



Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, Universidad de Concepción.

COMPARACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ADAPTACIÓN EN CEPAS CLÍNICAS DE *HELICOBACTER PYLORI*.

Seminario de Título presentado a la Facultad de Ciencias Naturales y oceanográficas

Para optar al título de biólogo

Hans Maximiliano Luchsinger Montecinos.

Concepción, Abril, 2025



Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Prof. Guía

Dra. Apolinaria Garcia Cancino _____

Prof. Evaluador

Dr. Victor Campos Araneda _____

Prof. Evaluador

Dr. Italo Fernández Fonseca _____

Prof. Coordinador de Seminario de Título

Dr. Victor Hernández Santander _____

Concepción, Abril, 2025.

Agradecimientos.

Agradezco a todo el Departamento de Microbiología, por ayudarme a realizar este trabajo, que ha sido un gran esfuerzo, donde se me ha apoyado en momentos de frustración constante, la cual podía estar presente por semanas. Así como agradezco a todos aquellos que me han apoyado también fuera de la universidad, tales como amigos, profesores y mi pareja por su ayuda.

Agradezco especialmente a mi profesora guía la Dra. Apolinaria García por darme la oportunidad de poder trabajar dentro del laboratorio, así como darme ánimos y señalar mis errores de una forma que solo puedo calificar como amorosa y motivadora, razón por lo cual he logrado progresar y mejorar a través de estos años a pesar del cansancio o la frustración, solo puedo desearle que siga así en su gran labor.

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional durante todo este proceso, que han sido una serie de desafíos grandes, tanto emocionales como económicos, pero que siempre han estado ahí detrás apoyándome.

Y, por último, pero lo más importante, le dedico este trabajo a mi Mamá y a mi Papá quienes se han esforzado y sacrificado más que nadie para poder lograr este trabajo, por lo que no puedo hacer más que agradecerles con todo por su apoyo, muchas gracias a todos.

Índice de Contenidos:

1. Resumen	Página 8
2. Abstract	Página 9
3. Introducción.	Página 10
4. Características de <i>Helicobacter pylori</i> y su importancia.....	Página 10
5. Tratamientos actuales.....	Página 11
6. Importancia de la biopelícula en <i>H. pylori</i>	Página 12
7. Modificación morfología bacilar-cocoide	Página 13
8. Ingreso de <i>H. pylori</i> a levaduras.....	Página 14
9. Pregunta de investigación	Página 16
10. Hipótesis.	Página 16
11. Objetivo general.....	Página 16
12. Objetivos específicos	Página 16
13. Materiales y métodos	Página 17
14. Resultados	Página 21
15. Discusión	Página 32
16. Conclusiones.....	Página 35
17. Imágenes	Página 27
18. Anexo	Página 36
19. Citas bibliográficas.....	Página 37

Índice de Tablas:

1. Tabla N°1: Clasificación de las cepas según producción de biopelículasPágina 19
2. Tabla N°2: Esquema de clasificación de formación de biopelículas a las 24 horasPágina 22
3. Tabla N°3: Esquema de clasificación de formación de biopelículas a las 48 horasPágina 23
4. Tabla N°4: Esquema de tiempos en los que se observaron “cuerpos similares a bacterias” al interior de *C. albicans*Página 26

índice de gráficos.

1. Gráfico N°1. Formación de biopelículas 24 horas..... Página 22
2. Gráfico N°2. Formación de biopelículas 48 horas..... Página 23
3. Gráfico N°3. Evolución de la proporción de morfología cocoide..... Página 24

Índice de Imágenes:

1. Imagen N°1: Proceso de lavados en biopelículas Página 18
2. Imagen N°2: Proceso de tinción de Gram Página 20
3. Imagen N°3: Toma de muestra en fresco de cocultivo durante ensayo de ingreso entre cepas de *H. pylori* y *C. albicans* Página 21
4. Imagen N°4: Observación de la muestra en fresco durante el proceso de ingreso de *H. pylori* 7A a *C. albicans* ATCC 90028 después de 4 días - Página 27
5. Imagen N°5: Foto de *H. pylori* de cepa 7A de ensayo de ingreso a *C. albicans* ATCC 90028 día 4 Página 28
6. Imagen N°6: Foto de *H. pylori* de cepa 13C de ensayo de ingreso a *C. albicans* ATCC 90028 día 4Página 29
7. Imagen N°7: Foto de *H. pylori* de cepa 14A de ensayo de ingreso a *C. albicans* ATCC 90028 día 4 Página 30
8. Imagen N°8: Foto de *H. pylori* de cepa 19A de ensayo de ingreso a *C. albicans* ATCC 90028 día 4 Página 30
9. Imagen N°9: Foto de *H. pylori* de cepa 61A de ensayo de ingreso a *C. albicans* ATCC 90028 día 2Página 31

Resumen.

Helicobacter pylori es una bacteria cosmopolita, con una presencia bastante amplia a lo largo y ancho de Chile, estando presente en todas las regiones. Según reportes, en Chile esta bacteria llega a tener una prevalencia de hasta 73% en adultos asintomáticos, este patógeno está asociado con diversas patologías gástricas, como lo es la gastritis, la enfermedad péptica ulcerosa, adenocarcinoma y linfoma del tejido linfoide asociado a mucosa gástrica, además de ser un patógeno clasificado como factor carcinógeno de clase 1 para el cáncer gástrico.

Sabiendo que en Chile la principal causa de muerte es el cáncer con un total del 28,8% de las muertes producidas el 2019, junto con la prevalencia que posee este patógeno en el país que varía entre 40% y 70%, nos deja con un panorama preocupante para la salud de la población.

De esta situación nace la necesidad de darle un seguimiento a este patógeno, con el objetivo de poseer más información sobre este. De esa forma lograr realizar tratamientos más adecuados a los casos actuales.

Para cumplir esto, debemos tener el conocimiento necesario de cómo actúan los mecanismos de adaptación de esta bacteria y si varían de forma sus mecanismos de adaptación, ya que se ha observado un considerable incremento en su resistencia a los antibióticos, lo que estaría dificultando su correcta erradicación.

Por eso, en el presente trabajo tiene como objetivo analizar los mecanismos de adaptación de *H. pylori*, con el fin de observar si las cepas poseen variabilidad en sus mecanismos adaptativos más efectivos, para eso se evaluó su capacidad de formar biopelículas, su capacidad de cambiar su morfología de bacilar-cocoide, y su capacidad de ingresar a levaduras.

Se observaron variaciones entre las cepas en 2 mecanismos correspondiendo a la capacidad de formación de biopelículas a las 48 horas y a la capacidad de cambiar su morfología a cocoide observándose diferentes proporciones de cocoide a través de los días observando cepas más sensibles al estrés que otras, mientras que en el ingreso a *C. albicans* sólo una cepa tuvo variaciones en el tiempo de ingreso. Indicando que las cepas si logran presentar variabilidad en sus mecanismos de adaptación, sugiriendo que la variación de estos mecanismos aparenta ser una respuesta con el fin de sobrevivir al estrés ambiental a través del tiempo.

Abstract.

Helicobacter pylori is a cosmopolitan bacterium with a fairly widespread presence throughout Chile, present in all regions. According to reports, this bacterium has a prevalence of up to 73% in asymptomatic adults in Chile. This pathogen is associated with various gastric pathologies, such as gastritis, peptic ulcer disease, adenocarcinoma, and lymphoma of the gastric mucosa-associated lymphoid tissue. It is also classified as a class 1 carcinogen for gastric cancer.

Knowing that cancer is the leading cause of death in Chile, accounting for 28.8% of deaths in 2019, along with the prevalence of this pathogen in the country, which varies between 40% and 70%, leaves us with a worrying outlook for the health of the population.

This situation creates the need to monitor this pathogen in order to obtain more information. This will allow us to develop more appropriate treatments for current cases.

To achieve this, we must have the necessary knowledge of how this bacteria's adaptive mechanisms work and whether these mechanisms vary, as a considerable increase in its resistance to antibiotics has been observed, which could be hindering its successful eradication.

Therefore, the present study aims to analyze the adaptive mechanisms of *H. pylori*, in order to observe whether strains exhibit variability in their most effective adaptive mechanisms. To this end, we evaluated their ability to form biofilms, their ability to change their bacillary-cocci morphology, and their ability to penetrate yeasts. Variations were observed between strains in two mechanisms, corresponding to the ability to form biofilms at 48 hours and the ability to change their morphology to coccoid, observing different proportions of coccoid over the days, observing strains more sensitive to stress than others, while in the entry to *C. albicans* only one strain had variations in the entry time. Indicating that the strains do manage to present variability in their adaptation mechanisms, suggesting that the variation of these mechanisms appears to be a response in order to survive environmental stress over time.

Introducción.

Características de *Helicobacter pylori* y su importancia.

El género *Helicobacter*, al cual pertenece *Helicobacter pylori*, son un grupo de bacterias Gram negativas, poseen una estructura en forma de espiral, miden de 2,5 – 5,5 micras de largo y de 0,5 – 1,0 micra de ancho y poseen de cuatro a ocho flagelos monopares con una recubierta lipídica con la aparente función de otorgar protección a los flagelos de la degradación por el medio ácido del estómago, estos flagelos le otorgan movilidad y le permite adherirse al epitelio gástrico. Las bacterias del género *Helicobacter*, poseen un crecimiento lento, cuyo periodo de incubación oscila de los 4 días a 8 días en un ambiente a 37°C con una atmósfera microaerofílica, al realizar pruebas enzimáticas se pueden clasificar como catalasa, oxidasa y ureas positivas, enzimas que favorecen su colonización en el medio estomacal (Geis et al. 1993; Goodwin et al. 1989; Lee et al. 1992; Shen et al. 1997).

En los análisis con respecto a la presencia de este patógeno se estima que alrededor de un 44,3 % de la población mundial estaría infectada con este patógeno (Zamani et al. 2018), este porcentaje asciende en países en vías de desarrollo (De Martel et al. 2012; Suerbaum and Michetti 2002). Su incidencia está relacionada con el nivel socioeconómico de cada región, así como con su higiene (Hooi et al. 2017). En Chile, la prevalencia de infección varía entre 40% y 70%, según la Organización Mundial de Gastroenterología (WGO) y los informes de algunos estudios nacionales (Hunt et al. 2011; Otth et al. 2011).

H. pylori está asociada a diversas patologías gástricas tales como gastritis, enfermedad péptica ulcerosa, 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. 2022; Tsay and Hsu 2018).

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, Heseltine, and Vainio 1995).

En Chile el cáncer es la principal causa de muerte con 28,8% de las muertes ocurridas en Chile el 2019, con un total de 32.568 muertes, mostrando un incremento con respecto al 2009 en el que era 26,8% con 24.488 muertes, además de que las enfermedades digestivas corresponden a una tasa de muerte del 7,45% con un total de 8.854 muertes en 2019 (Martínez-Sanguinetti et al. 2021).

Tratamientos actuales.

En la actualidad existen distintos esquemas de erradicación siendo la terapia triple estándar basado en inhibidores de bomba de protones y la combinación de al menos 2 antibióticos por al menos 14 días, cada uno con diferente eficacia (Villalón et al. 2020). Este régimen es utilizado como el primer recurso para el tratamiento de la infección; sin embargo, en casos de fracaso a la primera línea de tratamiento, se recomienda la cuadriterapia basada en bismuto como una opción de segunda línea reemplazando amoxicilina por tetraciclina. En nuestro medio, con este esquema, se logra una tasa de erradicación del 85% (Villalón et al. 2020).

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 (Calvo and Martínez-Martínez 2009; Sholeh et al. 2023).

H. pylori posee múltiples mecanismos para lograr sobrevivir al ambiente gástrico como lo es la generación de biopelículas, logrando disminuir su susceptibilidad a los antibióticos. Volviéndose un mecanismo que le permite prevalecer por extensos periodos de tiempo en la mucosa gástrica (Baj et al. 2020; Yonezawa, Osaki, and Kamiya 2015a). Otro mecanismo que *H. pylori* posee es la capacidad de modificar su morfología a un estado cocoide en condiciones desfavorables, que es definido como un estado viable pero no cultivable, por lo que el tratamiento podría llegar a inducir la formación de este estado, en el que son capaces de sobrevivir durante extensos periodos de tiempo, conllevando a la recrudescencia de la infección

(Sarem and Corti 2015). Además de que el estrés provocado por antibióticos como la amoxicilina inducen el proceso de internalización de *H. pylori*, mecanismo que se ha demostrado que aumenta la resistencia a dicho antibiótico, sugiriendo que dicha interacción otorga protección a condiciones ambientales desfavorables (Hiengrach et al. 2022; Sánchez-Alonzo et al. 2021).

Para comprender las dificultades que presenta el tratamiento de la erradicación de *H. pylori*, nos hace falta describir los mecanismos que interfieren con su correcto tratamiento a través de antibióticos, tales como la producción de biopelículas, el cambio a morfología cocoide, y su capacidad de ingresar a levaduras como *C. albicans*.

Importancia de la biopelícula en *H. pylori*.

La biopelícula microbiana se define como un consorcio estructurado de células inmersas en una matriz autoproducida. Sin embargo, vale la pena mencionar que la biopelícula también puede incluir componentes del huésped, por ejemplo, fibrina, anticuerpos, plaquetas o leucocitos. Las biopelículas se pueden adherir a una superficie abiótica o biótica, pero también pueden constituir una estructura móvil no adherida que flota en caldo de cultivo o fluidos corporales. Debido a la proximidad de las células microbianas y sus interacciones físicas, metabólicas y sociales, el crecimiento de la biopelícula difiere del estilo de vida planctónico (Flemming et al. 2016; Høiby et al. 2015; Lebeaux, Ghigo, and Beloin 2014a; Paluch et al. 2020; Vestby et al. 2020).

El término “biopelícula” fue introducido por JW Costerton, en 1985, en un breve informe que presentaba fotografías microscópicas de microcolonias de *Pseudomonas aeruginosa* que residían en muestras de esputo de un paciente con fibrosis quística. Aunque la presencia de biopelículas tiene su aspecto positivo en muchos ecosistemas, estas estructuras también ejercen su impacto negativo en el sector biomédico (Ciofu et al. 2017; Lebeaux, Ghigo, and Beloin 2014b). Además, las células de la biopelícula tienen una sensibilidad menor a los factores físico-

químicos desfavorables y a la actividad del sistema inmunitario. La susceptibilidad reducida de las biopelículas resulta no solo de los procesos de tolerancia pasiva a los antimicrobianos (metabolismo disminuido, matriz que limita la penetración de los antibióticos o presencia de células persistentes), sino también de los procesos de aumento activo en el número de microorganismos resistentes (intensificación de transferencia horizontal de genes (HGT) o la inducción del estado hipermutable (Lebeaux et al. 2014b).

H. pylori es una de las causas más comunes de infección bacteriana en humanos y tiene la capacidad de formar biopelículas en el medio ambiente y en el epitelio de la mucosa gástrica humana, así como en superficies abióticas in vitro (Yonezawa, Osaki, and Kamiya 2015b).

En un estudio se observó que la formación de biopelículas aumentó los niveles de resistencia determinado por concentración mínima inhibitoria (MIC) hasta 8 veces para amoxicilina y 2 veces para metronidazol esto en la cepa TK1402 indicando que la formación de biopelículas si aumentan la resistencia a los componentes antimicrobianos (Yonezawa et al. 2019). Otro estudio también observó que la formación de biopelículas para aislamientos clínicos de *H. pylori* disminuyó la susceptibilidad a amoxicilina, metronidazol, eritromicina y tetraciclina (Attaran, Falsafi, and Ghorbanmehr 2017).

Modificación morfológica bacilar-cocoide.

Se ha reportado una forma no cultivable de *H. pylori* en donde algunos autores la han definido como la forma morfológica de muerte de la bacteria; sin embargo, en la actualidad se sabe que puede corresponder a una forma latente que está potencialmente relacionada con las formas de transmisión de *H. pylori* (Santiago, Moreno, and Ferrús 2015) y con la recaída de una paciente post terapia antibiótica (Ierardi et al. 2020). Esta capacidad se ve relacionada a su vez con la formación de biopelícula 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. 2020); sin embargo, se cree que *H. pylori* tiene los mecanismos para revertirlo (Gladyshev, Taame, and Kravtsov 2020; Ierardi et al. 2020; Sarem and Corti 2015). 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 y su capacidad para pasar a morfología cocoide mediante cultivos prolongados.

Ingreso de *H. pylori* a levaduras.

Candida albicans es una de las levaduras comensal más comunes en el cuerpo humano de individuos sanos, y el principal patógeno fúngico que causa alta mortalidad en poblaciones de riesgo, principalmente en pacientes inmunocomprometidos (D'Enfert et al. 2020; Yamaoka 2010).

Se ha descubierto que *H. pylori* se encuentra al interior de *C. albicans*, observándose "cuerpos similares a bacterias" en movimiento al interior de las vacuolas de *C. albicans* de origen gástrico y se identificaron como *H. pylori* mediante PCR e inmunofluorescencia (Cheng et al. 2012). Otro hallazgo señala la detección de *H. pylori* en levaduras orales de estudiantes de una universidad chilena (Palencia, García, and Palencia 2021). *C. albicans* portando a *H. pylori* además de estar presente en los humanos, se encuentra de forma abundante en flores, frutas, miel y abejas (Sánchez-Alonzo et al. 2020).

La frecuencia de *C. albicans* invadida por *H. pylori* en la cavidad oral de los bebés nacidos normalmente es mayor que la de los nacidos por cesárea. Lo que indica que la vagina es un reservorio principal para transmitir *H. pylori* a los recién nacidos a través de su cavidad oral (Siavoshi and Saniee 2014a).

H. pylori infecta el epitelio gástrico del estómago, lugar donde se ha descrito la coexistencia entre *C. albicans* y *H. pylori*, lo que se ha asociado a un efecto sinérgico en la patogénesis de la úlcera (Siavoshi and Saniee 2014b).

Se registra que levaduras invadidas con *H. pylori* son capaces de sobrevivir a alta exposición de temperatura, sequedad y los antibióticos. *H. pylori* muestra un estado de movimiento activo bajo estas condiciones, lo que sugiere que la internalización de *H. pylori* en *C. albicans* puede proteger a la bacteria de las condiciones estrictas (Siavoshi et al. 2018).

Se ha observado que *H. pylori* intravacuolar de *C. albicans* al ser administrado en modelo de ratones lograron inducir infección gástrica, infiltración de células inflamatorias y daño tisular, sugiriendo una posible infección desde células intravacuolares (Hiengrach et al. 2022).

Pregunta de investigación.

¿Presentarán las cepas de *H. pylori* de aislamiento clínico variedad en la eficacia de sus mecanismos de adaptación?

Hipótesis.

Las cepas clínicas de *H. pylori*, presentan una variedad en la eficacia de sus mecanismos de adaptación.

Objetivo general.

Determinar la eficacia de los mecanismos de adaptación de cepas de *H. pylori* de aislamiento clínico.

Objetivos específicos.

- 1) Determinar la capacidad de formación de biopelículas en cepas clínicas de *H. pylori*.
- 2) Determinar la capacidad de modificación de forma bacilar-cocoide en cepas clínicas de *H. pylori*.
- 3) Determinar la capacidad de ingreso a levaduras de cepas clínicas de *H. pylori*.

Materiales y métodos.

Cultivo de las cepas de *H. pylori* y de *C. albicans* ATCC 90028

Las cepas microbianas utilizadas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción. Se cultivaron las cepas clínicas 7A, 13C, 14A, 19A y 61A de *H. pylori* a analizar, sobre placas de agar Columbia (Oxoid, Basingstoke, UK.) suplementado con 5% de sangre de caballo más un inhibidor de los microorganismos acompañantes DENT (Oxoid, UK.). Luego fueron incubadas a 37° C durante ocho días en condiciones microaerobiosis (10% CO₂, 90% de humedad).

El cultivo de *C. albicans* ATCC 90028 se realizó sobre placas con Agar Sabouraud Dextrosa, suplementado con Cloranfenicol (Oxoid, Basingstoke, UK), incubando a 37° C por 24 horas en condiciones de aerobiosis.

Prueba de formación de biopelículas.

Para la evaluación de formación de biopelículas 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 para evaluar la formación de biopelículas de *H. pylori*, cada pocillo posee un cubreobjeto 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 a un Mcfarland 2 (6×10^8 CFU/ml). Cada cepa se evaluó por triplicado para obtener un promedio de estas mediciones. Se incluyó un control negativo que consistirá únicamente en caldo de Brucella. Las placas se incubaron a 37°C en condiciones de microaerobiosis, se evaluó la formación de biopelículas a las, 24 y 48 h. Para la medición se retiraron las células planctónicas mediante aspiración y se procedió a lavar el pocillo tres veces con PBS, posterior a esto se dejaron secar al aire durante 10 minutos. Las bacterias adheridas a la superficie dispuesta 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, luego se procedió a realizar 4 lavados con PBS para retirar el exceso de cristal violeta no adherido. El colorante adherido se solubilizo en 800 µl de mezcla etanol acetona (80:20) y se leyó la densidad óptica (DO) a 590 nm.

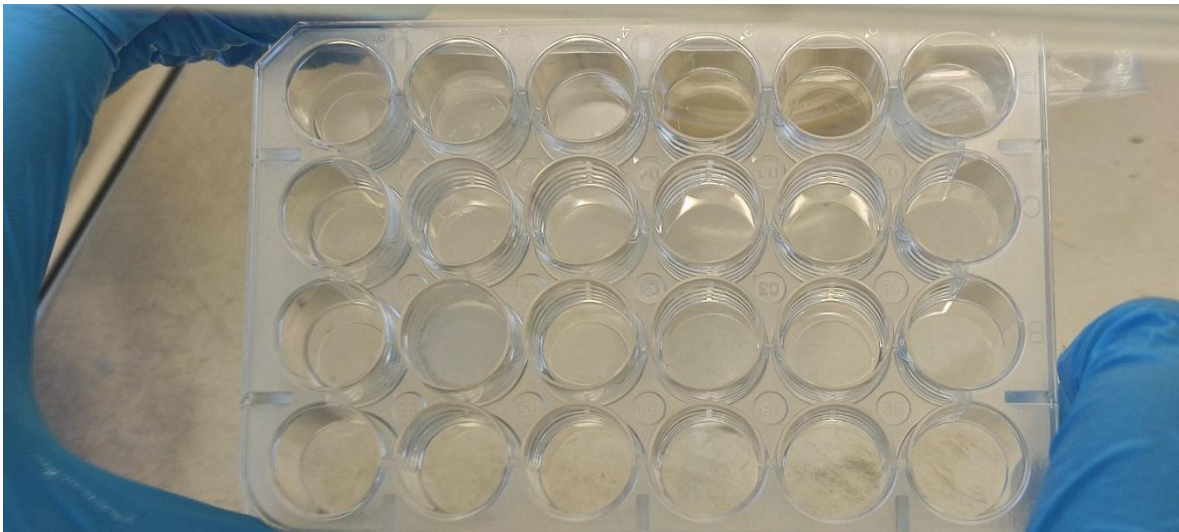


Imagen N°1. Proceso de lavados en biopelículas donde se realizaba cada pocillo un triplicado técnico, se aprecia una biopelícula abundante, comportamiento inusual en *H. pylori*, indicativo de una posible contaminación en el pocillo.

Los resultados de las mediciones de cada cepa son expresados como DO, se estableció una DO de corte (DO_c) de la siguiente manera:

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

SDcontrol negativo: Desviación estándar

Se consideraron como formadoras de biopelículas siguiendo las siguientes consideraciones:

Tabla N°1: Clasificación de las cepas según producción de biopelículas. Siguiendo las recomendaciones de Stepanović y colaboradores (Stepanović et al. 2007)

Clasificación	DO
No productor (0)	$DO \leq DOc$
Productor débil (+)	$DOc \leq DO \leq 2xDOc$
Productor moderado (++)	$2xDOc \leq DO \leq 4xDOc$
Productor fuerte (+++)	$DO > 4xDOc$

Prueba de transformación de bacilar a cocoide.

Para inducir la transformación de morfología bacilar a cocoide se realizaron cultivos prolongados sobre placas de agar Columbia (Oxoid, Basingstoke, UK.) suplementado con 5% de sangre de caballo siendo cultivados incubados a 37° C durante diez días en condiciones de microaerobiosis (10% CO₂, 90% de humedad). y se evaluó la morfología con tinción de Gram y microscopía óptica realizando conteos de al menos 100 células en total por cada campo de observación examinado, se realizaron 10 campos de observación por día evaluado por un periodo de 240 horas, comenzando la evaluación a las 72 horas y continuando cada 24 horas evaluando las horas 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 y 240.

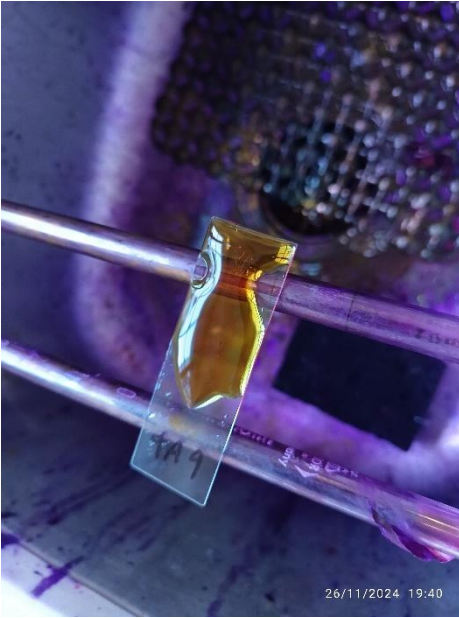


Imagen N°2. Proceso de tinción de Gram.

Prueba de ingreso a levaduras.

Se realizó un ensayo de ingreso en placas well mediante estrés nutricional con solución salina al 0,89%, aplicando 500 μL de solución de *H. pylori* en una concentración McFarland 3 (9.0×10^8 CFU/mL) y 500 μL de solución de *C. albicans* ATCC 90028 en una concentración McFarland 3 (9.0×10^8 CFU/mL) durante 144 horas en la incubadora a 37°C en condiciones de microaerobiosis.

A continuación, se evaluó la capacidad de ingreso a las levaduras observándose el progreso cada 48 horas y observándose múltiples campos a través de muestras en fresco evaluando la presencia de cuerpos similares a bacterias presentes al interior de las levaduras mediante microscopia óptica, comparando la presencia o ausencia en relación con cada cepa cada 48 horas respectivamente.

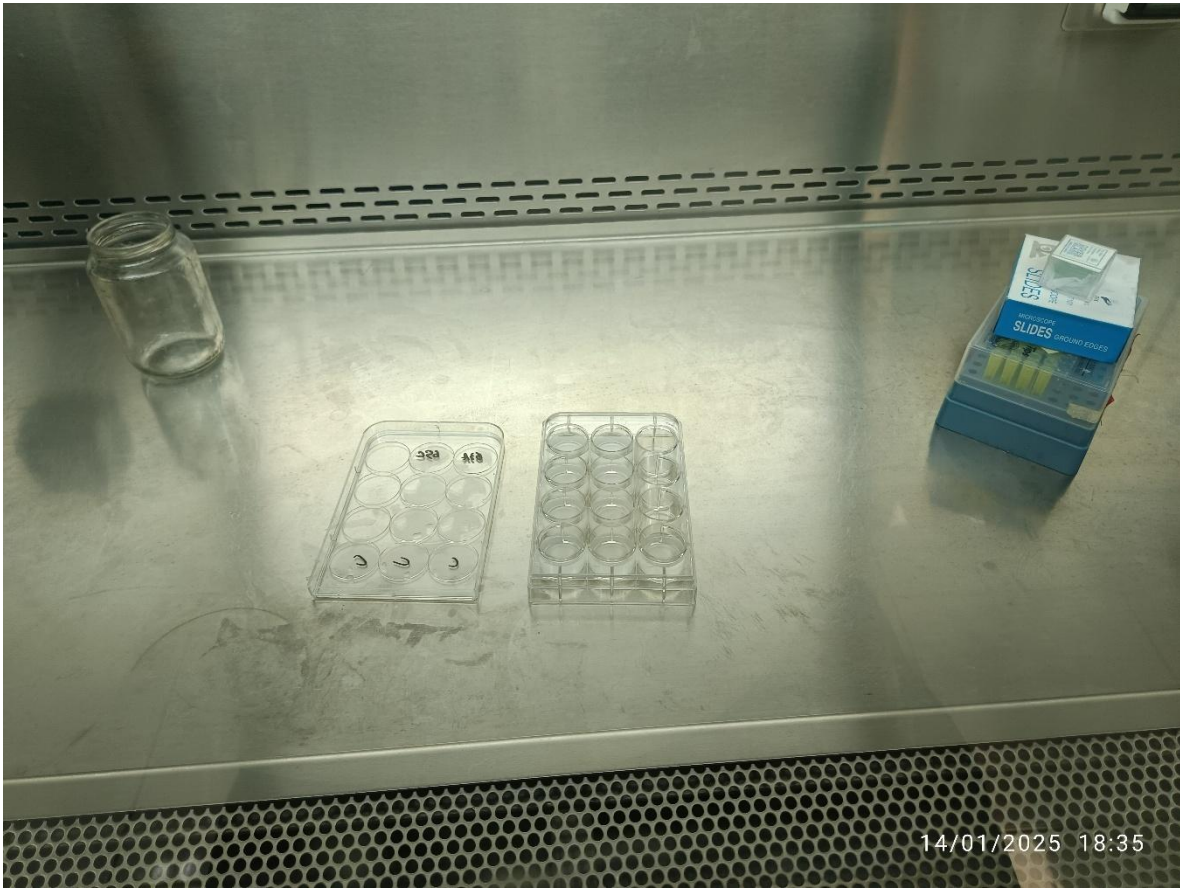


Imagen N°3. Toma de muestra en fresco de cocultivo durante ensayo de ingreso entre cepas de *H. pylori* y *C. albicans*.

Resultados.

Prueba de formación de biopelículas.

En el ensayo se evaluó la capacidad que poseen las cepas de *H. pylori* de formar una biopelícula en periodos de 24 y 48 horas respectivamente, los análisis se realizaron por triplicado biológico y triplicado técnico, mediante la técnica de análisis con cristal violeta con espectrofotómetro con una densidad óptica (DO) de 590 nm, clasificándose en relación a la densidad óptica del control en 4 categorías, no formadora, formadora débil, formadora moderada y formadora fuerte.

Los resultados fueron:

Tabla N°2. Esquema de clasificación de formación de biopelículas a las 24 horas.

Cepas	Clasificación de biopelícula 24h
7A	Formadora fuerte
13C	Formadora moderada
14A	Formadora moderada
19A	Formadora moderada
61A	Formadora moderada

Formación biopelículas 24h

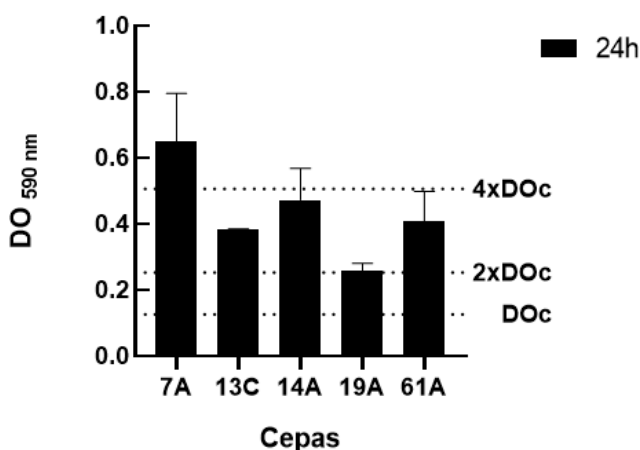


Gráfico N°1. Gráfico de los resultados de la formación de biopelículas comparado con el DOc mostrando su categoría de formación de biopelículas a las 24 horas.

Tabla N°3. Esquema de clasificación de formación de biopelículas a las 48 horas.

Cepas	Clasificación de biopelícula 48h
7A	Formadora fuerte
13C	Formadora moderada
14A	Formadora fuerte
19A	Formadora débil
61A	Formadora moderada

Formación de biopelículas 48h

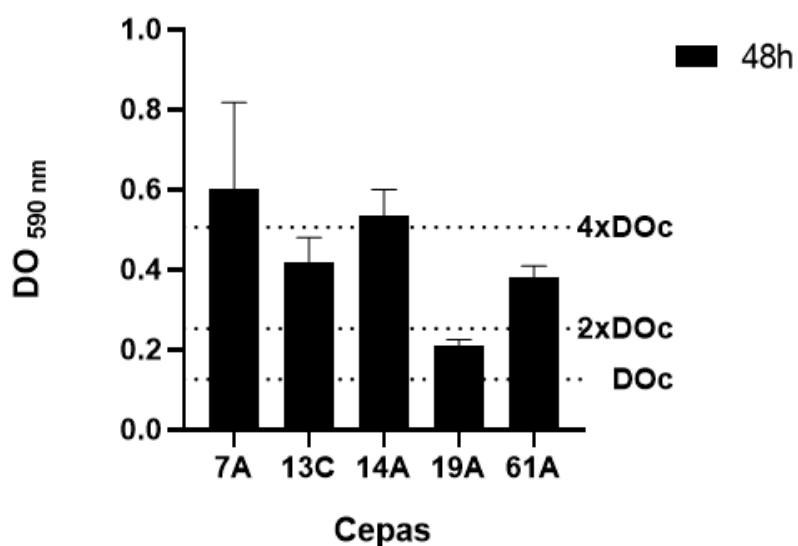


Gráfico N°2. Gráfico de los resultados de la formación de biopelículas comparado con el DOc mostrando su categoría de formación de biopelículas a las 48 horas.

En los resultados obtenidos, se puede observar una formación moderada de biopelícula por parte de la mayoría de las cepas, con excepción de la cepa 7A que resulta ser una formadora fuerte en las primeras 24 horas, mientras que el resultado presenta algo más de variación a las 48 horas, observándose la 7A y la 14A como formadoras fuertes, mientras que la 19A paso a ser una formadora débil a las 48 horas. La biopelícula da la capacidad de aumentar la resistencia a los antibióticos, logrando una mayor probabilidad de supervivencia acorde a la capacidad de producir biopelículas y así evitando condiciones estresantes de manera efectiva.

Prueba morfología bacilar – cocoide.

Para evaluar la morfología bacilar cocoide se evaluó con tinción de gran y mediante microscopia óptica, evaluando desde las 72 horas y continuando cada 24 horas evaluando las horas 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 y 240, mediante 10 campos por observación, de esta forma se realizó una matriz de datos por cepas, por días y cada día por campos, estos datos fueron acomodados y analizados mediante bioestadística utilizando un modelo lineal generalizado mixto con distribución binominal, permitiendo anidar datos como días y cepas, creando una jerarquía a la hora de realizar el análisis, siendo adecuado para un análisis que implica 2 categorías como lo es la morfología bacilar y la morfología cocoide.

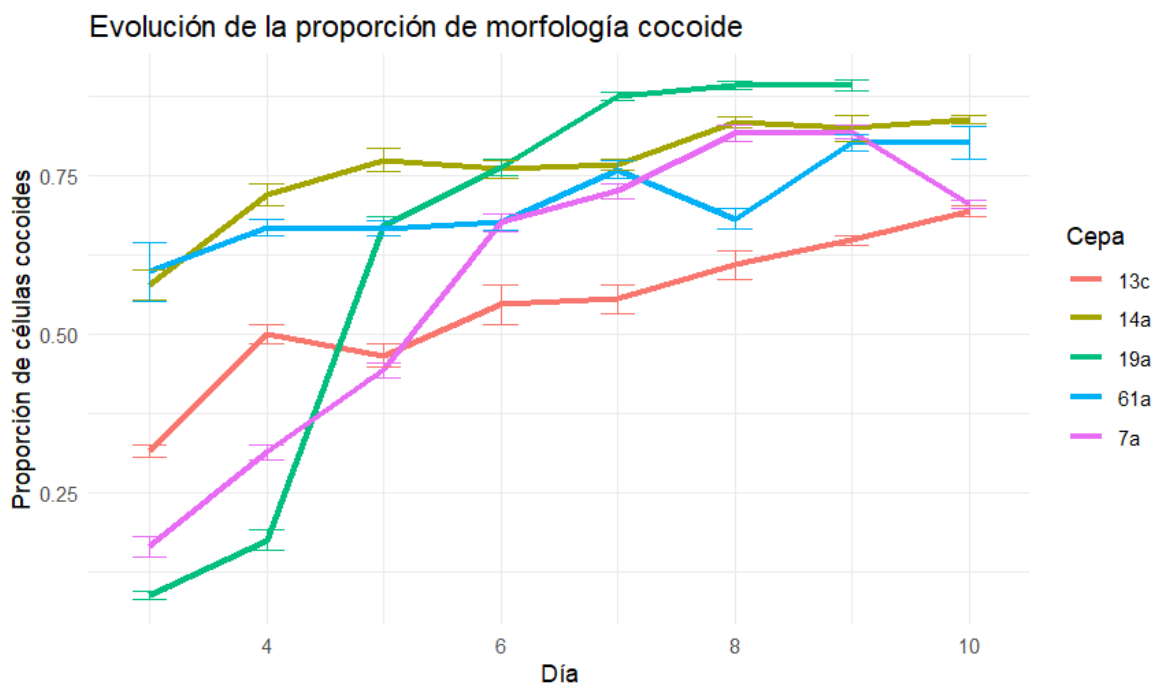


Gráfico N°3. Este grafico nos muestra la evolución de la proporción de cepas de *H. pylori* con morfología cocoide a través de los días, observándose también los gráficos de cajas que muestran el intervalo que abarcan en los días, mediante gráficos de cajas en conjunto con el grafico lineal.

Este grafico nos muestra la evolución que presentaron las cepas al ser evaluadas a través de los días observándose como la cepa 19A presenta la menor proporción de morfologías cocoides al inicio, subiendo abruptamente al día 5 y comenzar a estabilizar su proporción de cocoides, mientras que cepas como la 14A presenta una elevada proporción de morfologías cocoides desde el día 3 indicando una alta sensibilidad al estrés en cortos periodos de tiempo, así como la cepa 61A también posee una sensibilidad al estrés, observándose aumentos menores a lo largo del tiempo, mientras que la cepa 13C es en la que se observa una mayor prevalencia de la morfología bacilar a lo largo del tiempo y por lo tanto una mayor resistencia al estrés ambiental.

Dentro del ensayo se observaron diversos comportamientos, indicando que tendencia es aumentar la morfología cocoide a lo largo del tiempo, este cambio no sucede al mismo ritmo ente cada cepa de *H. pylori*, observándose casos donde el evento sucede de manera temprana y que en otros se desarrolla de manera tardía, aumentando la concentración conforme pasan los días, por lo que, podemos afirmar que en la morfología existe una variación en el ritmo con el que cada cepa logra modificar su morfología de bacilar a cocoide.

Ingreso a levaduras.

En este ensayo se evaluó la capacidad que cada cepa posee de ingresar a la levadura a través del tiempo, utilizando como agente estresor el estrés nutricional para inducir el ingreso, posterior al experimento se realizaron registros buscando a través de muestras en fresco “cuerpos similares a bacterias”, acorde que día sucedió el ingreso.

Tabla N°4. Esquema de tiempos en los que se observaron “cuerpos similares a bacterias” al interior de *C. albicans*.

Ingreso en 48 horas	Ingreso en 96 horas
	7A
	13C
	14A
	19A
61A	



Imagen N°4. Observación de la muestra en fresco durante el proceso de ingreso de *H. pylori* 7A a *C. albicans* ATCC 90028 después de 4 días.

Imágenes.

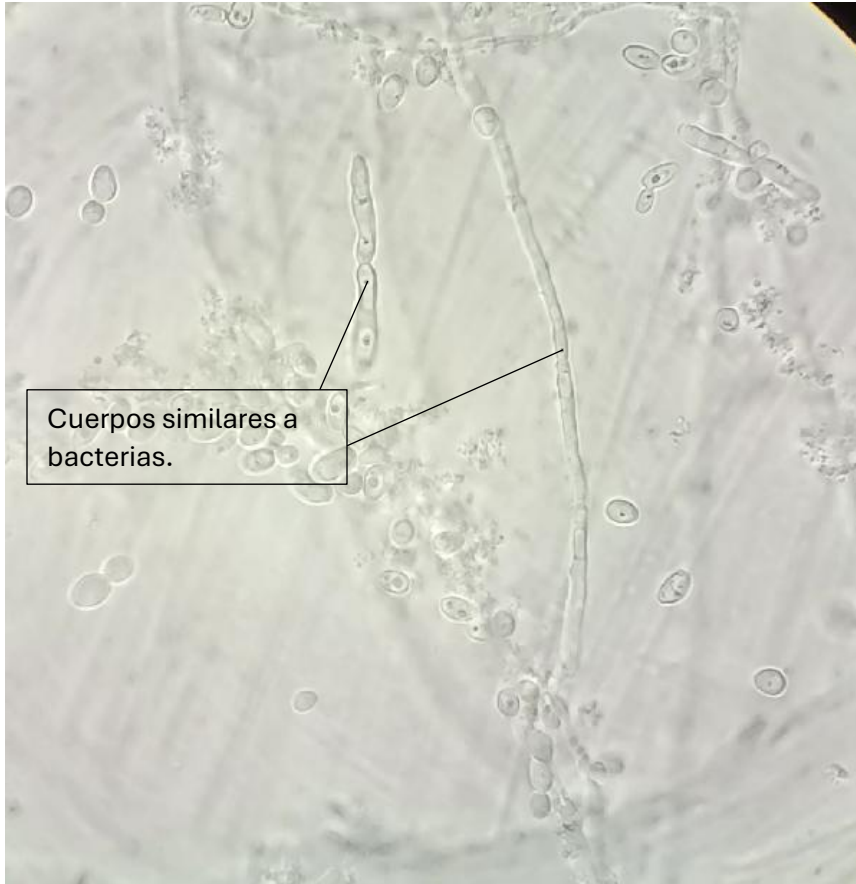


Imagen N°5. Foto de *H. pylori* de cepa 7A de ensayo de ingreso a *C. albicans* ATCC 90028 día 4.

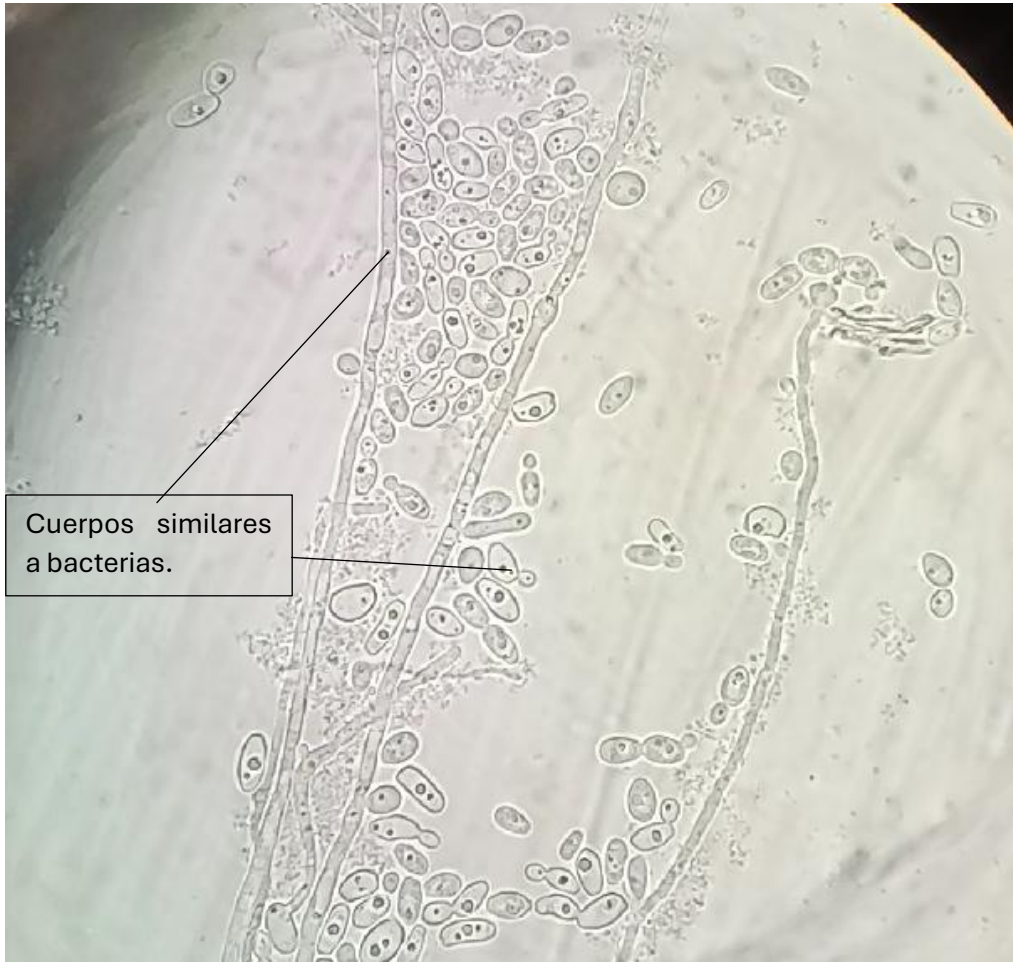


Imagen N°6. Foto de *H. pylori* de cepa 13C de ensayo de ingreso a *C. albicans* ATCC 90028 día 4.

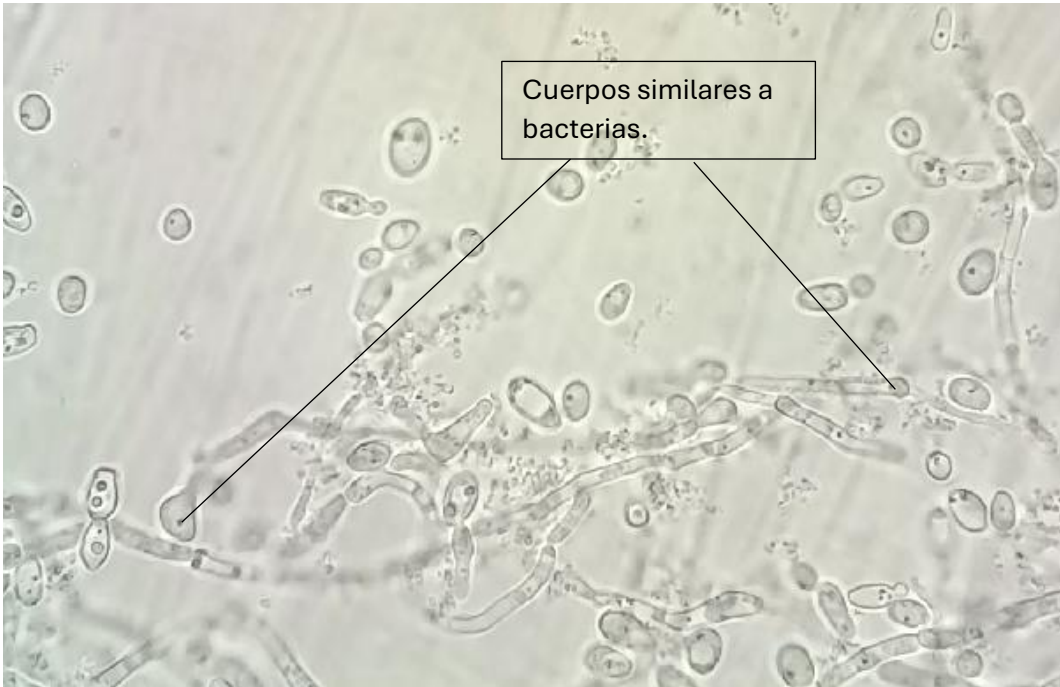


Imagen N°7. Foto de *H. pylori* de cepa 14A de ensayo de ingreso a *C. albicans* ATCC 90028 día 4.

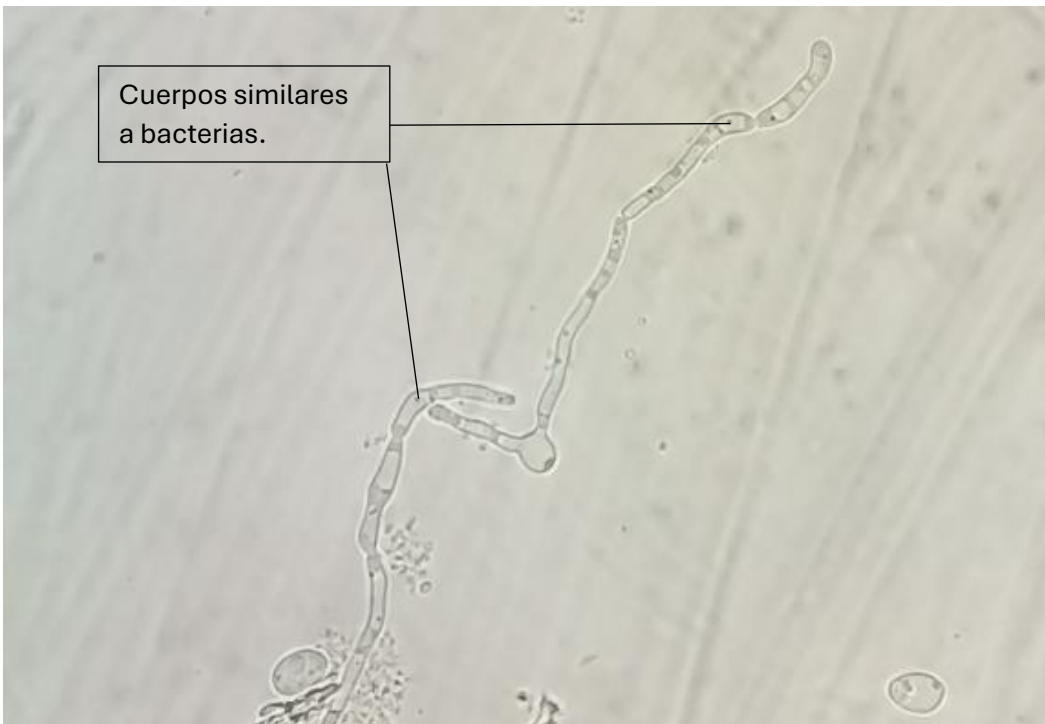


Imagen N°8. Foto de *H. pylori* de cepa 19A de ensayo de ingreso a *C. albicans* ATCC 90028 día 4.

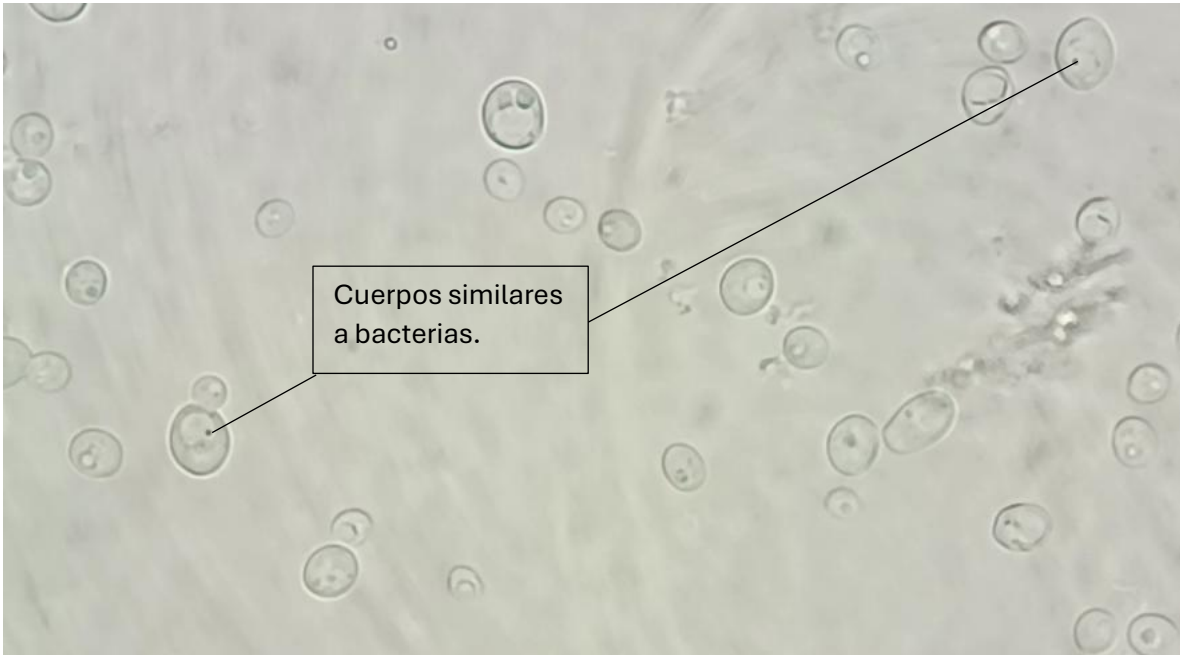


Imagen N°9. Foto de *H. pylori* de cepa 61A de ensayo de ingreso a *C. albicans* ATCC 90028 día 2.

Discusión.

En este trabajo, al evaluar estos mecanismos de adaptación, nos surgen una serie de preguntas, como puede ser el caso de la morfología bacilar- cocoide, donde si bien se evalúa la capacidad y la velocidad con la cual cada cepa pasa de una proporción bacilar a una proporción cocoide, un estado donde el metabolismo disminuye de forma considerable, y considerado un estado de aparente latencia bacteriana y un aumento en la resistencia, apuntan a ser un mecanismo de emergencia para la célula (Gladyshev et al. 2020; Ierardi et al. 2020; Sarem and Corti 2015), lo que nos indicaría una posible mayor sensibilidad a las condiciones ambientales por parte de las cepas 61A y 14A debido a su rápido cambio de morfología en proporciones abundantes desde el día 3 y observándose variaciones considerables en la gráfica entre las proporciones cocoides; sin embargo, una complicación que presenta la metodología, es que no nos permite averiguar la cantidad de células que estén viables dentro de ambas morfologías, debido a que pueden presentarse morfologías en estado tanto bacilar como cocoide, pero que tengan sus membranas comprometidas y por lo tanto no sean viables como tal, una forma de arreglar esta problemática sería mediante tinción life death, que nos permite observar la integridad de la membrana y poder realizar conteos de manera que se pueda asignar que los grupos presenten una viabilidad.

Otro mecanismo de resistencia como lo es la formación de biopelículas, mecanismo que se ha observado que tiene una participación evidente en la resistencia a los antibióticos y a condiciones estresantes, posibilitando su supervivencia incluso en el medio ambiente, así como un intercambio de material dentro de las biopelículas (Baj et al. 2020; Yonezawa et al. 2015a). El ensayo una de las grandes dificultades que posee, es la formación de finas biopelículas por parte de *H. pylori*, volviendo el proceso bastante sensible al manejo del operador, lo que facilita la formación de posibles errores en la medición, producto de la pérdida de la biopelícula durante el proceso de los lavados, motivo por el cual se utilizan categorías, con el fin de que a pesar de la posible pérdida, nos indique un resultado más cercano a la realidad. Otra medida para amortiguar el posible error de cuantificación fue el uso de

triplicados técnicos y biológicos, ayudando a reducir la cantidad de material perdido y poder recuperar mediante los análisis de múltiples muestras de manera simultánea, acercándonos más a un resultado más certero dentro de lo posible, lo que nos permitió observar que en las cepas trabajadas no presentan una diferencia en la formación de biopelículas en las 24 horas, observándose la única formadora fuerte, la cepa 7A, el mayor cambio se observó a las 48 horas, observándose una mayor variabilidad entre las cepas, presentando las cepas 7A, 14A como formadoras fuertes, mientras que la cepa 19A como formadora débil, lo que nos indica un comportamiento variable durante el tiempo.

El ingreso a *C. albicans* es un procedimiento crucial, donde *H. pylori* puede refugiarse de las condiciones estresantes al interior de la levadura, logrando refugiarse, incluso aumentando su resistencia a antibióticos y teniendo la capacidad de producir una recrudescencia en un paciente postratamiento

En el evento se observó un comportamiento similar a la hora de visualizar “cuerpos similares a bacterias”, observándose estos cuerpos principalmente a las 96 horas de haber realizado el ensayo de ingreso, con la única excepción de la cepa 61A, donde no se observaron intervalos de tiempo mayores durante el evento. Sugiriendo que la mayoría de las cepas poseen una capacidad idéntica a la hora de realizar el ingreso a *C. albicans* y de esta forma lograr refugiarse de condiciones adversas y estresante, otorgando la capacidad de supervivencia en el medio ambiente o incluso posibilitando la recrudescencia posterior a un tratamiento con antibióticos (Hiengrach et al. 2022, Siavoshi et al. 2018). Durante este ensayo, no se presentó una variabilidad alta durante el proceso de ingreso a la levadura, únicamente la cepa 61A posee una capacidad de observar ingreso a los 2 días, mientras que el resto, se observaron cuerpos, similares a bacterias desde el día 4. Lamentablemente en este ensayo lo que podemos observar es la posibilidad de ingreso en el tiempo, ya que hacen falta pruebas adicionales para confirmar de manera certera que los cuerpos observados son *H. pylori*; sin embargo, que se observen cuerpos si puede sugerir que llegue a ser *H. pylori*, ya que estos cuerpos se han presentado en ensayos anteriores donde se ha detectado la presencia de *H. pylori*

respectivamente, además de observarse un crecimiento de pseudohifas por parte de *C. albicans*, un proceso que también se ha observado al analizar la interacción entre estos 2 microorganismos.

Conclusiones.

Se evaluó la capacidad de formación de biopelículas en el periodo de 24 y 48 horas respectivamente, observándose una variación baja a las 24 horas, mientras que a las 48 horas se observa una mayor variabilidad entre las cepas.

En la capacidad de cambio de morfología bacilar-cocoide, se observó una gran variabilidad en la evolución de la proporción de morfologías a través de los días, tanto en la proporción inicial, como en el comportamiento a través de los días.

La capacidad de ingreso a levaduras no presentó una gran variabilidad en la capacidad de ingreso entre las cepas, únicamente en una cepa se observó el ingreso antes que las demás.

Por lo que las cepas si presentan variaciones en la efectividad de sus mecanismos de adaptación presentando mayor variación en la formación de biopelículas a las 48 horas y en el cambio de morfología bacilar-cocoide.

Anexo.

Enlace con acceso a las imágenes marcadas, fotos de ensayo de ingreso y datos recolectados de morfología bacilar-cocoide.

<https://drive.google.com/drive/folders/1Qr4BtsFfEwID39H2oLaYAKZiDV777EXt?usp=sharing>

Citas bibliográficas.

- Attaran, Bahareh, Tahereh Falsafi, and Nassim Ghorbanmehr. 2017. "Effect of Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Helicobacter Pylori* on the Efflux-Mediated Resistance to Commonly Used Antibiotics." *World Journal of Gastroenterology* 23(7):1163. doi: 10.3748/WJG.V23.I7.1163.
- Baj, Jacek, Alicja Forma, Monika Sitarz, Piero Portincasa, Gabriella Garruti, Danuta Krasowska, and Ryszard Maciejewski. 2020. "Helicobacter Pylori Virulence Factors—Mechanisms of Bacterial Pathogenicity in the Gastric Microenvironment." *Cells* 10(1):27. doi: 10.3390/CELLS10010027.
- Bravo, Denisse, Anilei Hoare, Cristopher Soto, Manuel A. Valenzuela, and Andrew Fg Quest. 2018. "Helicobacter Pylori in Human Health and Disease: Mechanisms for Local Gastric and Systemic Effects." *World Journal of Gastroenterology* 24(28):3071. doi: 10.3748/WJG.V24.I28.3071.
- Calvo, Jorge, and Luis Martínez-Martínez. 2009. "Mecanismos de Acción de Los Antimicrobianos." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27(1):44–52. doi: 10.1016/J.EIMC.2008.11.001.
- Cheng, Shih Chin, Leo A. B. Joosten, Bart Jan Kullberg, and Mihai G. Netea. 2012. "Interplay between *Candida Albicans* and the Mammalian Innate Host Defense." *Infection and Immunity* 80(4):1304–13. doi: 10.1128/IAI.06146-11/ASSET/7C16DCED-3B07-4B0F-A02C-70F2104ECC99/ASSETS/GRAPHIC/ZII9990995880003.JPEG.
- Ciofu, Oana, Estrella Rojo-Molinero, María D. Macià, and Antonio Oliver. 2017. "Antibiotic Treatment of Biofilm Infections." *APMIS* 125(4):304–19. doi: 10.1111/APM.12673.
- D'Enfert, Christophe, Ann Kristin Kaune, Leovigildo Rey Alaban, Sayoni Chakraborty, Nathaniel Cole, Margot Delavy, Daria Kosmala, Benoît Marsaux, Ricardo Fróis-Martins, Moran Morelli, Diletta Rosati, Marisa Valentine, Zixuan Xie, Yoan Emritloll, Peter A. Warn, Frédéric Bequet, Marie Elisabeth Bougnoux, Stephanie Bornes, Mark S. Gresnigt, Bernhard Hube, Ilse D. Jacobsen, Mélanie Legrand, Salomé Leibundgut-Landmann, Chaysavanh Manichanh, Carol A. Munro, Mihai G. Netea, Karla Queiroz, Karine Roget, Vincent Thomas, Claudia Thoral, Pieter Van Den Abbeele, Alan W. Walker, and Alistair J. P. Brown. 2020. "The Impact of the Fungus-Host-Microbiota Interplay upon *Candida Albicans* Infections: Current Knowledge and New Perspectives." *FEMS Microbiology Reviews* 45(3):fuaa060. doi: 10.1093/FEMSRE/FUAA060.
- Dong, Kai, Hanxu Pan, Dong Yang, Lei Rao, Liang Zhao, Yongtao Wang, and Xiaojun Liao. 2020. "Induction, Detection, Formation, and Resuscitation of Viable but Non-Culturable State Microorganisms." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19(1):149–83. doi: 10.1111/1541-4337.12513.
- Flemming, Hans Curt, Jost Wingender, Ulrich Szewzyk, Peter Steinberg, Scott A. Rice, and Staffan Kjelleberg. 2016. "Biofilms: An Emergent Form of Bacterial Life." *Nature Reviews Microbiology* 2016 14:9 14(9):563–75. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94.

- Geis, G., S. Suerbaum, B. Forsthoff, H. Leying, and W. Opferkuch. 1993. "Ultrastructure and Biochemical Studies of the Flagellar Sheath of *Helicobacter Pylori*." *Journal of Medical Microbiology* 38(5):371–77. doi: 10.1099/00222615-38-5-371/CITE/REFWORKS.
- Gladyshev, Nikita, Maria Taame, and Viacheslav Kravtsov. 2020. "Clinical and Laboratory Importance of Detecting *Helicobacter Pylori* Coccoid Forms for the Selection of Treatment." *Przeгляд Gastroenterologiczny* 15(4):294. doi: 10.5114/PG.2020.101557.
- Goodwin, C. S., J. A. Armstrong, T. Chilvers, M. Peters, M. D. Collins, L. Sly, W. McConnell, and W. E. S. Harper. 1989. "Transfer of *Campylobacter Pylori* and *Campylobacter Mustelae* to *Helicobacter* Gen. Nov. as *Helicobacter Pylori* Comb. Nov. and *Helicobacter Mustelae* Comb. Nov., Respectively." *International Journal of Systematic Bacteriology* 39(4):397–405. doi: 10.1099/00207713-39-4-397/CITE/REFWORKS.
- Hiengrach, Pratsanee, Wimonrat Panpetch, Ariya Chindamporn, and Asada Leelahavanichkul. 2022. "Helicobacter Pylori, Protected from Antibiotics and Stresses Inside *Candida Albicans* Vacuoles, Cause Gastritis in Mice." *International Journal of Molecular Sciences* 23(15):8568. doi: 10.3390/IJMS23158568.
- Højby, N., T. Bjarnsholt, C. Moser, G. L. Bassi, T. Coenye, G. Donelli, L. Hall-Stoodley, V. Holá, C. Imbert, K. Kirketerp-Møller, D. Lebeaux, A. Oliver, A. J. Ullmann, C. Williams, ESCMID Study Group for Biofilms (ESGB), and Consulting External Expert Werner Zimmerli. 2015. "ESCMID* Guideline for the Diagnosis and Treatment of Biofilm Infections 2014." *Clinical Microbiology and Infection* 21(S1):S1–25. doi: 10.1016/J.CMI.2014.10.024/ASSET/88A6A05E-B63C-4F9C-80E7-0EA0357260E0/MAIN.ASSETS/GR10.JPG.
- Hooi, James K. Y., Wan Ying Lai, Wee Khoon Ng, Michael M. Y. Suen, Fox E. Underwood, Divine Tanyingoh, Peter Malfertheiner, David Y. Graham, Vincent W. S. Wong, Justin C. Y. Wu, Francis K. L. Chan, Joseph J. Y. Sung, Gilaad G. Kaplan, and Siew C. Ng. 2017. "Global Prevalence of *Helicobacter Pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis." *Gastroenterology* 153(2):420–29. doi: 10.1053/j.gastro.2017.04.022.
- Hunt, R. H., S. D. Xiao, F. Megraud, R. Leon-Barua, F. Bazzoli, S. van der Merwe, L. G. Vaz Coelho, M. Fock, S. Fedail, H. Cohen, P. Malfertheiner, N. Vakil, S. Hamid, K. L. Goh, B. C. Y. Wong, J. Krabshuis, and A. Le Mair. 2011. "Helicobacter Pylori in Developing Countries. World Gastroenterology Organisation Global Guideline." *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* 20(3):299–304. doi: 10.1097/MCG.0b013e31820fb8f6.
- Ierardi, Enzo, Giuseppe Losurdo, Alessia Mileti, Rosa Paolillo, Floriana Giorgio, Mariabeatrice Principi, and Alfredo Di Leo. 2020. "The Puzzle of Coccoid Forms of *Helicobacter Pylori*: Beyond Basic Science." *Antibiotics* 9(6):293. doi: 10.3390/ANTIBIOTICS9060293.
- Krzyżek, Paweł, Rossella Grande, Paweł Migdał, Emil Paluch, and Grażyna Gościński. 2020. "Biofilm Formation as a Complex Result of Virulence and Adaptive Responses of *Helicobacter Pylori*." *Pathogens* 9(12):1062. doi: 10.3390/PATHOGENS9121062.

- Lebeaux, David, Jean-Marc Ghigo, and Christophe Beloin. 2014a. "Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 78(3):510. doi: 10.1128/MMBR.00013-14.
- Lebeaux, David, Jean-Marc Ghigo, and Christophe Beloin. 2014b. "Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 78(3):510. doi: 10.1128/MMBR.00013-14.
- Lebeer, Sarah, Tine L. A. Verhoeven, Mónica Perea Vélez, Jos Vanderleyden, and Sigrid C. J. De Keersmaecker. 2007. "Impact of Environmental and Genetic Factors on Biofilm Formation by the Probiotic Strain *Lactobacillus Rhamnosus* GG." *Applied and Environmental Microbiology* 73(21):6768. doi: 10.1128/AEM.01393-07.
- Lee, A., M. W. Phillips, J. L. O'Rourke, B. J. Paster, F. E. Dewhirst, G. J. Fraser, J. G. Fox, L. I. Sly, P. J. Romaniuk, T. J. Trust, and S. Kouprach. 1992. "Helicobacter Muridarum Sp. Nov., a Microaerophilic Helical Bacterium with a Novel Ultrastructure Isolated from the Intestinal Mucosa of Rodents." *International Journal of Systematic Bacteriology* 42(1):27–36. doi: 10.1099/00207713-42-1-27.
- De Martel, Catherine, Jacques Ferlay, Silvia Franceschi, Jérôme Vignat, Freddie Bray, David Forman, and Martyn Plummer. 2012. "Global Burden of Cancers Attributable to Infections in 2008: A Review and Synthetic Analysis." *The Lancet Oncology* 13(6):607–15. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70137-7.
- Martínez-Sanguinetti, María Adela, Ana María Leiva-Ordoñez, Fanny Petermann-Rocha, Carlos Celis-Morales, María Adela Martínez-Sanguinetti, Ana María Leiva-Ordoñez, Fanny Petermann-Rocha, and Carlos Celis-Morales. 2021. "¿Cómo Ha Cambiado El Perfil Epidemiológico En Chile En Los Últimos 10 Años?" *Revista Médica de Chile* 149(1):149–52. doi: 10.4067/S0034-98872021000100149.
- Møller, Henrik, Elisabeth Heseltine, and Harri Vainio. 1995. "Working Group Report on Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter Pylori. Meeting Held at IARC, LYON, 7–14 June 1994." *International Journal of Cancer* 60(5):587–89. doi: 10.1002/IJC.2910600502.
- Otth, Laura, Myra Wilson, Heriberto Fernández, Carola Otth, Claudio Toledo, Victoria Cárcamo, Paula Rivera, and Luis Ruiz. 2011. "Isolation of Helicobacter Pylori in Gastric Mucosa and Susceptibility to Five Antimicrobial Drugs in Southern Chile." *Brazilian Journal of Microbiology* 42(2):442–47. doi: 10.1590/S1517-83822011000200005.
- Palencia, Sixta L., Apolinaria García, and Manuel Palencia. 2021. "Multiple Surface Interaction Mechanisms Direct the Anchoring, Co-Aggregation and Formation of Dual-Species Biofilm between *Candida Albicans* and Helicobacter Pylori." *Journal of Advanced Research* 35:169. doi: 10.1016/J.JARE.2021.03.013.

- Paluch, E., J. Rewak-Soroczyńska, I. Jędrusik, E. Mazurkiewicz, and K. Jermakow. 2020. "Prevention of Biofilm Formation by Quorum Quenching." *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(5):1871. doi: 10.1007/S00253-020-10349-W.
- Ramachandran, Lintu, Luqman Baloch, Taha Mohamed Djirdeh, Yadwinder Sidhu, Nicole Gentile, and Mario Affinati. 2022. "Immune Thrombocytopenic Purpura Secondary to Helicobacter Pylori." *Baylor University Medical Center Proceedings* 35(1):60–61. doi: 10.1080/08998280.2021.1973293.
- Sánchez-Alonzo, Kimberly, Libnny Belmar, Cristian Parra-Sepúlveda, Humberto Bernasconi, Víctor L. Campos, Carlos T. Smith, Katia Sáez, and Apolinaria García-Cancino. 2021. "Antibiotics as a Stressing Factor Triggering the Harboring of Helicobacter Pylori J99 within Candida Albicans ATCC10231." *Pathogens* 10(3):382. doi: 10.3390/PATHOGENS10030382.
- Sánchez-Alonzo, Kimberly, Cristian Parra-Sepúlveda, Lorena Vergara, Humberto Bernasconi, and Apolinaria García-Cancino. 2020. "Detection of Helicobacter Pylori in Oral Yeasts from Students of a Chilean University." *Revista Da Associação Médica Brasileira* 66(11):1509–14. doi: 10.1590/1806-9282.66.11.1509.
- Santiago, Paula, Yolanda Moreno, and M. Antonía Ferrús. 2015. "Identification of Viable Helicobacter Pylori in Drinking Water Supplies by Cultural and Molecular Techniques." *Helicobacter* 20(4):252–59. doi: 10.1111/HEL.12205.
- Sarem, Muhannad, and Rodolfo Corti. 2015. "Rol de Las Formas Cocoides de Helicobacter Pylori En La Infección y La Recrudescencia." *Gastroenterología y Hepatología* 39(1):28–35. doi: 10.1016/J.GASTROHEP.2015.04.009.
- Shen, Z., J. G. Fox, F. E. Dewhirst, B. J. Paster, C. J. Foltz, L. Yan, B. Shames, and L. Perry. 1997. "Helicobacter Rodentium Sp. Nov., a Urease-Negative Helicobacter Species Isolated from Laboratory Mice." *International Journal of Systematic Bacteriology* 47(3):627–34. doi: 10.1099/00207713-47-3-627.
- Sholeh, Mohammad, Saeed Khoshnood, Taher Azimi, Jasem Mohamadi, Vahab Hassan Kaviar, Marzieh Hashemian, Somayeh Karamollahi, Nourkhoda Sadeghifard, Hedayat Heidarizadeh, Mohsen Heidary, and Morteza Saki. 2023. "The Prevalence of Clarithromycin-Resistant Helicobacter Pylori Isolates: A Systematic Review and Meta-Analysis." *PeerJ* 11:e15121. doi: 10.7717/PEERJ.15121/SUPP-2.
- Siavoshi, Farideh, Marzieh Sahraee, Hoda Ebrahimi, Abdolfatah Sarrafnejad, and Parastoo Saniee. 2018. "Natural Fruits, Flowers, Honey, and Honeybees Harbor Helicobacter Pylori-Positive Yeasts." *Helicobacter* 23(2):e12471. doi: 10.1111/HEL.12471.
- Siavoshi, Farideh, and Parastoo Saniee. 2014a. "Vacuoles of Candida Yeast as a Specialized Niche for Helicobacter Pylori." *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20(18):5263. doi: 10.3748/WJG.V20.I18.5263.

- Siavoshi, Farideh, and Parastoo Saniee. 2014b. "Vacuoles of Candida Yeast as a Specialized Niche for Helicobacter Pylori." *World Journal of Gastroenterology* 20(18):5263–73. doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5263.
- Stepanović, Srdjan, Dragana Vuković, Veronika Hola, Giovanni Di Bonaventura, Slobodanka Djukić, Ivana Ćirković, and Filip Ruzicka. 2007. "Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci." *APMIS* 115(8):891–99. doi: 10.1111/J.1600-0463.2007.APM_630.X.
- Suerbaum, Sebastian, and Pierre Michetti. 2002. "Helicobacter Pylori Infection." *New England Journal of Medicine* 347(15):1175–86. doi: 10.1056/NEJMRA020542.
- Tsay, Feng Woei, and Ping I. Hsu. 2018. "H. Pylori Infection and Extra-Gastrointestinal Diseases." *Journal of Biomedical Science* 25(1):65. doi: 10.1186/S12929-018-0469-6.
- Vestby, Lene K., Torstein Grønseth, Roger Simm, and Live L. Nesse. 2020. "Bacterial Biofilm and Its Role in the Pathogenesis of Disease." *Antibiotics* 9(2):59. doi: 10.3390/ANTIBIOTICS9020059.
- Villalón, Alejandro, Diego Reyes, Javier Ortiz, Vicente Gándara, Luis A. Díaz, Javier Chahuán, Margarita Pizarro, and Arnoldo Riquelme. 2020. "Helicobacter Pylori, Tratamiento, Resistencia Antibiótica." *Gastroenterol. Latinoam* 31:136–46.
- Yamaoka, Yoshio. 2010. "Mechanisms of Disease: Helicobacter Pylori Virulence Factors." *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 7(11):629. doi: 10.1038/NRGASTRO.2010.154.
- Yonezawa, Hideo, Takako Osaki, Fuhito Hojo, and Shigeru Kamiya. 2019. "Effect of Helicobacter Pylori Biofilm Formation on Susceptibility to Amoxicillin, Metronidazole and Clarithromycin." *Microbial Pathogenesis* 132:100–108. doi: 10.1016/J.MICPATH.2019.04.030.
- Yonezawa, Hideo, Takako Osaki, and Shigeru Kamiya. 2015a. "Biofilm Formation by Helicobacter Pylori and Its Involvement for Antibiotic Resistance." *BioMed Research International* 2015:914791. doi: 10.1155/2015/914791.
- Yonezawa, Hideo, Takako Osaki, and Shigeru Kamiya. 2015b. "Biofilm Formation by Helicobacter Pylori and Its Involvement for Antibiotic Resistance." *BioMed Research International* 2015:914791. doi: 10.1155/2015/914791.
- Zamani, M., F. Ebrahimitabar, V. Zamani, W. H. Miller, R. Alizadeh-Navaei, J. Shokri-Shirvani, and M. H. Derakhshan. 2018. "Systematic Review with Meta-Analysis: The Worldwide Prevalence of Helicobacter Pylori Infection." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 47(7):868–76. doi: 10.1111/apt.14561.