

## **Amebas de vida libre: ¿“Caballos de Troya” o vectores en la diseminación de *Helicobacter pylori* en los ambientes acuáticos?**

Free living Amoebae: "Trojan horses" or vectors in the dissemination of *Helicobacter pylori* in aquatic environments?

Amilcar Duquesne Alderete<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3928-3987>

Rosabel Falcón Márquez<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1273-6835>

Luis Enrique Jerez Puebla<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5343-0421>

Dorita Ginorio Gavito<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3889-763X>

Elizabeth Sanler Wong<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6855-0365>

Rafael Llanes Caballero<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7882-1296>

Isabel Martínez Mota<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7828-5497>

<sup>1</sup>Hospital Ortopédico Docente Fructuoso Rodríguez. La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri (IPK). La Habana, Cuba.

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR). La Habana, Cuba.

<sup>4</sup>Escuela Latinoamericana de Medicina. La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia. [alduque@infomed.sld.cu](mailto:alduque@infomed.sld.cu)

### **RESUMEN**

**Introducción:** Las amebas de vida libre son microorganismos eucarióticos unicelulares que se encuentran en diferentes ambientes y que interactúan con bacterias, virus y hongos. En los últimos años, llama la atención de la comunidad científica la relación que se establece entre estos parásitos y *Helicobacter pylori*.

**Objetivos:** Actualizar el papel de las amebas de vida libre en la diseminación de *Helicobacter pylori*, y esclarecer la influencia de este fenómeno en la persistencia de la bacteria y en la posible resistencia a los antimicrobianos.

**Métodos:** Se emplearon varios motores de búsqueda como Google, PubMed, Cochrane, Google Scholar, SciELO, Redalyc, entre otros. Se limitó la búsqueda a los

últimos 10 años, aunque también se tuvieron en cuenta algunos estudios antiguos, clásicos sobre el tema.

**Conclusiones:** La actualización del tema respalda que las amebas de vida libre, en especial *Acanthamoeba spp.* en los ambientes acuáticos, intervienen como reservorios de *H. pylori* y actúan como “Caballos de Troya” para la persistencia y la diseminación de esta bacteria, considerada resistente a los antimicrobianos, en especial a la claritromicina, y un agente causal de múltiples enfermedades gastroduodenales, entre ellas el cáncer gástrico. Futuras investigaciones enfocadas en aspectos medulares de la fisiopatología de esta relación entre ambos microorganismos deben proyectarse para un mejor conocimiento y nivel de actuación ante lo que pudiera considerarse un problema serio de salud.

**Palabras clave:** Amebas de vida libre; *Helicobacter pylori*; resistencia antimicrobiana; persistencia bacteriana.

## ABSTRACT

**Introduction:** Free living amoebae are unicellular eukaryotic microorganisms that are found in different environments and that interact with bacteria, viruses and fungus. Recently, it has called the attention of the scientific community the established relation between free living amoebae and *Helicobacter pylori*.

**Objectives:** To update the role of free-living amoebae in the dissemination of *Helicobacter pylori*, as well as to clarify how this phenomenon can influence in the bacterial persistence, and in its possible resistance to antimicrobials.

**Methods:** Different search engines such as Google, PubMed, Cochrane, Google Scholar, SciELO, Redalyc, among others were used. The search was limited to the last 10 years, although some older studies, mainly classics, were taking into consideration.

**Conclusions:** The updating of the topic back up the fact that free living amoebae, specially *Acanthamoeba spp.* in the aquatic environments, intervene as *Helicobacter pylori* reservoir and acts as "Trojan horses" for the persistence and the dissemination of this bacteria, considered resistant to antimicrobials, specially clarithromycin and a causal agent of several gastroduodenal diseases, for instance, gastric cancer. Future investigations focused on medullar aspects of the

physiopathology of this relation between both microorganisms, should be projected for a better knowledge and level of acting in front of what can be considered a serious health problem.

**Keywords:** Free living Amoebae; *Helicobacter pylori*; antimicrobial resistance; bacterial persistence.

Recibido: 15/06/2023

Aceptado: 09/10/2023

## Introducción

La palabra ameba se deriva del latín científico amoeba y éste del griego ἀμοιβή *amoibé*, que significa cambio.<sup>(1)</sup> El grupo de los protistas ameboides comprenden un grupo extenso y muy diverso, con más de 15 000 especies descritas.<sup>(2)</sup>

Estos protistas se mueven y emiten extensiones citoplasmáticas denominadas pseudópodos. Mientras que algunos como *Entamoeba histolytica*, son parásitos,<sup>(3)</sup> otros no dependen de un hospedero y se clasifican como amebas de vida libre (AVL).<sup>(4)</sup> Las AVL presentan al menos dos estados de desarrollo: el trofozoito, la forma de crecimiento activo mediante la cual son capaces de moverse, alimentarse y replicarse por fisión binaria, y el quiste, la forma de latencia e inactivo desde el punto de vista metabólico. Presentan la forma de trofozoito en condiciones favorables, pero son capaces de cambiar a quiste o estado latente bajo condiciones adversas.<sup>(5)</sup>

La formación del quiste en las AVL, supone un cambio fundamental en el trofozoito, tanto en su morfología como en su fisiología durante su ciclo de vida. Esta conversión requiere cambios a nivel molecular y celular como la reducción del contenido citoplasmático, del ADN, del ARN o de las proteínas, la expulsión de materiales no esenciales y la formación de una membrana muy resistente alrededor del organismo, lo cual permite la supervivencia en un estado viable durante muchos años. Del mismo modo, las condiciones favorables pueden provocar el desenquistamiento, es decir, el paso de quiste a trofozoito.<sup>(6)</sup>

Una de las funciones vitales de las AVL es la fagocitosis, para lo cual rodean la partícula con su membrana e internalizan pedazos de la bacteria o célula. Luego, se crean vacuolas, cuyo pH se acidifica hasta que el material internalizado se destruye. Se observa que el proceso es dependiente de una remodelación del citoesqueleto de actina ya que la citocalasina D lo inhibe.<sup>(7)</sup> Además, se cree que el mecanismo también se sustenta en parte, por la acción de las cinasas ya que inhibidores de la tirosina cinasa, y de la fosfatidil-inositol cinasa, retrasan el proceso. Sin embargo, este mecanismo molecular específico no es del todo conocido.<sup>(8)</sup>

Se describen hasta el momento, gran cantidad de géneros y de especies de AVL, pero solo algunas especies (genotipos) de *Acanthamoeba* spp., las especies *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia pedata* y *Vermamoeba vermiformis*, junto a los géneros *Paravahlkampfia* y *Vahlkampfia*, se informan como causantes de patologías en humanos y en otros animales.<sup>(9,10,11)</sup>

Estas amebas son microorganismos eucarióticos unicelulares que se encuentran en ambientes naturales acuáticos y terrestres en climas templados, pero además en otros ambientes extremos tales como el agua polar, la tierra árida y la selva tropical.<sup>(4,12)</sup> Su existencia en los alimentos se describe a partir de distintas superficies en contacto con la carne, como las cintas transportadoras, las agujas de un ablandador de carne, y las mesas de trabajo;<sup>(13)</sup> así como en los caparzones o las branquias de crustáceos,<sup>(14)</sup> y en los frigoríficos domésticos, sobre todo en las bandejas de verduras. Esto indica que las AVL están presentes en los vegetales y pueden transferirse a las superficies.<sup>(15)</sup> En el año 2014, Vaerewijck y otros<sup>(5)</sup> estudian aislamientos de amebas entre una gran variedad de vegetales como zanahorias, cebollas, coliflores, lechugas, rábanos, espinacas y tomates.

Las encefalitis y las meningoencefalitis son enfermedades que se relacionan con la presencia de las AVL, amenazan la vida y afectan a niños inmunocompetentes y a adultos inmunocomprometidos.<sup>(10,16,17)</sup> Se describen otros tipos de infecciones locales y diseminadas.<sup>(10,18)</sup> Son, además, la principal causa de infección corneal que lleva a la queratitis asociada a los lentes de contacto.<sup>(19)</sup> Resulta interesante el hecho que algunos de estos pacientes con queratitis asociadas a AVL están también infectados con varias especies bacterianas,<sup>(17)</sup> por lo que aumenta la

preocupación sobre el posible papel de estas bacterias intracelulares en la resistencia de las AVL a los biocidas.<sup>(18)</sup>

Por las razones antes expuestas, las AVL se consideran agentes infecciosos emergentes, tanto patógenos primarios como oportunistas, cuyo diagnóstico resulta complicado desde el punto de vista clínico-patológico y microbiológico, lo cual dificulta a su vez conocer su prevalencia real.<sup>(20)</sup>

A ello se le adiciona un aspecto de particular importancia y es la interacción de las AVL con bacterias virus y hongos. Las bacterias, son por mucho las más estudiadas en esta relación dual, con estudios pioneros en *Legionella* spp. y en las micobacterias.<sup>(20)</sup>

En los últimos años, llama la atención de la comunidad científica la relación que se establece entre las AVL y *H. pylori*, ya que se sospecha que esta bacteria podría sobrevivir en el interior de las AVL presentes en el agua, lo que la protegería frente a los tratamientos de desinfección, al igual que ocurre con otros patógenos que se transmiten a través del agua por la ruta fecal. Pocos son los estudios que abordan esta temática a nivel internacional y en Cuba, por lo cual se realiza esta revisión con el objetivo de actualizar el papel de las AVL en la diseminación de *H. pylori*, y en lo posible, esclarecer como este fenómeno influye en la persistencia de la bacteria y en su posible resistencia a los antimicrobianos como claritromicina.

## Métodos

Se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica, que incluyó las generalidades de las AVL y de *H. pylori*, las relaciones entre las amebas y diferentes géneros bacterianos, entre las que se encontraba la bacteria objeto de estudio, así como los fenómenos de persistencia bacteriana y de resistencia antimicrobiana en el contexto de la relación entre ambos microorganismos. Para ello se emplearon varios motores de búsqueda como Google y Google Scholar, así como diferentes bases de datos dentro de las que se encuentran PubMed, Cochrane, SciELO, Redalyc, entre otras. Se limitó la búsqueda a los últimos 10 años, aunque también se tuvieron en cuenta algunos estudios antiguos, clásicos sobre el tema.

## *Helicobacter pylori*

Es un bacilo Gram negativo, que infecta al 50 % de la población en todo el mundo y a alrededor del 90% de los habitantes de países en vías de desarrollo. Se le considera una de las infecciones bacterianas crónicas más prevalente en los humanos,<sup>(21)</sup> asociado a la gastritis, la úlcera duodenal, el carcinoma gástrico, y el linfoma tipo MALT.<sup>(22)</sup>

La forma helicoidal de la bacteria le permite penetrar en la mucosa gástrica y causar una reacción infamatoria de base inmune, humoral y tisular. La gastritis puede provocar la úlcera, enfermedad gastroduodenal con más del 90 % de personas infectadas con *H. pylori*, y puede progresar a la atrofia de la mucosa, al adenocarcinoma o al linfoma tipo MALT.<sup>(23)</sup>

En el año 2014, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer clasifica a *H. pylori* como un carcinógeno clase 1, debido a que su infección contribuye a casi el 75 % de los cánceres de estómago.<sup>(23)</sup> Desde el año 2017, este microorganismo se cataloga dentro de las 12 familias de bacterias resistentes a los antimicrobianos que representan la mayor amenaza a la salud humana, con cifras alarmantes de resistencia a la claritromicina, el antibiótico más importante en la terapia combinada para la erradicación de esta bacteria.<sup>(24,25)</sup>

Múltiples factores, como el nivel socioeconómico, la edad, la higiene, los hábitos sanitarios y el acceso al agua limpia determinan las tasas de infección por *H. pylori* en países en desarrollo.<sup>(21,23,26)</sup> Estudios recientes<sup>(27,28,29,30)</sup> sugieren que la prevalencia promedio de la infección por *H. pylori* en adultos cubanos es similar a la que se reporta en América Latina y el Caribe (59,3 %, 95 % IC 52,9-65,6).<sup>(21)</sup> Se atribuyen en Cuba unas 1300 muertes por año a la úlcera péptica (n = 366) y al cáncer gástrico (n = 865), con una tasa global de muerte en el país mayor para hombres mayores de 40 años.<sup>(31)</sup>

*Helicobacter pylori* se conoce como una bacteria extracelular, que se une a las células epiteliales gástricas y que adapta diferentes mecanismos para evitar la fagocitosis y para evadir la respuesta inmune.<sup>(32)</sup> Este microorganismo coexiste con el hombre desde hace 30 000 años.<sup>(33)</sup> Durante este largo tiempo, la evolución de la bacteria en su adaptación conlleva a generar un nicho confortable en el

hospedero humano. Al contrario de otros patógenos bacterianos que la respuesta inmune adaptativa del hospedero los elimina; *H. pylori* establece, de forma exitosa, una infección persistente, a pesar de la presencia de una inmunidad innata y adaptativa vigorosa, y desarrolla varios mecanismos que evaden ambas respuestas. La respuesta inmune mediada por el hospedero no solo falla en eliminar a la bacteria, sino que ayuda a la colonización mediante una disponibilidad aumentada de sitios de adhesión tales como MHC II y CD74, inducidos por el IFN- $\gamma$  y la IL-8 durante la infección por *H. pylori*.<sup>(34)</sup>

*Helicobacter pylori* puede adquirirse por diferentes vías, entre las que se encuentra la vía fecal oral a través del agua.<sup>(35)</sup> Sin embargo, la relación entre las enfermedades gastroduodenales y el agua contaminada aún no está bien esclarecida, debido al fracaso en el cultivo de este patógeno del ambiente acuático.<sup>(11,35)</sup> Además, es ostensible la sensibilidad de *H. pylori* a los tratamientos de desinfección de agua, pero los mecanismos de sobrevivencia de esta bacteria en el agua no están bien definidos.

Poco se sabe de la ecología microbiana de *H. pylori* fuera del hospedero humano.<sup>(36)</sup> En la última década, sin embargo, varios estudios apoyan la hipótesis que las AVL pueden ser hospederos acuáticos ambientales para esta bacteria.<sup>(37,38,39)</sup> Esta hipótesis nace de la revisión del estado del arte que sustenta. Son muchos los antecedentes que abordan los vínculos de las AVL con otras bacterias diferentes a *H. pylori*.<sup>(40,41,42,43,44,45,46)</sup> A continuación, por la relevancia del tema, se abordan algunos elementos a propósito de esta ancestral relación.

### **Asociación entre amebas de vida libre y otras bacterias**

Data de 1967 la observación bajo el microscopio de la presencia de endosimbiontes citoplasmáticos en *A. castellanii*.<sup>(40)</sup> En la actualidad, se estima que cerca de 25 % de los aislados de *Acanthamoeba* spp. contienen bacterias; así mismo, se identifican más de 100 microorganismos patógenos para el humano capaces de sobrevivir dentro de distintas especies amebianas.<sup>(41)</sup>

Debido a que las amebas del género *Acanthamoeba* son ubicuas en la naturaleza e interactúan con una gran variedad de bacterias, las cuales pueden sobrevivir dentro de la ameba por distintos periodos de tiempo y perdurar lo suficiente para



transportarse y diseminarse causando la propagación de enfermedades.<sup>(42)</sup> Dichos microorganismos se denominan endocitobiontes y el impacto de esta relación puede llevar a un aumento de la virulencia de las AVL.<sup>(43)</sup>

Muchas de estas bacterias, como *Legionella* spp., *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. y algunas micobacterias adquieren factores de virulencia mientras viven dentro de las amebas, lo que les permite sobrevivir dentro de otros fagocíticos celulares (por ejemplo, macrófagos humanos). Las AVL proporcionan también resistencia a estas bacterias y las convierte en bacterias resistentes a la ameba (BRA) frente a las respuestas inmunitarias humanas cuando se inhalan o se ingieren, actuando como “Caballos de Troya” para estos agentes infecciosos.<sup>(44)</sup>

Un estudio en Sudáfrica<sup>(45)</sup> investiga la coexistencia de posibles bacterias patógenas humanas y AVL en muestras recolectadas de agua almacenada en hogares rurales de Sudáfrica que utilizan como fuente primaria agua de pozo. Entre las especies bacterianas identificadas se encuentran, además de las mencionadas, *Enterobacter* spp. y otros patógenos oportunistas emergentes como *Stenotrophomonas maltophilia*. Otras bacterias de interés público tales como *Aeromonas* sp., *Arcobacter* sp. y *Salmonella* sp. se detectan como parte del microbioma de las AVL en muestras analizadas de lechugas.<sup>(46)</sup>

Las amebas se alimentan de bacterias a través de procesos fagocíticos similares a los establecidos en los macrófagos dentro de los fagolisosomas. Dichos mecanismos perduran durante la evolución, manteniéndose conservados entre diversas células eucariontes.<sup>(47)</sup> Debido a que ambos tipos celulares se catalogan como fagocitos profesionales, es lógico pensar que las bacterias utilizan mecanismos moleculares análogos que les permite evadir la fagocitosis dentro de amebas y macrófagos y, por lo tanto, lograr sobrevivir. A pesar del papel de las AVL como depredadores de bacterias, queda demostrada la capacidad de varios tipos de microorganismos resistentes a la degradación de las amebas y que sobreviven en su interior.<sup>(12)</sup>

A pesar de que una amplia gama de artículos describe las interacciones AVL-BRA, pocos estudian el microbioma bacteriano completo de las amebas de vida libre. Solo tres estudios abordan este tema mediante tecnología de secuenciación de nueva generación, a partir de AVL aisladas de vegetales,<sup>(46)</sup> de fuentes de agua



potable,<sup>(48)</sup> y de aguas residuales.<sup>(49)</sup> Por ello, para establecer que bacterias tienden a interactuar con las AVL y descubrir nuevas posibles BRA, es necesario realizar más investigaciones sobre el microbioma bacteriano de las AVL.

Los cambios y requerimientos necesarios para que un microorganismo pueda sobrevivir dentro de *A. castellanii* y *A. polyphaga* son motivo de interés para la comunidad científica.<sup>(42)</sup> Sin embargo, el efecto de esta relación sobre la ameba aún permanece sin entenderse por completo.<sup>(50)</sup> Shi y otros<sup>(51)</sup> evalúan el efecto citopático causado por las AVL en cultivos celulares epiteliales y determinan que las amebas que contienen microorganismos generan un mayor efecto citopático en comparación con el efecto que causan las amebas sin microorganismos en dichos cultivos celulares epiteliales. Debido a esto, se cree que algunos endocitobiontes podrían aumentar la virulencia de *Acanthamoeba* spp. Se requieren más estudios para confirmar si este efecto es dependiente del tipo de microorganismo enmascarado dentro de la ameba, si depende del tipo de AVL, o de una combinación de ambos factores.

Las relaciones entre las amebas y las bacterias son complejas y pueden extenderse a las interacciones mutualísticas y parasitarias.<sup>(51)</sup> Mientras que las interacciones depredatorias pueden tener implicaciones ecológicas,<sup>(52)</sup> las interacciones parasitarias atraen de forma considerable el interés de las investigaciones biomédicas. De hecho, algunas BRA son también patógenos humanos,<sup>(41)</sup> lo que remarca el papel de las amebas como reservorios y/o medios de diseminación de estas,<sup>(53)</sup> y se especula que actúa como un terreno de entrenamiento para los patógenos enmascarados dentro de las AVL.<sup>(54)</sup>

Mungroo y otros,<sup>(55)</sup> en un reciente artículo de revisión,<sup>(55)</sup> describen el patrón general de interacción entre *Acanthamoeba* y las bacterias, el cual puede llevar a dos opciones luego de la fagocitosis, la digestión o la sobrevivencia de la bacteria. En el caso que la bacteria sobreviva, la misma puede mantenerse estacionaria sin multiplicarse y en ese caso la ameba actúa como “caballo de Troya” o multiplicarse quedando la ameba como un reservorio o vector.

En la actualidad existe un entendimiento general de que la evolución de los protistas depende en gran medida de la presencia de las bacterias, por ejemplo, la

trasferencia horizontal de genes, de la bacteria a los protistas, contribuye de forma considerable al genoma de estos hospederos.<sup>(56)</sup>

De esa forma, las amebas constituyen modelos bien establecidos para el estudio de interacción con las bacterias.<sup>(57)</sup> El análisis de las interacciones entre las AVL y las bacterias patógenas u otros microorganismos es de gran valor para la salud pública, sobre todo, si se tiene en cuenta que las bacterias incorporadas a los trofozoítos muestran una mayor resistencia a los biocidas lo cual les confiere una mayor resistencia dentro de los quistes. Este análisis adquiere una particular importancia cuando se trata de *H. pylori*.

### ***Helicobacter pylori* en amebas de vida libre**

*Helicobacter pylori*, un patógeno extracelular que reside en la capa de moco sobre el epitelio gástrico, y que tiene la capacidad de que una fracción de la bacteria invada las células epiteliales o resida dentro de los macrófagos y los polimorfonucleares (PMN). Los macrófagos tienen su encuentro con la bacteria, sobre todo, en las regiones de ulceración, mientras que los PMN lo hacen en la capa de moco. Allen,<sup>(58)</sup> en un estudio muestra que la muerte de *H. pylori* tanto por los macrófagos, como por los PMN es ineficiente, y se comienza a entender cómo se modulan las interacciones entre la bacteria y los fagocitos.

La relación entre *H. pylori* y las AVL se estudia *in vitro*,<sup>(39)</sup> en las muestras de aguas de desecho y de consumo,<sup>(38)</sup> así como en muestras en vegetales como en lechugas.<sup>(46)</sup> Todos estos resultados demuestran que *H. pylori* es capaz de permanecer vivo dentro de las AVL en las muestras estudiadas, evadir los mecanismos de fagocitosis, sobrevivir por largos períodos de tiempo bajo condiciones aeróbicas y mantener su viabilidad cuando se protege en las AVL.<sup>(38)</sup> Un estudio en grandes ríos<sup>(59)</sup> demuestra la sobrevivencia intracelular de *H. pylori* en *Acanthamoeba* spp., lo cual prueba su papel como “caballo de Troya” dentro de dicha AVL. Moreno y otros,<sup>(39)</sup> por su parte, evidencian el crecimiento y la multiplicación de *H. pylori* dentro de *Acanthamoeba castellanii*, lo cual potencia su rol como vector de transmisión de la infección.

Las interacciones entre *H. pylori* y los macrófagos se caracterizan, en primer lugar, porque la bacteria viva y activa desde el punto de vista metabólico, retrasa su

entrada al macrófago,<sup>(60)</sup> a través de un sistema de señalización que se regula por un control de una proteína cinasa típica.<sup>(61)</sup>

El retraso de la fagocitosis es esencial para la sobrevivencia de la bacteria y para la opsonización de *H. pylori* con IgG, la cual resulta insuficiente para promover un rápido engullimiento y muerte intracelular.<sup>(61)</sup> Los receptores que median la fagocitosis no se definen aún, pero las vías de señalización inusuales que utilizan estos microorganismos, sugieren que puede existir un nuevo receptor. En segundo lugar, la bacteria intracelular estimula la fusión homotípica del fagosoma, y los organismos sobreviven por al menos 24 horas dentro de nuevos organelos llamados megasomas,<sup>(60)</sup> que acumulan marcadores antigénicos endosomales tempranos, y su formación se regula en parte por una proteína segregada llamada toxina vacuolizante (VacA).<sup>(62)</sup> La isla de patogenicidad (cagPAI) que codifica un sistema de secreción tipo IV se considera involucrado en la internalización de la bacteria y como el factor de virulencia mayoritario en *H. pylori*.<sup>(63)</sup>

Aunque existen estudios que investigan la internalización de *H. pylori* en las AVL *in vitro*,<sup>(60,64)</sup> ninguno demuestra la sobrevivencia del microorganismo después de la desinfección. Estos resultados y el hecho de que la bacteria se detecta en diferentes sistemas de agua que incluyen los ríos y las aguas de desecho y de consumo,<sup>(38,49)</sup> apoya la hipótesis que este patógeno puede pertenecer al grupo de las BRA y sobrevivir dentro de las AVL, las cuales actúan como “Caballos de Troya”, al protegerla de biocidas y se convierten en un vehículo de transmisión.<sup>(60)</sup>

Winięcka y otros,<sup>(65)</sup> al investigar la interacción entre las AVL y *H. pylori*, sugieren que la viabilidad de la bacteria se mejora en presencia de *Acanthamoeba castellanii* ya que esta bacteria microaerofílica estimula su crecimiento frente a la disminución del oxígeno disuelto en el medio que ofrece la AVL. Se considera importante definir si la viabilidad de *H. pylori* dentro de la ameba se debe a la capacidad de sobrevivencia de este patógeno o si el cocultivo solo promueve la viabilidad de la bacteria extracelular presente. En este sentido, este grupo de investigadores demuestran un incremento de 100 veces en el conteo de bacterias después de los siete días, y que puede mantenerse hasta por ocho semanas en un medio de cultivo apropiado.

Debido al hecho que *H. pylori* tiende a adquirirse desde el medio ambiente en un estado viable, pero no cultivable,<sup>(45,46,47,48,49)</sup> lograr la viabilidad del patógeno mediante el uso de métodos de cultivo es una tarea muy difícil. En este sentido, los métodos moleculares tales como la Hibridación de Fluorescencia *in Situ* (HFIS) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (RCPc) constituyen alternativas adecuadas para detectar la presencia de *H. pylori* dentro de la ameba. Sin embargo, tienen el inconveniente de no distinguir entre la bacteria viva o muerta. La HFIS en combinación con el conteo de células viables se propone como una metodología para detectar de forma exitosa células viables de *H. pylori* en las aguas de desecho y de consumo.<sup>(39,46,49,64)</sup>

Mesonero y otros,<sup>(39)</sup> determinan el número de *H. pylori* dentro de dos especies de AVL mediante la estimación de la cantidad de colonias a través de la RCPc con el gen ARN 23S. El análisis del número de bacterias se incrementa en ambas especies de amebas de forma significativa en más de 50 veces al cuarto día a 37 °C, lo que sugiere que las AVL promueven la multiplicación de *H. pylori*. Un análisis similar se obtiene a 25°C, pero con una cinética menor, por lo que los conteos viables no se incrementan ( $p < 0,001$ ), y *H. pylori* sin hospederos de amebas disminuye también, después de tres días. Todo ello sugiere que *H. pylori* puede entrar en un estado viable, pero no cultivable y luego de un tiempo incrementar la probabilidad de la formación de células viables; secuencia que puede afectarse a una temperatura menor. A pesar de que este estudio sugiere que *H. pylori* puede replicarse dentro de las AVL las evidencias apuntan a que la relación entre ambos favorece la sobrevivencia de la bacteria. Otro estudio de estos investigadores,<sup>(46)</sup> sustenta esta afirmación con la detección del ADN de *H. pylori* dentro del microbioma de las AVL presentes en muestras de lechugas con el empleo de las técnicas moleculares.

Los hallazgos sugieren que las AVL pueden actuar como un mediador biológico de la activación de las células viables, pero no cultivables de *H. pylori* y convierten a las AVL en un modelo celular prometedor para la identificación de genes que codifican proteínas involucradas en la adaptación y resistencia de *H. pylori* dentro de los fagosomas. Los planteamientos anteriores refuerzan la teoría desarrollada por Chatton<sup>(66)</sup> hace más de 100 años, en la que las amebas pueden servir de vectores o reservorios a patógenos de transmisión hídrica, como es el caso de *H.*

*pylori*. Nuevos estudios deben demostrar la transmisibilidad de las bacterias viables, pero no cultivables dentro de las AVL, y ofrecer información sobre los riesgos de la transmisión hídrica de *H. pylori* a través de las AVL.<sup>(67)</sup>

De igual manera, quedan muchas interrogantes para esclarecer cómo ocurre el proceso de endocitosis y exocitosis en esta relación simbiótica entre las AVL y *H. pylori* y qué factores influyen en la regulación de la multiplicación intracelular de dicha bacteria en las AVL. Otras investigaciones que den respuesta a estas y a otras interrogantes quedan aún pendientes por puntualizar y proyectar.

### **Comportamiento de la persistencia y de la resistencia antimicrobiana de bacterias asociado con las amebas de vida libre**

La resistencia antimicrobiana es la capacidad de un microorganismo para tolerar los efectos de los antibióticos; característica que puede ser inherente de la bacteria o que puede adquirirse durante el proceso infeccioso.<sup>(68)</sup> Se describen dos mecanismos que soportan la prevalencia de las bacterias resistentes: la selección artificial de clones resistentes debido a un tratamiento antibiótico inadecuado, y la selección natural, en la que hay una adquisición de plásmidos con genes de resistencia por transferencia horizontal.<sup>(69)</sup> Por otra parte, la resistencia implica una serie de cambios genéticos heredados (genes de resistencia, plásmidos), mecanismos enzimáticos (enzimas alteradoras o degradadoras), cambios estructurales y funcionales (impermeabilidad, bombas de eflujo), y alteraciones del sitio diana, que hacen ineficiente la terapia antibiótica.<sup>(70)</sup>

En contraste, la persistencia bacteriana implica una variación fenotípica no heredada, que se presenta en genes y mecanismos (respuesta del sistema de reparación de emergencia, sistemas de toxina-antitoxina, detección de cuórum, respuesta estricta a estrés conservado, metabolismo reducido del ATP, bombas de eflujo, formación de biopelículas) que se activan en respuesta a una gran variedad de tensiones ambientales de estrés y que permiten su adaptación y supervivencia.<sup>(70)</sup>

Las bacterias resistentes crecen en presencia de niveles elevados de concentración antibiótica, lo cual se interpreta *in vitro* como el aumento en la concentración mínima inhibitoria (CMI). En cambio, las persistentes no tienen

ningún efecto sobre la CMI, ya que estas células están en latencia y los antibióticos actúan sobre células activas (en crecimiento exponencial), lo que explica la tolerancia. Este fenotipo constituye una importante primera línea de defensa contra los antibióticos antes de que se adquiriera la resistencia antimicrobiana.<sup>(71)</sup>

La persistencia comprende un conjunto de fenómenos fisiológicos que ocurren en una subpoblación pequeña de células bacterianas salvajes llamadas células persistentes o persistentes bacterianos.<sup>(72)</sup> Estas células se forman en respuesta a una gran variedad de tensiones ambientales debido al estrés (limitación de nutrientes o exposición al daño por antibióticos), se adaptan con éxito al cambio ambiental,<sup>(73)</sup> se vuelven tolerantes y expresan un rango epigenético no heredado (inmutable) a su progenie,<sup>(74)</sup> rasgo que la diferencia de las resistentes, en las que sí existe una verdadera mutación. La aparición de la resistencia antimicrobiana es espontánea y se percibe durante el ciclo celular como variantes fenotípicas raras de tipo salvaje,<sup>(75)</sup> fenotipo de resistencia, subpoblación tolerante<sup>(76)</sup> o denominadas por algunos autores como células multirresistentes a los medicamentos,<sup>(77)</sup> que pueden tener una morfología indistinguible a las células susceptibles a los antibióticos (fenotipo salvaje).<sup>(72)</sup>

La latencia es una característica primordial en las células persistentes, e implica el cierre metabólico reversible (metabolismo inactivo) que permite a las células escapar de la acción letal de los antibióticos, donde muchos sitios diana están inactivos, lo que explica la ineficacia de estos últimos. Sin embargo, el concepto de que los persistentes son bacterias latentes no replicantes suele generar conflictos, es tema aún de debate, y se cuestiona en los últimos años por estudios<sup>(78)</sup> que definen la persistencia como un fenómeno mucho más complejo,<sup>(75)</sup> donde en lugar de una falta de crecimiento aparente (metabolismo inactivo), presentan actividad metabólica activa, que se manifiesta en la sobreexpresión de genes, en la actividad incrementada de las bombas de eflujo para las drogas,<sup>(79)</sup> en la capacidad de multiplicación, la cual conlleva a una estabilidad de su población como resultado de un equilibrio dinámico entre muerte y replicación bacteriana, lo que la aleja de ser un simple sinónimo de latencia.<sup>(80)</sup>

La presencia de persistentes puede ser causa importante de infecciones bacterianas crónicas,<sup>(81)</sup> lo que da lugar a la recalcitrancia, que se relaciona con un

aumento en el riesgo de aparición de resistencia a los antibióticos durante el tratamiento.<sup>(73)</sup> Por lo tanto, la persistencia debe ser una causa de preocupación global, ya que agrava la perspectiva de la actual crisis antibiótica, que se estima provocará hasta 10 millones de víctimas al año para el 2050.<sup>(82)</sup>

Estudios recientes identifican una serie de genes y vías que intervienen en la formación de persistentes. Estas incluyen entre otros, el estrés celular, la limitación de nutrientes, la producción de energía alternativa, la inhibición en la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos, la degradación de proteínas, los transportadores/sistemas de eflujo, los reguladores transcripcionales, las tensiones más generales, como el pH extremo, el choque térmico, la radiación, la defensa antioxidante, los fagos, las biopelículas y los macrófagos.<sup>(72,74,81,84,85,86)</sup>

En el fracaso al tratamiento intervienen el abandono de la terapia por parte del paciente, la llegada deficiente del fármaco hacia el sitio diana, el estado de latencia celular, entre otros y a pesar de que se postula que la tolerancia a múltiples fármacos en microorganismos persistentes es un fenómeno fenotípico, bajo ciertas condiciones estos pueden adquirir mutaciones y desarrollar resistencia genotípica.<sup>(83)</sup>

Diferentes especies bacterianas pueden poseer diferentes capacidades de persistencia *in vitro* e *in vivo*, con distintos grados de dificultad para el tratamiento.<sup>(83)</sup> Por lo que se requiere igualar la atención a la resistencia antimicrobiana y a la persistencia ya que ambos fenómenos son retos importantes para un tratamiento eficaz.<sup>(86)</sup>

A esto se suma el uso diseminado de antibióticos, un problema creciente a nivel mundial, que conlleva a diferentes microorganismos a desarrollar resistencia a los antibióticos, fenómeno que se agrava en las amebas que interactúan con las BRA patogénicas, lo cual disminuye la susceptibilidad de estos patógenos a los antibióticos.<sup>(87)</sup>

Este análisis se puede contextualizar a la interacción AVL-*H. pylori*, se sugiere una posible causa del fallo terapéutico del tratamiento a la infección por esta bacteria y es su persistencia bacteriana dentro de las AVL, que les permite sobrevivir, diseminarse y desarrollar un mecanismo de resistencia antimicrobiana a drogas como la claritromicina, la levofloxacina, la amoxicilina, entre otras. Se necesitan



más estudios que particularicen esta interesante relación entre ambos microorganismos, su fisiopatología y la posibilidad de persistencia de la bacteria, que resulte al final en una resistencia antimicrobiana incrementada.

## Conclusiones

La actualización del tema respalda que las AVL, en especial *Acanthamoeba* spp. en los ambientes acuáticos, intervienen como reservorios de *H. pylori* y actúan como “Caballos de Troya” para la persistencia y la diseminación de esta bacteria, considerada resistente a los antimicrobianos, en especial a la claritromicina y un agente causal de múltiples enfermedades gastroduodenales, entre ellas el cáncer gástrico. Futuras investigaciones enfocadas en aspectos medulares de la fisiopatología de esta relación entre ambos microorganismos deben proyectarse para un mejor conocimiento y nivel de actuación ante lo que pudiera considerarse un problema serio de salud.

## Referencias bibliográficas

1. Real Academia Española, Diccionario de la Lengua Española, avance de la 23ª ed. Ameba 2016 [acceso 24/09/2016]. Disponible en: <https://dle.rae.es/?id=2la7rRr>
2. Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, *et al.* The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2012;59(5):429-93. DOI: <https://doi:10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>
3. Carrero JC, Reyes López M, Serrano Luna J, Shibayama M, Unzueta J, León-Sicairos N, *et al.* Intestinal amoebiasis: 160 years of its first detection and still remains as a health problem in developing countries. *Int J Med Microbiol.* 2020;310:151358. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151358>
4. Anderson OR. A half-century of research on free-living amoebae (1965-2017): review of biogeographic, ecological and physiological studies. *Acta Protozol.* 2018;57:1-28. DOI: <https://doi.org/10.4467/16890027AP.18.001.8395>

5. Vaerewijck MJM, Baré J, Lambrecht E, Sabbe K, Houf K. Interactions of foodborne pathogens with free-living protozoa: potential consequences for food Safety. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2014;13(5):924-44. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12100>
6. Siddiqui R, Abouleish MY, Khamis M, Ibrahim T, Khan NA. Dual targeting of function–structure for effective killing of pathogenic free-living amoebae. *ACS Med. Chem. Lett.* 2021;12(5):672-6. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.1c00200>
7. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite.* 2015;22:10. DOI: <https://doi.10.1051/parasite/2015010>
8. Alsam S, Sissons J, Dudley R, Khan NA. Mechanisms associated with *Acanthamoeba castellanii* (T4) phagocytosis. *Parasitol Res.* 2005;96:402-9. DOI: <https://doi.10.1007/s00436-005-1401-z>
9. Lorenzo Morales J, Monteverde Miranda CA, Jiménez C, Tejedor ML, Valladares B, Ortega Rivas A. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *AAEM.* 2005;12:233-6.
10. Lee DI, Park SH, Baek JH, Yoon JW, Jin SI, Han KE, *et al.* Identification of Free-Living Amoebas in Tap Water of Buildings with Storage Tanks in Korea. *Korean J Parasitol.* 2020;58(2):191-4. DOI: <https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.2.191>
11. Trabelsi H, Dendana F, Neji S, Sellami H, Cheikhrouhou F, Makni F, *et al.* Morphological and molecular identification of free living amoeba isolated from hospital water in Tunisia. *Parasitol. Res.* 2016;115(1):431-5. DOI: <https://doi.10.1007/s00436-015-4788-1>
12. Samba Louaka A, Delafont V, Rodier MH, Cateau E, Héchard Y. Free living amoebae and squatters in the wild: ecological and molecular features. *FEMS Microbiol Rev.* 2019;43:415-34. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz011>
13. Vaerewijck MJM, Sabbe K, Baré J, Houf K. Microscopic and molecular studies of the diversity of Free-Living Protozoa in meat-cutting plants. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(18):5741-9. DOI: <https://doi.10.1128/AEM.00980-08>
14. Fernández Leborans G. Epibiosis in Crustacea: an overview. *Crustaceana.* 2010;83(5):549-640. DOI: <https://www.jstor.org/stable/27822637>

15. Vaerewijck MJM, Sabbe K, Van Hende J, Baré J, Houf K. Sampling strategy, occurrence and diversity of free-living protozoa in domestic refrigerators: Free living protozoa in refrigerators. *J Appl Microbiol.* 2010;109(5):1566-78. DOI: <https://doi.10.1111/j.1365-2672.2010.04783.x>
16. Aitken D, Hay J, Kinnear FB, Kirkness CM, Lee WR, Seal DV. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. *J. Ophthalmol.* 1996;103(3):485-94. DOI: [https://doi.10.1016/s0161-6420\(96\)30667-2](https://doi.10.1016/s0161-6420(96)30667-2)
17. Michel R, Schmid EN, Boker T, Hager DG, Muller KD, Hoffmann R, *et al.* *Vannella* sp. harboring microsporidia like organisms isolated from the contact lens and inflamed eye of a female keratitis patient. *Parasitol Res.* 2000;86(6):514-20. DOI: <https://doi.10.1007/s004360050704>
18. Grace E, Asbill S, Virga K. *Naegleria fowleri*: pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;59(11):6677-81. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01293-15>
19. Park MK, Cho MK, Kang SA, Park HK, Kim DH, Yu HS. *Acanthamoeba* protease activity promotes allergic airway inflammation via protease-activated receptor 2. *PloS one.* 2014;9(3):e92726. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092726>
20. Wagner Abuchaibe CM. Aislamiento y caracterización molecular de amebas de vida libre en Venezuela. Tesis doctoral. 2017. Disponible en: <https://riull.ull.es/xmlui/handle/915/6829>
21. Zamani M, Ebrahimitabar F, Zamani V, Miller WH, Alizadeh Navaei R, Shokri Shirvani J, *et al.* Systematic review with meta-analysis: The world wide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2018;47:868-76. DOI: <https://doi.org/10.1111/apt.14561>
22. Fong I. *Helicobacter pylori* Infection: When Should It Be Treated? In *Current Trends and Concerns in Infectious Diseases; Emerging Infectious Diseases of the 21<sup>st</sup> Century* Ed.; Springer Nature: Gewerbesrasse, Switzerland, 2020; Chapter 4; pp. 81-102.
23. Mladenova I. Clinical Relevance of *Helicobacter pylori* Infection. *J Clin Med.* 2021;10(6):3473. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm10163473>

24. Willyard C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature*. 2017;543:15. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature.2017.21550>
25. Lee YC, Dore MP, Graham DY. Diagnosis and Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *Annu. Rev. Med.* 2022;73:183-95. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042220-020814>
26. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, *et al.* Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: Systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 2017;153:420-9. DOI: <https://doi.10.1053/jgastro.2017.04.022>.
27. Llanes R, Feliciano O, Gutiérrez O, Gala A, Valdés L, Capó V, *et al.* Nuevos conocimientos sobre el diagnóstico y la resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* en Cuba. *Rev. Ann. Acad. Cienc. Cuba.* 2014 [acceso 17/02/2023];4:1-9. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu> ISSN:2304-0106.
28. Galbán E, Arús E, Periles U. Endoscopic findings and associated risk factors in primary health care settings in Havana, Cuba. *Medicc Rev.* 2012;14(1):30-7. DOI: <https://doi.org/10.37757/MR2012V14.N1.7>
29. Rodríguez A, Llanes R, Bello M, Langaney J, Verdasquera D, Argüez A, *et al.* Infección por *Helicobacter pylori* en pacientes atendidos en el Hospital General Docente Iván Portuondo. *Panorama. Cuba y Salud.* 2014 [acceso 17/02/2023];8:26-30. Disponible en: <https://revpanorama.sld.cu/index.php/panorama/article/view/16>
30. Gutiérrez B, Vidal T, Valmaña CE, Camou Juncas C, Santos A, Mégraud F, *et al.* *Helicobacter pylori* infection in Havana, Cuba. Prevalence and cagA status of the strains. *Vaccimonitor.* 2005 [acceso 17/02/2023];14:15-19. Disponible en: [https://researchonline.nd.edu.au/med\\_article/151/](https://researchonline.nd.edu.au/med_article/151/)
31. Anuario Estadístico de Salud. República de Cuba. 2020 [acceso 17/02/2023];1-192. Disponible en: <https://temas.sld.cu/estadisticassalud/2021/08/11/anuario-estadistico-de-salud-2020/>
32. Allen LA. Phagocytosis and persistence of *Helicobacter pylori*. *Cell Microbiol.* 2007;9(4):817-28. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00906.x>
33. Moodley Y, Linz B, Yamaoka Y, Windsor HM, Breurec S, Wu JY, *et al.* The peopling of the Pacific from a bacterial perspective. *Science.* 2009;323:527-30. DOI: <https://doi.10.1126/science.1166083>

34. Beswick EJ, Bland DA, Suarez G, Barrera CA, Fan X, Reyes VE. *Helicobacter pylori* binds to CD74 on gastric epithelial cells and stimulates interleukin-8 production. *Infect Immun*. 2005;73:2736-43. DOI: <https://doi.10.1128/IAI.73.5.2736-2743.2005>
35. Percival SL, Thomas JG. Transmission of *Helicobacter pylori* and the role of water and biofilms. *J Water Health*. 2009;7(3):469-77. DOI: <https://doi.10.2166/wh.2009.070>
36. Aziz RK, Khalifa MM, Sharaf RR. Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. *J Adv Res*. 2015;6(4):539-47. DOI: <https://doi.10.1016/j.jare.2013.07.007>
37. Ashbolt NJ. Microbial contamination of drinking water and human health from community water systems. *Curr Environ Health Rep*. 2015;2(1):95-106. DOI: <https://doi.10.1007/s40572-014-0037-5>
38. Moreno-Mesonero L, Moreno Y, Alonso JL, Ferrús MA. Detection of viable *Helicobacter pylori* inside free-living amoebae in wastewater and drinking water samples from Eastern Spain. *Environ Microbiol*. 2017;19(10):4103-12. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13856>
39. Moreno Mesonero L, Moreno Trigos MY, Alonso Molina JL, Ferrús Pérez MA. DVC-FISH and PMA-qPCR techniques to assess the survival of *Helicobacter pylori* inside *Acanthamoeba castellanii*. *Res. Microbiol*. 2016;167(1):29-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.08.002>
40. Jeon KW, Lorch IJ. Unusual intra-cellular bacterial infection in large, free living amoebae. *Exp. Cell Res*. 1967;48(1):236-40. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(67\)90313-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(67)90313-8)
41. Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:413-33. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.413-433.2004>
42. Guimaraes AJ, Gomes KX, Cortines JR, Peralta JM, Peralta RH. *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. *Microbiol Res*. 2016;193:30-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.08.001>

43. Balczun C, Scheid PL. Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance. *Viruses*. 2017;9. DOI: <https://doi.org/10.3390/v9040065>
44. Kofman A, Guarner J. Infections Caused by Free-Living Amoebae. *J. Clin Microbiol*. 2022;60(1):e0022821. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00228-21>
45. Potgieter N, van der Loo C, Barnard TG. Co-Existence of Free-Living Amoebae and Potential Human Pathogenic Bacteria Isolated from Rural Household Water Storage Containers. *Biology*. 2021;10(12):1228. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology10121228>
46. Moreno Mesonero L, Hortelano I, Moreno Y, Ferrús MA. Evidence of viable *Helicobacter pylori* and other bacteria of public health interest associated with free-living amoebae in lettuce samples by next generation sequencing and other molecular techniques. *Int J Food Microbiol*. 2020;3318:108477. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108477>
47. Cosson P, Lima WC. Intracellular killing of bacteria: is Dictyostelium a model macrophage or an alien? *Cell Microbiol*. 2014;16(6):816-23. DOI: <https://doi.org/10.1111/cmi.12291>
48. Delafont V, Brouke A, Bouchon D, Moulin L, Héchard Y. Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Res*. 2013;47(19):6958-65. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.waters.2013.07.047>
49. Moreno Mesonero L, Ferrús MA, Moreno Y. Determination of the bacterial microbiome of free-living amoebae isolated from wastewater by 16S rRNA amplicon-based sequencing. *Environ Res*. 2020;190:109987. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109987>
50. Lovieno A, Ledee DR, Miller D, Alfonso EC. Detection of bacterial endosymbionts in clinical *Acanthamoeba* isolates. *Ophthalmology*. 2010;117:445-52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2009.08.033>
51. Shi Y, Queller DC, Tian Y, Zhang S, Yan Q, HeZ Wu, *et al*. The ecology and evolution of amoeba-bacterium interactions. *Appl Environ Microbiol*. 2021;87:e01866-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01866-20>

52. Pernthaler J. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. Nat Rev Microbiol. 2005;3:537-46. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1180>
53. Cateau E, Delafont V, Hechard Y, Rodier MH. Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? J Hosp Infect. 2014;87:131-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.05.001>
54. Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, Abu Kwaik Y. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. Appl Environ Microbiol. 2005;71:20-8. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.20-28.2005>
55. Mungroo MR, Siddiqui R, Khan NA. War of the microbial world: *Acanthamoeba* spp. interactions with microorganisms. Folia Microbiol. 2021;66:689-99. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00889-7>
56. López García P, Eme L, Moreira D. Symbiosis in eukaryotic evolution. J Theor Biol. 2017;434:20-33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.02.031>
57. Thewes S, Soldati T, Eichinger L. Amoebae as host models to study the interaction with pathogens. Front Cell Infect Microbiol. 2019;9:47. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00047>
58. Allen LA. Modulating phagocyte activation: the pros and cons of *Helicobacter pylori* virulence factors. J Exp Med. 2000;191(9):1451-4. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.191.9.1451>
59. Mehlhorn H, Klimpel S. Parasite and Disease Spread by Major Rivers on Earth. Parasitol Res. 2019. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-29061-0>
60. Allen LA, Schlesinger LS, Kang B. Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. J Exp Med. 2000;191(1):115-28. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.191.1.115>
61. Allen LA, Allgood JA. Atypical protein kinase C- $\delta$  is essential for delayed phagocytosis of *Helicobacter pylori*. Curr Biol. 2002;12(20):1762-6. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)01216-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01216-2)
62. Zheng PY, Jones NL. *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and



- retaining TACO (coronin 1) protein, *Cell. Microbiol.* 2003;5(1):25-40. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00250.x>
63. Tegtmeyer N, Wessler S, Necchi V, Rohde M, Harrer A, Rau TT, *et al.* *Helicobacter pylori* employs a unique basolateral type IV secretion mechanism for CagA delivery. *Cell Host Microbe.* 2017;22:552-60.e5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.09.005>
64. Smith CD, Ashbolt NJ. The fate of *Helicobacter pylori* phagocytised by *Acanthamoeba polyphaga* demonstrated by fluorescent in situ hybridization and quantitative polymerization chain reaction tests. *Curr Microbiol.* 2012;65(6):805-12. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0232-2>
65. Winiecka Krusnell J, Wreiber K, Euler A, Engstrand L, Linder E. Free living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand J Infect Dis.* 2002;34(4):253-6. DOI: <https://doi.org/10.1080/00365540110080052>
66. Chatton E, Lalung Bonnaire P. *Amibe limax* (*Vahlkampfia* n. gen.) dans l'intestin humaine. Son importance pour l'interpretation des amibes de culture. *Bull Soc path exot.* 1912 [acceso 17/02/2023];5:135-43. DOI: [https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus\\_id=50534](https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=50534)
67. Dey R, Rieger A, Banting G, Ashbolt N J. Role of amoebae for survival and recovery of 'non-culturable' *Helicobacter pylori* cells in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2020;96(10):182. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa182>
68. Giono Cerezo S, Santos Preciado JI, Morfín Otero MR, Torres López FJ, Alcántar Curiel MD. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gac Med Mex.* 2020;156:172-80. DOI: <https://doi.10.24875/GMM.20005624>
69. O'Neill CB. The review on antimicrobial resistance. Suiza: World Intellectual Property Organization; 2016.
70. Suclupe Campos DO, Aguilar Gamboa FR. Persistencia bacteriana: un fenotipo celular de importancia clínica en infecciones crónicas y recurrentes. *Horiz Med (Lima).* 2020;20(1):77-87. DOI: <http://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2020.v20n1.11>
71. Van Den Bergh B, Fauvart M, Michiels J. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):219-51. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux001>

72. Kim JS, Wood TK. Tolerant, growing cells from nutrient shifts are not persister cells. *MBio*. 2017;8(2):e00354-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00354-17>
73. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(8):453-64. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>
74. Kussell E, Kishony R, Balaban NQ, Leibler S. Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics*. 2005 [acceso 17/02/2023];169(4):1807-14. Disponible en: <https://10.1534/genetics.104.035352>
75. Orman MA, Brynildsen MP. Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(7):3230-9. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00243-13>
76. Trastoy R, Manso T, Fernández García L, Blasco L, Ambroa A, Pérez del Molino ML, *et al*. Mechanisms of bacterial tolerance and persistence in the gastrointestinal and respiratory environments. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4):e00023-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-18>
77. Torrey HL, Keren I, Via LE, Lee JS, Lewis K. High persister mutants in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. 2016;11(5):1-28. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155127>
78. Helaine S, Kugelberg E. Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems. *Trends Microbiol*. 2014;22(7):417-24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.03.008>
79. Pu Y, Zhao Z, Li Y, Zou J, Ma Q, Zhao Y, *et al*. Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial cells. *Mol Cell*. 2016;62(2):284-94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.035>
80. Patricelli P, Ramirez E, Presa RC, Dell'Elce A, Formentini E. Efecto de la persistencia bacteriana sobre la eficacia de la enrofloxacin y ciprofloxacina frente a una cepa de *Escherichia coli*. *FAVE- Ciencias Vet*. 2017;16(2017):30-8. DOI: <https://doi.org/10.14409/favecv.v16i1.6648>
81. Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(23):7116-21. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02636-13>

82. Van den Bergh B, Michiels JE, Wenseleers T, Windels EM, Boer PV, Kestemont D, *et al.* Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of *Escherichia coli* persistence. *Nat Microbiol.* 2016;1(5):1-7. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.20>
83. Zhang Y. Persisters, persistent infections and the Yin-Yang model. *Emerg Microbes Infect.* 2014;3(1):e3. DOI: <https://doi.org/10.1038/emi.2014.3>
84. Wang T, El Meouche I, Dunlop MJ. Bacterial persistence induced by salicylate via reactive oxygen species. *Sci Rep.* 2017;7(43839):1-7. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep43839>
85. Xu T, Wang XY, Cui P, Zhang YM, Zhang WH, Zhang Y. The Agr quorum sensing system represses persister formation through regulation of phenol soluble modulins in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol.* 2017;8(2189):1-13. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02189>
86. Zhang Y, Yew WW, Barer MR. Targeting persisters for tuberculosis control. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2223-30. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.06288-11>
87. Loret JF, Greub G. Free-living amoebae: biological by-passes in water treatment. *Int J of Hyg Environ Health.* 2010;213(3):167-75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.03.004>

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.