



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA
EJE DE MICROBIOLOGÍA

**“ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS EN
CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD
INFLAMATORIA INTESTINAL”**

TÍTULO PARA OBTENER:

Licenciado en Biomedicina

ALUMNA:

Carolina Acevedo Ocampo

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. Gerardo Cortés Cortés

Puebla, Puebla. Noviembre de 2023.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	9
3.1 Antecedentes generales	9
3.2 Antecedentes específicos	12
4. Planteamiento del problema	13
5. Objetivos	13
5.1 Objetivo general <i>in silico</i>	13
5.1.1 Objetivos específicos <i>in silico</i>	14
5.2 Objetivo general experimental	14
5.2.1 Objetivos específicos experimentales	14
6. Material y métodos	14
6.1 Diseño del estudio	14
6.2 Ubicación espacio-temporal	14
6.3 Muestreo	15
6.3.1 Definición de la unidad poblacional	15
6.3.2 Selección de muestra	15
6.3.3 Criterios de selección de las unidades de muestreo	15
6.3.3.1 Criterios de inclusión	15
6.3.3.2 Criterios de exclusión	15
6.3.3.3 Criterios de eliminación	15
6.4 Método y recolección de datos	16
6.5 Técnicas y procedimientos	16
6.6 Análisis de datos	24
7. Logística	24
7.1 Recursos humanos	24
7.2 Recursos materiales	24
7.3 Recursos financieros	24
7.4 Cronograma de actividades	25
7.4.1 Gráfica de Gantt	25

8. Bioética	25
9. Resultados	25
10. Discusión	40
11. Conclusiones	43
12. Perspectivas	43
13. Bibliografía	44
14. Anexos	48

1. Resumen

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es un desorden que afecta al tracto gastrointestinal y que se constituye principalmente de dos enfermedades: la Enfermedad de Crohn y la Colitis Ulcerosa. Su causa exacta permanece incierta, aunque se le han atribuido distintos factores de origen genético, inmunológicos y ambientales. Sin embargo, un factor que ha tomado relevancia en los reportes publicados de esta última década es el papel que toma la microbiota en la patogénesis de esta enfermedad, siendo *E. coli* adherente-invasiva (AIEC), una de las bacterias involucradas en la disbiosis presentada en estos pacientes, ya que múltiples estudios han reportado la presencia de cepas AIEC con propiedades de virulencia en los pacientes con EII. Por otro lado, el uso de antibióticos betalactámicos es muy frecuente en el tratamiento de la EII, ya que usualmente se prescribe como un complemento que mantiene el estado de remisión y como prevención de futuras complicaciones. No obstante, el uso desmedido de los antibióticos ha causado un incremento significativo en los niveles reportados de resistencia antimicrobiana de los últimos diez años. Como resultado, los informes de resistencia antibiótica en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con EII son cada vez más comunes. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue examinar los niveles de resistencia a 9 betalactámicos en 66 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de tres pacientes con EII provenientes de la ciudad de Puebla, Puebla, México (37, 22 y 7 cepas, respectivamente). El método de Kirby-Bauer, demostró resistencia en todos los betalactámicos evaluados en 62 de las 66 cepas, con niveles de hasta 90.90%. También, se determinó la producción fenotípica de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) con un total de 16 cepas positivas, todas procedentes del paciente 1 (CUCI). Posteriormente, se determinó la presencia de genes asociados al fenotipo de resistencia a betalactámicos, encontrando que, de las 62 cepas resistentes, el 85.48% amplificó para *bla*_{TEM}, y 43.54% para *bla*_{CTX-M}. Los resultados obtenidos muestran una alta prevalencia de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos en cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII, lo que puede disminuir el éxito terapéutico y en consecuencia complicar la evolución de los pacientes con estos padecimientos intestinales.

Palabras clave: *E. coli*, AIEC, Betalactámicos, Resistencia, BLEE, Enfermedad Inflamatoria Intestinal, Enfermedad de Crohn, Colitis Ulcerosa.

2. Introducción

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un padecimiento crónico del tracto digestivo caracterizada por la aparición de inflamación, de etiología aún no aclarada. Las causas de este padecimiento son multifactoriales, lo que complica un diagnóstico asertivo y un tratamiento adecuado en etapas tempranas. Una de las causas que pudiera estar involucrada en el origen y/o evolución de este padecimiento, es la invasión de bacterias como *Escherichia coli* adherente invasiva (AIEC), que ocasiona una respuesta inflamatoria excesiva en el hospedero, provocando una respuesta mediada por distintos factores inmunológicos que serían los responsables de desencadenar la cascada inflamatoria con lesión de la mucosa intestinal. Aunado a esto, las altas tasas de resistencia a antibióticos de primera línea para tratar infecciones causadas por *E. coli*, complican más el panorama de los pacientes que sufren una EII, ya que la acción de los antibióticos se ve inhibida. Es por ello que el presente trabajo pretende analizar los mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos en cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII.

Enfermedad Inflamatoria Intestinal

La EII es una patología que engloba una amplia variedad de enfermedades multifactoriales, entre las cuales están la enfermedad de Crohn (EC), la reservoritis, la colitis ulcerosa (CU), inclasificada y microscópica. Su sintomatología dependerá de la extensión, localización, grado de actividad inflamatoria y manifestaciones extraintestinales asociadas (1).

La CU sólo afecta al colon y su síntoma fundamental es la rectorragia, en cambio el diagnóstico de la colitis inclasificada se reserva para aquellas colitis intervenidas quirúrgicamente en las que es imposible establecer si se trata de EC o CU, y la colitis microscópica engloba un grupo de trastornos histopatológicamente diferentes (colitis linfocítica, colitis colágena) pero que afectan a la mucosa, causando diarrea crónica (2).

La reservoritis es una entidad de la mucosa, inflamatoria, que afecta aproximadamente al 30-50% de los reservorios ileales que se crean artificialmente para mantener la función esfinteriana después de una colectomía total con anastomosis ileoanal para el tratamiento de la EII, especialmente de la CU y con menor frecuencia de la EC y la colitis inclasificada (2).

La EC es un proceso inflamatorio que puede afectar cualquier parte del tubo digestivo y que se caracteriza por una inflamación crónica, pues el proceso inflamatorio produce un daño progresivo que avanza con el tiempo y genera alteraciones que llegan a afectar la calidad de vida de los pacientes permanentemente (3,4).

Epidemiología

Usualmente estas enfermedades son diagnosticadas en la juventud, específicamente entre los 18 y 35 años; sin embargo, las últimas investigaciones reportan un incremento notorio en la tasa de diagnósticos pediátricos. Con respecto al género, aún no se ha reportado una diferencia notable en la incidencia de la CU en Europa, Norteamérica y Oceanía, mientras que, en el caso de la EC, algunos reportes señalan una mayor prevalencia en las mujeres. No obstante, en el continente asiático se habla de una predominancia de afección al sexo masculino en ambas afecciones. Y en el caso de los reportes de casos anuales, la mayor incidencia de la EC se da en Norteamérica (20.2 por 10.0000 personas/año), mientras que, en la CU, la mayor incidencia se da en Europa (24.3 por 10.0000 personas/año) (5-7).

Etiología

La EII es una enfermedad poligénica en cuya patogenia se involucran distintos factores genéticos y ambientales. La posibilidad de desarrollarla cuando uno de los padres está afectado es de 9.2% para la EC. Cuando el padre y la madre padecen EII el riesgo de padecerla en los hijos aumenta hasta por un 30% (8).

En la EC la evidencia demuestra que diversas alteraciones genéticas puntuales influyen no sólo en su aparición, sino además en su fenotipo clínico, y en otras variables como la respuesta a determinados tratamientos. Entre los genes identificados hasta la fecha destaca el NOD2/CARD15, situado en el cromosoma 16 (2,8).

Se han relacionado múltiples factores ambientales con la EII, entre ellos la lactancia materna como protector para el desarrollo de la misma, el tipo de dieta, el tabaco y la apendicectomía previa. Muchas de las variantes genéticas asociadas con el riesgo de la EC descritas en los últimos años, se relacionan con los mecanismos de defensa frente a las bacterias, y muy

particularmente en torno a la autofagia, cuyos fallos pueden resultar en fenotipos muy similares a la EC (2,8).

Clínica

Solamente un 25% de los pacientes presenta la triada clásica de dolor abdominal, pérdida de peso y diarrea. La EC puede afectar a cualquier zona del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano, y su evolución puede llegar a complicarse con la aparición de fístulas y abscesos intraabdominales, o por posibles estenosis, que obligan a tratamientos quirúrgicos repetidos en los pacientes (8).

Entre las manifestaciones clínicas de la EC están el dolor abdominal recurrente, la diarrea, masas abdominales, fístulas, anorexia, pérdida de peso y anemia ferropénica. La localización más frecuente (fosa ilíaca derecha) facilita la sospecha, pero en los cuadros agudos iniciales complica especialmente el diagnóstico diferencial con cuadros tan comunes como la apendicitis aguda y la enfermedad inflamatoria pélvica (1,2).

Diagnóstico

Ante la sospecha de EC, en la gran mayoría de los casos el estudio se inicia con una colonoscopia que incluye a ser posible el estudio del íleon, y la toma correspondiente de biopsias. Es obligatorio, además, estudiar el intestino delgado, inicialmente mediante un estudio radiológico, tanto para establecer el diagnóstico en los casos de afección exclusiva del intestino delgado, como para valorar la extensión en los casos con afección baja (2).

La incapacidad para realizar un diagnóstico temprano en muchos casos supone que cuando éste se realiza, los pacientes presentan una forma más evolucionada de la enfermedad o inclusive complicaciones que ya solo pueden resolverse mediante tratamiento quirúrgico, lo que agrega una mayor morbilidad e incluso puede llegar a comprometer la vida del paciente (3).

Tratamiento

Manipulaciones dietéticas, fármacos y tratamiento quirúrgico. El tratamiento de la EC depende de la extensión, el fenotipo clínico y la gravedad; siendo esencial el abandono del tabaquismo. Se emplea generalmente glucocorticoides como la mesalazina o sulfasalazina, inmunosupresores, como la azatioprina, y tratamientos biológicos, reservando a las intervenciones quirúrgicas para casos complicados o con nula respuesta al tratamiento. Finalmente, con respecto a los antibióticos, comúnmente se recurre a los betalactámicos, a la ciprofloxacina, rifaximina, claritromicina, rifampicina, entre otros más (2,3,9).

Complicaciones

Alrededor de un 25% de los pacientes con EC presentarán un absceso intraabdominal como complicación evolutiva a lo largo de su vida. El paso de contenido intestinal y de gérmenes entéricos por este trayecto y su posterior colonización propician la aparición de una complicación supurativa. Si se confirma la presencia de un absceso deben indicarse antibióticos útiles en las infecciones intraabdominales y proceder a su drenaje percutáneo (2).

Escherichia coli

Desde la década de los 70's se empezó a investigar el papel de la enterobacteria *Escherichia coli* como un posible causante de la EII, y en los últimos años, se han realizado múltiples estudios que muestran resultados en los que se indica la posibilidad de la participación de esta bacteria al inicio de la enfermedad, actuando como un promotor crónico de los procesos inflamatorios al proliferar en cantidades aumentadas provocando una disbiosis en el intestino (10).

E. coli es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de la microbiota intestinal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (11).

E. coli no vive fuera de organismos hospedantes y su presencia en tales sitios resulta de la excreción de desechos de los animales y humanos, por ello que *E. coli* es considerada como

un microorganismo indicador de la contaminación fecal en el ambiente. Las cepas patógenas de esta especie poseen factores de virulencia específicos que les permite causar un amplio espectro de enfermedades intestinales (12).

Según su patogénesis y las características epidemiológicas, las cepas diarreogénicas de esta bacteria se dividen en seis patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC, por sus siglas en inglés Enteropathogenic *E. coli*), productora de toxina shiga (STEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) y difuso adherente (DAEC) (11).

Pero existe además un patotipo característico por su adherencia a las células intestinales epiteliales, así como por su capacidad de invadir y proliferar dentro de los macrófagos, llamado AIEC, el cual fue descrito por primera vez alrededor de 1999, donde se encontró que estaba asociado a la EC. En los últimos años, la evidencia ha demostrado su relación con distintos tipos de desórdenes gastrointestinales, como la ya mencionada CU, por dar un ejemplo (10).

Con el propósito de identificar aquellas cepas patógenas del resto, así como encontrar diferencias entre los diferentes grupos de la especie, existen sistemas de clasificación intraespecíficos; métodos fenotípicos: biotipado, serotipado, antibiograma y ensayos de adherencia en cultivos celulares, los cuales detectan características expresadas por los microorganismos. Así como métodos genotípicos: reacción de la cadena polimerasa (PCR), electroforesis en campo pulsado (ECP), análisis plasmídicos, análisis de enzimas de restricción (REA), etc (12).

Tratamiento con Betalactámicos

La mayoría de las infecciones asociadas a *E. coli* son tratadas con antibióticos de primera línea, como lo son los betalactámicos. Este grupo representa aproximadamente la mitad del mercado total de antibióticos a nivel mundial, además de ser los más usados en la práctica clínica. Se definen por su anillo betalactámico, el cual determina su mecanismo de acción: la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana. Este consta de un anillo heterocíclico de cuatro átomos, tres de carbono y uno de nitrógeno; y es su asociación a los diferentes tipos

de cadenas lineales lo que les da sus propiedades a cada betalactámico que hay: carbapenémicos, cefalosporinas, monobactámicos y penicilinas (13).

En 1928, Alexander Fleming descubrió la penicilina después de haberse dado cuenta que el crecimiento de *Staphylococcus aureus* se veía interrumpido ante la presencia del hongo *Penicillium notatum*, aunque fueron las investigaciones de Howard Florey y Ernst Chain, alrededor de 1940, las que permitieron su producción comercial (14).

Un año después, Edward Abraham llevó a cabo la purificación cromatográfica de la penicilina, siendo el primero en evaluar sus propiedades antimicrobianas en animales. En 1943, Robert Robinson explicó la estructura química de la penicilina, lo cual proporcionó los medios para su síntesis (15).

En 1974, Blumberg y Strominger aclararon el mecanismo de acción de la penicilina, llegando a la conclusión de que tanto la penicilina como la terminación D-Ala-D-Ala del peptidoglicano en las paredes celulares de los microorganismos grampositivos y gramnegativos eran estructuralmente similares. Propusieron que todos los antibióticos betalactámicos eran inhibidores de la síntesis de la pared celular bacteriana (15).

Si bien, aunque no es muy recomendado el tratamiento antibiótico en la EC, este puede ser de gran ayuda en aquellos pacientes portadores del patotipo AIEC, sobre todo para la atenuación de la bacteria, el tratamiento de fístulas, y en la prevención de infecciones postoperatorias. Por otra lado, a pesar de que aún son pocos los estudios que tratan acerca de la resistencia antimicrobiana en AIEC, hay que destacar que los resultados ya reportan altos niveles de resistencia a betalactámicos (12).

Clasificación y miembros de la familia de antibióticos betalactámicos

Penicilinas

Los miembros de las penicilinas incluyen a la penicilina G, penicilina V, oxacilina, meticilina, nafcilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, piperacilina, mezlocilina y ticarcilina. En la penicilina G, la cadena lateral es un bencilo, y esta tiene la mayor actividad

antimicrobiana dentro de todas las penicilinas naturales. Fue la primera en producirse entre este grupo y entre todos los antibióticos. Las penicilinas naturales son utilizadas tanto para el tratamiento de infecciones por bacterias grampositivas como para el de gramnegativas (16,17).

Cefalosporinas

Las cefalosporinas se clasifican como pertenecientes a una generación, de la primera a la quinta, para referirse así a la actividad específica de los agentes. Las cefalosporinas de primera generación tienen actividad contra cocos grampositivos, excepto los enterococos y los estafilococos, pero tienen una actividad limitada contra patógenos gramnegativos, principalmente *E. coli*, *Proteus* y *Klebsiella* (17,18).

Las cefalosporinas de segunda generación tienen una mejor actividad contra gramnegativos. Algunas cefalosporinas de segunda generación como cefoxitina y cefotetan, también tienen actividad contra anaerobios. Las cefalosporinas de tercera generación tienen una actividad contra bacterias gramnegativas aún más efectiva, pero su actividad contra grampositivas varía. En el caso de las cefalosporinas de cuarta generación como la cefepima y la cefpiroma, hay eficacia contra la mayoría de las bacterias grampositivas y gramnegativas de importancia clínica (17).

Y en el caso de las cefalosporinas de quinta generación como la ceftarolina, hay actividad específicamente contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Existe también otra clasificación de las cefalosporinas basada en la estructura química, pues debido al reciente aumento en la resistencia dada por las β -lactamasas de espectro extendido y las carbapenemasas, redefinir la categorización dentro de estas generaciones es una solución que se busca con gran urgencia (17).

Monobactámicos

Los monobactámicos tienen un anillo monocíclico flexible y carecen de un resto de ácido carboxílico, sin un segundo anillo fusionado al anillo betalactámico. Aztreonam, comercializado en 1984, fue el primer monobactámico, y hasta la fecha el más usado. Otros

compuestos incluyen carumonam, pirazmonam y tigemonam. Los monobactámicos son activos casi exclusivamente contra bacterias gramnegativas, y algunos han demostrado tener actividad antipseudomónica (19).

Carbapenémicos

Entre los varios betalactámicos, los carbapenémicos poseen el espectro de actividad más amplio y la mayor potencia tanto contra bacterias grampositivas, como contra las gramnegativas. Usualmente se administran cuando los pacientes con infecciones se enferman gravemente o se sospecha que albergan bacterias resistentes. Imipenem, es eficaz contra patógenos aeróbicos y anaeróbicos, meropenem, actúa contra los bacilos gramnegativos no fermentadores, ertapenem, que contiene un amplio espectro con actividad limitada contra bacilos gramnegativos no fermentadores, y doripenem, son los antibióticos con cobertura bacteriana más amplia de todos los betalactámicos (16,17).

3. Antecedentes

3.1 Antecedentes generales

Resistencia a betalactámicos

Ciertas cepas de esta bacteria han desarrollado mecanismos para evadir el efecto de estos antimicrobianos. Con el tiempo, el mal uso de antibióticos ha provocado un aumento en su resistencia a nivel mundial. Muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* poseen betalactamasas cromosómicas naturales. Los genes que codifican enzimas hidrolíticas de estos antibióticos se pueden encontrar en el cromosoma o en elementos genéticos móviles, y su producción puede ser constitutiva o inducible. El efecto antibacteriano de un betalactámico da como resultado la inhibición del crecimiento de bacterias replicantes. Durante las etapas terminales de la biosíntesis de la pared celular, se evita que las enzimas PBP (proteínas de unión a penicilinas) efectúen la reticulación de cadenas peptídicas para formar peptidoglicano, lo que da como resultado la muerte celular (20).

Como ocurre con otras clases de antimicrobianos, el mal uso de betalactámicos ha provocado la aparición de resistencias, estas pueden ocurrir por una mutación o expresión de PBP

alternativas, reducción de la permeabilidad celular, sobreexpresión de los sistemas de salida y producción de enzimas modificadoras o degradantes (21).

Para la clasificación de estas enzimas se utilizan dos sistemas, el sistema basado en la actividad de Bush-Jacoby-Medeiros y el sistema Ambler, basado en la información de la secuencia. Este último divide a las betalactamasas en cuatro clases: A, B, C y D. Esto es con base a las diferencias en su mecanismo hidrolítico (21).

Desde el punto de vista clínico, las enzimas más desafiantes son las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), pues estas enzimas son capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos, algunas inclusive a los carbapenémicos y, por lo general, a la mayoría de los otros betalactámicos (22).

Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las BLEE se definen como enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, todas las cefalosporinas (menos las cefamicinas) y los monobactams, pero no los carbapenémicos. Se caracterizan por ser inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Además de las BLEE clásicas, de naturaleza plasmídica, algunos microorganismos producen betalactamasas cromosómicas que confieren fenotipos de resistencia similares al que determinan las BLEE, esto es, resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido, y son inhibidas por el ácido clavulánico. La mayoría de los métodos descritos para detectar microorganismos productores de BLEE se han diseñado para *E. coli* y *Klebsiella*, y se fundamentan en la inhibición de estas enzimas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de betalactamasas. Sin embargo, en los últimos años se han reportado algunas variantes que ya no son inhibidas por el ácido clavulánico (23).

Se han clasificado bioquímicamente en dos categorías según el mecanismo por el que realizan hidrólisis, ya sea mediante la formación de una enzima acilo con una serina en el sitio activo o mediante una reacción hidrolítica facilitada por uno o dos iones de zinc esenciales en los sitios activos de metalobetalactamasas (MBL) (20).

Desafortunadamente, las cepas productoras de estas enzimas pueden ser también resistentes a otros antibióticos, con lo que se reducen considerablemente las opciones de tratamiento. Hasta los últimos dos años, se han identificado más de 200 tipos de BLEE, codificadas por diferentes genes conocidos como genes *bla*, siendo los más frecuentes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}(24).

El mecanismo más probable de transferencia entre especies poco relacionadas es la conjugación, en la que participan elementos genéticos móviles, como los plásmidos, bacteriófagos, transposones e integrones, que acarrean genes de resistencia o virulencia (25).

Las betalactamasas de tipo TEM provienen de las enzimas TEM-1 y TEM-2, contenidas en plásmidos, mientras que las SHV tienen un origen cromosómico en *Klebsiella pneumoniae*. Las CTX-M son las BLEE de mayor reporte mundial, predominando en agentes de infecciones nosocomiales como *E. coli* y *Klebsiella spp* (26).

En la actualidad, se han descrito 189 variantes alélicas de tipo SHV y más de 200 de tipo TEM. El primer reporte de la enzima SHV en Sudamérica se presentó en aislamientos de *K. pneumoniae* de Argentina y Chile en 1988 y 1989, donde se identificaron las variantes de tipo SHV-2 y SHV-5, mientras que el primer reporte de la TEM se presentó en el 2003 en Argentina, donde se detectaron los tipos TEM-10 y TEM-12 en *K. pneumoniae* (las diferentes variantes de betalactamasas pueden ser consultadas en el sitio web: <https://externalwebapps.lahey.org/studies/>) (27).

Las enzimas CTX-M son un tipo de BLEE que hidrolizan a la cefotaxima y la ceftriaxona con mayor eficacia que a la ceftazidima, así como a la cefepima. Fueron identificadas alrededor de 1989 en Alemania, en un aislamiento clínico de *E. coli*, sin embargo, fue en Sudamérica donde comenzaron a identificarse con más frecuencia, y es posible que hayan estado en constante circulación desde 1989. Hasta la fecha se han descrito 172 variantes (27).

3.2 Antecedentes específicos

Entre 2007 y 2012, en China, se realizó un estudio a 97 pacientes con EC que padecían abscesos intraabdominales espontáneos en donde se cultivaron 151 bacterias aeróbicas, de las cuales *E. coli* resultó ser más del 50% del total bacteriano. Se administró cefalosporina y ornidazol. El análisis realizado en este estudio reveló que los pacientes con EC que usaron inmunosupresores tenían más probabilidades de tener una infección intraabdominal causada por bacterias productoras de BLEE (28).

En 2013, en un estudio llevado a cabo por Dogan y colaboradores en Estados Unidos, se anunció que a pacientes con EC se les detectó cepas de *E. coli* con resistencia a amoxicilina y ácido clavulánico, cefoxitina, cloranfenicol, ciprofloxacino, gentamicina y rifaximina, mientras que a pacientes con un íleon inafectado se les detectó resistencia a ciprofloxacino y rifaximina. Además de la presencia de AIEC en 8 de los 32 pacientes con EC y en 5 de 28 pacientes con un íleon inafectado. De estas 13 cepas de AIEC, 8 de ellas mostraron resistencia a ciprofloxacina, claritromicina, rifampicina, tetraciclina y trimetoprima/sulfametoxazol (29).

Años más tarde en 2021, en un artículo publicado en Irán por Dolatabadi y colaboradores, se reporta un análisis de investigación de literatura publicada en distintas bases de datos, sobre la prevalencia de AIEC y su grupo filogenético entre pacientes con EII. Entre los artículos revisados, se dieron 465 casos de pacientes con EII (348 diagnosticados con EC y 117 con CU) y 307 como controles, de los cuales se observó que existía una prevalencia de AIEC mucho más alta en pacientes con EII comparada con los controles. Los resultados hacen hincapié en la existencia de una asociación significativa entre la colonización de AIEC en la EII, añadiendo también, que el filogrupo más común entre estos pacientes fue el B2, tanto en pacientes con EII como en el grupo control, lo que según los autores, sugieren es que este es un trastorno específicamente relacionado con este patovar (30).

En un estudio publicado en enero de este año, investigadores de Corea del Sur llevaron a cabo un análisis de 83 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con EII y Colitis Isquémica, de las cuales todas dieron resultados de resistencia al menos a uno de los antibióticos usados,

con eritromicina teniendo el nivel más alto, seguido de ampicilina, ciprofloxacino y ceftriaxona. Asimismo, entre estas cepas resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, el 90.7% de ellas resultaron ser productoras de BLEE. Además de que entre aquellas cepas productoras de BLEE, se encontró que el 92.3% fueron provenientes de pacientes con EC y 82.4% de CU (31).

Por otro lado, en México hasta la fecha solo se han realizado dos estudios, el primero de ellos en el 2018, en el cual se publicó el primer reporte de AIEC en el país, además del aislamiento de cepas asociadas con donadores sanos, así como la detección de una cepa AIEC asociada a la clona ST131 y dos virotipos nuevos. Mientras que, en el segundo reporte, se demostró que aquellas cepas obtenidas de donadores sanos y sin síntomas de EII del estudio anterior compartían similitudes fenotípicas y genómicas con cepas de AIEC asociadas a la EII, mostrando una coexistencia entre factores de virulencia y resistencia a los antibióticos con implicaciones en los hospederos susceptibles (32,33).

4. Planteamiento del problema

Debido a su complejo origen multifactorial, el frecuente diagnóstico tardío, así como las insuficientes opciones de tratamiento, hacen que la EII sea un padecimiento difícil de curar. Aunado a esto, las altas tasas de resistencia de AIEC, bacteria asociada en el desarrollo de esta enfermedad, a los antibióticos de primera línea como los betalactámicos, complican el control de la EII. Por lo tanto, con el fin de prevenir el efecto disminuido de los antibióticos y mayores tasas de mortalidad entre las poblaciones vulnerables, es de crucial importancia conocer cuál es el perfil de resistencia a antibióticos betalactámicos en pacientes que padecen de la EII, qué factores genéticos pueden estar involucrados en su evolución, y cuáles otras causas podrían favorecer a la expansión de este creciente fenómeno.

5. Objetivos

El presente trabajo de tesis se divide en dos partes:

5.1 Objetivo general *in silico*

Conocer la presencia de genes de resistencia a betalactámicos en cepas de AIEC mediante una revisión bibliográfica sobre estudios reportados en bases de datos públicas.

5.1.1 Objetivos específicos *in silico*

A partir de la información recolectada con la revisión bibliográfica, colaborar en la redacción de un artículo de revisión que informe sobre la presencia de AIEC en la EII, así como de los últimos reportes en nuestro país.

5.2 Objetivo general experimental

Determinar el perfil fenotípico de susceptibilidad a antibióticos betalactámicos en cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII.

5.2.1 Objetivos específicos experimentales

1. Realizar ensayos de Kirby-Bauer con antibióticos betalactámicos a las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII.
2. Determinar el fenotipo de producción de betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), en las cepas de interés.
3. Identificar los genes que codifican para serín betalactamasas y metalo betalactamasas en las cepas de *E. coli*.

6. Material y métodos

6.1 Diseño del estudio

Observacional, transversal y prospectivo y ambilectivo.

6.2 Ubicación espacio-temporal

El proyecto de tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad que pertenece al área de Microbiología Médica del Centro de Investigaciones en

Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias (ICUAP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

6.3 Muestreo

El laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC) cuenta con 66 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de 3 pacientes con EII. Las biopsias fueron obtenidas en centros de salud por personal capacitado (médicos endoscopistas gastroenterólogos), con el consentimiento informado de los pacientes. Posteriormente, fueron llevadas al LMHyC y procesadas por la médico pasante Norarizbeth Lara Flores, para aislar, identificar y conservar a las cepas de *E. coli* a -70°C .

6.3.1 Definición de la unidad poblacional

El estudio incluyó 66 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de 3 pacientes ambulatorios.

6.3.2. Selección de la muestra

Aleatoria, no consecutiva y a conveniencia y disposición.

6.3.3 Criterios de selección de las unidades de muestreo

6.3.3.1 Criterios de inclusión

Todas las cepas de *E. coli* previamente aisladas de biopsias de pacientes que estuvieron cursando con una EII al momento de su consideración a este estudio.

6.3.3.2 Criterios de exclusión

Cepas no identificadas como *E. coli*.

6.3.3.3 Criterios de eliminación

Todas aquellas especies bacterianas de la familia *Enterobacteriaceae* que no hayan sido identificadas como *E. coli* mediante pruebas bioquímicas clásicas y por la presencia del marcador genético especie-específico *ybbW*.

6.4 Método y recolección de datos

La susceptibilidad a antibióticos y el fenotipo BLEE se determinó por medio de la técnica de Kirby-Bauer y siguiendo lo establecido en el CLSI 2022. La amplificación de los genes involucrados en la resistencia a betalactámicos se llevó a cabo siguiendo los métodos de amplificación por PCR y observación de los productos por electroforesis en agarosa, bajo las condiciones estandarizadas en el LMHyC. Por lo que se usaron hojas de excel para su recolección.

6.5 Técnicas y procedimientos

Cepas de *E. coli*

El laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC) cuenta con 66 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de tres pacientes con EII (Tabla 1). Las biopsias fueron obtenidas en centros de salud por personal capacitado bajo el conocimiento informado de los pacientes. Posteriormente, fueron llevadas al LMHyC y procesadas por la médico pasante Norarizbeth Lara Flores (alumna de servicio social en 2017-2018), para aislar, identificar y conservar a las cepas de *E. coli* como se ilustra en la figura 1. Cabe mencionar que se obtuvieron 37, 22 y 7 colonias de cada paciente, respectivamente; por lo que se consideraron como clonas diferentes y se trabajó con todas ellas.

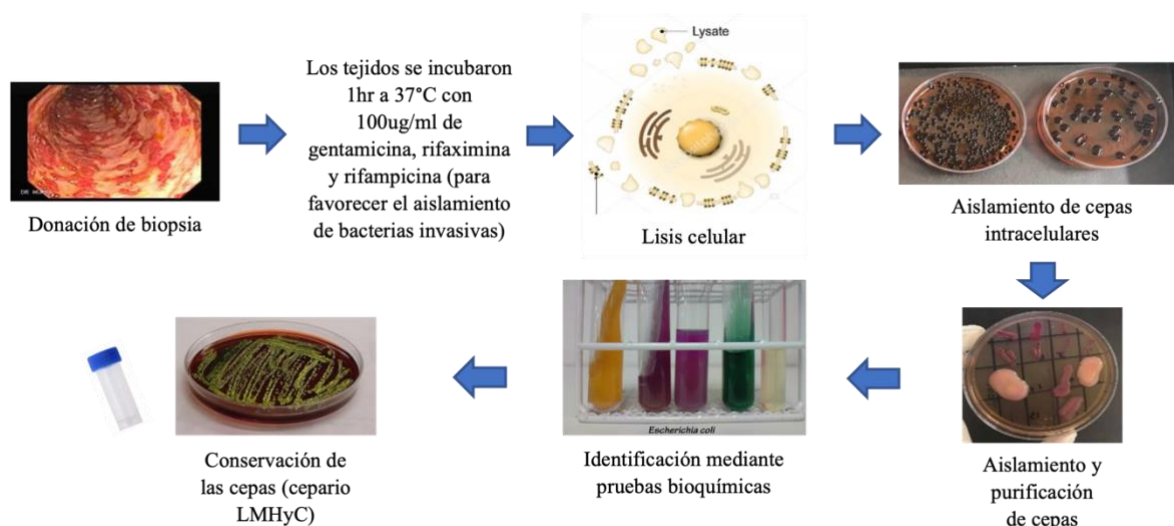


Figura 1. Procesamiento de las biopsias para el aislamiento de *E. coli*.

Tabla 1. Origen de las cepas de *E. coli* a estudiar.

Paciente	Edad (años)	Género	Origen de la biopsia	Diagnóstico	Tratamiento (previo al diagnóstico)	Número de cepas aisladas
1	23	M	Colon descendente y transverso	CUCI	Trimetoprim/ Sulfametoxazol	37
2	61	F	Sigmoides	Colitis crónica y diverticulitis	Ciprofloxacino, Rifaximina	22
3	34	M	Colon descendente y ano	CUCI	Metronidazol, Ciprofloxacino, Ceftriaxona	7

Susceptibilidad a antibióticos

Para conocer la susceptibilidad a antibióticos, se utilizó el método de Kirby-Bauer y se escogieron 18 antibióticos, siguiendo la guía del CLSI 2022: cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), ampicilina (AMP), meropenem (MEM), imipenem (IMP), tetraciclina (TE), gentamicina (GM), estreptomicina (STR), amikacina (AN), trimetoprim-sulfametoxazol (STX), cloranfenicol (CHL), cefoxitina (FOX), ceftriaxona (CRO), ciprofloxacino (CIP) y ácido nalidíxico (NA).

El método de Kirby-Bauer consiste en un antibiograma por difusión de sensibilizadores, por lo tanto, se utilizó para conocer la susceptibilidad a antibióticos y el fenotipo BLEE, como se describe a continuación:

Procedimiento: De un cultivo previo de TSA por estría cruzada que fue incubado a 37° C por 24 horas, se tomaron con un asa bacteriológica las colonias más aisladas (entre 3-6) y se llevaron a un tubo con 5 mL de Solución Salina isotónica (SSI) al 0.85% masa/volumen de NaCl, para tener una mezcla homogénea y así poder ajustar la turbidez a 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro equivalente al tubo 0.5 en la escala de McFarland.

Una vez obtenida esta turbidez se impregnó un hisopo con dicha suspensión y una placa de agar Muller-Hinton se inoculó utilizando el hisopo cubriendo el diámetro de la placa para después pasar el hisopo de orilla a orilla cubriendo el área de la placa de arriba abajo y girar la placa 45°, se realizó esto un total de tres veces y al finalizar se pasó el hisopo por la circunferencia de la placa tres veces.

Siguiendo la guía del CLSI 2022, los resultados se interpretaron de acuerdo a la siguiente tabla (Tabla 2) donde se detallan las concentraciones por sensidisco de los antibióticos previamente seleccionados y el diámetro del halo de inhibición que debe tomarse en cuenta para conocer la susceptibilidad a dicho antibiótico:

Tabla 2. Antimicrobianos y valores de corte utilizados en el ensayo de susceptibilidad

Grupo o familia	Antimicrobiano	Concentración (µg)	Halo de inhibición (mm) y criterio de interpretación ^a			
			S	SDD	I	R
Penicilinas	Ampicilina (AMP)	10	≥17		14-16	≤13
β-lactámico/inhibidor de β-lactamasas	Amoxicilina con ácido clavulánico (AMC)	20/10	≥18		14-17	≤13
Cefalosporinas	Cefoxitina (FOX)	30	≥18		15-17	≤14
	Ceftazidima (CAZ)	30	≥21		18-20	≤17
	Cefotaxima (CTX)	30	≥26		23-25	≤22
	Cefepime (FEP)	30	≥25		19-24	≤18
Monobactámicos	Aztreonam (ATM)	30	≥21		18-20	≤17
Carbapenémicos	Imipenem (IMP)	10	≥23		20-22	≤19
	Meropenem (MEM)	10	≥23		20-22	≤19

Quinolonas	Ácido Nalidíxico (ANA)	30	≥19		14-18	≤13
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino (CIP)	5	≥26		22-25	≤21
Aminoglucósidos	Gentamicina (GEN)	10	≥15		13-14	≤12
	Tobramicina (TOB)	10	≥15		13-14	≤12
	Amikacina (AMK)	30	≥17		15-16	≤14
	Estreptomicina (EST)	10	≥15		12-14	≤11
Tetraciclinas	Tetraciclina (TET)	30	≥15		12-14	≤11
Inhibidores de la vía folato	Trimetoprim con Sulfametoxazol (TMP/SXT)	1.25/23.75	≥16		11-15	≤10
Fenicoles	Cloranfenicol (CLO)	30	≥18		13-17	≤12

Referencia 34

La distribución de los sensidiscos por placa se realizó de la siguiente manera:

Placa 1: Gentamicina (GM), amikacina (AN), estreptomicina (STR), ciprofloxacino (CIP), ácido nalidíxico (NA), trimetoprim-sulfametoxazol (STX) y tetraciclina (TE).

Placa 2: Cloranfenicol (CHL), cefoxitina (FOX), ceftriaxona (CRO), ampicilina (AMP), meropenem (MEM) e imipenem (IMP).

Placa 3: (para fenotipo BLEE): cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), cefepime (FEP) y aztreonam (ATM).

Determinación de fenotipo BLEE

A los aislados resistentes a cefalosporinas de amplio espectro se les determinó la producción fenotípica de BLEE mediante la técnica de difusión con doble disco, usando discos de cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), aztreonam (30 µg) y cefepime (30 µg), colocados en las proximidades de un disco central de amoxicilina con ácido clavulánico (20/10 µg) a una distancia de 25 mm (extremo-extremo) (Figura 2).

El procedimiento para esta técnica es similar al de Kirby-Bauer, diferenciándose únicamente en la distribución de los discos. La aparición de un efecto sinérgico (prolongación del halo de inhibición) entre los antibióticos betalactámicos y el disco central que contiene al inhibidor de betalactamasas (Ácido clavulánico) se consideró como resultado positivo de producción de BLEE.

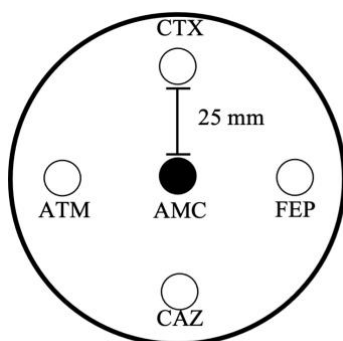


Figura 2. Posición de discos para determinar la producción fenotípica de BLEE.

Tomada de referencia 35.

Obtención de ADN bacteriano

Con la finalidad de caracterizar los mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos, se procedió a obtener el material genético mediante el método de hervido, como se describe a continuación:

Técnica de hervido

Con esta técnica se provocó la ruptura celular mediante ebullición, lo que ocasionó la liberación del ADN bacteriano (templado). A partir de un cultivo puro de 24h de crecimiento se realizó la siguiente metodología:

1. El cultivo bacteriano se resuspendió en 500 μ l de agua (inyectable Pisa®).
2. Se sometió a ebullición durante 10 min en baño María. Se dejó enfriar durante 5 min.
3. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min.
4. El sobrenadante se recuperó y se ajustó la concentración de ADN/proteínas a 100 ng/ μ l.

Cuantificación de ADN

La concentración y pureza del ADN se midió en el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific®) a una absorbancia de 260 y 280 nm. La lectura a 260 nm refleja la concentración de ADN, considerando 1 unidad de densidad óptica equivalente a 50 µg/ml de ADN de doble cadena. Las concentraciones utilizadas en las PCR tuvieron que estar en los 100 ng/µl.

Identificación de genes de resistencia a betalactámicos

Con base al perfil de resistencia, se hizo una selección de oligonucleótidos específicos para amplificar determinantes de resistencia mediante la técnica de PCR (Tabla 3). A los aislados que mostraron fenotipo BLEE positivo se les realizó la búsqueda de genes codificantes de enzimas cefalosporinasas de amplio espectro: *bla*_{CTX-M} (grupos 1, 2, 8 y 9), *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{OXA}; iniciando con oligonucleótidos universales en el caso de *bla*_{CTX-M} (diseñados a partir de una región conservada en todas las variantes).

E. coli C1550 fue usada como control positivo de los genes *bla*_{CTX-M} (grupo 1) y *bla*_{TEM} (35); mientras que *K. pneumoniae* ATCC 700603 se usó como control positivo de los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{OXA}. Todos los productos de PCR fueron comparados con un control positivo (previamente secuenciado) para determinar la variante de cada betalactamasa. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la identificación de genes de betalactámicos, así como las condiciones de amplificación y el tamaño del producto de PCR se muestran en la tabla 3:

Tabla 3. Oligonucleótidos y condiciones de reacción utilizados en la amplificación de genes de resistencia a betalactámicos.

Oligonucleótidos (Secuencia 5' - 3')	Condiciones de amplificación			Tamaño (referencia)
<i>bla</i>_{CTX-M} CTXM-UNI-F: CGATGTGCAGTACCAGTAA CTXM-UNI-R: TTAGTGACCAGAATCAGCGG	94°C	5 min.	1 ciclo	566 pb (36)
	94°C	30 seg.		
	52°C	30 seg.	35 ciclos	
	72°C	1 min.		
	72°C	5 min.	1 ciclo	
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo 1 CTX-M13U: GGTAAAAAATCACTGCGYC CTX-M13D: TTGGTGACGATTTTAGCCGC	94°C	7 min.	1 ciclo	843 pb (37)
	94°C	50 seg.		
	50°C	40 seg.	35 ciclos	
	68°C	1 min.		

	68°C 5 min. 1 ciclo	
blaCTX-M 15 CTX-M3G-F: GTTACAATGTGTGAGAAGCAG CTX-M3G-R: CCGTTTCCGCTATTACAAAC	94°C 7 min 94°C 50 seg 50°C 40 seg. 35 ciclos 68°C 1 min. 68°C 5 min. 1 ciclo	1096 (38)
blaCTX-M grupo 9 CTX-M-9-F: GTGACAAAGAGAGTGCAACGG CTX-M-9-R: ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	94°C 3 min. 1 ciclo 94°C 45 seg. 62°C 45 seg. 35 ciclos 72°C 45 seg. 72°C 10 min. 1 ciclo	857 pb (39)
blaTEM TEM-F: ATTCTTGAAGACGAAAGGGC TEM-R: ACGCTCAGTGGAACGAAAAC	94°C 3 min. 1 ciclo 94°C 1 min. 60°C 1 min. 30 ciclos 72°C 1 min. 72°C 5 min. 1 ciclo	1029 pb (40)
blaSHV SHV-F: CACTCAAGGATGTATTGTG SHV-R: TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	96°C 15 seg. 1 ciclo 96°C 15 seg. 52°C 15 seg. 24 ciclos 72°C 2 min. 72°C 3 min. 1 ciclo	883 pb (41)
blaOXA-1 OXA-1: CCAAAGACGTGGATG OXA-2: GTTAAATTCGACCCCAAGTT	96°C 5 min. 1 ciclo 96°C 1 min. 61°C 1 min. 35 ciclos 72°C 2 min. 72°C 10 min. 1 ciclo	442 pb (42)

Las reacciones de PCR se realizaron en los siguientes termocicladores: Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems), T3 y T3000 thermocycler (Biometra), T Professional TRIO Thermocycler (Biometra) y Multigene™ Mini. Los reactivos y las concentraciones empleados en esta técnica se detallan a continuación:

Tabla 4. Componentes y cantidades utilizados en cada PCR.

Componente (distribuidor)	Concentración stock inicial	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Oligonucleótido “forward” (Sigma)	25 μ M	1 μ l	0.5 μ M
Oligonucleótido “reverse” (Sigma)	25 μ M	1 μ l	0.5 μ M
BIOTAQ™DNA Polimerasa (Bioline)	5 U/ μ l	0.3 μ l	1.5 U
Tampón de reacción NH ₄ (Bioline)	10 X	5 μ l	1 X
MgCl ₂ (Bioline)	50 mM	1.5 μ l	1.5 mM
dNTPs mix (Sigma Aldrich)	2.5 mM	1 μ l	0.05 mM
DNA	---	10 μ l	6
Agua miliQ estéril	---	30.2 μ l ----- 50 μ l	---

Nota: En el caso de las PCR múltiplex la cantidad de oligonucleótido extra añadido fue restado del volumen de agua, conservando así el volumen final requerido. La concentración final de DNA fue calculada a partir de una medición estándar de 300 ng/ μ l.

Visualización de los productos de PCR

Los productos de las PCR se observaron mediante electroforesis en geles de agarosa (Invitrogen®) al 1% (aunque cuando el producto esperado fue menor a 500 pb se usaron geles al 1.5 o al 2% de agarosa) en una cámara de electroforesis con TAE 1X, a 90 Voltios durante 1 hora (generalmente) junto con un marcador de peso molecular (O' GeneRuler®). Posteriormente los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (BET) (Ethidium Bromide, Sigma®, 10 mg/ml), 0.5 g/L durante 30 seg y se lavaron en agua destilada durante 1 min. Posteriormente, los geles se visualizaron y digitalizaron con ayuda de un fotodocumentador (MiniBIS Pro).

Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR que se seleccionaron para secuenciar fueron purificados previamente con el kit “Zymoclean Gel DNA Recovery Kit”. *Ver anexo 1.*

6.6 Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados para conocer el fenotipo, la susceptibilidad y resistencia a antibióticos. Esto por medio del cálculo de porcentajes, a partir de los cuales se realizaron tablas estadísticas y gráficos de barras.

7. Logística

7.1 Recursos humanos

Alumnos: Carolina Acevedo Ocampo, Hania Anahí Alcalá Martínez, Carlos de la Torre Perdomo y Adrián Escalante Urdanivia.

Profesores: D.C Rosa del Carmen Rocha Gracia y D.C. Gerardo Cortés Cortés.

7.2 Recursos materiales

- Medio de cultivo MacConkey ® Bioxon.
- Medio de cultivo TSA ® Bioxon.
- Medio de cultivo Muller Hinton ® Bioxon.
- Medio de cultivo TSI ® Bioxon.
- Medio de cultivo LEVINE ® Bioxon.
- Cefotaxima (Sigma-Aldrich).
- Sensidiscos con antibióticos.
- Sensidisco con EDTA.

7.3 Recursos financieros

Este trabajo fue financiado por el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, el cual pertenece al Centro de Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP. Con el apoyo de proyectos grupales VIEP-100182644, y por el proyecto CB

2017-2018-A1-S-22136 de Conahcyt, cuya investigadora responsable es la Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia.

7.4. Cronograma de actividades

7.4.1 Gráfica de Gantt

Actividades	Junio - Julio 2022	Agosto - Septiembre 2022	Octubre - Diciembre 2022	Enero - Octubre 2023	Diciembre 2023
Redacción del protocolo					
Experimentación: preparación de antibiogramas, fenotipo BLEE y PCR					
Redacción de trabajo de tesis: análisis de resultados					
Presentación de Examen Profesional de Defensa de Trabajo de Investigación					

8. Bioética

Las muestras fueron tomadas con el consentimiento informado y autorización de los pacientes bajo procedimientos médicos autorizados, y realizados por personal capacitado (médico endoscopista gastroenterólogo) en las instalaciones médicas correspondientes. Los nombres, números de expedientes y datos personales fueron manejados confidencialmente (43).

9. Resultados

Objetivo general *in silico*. Conocer la presencia de genes de resistencia a betalactámicos en cepas de AIEC mediante una revisión bibliográfica sobre estudios reportados en bases de datos públicas.

Se realizó la búsqueda de artículos de investigación/revisión alusivos a la EII y la resistencia a betalactámicos en AIEC. En conjunto con los artículos seleccionados por el resto de los

alumnos de la licenciatura en Biomedicina y de los investigadores a cargo, se obtuvieron un total de 180 artículos. *Ver Anexo 2*

En este trabajo se buscó dar una visión general del estatus de la EII en el país, así como una descripción de la epidemiología, las características fenotípicas, el mecanismo de adherencia, invasión y replicación de AIEC, y como es que esto se relaciona estrechamente en el desarrollo de la EII.

Entre los genes encontrados en los reportes consultados, se destaca la presencia de *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}, siendo la variante *bla*_{CTX-M-15} la más frecuentemente reportada en *E. coli* en México. Mientras que en Estados Unidos, se reportan genes como *tetA*, *tetB*, *tetC*, así como a *bla*_{TEM}, y *bla*_{OXA}. Asimismo, en el primer estudio en cepas AIEC resistentes a betalactámicos en México, se encontraron las betalactamasas *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{OXA-1} en cepas provenientes de sujetos sanos (29, 32).

El objetivo principal de nuestra revisión fue proporcionar información actualizada sobre uno de los trastornos gastrointestinales que más afectan a la población en la actualidad, buscando contribuir en su difusión entre la comunidad científica, médica y general de nuestro país. Este manuscrito se encuentra en proceso de revisión para ser sometido a una revista indizada.

Objetivo general experimental. Determinar el perfil fenotípico de susceptibilidad a antibióticos betalactámicos en cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII.

- **Realización de ensayos de Kirby-Bauer con antibióticos betalactámicos a las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII.**

Como se ha mencionado anteriormente, se analizaron 66 cepas aisladas de biopsias de tres pacientes con EII; 37 cepas pertenecientes al paciente 1 (paciente masculino de 23 años diagnosticado con CUCI), 22 al paciente 2 (paciente femenina de 61 años diagnosticada con Colitis crónica y diverticulitis) y las siete restantes al paciente 3 (paciente masculino de 34 años de edad diagnosticado con CUCI) (Tabla 5).

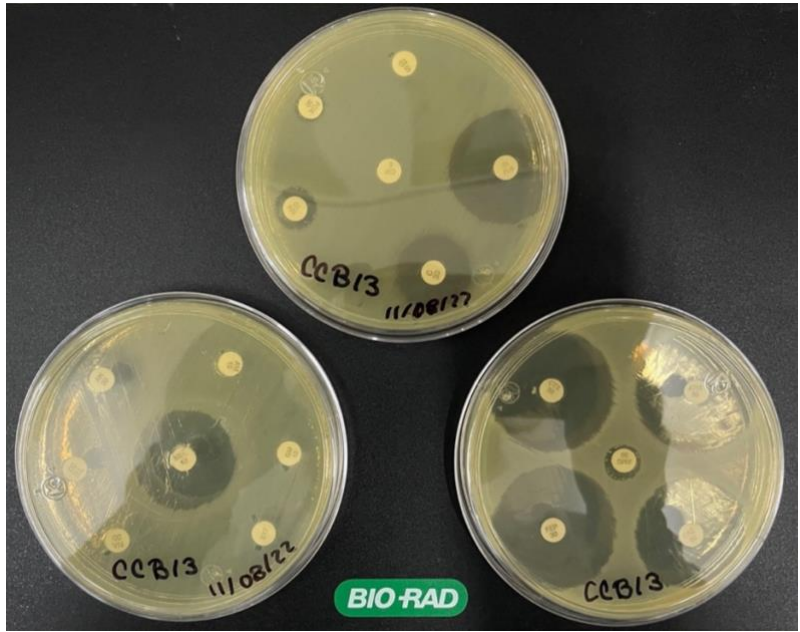


Figura 3. Determinación del perfil de resistencia en la cepa CCB13.

Tabla 5. Características generales de las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias

Paciente	Sexo	Edad	Origen de la biopsia	Diagnóstico	Cepa
1	M	23 años	Colon descendente y transverso	CUCI	CUA30
					CUA22
					CUA28
					CUA2
					CUA6
					CUA3
					CUA21
					CUA1
					CUA19
					CUA25
					CUA18
					CUA29
					CUA7
					CUA5
					CUA9
					CUA4
					CUA38
					CUA37
					CUA34
					CUA12
					CUA24
					CUA10
					CUA39
					CUA14
					CUA32
					CUA36
CUA27					
CUA31					
CUA11					
CUA35					
CUA23					
CUA13					
CUA33					
CUA17					
CUA16					
CUA15					
CUA20					
2	F	61 años	Sigmoides	Colitis crónica y diverticulitis	CCB18
					CCB13
					CCB15
					CCB16
					CCB19
					CCB17
					CCH1
					CCH4
					CCB11
					CCB14
					CCH5
					CCB10
					CCB2
					CCB3
					CCB12
					CCB8
					CCB5
					CCB1
					CCB7
					CCB4
CCB6					
CCB9					
3	M	34 años	Colon descendente y ano	CUCI	CUA50
					CUA42
					CUA44
					CUA55
					CUA57
					CUA69
CUA67					

- **Determinación del fenotipo de producción de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), en las cepas de interés.**

Todas las cepas de *E. coli* registradas fueron analizadas (Tabla 6), y a cada una de ellas se les determinó el perfil de resistencia a través del método de Kirby-Bauer (Figura 3), tal como está especificado en la sección de material y métodos. Paralelamente a la determinación de la resistencia a antibióticos, se determinó el perfil fenotípico de todas las 66 cepas mediante la técnica de difusión con doble disco, ocupando discos de cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), aztreonam (ATM), cefepime (FEP) y amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), tal como es indicado en la sección de material y métodos, obteniendo el 24.24% (16 cepas) de cepas que presentaron el fenotipo BLEE (Figura 4 y Tabla 6).



Figura 4. Ejemplo de fenotipo BLEE en la cepa CUA4.

Nota: La ausencia de algunos medicamentos ejemplificada en la Tabla 6 se debe a la escasez en los suministros de proveedores de nuestro laboratorio, así como a razones de logística desencadenadas por el periodo de la pandemia de COVID-19, lo cual imposibilitó utilizar más tiempo del asignado en esperar a la entrega de estos.

Tabla 6. Perfil de resistencia a antibióticos betalactámicos de cepas de *E.coli*

Paciente	Diagnóstico	Cepa	AMP	AMC	FOX	CAZ	CTX	FEP	ATM	IPM	MEM	Fenotipo BLEE
1	CUCI	CUA30	R	R	R	S	S	S	S	S	I	
		CUA22	R	R	R	S	S	S	S	S	S	
		CUA28	R	R	R	S	S	S	S	S	S	
		CUA2	S	S	I	S	S	S	S	S	S	
		CUA6	R	R	R	S	S	S	S	S	S	
		CUA3	R	S	I	S	R	I	R	S	S	
		CUA21	R	R	I	S	S	S	S	S	S	
		CUA1	R	R	R	S	R	I	S	S	S	
		CUA19	R	R	S	R	R	R	R	S	S	
		CUA25	R	I	S	S	S	S	S	S	S	
		CUA18	R	I	S	R	R	R	R	S	S	BLEE +
		CUA29	R	S	S	R	R	R	R	S	S	BLEE +
		CUA7	S	S	I	S	S	S	S	S	S	
		CUA5	R	S		S	S	S	S	S	S	
		CUA9	R	S		R	R	I	R	S	S	BLEE +
		CUA4	R	S		R	R	R	R	S	S	BLEE +
		CUA38	R	S		S	S	S	S	S	S	
		CUA37	R	S		S	S	S	S	S	S	
		CUA34	R	S		S	S	S	S	S	S	
		CUA12	R	S		S	S	S	S	S	S	
		CUA24	R	S		I	R	I	R	S	S	BLEE +
		CUA10	R	S		R	R	I	R	S	S	BLEE +
		CUA39	R	S		R	R	I	R	S	S	BLEE +
		CUA14	R	S		I	R	I	I	S	S	BLEE +
		CUA32	R	S		S	S	S	S	S	S	
		CUA36	R	S		S	S	S	S	S	S	
		CUA27	R	S		S	S	S	S	S	S	
		CUA31	R	S		R	R	I	R	S	S	BLEE +
		CUA11	R	S		I	R	I	R	S	S	BLEE +
		CUA35	R	S		S	S	S	S	S	S	
		CUA23	R	S		R	R	I	R	S	S	BLEE +
		CUA13	R	I		R	R	R	R	S	S	BLEE +
CUA33	R	S		R	R	I	R	S	S	BLEE +		
CUA17	R	S		I	R	I	R	S	S	BLEE +		
CUA16	R	I		R		I	R	S	S	BLEE +		
CUA15	R	S		R	R	I	R	S	S	BLEE +		
CUA20	R	S		S	S	S	S	S	S			
2	Colitis crónica y diverticulitis	CCB18	R	R	R	S	S	S	S	S	I	
		CCB13	R	R	R	S	S	S	S	S	S	
		CCB15	R	I	R	S	S	S	S	S	S	
		CCB16	R	I	R	S	S	S	S	S	S	
		CCB19	I	S	I	S	S	S	S	S	S	
		CCB17	R	I	I	S	S	S	S	S	S	
		CCH1	R	R	R	S	I	S	S	S	S	
		CCH4	R	R	R	S	S	S	S	S	S	
		CCB11	R	I	I	S	S	S	S	S	S	
		CCB14	R	R	I	S	S	S	S	S	S	
		CCH5	R	R	S	S	S	S	S	S	S	
		CCB10	R	R	S	R	R	R	R	S	S	
		CCB2	R	S		S	S	S	S	S	S	
		CCB3	S	S		S	S	S	S	S	S	
		CCB12	R	I		S	S	S	S	S	S	
		CCB8	R	S		S	S	S	S	S	S	
		CCB5	R	I		S	I	S	S	S	S	
		CCB1	S	S		S	S	S	S	S	S	
		CCB7	R	I		S	S	S	S	S	S	
		CCB4	R	I		S	S	S	S	S	S	
CCB6	R	S		S	S	S	S	S	S			
CCB9	R	I		S	S	S	S	S	S			
3	CUCI	CUA50	R	R	R	R	R	S	S	I	S	
		CUA42	R	R	R	S	S	S	S	S	S	
		CUA44	R	R	R	S	S	S	S	S	S	
		CUA55	R	R	R	S	R	S	S	I	S	
		CUA57	S	S		S	S	S	S	S	S	
		CUA69	S	S		S	S	S	S	S	S	
		CUA67	R	R		I	R	S	S	S	S	

En orden de izquierda a derecha: (AMP) ampicilina, (AMC) amoxicilina/ácido clavulánico, (FOX) cefoxitina, (CAZ) ceftazidima, (CTX) cefotaxima, (FEP) cefepime, (ATM) aztreonam, (IPM) imipenem y (MEM) meropenem.

Entre los 9 antibióticos se encontró que ampicilina (AMP) fue el que obtuvo los niveles más altos de resistencia, con 90.90% (60 de las 66 cepas). Por el contrario, en el resto de los antibióticos; amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), imipenem (IMP) y meropenem (MEM), los niveles de sensibilidad de las cepas fueron notablemente superiores a los de resistencia (Figura 5).

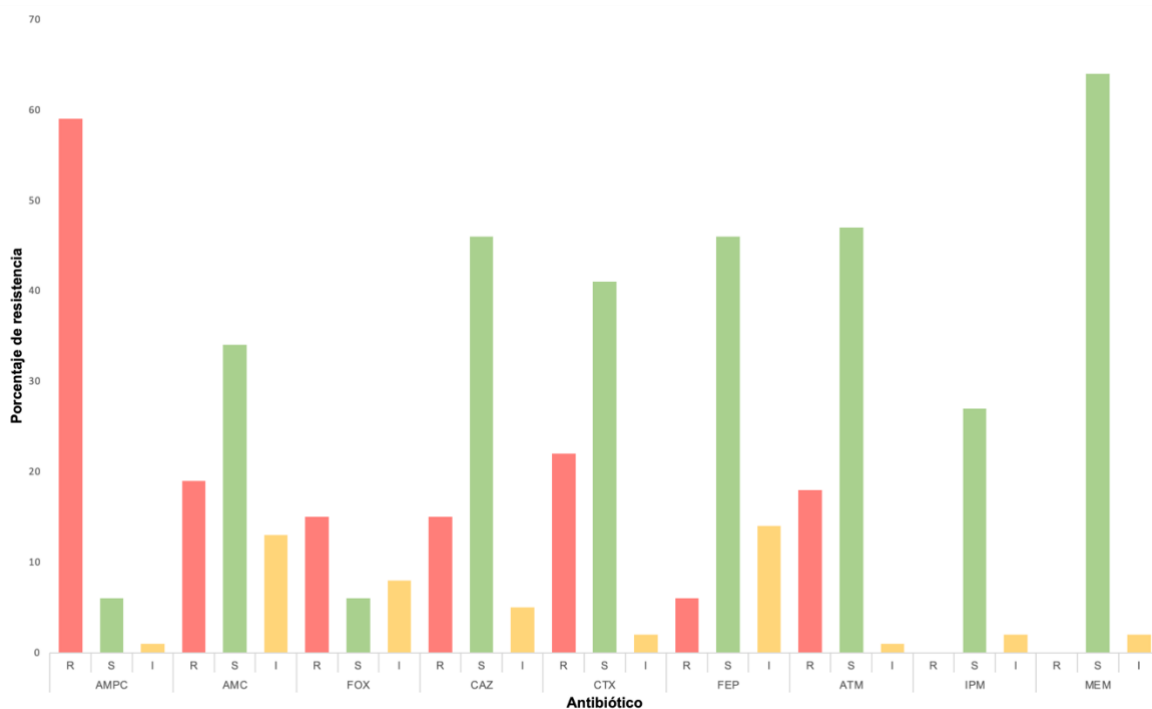


Figura 5. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos betalactámicos evaluados. Se indica el nivel de resistencia según el color; rojo para resistentes, amarillo para intermedias y verde para aquellas cepas que son sensibles. En orden de izquierda a derecha: (AMP) ampicilina, (AMC) amoxicilina/ácido clavulánico, (FOX) cefoxitina, (CAZ) ceftazidima, (CTX) cefotaxima, (FEP) cefepime, (ATM) aztreonam, (IPM) imipenem y (MEM) meropenem.

- **Identificación de los genes que codifican para serín betalactamasas y metalo betalactamasas en las cepas de *E. coli*.**

A partir de los resultados de la determinación de resistencia, mediante la técnica de PCR fueron amplificados los genes *bla*CTX-M, *bla*CTX-M-15, *bla*CTX-M G1, *bla*CTX-M G9, *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*OXA-1, en aquellas cepas que presentaron resistencia a betalactámicos, así como fenotipo BLEE positivo. Tomando en cuenta esta clasificación, fueron un total de 62 cepas, es decir, el 93.93%, aquellas que fueron seleccionadas para su amplificación (Figura 6).

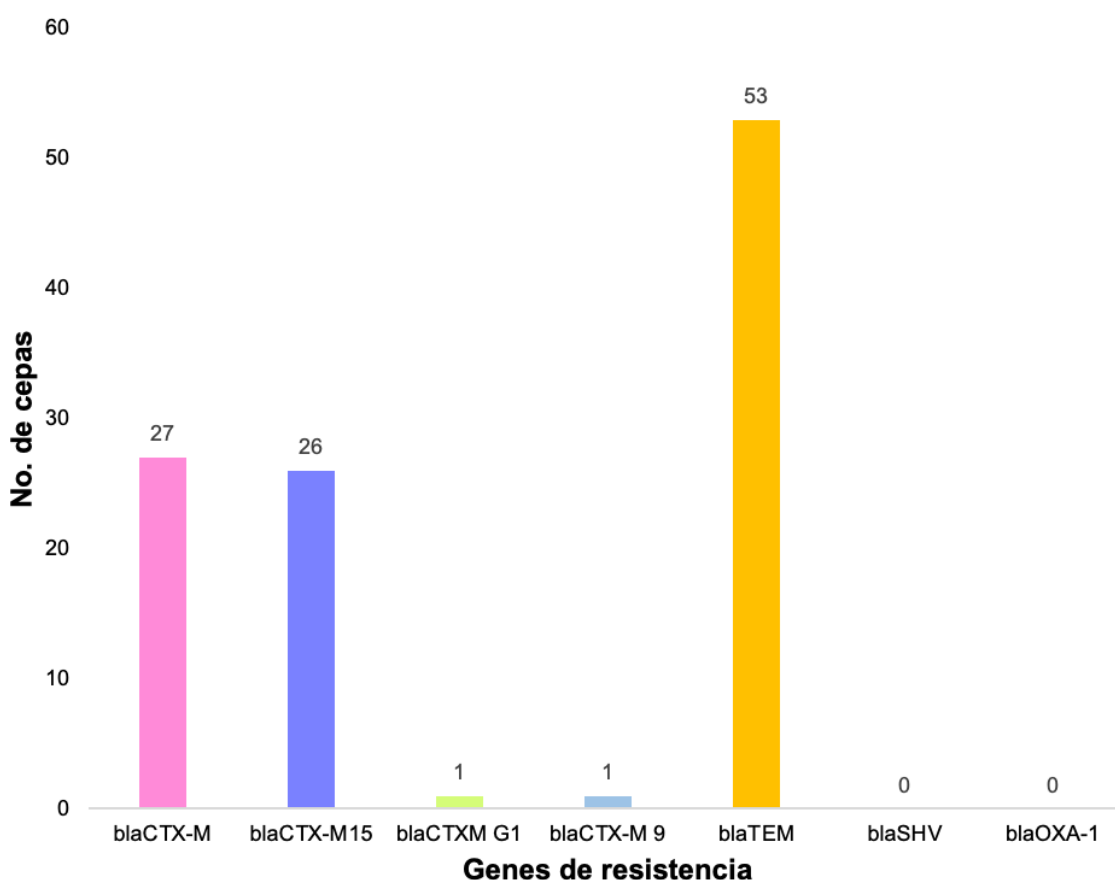


Figura 6. Genes de resistencia codificantes de betalactamasas detectados en las cepas resistentes a betalactámicos. Cada color es utilizado solo para marcar la diferenciación entre cada gen.

De las 62 cepas en total, el 43.54% amplificó para el gen *bla*_{CTX-M} universal, un 41.93% para el gen *bla*_{CTX-M-15}, 85.48% para el gen *bla*_{TEM}, siendo este el más prevalente entre todas las cepas, y tan solo 1.61% para el gen *bla*_{CTX-M G1} y *bla*_{CTX-M G9}, respectivamente. Sin embargo, ninguna de las cepas amplificó para los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{OXA-1}. En las siguientes imágenes se exhiben los amplificados de los genes en algunas de las cepas (Figura 7 a Figura 13).

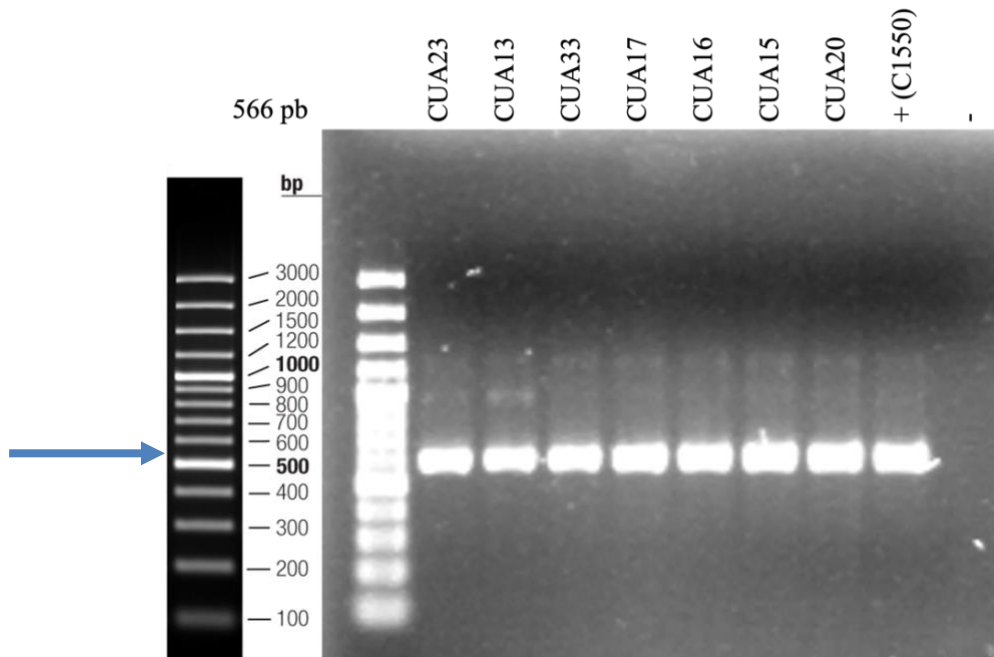


Figura 7. Electroforesis en geles de acrilamida al 1% de la amplificación por PCR del gen *bla*_{CTX-M}. Carril 1: Marcador, Carril 2: CUA23, Carril 3: CUA13, Carril 4: CUA33, Carril 5: CUA17, Carril 6: CUA16, Carril 7: CUA15, Carril 8: CUA20, Carril 9: Control Positivo (C1550), Carril 10: Control Negativo.

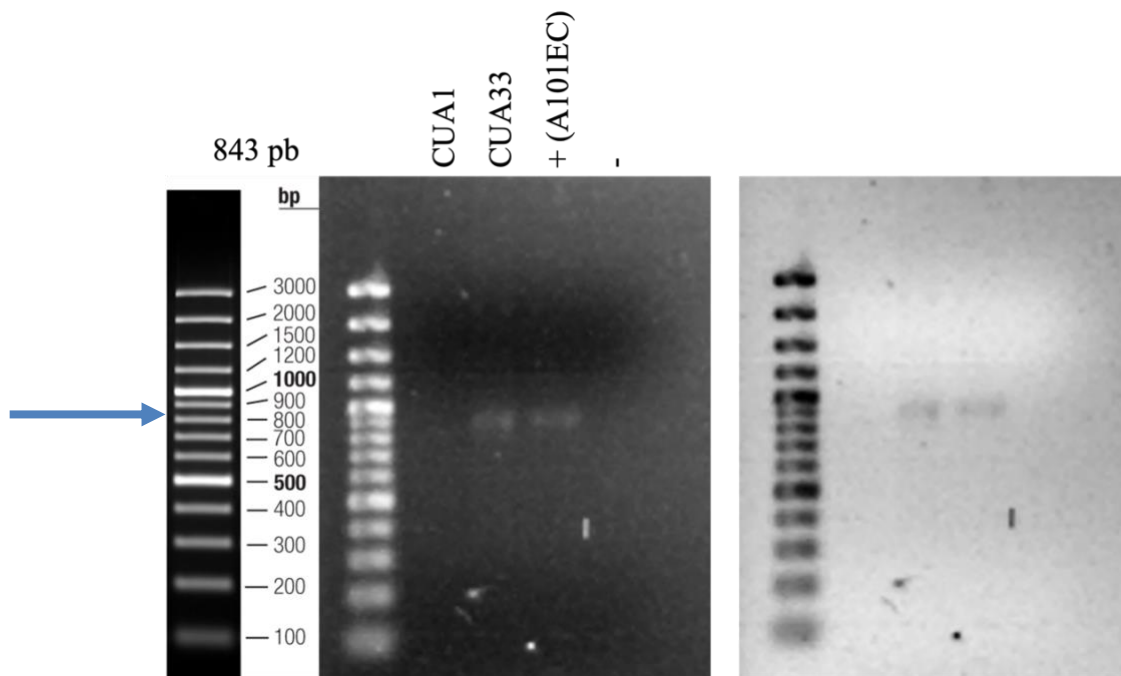


Figura 12. Electroforesis en geles de acrilamida al 1% de la amplificación por PCR del gen *bla*_{CTX-M G1}. Carril 1: Marcador, Carril 2: CUA1, Carril 3: CUA33, Carril 4: Control Positivo (A101EC), Carril 5: Control Negativo.

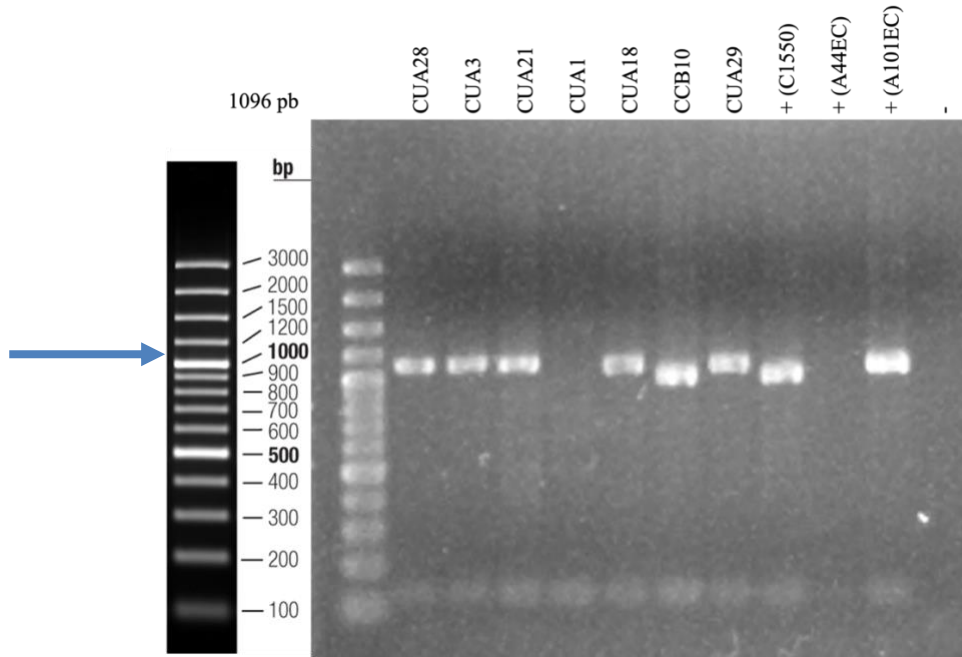


Figura 8. Electroforesis en geles de acrilamida al 1% de la amplificación por PCR del gen *bla*_{CTX-M-15}. Carril 1: Marcador, Carril 2: CUA28, Carril 3: CUA3, Carril 4: CUA21, Carril 5: CUA1, Carril 6: CUA18, Carril 7: CCB10, Carril 8: CUA29, Carril 9: Control Positivo (C1550), Carril 10: Control Positivo (A44EC), Carril 11: Control Positivo (A101EC), Carril 12: Control Negativo.

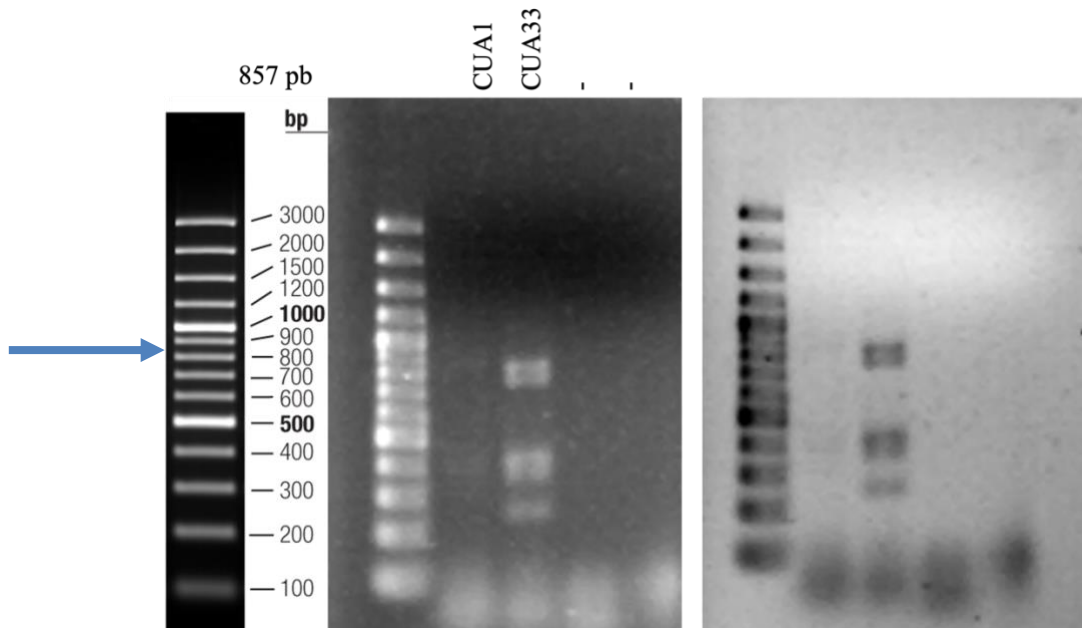


Figura 13. Electroforesis en geles de acrilamida al 1% de la amplificación por PCR del gen *bla*_{CTX-M-9}. Carril 1: Marcador, Carril 2: CUA1, Carril 3: CUA33, Carril 4: Control Negativo, Carril 5: Control Negativo.

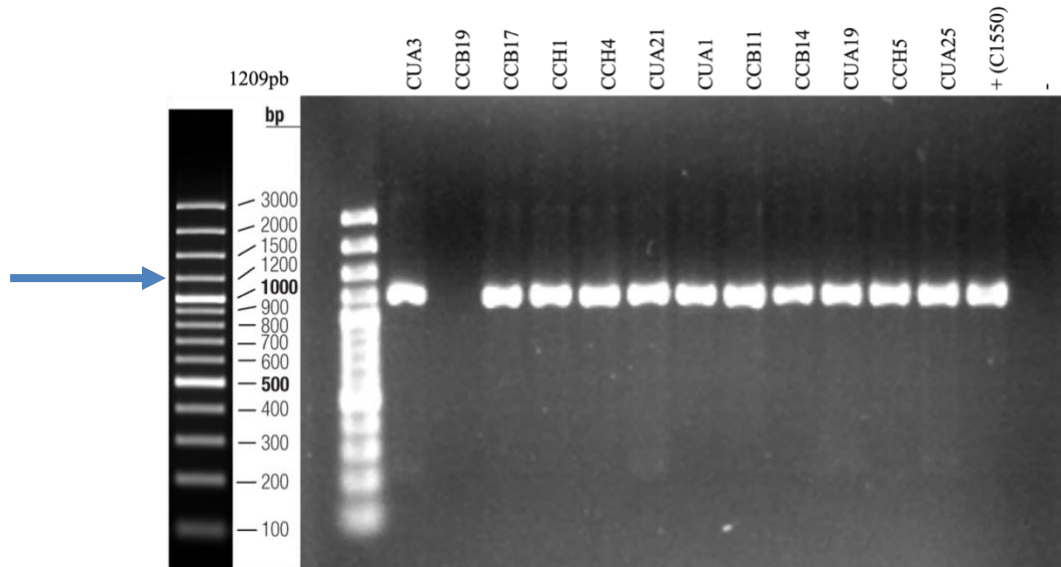


Figura 9. Electroforesis en geles de acrilamida al 1% de la amplificación por PCR del gen *bla_{TEM}*. Carril 1: Marcador, Carril 2: CUA3, Carril 3: CCB19, Carril 4: CCB17, Carril 5: CCH1, Carril 6: CCH4, Carril 7: CUA21, Carril 8: CUA1, Carril 9: CCB11, Carril 10: CCB14, Carril 11: CUA19, Carril 12: CCH5, Carril 13: CUA25, Carril 14: Control Positivo (C1550), Carril 15: Control Negativo.

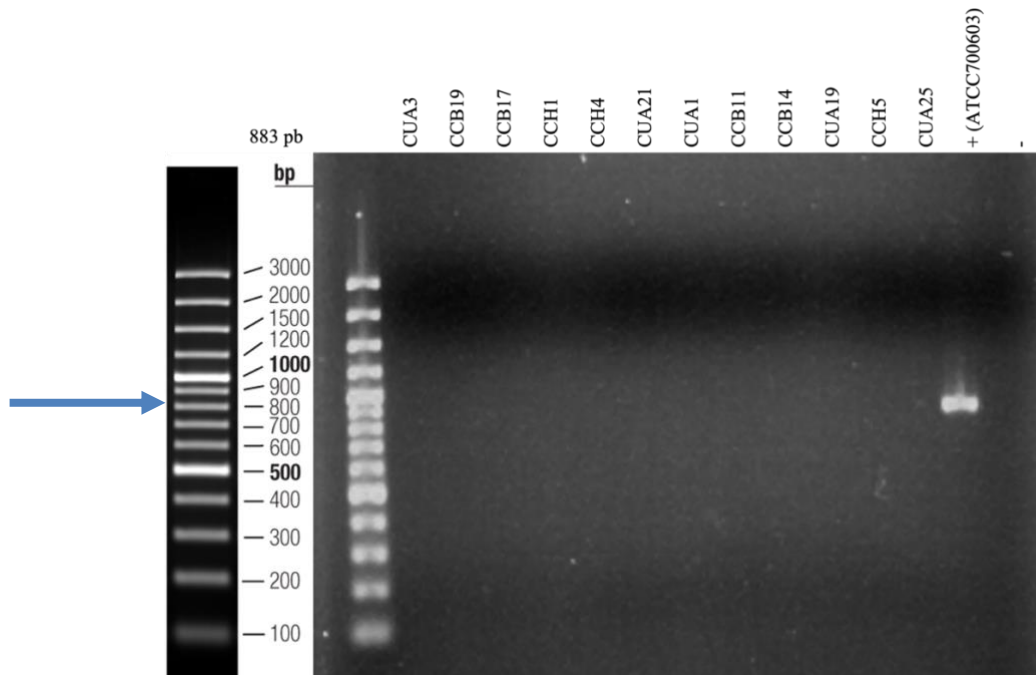


Figura 10. Electroforesis en geles de acrilamida al 1% de la amplificación por PCR del gen *bla_{SHV}*. Carril 1: Marcador, Carril 2: CUA28, Carril 3: CUA3, Carril 4: CUA21, Carril 5: CUA1, Carril 6: CUA18 Carril 7: CCB10, Carril 8: CUA29, Carril 9: Control Positivo (C1550), Carril 10: Control Positivo (A44EC), Carril 11: Control Positivo (A101EC), Carril 12: Control Negativo.

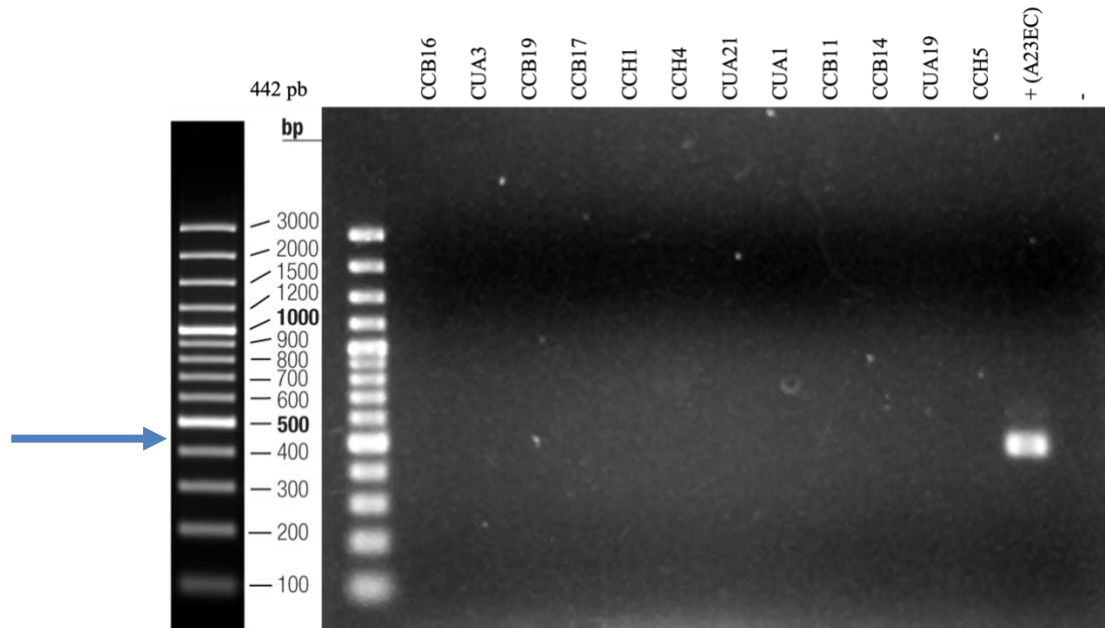


Figura 11. Electroforesis en geles de acrilamida al 1% de la amplificación por PCR del gen *bla_{OXA-1}*. Carril 1: Marcador, Carril 2: CCB16, Carril 3: CUA3, Carril 4: CCB19, Carril 5: CCB17, Carril 6: CCH1, Carril 7: CCH4, Carril 8: CUA21, Carril 9: CUA1, Carril 10: CCB11, Carril 11: CCB14, Carril 12: CUA19, Carril 13: CCH5, Carril 14: Control Positivo (A23EC), Carril 15: Control Negativo.

Tabla 7. Presencia de genes que codifican a betalactamasas en las cepas estudiadas.

Paciente	Diagnóstico	Cepa	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M G1}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{CTX-M G9}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{OXA-1}		
1	CUCI	CUA30					+				
		CUA22					+				
		CUA28	+		+		+				
		CUA2									
		CUA6						+			
		CUA3	+		+			+			
		CUA21	+		+			+			
		CUA1						+			
		CUA19						+			
		CUA25						+			
		CUA18	+		+			+			
		CUA29	+		+						
		CUA7									
		CUA5	+		+			+			
		CUA9	+		+			+			
		CUA4	+		+			+			
		CUA38						+			
		CUA37	+		+			+			
		CUA34	+		+			+			
		CUA12	+		+			+			
		CUA24	+		+			+			
		CUA10	+		+			+			
		CUA39	+		+			+			
		CUA14	+		+			+			
		CUA32						+			
		CUA36						+			
		CUA27	+		+			+			
		CUA31	+		+			+			
		CUA11	+		+			+			
		CUA35	+		+			+			
CUA23	+		+			+					
CUA13	+		+			+					
CUA33	+		+	+	+	+					
CUA17	+		+			+					
CUA16	+		+			+					
CUA15	+		+			+					
CUA20	+		+			+					
2	Colitis crónica y diverticulitis	CCB18					+				
		CCB13					+				
		CCB15									
		CCB16						+			
		CCB19									
		CCB17						+			
		CCH1						+			
		CCH4						+			
		CCB11						+			
		CCB14						+			
		CCH5						+			
		CCB10	+		+						
		CCB2						+			
		CCB3									
		CCB12						+			
		CCB8						+			
		CCB5									
		CCB1									
		CCB7						+			
		CCB4						+			
CCB6						+					
CCB9						+					
3	CUCI	CUA50					+				
		CUA42					+				
		CUA44									
		CUA55									
		CUA57									
		CUA69									
CUA67						+					

Tabla 8. Perspectivas de investigación.

Paciente	Diagnóstico	Cepa	Genotipo de resistencia detectado	Acciones pendientes de realizar
1	CUCI	CUA30	<i>bla</i> _{TEM}	Fenotipo de producción de carbapenemasas
		CUA22	<i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CUA28	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CUA2	?	Búsqueda de otros mecanismos de resistencia
		CUA6	<i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CUA3	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CUA21	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CUA1	<i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CUA19	<i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CUA25	<i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CUA18	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar
		CUA29	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	Secuenciar
		CUA7	?	Búsqueda de otros mecanismos de resistencia
		CUA5	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA9	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar, perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA4	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar, perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA38	<i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA37	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA34	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA12	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA24	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar, perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA10	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar, perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA39	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar, perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA14	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar, perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA32	<i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA36	<i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA27	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA31	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar, perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA11	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar, perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA35	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA23	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar, perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA13	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar, perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA33	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M G1} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M G9} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar, perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
CUA17	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar, perfil de susceptibilidad a FOX e IPM		
CUA16	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar, perfil de susceptibilidad a FOX, CTX e IPM		
CUA15	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar, perfil de susceptibilidad a FOX e IPM		
CUA20	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM		
2	Colitis crónica y diverticulitis	CCB18	<i>bla</i> _{TEM}	Fenotipo de producción de carbapenemasas
		CCB13	<i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CCB15	?	Búsqueda de otros mecanismos de resistencia
		CCB16	<i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CCB19	?	Búsqueda de otros mecanismos de resistencia
		CCB17	<i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CCH1	<i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CCH4	<i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CCB11	<i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CCB14	<i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CCH5	<i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CCB10	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CCB2	<i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CCB3	?	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CCB12	<i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CCB8	<i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CCB5	?	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CCB1	?	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CCB7	<i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CCB4	<i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
CCB6	<i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM		
CCB9	<i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM		
3	CUCI	CUA50	<i>bla</i> _{TEM}	Fenotipo de producción de carbapenemasas
		CUA42	<i>bla</i> _{TEM}	Secuenciar (comprobar la variante amplificada)
		CUA44	?	Búsqueda de otros mecanismos de resistencia
		CUA55	?	Fenotipo de producción de carbapenemasas
		CUA57	?	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
		CUA69	?	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM
CUA67	<i>bla</i> _{TEM}	Perfil de susceptibilidad a FOX e IPM		

10. Discusión

La resistencia a los antibióticos de primera línea es uno de los más grandes y complejos problemas de salud pública, que involucra a los humanos, animales y al medio ambiente. En el panorama general de este fenómeno, la finalidad del presente trabajo de tesis fue elucidar los determinantes de resistencia a antibióticos betalactámicos en cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes que padecen una EII, a fin de contribuir en la búsqueda continua de estrategias para tratar y vigilar los padecimientos intestinales en los que el patotipo AIEC esté asociado.

Asimismo, uno de los objetivos de esta tesis fue la redacción de un artículo de revisión sobre la asociación de AIEC con la EII. En esta se destaca la primera investigación de cepas AIEC resistentes a betalactámicos en México, y que presentan a la betalactamasa *bla*_{CTX-M-15}. Se habla también de cepas de AIEC resistentes a betalactámicos asociadas a *bla*_{TEM}, reportadas en Estados Unidos (29, 32). Ambos hallazgos coinciden con los resultados experimentales de este trabajo; sin embargo, las cepas analizadas no han sido clasificadas como AIEC, por lo que se tendrían que realizar los ensayos de caracterización fenotípica.

En este trabajo, a través del método de Kirby-Bauer se detectaron niveles de resistencia de hasta un 90.90% (60 de 66), en ampicilina, mientras que el 93.93% (62 de 66) de las cepas presentó resistencia a alguno de los antibióticos utilizados en este estudio. Por otro lado, se identificaron 16 cepas (24.24%) de *E. coli* con el fenotipo BLEE aisladas de las biopsias de tres pacientes con EII, y el 72.72% de ellas (48 de 66) mostró resistencia en más de un betalactámico.

Los resultados de este trabajo coinciden con los de estudios previos sobre el perfil de resistencia en cepas asociadas a padecimientos intestinales en algunas regiones del mundo, como en Estados Unidos, donde Dogan y colaboradores reportan resistencia a amoxicilina y ácido clavulánico, cefoxitina, cloranfenicol, ciprofloxacino, gentamicina y rifaximina en AIEC (29). Por otro lado, en aquellas cepas con fenotipo BLEE (24.24%; 16 de 66 cepas), fueron quince las que presentaron al menos dos genes codificantes para BLEE, es decir

93.75% de cepas con sinergismo de doble disco. Siendo *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{TEM} las betalactamasas presentes en estas.

Entre los genes de las 66 cepas analizadas en este estudio, hubo un porcentaje del 40.90% de *bla*_{CTX-M}, siendo el más prevalente entre los genes buscados, 39.39% en *bla*_{CTX-M-15}, 80.30% en *bla*_{TEM}, y 1.51% en *bla*_{CTX-M G1} y *bla*_{CTX-M G9}, respectivamente; sin embargo, es necesario realizar la secuenciación de estos genes para determinar la variante alélica. Respecto a los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{OXA-1}, no se encontraron en ninguna de las 66 cepas. Y cabe destacar que estos resultados concuerdan con estudios que reportan la presencia de las betalactamasas CTX-M y TEM en cepas de *E. coli* aisladas de diferentes orígenes (34).

Hasta el momento se sabe que CTX-M es la betalactamasa más frecuente entre todas las BLEE, mientras que TEM es la más común entre las cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos, información que coincide con el perfil de resistencia reportado en este trabajo. Por otro lado, SHV y OXA-1, son casi siempre encontradas en cepas de *K. pneumoniae* y de *Acinetobacter baumannii* (44). Estos resultados concuerdan con reportes recientes que mencionan a CTX-M como la enzima cada vez más prevalente en Latinoamérica y a *E. coli* como la bacteria con más diseminación de BLEE (45).

Fue en el paciente 1, con diagnóstico de CUCI, donde se encontraron todas las cepas con fenotipo BLEE, a diferencia del paciente 3 (mismo diagnóstico) en el cual sólo *bla*_{TEM} fue descrito. No obstante, y coincidiendo con la evidencia reportada, son las bacterias productoras de BLEE las más comunes entre todos los microorganismos multidrogoresistentes que colonizan el tracto intestinal de pacientes con CU, y son justamente *bla*_{CTX-M} y *bla*_{TEM} los genes de resistencia que más predominan entre ellos (46). Sin embargo, el tratamiento previo que ellos llevaron no indica ningún registro de betalactámicos, a excepción del paciente 3, que fue tratado con ceftriaxona, una cefalosporina de tercera generación, lo cual denota a la posibilidad de que aquellas cepas resistentes pudieron haber adquirido los genes mediante elementos genéticos móviles, a través de transferencia horizontal, como lo reporta la literatura (47).

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con aquellos reportados en los estudios realizados de esta última década, los cuales en su mayoría han señalado un incremento acelerado en los niveles de resistencia antibiótica en *E. coli*, además de un aumento notorio en el número de cepas multirresistentes con esta. Sin embargo, siguen siendo escasos los datos referentes a la epidemiología de la resistencia a antibióticos en el patotipo AIEC. Esto en consecuencia de que es un tema que muy recientemente se ha empezado a estudiar, siendo uno de los principales retos en la elaboración del presente trabajo de investigación, e igualmente razón por la que se presenta un marco de antecedentes con una extensión en parte limitada y con mayor énfasis en la última década. Por lo que cabe destacar la importancia de este trabajo, al ser uno de los primeros del campo de la resistencia en AIEC que evidencia la presencia de genes de resistencia en cepas aisladas de biopsias de pacientes diagnosticados con EII.

Al mismo tiempo, hay que enfatizar lo considerable que es la elección del grupo de medicamentos analizados en este estudio, pues al ser de los antibióticos más usados en el tratamiento de primera línea de enfermedades tales como la EII, reportar la presencia de más de un tipo de BLEE como se ha hecho aquí, puede ser un indicador y claro ejemplo de lo urgente que es conferir más prioridad no sólo al estudio y financiación del fenómeno de resistencia antibacteriana, sino también, a la educación y difusión en la población del mismo.

Sobre el control de la EII, al ser este un trastorno cuyas terapias actuales además de ser inicialmente de difícil alcance debido a su alto costo, se espera que se vuelvan todavía más escasas debido al creciente número de reportes sobre la ya mencionada resistencia antibiótica, por lo que es necesario tener una vigilancia más constante de estos datos epidemiológicos.

Hace cinco años se publicó el primer reporte de AIEC en México (32), y solo tres años desde que se informó de la presencia de cepas AIEC similares a otras ya reportadas relacionadas con la EII (33). Esto quiere decir, que no hay un registro lo suficientemente extenso con el que podamos orientarnos hacia el control del creciente desarrollo de esta enfermedad en nuestro país.

Por otro parte, es debido a este uso inadecuado de antibióticos tanto dentro como fuera del sector salud, además de un estilo de vida acelerado típico de países desarrollados y cada vez más común en el resto de las poblaciones, de la prevalencia en el consumo de alcohol y tabaco, y del creciente reporte de afecciones mentales tales como la depresión y ansiedad, que se promueve la incidencia de la EII.

Aunado a esto, habría que considerar la acelerada evolución de las poblaciones bacterianas. Y es cómo resultado de esta postura inamovible ante el manejo de los antibióticos, desde su primera aparición durante el último siglo hasta el inicio del presente, que hemos ido formando un ambiente favorable para el desarrollo precipitado de mecanismos tales como la modificación enzimática por medio de BLEE.

11. Conclusiones

1. La revisión bibliográfica realizada sugiere que son escasos los reportes sobre la resistencia de AIEC (asociada a EII) a los antibióticos betalactámicos.
2. Este trabajo de tesis mostró altas tasas de resistencia (hasta 93.93%) a antibióticos betalactámicos en cepas aisladas de biopsias de pacientes diagnosticados con alguna EII, siendo hasta el momento el segundo reporte en México.
3. Se describió la presencia de las betalactamasas tipo TEM y CTX-M, que son de amplia prevalencia epidemiológica en *E. coli*, siendo TEM la más prevalente entre este grupo de cepas.
4. Los datos mostrados son evidencia de que estas cepas multidrogoresistentes pueden circular entre el ambiente comunitario y hospitalario, ya que los tres pacientes incluidos en este trabajo son portadores que frecuentan ambos ambientes.

12. Perspectivas

- Concluir el perfil de susceptibilidad para los antibióticos FOX, CTX e IPM.

- Secuenciar los genes de resistencia en las cepas productoras de BLEE.
- Búsqueda de carbapenemasas en aquellas cepas que presentaron un perfil fenotípico intermedio a antibióticos carbapenémicos.
- Es importante continuar con la caracterización de estas cepas resistentes a betalactámicos, para determinar si pertenecen al patotipo AIEC y elucidar su participación en el proceso inflamatorio en los tres pacientes evaluados.

13. Bibliografía

1. Martínez MJ y Viada J. F. Enfermedad de Crohn. ADOLESCERE. 2015;3(2):54.
2. Gomollón F, Sans M. Enfermedad inflamatoria intestinal. Enfermedad de Crohn. En Gastroenterología y Hepatología. Barcelona: Jarpoy Editores; 2012. p. 443-456.
3. Bustamante M, Fernández A, Álvarez A, Loreto M, Celeiro C. Enfermedad de Crohn: afectación gastrointestinal alta. Revista de Gastroenterología de México. 2015;80(4):282-285.
4. Ibáñez P, Quera R, Lubascher J, Figueroa C, Pizarro G, Kronberg U, Simian D. Algoritmos de tratamiento de la enfermedad de Crohn desde una experiencia local. Revista Médica Clínica Las Condes. 2018;29(6):663-677.
5. Figueroa C. Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal. Revista Médica Clínica Las Condes. 2019;30(4):257-261.
6. Mak WY, Zhao M, Ng SC, Burisch J. The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. Journal of gastroenterology and hepatology. 2020;35(3):380-389.
7. Windsor JW, Kaplan GG. Evolving epidemiology of IBD. Current Gastroenterology Reports. 2019;21(8):1-9.
8. Gómez MM. Enfermedad inflamatoria intestinal pediátrica. Pediatría Integral. 2015;119.
9. Martínez-Medina M, Strozzi F, Ruiz Del Castillo B, Serrano-Morillas N, Ferrer Bustins N, Martínez-Martínez L. Antimicrobial resistance profiles of adherent invasive *Escherichia coli* show increased resistance to β -lactams. Antibiotics. 2020;9(5):251.

10. Mirsepasi-Lauridsen HC, Vallance BA, Krogfelt KA, Petersen AM. *Escherichia coli* pathobionts associated with inflammatory bowel disease. *Clinical microbiology reviews*. 2019;32(2).
11. Ochoa TJ, Mercado EH, Durand D, Rivera FP, Mosquito S, Contreras C, Ruiz J. Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénicas en niños peruanos con y sin diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2011;28:13-20.
12. Benvenuto Vargas VP. Determinación de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) en agua de mar del Circuito de Playas de la Costa Verde [tesis de licenciatura] [Lima, Perú]: Universidad Ricardo Palma; 2017.
13. Medrano, F. L., Pedroche, C. D., & Garrido, R. S. J. (2006). Antibióticos betalactámicos I. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 9(51), 3344-3350.
14. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2009;27(2):116-129.
15. Lima LM, da Silva BNM, Barbosa G, Barreiro EJ. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020; 112829.
16. Etebu E, Ariekpar I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2016;90-101.
17. Watkins RR, Bonomo, R. A. β -Lactam Antibiotics. En J. Cohen (Ed.), *Infectious Diseases*. ELSEVIER; 2017. p 1203-1204.
18. Fernandes R, Amador P, Prudêncio C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*. 2013;24(1): 7-17.
19. Aronson JK. Monobactams. En: *Meyler's Side Effects of Drugs*. ELSEVIER; 2016. p. 1097-99.
20. Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018;62(10).
21. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VH, Takebayashi Y, Spencer J. β -Lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st century. *Journal of molecular biology*. 2019;431(18):3472-3500.

22. Opal SM, Pop-Vicas A. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria. En J. Bennett (Ed.), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. ELSEVIER; 2015. p 235-.
23. García CS, de la Gándara MP, García FJC. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2010;28:12-18.
24. Galindo-Méndez M. Caracterización molecular y patrón de susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido en infección del tracto urinario adquirida en la comunidad. Revista chilena de infectología. 2018;35(1):29-35.
25. Velandia DPL, Caycedo MIT, Orduz LMC, Quiroga CFP. Determinación de genes que codifican la resistencia de betalactamasas de espectro extendido en bacilos Gram negativos aislados de urocultivos. Revista Investigación en Salud Universidad de Boyacá. 2016;3(2):107-126.
26. Rivera-Jacinto M, Rodríguez-Ulloa C, Flores Clavo R, Serquén López L, Arce Gil Z. Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella spp* y *Escherichia coli* aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2015;32:q752-755.
27. Rada AM, Hernández-Gómez C, Restrepo E, Villegas MV. Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. Biomédica. 2019;39:199-220.
28. Li G, Ren, Wu Q, Hu D, Wang G, Wu X, Liu S, Wu Y, Gu G, Li R. Bacteriology of Spontaneous Intra-Abdominal Abscess in Patients with Crohn Disease in China: Risk of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacteria. Surgical infections. 2015;16(4):461-465.
29. Dogan B, Scherl E, Bosworth B, Yantiss R, Altier C, McDonough P, Jiang Z, DuPont H, Garneau P, Harel J, Rishniw M, Simpson K. Multidrug Resistance Is Common in *Escherichia coli* Associated with Ileal Crohn's Disease. Inflammatory Bowel Diseases. 2013;19(1):141-150.

30. Kamali Dolatabadi R, Feizi A, Halaji M, Fazeli H, Adibi P. The Prevalence of Adherent-Invasive *Escherichia coli* and Its Association With Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in medicine*. 2021(8): 730243.
31. Dahal RH, Choi YJ, Kim S, Kim J. Differentiation of *Escherichia fergusonii* and *Escherichia coli* Isolated from Patients with Inflammatory Bowel Disease/Ischemic Colitis and Their Antimicrobial Susceptibility Patterns. *Antibiotics (Basel)*. 2023(12):154.
32. Barrios-Villa E, Cortés-Cortés G, Lozano-Zaraín P, Arenas-Hernández M, Martínez de la Peña CF, Martínez-Laguna Y, Torres C, Rocha-Gracia R. Adherent/invasive *Escherichia coli* (AIEC) isolates from asymptomatic people: new E. coli ST131 O25:H4/H30-Rx virotypes. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2018;17(1):42.
33. Barrios-Villa E, Martínez de la Peña CF, Lozano-Zaraín P, Cevallos MA, Torres C, Torres AG, Rocha-Gracia R. Comparative genomics of a subset of Adherent/Invasive *Escherichia coli* strains isolated from individuals without inflammatory bowel disease. *Genomics*. 2020;112(2):1813–1820.
34. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2022 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI document M100 32th Ed.
35. Cortés G. Caracterización de la resistencia antimicrobiana y tipificación molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes hospederos en Puebla, México [Tesis Doctoral]. Puebla, Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2016.
36. Batchelor M, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Paiba GA, Davies RH, Liebana E. Detection of multiple cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from a cattle fecal sample in Great Britain. *Microb Drug Resist*. 2005;11:58-61.
37. Briñas L, Lantero M, de Diego I, Alvarez M, Zarazaga M, Torres C. Mechanisms of resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* isolates recovered in a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56:1107-10.
38. Pagani L, Dell’Amico E, Migliavacca R, D’Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G, et al. Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Nosocomial Isolates of Enterobacteriaceae from a Hospital in Northern Italy. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003 Sep 1;41(9):4264–9.

39. Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:500-10.
40. Belaouaj A, Lapoumeroulie C, Canica MM, Vedel G, Nénot P, Krishnamoorthy R, Paul G. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like beta-lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiol Lett.* 1994;120:75-80.
41. Pitout J, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC. beta-Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:1350-4.
42. Briñas L, Moreno MA, Teshager T, Zarazaga M, Sáenz Y, Porrero C. Beta-lactamase characterization in *Escherichia coli* isolates with diminished susceptibility or resistance to extended-spectrum cephalosporins recovered from sick animals in Spain. *Microb Drug Resist.* 2003; 9:201-9.
43. Lara N. Caracterización genética de la resistencia y determinantes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con Enfermedad de Crohn, en Puebla [Servicio Social]. Puebla, Puebla: Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2018.
44. Hussain HI, Aqib AI, Seleem MN, Shabbir MA, Hao H, Iqbal Z, Kulyar MF, Zaheer T, Li K. Genetic basis of molecular mechanisms in β -lactam resistant gram-negative bacteria. *Microb Pathog.* 2021(158):105040.
45. Castanheira M, Simner PJ & Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases: An update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-antimicrobial resistance,* 2021; 3(3): dlab092.
46. Skuja V, Derovs A, Pekarska K, Rudzite D, Lavrinovica E, Piekuse L, et al. Gut colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae may increase disease activity in biologic-naive outpatients with ulcerative colitis: an interim analysis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology.* 2018 Jan 1;30(1):92–100.
47. Juhas M. Horizontal gene transfer in human pathogens. *Critical reviews in microbiology.* 2015; 41(1):101–8.

Sitios web:

<https://externalwebapps.lahey.org/studies/>

14. Anexos**Anexo 1: Zymoclean Gel DNA Recovery Kit.**

1. El producto de PCR se correrá en un gel de agarosa al 1%, se teñirá y la banda de interés se cortará bajo la luz UV del transiluminador (Benchtop UV, UVP).
2. Se transferirá a un tubo Eppendorf de 1.5 mL previamente pesado, se volverá a pesar y el peso del gel se determinará por diferencia.
3. Se adicionará *ADB Buffer* en 3 veces el peso del gel (ejemplo: si el peso es 0.15g, se adicionarán 450 µl).
4. Se incubará a 55°C durante 10 min (o hasta que la agarosa se disuelva), mezclando por inversión cada 2 min.
5. Se transferirá a un filtro con tubo colector y se centrifugará a 13,000 rpm durante 1 min. El líquido del tubo colector se desechará.
6. Se lavará 2 veces con 200 µl de *DNA Wash Buffer* y se centrifugará a 13,000 rpm durante 30 seg entre cada lavado.
7. El filtro se transfiere a un tubo nuevo y el ADN se eluye en 20 µl de agua centrifugando a 13,000 rpm durante 1 min.
8. Se mide la concentración de ADN en el NanoDrop y 1 µl del purificado se correrá en un gel de agarosa al 1% para visualizar el producto.
9. El producto se resguardará a 4°C hasta su envío.

Anexo 2: Asociación de *Escherichia coli* adherente-invasiva con la enfermedad inflamatoria intestinal

Resumen: En México no se cuenta con una estadística oficial sobre la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) ni datos sobre la participación de *Escherichia coli* adherente-invasiva (AIEC) en la patogénesis de este padecimiento. Por ello, en esta revisión proporcionamos una actualización sobre el papel potencial de AIEC en la patogenia de la

EII, así como de las estadísticas que se han reportado en México. Realizamos una búsqueda sistemática de literatura y analizamos un total de 180 reportes científicos obtenidos de bases de datos públicas que sustentan la participación de AIEC como agente causal de EII, ya que genera una invasión intestinal que conlleva a una respuesta inflamatoria exacerbada. La presente revisión contribuye significativamente a explorar los avances científicos que hasta la fecha se han alcanzado sobre la participación de AIEC en la EII. A pesar de que la EII es un fenómeno de salud mundial, México cuenta con información limitada, por lo que es necesario proponer proyectos que conlleven a evaluar, monitorear y controlar este problema de salud pública, con miras a extrapolar y extender las estrategias resultantes a nivel mundial en un futuro cercano.