



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



**Utilización de antibióticos como factor de
estrés para el ingreso de *H. pylori* J99 en *C.
albicans* ATCC10231.**

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

Libnny Nicole Belmar Frías
CONCEPCIÓN-CHILE
2019

Profesor Guía: Dra. Apolinaria García Cancino
Dpto. de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

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

Profesor Guía

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

Comisión Evaluadora:



Dr. Carlos González Correa
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Miguel Martínez Poblete
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Patricio Godoy Martínez
Instituto de Microbiología clínica
Universidad Austral de Chile

Director de Programa

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

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.2. Transmisión.....	3
1.3. Tratamiento.....	4
1.4. <i>Candida albicans</i>	8
1.5. Interacción entre <i>H. pylori</i> y <i>C. albicans</i>	9
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
2. METODOLOGIA	14
2.1. Cepas utilizadas y cultivo de los microorganismos.....	14
2.1.1. Cepas de estudio.....	14
2.1.2. Cultivo de microorganismos.....	14
2.2. Curva de crecimiento de <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	15
2.3. Curva de crecimiento cepa J99 de <i>H. pylori</i>	16
2.4. Preparación de antibióticos	16
2.5. Evaluación de la CMI de la cepa J99 de <i>H. pylori</i>	17
2.6. Internalización de <i>H. pylori</i> J99 en <i>C. albicans</i> ATCC 10231 frente a concentraciones del antibiótico.....	17
2.7. Análisis estadístico	18

2.8.	Detección molecular de la incorporación	19
2.8.1.	Extracción del ADN	19
	SE HICIERON LAVADOS!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!	19
2.8.2.	Cuantificación del ADN	19
2.8.3.	Amplificación del gen	20
2.8.4.	Electroforesis en gel de agarosa	21
3.	RESULTADOS	22
3.1.	Curva de crecimiento de <i>H. pylori</i> y <i>C. albicans</i>	22
3.2.	Evaluación de la CMI frente al antibiótico	24
3.3.	Ensayo co-cultivo frente a concentración sub-inhibitoria de antibiótico	25
3.4.	Detección de la incorporación de <i>H. pylori</i> en <i>C. albicans</i>	28
4.	DISCUSIÓN	31
5.	CONCLUSIONES	37
6.	BIBLIOGRAFÍA	38



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Diferentes tratamientos utilizados para <i>H. pylori</i>	6
Tabla 2: Genes utilizados en la amplificación de ADNr 16S de <i>H. pylori</i>	20
Tabla 3: Cuantificación y pureza de ADN obtenido de los co-cultivos a 48 h.....	28



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Curva de crecimiento de <i>H. pylori</i> J99 y <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	23
Figura 2: Evaluación de CMI de AMX y CLT.	25
Figura 3: Microscopia óptica de preparaciones al fresco de co-cultivo a 24 h con AMX.	26
Figura 4: Porcentaje de ingreso de <i>H. pylori</i> a <i>C. albicans</i> evaluadas por microscopia óptica.	27
Figura 5: Detección molecular del ARNr16s por PCR de <i>H. pylori</i> en muestra de co-cultivo con AMX a las 48 h.....	29
Figura 6: Detección molecular de ARNr 16s por PCR de <i>H. pylori</i> en muestra de co-cultivo con CLT a las 48 h.....	30

RESUMEN

H. pylori es una bacteria patógena que afecta al 50% de la población mundial y se encuentra ampliamente asociada a enfermedades de alto impacto como cáncer gástrico y úlcera gastroduodenal. Actualmente se utiliza como tratamiento de erradicación la terapia clásica de primera línea, que consta de dos antibióticos (claritromicina y amoxicilina) junto con un inhibidor de la bomba de protones (generalmente omeprazol). Sin embargo, este tratamiento ha perdido efectividad con el tiempo debido a la aparición de cepas resistentes a claritromicina y metronidazol, lo cual la ha convertido en una bacteria de difícil erradicación.

Por otro lado, se han reportado *in vivo* interacciones endosimbióticas de *H. pylori* en *C. albicans* (levadura de la microbiota normal), donde *H. pylori* se encuentra al interior de *C. albicans*, evitando con esto la acción de los antibióticos sobre la bacteria. Los factores que promueven este comportamiento aun no son del todo entendidos, sin embargo, se ha sugerido que el estrés sobre la bacteria podría gatillar los mecanismos asociados al ingreso, siendo estos aún desconocidos.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de claritromicina y amoxicilina (tratamiento de primera línea) como factor de estrés sobre *H. pylori*, en promover su ingreso a *C. albicans*.

Mediante la determinación de curvas de crecimiento, tanto para *H. pylori* como para *C. albicans*, y la concentración mínima inhibitoria (CMI) de claritromicina y amoxicilina sobre *H. pylori*, se obtuvieron las condiciones para realizar co-cultivos en condiciones sub-inhedorias de cada antibiótico ($\frac{1}{4}$ de la CMI experimental) por separado en caldo Brucella con 10% suero fetal bovino. La internalización de *H. pylori* en *C. albicans* fue evaluada utilizando microscopía de luz. Además, un subcultivo de *C. albicans* se aisló en agar Sabouraud y fue estudiada la presencia del gen ARNr 16S de *H. pylori* por PCR.

Se encontraron levaduras que tenían solo 1 cuerpo parecido a bacteria al interior de estructuras membranosas internas (similares a vacuola). Este ingreso se registró en todos los experimentos realizados, sin embargo, un aumento significativo del 50% es detectado únicamente al realizar el co-cultivo en presencia de amoxicilina a las 24 h. Se confirmó la presencia de *H. pylori* por detección por PCR.

Amoxicilina contribuye como factor de estrés en el ingreso de *H. pylori* a *C. albicans*.

ABSTRACT

H. pylori is pathogenic bacterium that affects 50% of the world's population and is widely related with high-impact diseases such as gastric cancer, gastric and duodenal ulcer. Nowadays, a classic first-line therapy consisting in two antibiotics (clarithromycin and amoxicillin) together with a proton pump inhibitor (usually omeprazole) is used. However, this treatment has lost effectiveness over time due to the appearance of clarithromycin/metronidazole resistant strains, making difficult the eradication of the bacterium.

Otherwise, endosymbiotic interactions of *H. pylori* in *C. albicans* (normal microbiota yeast) has been reported *in vivo*, where *H. pylori* has found inside *C. albicans*, avoiding direct action of antibiotics on the bacteria. Factors that promotes this behavior are not fully understood, however, stress over *H. pylori* has been suggested as a triggering factor of the mechanism associated with the entry to the yeast, those mechanism remain unknown

The objective of this research was the evaluation of the effect of clarithromycin and amoxicillin (first-line treatment) as a stress factor on *H. pylori* which could promote its entry on *C. albicans*.

By determining grow curves for either *H. pylori* and *C. albicans* and minimum inhibitory concentration (MIC) of clarithromycin and amoxicillin on *H. pylori*, the conditions were obtained for co-cultures under subinhibitory conditions of each antibiotic (1/4 of experimental MIC) separately in Brucella broth with 10% fetal bovine serum. The internalization of *H. pylori* in *C. albicans* was evaluated using light microscopy. In addition, a subculture of *C. albicans* was isolated in Sabouraud agar and the presence of the 16S gene rRNA of *H. pylori* was studied by PCR.

It was found yeast containing only 1 bacteria-like bodies inside membranous structures (vacuole-like). This entry was registered in all the experiment performed; however, a 50% significant increase was detected only in amoxicillin co-cultures at 24h. *H. pylori* was confirmed using PCR.

Amoxicillin contributes as a stress factor on the entry of *H. pylori* in *C. albicans*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Helicobacter pylori*

H. pylori es un microorganismo Gram negativo, microaerófilo y neutrófilo. Morfológicamente presenta forma espiralada de 2-4 μm de largo y de 0,1 a 1 μm de diámetro y un flagelo unipolar. Es una bacteria patógena con capacidad de colonizar la mucosa gástrica (Uemura *et al.*, 2001), esta colonización implica en una primera etapa penetrar la mucosa gástrica hasta alcanzar el epitelio. Esto puede ocurrir de dos formas: a) el 20 % de las células queda adherida a la superficie de las células epiteliales y b) la principal, el 80 % corresponde al contacto directo con el epitelio en las uniones intercelulares, eventualmente penetrando las uniones para llegar a espacios más profundos del mismo (Bauer & Meyer, 2011).

La colonización de *H. pylori* se lleva a cabo gracias a la secreción de ureasa, enzima encargada de neutralizar el pH ácido del estómago permitiendo el avance hacia las células epiteliales gástricas; la adhesión a ellas se realiza mediante interacciones específicas de adhesinas (BabA, SabA, AlpaA, AlpaB,

HopZ, OipA) (Bauer & Meyer, 2011; Kao *et al.*, 2016). Una vez adherida, la bacteria secreta la proteína CagA y la citotoxina VacA que promueven cambios patológicos en la célula blanco. Esto causa daño tisular y subsecuentemente activa la secreción de quimiocinas por parte de la célula huésped, lo cual desarrolla una respuesta inflamatoria. El daño tisular deriva en enfermedades gastrointestinales como gastritis, úlcera péptica, linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT) y cáncer gástrico (Boro & Sarma, 2016; Porras *et al.*, 2014). Debido a la asociación con cuadros clínicos cancerígenos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la cataloga como microorganismo cancerígeno de tipo I en el año 1994.



La prevalencia de *H. pylori* en el mundo corresponde al 50%; sin embargo, la situación particular de cada continente y país difiere considerablemente. En 2017, Hooi y colaboradores presentaron un meta-análisis donde encontraron en América del sur una prevalencia de 69,7 %, ubicándolo en segundo lugar después de África. Chile por su parte se encuentra sobre el promedio continental con un 74,6%, sumando más de 13 millones de individuos *H. pylori* positivos (Hooi *et al.*, 2017).

Al 2017, la evidencia recopilada de prevalencia y estudios enfocados en la erradicación de *H. pylori* señalan que si esta última se realiza en momentos oportunos de la infección, evita la progresión hacia lesiones cancerígenas en la

mucosa gástrica (Lee, *et al.*, 2013; Zhou, *et al.*, 2003) e intestinal (Ford, *et al.*, 2014; Tsukamoto, *et al.*, 2017; Wang, *et al.*, 2011). Fue este el motivo por el cual el consenso de Maastrich (consenso organizado por investigadores europeos de *H. pylori*) estableció la erradicación de *H. pylori* como medida profiláctica de sus patologías derivadas cuando se encuentra en la etapa gastritis crónica antes de pasar a atrofia gástrica (Fallone *et al.*, 2016; Malfertheiner *et al.*, 2016; Sugano *et al.*, 2015).

Lo establecido por el consenso de Maastrich es de gran importancia para Chile ya que la mortalidad por cáncer gástrico ocupa la primera causa de muerte en hombres y la cuarta en mujeres (MINSAL, 2018). Además, la misma patología se encuentra en el séptimo lugar a nivel mundial según la OMS (WHO, 2018), observándose un alza durante los últimos 7 años.

1.2. Transmisión

Más de 30 años después de la primera descripción de *H. pylori*, aún existen interrogantes referentes a los mecanismos de trasmisión en la población. Los postulados más aceptados corresponden a la transmisión oral-oral y fecal-oral (Brown, 2000; Sampieri, 2013), se sugiere además que es principalmente adquirida durante la niñez (O’Ryan *et al.*, 2015), incluso algunos autores debaten la infección intrafamiliar como principal mecanismo (Merino *et al.*, 2019). Los mecanismos de transmisión se sustentan en estudios donde *H.*

pylori se ha aislado en muestras de tracto gastrointestinal, incluyendo saliva, heces y placas dentales (García *et al.*, 2014; Umeda *et al.*, 2003). Por otro lado, estudios epidemiológicos han detectado *H. pylori* en aguas contaminadas (Aziz *et al.*, 2015), vegetales sin lavar (Atapoor *et al.*, 2014), en leche cruda de diferentes animales como oveja, vaca, cabra (Talaie *et al.*, 2015) y en alimentos listos para el consumo (Hemmatinezhad *et al.*, 2016) en diversos países incluyendo Perú, Japón, Kazajstán y Malasia.

Es interesante mencionar que el ADN de *H. pylori* se ha podido encontrar en diversas fuentes y lugares del cuerpo humano. Sin embargo, las únicas cepas cultivables provienen de muestras gástricas. Esto indicaría que las otras zonas no ofrecen las condiciones favorables para su mantención, siendo ésta una de las posibles razones que hace pensar que utiliza vehículos para diseminarse luego de la infección a fin de sobrevivir en zonas ajenas al estómago. En literatura se han mencionado reservorios naturales como *Acanthamoeba castellanii* (Moreno *et al.*, 2017), levaduras (Siavoshi *et al.*, 2005) copépodos (Cellini *et al.*, 2005), mosca (Junqueira *et al.*, 2017), cucarachas (Imamura *et al.*, 2003) y abejas (Siavoshi, *et al.*, 2018).

1.3. Tratamiento

El tratamiento para la erradicación de *H. pylori* ha variado a lo largo de la

historia debido a problemas en su erradicación, la causa más probable de estas fallas podría corresponder al aumento de cepas resistentes a antibióticos. Los tratamientos que se han utilizado se pueden separar en tres tipos: terapia clásica o de primera línea, terapia de segunda línea y terapia de tercera línea. Todas tienen en común un tiempo de administración de 15 días aproximadamente y poseen dentro de la prescripción un inhibidor de la bomba de protones, el cual interrumpe la secreción de ácido de las células parietales aumentando el pH en el estómago (tabla 1) (Hu *et al.*, 2017; Moo *et al.*, 2010). Es importante mencionar que la tetra terapia se ha flexibilizado, reportando diferentes combinaciones para erradicar a *H. pylori* como: claritromicina – amoxicilina (Sun *et al.*, 2010), claritromicina - furazolidona (Xie *et al.*, 2014), amoxicilina - metronidazol (Zhang *et al.*, 2015), amoxicilina - tetraciclina (Liang *et al.*, 2013), metronidazol - furazolidona (Liang *et al.*, 2013), rifabutina-amoxicilina y metronidazol y tetraciclina (Graham *et al.*, 2016; Hooi *et al.*, 2017).

Tabla 1: Diferentes tratamientos utilizados para *H. pylori*.

Tratamiento	Fármacos	Mecanismo
Primera línea (triterapia)	Inhibidor de bomba de protones (IBP)	Inhibe la ATPasa H ⁺ /K ⁺
	Amoxicilina	Inhibe la síntesis de peptidoglicán
	Claritromicina	Inhibidor de la subunidad 50 S
Segunda línea (tetraterapia)	Sal de bismuto	Se relaciona con el cambio de morfología de <i>H. pylori</i> de espiral a cocoide (Bland, Ismail, Heinemann, & Keenan, 2004)
	Inhibidor de la bomba de protones (IBP)	Inhibe la ATPasa H ⁺ /K ⁺
	Metronidazol	Formador de radicales
	Tetraciclina	Se une a la subunidad 30 S
Tercera línea (triterapia)	Inhibidor de bomba de protones (IBP)	Inhibe la ATPasa H ⁺ /K ⁺
	Amoxicilina	Inhibe la síntesis de peptidoglicán
	Levofloxacino	Inhibe la replicación de ADN

La efectividad del tratamiento y las variaciones en la terapia para erradicación de *H. pylori* se genera debido a la realidad de resistencia a los antibióticos en diferentes países. Para el caso de claritromicina, en China se ha reportado resistencia entre 13.9–52.6% de pacientes tratados (Han *et al.*, 2016; Hong, J. *et al.*, 2016), mientras que en EEUU alcanza un valor de 31.3% de pacientes tratados (Park *et al.*, 2016). Por su parte, en Latinoamérica, se reportó resistencia de 12, 53, 4, 6 y 15% para los antibióticos Claritromicina, metronidazol, amoxicilina, tetraciclina y fluorquinolonas respectivamente. Ubicando a Chile bajo el promedio con un 9 y 31% para claritromicina y metronidazol, respectivamente (Camargo *et al.*, 2014).

En Chile el tratamiento recomendado de primera línea para la erradicación de *H. pylori* según la Guía del MINSAL (MINSAL, 2013; MINSAL, 2014) consiste en omeprazol (20 mg), amoxicilina (1g) y claritromicina (500 mg) cada 12 h. En caso de que el paciente sea alérgico a la penicilina se recomienda usar metronidazol (500 mg) cada 12h en vez de amoxicilina y si el tratamiento falla, se debe utilizar la tetra terapia que consiste en: IBP cada 12 h, bismuto (120 mg), metronidazol (250 mg y tetraciclina cada 6 h. Ambas alternativas utilizan antibióticos a los que *H. pylori* presenta resistencia (Camargo *et al.*, 2014).

La falla en el tratamiento por el aumento de la resistencia a antibióticos afecta tanto a Chile como el mundo, siendo el principal factor que favorece la

persistencia de *H. pylori*. Sin embargo, en los últimos años se ha sugerido que la falla en el tratamiento puede tener motivos físicos por la capacidad adquirida de *H. pylori* de ingresar al epitelio gástrico por las uniones intercelulares (Lai *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2017). Evidencia de este fenómeno se conoce desde 1988, donde muestras de biopsia humana presentaban “organismos tipo *Campylobacter pylori*”, -más tarde *H. pylori*- al interior del epitelio (Bode *et al.*, 1988), posteriormente se encontraría preferentemente en el cuerpo y en el antro de pacientes infectados (Caron *et al.*, 2015; Necchi *et al.*, 2007). Además, se ha encontrado *H. pylori* al interior de cultivos *in-vitro* de líneas celulares cancerígenas -células adenocarcinomas (AGS) y células adenocarcinoma de colon (Caco-2) (Amieva *et al.*, 2002)-, en células eucariontes como amebas *Acanthamoeba castellanii* (Moreno-Mesonero *et al.*, 2015) y en levaduras como *Candida albicans* (Saniee *et al.*, 2013).

1.4. *Candida albicans*

Es una levadura polimórfica que forma parte de la microbiota humana. Generalmente presenta una relación con el huésped de tipo comensal, la cual puede pasar a oportunista en pacientes inmunocomprometidos (Dadar *et al.*, 2018), siendo *C. albicans* la principal causante de candidiasis invasora (46,3%), seguida de *C. glabrata* (24,4%) y *C. parapsilosis* (8,1%) (Andes *et al.*, 2016).

C. albicans se ha encontrado en diferentes nichos dentro del cuerpo humano, específicamente en el tracto gastrointestinal (GI), respiratorio y genitourinario. La presencia de ella en ambientes biológicos diferentes se debe principalmente a su capacidad de adaptación a las condiciones del medio, incluso se ha reportado cambios morfológicos en escenarios de biodisponibilidad de nutrientes restringida (Miramon & Lorenz, 2017) y procesos de evasión del sistema inmune del huésped debido a cambios en el pH del medio, promoviendo la progresión de enfermedades durante periodos de metabolismos anaeróbicos (Ballou *et al.*, 2016). La invasión de *C. albicans* se genera por diversos factores de virulencia: (1) la transformación morfológica desde levadura a hifa, siendo esta última una morfología patogénica, lo que puede conducir a infección tisular y evasión de macrófagos; (2) la expresión de adhesinas e invasinas en la superficie celular, permitiendo la adherencia; (3) tigmotropismo a la célula huésped; (4) formación de biopelículas para favorecer su persistencia en el ambiente y (5) secreción de enzimas hidrolasas promoviendo la invasión (Kadosh, 2017; Mayer *et al.*, 2013).

1.5. Interacción entre *H. pylori* y *C. albicans*

En el año 1998 *Candida* sp. fue encontrada como microorganismo contaminante en cultivos de biopsias gástricas conteniendo en su interior

cuerpos similares a bacterias, más tarde identificadas como *H. pylori* mediante técnicas moleculares.

Las muestras de *C. albicans* que contenían *H. pylori* en su interior, fueron sometidas a altas temperaturas, desecación, pH ácido y biocida, manteniéndose tanto *Candida* como *H. pylori* viables (esta última mostrando movimiento activo) mientras que la cepa de *H. pylori* control (no localizada dentro de *Candida*) fue inactivada por estas condiciones estresantes (Siavoshi *et al.*, 1998).

En la naturaleza existe el precedente de bacterias patogénicas que sobreviven a condiciones de estrés ingresando a vacuolas de microorganismos eucariotas como amebas de vida libre, tal es el caso de *Burkholderia cepacia* (Marolda *et al.*, 1999), *Legionella* (Bozue & Johnson, 1996) y *Pseudomonas* (Michel *et al.*, 1995). También se han observado en cultivos *in-vitro* al interior en células epiteliales y macrófagos (Martin & Mohr, 2000; Saini *et al.*, 1999). Este establecimiento intracelular sugiere que estaría protegiendo a la bacteria contra el estrés ambiental o sistema inmune del huésped facilitando la transmisión a un nuevo huésped (Siavoshi & Saniee, 2014). También se ha encontrado que la coexistencia de *H. pylori* y *C. albicans* en biopsias gástrica exacerba las manifestaciones clínicas de úlcera gástrica en comparación con una infección independiente de cada uno de ellos, pudiendo confirmar su acción sinérgica en la patogénesis de esta enfermedad (Karczewska *et al.*, 2009), debido a que se ha propuesto que el establecimiento de *H. pylori* en el epitelio debería jugar un

rol importante en la colonización fúngica, ya que la coexistencia de ambos microorganismos aumenta la respuesta inflamatoria y daño en el tejido (Diebel *et al.*, 1999; Zwolińska-wcisło *et al.*, 2001; Zwolińska-Wcisło *et al.*, 2003).

La interacción entre *H. pylori* y *Candida* sp. correspondería a un ejemplo de relación entre bacterias y levaduras que promueve la falla de los tratamientos contra *H. pylori*. Sin embargo, los detalles de la interacción aún son fuente de debate en la comunidad científica, como la causa y mecanismos de ingreso, su egreso; y, por otro lado, los beneficios de la relación.



El presente trabajo aborda la primera parte de este problema, como es: una posible causa de su ingreso, utilizando antibióticos -usados en la triple terapia- como fuente de estrés para favorecer la internalización de *H. pylori* en *C. albicans*.

HIPÓTESIS

1. La presencia de amoxicilina o claritromicina en el medio promueve el ingreso de *H. pylori* J99 en *C. albicans* ATCC10231



OBJETIVO

Objetivo general

Establecer si las condiciones estresantes causadas por amoxicilina o claritromicina en el medio promueven la localización intracelular de *H. pylori* en *C. albicans*



Objetivos específicos

1. Determinar la CMI de amoxicilina y claritromicina sobre *H. pylori* J99 en las condiciones que se realizará el co-cultivo
2. Determinar el efecto de concentraciones sub-inhedoras de amoxicilina o claritromicina en la incorporación de *H. pylori* J99 a *C. albicans* ATCC10231

2. METODOLOGIA

Desarrollo del objetivo 1: Determinar la CMI de amoxicilina y claritromicina sobre *H. pylori* J99 en las condiciones que se realizará el co-cultivo

2.1. Cepas utilizadas y cultivo de los microorganismos

2.1.1. Cepas de estudio

La cepa J99 de *H. pylori* y la cepa ATCC 10231 de *C. albicans* fueron facilitadas por el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología de la Universidad de Concepción. Las cepas de *H. pylori* y *C. albicans* se mantuvo a -80°C en caldo BHI al 20 % de glicerol y caldo tripticasa al 20 % de glicerol respectivamente.

2.1.2. Cultivo de microorganismos

El cultivo de *H. pylori* se realizó en placas de agar Columbia suplementado con 5% de sangre de equino. Se incubó a 37°C 60 h en microaerobiosis (10% CO₂) en estufa (Thermo scientific 3429).

El cultivo de *C. albicans* se realizó en placa de agar dextrosa Sabouraud (Difco™) suplementado con cloranfenicol. Se incubó en aerobiosis a 37°C por 24 h en estufa (Zhicheng ZDP-2160).

En ambos casos se verificaron los cultivos por observación al fresco mediante microscopía de luz, para determinar la morfología característica de *C. albicans* y por tinción de Gram para la morfología de *H. pylori*. Adicionalmente, se realizó prueba de ureasa a *H. pylori*.

2.2. Curva de crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231

Desde un cultivo previo de 24 h de *C. albicans*, se traspasó 1/4 de la placa a 50 mL de medio cultivo líquido Brucella suplementado con 10% suero bovino fetal (CB-SBF) y se incubó en condiciones de aerobiosis a 37°C por 12 h. Posteriormente, se realizó una dilución agregando una alícuota del cultivo en CB-SBF hasta ajustar a una densidad óptica de 0,1 a 600 nm (D.O.₆₀₀). Se alicuotó 200 µL de dicha dilución en microplaca de 96 pocillos y se evaluó el crecimiento obteniendo la D.O.₆₀₀ cada 4 h utilizando como referencia el protocolo descrito por Maidan (Maidan *et al.*, 2008). Adicionalmente, se verificó por microscopía óptica el crecimiento y morfología celular.

2.3. Curva de crecimiento cepa J99 de *H. pylori*

De un cultivo previo de *H. pylori* de 36 h en condiciones mencionadas, se preparó un inóculo inicial de 10^6 UFC/mL en CB-SBF (previa verificación de morfología por tinción de Gram) en tubo vidrio. Los cultivos se incubaron en jarra de microaerobiosis a 37°C, observando el crecimiento cada 12 h por 60 h mediante detección de absorbancia a 600 nm (D.O.₆₀₀) con lectura en lector de microplaca de 96 pocillos (TECAN NANO QUANT, modelo infinite M200Pro).

Desarrollo del objetivo 2: Determinar el efecto de concentraciones sub-inhedoras de amoxicilina o claritromicina en la incorporación de *H. pylori* J99 a *C. albicans* ATCC10231

2.4. Preparación de antibióticos

Se prepararon soluciones stock de amoxicilina y claritromicina en amoníaco 1M y dimetilsulfoxido (DMSO) respectivamente (stock A), las soluciones stock fueron filtradas en filtro de poro 0,22 µm. Se realizaron 2 diluciones seriadas (stock B y C) de los cuales se alicuotó cada uno de los pocillos para obtener

una concentración final en placa de 0,24 µg/mL, 0,12 µg/mL, 0,06 µg/mL, 0,03 µg/mL y 0,015 µg/mL.

2.5. Evaluación de la CMI de la cepa J99 de *H. pylori*

Se utilizó la metodología de CLSI mediante la técnica de dilución en agar, que consisten en usar agar Müller Hinton (MH) suplementado con 7 % de suero equino y la concentración del antibiótico respectivo en placa de 6 pocillos.

Desde un cultivo de cepa J99 de *H. pylori* en agar Columbia por 60 h se obtiene un inóculo inicial McFarland 2. Se sembraron 3 µL en cada pocillo de la placa y se incubó por 48 h. La CMI quedo definida como la concentración de antibiótico donde no se registra crecimiento (Clinical and laboratory standards institute (CLSI), 2011).

2.6. Internalización de *H. pylori* J99 en *C. albicans* ATCC 10231 frente a concentraciones del antibiótico

La concentración de los antibióticos amoxicilina (AMX) o claritromicina (CLT) utilizada en este ensayo corresponde a ¼ de la CMI experimental obtenida.

Desde cultivo de traspaso en placa de la cepa J99 de *H. pylori* de 36 h y de cultivo en placa de la cepa a ATCC 10231, se realizó una suspensión alcanzando McFarland 2 por separado en 5 mL de caldo Brucella suplementado al 10 % SBF. Enseguida, se adicionó el tubo del cultivo *Candida* ATCC 10231 en el tubo de cultivo de *H. pylori* alcanzando un volumen de 10 mL y una concentración estimada según la escala de McFarland de 3×10^8 ufc/mL respectivamente. Este procedimiento se realizó por duplicado para el tubo control como para el tubo en el que se adicionaba la concentración del antibiótico. Posteriormente, se incubaron los cultivos a 37°C en condiciones de microaerobiosis con atmósfera del 10% de CO₂, tomándose muestras del cultivo a las 0, 1, 3, 6, 12, 24 y 48 h, para evaluar mediante microscopía de luz la internalización bacteriana, se analizaron 100 campos por muestra. Posteriormente, se sembró en agar Sabouraud y se incubó a 37°C en condiciones de aerobiosis por 48 h. El porcentaje de ingreso fue calculado como la proporción de Cuerpos Parecidos a Bacteria (CPB) al interior de *C. albicans* con respecto de CPB totales (al interior de *C. albicans* y libres).

2.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los análisis de las muestras de co-cultivo en presencia y ausencia de los antibióticos fueron incorporados a una base Excel y procesados con el software SPSS 23.0. Los niveles de las variables categóricas

fueron expresados por el tiempo de ingreso y sus porcentajes utilizándose test t-student para determinar la relación entre las variables categóricas. Se utilizó un nivel de significancia del 0.05, esto es cada vez que el valor p asociado al test fue menor que 0.05, se consideró significativo.

2.8. Detección molecular de la incorporación

2.8.1. Extracción del ADN

SE HICIERON LAVADOS!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

Se realizó la extracción de ADN de las diferentes muestras utilizando el kit UltraClean® Microbial DNA Isolation (M.O BIO, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. El control positivo fue obtenido a partir de la extracción de ADN de un cultivo puro de *H. pylori* J99. Del mismo modo, la extracción de ADN del control negativo se obtuvo de un cultivo puro de *C. albicans* ATCC10231. Por otro lado, las muestras de co-cultivo con antibiótico y sin antibiótico fueron obtenidas del cultivo en agar Sabouraud de 48 h previamente mencionado.

2.8.2. Cuantificación del ADN

El ADN obtenido se cuantificó utilizando un espectrofotómetro TECAN NANO QUANT, modelo infinite M200Pro y se seleccionaron las muestras que cuenten

con una relación de absorbancia 260/280 entre 1,8 -2,0. Posteriormente, se guardó a -20 °C para análisis posteriores.

2.8.3. Amplificación del gen

La amplificación de un fragmento de 110 pb del gen ARNr 16S de *H. pylori* se realizó utilizando el kit SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (TAKARA BIO INC, Japón), mediante la técnica de PCR utilizando los partidores especificados en la tabla 2. Para ello se utilizó por muestra 12,5 µL de master mix, 1µL forward primer, 1 µL reverse primer, 2 µL de muestra y de controles y 8,5 µL H₂O PCR alcanzando 25µL de mezcla para la PCR.

Las condiciones de la PCR fueron:

- Temperatura de desnaturalización inicial a 94°C por 1 min
- Temperatura de desnaturalización 98° por 5 s
- Temperatura de hibridación a 53°C por 5 s
- Temperatura de elongación a 72°C por 40 s

Se realizaron 30 ciclos de PCR para cada una de las muestras utilizando el termociclador (Fermelo Biotec T 960).

Tabla 2: Genes utilizados en la amplificación de ARNr 16S de *H. pylori*.

Gen	Secuencia	Tm (°C)	pb (amplicón)	Referencia
-----	-----------	---------	------------------	------------

ARNr 16S	F- 5'CTC GAG AGA CTA AGC CCT CC 3' R- 5'ATT ACT GAC GCT GAT GTG C 3'	53	110	Proyecto Fondef D03i1105
---------------------	---	----	-----	--------------------------------

2.8.4. Electroforesis en gel de agarosa

Una vez realizado la amplificación del gen en las muestras se realizó la electroforesis al 2% agarosa (Lonza, EEUU), se preparó agregando 0,6 g de agarosa en 30 mL de TAE 1X. una vez disuelta la agarosa se agregó 0,6 µL de REDGEL (Biotium, EEUU), se agregó a la base de la cámara, se solidificó se colocó en la cámara electroforética, se agregó buffer de corrida hasta cubrir por completo el gel y se procedió a agregar 1µL de marcador de corrida de 100 pb (MAESTROGEN, EEUU) rango 100 pb a 3000 pb. De los productos amplificados se agregaron 10 µL en cada pocillo y se corrió a 70 voltios por 90 min. La visualización del gel se realizó bajo luz UV en el fotodocumentador UVIdoc HD5 (Uvitec, Cambridge).

3. RESULTADOS

3.1. Curva de crecimiento de *H. pylori* y *C. albicans*

Se realizaron curvas de crecimiento de *H. pylori* J99 y *C. albicans* ATCC10231 en CB-SBF al 10% como muestra la Figura. 1. Para *H. pylori* se observan las fases de adaptación, exponencial y estacionaria entre las 0-12 h, 12-24 h y 24-48 h (Figura 1A). Mientras que para *C. albicans* sólo se observó fase de adaptación y exponencial entre las 0-12 h y 12-48 h (Figura 1B). Con estos resultados se aseguró que ambos microorganismos se desarrollan en las condiciones experimentales de los co-cultivos.

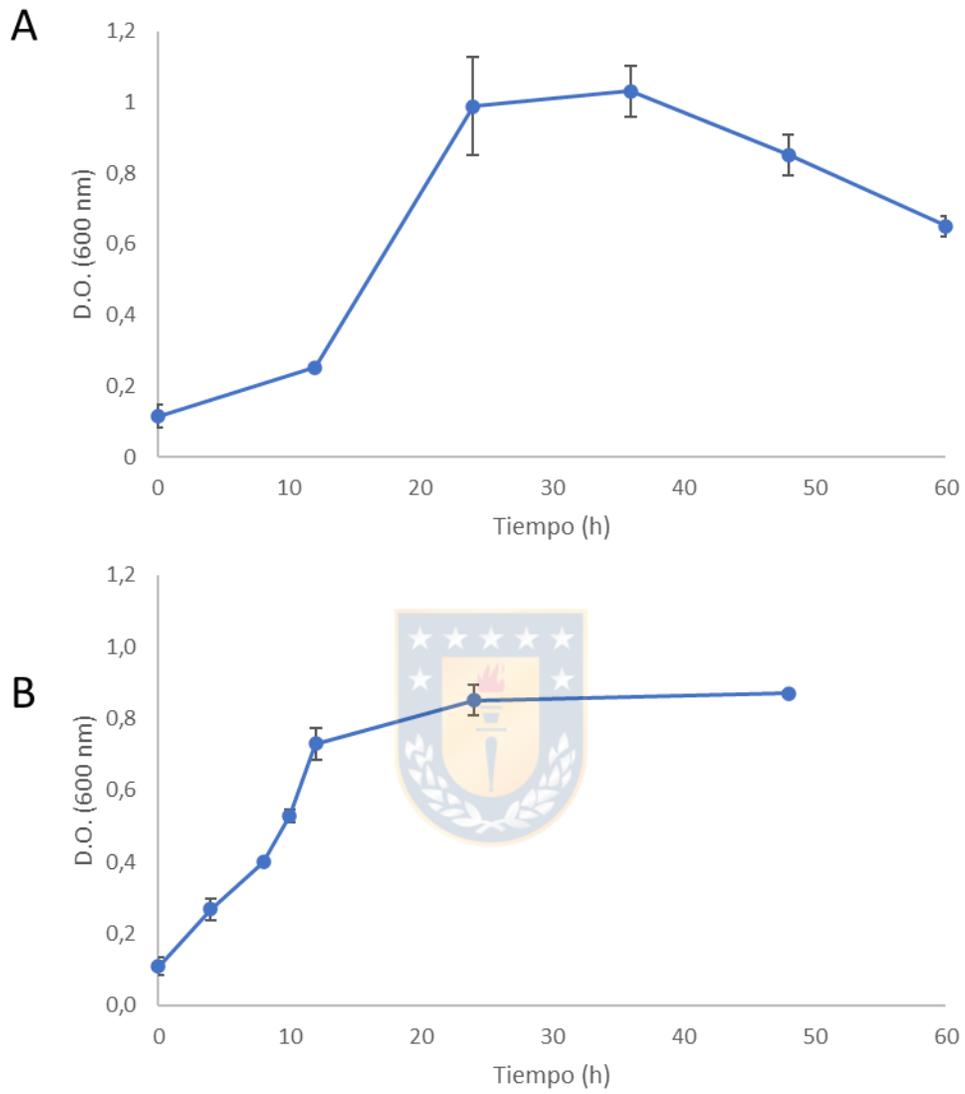


Figura 1: Curva de crecimiento de *H. pylori* J99 (A) Curva de crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231 (B) en medio líquido Brucella suplementado al 10% suero bovino fetal.

3.2. Evaluación de la CMI frente al antibiótico.

La Figura 2 muestra el ensayo de CMI para AMX y CLT de *H. pylori* frente a ambos antibióticos. Se observó un valor de CMI de 0,030 µg/mL para ambos antibióticos (Figuras 2A y 2B), respectivamente. El crecimiento bacteriano a 0,015 µg/mL de antibiótico fue corroborado como *H. pylori* por test de ureasa rápida y tinción de Gram identificándose la morfología bacilar espiralada característica de dicha bacteria (Figuras 2C y 2D). La concentración de AMX y CLT utilizada para los ensayos de co-cultivo fue de 0,0075 µg/mL correspondiendo a $\frac{1}{4}$ de la CMI obtenida.

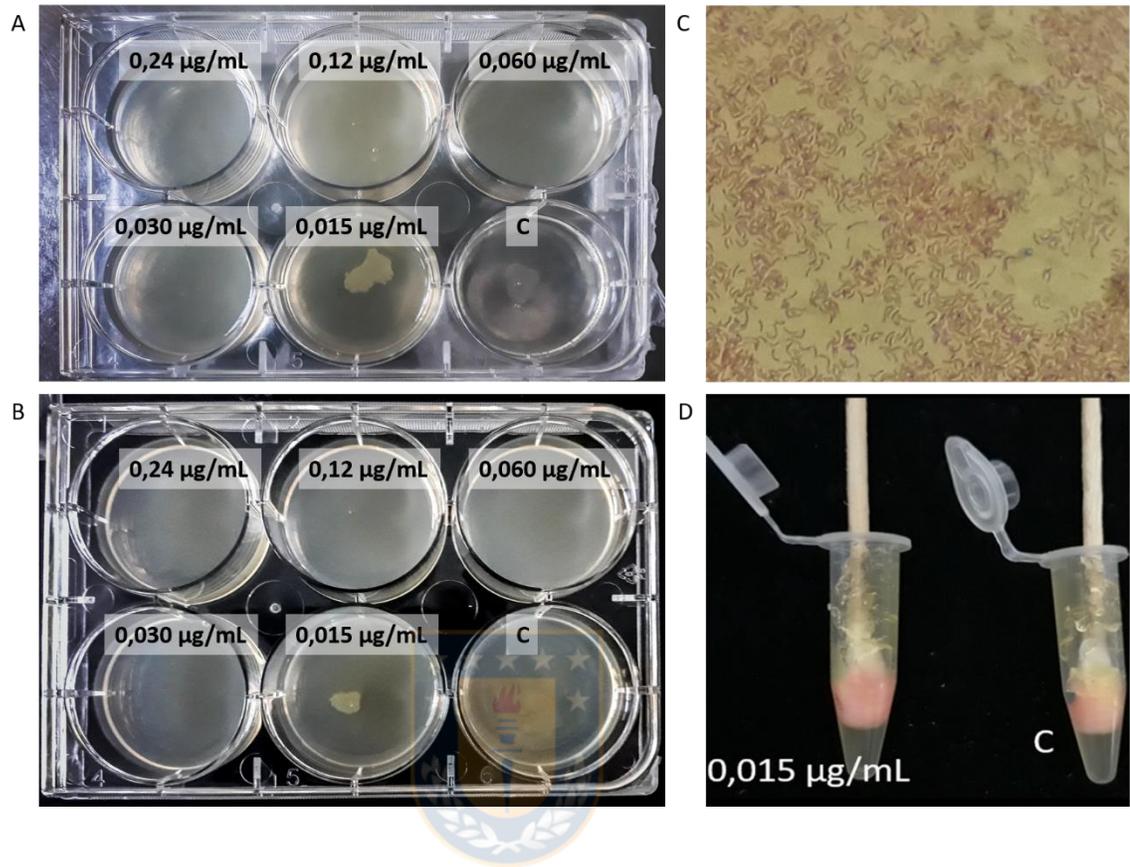


Figura 2: Evaluación de CMI de AMX (A). Evaluación de CMI de CLT en cultivo de *H. pylori* J99 (B). Tinción de Gram (C) y Test de ureasa (D).

3.3. Ensayo co-cultivo frente a concentración sub-inhibitoria de antibiótico.

La microscopía óptica de preparaciones al fresco de co-cultivo mostro CPB de alta movilidad en al interior de *C. albicans*, mostrando una preferencia por estructuras apicales de pseudohifa por sobre las blastoconidias (Figura 3).

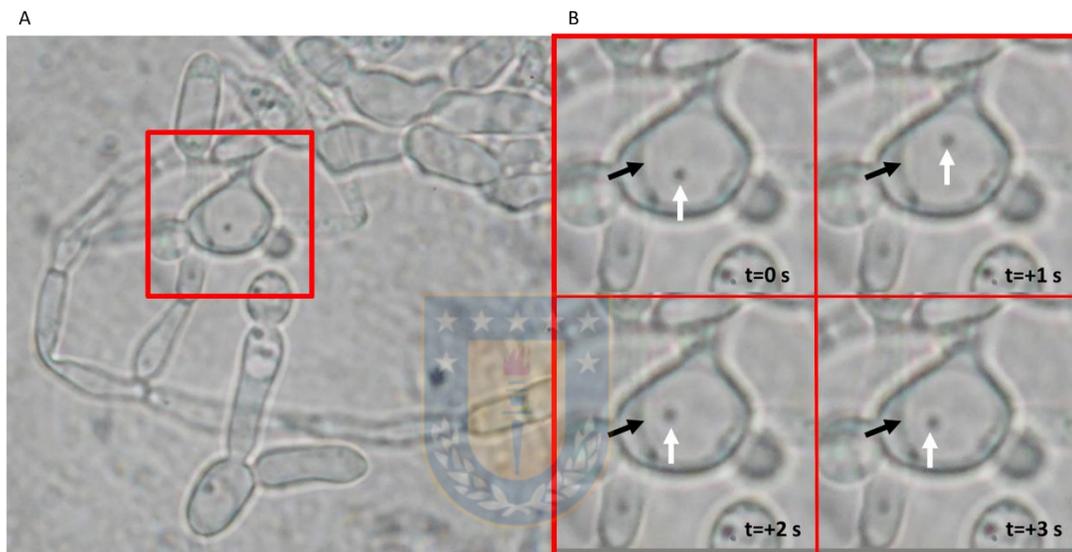


Figura 3: Microscopía de luz de preparaciones al fresco de co-cultivo a 24 h con AMX. (A) Pseudohifas de *C. albicans*, cuadro rojo representa la ampliación mostrada en B. (B) Visualización del movimiento de un cuerpo parecido a bacteria (flecha blanca) al interior de una estructura interna de *C. albicans* similar a la vacuola (flecha negra). Imágenes obtenidas cada 1 segundo desde video.

En el co-cultivo control, es decir en ausencia de antibiótico, se observa un ingreso basal de un 25% y 34% a las 4 y 12 h, manteniéndose estable hasta las 48 h. La presencia de CLT a $\frac{1}{4}$ de MIC, muestra ingreso sin diferencias significativas con respecto del control, variando de 21 a 33% (Figura 4).

El co-cultivo en presencia de AMX muestra resultados diferentes, con un aumento inmediato de ingreso de CPB, registrando una curva significativamente mayor con respecto al control, alcanzando un ingreso de 80% a las 24 h (Figura. 4).

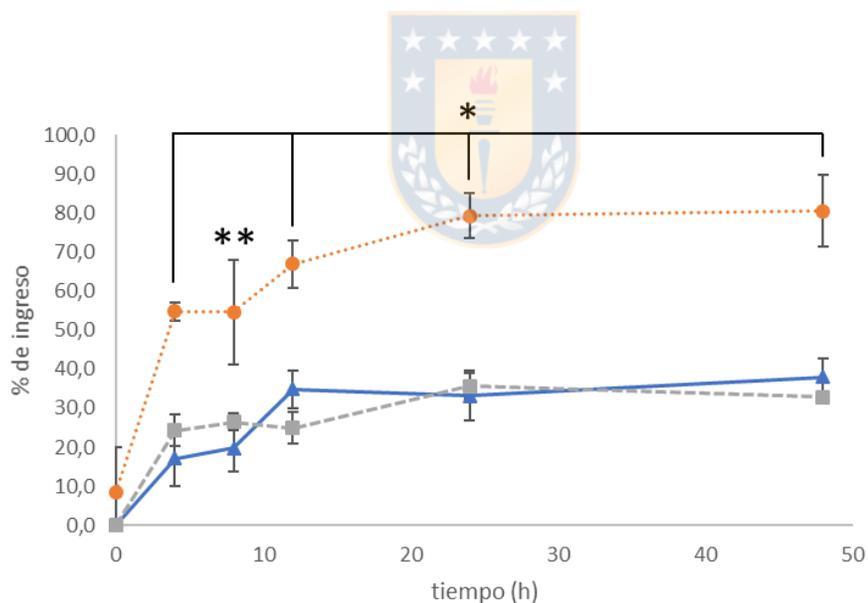


Figura 4: Porcentaje de ingreso de *H. pylori* a *C. albicans* evaluadas por microscopía óptica.

Control (▲), CLT (■), AMX (●). Promedio \pm desviación estándar de duplicados. * $p < 0.05$, ** $p < 0.1$ con respecto a la curva control.

3.4. Detección de la incorporación de *H. pylori* en *C. albicans*

El amplicon de 110 correspondiente al gen *ARNr 16S* de *H. pylori* fue encontrado mediante PCR, en los sub-cultivos de *C. albicans* obtenidos desde los co-cultivos con cada uno de los antibióticos AMX (Figura 5) y CLT (Figura 6) y el control. Las cuantificaciones de ADN se resumen en la Tabla 3.



Tabla 3: Cuantificación y pureza de ADN obtenido de los co-cultivos a 48 h.

Muestra	Concentración de ADN (ng/ μ L)	Pureza
Control	35,40 \pm 3,39	1,94
AMX	46,85 \pm 2,19	1,97
CLT	31,15 \pm 1,59	1,91

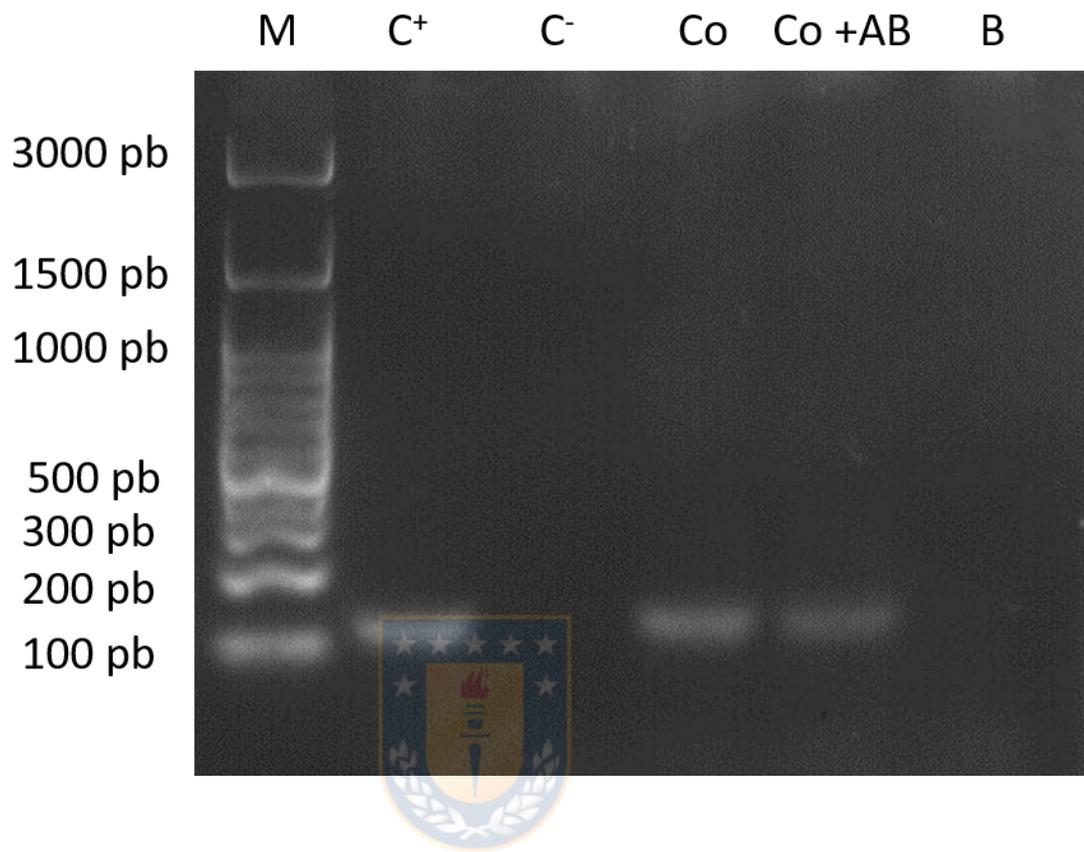


Figura 5: Detección molecular del ARNr16s por PCR de *H. pylori* en muestra de co-cultivo con AMX a las 48 h. Marcador molecular (M), control positivo (C+), control negativo (C-), co-cultivo sin AMX (Co), co-cultivo en presencia de AMX (Co-AB) y blanco (B).

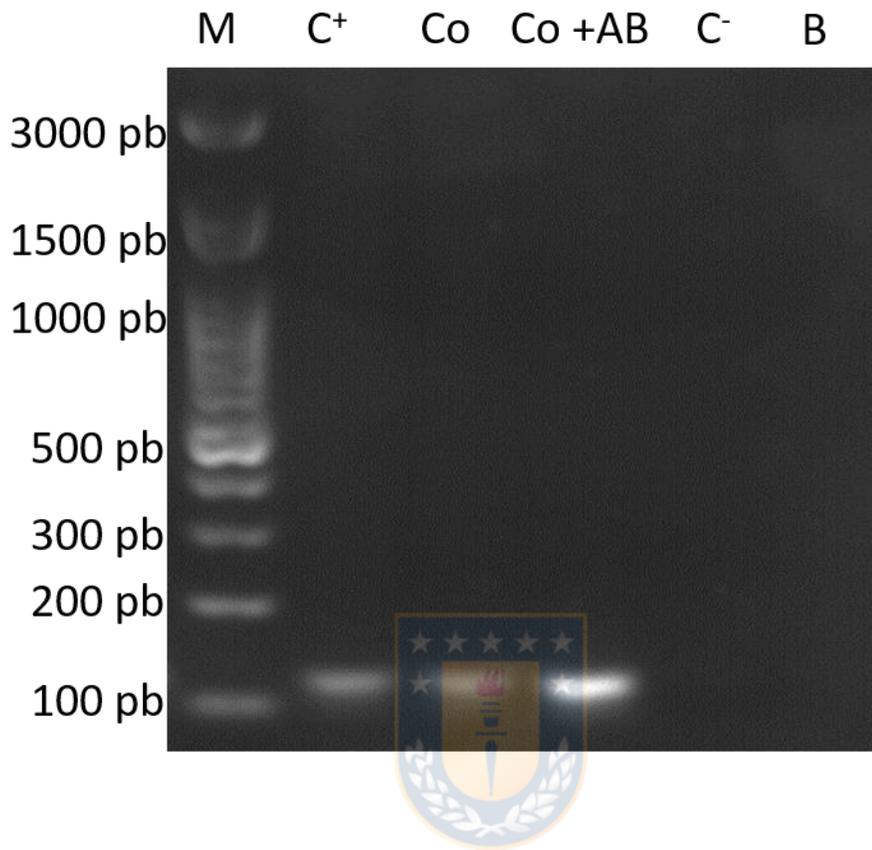


Figura 6: Detección molecular de ARNr 16s por PCR de *H. pylori* en muestra de co-cultivo con CLT a las 48 h. Marcador molecular (M), control positivo (C+), control negativo (C-), co-cultivo sin CLT (Co), co-cultivo en presencia de CLT (Co-AB) y blanco (B).

4. DISCUSIÓN

Las curvas de crecimiento trabajada para la cepa J99 de *H. pylori* es similar a los resultados obtenidos en literatura por Baltrus y Guillemin con la misma cepa de *H. pylori* en condiciones similares de cultivo (Baltrus & Guillemin, 2005). También se ha visto crecimiento muy similar en otros medios como BHI suplementado con suero de equino e incluso crecimiento similar en cepa diferentes como se ha visto en SS1 en caldo BHI suplementado con β -ciclodextrina (Bury-moné *et al.*, 2006). Igualmente se ha encontrado crecimiento parecido en caldo BHI suplementado con suero bovino fetal (Parreira *et al.*, 2011) y BHI suplementado con extracto de levadura y suero equino (Estibariz *et al.*, 2019). Por lo que se puede concluir que para crecer a *H. pylori* se necesitan medios altamente nutritivos. Existen diferentes agares utilizados para crecer *H. pylori* encontrándose agar Columbia, agar Müller-Hinton suplementado con sangre y agar sangre entre los medios recomendados para *H. pylori* (Blanchard & Nedrud, 2006). Sin embargo, este microorganismo es dificultoso de cultivar *in vitro* particularmente en medio líquido, ya que se han reportado problemas de adaptación (Shahamat *et al.*, 1991; Vega *et al.*, 2003).

En el caso del crecimiento *C. albicans* obtenida en CB- SBF se observó la misma tendencia en estudios reportados en cultivos realizados en caldo YPD (Thewes *et al.*, 2008) y caldo Sabouraud (Weerasekera *et al.*, 2016), e incluso a diferentes temperaturas (Maidan *et al.*, 2008). Estos resultados obtenidos nos indicarían que los problemas de cultivo de *C. albicans* están minimizados en el medio utilizado.

La MIC obtenida par ambos antibióticos fue 0,03 µg/mL. Este valor al compararse con los puntos de cortes informados por el EUCAST corresponde a un microorganismo sensible (resistente >0,125 µg/mL y sensible < 0,125 µg/mL para amoxicilina y resistente >0,5 µg/mL y <0,25 µg/mL para claritromicina) (EUCAST), 2019). La concentración Sub-MIC de 0.0075 µg/mL, correspondiente a ¼ MIC fue utilizada para los ensayos, debido a que se han reportado estudios a esta relación de la MIC sobre *H. pylori* con diferentes antibióticos (Donofrio *et al.*, 2015; Momynaliev *et al.*, 2013).

En literatura se ha postulado que la internalización de bacterias en microorganismos eucariontes se generaría como mecanismo de persistencia frente a condiciones desfavorables (Siavoshi *et al.*, 2018; Siavoshi & Saniee, 2014). Por lo tanto, el ingreso de un 30 % de *H. pylori* a *C. albicans* a las 48 horas en el control, seria atribuido a un estrés basal debido a factores como: cambio de medio solido a líquido, periodos de incubación extendidos y

acumulación de metabolitos; existiendo otros factores que se encuentran controlados en este caso como privación de nutrientes y cambios de pH, como se ha discutido ampliamente (Berry *et al.*, 1995; Shahamat *et al.*, 1991).

A los factores anteriores, se adiciona antibiótico a concentración $\frac{1}{4}$ MIC como fuente de estrés para gatillar el ingreso, encontrándose un aumento significativo únicamente en presencia de amoxicilina. Mientras que con claritromicina no hay diferencias con respecto al control. Esto estaría indicando que la concentración de este último antibiótico no reúne condiciones necesarias para que *H. pylori* internalice en *C. albicans*.



A pesar de extensivas investigaciones sobre el efecto individual de antibióticos como amoxicilina y claritromicina sobre *H. pylori* donde se han observado efectos similares en cuanto a cambios morfológicos, formación de biofilms y arreglos genéticos, la diferencia de ingreso sugiere que el mecanismo de acción del antibiótico estaría jugando un rol importante en la presión ejercida sobre *H. pylori* para gatillar la internalización.

Amoxicilina es un antibiótico β -lactámico, el cual se une irreversiblemente a las proteínas que unen penicilina (PBP) mostrando preferencia por la PBP2, lo cual interrumpe la síntesis de peptidoglicán (De Francesco *et al.*, 2011). La PBP2 que es una D,D-transpeptidasa asociada estrechamente con la morfología

bacteriana, principalmente en la síntesis lateral de peptidoglicán para la generación de formas bacilares. Consecuentemente, la interrupción del funcionamiento de ésta se asocia con la generación de formas cocoides en bacterias como *H. pylori* y *E. coli* (Bush, 2012; Chaput *et al.*, 2006; Krzyzek & Gościński, 2018; Sauvage *et al.*, 2008). Por lo tanto, este antibiótico estaría realizando un efecto directo en la estabilidad de la estructura de *H. pylori* y se constituye como una fuente de estrés. En contraste, claritromicina, pertenece a la familia de los macrólidos, se une de forma reversible al ARNr 23S de la subunidad 50S del ribosoma, región cercana a la peptidil transferasa, la cual cataliza la unión del péptido durante la elongación. La unión de claritromicina tiene como consecuencia la interrupción de la síntesis proteica (Lambert, 2012) y por tanto problemas en la viabilidad bacteriana.

El uso de concentraciones sub-inhedoras de claritromicina en otras especies bacterianas genera efectos diversos como disminución de adherencia de *S. aureus* en las células bucales (Braga, 1994). En *P. aeruginosa* se ha encontrado baja tasa de síntesis de diferentes factores de virulencia como elastasa, DNasa, proteasas y lecitinasa. Disminución de la motilidad, supresión de twitching e inhibición de la formación de la matriz del biofilm y la producción de proteasas (Garey *et al.*, 2009; Shryock *et al.*, 1998; Wozniak & Keyser, 2004).

En *H. pylori* las concentraciones sub-MIC han mostrado cambios de morfología de espiral a cocoide (Faghri *et al.*, 2014) y el aumento de formación de biofilms (Attaran & Falsafi, 2017; Bessa *et al.*, 2012). Sin embargo, no se encontró efecto en la internalización de la bacteria a *C. albicans*. Esto se puede explicar por la reversibilidad del mecanismo del antibiótico a una concentración de trabajo de $\frac{1}{4}$ de MIC, que desplazaría el equilibrio hacia ribosomas mayormente funcionales minimizando la presión del antibiótico como fuente de estrés que promueva mecanismos de ingreso de *H. pylori*. La presión de la claritromicina sería mayor si se aumenta la concentración de antibiótico, en este sentido el uso de mayores concentraciones de claritromicina se relaciona con un aumento en la formación de estructuras cocoides como respuesta frente al estrés (Faghri *et al.*, 2014).

La microscopia óptica obtenida de este estudio *in vitro* revela la presencia de cuerpos parecidos a bacterias (CPB) dentro de *C. albicans*. Mayoritariamente en estructura de pseudohifa e hifa de la levadura. Morfología que se ve favorecida en presencia de suero (Noble, Gianetti, & Witchley, 2017; Sudbery, Gow, & Berman, 2004). Esta presencia dentro de la levadura es homóloga a lo observado en literatura en diferentes tipos de muestras, dentro de las que encontramos: muestra oral de paciente dispéptico (Siavoshi *et al.*, 2005), muestras de alimento (Salmanian *et al.*, 2011), cavidad oral y vaginal (Siavoshi *et al.*, 2013) y en biopsias gástricas (Siavoshi *et al.*, 2019). En la literatura

también se ha encontrado no solo *H. pylori* dentro de la levadura, sino que también se han detectado *S. hominis* and *S. haemolyticus* por técnicas moleculares (Tavakolian, Siavoshi, & Eftekhari, 2018).

La confirmación del gen ARNr 16 S de *H. pylori* en *C. albicans* mediante PCR es la técnica de análisis utilizada ampliamente en literatura a fin de confirmar la presencia de este gen en muestras de levaduras obtenidas desde zonas orales, vaginales y biopsias gástricas (Siavoshi *et al.*, 2019; Siavoshi *et al.*, 2005; Siavoshi *et al.*, 2013) así como en estudios realizados en el laboratorio (Matamala-Valdés *et al.*, 2018).



La literatura propone la presencia de bacterias dentro de microorganismos eucariontes como una forma de persistencia en el ambiente e incluso como vehículo de diseminación.

Este estudio provee la primera evidencia de internalización de *H. pylori* en *C. albicans* en cultivos *in vitro* promovido por la presencia de antibióticos utilizados actualmente en el tratamiento. Este hallazgo podría representar un mecanismo de protección de *H. pylori* que dificultaría la erradicación de la misma en situaciones clínicas. Se hace necesaria la realización de nuevas investigaciones que aborden las consecuencias de este mecanismo de internalización y amplíen la información relativa a los factores que favorecen este fenómeno.

5. CONCLUSIONES

- *H. pylori* y *C. albicans* crecen en caldo Brucella suplementado con 10 % de suero bovino fetal en condiciones de microaerobiosis.
- La CMI obtenida en *H. pylori* corresponde a un microorganismo sensible según los puntos de cortes informados por el EUCAST.
- A $\frac{1}{4}$ de la CMI de amoxicilina se favorece el ingreso de *H. pylori* en *C. albicans* de forma significativa en comparación al control. Mientras que a las mismas condiciones con claritromicina no hay diferencia.
- Se confirma la presencia de *H. pylori* mediante detección molecular en las muestras de co-cultivo en presencia de amoxicilina.

En base a los resultados obtenidos en esta tesis se acepta la hipótesis.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Amieva, M. R., Salama, N. R., Tompkins, L. S., & Falkow, S. (2002). *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 4(10), 677–690.
- Andes, D. R., Safdar, N., Baddley, J. W., Alexander, B., Brumble, L., Freifeld, A., & Morrison, V. (2016). The epidemiology and outcomes of invasive *Candida* infections among organ transplant recipients in the United States: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Transplant Infectious Disease*, 18(6), 921–931.
- Atapoor, S., Dehkordi, F., & Rahimi, E. (2014). Detection of *Helicobacter pylori* in various types of vegetables and salads. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(5), 1-4.
- Attaran, B., & Falsafi, T. (2017). Identification of factors associated with biofilm formation ability in the clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 15(1), 58–66.
- Aziz, R. K., Khalifa, M. M., & Sharaf, R. R. (2015). Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(4), 539–547.
- Ballou, E. R., Avelar, G. M., Childers, D. S., Mackie, J., Bain, J. M., Wagener, J., ... Brown, A. J. P. (2016). Lactate Signalling regulates fungal β -glucan masking and immune evasion. *Nature Microbiology*, 2, 1–9.
- Baltrus, D. A., & Guillemin, K. (2005). Multiple phases of competence occur during the *Helicobacter pylori* growth cycle. *Federation of European Microbial Societies*, 255, 148–155.
- Bauer, B., & Meyer, T. F. (2011). The Human Gastric Pathogen *Helicobacter pylori* and Its Association with Gastric Cancer and Ulcer Disease. *Ulcers*, 2011, 1–23.
- Berry, V., Jennings, K., & Woodnutt, G. (1995). Bactericidal and Morphological Effects of Amoxicillin on *H. pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(8), 1859–1861.

- Bessa, L. J., Grande, R., Di Iorio, D., Di Giulio, M., Di Campli, E., & Cellini, L. (2012). *Helicobacter pylori* free-living and biofilm modes of growth: Behavior in response to different culture media. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 121(6), 549–560.
- Blanchard, T. G., & Nedrud, J. G. (2006). Laboratory Maintenance of *Helicobacter* Species. *Current Protocols in Microbiology*, 0, 1–23.
- Bland, M. V, Ismail, S., Heinemann, J. A., & Keenan, J. I. (2004). The Action of Bismuth against *Helicobacter pylori* Mimics but Is Not Caused by Intracellular Iron Deprivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6), 1983–1988.
- Bode, G, Malfertheiner, P & Ditschuneit, H. (1988). Pathogenetic implications of ultrastructural findings in *Campylobacter pylori* related gastroduodenal disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 23(142), 25–39.
- Boro, S., & Sarma, M. P. (2016). *Helicobacter Pylori* and Steps for its Elimination: A Review. *Global Journal of Medical Research*, 16(4), 30-36.
- Bozue, J. A., & Johnson, W. (1996). Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: Uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infection and Immunity*, 64(2), 668–673.
- Braga, P. C. (1994). Effects of subinhibitory concentrations of seven macrolides and four fluoroquinolones on adhesion of *Staphylococcus aureus* to human mucosal cells. *Chemotherapy* 40, 304–10.
- Brown, L. (2000). *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev*, 22(2), 283–297.
- Bury-moné, S., Kaakoush, N. O., Asencio, C., Mégraud, F., Thibonnier, M., Reuse, H. De, & Mendz, G. L. (2006). Is *Helicobacter pylori* a True Microaerophile? *Helicobacter*, 11, 296–303.
- Bush, K. (2012). Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. *Revue Scientifique et Technique*, 31, 43–56.
- Camargo, M. C., García, A., Riquelme, A., Camargo, C. A., Hernandez-garcía, T., Candia, R., ... Rabkin, C. S. (2014). Systematic Review in Latin America. *The American Journal of Gastroenterology*, 109(4), 485–495.
- Caron, T. J., Scott, K. E., Fox, J. G., & Hagen, S. J. (2015). Tight junction disruption: *Helicobacter pylori* and dysregulation of the gastric mucosal

- barrier. *World Journal of Gastroenterology*, 21(40), 11411–11427.
- Cellini, L., Di Campi, E., Grande, R., Di Bartolomeo, S., Prena, M., Pasquantonio, M. S., & Pane, L. (2005). Detection of *Helicobacter pylori* associated with zooplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 40(2), 115–120.
- Chaput, C., Ecobichon, C., Cayet, N., Girardin, S. E., Werts, C., Guadagnini, S., Boneca, I. G. (2006). Role of AmiA in the morphological transition of *Helicobacter pylori* and in immune escape. *PLoS Pathogens*, 2(9), 0844–0852.
- Clinical and laboratory standards institute(CLSI). (2011). *Method for antimicrobial dilution and Disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved Guideline, second edition, 1-77.*
- Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., & Dhama, K. (2018). *Candida albicans*-Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control—An update. *Microbial Pathogenesis*, 117, 128–138.
- De Francesco, V., Zullo, A., Hassan, C., Giorgio, F., Rosania, R., & Ierardi, E. (2011). Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 2(3), 35-41.
- Diebel, L.N., Liberati, D.M., Diglio, C.A., Dulchavsky, S.A., And Brown, W. (1999). Synergistic effects of *Candida* and *Escherichia coli* on gut barrier function. *Journal of Trauma*, 47, 1045–1050.
- Donofrio, F. C., Toscano, E., Cardoso, D., Zeponne, I., & Gonçalves, M. S. (2015). Subinhibitory concentrations of amoxicillin on *Helicobacter pylori* increase apoptosis in RAW 264 . 7 cells. *Journal Os Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(3), 178–181.
- Estibariz, I., Overmann, A., Ailloud, F., Krebs, J., Josenhans, C., & Suerbaum, S. (2019). The core genome ^{m5C} methyltransferase JHP1050 (M.Hpy99III) plays an important role in orchestrating gene expression in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Research*, 47(5), 2336–2348.
- Faghri, J., Poursina, F., Moghim, S., Esfahani, H. Z., Esfahani, B. N., Fazeli, H., ... Ghasemian Safaei, H. (2014). Morphological and bactericidal effects of different antibiotics on *Helicobacter pylori*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(1), 1–6.
- Fallone, C. A., Chiba, N., van Zanten, S. V., Fischbach, L., Gisbert, J. P., &

- Hunt, R. H. (2016). The toronto consensus for the treatment of *Helicobacter pylori* infection in adults. *Gastroenterology*, 151, 51–69.
- Ford, A. ., Forman, D., Hunt, R. H., Yuan, Y., & Moayyedi, P. (2014). *Helicobacter pylori* eradication therapy to prevent gastric cancer in healthy asymptomatic infected individuals: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ. British Medical Journal*, 348, 3174.
- García, A., Salas-jara, M. J., Herrera, C., & González, C. (2014). Biofilm and *Helicobacter pylori*: From environment to human host. *World Journal of Gastroenterology*, 20(19), 5632–5638.
- Garey, K. W., Vo, Q. P., Lewis, R. E., Saengcharoen, W., LaRocco, M. T., & Tam, V. H. (2009). Increased bacterial adherence and biomass in *Pseudomonas aeruginosa* bacteria exposed to clarithromycin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63(1), 81–86.
- Graham, D. Y., Dore, M. P., Medica, C., & Pietro, V. S. (2016). *Helicobacter pylori* therapy: a paradigm shift. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 14(6), 577–585.
- Han, R., Lu, H., Jiang, M. W., Tan, K. W., Peng, Z., & Hu, J. L. (2016). Multicenter study of antibiotic resistance profile of *H. pylori* and distribution of CYP2C19 gene polymorphism in rural population of chongqing, China. *Gastroenterol.Ogy Research and Practice*, 2016, 1-6.
- Hemmatinezhad, B., Momtaz, H., & Rahimi, E. (2016). *VacA*, *cagA*, *iceA* and *oipA* genotypes status and antimicrobial resistance properties of to eat foods. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15(2), 1-9.
- Hong, J., Shu, X., Liu, D., Zhu, Y., Xie, C., & Xie, Y. (2016). Antibiotic resistance and CYP2C19 polymorphisms affect the efficacy of concomitant therapies for *Helicobacter pylori* infection: an open-label, randomized, single-centre clinical trial. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71, 2280–2285.
- Hooi, J. K. Y., Lai, W. Y., Ng, W. K., Suen, M. M. Y., Underwood, F. E., Tanyingoh, D., Malfertheiner, P, Graham D.Y, Wong V.W.S, Wu J.C.Y, Chan F.K.L, Sung J.J.Y, Kaplan G.G, Ng, S.C. (2017). Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*, 153(2), 420–429.
- Hu, Y., Zhu, Y., & Lu, N. (2017). Novel and Effective Therapeutic Regimens for *Helicobacter pylori* in an Era of Increasing Antibiotic Resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 1–20.

- Imamura, S., Kita, M., Yamaoka, Y., Yamamoto, T., Ishimaru, A., Konishi, H., ... Imanishi, J. (2003). Vector Potential of Cockroaches for *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, 98(7), 1500-1503.
- Junqueira, A. C. M., Ratan, A., Acerbi, E., Drautz-Moses, D. I., Premkrishnan, B. N. V., Costea, P. I., ... Schuster, S. C. (2017). The microbiomes of blowflies and houseflies as bacterial transmission reservoirs. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15.
- Kadosh, D. (2017). Control of *Candida albicans* morphology and pathogenicity by post-transcriptional mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(22), 4265–4278.
- Kao, C., Sheu, B., & Wu, J. (2016). ScienceDirect *Helicobacter pylori* infection : An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomedical Journal*, 39(1), 14–23.
- Karczewska, E., Wojtas, I., Sito, E., Trojanowska, D., Budak, A., Zwolinska-Wcislo, M., & Wilk, A. (2009). Assessment of co-existence of *Helicobacter pylori* and *Candida* fungi in diseases of the upper gastrointestinal tract. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 60(6), 33–39.
- Krzyzek, P., & Gościński, G. (2018). Morphology of *Helicobacter pylori* as a result of peptidoglycan and cytoskeleton rearrangements. *Gastroenterology Review*, 13(3), 182–195.
- Lai, C., Kuo, C., Chen, P., Poon, S., Chang, C., & Wang, W. (2006). Association of antibiotic resistance and higher internalization activity in resistant *Helicobacter pylori* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 466–471.
- Lambert, T. (2012). Antibiotics that affect the ribosome. *Scientific and Technical Review of the Office International Des Epizooties*, 31(1), 57–64.
- Lee, Y.-C., Chen, T. H., Chiu, H. M., & Shun, C. . (2013). Lee, Y.-C., Chen, T. H., Chiu, H. M., Shun, C. T., Chiang, H., Liu, T. Y., *et al.* (2013). The benefit of mass eradication of *Helicobacter pylori* infection: a community-based study of gastric cancer prevention. *Gut*, 62, 676–682.
- Liang, X., Xu, X., Zheng, Q., Zhang, W., Sun, Q., & Liu, W. (2013). Efficacy of bismuth-containing quadruple therapies for clarithromycin-, metronidazole-, and fluoroquinolone-resistant *Helicobacter pylori* infections in a prospective study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 11, 802–807.

- Maidan, M., De Rop, L., Relloso, M., Diez-Orejas, R., Thevelein, J., & Van Dijck, P. (2008). Combined Inactivation of the *Candida albicans* GPR1 and TPS2 Genes Results in Avirulence in a Mouse Model for Systemic ... Results in Avirulence in a Mouse Model for Systemic Infection. *Infection and Immunity*, 76(4), 1686–1694.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., Morain, C.A.O., Gisbert, J. P., Kuipers, E. J., Axon, A.T., ... Moayyedi, P. (2016). Management of *Helicobacter pylori* infection — the Maastricht V / Florence Consensus Report. *British Medical Journal*, 0, 1–25.
- Marolda, C.L., Hauröder, B., John, M.A., Michel, R., & Valvano, M. A. (1999). Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amoebae. *Microbiology*, 145(7), 1509–1517.
- Martin, D.W., & Mohr, C.D. (2000). Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*. *Infection and Immunity*, 68(1), 24–29.
- Matamala-Valdés, L., Sánchez-Alonzo, K., Parra, C., Saez, K., Aguayo-Reyes, A., Garcia, A. (2018). Detection of intracellular *Helicobacter pylori* in *Candida* SPP from neonate oral swabs. *Revista da Associacao Médica Brasileira*, 64(10), 928-935.
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 15(2), 119–128.
- Merino, J. S., Araneda, L., Lincoñir-Campos, P., Parra, C., Sáez, K., & García, A. (2019). Dynamics of *Helicobacter pylori* infection in infants during the first six months of life. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(2), 109–111.
- Michel, R., Burghardt, H., & Bergmann, H. (1995). Acanthamoeba, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. *International Journal of Hygiene and Environmental Medicine*, 196(6), 532-544.
- Ministerio de Salud (MINSAL). (2013). *Tratamiento de erradicación de Helicobacter pylori en el paciente con úlcera péptica*. 1ª edición, 5-50.
- Ministerio de Salud (MINSAL). (2014). *Guías Clínicas AUGE Cáncer Gástrico*. 3ª edición, 5-7.

- Ministerio de Salud (MINSAL). (2018). Nacional Cáncer. *Plan Nacional de Cáncer 2018-2028*. 14-181.
- Miramón, P., & Lorenz, M. (2017). A feast for *Candida*: Metabolic plasticity confers an edge for virulence. *Plos Pathogens*, 13(2), 1–7.
- Momynaliev, K., Chelysheva, V., Selezneva, O., Larin, A., Akopian, T., Alexeev, D., Govorun, V. (2013). Modulation of *Helicobacter pylori* transcriptional profile by subinhibitory concentrations of rifampicin. *Biotechnology. Theory and Practice.*, 2, 23–29.
- Moo, J., Sachs, G., & van Zandvoort, M. (2010). Pharmacology of Proton Pump Inhibitors. *Current Gastroenterology Reports*, 10(6), 528–534.
- Moreno-Mesonero, Moreno, A., & Ferrus, L. (2015). DVC-FISH and PMA-qPCR 609 techniques to assess the survival of *Helicobacter pylori* inside *Acanthamoeba castellanii*. *Research in Microbiology*, 29(167), 29–34.
- Moreno, L., Moren, Y., Alonso, J., & Ferrus, M. (2017). Detection of viable *Helicobacter pylori* inside free-living amoebae in wastewater and drinking water samples from Eastern Spain. *Environmental Microbiology*, 19, 4103–4112.
- Necchi, V., Candusso, M. E., Tava, F., Luinetti, O., Ventura, U., Fiocca, R., ... Solcia, E. (2007). Intracellular, Intercellular, and Stromal Invasion of Gastric Mucosa, Preneoplastic Lesions, and Cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 132(3), 1009–1023.
- Noble, S. M., Gianetti, B. A., & Witchley, J. N. (2017). *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature Reviews Microbiology*, 15(2), 96–108.
- O’Ryan, M. L., Lucero, Y., Rabello, M., Mamani, N., Salinas, A. M., Peña, A., Lagomarcino, A. J. (2015). Persistent and Transient *Helicobacter pylori* Infections in Early Childhood. *Clinical Infectious Diseases*, 61(2), 211–218.
- Park, J. Y., Dunbar, K. B., Mitui, M., Arnold, C. A., Lam-Himlin, D. M., & Valasek, M. A. (2016). *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance and treatment failure are common in the USA. *Digestive Diseases and Sciences*, 61, 2373–2380.
- Parreira, P., Magalha, A., Gonc, ines C., Gomes, J., Vidal, R., Reis, C. A., Martins, M. C. L. (2011). Effect of surface chemistry on bacterial adhesion , viability , and morphology. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*,

99A(3), 344–353.

- Porras, C., Nodora J., Sexton, R., Ferrecio, C., Jimenez, S., Dominguez, RL., Cook, P., Anderson, G., Morgan, DR., Baker, LH., Greenberg, ER and Herrero, R. (2014). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in six Latin American countries (SWOG Trial S0701), *NIH Public Access*. 24(2), 209–215.
- Saini, L. S., Galsworthy, S. B., John, M. a, & Valvano, M. a. (1999). Intracellular survival of *Burkholderia cepacia* complex isolates in the presence of macrophage cell activation. *Microbiology*, 145(12), 3465–3475.
- Salmanian, A.-H., Siavoshi, F., Beyrami, Z., Latifi-Navid, S., Tavakolian, A., & Sadjadi, A. (2011). Foodborne yeasts serve as reservoirs of *Helicobacter pylori*. *Journal of Food Safety*, 32(2012), 152–160.
- Sampieri, C. L. (2013). *Helicobacter pylori* and gastritis: The role of extracellular matrix metalloproteases, their inhibitors, and the disintegrins and metalloproteases - A systematic literature review. *Digestive Diseases and Sciences*, 58(10), 2777–2783.
- Saniee, P., Siavoshi, F., Broujeni, G., Khormali, M., , Sarrafnejad, A., & Malekzadeh, R. (2013). Localization of *H. pylori* within the Vacuole of *Candida* Yeast by Direct immunofluorescence technique, *Archives of Iranian Medicine*, 16(12), 705–710.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 234–258.
- Shahamat, M., Mai, U. E. H., Paszko-Kolva, C., Yamamoto, H., & Colwell, R. R. (1991). Evaluation of liquid media for growth of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(12), 2835–2837.
- Shryock, T. R., Mortensen, J. E., & Baumholtz, M. (1998). The effects of macrolides on the expression of bacterial virulence mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, 505–512.
- Siavoshi, F, Nourali-Ahari, F, Zeinali, S, Hashemi-Dogaheh, MH, Malekzadeh, R., & Massarrat, S. (1998). Yeast protects *Helicobacter pylori* against the environmental stress. *Archives of Iranian Medicine*, 1, 2–8.
- Siavoshi, F., Heydari, S., Shafiee, M., Ahmadi, S., Saniee, P., Sarrafnejad, A., & Kolahdoozan, S. (2019). Sequestration inside the yeast vacuole may

- enhance *Helicobacter pylori* survival against stressful condition. *Infection, Genetics and Evolution*, 69(January), 127–133.
- Siavoshi, F., Sahraee, M., Ebrahimi, H., Sarrafnejad, A., & Saniee, P. (2018). Natural fruits, flowers, honey, and honeybees harbor *Helicobacter pylori* - positive yeasts. *Helicobacter*, 23(2), 1–11.
- Siavoshi, F., Salmanian, A., Kbari, F., Malekzadeh, R., & Massarrat, S. (2005). Detection of *Helicobacter pylori*-Specific Genes in the Oral Yeast. *Helicobacter*, 10(4), 318–322.
- Siavoshi, F., & Saniee, P. (2014). *Helicobacter pylori* Vacuoles of *Candida* yeast as a specialized niche for *Helicobacter pylori*. *World Journal Gastroenterology*, 20(18), 5263–5273.
- Siavoshi, F., Taghikhani, A., Malekzadeh, R., Sarrafnejad, A., Kashanian, M., Sadat, A., Houshang, A. (2013). The Role of Mother's Oral and Vaginal Yeasts in Transmission of *Helicobacter pylori* to Neonates. *Archives of Iranian Medicine*, 16(5), 288–294.
- Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 12(7), 317–324.
- Sugano, K., Tack, J., Kuipers, E., & Graham, D. Y. (2015). Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*, 64, 1353–1367.
- Sun, Q., Liang, X., Zheng, Q., Liu, W., Xiao, S., & Gu, W. (2010). High efficacy of 14-day triple therapy-based, bismuth-containing quadruple therapy for initial *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter*, 15, 233–238.
- Talaei, R., Souod, N., Momtaz, H., & Dabiri, H. (2015). Milk of livestock as a possible transmission route of *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, 8(2), 30–36.
- Tavakolian, A., Siavoshi, F., & Eftekhari, F. (2018). *Candida albicans* release intracellular bacteria when treated with amphotericin B. *Archives of Iranian Medicine*, 21(5), 191–198.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2019). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. v.9.0, 1-100.
- Thewes, S., Moran, G. P., Magee, B. B., Schaller, M., Sullivan, D. J., & Hube, B. (2008). Phenotypic screening, transcriptional profiling, and comparative

- genomic analysis of an invasive and non-invasive strain of *Candida albicans*. *BMC Microbiology*, 8, 1–16.
- Tsukamoto, T., Nakagawa, M., Kiriya, Y., & Toyoda, T. (2017). Prevention of gastric cancer : eradication of *Helicobacter pylori* and beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1699–1715.
- Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., ... Schlemper, R. (2001). *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *The New England Journal of Medicine*, 345(11), 784–789.
- Umeda, M., Kobayashi, H., Takeuchi, Y., Hayashi, J., & Morotome-Hayashi. (2003). High prevalence of *Helicobacter pylori* detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients. *Journal of Periodontology*, 74(1), 129–134.
- Vega, A. E., Cortiñas, T. I., Mattana, C. M., Silva, H. J., & De Centorbi, O. P. (2003). Growth of *Helicobacter pylori* in Medium Supplemented with Cyanobacterial Extract. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5384–5388.
- Wang, J., Xu, L., Shi, R., & Huang, X. (2011). Gastric atrophy and intestinal metaplasia before and after *Helicobacter pylori* eradication: a meta-analysis. *Digestion*, 83, 253–260.
- Wang, Y., Lv, Z., Zhong, Y., Liu, D., Cheng, S., & Xie, Y. (2017). The internalization of *Helicobacter pylori* plays a role in the failure of *H. pylori* eradication. *Helicobacter*, 22, 1–5.
- Weerasekera, M. M., Wijesinghe, G. K., Jayarathna, T. A., Gunasekara, C. P., Fernando, N., Kottegoda, N., & Samaranyake, L. P. (2016). Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(11), 697–702.
- WHO. (2018). WHO Mortality Database. Retrieved from 2015 website: <http://apps.who.int/healthinfo/statistics/mortality/whodpms/>
- Wozniak, D., & Keyser, R. (2004). Effects of Subinhibitory Concentrations Of Macrolide Antibiotic on *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest*, 125(2), 62S-69S.
- Xie, Y., Zhu, Y., Zhou, H., Lu, Z. F., Yang, Z., & Shu, X. (2014). Furazolidone based triple and quadruple eradication therapy for *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*, 20, 11415–11421.

- Zhang, W., Chen, Q., Liang, X., Liu, W., Xiao, S., Graham, D. Y., & Lu, H. (2015). Bismuth , lansoprazole , amoxicillin and metronidazole or clarithromycin as first-line Helicobacter pylori therapy. *Gut*, 64(11), 1715-1720.
- Zhou, L., Sung, J. J. Y., Linn, S., & Jin. (2003). A five-year follow-up study on the pathological changes of gastric mucosa after *H. pylori* eradication. *Chinese Medical Journal*, 116, 11–14.
- Zwolińska-wcisło, M., Budak, A., Bogdał, J., Trojanowska, D., & Stachura, J. (2001). Fungal colonization of gastric mucosa and its clinical relevance. *Medical Science Monitot*, 7(5), 982–988.
- Zwolińska-WcisłoBudak, M., Brzozowski, W. Kwiecień, T., & Drozdowicz, D. Bogdał, J. Budak, A. true true, J. Bagdał, , S. Konturek, S. P. (2003). Kolonizacja grzybicza przewodu pokarmowego w badaniach klinicznych doświadczeń. *PrzewLek*, 6, 81–89.

