BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

"ESTUDIO PARCIAL DE PLÁSMIDOS EN CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE BIOPSIAS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL"

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA.

PRESENTA:

Q.F.B. ALEJANDRA MALDONADO GÁLVEZ

ASESORA DE TESIS:

D.C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

PUEBLA, PUE., MÉXICO. **Enero, 2024**

Puebla, Pue. a 8 de diciembre 2023.

A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Alejandra Maldonado Gálvez,** les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Estudio parcial de plásmidos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de biopsas de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal"

A nuestro juicio, la alumna **Alejandra Maldonado Gálvez** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

A t e n t a m e n t e.
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

D.C. Patricia Lozano Zarain — **D.C. Gerardo Cortés Cortés**

D.C. Margarita Ma. de la Paz Arenas Hdez. — **D.C. Cristina González Vázquez**

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

Agradecimientos

- **INSTITUCIONALES**

❖ A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, por el apoyo recibido durante la maestría y permitirme formar parte de esta excelente Universidad.

❖ Al **Instituto de Ciencias**, y todo su personal por todo el apoyo brindado y disponibilidad para todas las gestiones y apoyos para la participación en congresos.

❖ Al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas**, por aceptarme en el programa de Posgrado en Microbiología, por el conocimiento obtenido en este centro y por confiar en mi como alumna.

❖ Al **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad**, por abrirme las puertas para poder desempeñar mi proyecto de investigación, por el aprendizaje de las técnicas utilizadas, es un orgullo haber pertenecido a este valioso grupo de trabajo.

❖ A la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado**, por el apoyo para la realización de este proyecto y por el apoyo dado para los gastos de transporte para la asistencia del XLVII Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica en la ciudad de Boca del Rio, Veracruz.

❖ Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías**, por la beca otorgada durante los estudios de maestría, con número de becario 797810. Esta tesis forma parte de los proyectos de CONAHCYT de Ciencia Básica A1-S-22136

- **ACADÉMICOS**

❖ A mi asesora la **D.C. Rosa Del Carmen Rocha Gracia**, por confiar en mí y permitirme trabajar con ella y su grupo de trabajo, por el apoyo brindado en cada momento, por ser mi guía en este proceso, por ser parte de un equipo de laboratorio maravilloso, espero haber cumplido en mi desempeño como alumna. Muchas GRACIAS por que usted fue una clave importante para la realización de un sueño anhelado y ahora cumplido, gracias por todo. ¡La estimo mucho!

❖ la **D.C. Patricia Lozano Zaraín**, por el apoyo y consejos brindados para el desarrollo de este proyecto, por las enseñanzas en clases e incluso fuera de ellas, además, de esos momentos agradables en el laboratorio, gracias por todo.

❖ A la **D.C. Margarita María De La Paz Arenas Hernández**, por su apoyo y consejos para el desarrollo de este proyecto y por su orientación y contribución al compartirnos de sus reactivos que ayudaron al desarrollo de esta tesis.

❖ Al **D.C. Gerardo Cortes Cortes**, por los consejos, por su disponibilidad de tiempo y apoyos, a pesar de la distancia, ha sido un gran guía para el desarrollo de este proyecto de investigación, gracias por toda la ayuda brindada.

Dedicatorias

❖ **A Dios**

Principalmente ya que, confiando en Él, sé que ha sido quien me ha permitido llegar hasta el día de hoy.

❖ **A mi familia**

Mis padres Claudia y Leonardo por el apoyo incondicional que me han dado desde el momento que decidí estudiar la maestría, por esa paciencia y amor ya que la distancia fue un poco difícil. Gracias a ellos por darme ese impulso de seguirme formando como profesional, este logro no solo me pertenece si no también es para ustedes, los amo mucho y es un privilegio para mi ser su hija.

A mis hermanos Raúl y Leo porque me apoyaron en muchas cosas, por estar conmigo en los momentos difíciles, les agradezco mucho y los amo.

A mi segunda familia de la renovación carismática por ser parte y apoyo emocional y espiritual, por darme ánimos y cariño.

❖ **A mi novio**

Javier, por a ver sido parte de este proceso, por los ánimos brindados y cariño dad, a pesar de la distancia y los obstáculos pasados me alegro de ese gran apoyo y tus palabras de aliento, te amo.

❖ **A mis amigos y compañeros**

A mis amigos de Chiapas, Jonny, Laly y Vale, que fueron un gran apoyo en cada momento.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, afortunadamente tuve el honor de conocerlos, que cada uno fue un elemento importante en mi vida, gracias por su apoyo a María, Jessi, Cristi, Ana, Lore, Vero, Brenda, Toñito, Isamar, Elsy; a ¨mis niños¨: Caro, Hania, Carlos, Ismael, Cristian, José de Jesús y Luis. Gracias por

todos los momentos que pasamos juntos, momentos de aprendizaje y alegría, los voy a extrañar mucho.

Les agradezco de todo corazón a todas las personas que me apoyaron y que fueron parte de este proyecto y parte de este momento importante de mi vida, que estuvieron conmigo dándome parte de su tiempo y ánimos para concluir este proyecto de investigación, les dedico esta tesis ya que por mi propia cuenta no hubiera podido haber terminado.

Gracias a todos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS 9

ÍNDICE DE TABLAS 11

ABREVIATURAS 12

RESUMEN 14

1. INTRODUCCIÓN 16

1.1 Enfermedad Inflamatoria Intestinal 16

1.2 *Escherichia coli* 19

1.3 *Escherichia coli* adherente invasiva (AIEC) 21

1.4 Resistencia antimicrobiana 25

1.5 Características de los plásmidos 27

2. ANTECEDENTES 29

3. JUSTIFICACIÓN 33

4. OBJETIVOS 34

4.1 General: 34

4.2 Específicos: 34

5. ESQUEMA DE TRABAJO 35

5.1 Estrategia *in vitro* 35

5.2 Estrategia *in silico* 36

6. MATERIAL Y MÉTODO 37

6.1 Material biológico 37

6.2 Determinación del perfil de resistencia 37

6.2.1 Susceptibilidad antimicrobiana 37

6.2.2 Detección fenotípica de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y Metalo- β-lactamasas 38

6.3 Obtención de ADN bacteriano 40

6.3.1 Extracción del templado de ADN total 40

6.4 Cuantificación de ADN 41

6.5 Identificación del genotipo de resistencia 41

6.6 Visualización de los productos de PCR 45

6.7 Identificación de la presencia de plásmidos por el método de Kieser 45

6.7.1 Visualización del gel de agarosa 46

6.8 Determinación de número y tamaño de plásmidos 46

6.8.1 Preparación de insertos bacterianos 47

6.8.2 Lisis bacteriana 47
6.8.3 Lavado de los insertos 47
6.8.4 Digestión enzimática 47
6.8.5 Electroforesis 48
6.8.6 Tinción del gel y visualización 48
6.9 Tipado de plásmidos por "PCR-based replicon typing" (PBRT) 48
6.10 Sistemas de Adicción Plasmídicos 52
7. RESULTADOS 55
7.1 Susceptibilidad antimicrobiana a antibióticos y fenotipo BLEE 55
7.1.1 Perfil de susceptibilidad y fenotipo BLEE de las cepas de *E. coli* 55
7.1.2 Fenotipo para metalo β-lactamasas 57
7.2 Identificación de genes que codifican para BLEE y B-lactamasas AmpC plasmídica 57
7.3 Identificación de los genes plasmídicos involucrados en la resistencia a quinolonas. 58
7.4 Identificación de genes asociados a la resistencia a Tetraciclinas, Cloranfenicol, Sulfonamidas y Trimetoprim. 59
7.5 Determinación y caracterización del perfil plasmídico de las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias intestinales. 62
7.5.1 Presencia o ausencia de plásmidos 62
7.5.2 Identificación del número y tamaño de plásmidos mediante PFGE-S1 62
7.5.3 Caracterización de los plásmidos de las cepas de *E. coli* 64
7.6 Análisis de la presencia de genes asociados a la resistencia a antibióticos *in silico* y los presentes en las cepas de este estudio. 68
7.7 Construcción del mapa genómico del plásmido pO83 72
8. DISCUSIÓN 73
9. CONCLUSIONES 80
10. PERSPECTIVAS 82
11. BIBLIOGRAFÍA 84
ANEXOS 91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.Representación esquemática de las condiciones de eubiosis y disbiosis intestinal…….. 18

Figura 2. Interacción de *Escherichia coli* adherente-invasiva (AIEC) con la mucosa intestinal en el contexto de la EII…….. 24

Figura 3. Descripción general de la organización de un plásmido…… 26

Figura 4. Estructura del plásmido pO83 de la cepa NRG857c (O83:H1) que contiene un operon con los genes *arlA, arlB y arlC*…….. 29

Figura 5. Posición de discos para determinar la producción fenotípica de BLEEs…….. 39

Figura 6. Porcentajes de susceptibilidad de las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias intestinales de pacientes con EII……. 54

Figura 7. Determinación del fenotipo BLEE por el método de Kirby Bauer propuesto por el CLSI 2022……. 55

Figura 8. Imagen de la determinación del fenotipo de metalo β-lactamasas…….. 56

Figura 9. Porcentaje de los genes de β-lactamasas presentes en las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con EII……. 57

Figura 10. Amplificación del gen *qnrS* (carril 1 y 4) y el gen *qnrA* (carril 7) en las cepas de E. coli aisladas de biopsias de pacientes con EII……. 58

Figura 11. Gráfica de los genes asociados a los otros antibióticos.
En la tabla se observa el número de cepas evaluadas y el porcentaje de los genes encontrados……. 59

Figura 12. Se muestra el gel de poliacrilamida al 0.7% donde se observa la presencia de diversas isoformas plasmídicas, de 7 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII ……..... 61

Figura 13. Se muestra el gel de poliacrilamida al 1.2% obtenido por PFGE con enzima S1 para determinar el número y tamaño de plásmidos de las cepas *E. coli* productoras de BLEE del paciente 1. Los carriles 1, 8 y 15 muestran la cepa control NCTC 50192 (contiene plásmidos de 155.8, 61.3, 40.1 y 6.8 Kb); 2, CUA14; 3, CUA23; 4, CUA10; 5, CUA11; 6, CUA15; 7, CUA24; 9, CUA31; 10, CUA39; 11, CUA13; 12, CUA16; 13, CUA18; 14, CUA17……. 62

Figura 14. Grupos de Incompatibilidad plasmídica presente en las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII…… 63

Figura 15. Sistemas de Adicción Plasmídica (SAP) de las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII. ……... 64

Figura 16. Porcentaje de la presencia de los genes asociados a la resistencia a los antibióticos……. 67

Figura 17. Frecuencia de la presencia de los genes asociados a la resistencia a los antibióticos entre los 30 genomas caracterizados como AIEC del banco de datos libres y las 66 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII……. 69

Figura 18. Genes asociados a la resistencia a los antibióticos más comunes entre los genomas caracterizados como AIEC y las 66 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII ……..…… 70

Figura 19. Mapa genómico del plásmido pO83 de la cepa de AIEC NRG857c asociada con la enfermedad de Crohn…… 71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Antimicrobianos y valores de corte utilizados en el ensayo de susceptibilidad…… 38

Tabla 2. Oligonucleótidos y condiciones de reacción utilizados en la amplificación de genes de resistencia…….. 40

Tabla 3. Componentes y cantidades utilizados en cada PCR para amplificar los genes de resistencia a antibióticos…… 43

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en el método PBRT para el tipado de plásmidos…… 48

Tabla 5. Componentes y cantidades utilizados en cada PCR para la determinación de replicones plasmídicos y búsqueda de los Sistemas de Adicción Plasmídicos …….. 51

Tabla 6. Oligonucleótidos y condiciones de PCR empleados en la búsqueda de los Sistemas de Adicción Plasmídicos…… 52

Tabla 7. Número de acceso y estatus de los genomas caracterizados como AIEC depositados en el GenBank……. 53

Tabla 8. Fenotipo y Genotipo de resistencia de *E. coli* aislada de biopsias intestinales de pacientes con EII…… 60

Tabla 9. Caracterización parcial de los plásmidos presentes en las cepas de *E. coli*, aisladas de biopsias de pacientes con EII…….. 65

Tabla 10. Genes asociados a la resistencia encontrados en los genomas determinados como AIEC…… 69

ABREVIATURAS

ADEC	*E. coli* adherente difusa
AIEC	*E. coli* adherente invasiva
AINE	Antinflamatorios no esteroideos
AM	Ampicilina
AMC	Amoxicilina + Clavulonato
AMK	Amikacina
ANA	Ácido Nalidíxico
ATM	Aztreonam
BET	Bromuro de Etidio
BLEE	β-lactamasas de espectro extendido
C	Cloranfenicol.
CAZ	Ceftazidima
CEACAM6	Molécula de adhesión celular Celular 6 relacionada con el antígeno carcinoembrionario
CHI3L1	Quitinasa 3 similar a 1
CICM	Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
CUCI	Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática
CTX	Cefotaxima
DPMT	Tipificación de Relaxasa MOB con Primers Degenerados
E. coli	*Escherichia coli*
EAEC	*E. coli* enteroagregativa
EC	Enfermedad de Crohn
EIEC	*E. coli enteroinvasora*
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
EPEC	*E. coli enteropatógena*
ETEC	*E. coli enterotoxigénica*
ExPEC	*E. coli* patógena extraintestinal

FEP	Cefepime
FOX	Cefoxitina
GEN	Gentamicina
I	Intermedio
IEC	Células epiteliales intestinales
IMP	Imipenem
LMHyC	Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad
MEM	Meropenem
MGE	Elementos Genéticos Móviles
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NMEC	*E. coli asociada a meningitis*
OMV	Vesículas de la membrana externa
PBRT	Tipificación del Replicón Basada en PCR
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PFGE	Electroforesis en Gel de Campos Pulsados
PP	Placas de Peyer
R	Resistentes
RAM	Resistencia a los antimicrobianos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S	Susceptible.
SAP	Sistemas de Adicción Plasmídico
SSI	Solución Salina Isotónica
STEC o EHEC	*E. coli shigatoxigénica ó enterohemorrágica*
TET	Tetraciclina
TMP/STX	Trimetoprim/Sulfametoxazol
TOB	Tobramicina
TSA	Agar soya tripticasa
UPEC	*E. coli uropatógena*

RESUMEN

La Enfermedades Inflamatorias Intestinales (EII) son un grupo heterogéneo de trastornos que presentan inflamación crónica del tracto digestivo. A pesar de que se desconoce la etiología de las EII, se ha informado que la causa más probable a la respuesta inflamatoria del hospedero podría ser el desequilibrio de la microbiota intestinal, causado por la proliferación de enterobacterias, dentro de las que se encuentra *Escherichia coli.* En los últimos años se ha documentado la existencia de un patotipo asociado con la EII y que se ha denominado como *E. coli* adherente invasiva (AIEC).

Se ha documentado, aunque en baja proporción, la existencia de cepas AIEC multidrogorresistentes, lo cual representa una amenaza para el tratamiento efectivo de los pacientes con EII. En este sentido, la transferencia horizontal de genes mediada por plásmidos es uno de los principales mecanismos de diseminación de la resistencia antimicrobiana. Por lo cual en este trabajo se tuvo como objetivo estudiar la resistencia y caracterizar parcialmente los plásmidos de cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con alguna EII.

Se trabajaron con cepas aisladas a partir de biopsias de pacientes diagnosticados con EII. Se estudiaron 66 cepas de *E. coli* [37 cepas paciente 1(CUCI), 22 cepas del paciente 2 (Colitis crónica y Diverticulitis) y 7 cepas del paciente 3(CUCI)], de las cuales 58 cepas (87%) fueron multidrogorresistentes y 16 cepas (24%), (que solo pertenecen al paciente 1) presentaron fenotipo BLEE positivo. Se detectaron diferentes genes de resistencia hacia β-lactámicos (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{OXA}$, *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{CTX-M-15}$, *bla*$_{CTX-M-GI}$, *bla*$_{CTX-M-G9}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{CMY2}$); quinolonas [*aac(6´)Ib-cr, qnrA, qnrB, qnrS*]; sulfonamidas (*sul-1, sul-3*); trimetoprim (*drfA, dfrB*); tetraciclina [*tet*(A), *tet*(B)] y cloranfenicol (*cmlA*).

Con base al fenotipo y genotipo de resistencia, y la presencia de plásmidos detectado por Kieser, se seleccionaron 45 cepas a las cuales se les buscó el número y tamaños de plásmidos mediante campos pulsados con la enzima S1. El rango del tamaño de los plásmidos encontrados en las cepas fue de los 37 kb a los 151 kb.

La mayor parte de estas cepas presentaron replicones IncF, siendo el más común el IncFIB. También se identificaron diversos sistemas de Adicción Plasmídicos, siendo *pemKI*, *hok-sok*, *srnBC*, los más prevalentes.

Posteriormente, conforme a los resultados de la resistencia de las 66 cepas, se procedió a buscar alguna similitud con la presencia de los genes asociados a la resistencia antimicrobiana de las cepas de estudio con los 30 genomas existentes en el banco de datos libres de cepas caracterizadas como AIEC. Observamos que, tanto las 66 cepas como los 30 genomas de AIEC presentan una mayor presencia de genes asociados a la resistencia a β-lactámicos. Sin embargo, para otros antibióticos si existe una diferencia de presencia de genes.

Además, se construyó el mapa genómico del plásmido prototipo de AIEC (pO83) acarreador de genes de resistencia a antibióticos, observando que presenta algunas características similares (tamaño y tipo de replicón) a algunos de los plásmidos encontrados, los cuales podrían estar acarreando algunos genes que les permita conferir la resistencia.

Este trabajo reporta que el 87.7% de las cepas *E. coli* recuperadas de pacientes con EII son multidrogorresistentes y poseen un alto contenido de genes de resistencia. Además, contienen plásmidos de diferentes tamaños, los cuales, podrían acarrear y diseminar los genes de resistencia a antibióticos, aportando una importante información al estudio sobre la EII para el uso de nuevas opciones terapéuticas para el paciente.

Palabras clave: EII, *E. coli*, Resistencia antimicrobiana.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad Inflamatoria Intestinal

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) describe distintos trastornos que presentan inflamación crónica del tracto digestivo. La EII se dividen principalmente en Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI), Enfermedad de Crohn (EC) y Colitis Intermedia o Inclasificable (Seyedian *et al*., 2019). Las enfermedades se presentan como diarrea crónica con sangre y mucosidad, en el caso de CUCI, se caracteriza por una inflamación del intestino más restringida localizada en la mucosa y submucosa del colon. Por el contrario, la EC involucra cualquier parte del tracto gastrointestinal, comúnmente el íleon terminal o la región perianal, las características microscópicas incluyen la inflamación transmural y ulceración fisurante (Khor *et al*., 2011). Sin embargo, la delimitación entre CUCI y EC no suelen ser concluyentes, por lo que se llega a confundir el diagnóstico. Aproximadamente el 30% de los pacientes con EII llegan a ser indistinguibles, por lo tanto, se conocen como Colitis Indeterminada (M'Koma, 2022).

La EII afecta a una población amplia que incluye niños, adultos y personas mayores, independientemente de la región geográfica o el origen étnico. Aproximadamente el 25% de los casos se presenta antes de los 20 años (Seyedian *et al*., 2019; Buie *et al*., 2022). Desde inicios del siglo XXI la EII ha sido un problema de salud pública a nivel mundial. Se estima que, en Norteamérica y Europa, alrededor de 1.5 y 2 millones de personas, respectivamente, presentan la enfermedad. Al mismo tiempo, la incidencia del padecimiento puede estar aumentando en América del sur, Europa de Este, Asia y África (Rosen *et al*., 2015; Yamamoto *et al*., 2020). Los estudios realizados en América Latina y el Caribe, donde se incluyen países y territorios de América del norte (como México), América Central y América del Sur, han demostrado una incidencia creciente de la EII. Sin embargo, la falta de datos es un reto para comprender la carga de la enfermedad en estos países (Kotze *et al*., 2020).

En México se ha reportado la incidencia de EII durante el periodo 2000 al 2017, la cual ha aumentado constantemente de 0.05 a 0.21 por 100,000 habitantes en los últimos 15 años; además, se ha llegado a observar mayor prevalencia de pacientes con CU (78.6%) en comparación con la EC (Yamamoto *et al*., 2019). Este aumento en la incidencia y prevalencia de EII podría ser multifactorial, ya sea, por cambios en el estilo de vida, por hábitos alimentarios, el uso de antibióticos, así como la mejora del diagnóstico para la EII y una menor prevalencia de enfermedades infecciosas por parásitos como lombrices, debido a la disminución de parasitosis por helmintos (Ciapponi *et* al., 2020; Yamamoto *et al*., 2022).

El diagnóstico de la EII se basa en la combinación del historial clínico, exploración física, exámenes de laboratorio como: VSG, proteína C reactiva, fibrinógeno, ferritina y cal-proteína fecal. Además de emplear radiografía del tracto gastrointestinal superior, endoscopia, colonoscopia para recuperar una muestra de tejido del tracto gastrointestinal y en algunos casos se realiza resonancia magnética, para tener una imagen adecuada de la localización de lesiones de intestino. Sin embargo, no existe una prueba exacta para diagnosticar la EII o para distinguir entre la EC y la CU (Seyedian *et al*., 2019, Ghouri *et al.*, 2020). Para el diagnóstico diferencial, se debe preguntar al paciente sobre la intolerancia alimentaria, los fármacos que toma [incluidos los antinflamatorios no esteroideos (AINE)], los viajes al extranjero y el tabaquismo. En niños, se considera el retraso del crecimiento inexplicable, deficiencias nutricionales (comúnmente deficiencia de vitamina B12) y ciertos cambios en la piel (Cummings *et al.*, 2008; Wehkamp *et al*., 2016).

La terapia para la EII consiste en una combinación entre tratamientos nutricionales y tratamientos médicos (Seyedian *et al*., 2019). Entre los tratamientos médicos pueden usarse los corticosteroides como prednisona; los Ácido-5-Aminosalicílico, así como la mesalazina, la cual puede utilizarse para el tratamiento inicial; los antibióticos, donde la rifaximina es una alternativa terapéutica. En algunos casos se utiliza como terapia antibióticos betalactámicos y ciprofloxacino (Gómez, 2015).

La etiología y patología de la EII son aún desconocidas, sin embargo, las influencias genéticas, ambientales y microbianas del hospedero convergen y dan como

resultados una respuesta inmunitaria desregulada entre la mucosa y el microbioma intestinal comensal (Rosen *et al*., 2015). Este cambio en el equilibrio se conoce como disbiosis, la cual juega un papel importante en la patogenia de la enfermedad (Ghouri *et al.*, 2020).

Los estudios realizados en modelos animales sugieren que la inflamación en la EII puede surgir como resultados de una expresión exagerada de las células T, lo que conlleva a la sobreproducción de citocinas proinflamatorias. Pero de igual manera, la microbiota intestinal es necesaria para iniciar o mantener el proceso inflamatorio intestinal (Mirsepasi *et al*., 2019; Baldelli *et al*., 2021).

El microbioma intestinal humano está compuesto por cuatro grupos de bacterias principales. Los más abundantes son los Firmicutes (grampositivas) y Bacteroidetes (gramnegativas), seguidos en menor medida por Proteobacterias y Actinobacterias (Matsuoka *et al*., 2015). Se ha informado que en las personas diagnosticadas con EII presentan una disminución de la biodiversidad principalmente de Firmicutes como *Clostridium leptum* y especialmente *Faecalibacterium prausnitzii*, además, de un aumento de Proteobacterias potencialmente dañinas, especialmente de la familia Enterobacteriaceae. Por lo cual, se sugiere que la proliferación de Enterobacteriaceae puede participar en el desequilibrio de la microbiota intestinal, provocando una respuesta inflamatoria (Figura 1) (Baldelli *et al*., 2021).

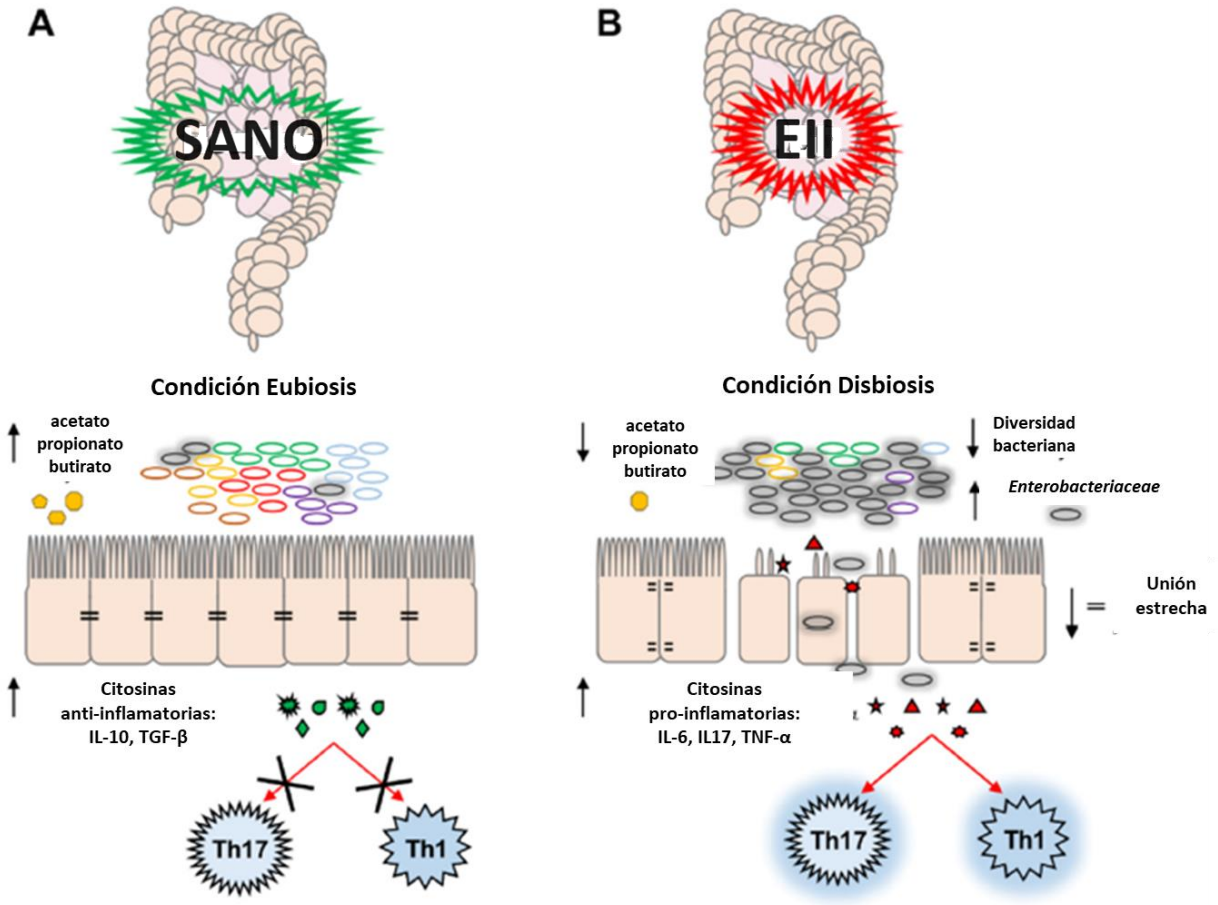


Figura 19. Representación esquemática de las condiciones de eubiosis y disbiosis intestinal. Modificado de Baldelli *et al*., 2021. IL: interleucina, TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta, TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa

Escherichia coli representa uno de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* más estudiado, el cual coloniza el intestino humano desde el nacimiento. Se documenta que el patotipo de *E. coli* adherente/invasivo (AIEC) está muy ligado a la EII, por lo cual esta bacteria, se ha propuesto como posible causante del inicio de la respuesta inflamatoria en el intestino (Meconi *et* al., 2007; Baldelli *et al*., 2021).

1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) es un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu *Escherichia*, metabólicamente esta bacteria es oxidasa negativa, indol positivo (De la Fuente *et al.,* 2017). Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un

microorganismo de la microbiota intestinal (Águila *et al*., 2020). Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen, Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (Benvenutto, 2017; Liu Bin *et al.,* 2020).

Aunque *E. coli* puede ser un residente inócuo del tracto gastrointestinal, también tiene la capacidad patógena de causar importantes enfermedades diarreicas y extraintestinales (Rodríguez, 2002). Las cepas patógenas de *E. coli* son responsables de una variedad de infecciones graves como meningitis, colitis hemorrágica, infecciones del tracto urinario, síndrome urémico hemolítico, diarrea infantil, diarrea sanguinolenta, entre otras (Sub *et al*., 2020).

Las variantes patogénicas de *E. coli* (patotipos) causan elevadas cifras de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. En consecuencia, los patotipos de *E. coli* se estudian ampliamente en humanos, animales, alimentos y el medio ambiente (Croxen *et al*., 2013). Se han descrito patotipos que causan enfermedades en humanos, que incluyen patotipos intestinales y patotipos extraintestinales comúnmente denominadas *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC). Las ExPEC incluyen *E. coli uropatógena* (UPEC) y *E. coli asociada a meningitis* (NMEC) (Liu *et al*., 2020). Los patotipos intestinales se identifica mediante marcadores moleculares los cuales codifican para factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad; estos son, *E. coli enteropatógena* (EPEC), *E. coli enterotoxigénica* (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* shigatoxigénica ó enterohemorrágica (STEC, EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* adherente difusa (ADEC) (Farfán *et al*., 2016). Además, recientemente se ha definido un nuevo patotipo de cepas de cepas de *E. coli* que se adhieren e invaden las células epiteliales intestinales, sobreviven y se replican en macrófagos y algunas de ellas forman biopelícula definiéndola como *E. coli* adherente invasiva (AIEC) (Meconi *et* al., 2007).

1.3 *Escherichia coli* adherente invasiva (AIEC)

El patotipo adherente invasivo de *Escherichia coli* (AIEC) se describió en 1999 cuando se descubrió en asociación con la EC. Se describe que las cepas de AIEC están altamente asociadas con pacientes con EII, ya que se sospecha que inducen inflamación crónica en el hospedero al proliferar y alterar la microbiota del intestino. Muchos estudios sugieren que AIEC puede contribuir o no a la aparición de la EII; sin embargo, también se ha informado la presencia de AIEC en individuos sanos (Barrios *et al.,* 2018; Abdelhalim *et al*., 2020). Debido a esto, hay varios grupos de investigación enfocados a determinar esta relación de AIEC con EII y recientemente se publicó un estudio *in vitro* donde realizaron fenotipado y utilizaron un modelo murino de inflamación intestinal para comparar sistemáticamente cepas identificadas como AIEC con aquellas identificadas como no AIEC y relacionaron los fenotipos AIEC con la patogenicidad. Las cepas identificadas como AIEC provocaron, en promedio, una inflamación intestinal más grave. Los fenotipos de supervivencia/replicación intracelular en macrófagos utilizados habitualmente para clasificar la AIEC se correlacionaban positivamente con la enfermedad, mientras que la adherencia a las células epiteliales y la producción del factor de necrosis tumoral alfa por parte de los macrófagos no lo hacían. Luego, este conocimiento se aplicó para diseñar y probar una estrategia para prevenir la inflamación mediante la selección de cepas de *E. coli* que se adhirieron a las células epiteliales pero que sobrevivieron o se replicaron intracelularmente de manera deficiente. En resumen, estos resultados muestran una relación entre la supervivencia/replicación intracelular en *E. coli* y la patología en la colitis murina, lo que sugiere que las cepas que poseen estos fenotipos podrían no solo enriquecerse en la EII humana sino también contribuir a la enfermedad. Este estudio proporciona nueva evidencia de que fenotipos de AIEC específicos son patológicamente relevantes y una prueba de que dicha información mecanicista puede explotarse terapéuticamente para aliviar la inflamación intestinal (Kittana *et al*., 2023).

AIEC se considera un patobionte porque su proliferación en intestino puede promover enfermedades inflamatorias debido a la evolución adaptativa de su

genoma en un hospedero específico y susceptible. A diferencia de los patógenos oportunistas, la influencia de los patobiontes en el hospedero se produce indirectamente mediante el sistema inmunológico, al estimular la respuesta pro-inflamatoria Th1 y Th17 (Nadalian *et al*., 2020).

Este patotipo se ha aislado de diferentes poblaciones, incluidos adultos y niños, individuos sanos, pacientes con EII o cáncer colorrectal y animales de compañía, sugiriendo que el patotipo AIEC está asociado más a una enfermedad que a un hospedero específico (Palmela *et al.,* 2017).

Las cepas de AIEC aisladas hasta la fecha son diversas y pertenecen a distintos filogrupos. Si bien la mayoría de estas cepas se encuentran principalmente en el filogrupo B2, también se han encontrado cepas de AIEC pertenecientes a los filogrupos A, B1, D y F (Camprubí *et* al., 2020). Por lo cual AIEC comparte factores de virulencia similares con las cepas de ExPEC, pero carecen de la mayoría de los factores de virulencia que se encuentran en las cepas de *E. coli* patógenas intestinales (Abdelhalim *et al*., 2020).

Aunque los enfoques moleculares y la secuenciación genómica han identificado genes asociados con la adherencia e invasión a células epiteliales intestinales (IEC) y la replicación en macrófagos, aún no se ha identificado un marcador molecular exclusivo del patotipo, la única forma de identificar una cepa es evaluando su fenotipo de adherencia, invasión, sobrevida en macrófagos y formación de biopelícula (Camprubí *et al*., 2020).

AIEC se caracteriza funcionalmente por su capacidad de adherirse a las IEC e invadirlas, de translocarse a través de las células M que recubren las placas de Peyer (PP), de formar biopelículas, sobrevivir, replicarse dentro de los macrófagos y por desencadenar una respuesta proinflamatoria en las células (Farfan *et al.,* 2016, Larabi *et al*., 2020).

Durante la inflamación intestinal, la barrera de la mucosa se rompe y los receptores específicos en el epitelio se expresan de manera anormal (Dreux *et al,* 2015). Además, las personas con EII a menudo tienen respuestas inmunitarias innatas y

adaptativas alteradas, con mutaciones en NOD2, NF-κB1 (factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa del factor nuclear de las células B activadas) y genes relacionados con las interleucinas (IL2, IL21, IL23R, etc.), lo que podría aumentar la inflamación facilitando aún más la adherencia e invasión por AIEC (Palmela *et al.,* 2017).

AIEC tiene la capacidad de adherirse e invadir las células epiteliales a través de los pili tipo 1 ó fimH uniéndose al receptor de la molécula de adhesión celular 6 relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM6), que esta aumentado en individuos con EII, siendo que la sobreexpresión de CEACAM6 promueve la colonización de estas cepas (Yang, 2014; Baldelli *et al*., 2021).

Al igual se ha demostrado que la quitinasa 3 similar a 1 (CHI3L1), desempeñan un papel fundamental en la facilitación de la infección por AIEC. La expresión de CHI3L1 en el intestino no es muy común en hospederos sanos, sin embargo, se ha informado que se regula durante la inflamación favoreciendo la colonización en la mucosa (Low *et al.,* 2013).

Por otra parte, la proteína OMPA presente en la OMVS (vesículas de la membrana externa) secretadas por AIEC, tienen la capacidad de interactuar con el factor de respuesta al estrés del retículo endoplásmico Gp96 y, en asociación con la flagelina que se dirige a TLR5, induciendo una respuesta inflamatoria de IL-8 epitelial y promueven la internalización en la mucosa intestinal (Farfán *et al.,* 2016).

Las células M presentes en las placas de Peyer también participan en la translocación de AIEC por medio del pili FimH y fimbrias polares largas. Esta translocación puede promover la supervivencia y la proliferación dentro del macrófago (Abdelhalima *et al.,* 2020).

La capacidad que tiene AIEC para sobrevivir y replicarse dentro de macrófagos, es una característica distintiva que tienen estas bacterias. La supervivencia y replicación de AIEC en macrófagos es promovida por la proteína de estrés HtrA, la tiol-disulfuro oxidorreductasa DsbA, la proteína de unión al ARN Hfq y la oxidoreductasa IbeA dependiente de FAD que juegan un papel en la supervivencia

de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Palmela *et al.,* 2017). Además, la infección por AIEC estimula la expresión de TNF-α en los macrófagos, promoviendo el crecimiento bacteriano dentro de los mismos (Yang, 2014).

Es muy probable que los patovares intestinales de *E. coli* penetren en la capa de la mucosa al promover la degradación de la mucina con proteasas como VATAIEC, que es una proteasa recientemente descrita secretada por AIEC, contribuye a la colonización intestinal en un modelo murino al mejorar la propagación de bacterias a través de la capa mucosa y la adhesión a IEC (Miquel *et* al., 2010; Sevrina *et al*., 2020).

Un artículo de McPhee *et al*., 2014 reporta que en la cepa AIEC NRG857c aislada de un paciente con EC, se identificaron dos genes implicados en la resistencia a péptidos intestinales antibacterianos. Observaron que el plásmido transportado por esta cepa de AIEC específicamente (pO83) comprende una isla genómica que contiene dos genes involucrados en la resistencia a péptidos antimicrobianos catiónicos: *arlA* y *arlC*. El gen *arlA*, codifica una proteína de la familia Mig-14 implicada en la resistencia a la defensina, y *arlC*, que codifica para una proteasa de membrana externa de la familia OmpT (Figura 2) (Palmela *et al.,* 2017).

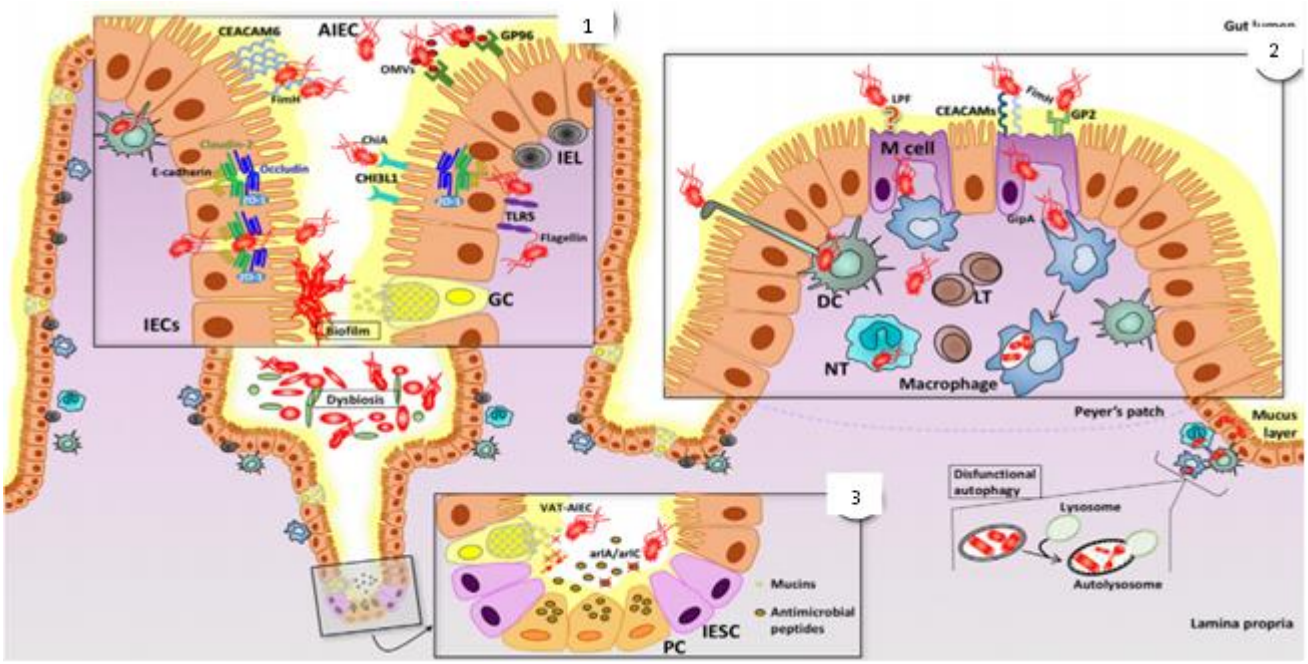


Figura 20. Interacción de *Escherichia coli* adherente-invasiva (AIEC) con la mucosa intestinal en el contexto de la EII.(1) AIEC se adhiere a las células epiteliales intestinales (IEC) y conduce a la colonización de la mucosa intestinal; (2) AIEC ingresa a la lámina propia y las placas de Peyer a través de las células M e interactúa con las células inmunes; (3) AIEC cruza la capa mucosa y resiste a los péptidos antimicrobianos (modificado de Palmela *et al.,* 2017).

1.4 Resistencia antimicrobiana

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se define como la capacidad de los microorganismos para sobrevivir y ser viables bajo la influencia de agentes antimicrobianos (Abushaheena et al., 2020).

Recordando que para tratar la EII se emplean terapias de mantenimiento con antibióticos, a largo plazo se puede promover resistencia a las bacterias y reducir las opciones terapéuticas (Kothary *et al*., 2013). Los estudios realizados hasta el momento respecto a la resistencia de AIEC aislada de pacientes con EII, muestran que es frecuente la resistencia a los antimicrobianos de primera elección, sobre todo hacia los betalactámicos (Dogan *et al.,*2013; Martinez *et al*., 2020).

Existen varios mecanismos de resistencia a antibióticos que pueden desarrollar las diferentes cepas de *E. coli,* los cuales involucran la modificación en el sitio blanco,

alteraciones de la permeabilidad, bombas de eflujo e inactivación enzimática (Navarro *et al.,* 2011).

El mecanismo de inactivación enzimática se refiere a la producción de enzimas que inactivan al antibiótico mediante hidrolisis, acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones. Este mecanismo de resistencia es el más común contra antibióticos betalactámicos entre las enterobacterias, ya que producen β-lactamasas, enzimas que hidrolizan el anillo β-lactámico (enlace amida) (Tooke *et al.,* 2019). Las β-lactamasas se clasifican en cuatro grupos funcionales basados en sus sustratos e inhibidores y de acuerdo con su clase molecular, las cuales se dividen de la A a la D (Bush y Jacoby 2010).

Se ha llegado a encontrar numerosos genes que confieren resistencia a los β-lactámicos en cepas de *E. coli* de origen humano. Algunos de ellos, como bla_{TEM-1} codifican solo para β-lactamasas de espectro estrecho que pueden inactivar penicilinas y aminopenicilinas. Sin embargo, en los últimos años, han surgido genes que codifican β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y β-lactamasas de clase C (*AmpC*) (Poirel *et al*., 2018). Además, con frecuencia *E. coli* suele ser MDR, ya que presenta resistencia hacia otros grupos de antibióticos mediante diferentes mecanismos que son codificados en genes portados en elementos genéticos móviles (Wei *et al.,* 2020).

Los elementos genéticos móviles (MGE, por sus siglas en ingles), como transposones, integrones y plásmidos, proveen plataformas genéticas que permiten el mantenimiento y diseminación de genes de resistencia a antibióticos (Khan *et al.,* 2018). Los plásmidos son los principales responsables de la diseminación de enzimas responsables para la resistencia ante la acción de antibióticos como los β-lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas, trimetoprim, cloranfenicol, tetraciclinas y macrólidos (Balbuena *et al.,* 2022). Esta diseminación se puede dar entre las bacterias ya que estos pueden ser transferidos entre diferentes cepas, especies e incluso géneros bacterianos (Carattoli *et al.*, 2005).

1.5 Características de los plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN circular covalentemente cerrado y superenrollado, que se mantienen independientes del cromosoma bacteriano gracias a su capacidad auto-replicativa. Existe en varias formas topológicas de los plásmidos, como superenrollada, lineal y circular abierta (Lara *et al.,* 2004; Wang *et al.,* 2022).

Los plásmidos consisten en cuatro módulos importantes, tres de ellos forman el esqueleto plasmídico también conocido como la región conservada, el cual se encuentra compuesto por los módulos de replicación, movilidad y estabilidad y el cuarto módulo que está conformado por elementos accesorios que corresponde a la región variable del plásmido en el cual pueden encontrarse genes de resistencia, virulencia o para la producción de compuestos tóxicos, lo cual le confiere a la bacteria características benéficas dentro de un ambiente específico (Figura 3) (Norman *et al.,* 2009; Brovedan *et al.,* 2020).

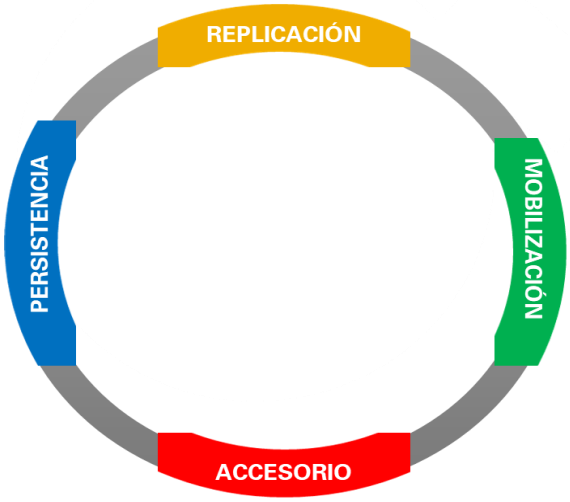


Figura 21. Descripción general de la organización de un plásmido. Modificado de Norman *et al*., 2009

La necesidad de poder clasificar a los plásmidos es de gran importancia y los criterios usados para ello pueden ser el tamaño, el número de copias, el tipo de genes contenidos, el grupo de incompatibilidad (mediante tipificación del replicón basada en PCR o PBRT) o el tipo de relaxasa que determina su movilidad (mediante tipificación de relaxasa MOB con primers degenerados o DPMT) (Cantón *et al.,* 2012).

Se dice que, si dos plásmidos son incapaces de coexistir en la misma bacteria, pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad (D´Andrea *et al.,* 2013). Los

plásmidos relacionados con resistencia antimicrobiana se dividen en dos grupos, a) de estrecho rango de hospedero (incluye a los plásmido con grupo de incompatibilidad IncF y relaxasas de la familia MOB-F [particularmente de la subfamilia F12]); y b) de amplio rango de hospedero (incluyendo los plásmidos con grupo de incompatibilidad IncA/C, IncL/M e IncN y relaxasas de las familias MOB-F [particularmente de la subfamilia F-11], MOB-P [particularmente de la subfamilia P-13] y MOB-H [particularmente de la subfamilia H-121]) (Carattoli *et al.,* 2014).

Además, los plásmidos persisten en las bacterias por la presencia de Sistemas de Adicción Plasmídico (SAP) (Carattoli, 2013). Estos sistemas se describen en dos grupos: de partición, donde las células hijas heredan el plásmido durante la división celular; y toxina-antitoxina, que consiste en la producción de una toxina estable y una antitoxina inestable; esta última, neutraliza la acción de la toxina o impide la síntesis de la toxina (Mnif *et al.,* 2010).

2. ANTECEDENTES

Las Enfermedades Inflamatorias del tracto intestinal son un problema de salud en todo el mundo. En los últimos años diversos estudios han sospechado la participación de agentes infecciosos involucrados en la patogenia de la EII, entre estos se ha llegado a encontrar a AIEC.

Darfeuille y cols., en 1998, en Francia, describen por primera vez cepas de *E. coli* aisladas de la mucosa ileal de pacientes con EC; las cuales se adhieren a células Caco-2 presentes en células intestinales. Además, observaron que todas las cepas de *E. coli* pertenecen a la microbiota y sintetizan pili tipo 1 que les confiere la capacidad adhesiva a las células, por lo cual sugieren que podrían participar en el proceso inflamatorio del intestino (Darfeuille *et al.,* 1998)

Posteriormente en 1999, Boudeau y cols., compararon la capacidad de invasión de una cepa aislada de biopsia ileal de un paciente con EC (cepa LF82) con otros patotipos de *E. coli* involucrados en infecciones del tracto gastrointestinal como *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* adherencia difusa (DAEC), demostrando que la cepa tiene capacidad de invasión superior a los otros patotipos; sin embargo, no se puede clasificar en ninguno de los grupos de *E. coli* patógenos descritos por lo cual sugirieron la existencia de un nuevo grupo potencialmente patógeno denominándolo *E. coli* adherente-invasiva (AIEC) (Boudeau *et al*.,1999).

En el 2007, Rolhion y cols., observaron que las cepas de AIEC son predominantes en lesiones ileales tempranas como crónicas, además, colonizan la mucosa intestinal adhiriéndose e invadiendo a las células epiteliales intestinales (IEC). AIEC también sobrevive y se replican ampliamente dentro de los macrófagos sin inducir la muerte de la célula hospedera. Asimismo, por su adherencia, invasión y sobrevivencia en macrófagos caracterizan la primera cepa de AIEC denominándola LF82 (Rolhion *et al.,* 2007).

Un año después, en Estados Unidos, Eaves y cols., examinaron varias cepas de *E. coli* (designadas LF82, O83:H1, 6604 y 6655) aisladas de pacientes con EC por su capacidad de producir inflamación en las células intestinales. Los resultados mostraron que cada cepa tenía capacidad variable de adherencia e invadisión IEC. Por otro lado, se caracterizó la segunda cepa de AIEC denominándolo como O83: H1 la cual no comparten determinantes genéticos con la primera cepa y contiene un plásmido con un tamaño de 147,060 pb (Eaves *et al*., 2008).

McPhee y cols., en el 2014, identificaron una isla genómica codificada por plásmido (pO83) en la cepa AIEC NRG857c que confiere un alto nivel de resistencia a los péptidos catiónicos α-helicoidales y las defensinas α y β. Este fenotipo se debe a dos genes, *arlA* que codifica una proteína de la familia Mig-14 implicada en la resistencia a las defensinas, y *arlC* una proteasa de membrana externa de la familia OmpT (Figura 4), sugiriendo un mecanismo de AIEC que permite la colonización crónica del hospedero (McPhee *et al.,* 2014).

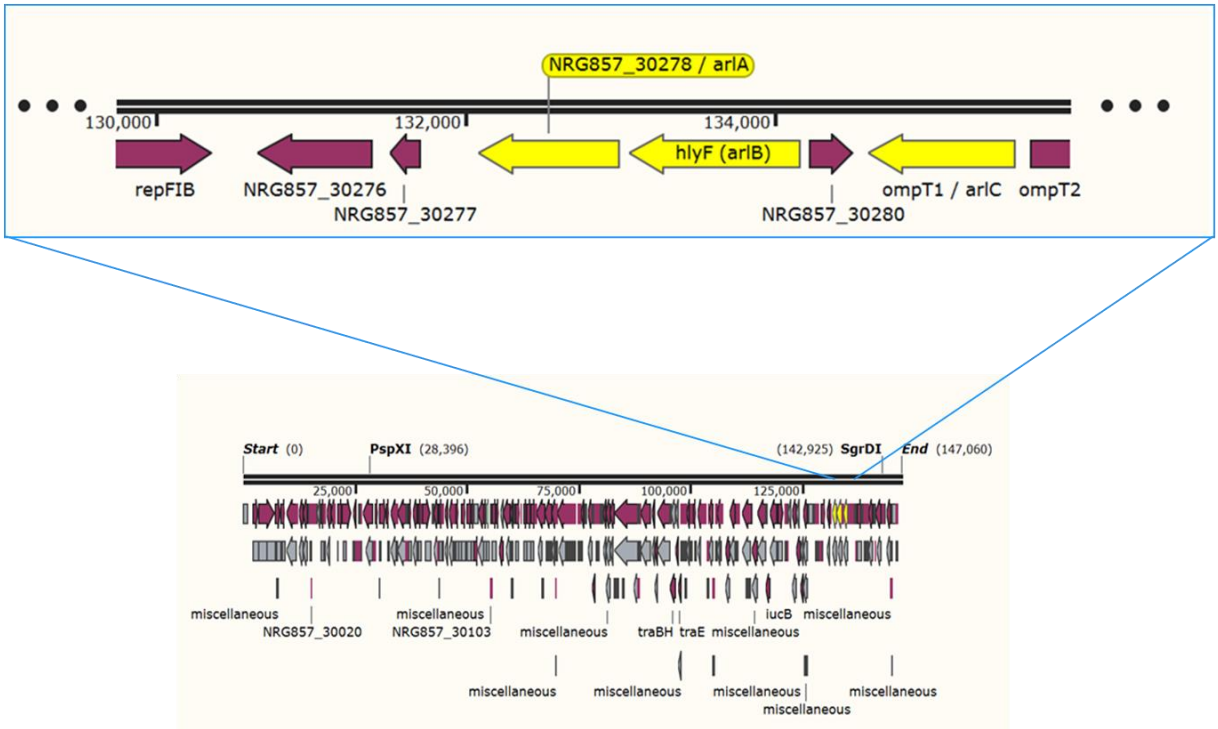


Figura 22. Estructura del plásmido pO83 de la cepa NRG857c (O83:H1) que contiene un operon con los genes *arlA, arlB* y *arlC*
(McPhee *et al.,* 2014).

Escasos informes han mostrado los perfiles de resistencia antimicrobiana (AMR) de AIEC. En España en el 2020, Martínez Medina y cols., examinaron el perfil de resistencia a los antimicrobianos en cepas AIEC, para identificar qué terapias podrían ser efectivas o conferir un riesgo para dichos pacientes. Se evaluaron 30 antimicrobianos de acuerdo con los estándares CLSI 2022. Se evaluaron cepas AIEC (n = 22) y cepas de *E. coli* no patógena (no AIEC) (n= 37) aisladas de la mucosa intestinal de 31 pacientes con EC y 18 pacientes clínicamente sanos, en el cual se observó que las cepas de AIEC presentan mayor resistencia a β- lactámicos (Martínez *et al*., 2020).

Los estudios en México sobre AIEC, son dos realizados en Puebla, en el 2018, por Barrios y colaboradores, donde se reportaron las primeras cepas asociada a AIEC en México en personas clínicamente sanas; estas fueron aisladas de heces de donantes sanos de los cuales se aislaron cuatro cepas y una de líquido peritoneal (LP) neonatal, con capacidad adherente/invasiva y supervivencia en macrófagos (Barrios *et al*., 2018). Posteriormente en el 2020, el mismo equipo de trabajo de Puebla, reporta que secuenciaron y compararon los genomas de las cinco cepas AIEC (aisladas de individuos sin EII y de LP neonatal) con cepas prototipo de AIEC (LF82 y NRG857c) y con una cepa uropatógena (UPEC CFT073), confirmando la presencia de varios genes de virulencia como *fim*A, *fli*C, *fuh*D, *chu*A, *irp*2 y *cva*C, reportados en cepas AIEC de otros países (Barrios *et al*., 2020).

En el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC) del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM), Lara Flores y col., en 2018, aisló e identificó 66 cepas de *E. coli* a partir de biopsias de 3 pacientes con EII, cuyo diagnostico fue:

Pacientes 1: masculino de 23 años diagnosticado con CUCI, con un tratamiento previo de Trimetoprim/Sulfametoxazol; paciente 2: femenino de 61 años diagnosticado con Colitis crónica y Diverticulitis, con un tratamiento previo de Ciprofloxacino y Rifaximina; y paciente 3: masculino de 34 años diagnosticado con CUCI, llevan un tratamiento previo con Metronidazol, Ciprofloxacino y Ceftriaxona. Estas cepas se encuentran conservadas en el cepario del LMHyC.

Las biopsias tienen orígenes distintos: colon descendente y transverso de donde se aislaron 37 cepas de *E. coli*; sigmoides en donde se aislaron 22 cepas y colon descendente y ano de donde se obtuvieron 7 cepas. Las cepas de *E. coli* provenientes de los enfermos de CUCI presentaron una concentración mínima inhibitoria para Rifaximina $\leq$32ug/ml (antibiótico de uso común en estas afectaciones); sin embargo, todas las cepas (n=22) provenientes de Colitis Crónica y Diverticulitis tuvieron crecimiento con una CMI $\geq$512ug/ml, es decir todas fueron resistentes, este dato es importante ya que el tratamiento inicial para pacientes con EII es la rifaximina. A 26 cepas se les realizo ensayos preliminares de adherencia en células HeLa, donde el 77.3% de las cepas de *E. coli* fueron adherentes, lo cual sugiere la presencia de AIEC en estas cepas.

3. JUSTIFICACIÓN

Aunque *E. coli* es considerada una bacteria inocua del tracto digestivo, hay ciertos patotipos que llegan a causar padecimientos crónicos. Dentro de esos patotipos está AIEC, un patotipo nuevo, que se asocia a la EII, una serie de enfermedades crónicas del tracto digestivo.

A pesar de que el viruloma y en menor grado el resistoma se ha caracterizado en los últimos años en AIEC, los mecanismos de transferencia genética horizontal asociados a genes de resistencia permanecen poco claros. En este sentido, la transferencia horizontal de genes mediada por plásmidos es uno de los principales mecanismos de diseminación de la resistencia antimicrobiana. En el patotipo AIEC, aún no existen reportes que indiquen la presencia de plásmidos acarreadores de genes de resistencia.

Por lo que el presente trabajo pretende aportar nueva información relacionada a esta problemática a través de la caracterización parcial de plásmidos de cepas de *E. coli* provenientes de biopsias intestinales de pacientes con EII.

4. OBJETIVOS

4.1 General: Estudiar la caracterización parcialmente los plásmidos de cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

4.2 Específicos:

I. Caracterizar el perfil de susceptibilidad a antibióticos de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

II. Analizar el perfil fenotípico de la presencia de serín β-lactamasas y metalo β-lactamasas de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

III. Determinar el genotipo de resistencia de las cepas, de acuerdo con los resultados de los objetivos 1 y 2.

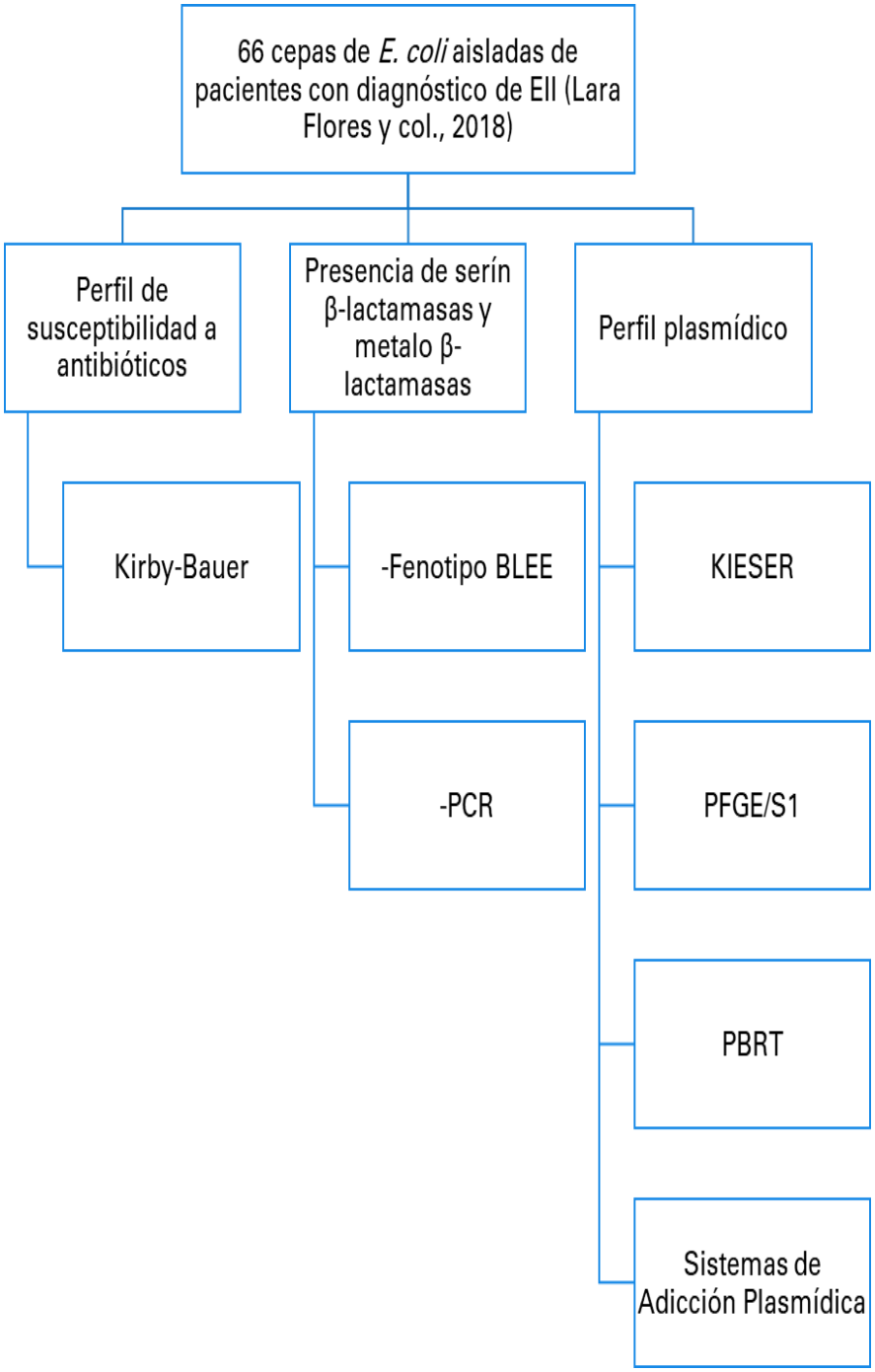
IV. Determinar y caracterizar parcialmente los plásmidos (perfil plasmídico, replicón y sistema de adicción) de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

V. Analizar la presencia de genes asociados a la resistencia a antibióticos en 30 genomas de AIEC depositados en el GenBank.

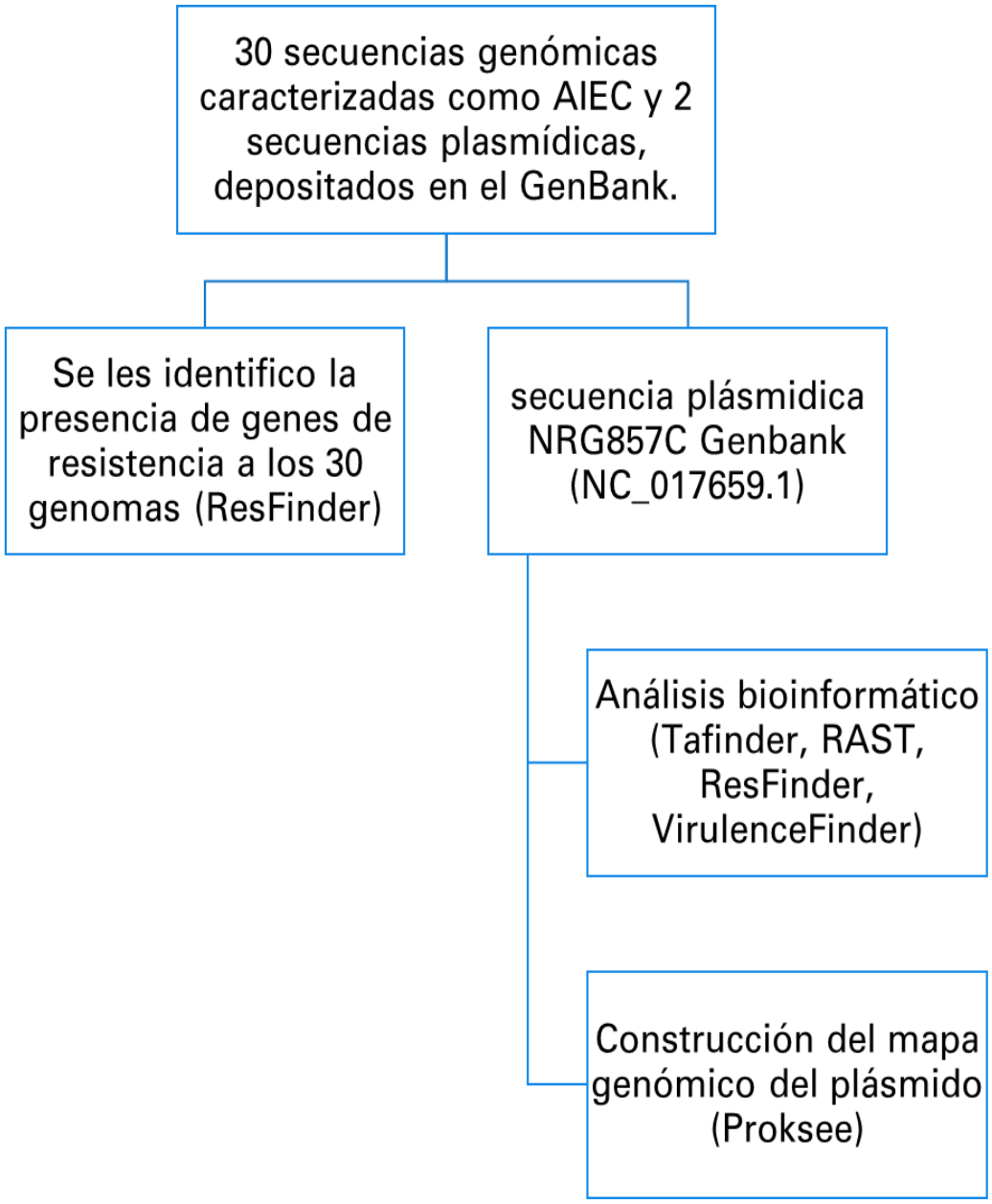
VI. Realizar la construcción del mapa genómico del plásmido pO83 de la cepa de AIEC NRG857C asociada con la EC.

5. ESQUEMA DE TRABAJO

5.1 Estrategia *in vitro*



5.2 Estrategia *in silico*



6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Material biológico

Se trabajaron con 66 cepas de *E. coli* aisladas, en un estudio previo, de 3 pacientes adultos de consulta externa privada del estado de Puebla diagnosticados con CUCI, Colitis Crónica y Diverticulitis respectivamente.

Dos pacientes fueron masculinos con CUCI y una paciente femenina con Colitis Crónica y Diverticulitis. Las cepas fueron aisladas de biopsias, las cuales tienen orígenes distintos: colon descendente y transverso de donde se aislaron 37 cepas de *E. coli* (paciente 1); sigmoides en donde se aislaron 22 cepas (paciente 2) y colon descendente y ano de donde se obtuvieron 7 cepas (paciente 3). A 26 cepas se les realizo ensayos preliminares de adherencia en células HeLa, donde el 77.3% de las cepas de *E. coli* fueron adherentes, lo cual sugiere la presencia de AIEC en estas cepas.

6.2 Determinación del perfil de resistencia

Para determinar el perfil de resistencia se ensayaron 17 antibióticos pertenecientes a diferentes familias (Tabla 1) (CLSI, 2022). Se realizó mediante el método Kirby-Baüer, y la técnica de difusión con doble disco.

6.2.1 Susceptibilidad antimicrobiana

De un cultivo de 24 horas en agar tripticaseína de soya (TSA, MCD LAB, S.A. de C.V.), se seleccionaron de 1 a 3 colonias aisladas, las cuales se re-suspendieron en 5 ml de solución salina isotónica (SSI) estéril al 0.85% (masa/volumen) de NaCl, posteriormente se ajustó la turbidez al tubo 0.5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL). De esta suspensión bacteriana se impregno un hisopo de algodón estéril y se inocularon placas de agar Müeller Hinton (BD Bioxon®), empezando de la parte superior de la placa deslizando el hisopo sobre la superficie del agar tres veces,

rotando la placa unos 45° cada vez y pasándolo por último sobre la periferia del agar para conseguir un crecimiento uniforme.

Una vez inoculadas las placas con ayuda de una pinza estéril, se colocaron los discos de antimicrobianos (BBL™) y se incubaron las placas por 24 horas a 37°C. Finalmente se midieron los halos de inhibición y se compararon los resultados de acuerdo con los valores establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2022) (Tabla 1), con los cuales se determinó si las cepas eran sensibles (S), intermedias (I) o resistentes (R). Como cepa control se utilizó la *E. coli* ATCC 25922, que es sensible a todos los antibacterianos evaluados.

6.2.2 Detección fenotípica de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y Metalo- β-lactamasas

Para determinar la producción fenotípica de β-lactamasas de espectro extendido (BLEEs), se empleó 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 5.).

La aparición de un efecto sinérgico (prolongación del halo de inhibición) entre los antibióticos β-lactámicos y el disco central que contiene al inhibidor de β-lactamasas (Acido Clavulánico) será considerado como resultado positivo de producción de BLEE.

En el caso de la detección de Metalo- β-lactamasas la prueba consistió en hacer una suspensión 0.5 McFarland a partir de un cultivo puro e inocular una placa de agar MH en forma masiva, posteriormente se colocó un disco con 10 µL de EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético 0.5M, pH:8.0) se colocó a una distancia equidistante (≈1.5cm) un disco de IPM (Imipenem 10µg) y de MEM (Meropenem 10µg). La prueba se tomó como positiva si se observaba un efecto de sinergismo alrededor de los discos (Meletis, 2014).

Tabla 1. Antimicrobianos y valores de corte utilizados en el ensayo de susceptibilidad

Grupo o familia	Antimicrobiano	Concentración (µg)	Halo de inhibición (mm) y criterios de interpretación[a]		
			S	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
Tetraciclinas	Tetraciclina (TET)	30	≥15	12-14	≤11
Inhibidores de la vía folato	Trimetoprin con Sulfametoxazol (TMP/SXT)	1.25/23.75	≥16	11-15	≤10
Fenicoles	Cloranfenicol (CLO)	30	≥18	13-17	≤12

a: Los puntos de corte se interpretaron de acuerdo con el CLSI, versión 2022.
S: Sensible; I: Intermedio; R: Resistente

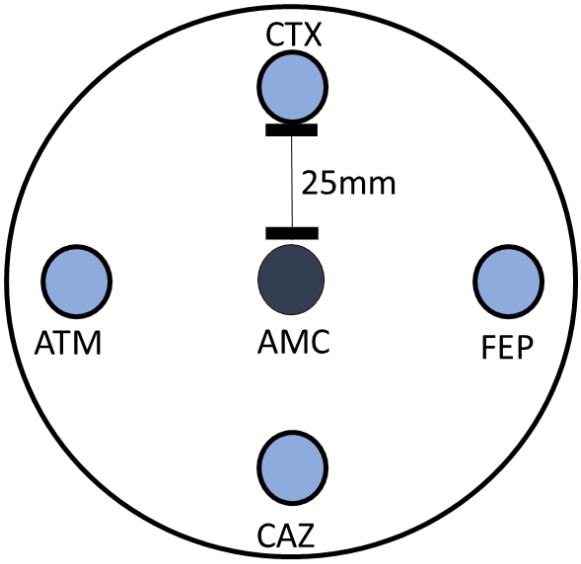


Figura 23. Posición de discos para determinar la producción fenotípica de BLEEs.

6.3 Obtención de ADN bacteriano

Con la finalidad de caracterizar los mecanismos de resistencia se obtuvo el ADN para lo cual se realizó la siguiente metodología:

6.3.1 Extracción del templado de ADN total

Para la extracción del templado de ADN se utilizó el método de hervido. A partir de un cultivo bacteriano puro incubado durante 18 h en medio TSA, se recolecto una asada bacteriana y se resuspendió en 500 µl de agua inyectable estéril, se homogenizo con ayuda del vórtex. Posteriormente se colocó el tubo en baño María a una temperatura de ebullición durante 15 min para lisar las células. Una vez transcurrido el tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min para separar los restos celulares del material genético. Finalmente se recuperó el sobrenadante en nuevos tubos Eppendorf estériles y fue conservado en congelación a -20°C.

6.4 Cuantificación de ADN

La concentración del ADN se midió y fue ajustada a 100 ng/µl en el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific®) con la lectura a *280* nm para determinar la concentración de ADN de doble cadena.

6.5 Identificación del genotipo de resistencia

Con base en los resultados obtenidos del perfil de resistencia, se realizó una selección de oligonucleótidos específicos para amplificar los genes determinantes de resistencia mediante la técnica de PCR (Tabla 2).

Los genes que se buscaron para los aislados que mostraron fenotipo BLEE positivo fueron *bla$_{TEM}$, bla$_{SHV}$, bla$_{OXA}$* y *bla$_{CTX-M}$*, así como los diferentes grupos de esta última: *bla$_{CTX-M\ G1}$, bla$_{CTX-M\ G}$* y *bla$_{CTX-M-15}$*. Se utilizaron diferentes controles positivos mencionados en la Tabla 2. A las *E. coli* resistentes a cefoxitina (FOX) se les determino la presencia de gen *bla$_{CMY2}$* mediante PCR.

Para los demás grupos de antibióticos se buscaron los siguientes genes: quinolonas: *aac(6')-Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, *oqxA* y *oqxB*; sulfonamidas: *sul-1*, *sul-3*; tetraciclina: *tet*(A), *tet*(B), trimetoprim: *drfA*, *drfB* y cloranfenicol: *cmlA*; de igual manera se utilizó controles positivos por cada gen y están descritos en la tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos y condiciones de reacción utilizados en la amplificación de genes de resistencia

Oligonucleótidos (Secuencia 5' - 3')	Condiciones de amplificación			Control positivo	Referencia (tamaño)
***bla*$_{CTX-M}$** CTXM-UNI-F: CGATGTGCAGTACCAGTAA CTXM-UNI-R: TTAGTGACCAGAATCAGCGG	94ºC 94ºC 52ºC 72ºC 72ºC	5 min. 30 seg. 30 seg. 1 min. 5 min.	1 ciclo 35 ciclos 1 ciclo	C1550	Batchelor *et al*., 2005 (566 pb)
***bla*$_{CTX-M}$ grupo 1** CTX-M13U: GGTTAAAAAATCACTGCGYC CTX-M13D: TTGGTGACGATTTTAGCCGC	94ºC 94ºC 50ºC 68ºC 68ºC	7 min. 50 seg. 40 seg. 1 min. 5 min.	1 ciclo 35 ciclos 1 ciclo	NA	Briñas *et al*., 2005 (843 pb)
***bla*$_{CTX-M}$ grupo 9**	94ºC 94ºC	3 min. 45 seg.	1 ciclo	NA	Coque *et al*.,

CTX-M-9-F: GTGACAAAGAGAGTGCAACGG CTX-M-9-R: ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	62ºC 45 seg. 35 ciclos 72ºC 45 seg. 72ºC 10 min. 1 ciclo		2002 (857 pb)
***bla*$_{TEM}$** TEM-F: ATTCTTGAAGACGAAAGGGC TEM-R: ACGCTCAGTGGAACGAAAAC	94ºC 3 min. 1 ciclo 94ºC 1 min. 60ºC 1 min. 30 ciclos 72ºC 1 min. 72ºC 5 min. 1 ciclo	C1550	Belaaouaj *et al*., 1994 (1029 pb)
***bla*$_{SHV}$** SHV-F: CACTCAAGGATGTATTGTG SHV-R: TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	96ºC 15 seg. 1 ciclo 96ºC 15 seg. 52ºC 15 seg. 24 ciclos 72ºC 2 min. 72ºC 3 min. 1 ciclo	ATCC700603	Pitout *et al*., 1998 (883 pb)
***bla*$_{OXA-1}$** OXA-1: CCAAAGACGTGGATG OXA-2: GTTAAATTCGACCCCAAGTT	96ºC 5 min. 1 ciclo 96ºC 1 min. 61ºC 1 min. 35 ciclos 72ºC 2 min. 72ºC 10 min. 1 ciclo	A23EC	Briñas et al., 2003 (442 pb)
***bla*$_{CMY-2}$** CMY-2F: GCCGTTATCTACCAGGGAAAA CMY-2R: TTTTCAAGAATGCGCCAG	95ºC 5 min. 1 ciclo 95ºC 1 min. 63ºC 30 seg. 35 ciclos 72ºC 1 min. 72ºC 5 min. 1 ciclo	C7201	Ayala-Nuñez 2017 (986 pb)
qnrA QnrAm-F: AGAGGATTTCTCACGCCAGG QnrAm-R: TGCCAGGCACAGATCTTGAC	95ºC 10 min. 1 ciclo 95ºC 45 seg. 58ºC 45 seg. 25 ciclos 72ºC 15 seg. 72ºC 3 min. 1 ciclo	C7219	Kraychete *et al*., 2016 (579 pb)
qnrB QnrB-F: GGMATHGAAATTCGCCACTG QnrB-R: TTTGCYGYYCGCCAGTCGAA	95ºC 5 min. 1 ciclo 95ºC 1 min. 56ºC 1 min. 35 ciclos 72ºC 1 min. 72ºC 7 min. 1 ciclo	C3305	Cattoir *et al*., 2008 (263 pb)
qnrS QnrSm-F: GCAAGTTCATTGAACAGGGT QnrSm-R: TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	95ºC 5 min. 1 ciclo 95ºC 1 min. 55ºC 1 min. 30 ciclos 72ºC 30 seg. 72ºC 5 min. 1 ciclo	NA	Cattoir *et al*., 2008 (427 pb)
aac(6')-Ib aac(6')-Ib-F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA aac(6')-Ib-R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	94ºC 5 min. 1 ciclo 94ºC 45 seg. 60ºC 45 seg. 20 ciclos 72ºC 45 seg. 72ºC 5 min. 1 ciclo	A23EC	Park *et al*., 2006 (482 pb)
qepA QepA-Fnew: GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG QepA-R: CAACTGCTTGAGCCCGTAG	94ºC 5 min. 1 ciclo 94ºC 45 seg. 57ºC 45 seg. 35 ciclos 72ºC 45 seg. 72ºC 5 min. 1 ciclo	C1550	Chirani *et al*., 2017 (131pb)

oqxA OqxA-F: CTCGGCGCGATGATGCT OqxA-R: CCACTCTTCACGGGAGACGA	94ºC 4 min. 1 ciclo 95ºC 30 seg. 58ºC 45 seg. 30 ciclos 72ºC 50 seg. 72ºC 3 min. 1 ciclo	*K. pneumoniae*	Kim *et al*., 2009 (601 pb)
oqxB OqxB-F: TTCTCCCCCGGCGGGAAGTAC OqxB-R: CTCGGCCATTTTGGCGCGTA	94ºC 5 min. 1 ciclo 94ºC 45 seg. 64ºC 45 seg. 32 ciclos 72ºC 1 min. 72ºC 7 min. 1 ciclo	C7222	Kim *et al*., 2009 (512 pb)
dfrA1/5/14 *dfrA1/5/14-F:* GARCAGCTMCTBTTTAAAGC *dfrA1/5/14-R:* TTAACCCTTTTKCCARATTTG	95ºC 5 min. 1 ciclo 95ºC 1 min. 52ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 30 seg. 72ºC 5 min. 1 ciclo	A65EC	Eder, 2019 (393 pb)
dfrA7/17 dfrA7/17-F: TCAGAAAATGGCGTAATCGG dfrA7/17-R: TCAACGTGAACAGTAGACAA	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 1 min. 57°C 30 seg 30 ciclos 72°C 30 seg. 72°C 10 min. 1 ciclo	A134-1EC	Eder, 2019 (335 pb)
dfrA8/12 dfrA8/12-F: ATGGGGCGMAAGACCTWTG dfrA8/12-R: TGWATATCTCAGCKCCRCC	95°C 5 min. 1 ciclo 95°C 1 min. 58°C 1 min. 30 ciclos 72°C 30 seg. 72°C 5 min. 1 ciclo	A65EC	Eder, 2019 (205/184 pb)
dfrB dfrB-F: GATCGCGTRCGCAAGAARTC dfrB-R: GGATAAATYTGBACYGARCC	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 1 min. 56°C 1 min. 30 ciclos 72°C 30 seg. 72°C 10 min. 1 ciclo	NA	Eder, 2019 (128 pb)
Sul1 *Sul1-F:* TGGTGACGGTGTTCGGCATTC *Sul1-R:* GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG	94ºC 5 min. 1 ciclo 94ºC 30 seg. 63ºC 30 seg. 30 ciclos 72ºC 1 min. 72ºC 8 min. 1 ciclo	A65EC	Mazel et al., 2000 (789 pb)
Sul3 *sul-3-F:* GAGCAAGATTTTTGGAATCG *sul-3-R:* CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	94ºC 5 min. 1 ciclo 94ºC 1 min. 51ºC 1 min. 30 ciclos 72ºC 1 min. 72ºC 5 min. 1 ciclo	A6EC	Ruiz et al., 2012; Perreten and Boerlin, 2003 (990 pb)
tet(A) *tet(A)-F:* GTAATTCTGAGCACTGTCGC *tet(A)-R:* CTGCCTGGACAACATTGCTT	95ºC 5 min. 1 ciclo 95ºC 30 seg. 62ºC 30 seg. 23 ciclos 72ºC 45 seg. 72ºC 7 min. 1 ciclo	C7224	Guardabassi et al., 2000 (937 pb)
tet(B) *tet(B)-F:* TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG	94ºC 5 min. 1 ciclo 94ºC 30 seg. 52ºC 30 seg. 35 ciclos	C7200	Guardabassi *et al*., 2000 (659 pb)

tet(B)-R: GTAATGGGCCAATAACACCG	72ºC 1 min. 72ºC 5 min. 1 ciclo		
cmlA *cmlA-F:* TGTCATTTACGGCATACTCG *cmlA-R:* ATCAGGCATCCCATTCCCAT	94ºC 5 min. 1 ciclo 94ºC 1 min. 55ºC 1 min. 30 ciclos 72ºC 1 min. 72ºC 7 min. 1 ciclo	C3327	Sáenz *et al*., 2004 (455 pb)

NA: No aplica debido a que en el laboratorio no contamos con cepas control para estos genes.

Las reacciones de PCR se realizaron en los siguientes termocicladores: TRIO Thermocycler (Biometra) y T100 Thermal Cycle (Bio Rad).

En la tabla 3 se encuentran los componentes y cantidades empleadas en cada PCR, en la cual se utilizó un kit comercial, donde cada reacción se llevó a cabo a un volumen final de 10 µl por reacción.

Tabla 3. Componentes y cantidades utilizados en cada PCR para amplificar los genes de resistencia a antibióticos

Componente	Concentración de STOCK	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Tampón de reacción NH4 + MgCl2 (Bioline)	10 x	1 ul	1x
Oligonucleótido “forward” (Sigma)	25 uM	0.3 ul	0.75 uM
Oligonucleótido “reverse” (Sigma)	25 uM	0.3 ul	0.75 uM
dNTPs mix (Sigma Aldrich)	10 mM	0.4 ul	0.4 mM
BIOTAQTMDNA Polimerasa (Bioline)	5 U/ul	0.1 ul	0.5 U
Agua miliQ estéril	---	7.4 ul	---
DNA	100 ng/ul	0.5 ul	---
		10 ul	

6.6 Visualización de los productos de PCR

Para la visualización de los productos de PCR se realizó una electroforesis de ADN, en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando un buffer de TAE 1X a 90 Voltios durante 40-45 min junto con un marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific) para poder identificar el tamaño del fragmento amplificado, además de utilizar un buffer de carga para colocar las muestras en el gel. Posteriormente los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (BET) (Bio-Rad, 10 mg/ml) 0.5 g/L, durante 5-10 seg y se lavaron en agua destilada durante 1 hora. Finalmente, los geles se visualizaron y digitalizaron con ayuda de un fotodocumentador (Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro).

6.7 Identificación de la presencia de plásmidos por el método de Kieser

Esta técnica permite una extracción de DNA plasmídico partiendo de un cultivo bacteriano puro en medio agar soya tripticasa (TSA) de 18 a 24 horas por estriado. Posteriormente, una colonia pura se depositó en tubos con 5ml de LB (para 1000 ml [10 g de Triptona de Caseina,5 g de extracto de levadura, 10 g NaCl]) y se dejó crecer por 16 h a 37 °C con agitación a 200 rpm.

Una vez realizado lo anterior, se empastillaron 1500 µl en un tubo nuevo y se centrifugo a 13,000 rpm durante 5 min. Se decanto el LB procurando que la pastilla quedara con la menor cantidad de medio posible y se adicionaron 400 µl de solución 1 (ver anexo 1), estos se homogenizaron por vortex hasta resuspender la pastilla. Se adicionaron 100 µl de lisozima (10mg/ml) y se invirtió suavemente para mezclar. Esta mezcla, se dejó incubado a 4 °C durante 30 min.

Después de ese tiempo, se le adicionaron 250 µl de solución 2 (ver anexo 1), se mezcló e incubó por 30 min a 55 °C. Transcurrido los 30 min, se agregaron 80 µl de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) (Golden Bell) y se mezcló por vortex hasta que tomó una coloración blanca uniforme. Subsiguientemente se centrifugo a 13,000 rpm a 4°C durante 20 min y del sobrenadante se tomaron 450 µl, tomando con cuidado solo la parte superior.

A los 450 µl, se le adicionaron 300 µl de acetato de potasio (Meyer) al 3M e incubaron a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugo a 13,000 rpm durante 10 min., el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, a este se le agrego etanol absoluto (Golden Bell) al 100% frio, se mezcló y se incubo 2 min a -20°C. Posteriormente se centrifugo a 13,000 rpm durante 10 min., se decantó y se le agregaron 100 µl de etanol absoluto al 70%, el cual solo se agrega y se decanta todo. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 20 µl de agua y se conserva a -20°C.

6.7.1 Visualización del gel de agarosa

De los 20 µl de DNA plasmídico se tomaron 3 µl para cargarlos en un gel de agarosa al 0.7% y se sometieron a un corrimiento electroforético durante 2 horas en un Buffer de TAE 1X a 100 Voltios. Para la electroforesis se usó como marcador de peso molecular la cepa de *E. coli* NCTC 50192 que contiene 4 plásmidos de tamaño conocido (155.8, 61.3, 40.1 y 6.8 Kb). Posteriormente los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (BET) (Bio Rad, 10 mg/ml) 0.5 g/L, durante 5-10 seg y se lavaron en agua destilada durante 1 hora. Finalmente, los geles se visualizaron y digitalizaron con ayuda de un fotodocumentador (Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro).

6.8 Determinación de número y tamaño de plásmidos

Una vez que se puso en evidencia la presencia de bandas plasmídicas por el método de Kieser, y conforme a estos resultados y los del perfil de resistencia fenotípica y genotípica en las cepas estudiadas, se seleccionaron 43 cepas para determinar el número y el tamaño de los plásmidos albergados.

Para la determinar el número y tamaño de plásmidos se llevó a cabo la técnica de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) y el uso de la nucleasa S1, para generar una conformación lineal de los plásmidos y poder separarlos con base en su tamaño.

6.8.1 Preparación de insertos bacterianos

A partir de un cultivo puro crecido durante 24 h en agar BHI (BD Bioxon), se realizó una suspensión en 3 ml de Buffer TE (ver anexo 1) hasta conseguir una absorbancia de 3.00 en la escala de Macfarlán. Se preparó agarosa (Pulsed Field Certified Agarosa, BioRad®) al 1.5% en tampón TE y se mantuvo a 54°C; se mezclaron 0.5 ml de la suspensión bacteriana con 0.5 ml de agarosa y se distribuyó en moldes para obtener los insertos. Se dejó solidificar unos minutos en refrigeración.

6.8.2 Lisis bacteriana

Se procedió a realizar la lisis bacteriana *in situ* para lo cual se emplearon 2 insertos por cepa, a los que se añadió 1 ml de Buffer de lisis (ver anexo 1) por inserto y se dejó incubar durante 24 h en baño María a 54ºC.

6.8.3 Lavado de los insertos

Tras eliminar el Buffer de lisis, se realizaron los siguientes lavados en baño María a 54°C, agregando:

- 10 ml de agua destilada estéril cada 10 min, tres veces.
- 7 ml de Buffer TE cada 10 min, dos veces.
- 7 ml de buffer TE a temperatura ambiente, una vez.
- Después de cada lavado, se dejaba 10 min en hielo.

Los insertos se conservaron en 1 ml de Buffer TE a 4°C hasta su utilización.

6.8.4 Digestión enzimática

Se digirió medio inserto de cada cepa con la enzima S1. El volumen final del tampón de digestión fue de 100 µl por tubo, a los que se añadieron 160 U/µl de enzima S1 (Fermentans Thermo Scientific®), 20 µl de Buffer 5X de la enzima y 78.4 µl de agua miliQ estéril. Se incubó por 40 min a temperatura ambiente.

Reacción: Enzima S1 (160 U/ µl): 1.6 µl
Buffer 5X: 20 µl

Agua:	78.4 µl
Vol. Final:	100 µl

Transcurrido los 40 min de incubación, la digestión se detuvo colocando el inserto en un tubo con 150 µl de EDTA a 0.5M/1% de sarcosil (N-Lauroylsarcosine sodium salt, Merck®) e incubando en hielo durante 10 min. El exceso de sarcosil se eliminó con papel absorbente antes de cargar el inserto en el gel de agarosa al 1.2%, disuelta en TBE 0.5X. Se coloco en el carril 1, 8 y 15 la cepa de *E. coli* NCTC 50192, que se usó como cepa control, puesto que contiene 4 plásmidos de tamaño conocido: 154, 66, 48 y 7 kb (Philippon *et al.,* 1997). Finalmente, los pozos se sellaron con agarosa a 50ºC.

6.8.5 Electroforesis

La electroforesis se realizó en la cámara CHEF-DR II (BioRad) con 2 L de TBE 0.5X suplementado con tiourea 75µM (0.5g/L, Merck®). El gradiente de voltaje fue 6 V/cm, y se empleó una rampa lineal pulsada de 1 a 30 seg durante 22 h a 14 ºC.

6.8.6 Tinción del gel y visualización

El gel se tiñó durante 5 min en una solución acuosa de 200 ml de BET [10 µl del stock/ 200 ml] y se visualizó y digitalizó en el Fotodocumentador (Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro). El gel se destiñó en agua destilada, fotografiándose periódicamente hasta una correcta visualización.

6.9 Tipado de plásmidos por "PCR-based replicon typing" (PBRT)

Este método descrito por Carattoli y colaboradores, se le realizo a 35 cepas, se basa en el tipado de plásmidos mediante la amplificación por PCR de replicones pertenecientes a los grupos de incompatibilidad (Inc) para enterobacterias (Carattoli *et al*., 2005). La técnica se basó en la realización de 5 PCR multiplex y 3 PCR simplex con los oligonucleótidos que se describen en la tabla 4.

También se realizó la búsqueda de otros replicones no considerados en la metodología anterior, como IncT, IncU y el plásmido oriColE; cuyos oligonucleótidos (García-Fernández *et al.,* 2009), también se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en el método PBRT para el tipado de plásmidos.

Replicón	Oligonucleótidos (5'- 3')	Sitio blanco	Tamaño (pb)
IncHI1[a]	F: GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC R: TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	parA-parB	471
IncHI2[a]	F: TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC R: GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	Iterones	644
IncI1[a]	F: CGAAAGCCGGACGGCAGAA R: TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	RNAI	139
IncX[b]	F: AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT R: TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	ori	376
IncL/M[b]	F: GGATGAAAACTATCAGCATCTGAAG R: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	repA,B,C	785
IncN[b]	F: GTCTAACGAGCTTACCGAAG R: GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	repA	559
IncFIA[c]	F: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG R: GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	Iterones	462
IncFIB[c]	F: TCTGTTTATTCTTTTACTGTCCAC R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	repA	702

IncW[c]	F: CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG R: GGTGCGCGGCATAGAACCGT	repA	242
IncY[d]	F: AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG R: GCGAGAATGGACGATTACAAAACTTT	repA	765
IncP[d]	F: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA R: TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	Iterones	534
IncFIC[d]	F: GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG R: TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	repA2	262
IncA/C[e]	F: GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA R: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	repA	465
IncT[e]	F: TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT R: CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	repA	750
IncF repB[e]	F: TGATCGTTTAAGGAATTTTG R: GAAGATCAGTCACACCATCC	RNAI/repA	270
IncFII[1]	F: CTAAAGAATTTTGATGGCTGGC R: CAGTCACTTCTGCCTGCAC	repA	270
IncK[2]	F: GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC R: TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	RNAI	160
IncB/O[3]	F: GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC R: TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	RNAI	159

IncR	F: TCGCTTCATTCCTGCTTCAGC R: GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA	Plásmido R	251
IncU	F: TCACGACACAAGCGCAAGGG R: TCATGGTACATCTGGGCGC	Plásmido U	843
oriColE	F: GTTCGTGCATACAGTCCA R: GGCGAAACCCGACAGGACT	Plásmido ColE	187
oriColETp	F: GTTCGTGCATACAGTCCA R: GGTTTACCGGTGTCATTCC	Plásmido ColETp	106

a: Multiplex 1; b: Multiplex 2; c: Multiplex 3; d: Multiplex 4; e: Multiplex 5.
1: Simplex 1; 2: Simplex 2; 3: Simplex 3. (Carattoli *et al*., 2005a; García-Fernández *et al*., 2009).

Para todas las PCR las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial (94ºC, 5 min); 30 ciclos (94ºC, 1 min; 60ºC, 30 seg y 72ºC, 1 min) y extensión final (72ºC, 5 min). En el caso de la PCR simplex 1 la temperatura de alineamiento fue de 54ºC (en lugar de 60ºC).

Los reactivos y las concentraciones de los componentes empleados en esta técnica se detallan a continuación:

Tabla 5. Componentes y cantidades utilizados en cada PCR para la determinación de replicones.

Componente	Concentración de STOCK	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Tampón de reacción NH4 + $MgCl_2$ (Bioline)	10 x	1 ul	1x
Oligonucleótido “forward” (Sigma)	25 uM	0.3 ul	0.75 uM
Oligonucleótido “reverse” (Sigma)	25 uM	0.3 ul	0.75 uM
dNTPs mix (Sigma Aldrich)	10 mM	0.4 ul	0.4 mM
BIOTAQTMDNA Polimerasa (Bioline)	5 U/ul	0.1 ul	0.5 U
Agua miliQ estéril	---	7.4 ul	---
DNA	100 ng/ul	0.5 ul	---
		10 ul	

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.

6.10 Sistemas de Adicción Plasmídicos

De igual manera se estudió mediante PCR la presencia de 8 sistemas de Adicción:

- 5 sistemas proteicos antitoxina-regulados: PemK–PemI, codificado por el gen *pem*KI (plasmid emergency maintenance); CcdA–CcdB, gen *ccd*AB (coupled cell division locus); RelB– RelE, gen *rel*BE (relaxed control of stable RNA synthesis); ParD–ParE, gen *par*DE (plásmido RK2) y VagC–VagD, gen *vap*BC (virulence-associated protein), también llamado *vag*CD.
- 3 sistemas RNA antisentido-regulados: Hok–Sok, gen *hok–sok* (host-killing system); PndA–PndC, gen *pnd*AC (promotion of nucleic acid degradation) y SrnB–SrnC, codificado por el gen *srn*BC (stable RNA) (Mnif *et al.,* 2010).

Los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6. Oligonucleótidos y condiciones de PCR empleados en la búsqueda de los Sistemas de Adicción Plasmídicos.

Gen	Oligonucleótidos (5' - 3')	Temperatura de alineamiento	Control positivo	Tamaño (pb)
pemKI	PemK-up: AACGAGAATGGCTGGATGC PemK-low: CCAACGACACCGCAAAGC	54	A6EC	232
ccdAB	CcdA-up: AGGAAGGGATGGCTGAGGT CcdB-low: GGTAAAGTTCACGGGAGAC	54	A23EC	230
relBE	RelE-up: AAAAACCCGATGGCGACAG RelE-low: TGATAGACCAGGCGAAAAC	57	A65EC	370
parDE	ParD-up: ACGGACCAGCAGCACCAG ParE-low: AGCCCTTGAGCCTGTCGG	58	A6EC	534
vagCD	VagC-up: GGGACCTGGATTTTGATGG VagD-low: GAGCAGATGTTGGTGTCG	53	A23EC	210
hok-sok	Hok-up: AGATAGCCCCGTAGTAAGTT Sok-low: GATTTTCGTGTCAGATAAGTG	54	A6EC	203
pndAC	PndC-up: TCAATCAACCAGGGCTCT PndA-low: CCTCACCATCCAGACAAAA	52	A23EC	140
srnBC	SrnB-up: ACTGATTGTAGCCTCTTCTTT SrnC-low: CACCACTGTATTTCCCCTGT	54	A23EC	171

Condiciones de amplificación: desnaturalización inicial (94ºC, 5 min); 30 ciclos (94ºC, 45 seg; a, 45 seg y 72ºC, 45 seg) y extensión final (72ºC, 5 min) (Mnif *et al*., 2010).

Las cantidades para cada PCR fueron las mismas que se detallan en la tabla 5. Finalmente se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5%.

6.11 Análisis genes asociados a la resistencia a antibióticos *in silico* a genomas asociados como AIEC

Para este análisis se tomó en cuenta un estudio realizados previamente por Monserrat Lara, que por, los criterio inclusión que deberían de ser clasificadas como AIEC por el fenotipo, el origen de los genomas y la base de datos utilizada (Patric, GenBank, Pathogens), encontró 30 secuencias genómicas caracterizados como AIEC y 2 secuencias plasmídicas de AIEC depositados en el GenBank, las cuales son aisladas de pacientes sanos (n=8), EC -8n-016) y CU (n=6) (table x).

Las secuencias de AIEC fueron analizadas en la plataforma que dispone el Center for Genomic Epidemiology llamado Resfinder el cual identifica los genes de resistencia adquirida a antibióticos de las secuencias genómicas de las bacterias.

Tabla 7. Número de acceso y estatus de los genomas caracterizados como AIEC depositados en el GenBank.

Nombre del Genoma	Estatus	No. de acceso
E. coli AIEC07	WGS	GCA_900130225.1
E. coli ECG04	WGS	GCA_900130215.1
E. coli AIEC01	WGS	GCA_900130205.1
E. coli ECG11	WGS	GCA_900130195.1
E. coli ECG28	WGS	GCA_900130185.1
E. coli AIEC17	WGS	GCA_900130175.1
E. coli C4435	Complete	GCA_003999775.1
E. coli C7230	WGS	GCA_004120965.1
E. coli C7226	WGS	GCA_004120975.1
E. coli C7225	WGS	GCA_004121005.1
E. coli C7223	WGS	GCA_004121025.1
E. coli UM-146	WGS	GCA_008553695.1
E. coli T75	WGS	GCA_008553705.1
E. coli 13I	WGS	GCA_008553725.1
E. coli HM488	WGS	GCA_008553755.1
E. coli UM141	WGS	GCF_001571565.1
E. coli UM131	WGS	GCF_001571575.1
E. coli UM149	WGS	GCF_001571585.1
E. coli CD121	WGS	GCF_001571595.1
E. coli CD44	WGS	GCF_001571645.1
E. coli CD3	WGS	GCF_001571665.1
E. coli UC5	WGS	GCF_001571675.1
E. coli CD26	WGS	GCF_001571685.1
E. coli UM128	WGS	GCF_001571725.1
E. coli UC37	WGS	GCF_001571745.1
E. coli UM147	WGS	GCF_001571755.1
E. coli LF82	Complete	GCA_000284495.1
E. coli O83:H1 str. NRG 857C	Complete	GCA_000183345.1
E. coli HM605	WGS	GCA_000285375.1
E. coli UM146	Complete	GCA_000148605.1

7. RESULTADOS

7.1 Susceptibilidad antimicrobiana a antibióticos y fenotipo BLEE

7.1.1 Perfil de susceptibilidad y fenotipo BLEE de las cepas de *E. coli*

De un total de 66 cepas aisladas de biopsias de pacientes con EII. El 87% (n=58) fueron multidrogorresistentes. Se observó que para los antibióticos betalactámicos las cepas presentaron un 89% de resistencia a AMP, un 35% a CTX, 29%, 27%, 24% y 23% a AMC, ATM, FOX y CAZ, respectivamente; sin embargo, para los carbapenémicos (MEM e IMP) no hubo resistencia y solo 5 cepas fueron intermedias hacia estos últimos antibióticos. En el caso del resto de los antibióticos también se presentó una elevada resistencia; en las quinolonas se observó una resistencia mayor al 80%, de igual manera para los aminoglucosidos, sin embargo, para AMK solo 2 cepas fueron resistentes. Para los inhibidores de la vía del folato (TMP/SXT) y TET se observó un 89% de resistencia y una baja resistencia para CLO con un 20% (Figura 6).

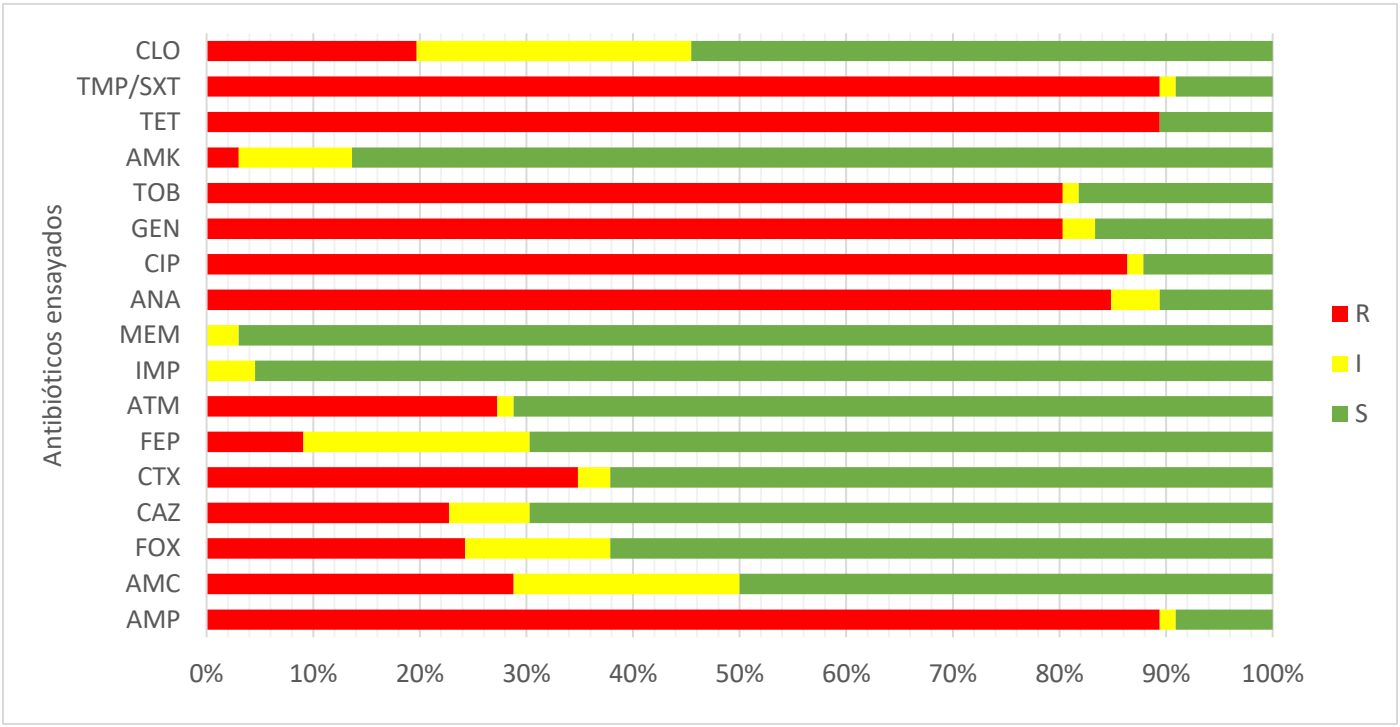


Figura 24. Porcentajes de susceptibilidad de las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias intestinales de pacientes con EII hacia 17 antibióticos ensayados mediante el método de Kirby-Bauer (CLSI, 2022). AM: Ampicilina; AMC: Amoxicilina + Clavulonato; FOX: cefoxitina; CAZ: Ceftazidima; CTX: Cefotaxima; FEP: Cefepime; ATM: Aztreonam; IMP: Imipenem; MEM: Meropenem; ANA: Ácido Nalidíxico; CIP: Ciprofloxacino; GEN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; AMK: Amikacina; TET: Tetraciclina; TMP/STX Trimetoprim/Sulfametoxazol; CLO: Cloranfenicol. R, resistentes; I, intermedio; S. susceptible.

16 cepas presentaron un fenotipo BLEE; estas cepas son provenientes únicamente del paciente 1 (Figura 7).

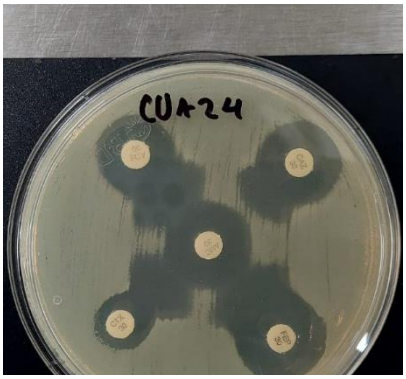


Figura 25. Determinación del fenotipo BLEE por el método de Kirby Bauguer porpuesto por el CLSI 2022.

7.1.1 Fenotipo para metalo β-lactamasas

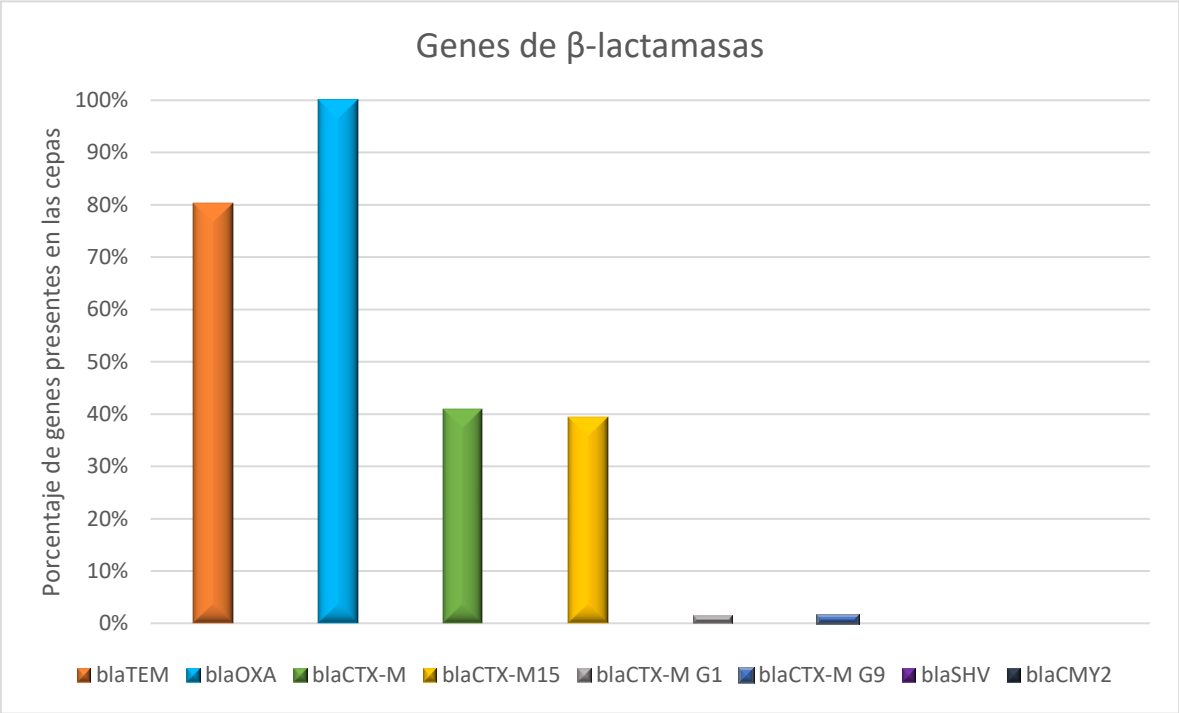
Para determinar el fenotipo se utilizó como control positivo la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 y se le realizo a las cepas que presentaron resistencia intermedia a los carbapenémicos (IM y MEM), las cuales fueron 5 de las 66 cepas; ninguna de las cepas presento fenotipo (Figura 8).

Figura 26. Imagen de la determinación del fenotipo de metalo β-lactamasa. Resultado negativo.

7.2 Identificación de genes que codifican para BLEE y B-lactamasas AmpC plasmídica

En las 66 cepas de *E. coli* se buscaron los genes que codifican las BLEE más comunes en *E. coli*: *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{OXA}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{CTX-M}$ y la B-lactamasa tipo AmpC plamídica *bla*$_{CMY}$, a excepción de los genes *bla*$_{OXA}$ y *bla*$_{CMY}$ para los cuales solo se evaluaron 34 cepas (productoras de BLEE/ resistentes e intermedias a cefalosporinas) y 25 cepas (resistentes e intermedias a cefoxitina) respectivamente. De las 66 cepas 53 cepas presentaron el gen *bla*$_{TEM}$; 27 cepas presentaron el gen *bla*$_{CTX-M}$ y ninguna cepa presentó el gen *bla*$_{SHV}$; en el caso de *bla*$_{OXA}$ de las 44 cepas 34 de ellas presentaron el gen y de las 25 cepas ensayadas para el gen *bla*$_{CMY}$ ninguna presento el gen. Además, de las 27 cepas que presentaron *bla*$_{CTX-M}$, se procedió a la determinación del probable grupo 1, 9 y la variante *bla*$_{CTX-M-15}$ por PCR. De las cuales 26 cepas presentaron el gen *bla*$_{CTX-M-15}$ y 1 cepa presento tanto *bla*$_{CTX-}$

M del grupo 1 como la del grupo 9 (Figura 9), lo cual deberá confirmarse por secuenciación.



Genes	bla_{TEM}	bla_{OXA}	bla_{CTX-M}	$bla_{CTX-M15}$	$bla_{CTX-M\ G1}$	$bla_{CTX-M\ G9}$	bla_{SHV}	bla_{CMY2}
N cepas evaluadas	66	34	66	27	27	27	66	25
Porcentaje	80%	100%	41%	39%	2%	2%	0%	0%

Figura 27. Porcentaje de los genes de β-lactamasas presentes en las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con EII.

7.3 Identificación de los genes plasmídicos involucrados en la resistencia a quinolonas.

Conforme a los resultados de susceptibilidad a quinolonas, de 59 cepas resistentes se buscaron los genes plasmídicos *acc-(6´)-Ib, qnrA, qnrB, qnrS, oqxA* y *oxqB* mediante PCR. De todos los genes buscados solo se encontraron en dos cepas el gen *qnrS*, en una cepa el gen *qnrA* y en otra cepa el gen *qepA* (Figura 10).

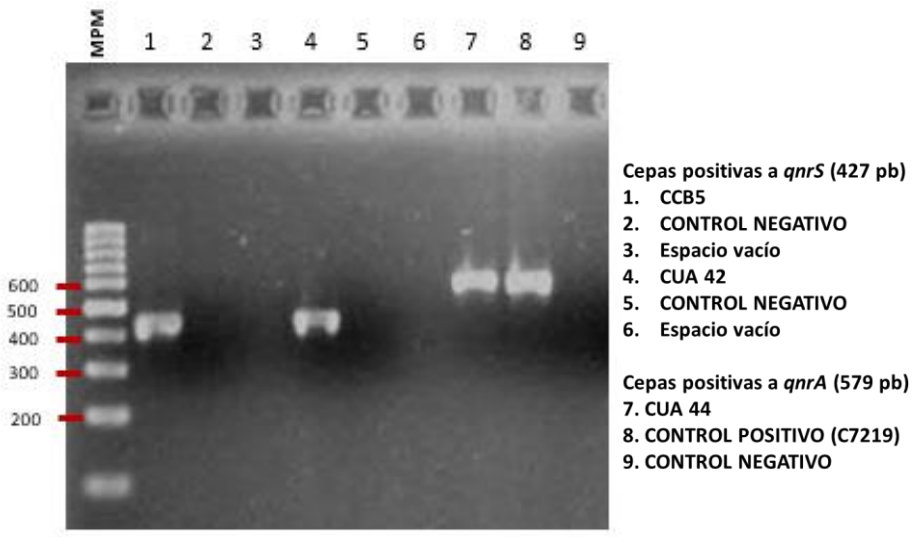
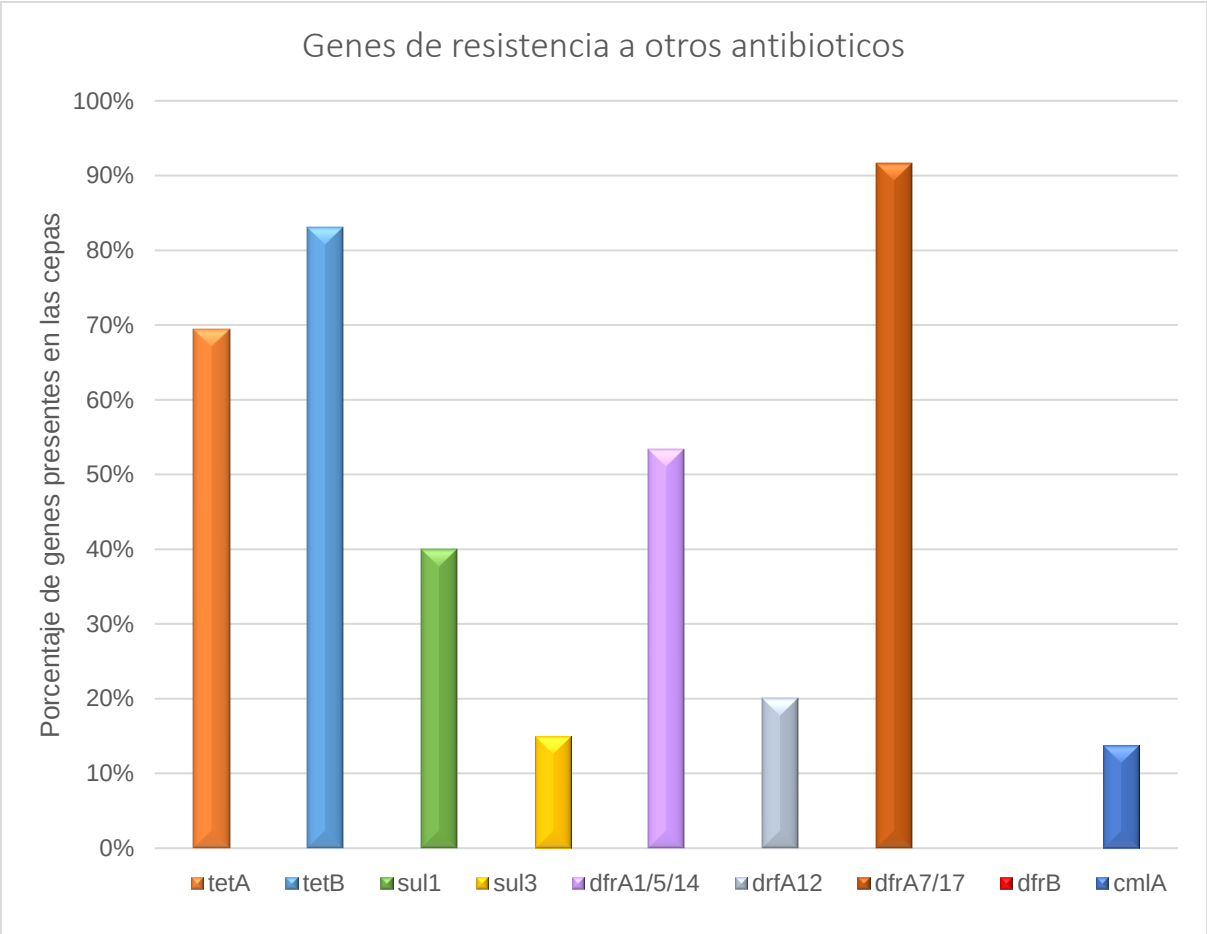


Figura 28. Amplificación del gen *qnrS* (carril 1 y 4) y el gen *qnrA* (carril 7) en las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII.

7.4 Identificación de genes asociados a la resistencia a Tetraciclinas, Cloranfenicol, Sulfonamidas y Trimetoprim.

Se identificaron los genes asociados a la resistencia o resistencia intermedias a tetraciclina, cloranfenicol y trimetoprim con sulfametoxazol. El gen más común fue *dfrA*$_{7/17}$ (92%), seguido de *tet(B)* (83%), *tet(A)* (69%) y *dfrA*$_{1/5/14}$ (53%); menos del 50% se encontraron los genes *sul1*(40%), *dfrA*$_{12}$ (20%), *sul3* (15%) y *cmlA* (14%); el gen *dfrB* fue el único el cual no está presente en ninguna cepa evaluada (Figura 11).

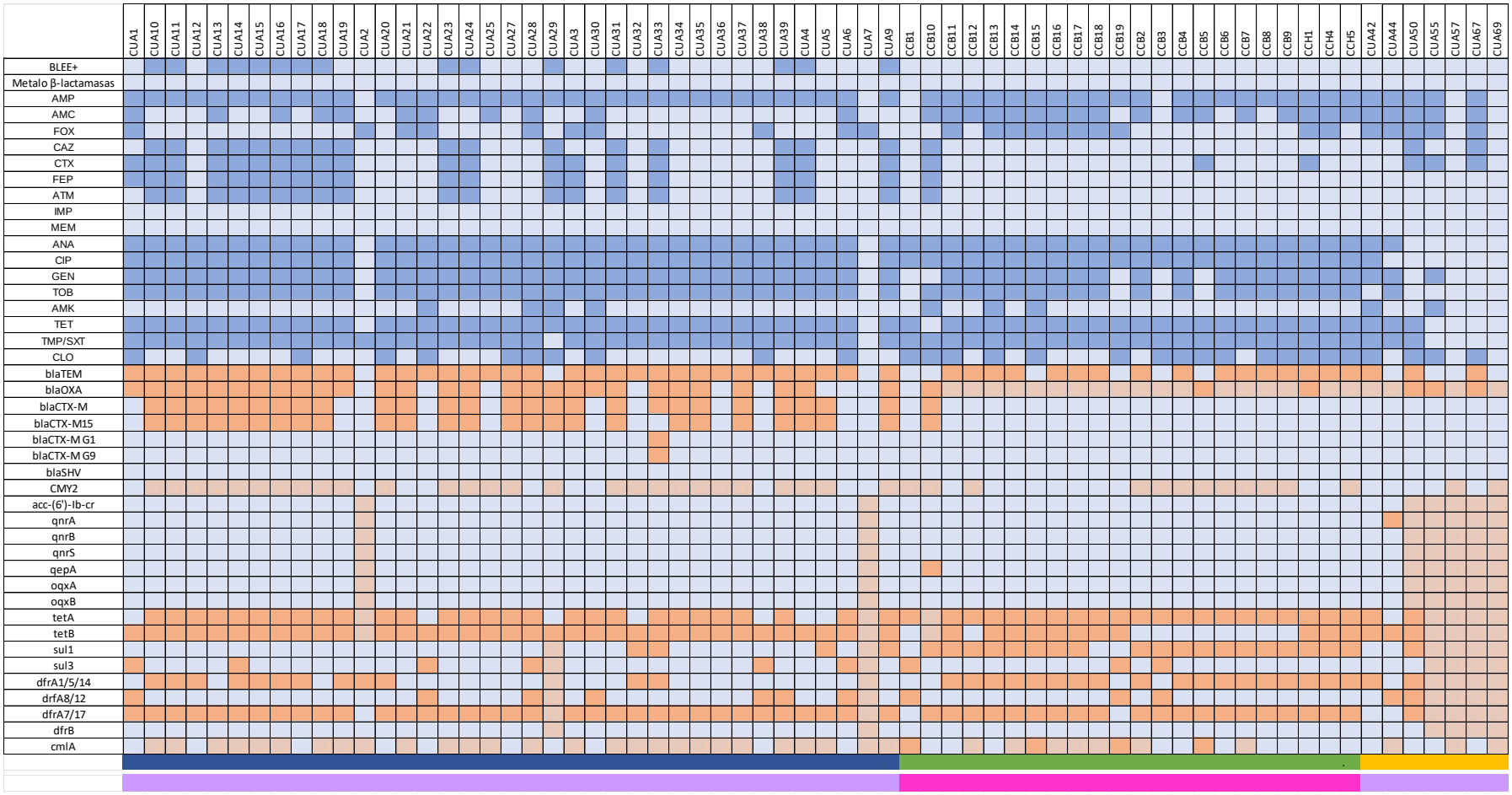


Genes	*tetA*	*tetB*	*sul1*	*sul3*	*dfrA1/5/14*	*drfA12*	*dfrA7/17*	*dfrB*	*cmlA*
N cepas evaluadas	59	59	60	60	60	60	60	60	29
Porcentaje	69%	83%	40%	15%	53%	20%	92%	0%	14%

Figura 29. Gráfica de los genes asociados a los otros antibióticos.
En la tabla se observa la n de cepas evaluadas y el porcentaje de los genes encontrados.

De acuerdo con el padecimiento y la procedencia de las cepas en los tres pacientes se describen el Fenotipo de resistencia, BLEE y genotipo en la tabla 8, observando que solo las cepas del paciente 1 presentan el fenotipo BLEE, así como la presencia de los genes blaCTX-M y la variante blaCTX-M-15. También se observa que existe una alta resistencia a los antibióticos en las cepas de los tres pacientes, así como la presencia de varios de resistencia plasmídica. A excepción de los genes plasmídicos asociados a la resistencia a quinolonas, ya que la presencia de estos genes es mínima.

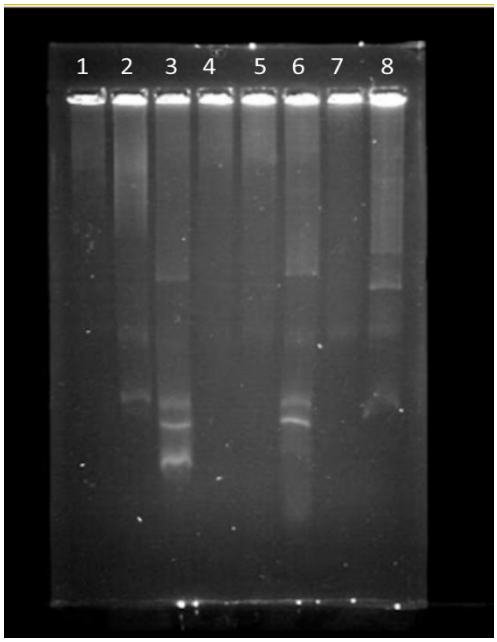
Tabla 8. Fenotipo y Genotipo de resistencia de *E. coli* aislada de biopsias intestinales de pacientes con EII



7.5 Determinación y caracterización del perfil plasmídico de las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias intestinales.

7.5.1 Presencia o ausencia de plásmidos

Por medio del método de Kieser se observó la presencia o ausencia de banda plasmídicas en las 66 cepas. De acuerdo con esto, el 82% de las cepas presentó bandas plamídicas. En la figura 12, se muestra un gel representativo.



Número	Cepa	Resultado
1	CUA 30	-
2	CUA 50	+
3	CCB 18	+
4	CUA 22	+
5	CUA 28	+
6	CCB 13	+
7	CUA 42	+
8	CONTROL NCTC 50192	

Figura 30. Se muestra el gel de poliacrilamida al 0.7% donde se observa la presencia de diversas isoformas plasmídicas, de 7 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII

7.5.2 Identificación del número y tamaño de plásmidos mediante PFGE-S1

Conforme a los resultados obtenidos con el método de Kieser y tomando en cuenta el fenotipo y genotipo de resistencia que presentaron las cepas de estudio, se seleccionaron 43 cepas para la identificación del número y tamaño de plásmidos mediante PFGE usando la enzima S1. Se observó que algunas cepas presentaban

de 1 a 5 plásmidos (Figura 13). El rango del tamaño de los plásmidos encontrados en las cepas va de los 37 kb a los 151 kb, además, hubo cepas que no presentaron plásmidos. En la tabla 9 se muestran el número de plásmidos y sus tamaños.

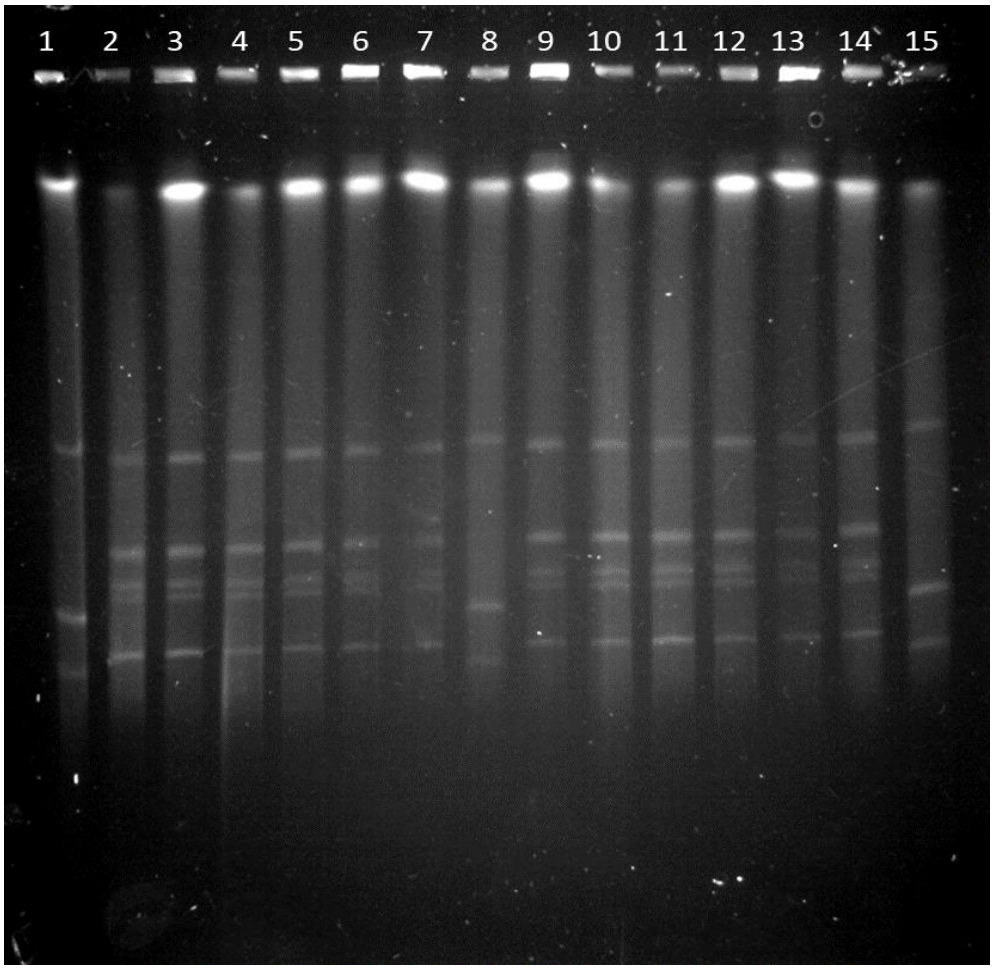
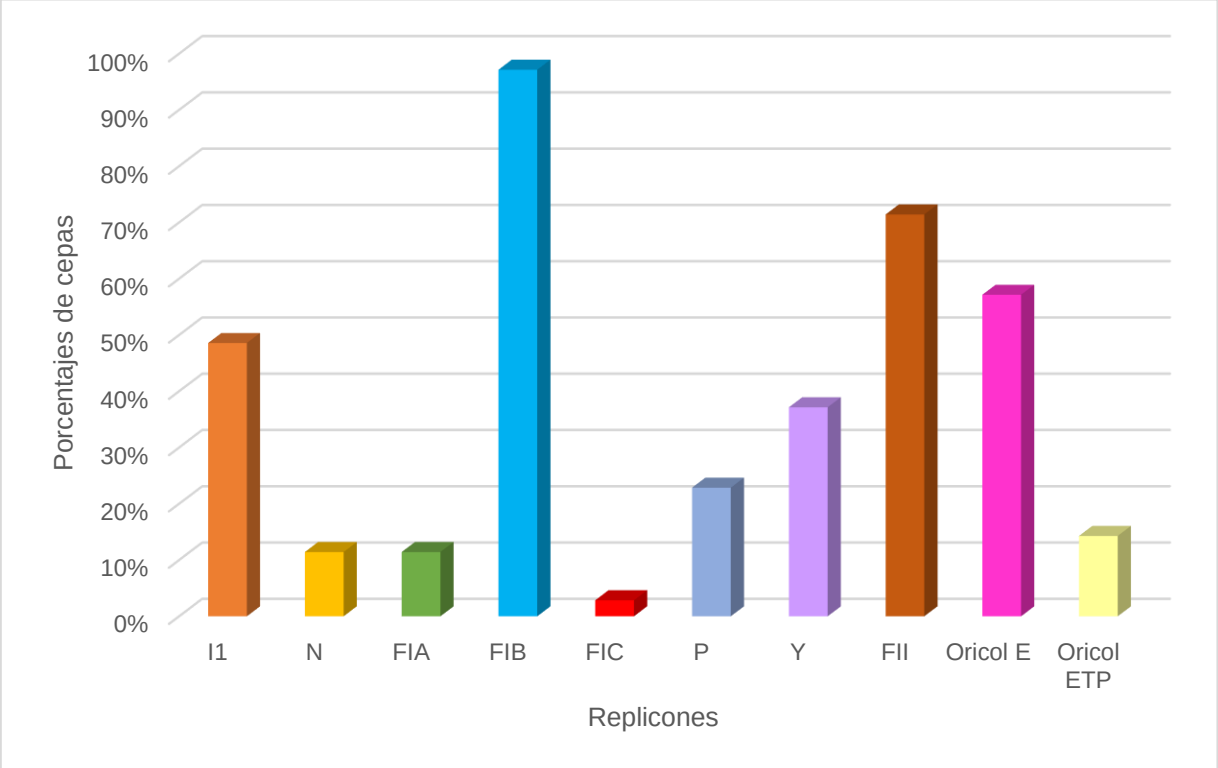


Figura 31. Se muestra el gel de poliacrilamida al 1.2% obtenido por PFGE con enzima S1 para determinar el número y tamaño de plásmidos de las cepas *E. coli* productoras de BLEE del paciente 1. Los carriles 1, 8 y 15 muestran la cepa control NCTC 50192 (contiene plásmidos de 155.8, 61.3, 40.1 y 6.8 Kb); 2, CUA14; 3, CUA23; 4, CUA10; 5, CUA11; 6, CUA15; 7, CUA24; 9, CUA31; 10, CUA39; 11, CUA13; 12, CUA16; 13, CUA18; 14, CUA17.

7.5.3 Caracterización de los plásmidos de las cepas de *E. coli*

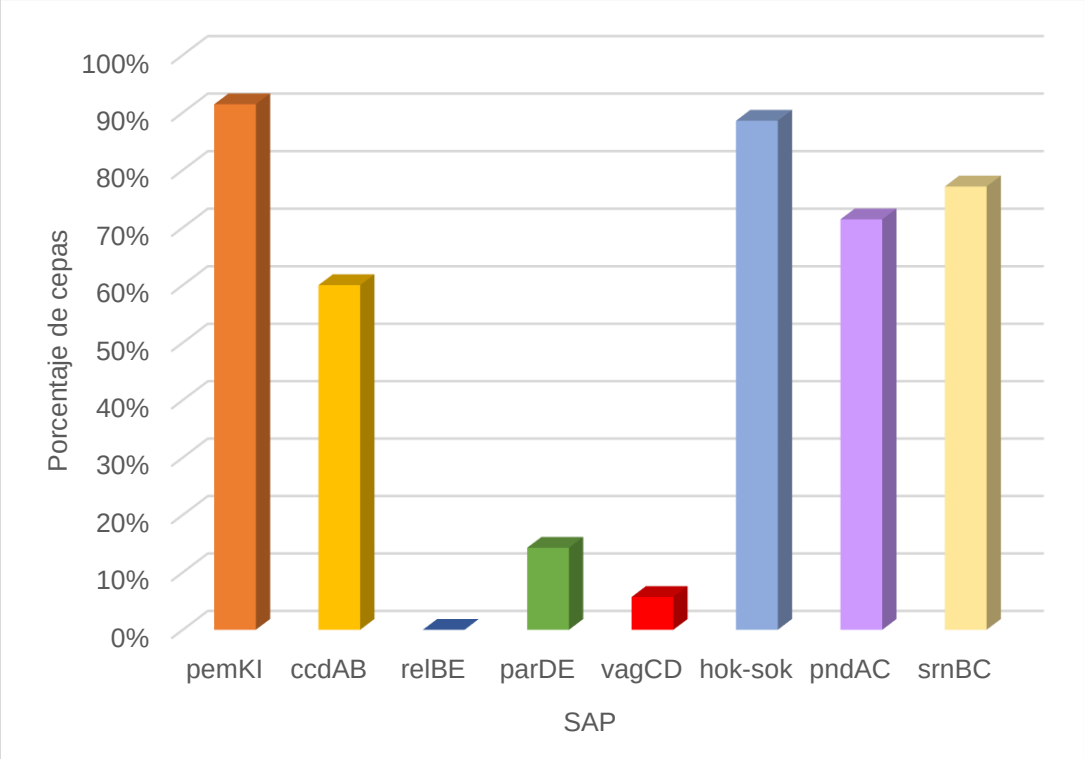
Para la caracterización de los plásmidos hubieron cepas que presentaban los mismos número y tamaño de plásmidos, por lo cual, de las 43 cepas se seleccionaron 35 cepas y observamos que el replicón con mayor frecuencia fue el FIB (97%), seguido de FII (71%) y Oricol E (57%); menor al 50% encontramos el replicón I1 (49%), IncY (37%); Inc P (23%) y de menor proporción se identificaron los replicones Oricol ETP con un 14%; FIA y N con un 11% cada uno y un 3% el FIC presente en una cepa (Figura 14).



Inc	I1	N	FIA	FIB	FIC	P	Y	FII	Oricol E	Oricol ETP
porcentaje	49%	11%	11%	97%	3%	23%	37%	71%	57%	14%

Figura 32. Grupos de Incompatibilidad plasmídica presente en las cepas de *E.* coli aisladas de biopsias de pacientes con EII.

En la búsqueda de los sistemas de adicción plasmídica (SAP) observamos que las 35 cepas presentaron de 3 a 6 sistemas. Entre los SAP más frecuentes fueron *pem*KI (91%), Hok-Sok (89%), *srn*BC (77%), *pnd*AC (71%) y *ccd*AB (60%) y menos frecuente *par*DE (14%), *vag*CD (6%) y en ninguna *rel*BE (Figura 15).



SAP	pemKI	ccdAB	relBE	parDE	vagCD	hok-sok	pndAC	srnBC
porcentaje	91%	60%	0%	14%	6%	89%	71%	77%

Figura 33. Sistemas de Adicción Plasmídica (SAP) de las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII. Sistemas proteicos: PemK–PemI, codificado por el gen *pemKI* (plasmid emergency maintenance); CcdA–CcdB, gen *ccdAB* (coupled cell division locus); RelB– RelE, gen *relBE* (relaxed control of stable RNA synthesis); ParD–ParE, gen *parDE* (plásmido RK2) y VagC–VagD, gen *vapBC* (virulence-associated protein), también llamado *vagCD.* Sistemas RNA antisentido-regulados: Hok–Sok, gen *hok–sok* (host-killing system); PndA–PndC, gen *pndAC* (promotion of nucleic acid degradation) y SrnB–SrnC, codificado por el gen *srnBC*

En la tabla 9 se muestra un resumen del fenotipo, genotipo y la caracterización parcial de los plásmidos relacionándola con el paciente y la enfermedad que presenta. Observamos que las cepas procedentes del paciente1, son las que poseen genes blaCTX-M y blaCTX-M-15, además de que algunas llegan a presentar de 1 a 5 plásmidos. También se demuestra que los replicones IncI1 e IncY solo está presente en algunas de estas cepas. Los SAP más comunes en estas cepas fueron

pemKI (100%) seguido de *sndAC* (95%). Conforme a las cepas del paciente 2, observamos que una cepa presenta los genes blaCTX-M y blaCTX-M-15. Estas cepas contienen de 1 a 3 plásmidos, algunas de estas cepas se diferencian por presentar el replicón IncN. SAP más frecuentes (100%) en las cepas de este paciente son *pemKI, Hok-Sok* y *srnBC*. Finalmente, observamos que una de las cepas del paciente 3 presenta el gen *qnrA*. Hay cepas que contiene de 1 a 3 plásmidos, sin embargo, dos de estas no llega a contener ninguno plásmido. El replicón diferente que se puede llegar a observar en estas cepas es IncFIC y el SAP con mayor frecuencia es ccdAB (100%).

Tabla 9. Caracterización parcial de los plásmidos presentes en las cepas de *E. coli*, aisladas de biopsias de pacientes con EII.

					Caracterización plasmídica		
	Cepa	Fenotipo BLEE	β-lactamasas	Otros genes de resistencia	Número: tamaño (kb)	Replicón	Sistemas de adicción
PACIENTE 1 CUCI	**CUA1**	-	TEM	tetB, sul3,dfrA7,17	1: 146,	I1, FIB	pemKI, hok-sok, pndAC
	CUA10	+	TEM, CTX-M, CTX-M-15, OXA	tetA, tetB, dfrA1_5_14, dfrA7/17	5: 45, 64, 69, 84, 147	I1, FIB, FII, OricolE	pemKI, ccdAB, hok-sok, pndAC, srnBC
	CUA11	+	TEM, CTX-M, CTX-M-15, OXA	tetA, tetB, dfrA1_5_14, dfrA7/17	5: 46, 64, 70, 85, 150	ND	ND
	CUA13	+	TEM, CTX-M, CTX-M-15, OXA	tetA, tetB, dfrA7/17	5: 44, 62, 69, 84, 146	ND	ND
	CUA14	+	TEM, CTX-M, CTX-M-15, OXA	tetA, tetB, sul3, dfrA1_5_14, dfrA7/17	5: 45, 64, 69, 86,151	I1, FIB, Y, FII, OricolE	pemKI, ccdAB, hok-sok, pndAC, srnBC
	CUA15	+	TEM, CTX-M, CTX-M-15, OXA	tetA, tetB, dfrA1_5_14, dfrA7/17	5:46, 63, 69, 85, 148	ND	ND
	CUA16	+	TEM, CTX-M, CTX-M-15, OXA	tetA, tetB, dfrA1_5_14, dfrA7/18	5: 44, 63, 69, 84, 147	I1, FIB, FII, OricolE	pemKI, ccdAB, hok-sok, pndAC, srnBC
	CUA17	+	TEM, CTX-M, CTX-M-15, OXA	tetA, tetB, dfrA7/19	5:44, 61, 68, 84, 150	I1, FIB, Y, FII, OricolE	pemKI, ccdAB, hok-sok, pndAC, srnBC
	CUA18	+	TEM, CTX-M, CTX-M-15, OXA	tetA, tetB, dfrA1_5_14, dfrA7/20	5: 43, 62, 69, 84, 146	I1, FIB, Y, FII, OricolE	pemKI, ccdAB, pndAC, srnBC
	CUA2	-	*	dfrA1_5_14	1: 78,	FIB, OricolE, OricoEtp	ccdAB, hok-sok,
	CUA21	-	TEM, CTX-M, CTX-M-15, OXA	tetA, tetB, dfrA7/17	4: 44, 65, 83, 151	I1, FIB, Y, FII, OricolE	pemKI, ccdAB, hok-sok, pndAC, srnBC
	CUA22	-	TEM	tetB, sul3,dfrA7,17	2: 99, 146	I1, FIB	pemKI, hok-sok,pndAC,
	CUA23	+	TEM, CTX-M, CTX-M-15, OXA	tetA, tetB, dfrA7/17	5: 45, 64, 69, 86, 149	ND	ND
	CUA24	+	TEM, CTX-M, CTX-M-15, OXA	tetA, tetB, dfrA7/17	5: 47, 65, 70, 85, 146	I1, FIB, Y, FII, OricolE	pemKI, ccdAB, hok-sok, pndAC, srnBC
	CUA28	-	TEM, CTX-M, CTX-M-15, OXA	tetA, tetB, sul3, dfrA7/17	2: 102, 150	I1, FIB, P, Y, OricolE	pemKI, ccdAB, hok-sok, pndAC, srnBC
	CUA3	-	TEM, CTX-M, CTX-M-15, OXA	tetA, tetB, dfrA7/17	4: 45, 64, 83, 133	I1, FIB, P, Y, FII, OricolE	pemKI, ccdAB, hok-sok, pndAC, srnBC
	CUA30	-	TEM, OXA	tetA, tetB, dfrA7/17	1: 148,	I1, FIB	pemKI, hok-sok, pndAC
	CUA31	+	TEM, CTX-M, CTX-M-15, OXA	tetA, tetB, dfrA7/17	5: 45, 64, 70, 86, 149	ND	ND
	CUA32	-	TEM	tetB, sul1, dfrA1_5_14, dfrA7/17	4: 41, 58, 78, 145	I1, FIB, Y, FII, OricolE	pemKI, ccdAB, hok-sok, pndAC, srnBC
	CUA33	+	TEM, CTX-M,CTX-M G1y G9, OXA	tetA, tetB, sul1, dfrA1_5_14, dfrA7/17	5: 42, 58, 66, 82, 147	I1, FIB, Y, FII, OricolE	pemKI, ccdAB, parDE, hok-sok, pndAC, srnBC
	CUA39	+	TEM, CTX-M, CTX-M-15, OXA	tetA, tetB, dfrA7/17	5: 45, 63, 69, 86, 146	ND	ND
	CUA5	-	TEM, CTX-M, CTX-M-15	tetB, sul1, dfrA7/17	4: 42, 65, 82, 146	I1, FIB, Y, FII, OricolE	pemKI, ccdAB, parDE, hok-sok, pndAC, srnBC
	CUA6	-	TEM	tetA, tetB, sul3, dfrA7/17	2: 100, 145	I1, FIB, Y, OricolE	pemKI, ccdAB, parDE, hok-sok, pndAC, srnBC
	CUA7	-	*	*	1: 76,	P, Y	ccdAB, parDE, pndAC
	CUA9	+	TEM, CTX-M, CTX-M-15, OXA	tetA, tetB, sul1, dfrA7/17	5: 42, 61, 68, 83, 151	I1, FIB, Y, FII, OricolE	pemKI, ccdAB, parDE, hok-sok, pndAC, srnBC
PACIENTE 2 COLITIS CRONICA Y DIVERTIC	**CCB10**	-	CTX-M, CTX-M-15, OXA	sul1, qepA, dfrA7/17	2: 37, 87	FIA, FIB, P, OricolE, OricolEtp	pemKI, ccdAB, vagCD, hok-sok, srnBC
	CCB11	-	TEM	tetA, tetB, sul1, dfrA1_5_14, dfrA7/17	3: 45, 49, 137	N, FIB, FII	pemKI, hok-sok, pndAC, srnBC
	CCB12	-	TEM	tetA, sul1, dfrA1_5_14, dfrA7/17	2: 46, 134	N, FIB, FII, OricolE, OricolEtp	pemKI, hok-sok, pndAC, srnBC
	CCB13	-	TEM	tetA, tetB, sul1, dfrA1_5_14, dfrA7/17	2: 48, 140	N, FIB, FII	pemKI, hok,sok, srnBC
	CCB16	-	TEM	tetA, tetB, sul1, dfrA1_5_14, dfrA7/18	2: 49, 138	FIB, FII	pemKI, hok-sok, pndAC, srnBC
	CCB3	-	*	tetA, sul1, sul3, dfrA7/17	1: 48,	FIB, P, FII	pemKI, hok-sok, srnBC
	CCB6	-	TEM	tetA, sul1, dfrA1_5_14, dfrA7/17	2: 47, 134	FIB, FII	pemKI, hok-sok, pndAC, srnBC
	CCB8	-	TEM	tetA, sul1, dfrA1_5_14, dfrA7/17	3: 46, 50, 144	N, FIB, FII	pemKI, hok-sok, pndAC, srnBC
	CCB9	-	TEM	tetA, sul1, dfrA1_5_14, dfrA7/18	2: 47, 137	FIB, FII	pemKI, hok-sok, pndAC, srnBC
	CCH1	-	TEM, OXA	tetA, tetB, sul1, dfrA1_5_14, dfrA7/19	2: 47, 140	FIB, FII, OricolE, OricolEtp	pemKI, hok-sok, pndAC, srnBC
	CCH4	-	TEM	tetA, tetB, sul1, dfrA1_5_14, dfrA7/20	2: 48, 132	FIB, FII, OricolE, OricolEtp	pemKI, hok-sok, srnBC
	CCH5	-	TEM	tetA, tetB, sul1, dfrA1_5_14, dfrA7/21	3: 47, 106, 136	FIB, FII	pemKI, hok-sok, srnBC
PACIENTE 3 CUCI	**CUA42**	-	TEM	qnrS, tetA, tetB, dfrA1_5_14,	0	ND	ND
	CUA44	-	*	qnrA, tetB, dfrA12	1: 151,	FIA, FIB, FIC	pemKI, ccdAB, vagCD, srnBC
	CUA50	-	TEM, OXA	tetA, tetB, sul1, dfrA1_5_14, dfrA7/21	3: 83, 101, 123	FIA, FIB, P, FII	pemKI, ccdAB, hok-sok, srnBC
	CUA55	-	OXA	*	2: 99, 121	FIB, P,OricolEtp	ccdAB,
	CUA57	-	*	*	0	ND	ND
	CUA67	-	TEM, OXA	*	2: 87, 105	FIA, FIB, P, FII	pemKI, ccdAB, hok-sok

*: No se encontró, ND: No se determino

7.6 Análisis de la presencia de genes asociados a la resistencia a antibióticos *in silico* y los presentes en las cepas de este estudio.

Se realizó un analisis de la presencia de genes asociados a la resistencia de antibióticos entre las cepas de *E. coli* del laboratorio que fueron aisladas de biopsias de pacientes con EII y los genomas de AIEC del banco del Gen Bank, donde se observó que los 30 genomas de AIEC estudiados presentan mayor porcentaje de genes de resistencia a los betalactámicos (83%), seguido por genes asociados a la resistencia a aminoglucosidos (40%), inhibidores de la vía del folato (37%) y fluroquinolonas (20%); en menor porcentaje se encontró a tretraciclinas (13%), anfenicoles (10%) y macrólidos (7%) (Figura 16).

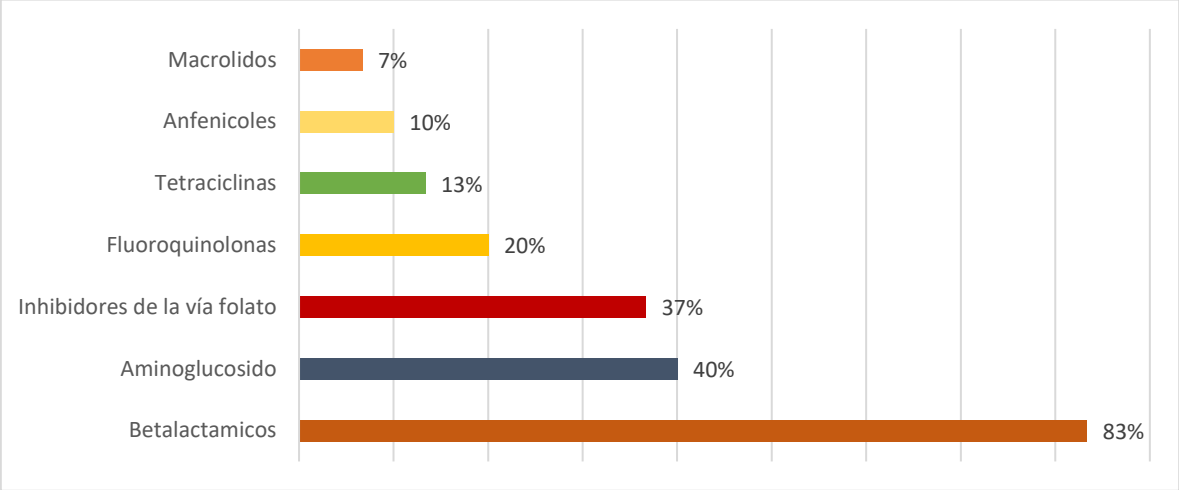
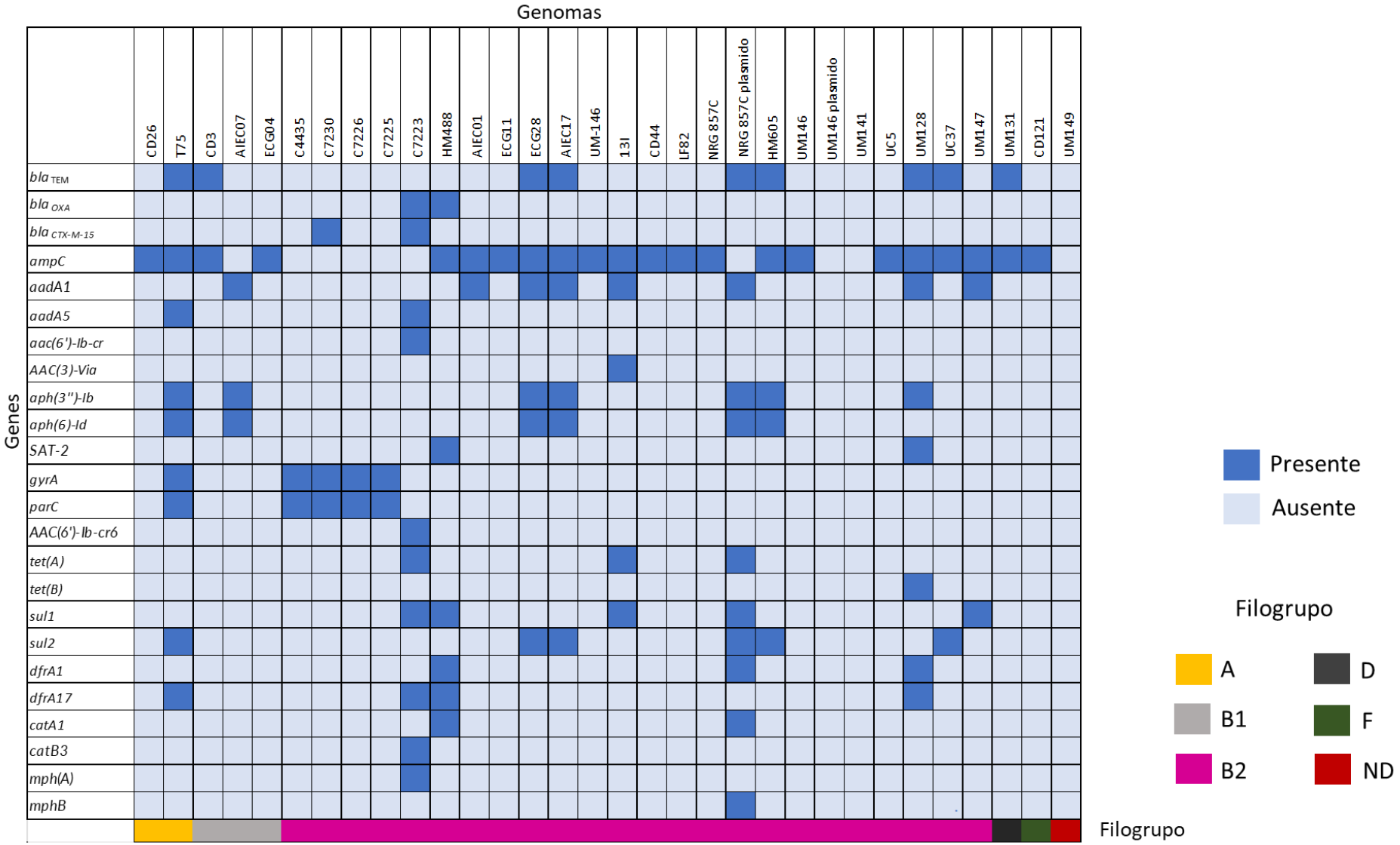


Figura 34. Porcentaje de genes asociados a la resistencia a los antibióticos en los genomas de *E. coli* reportados como cepas AIEC del banco de datos libre.

En la tabla 10 se muestra el resumen de los genes asociados a la resistencia a antibióticos encontrados en los 30 genomas de AIEC, así como al filogrupo al que pertenecen.

Tabla 10. Genes asociados a la Resistencia y filogrupo encontrados en los genomas del Gen Bank determinados como AIEC.



Conforme al análisis obtenido, se demuestra la frecuencia que existe con la presencia de los genes asociados a la resistencia a los antibióticos entre los 30 genomas caracterizados como AIEC del banco de datos libres y las 66 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII (Figura 17). Los genes asociados a la resistencia contra betalactámicos son más frecuentes a comparación con otros antibióticos.

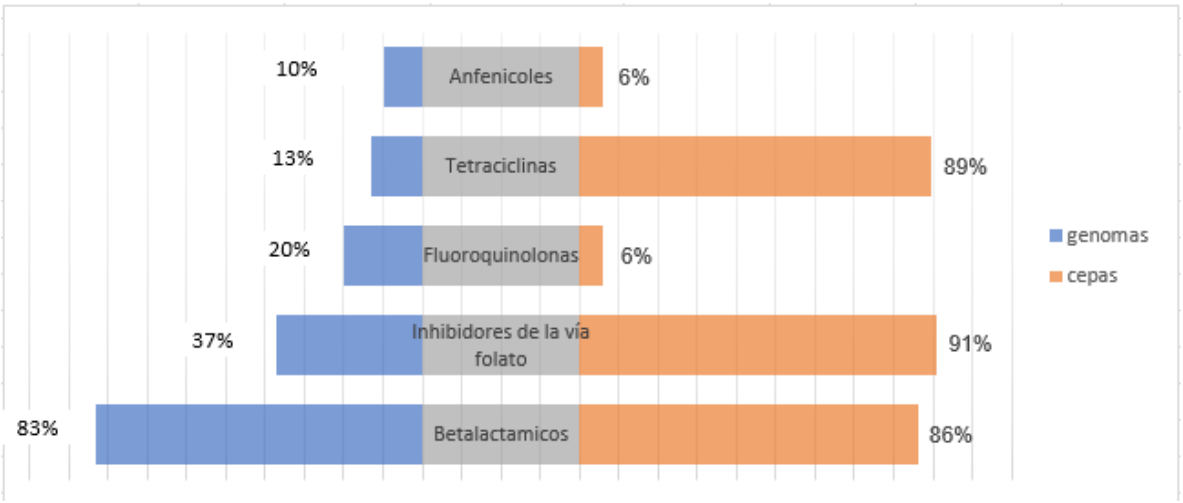


Figura 35. Frecuencia de genes asociados a la resistencia a los antibióticos entre los 30 genomas caracterizados como AIEC del banco de datos libres y las 66 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII.

En la figura 18 se observa el gen de resistencia a los antibióticos más común conforme a los genomas caracterizados como AIEC y las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII de nuestro cepario.

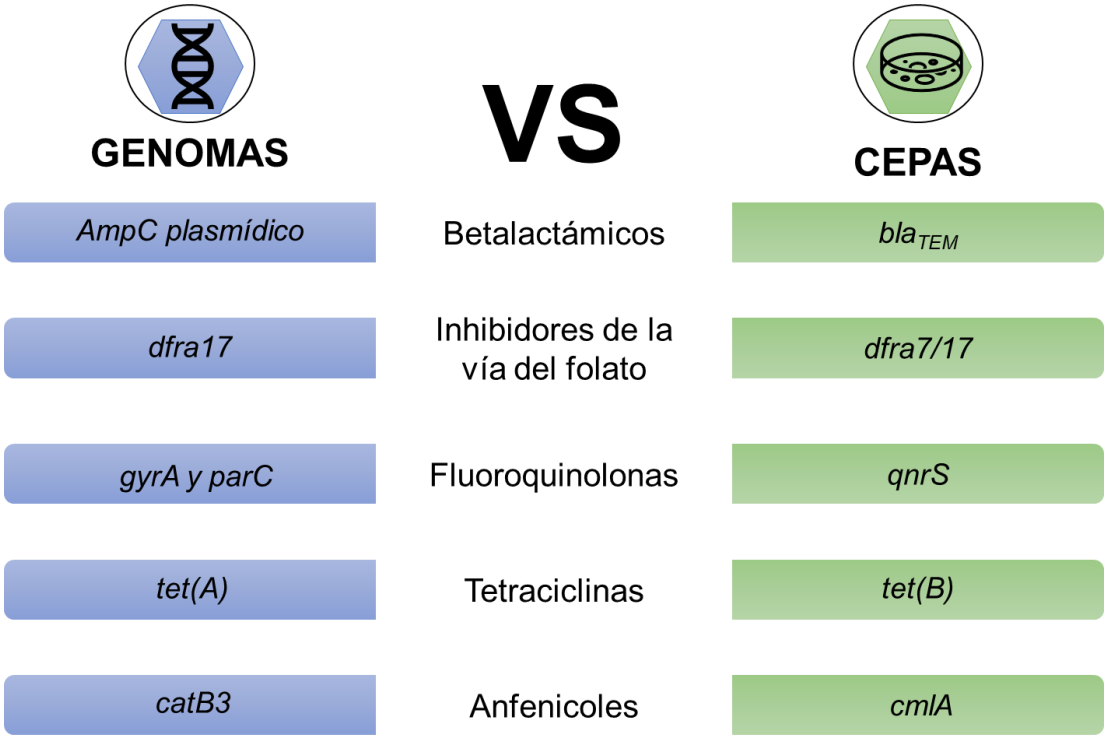


Figura 36. Genes asociados a la resistencia a los antibióticos más comunes entre los genomas caracterizados como AIEC y las 66 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII.

7.7 Construcción del mapa genómico del plásmido pO83

Se realizó la construcción del mapa genómico del plásmido pO83 de la cepa de AIEC NRG857C asociada con la EC, debido a que varios plásmidos encontrados en este estudio poseen características similares a este plásmido como el tamaño, ya que este tiene un tamaño de 147,060 pb y el replicón FIB, el cual fue el más frecuente en las cepas de estudio. Además, este plásmido pO83 acarrea genes de virulencia y de resistencia, y cuenta con un sistema de movilización completo lo cual podría llegar a ser conjugativo, por lo que es un buen modelo para verificar si se llega a encontrar en algunas de las cepas de *E.* coli de este proyecto (Figura 19).

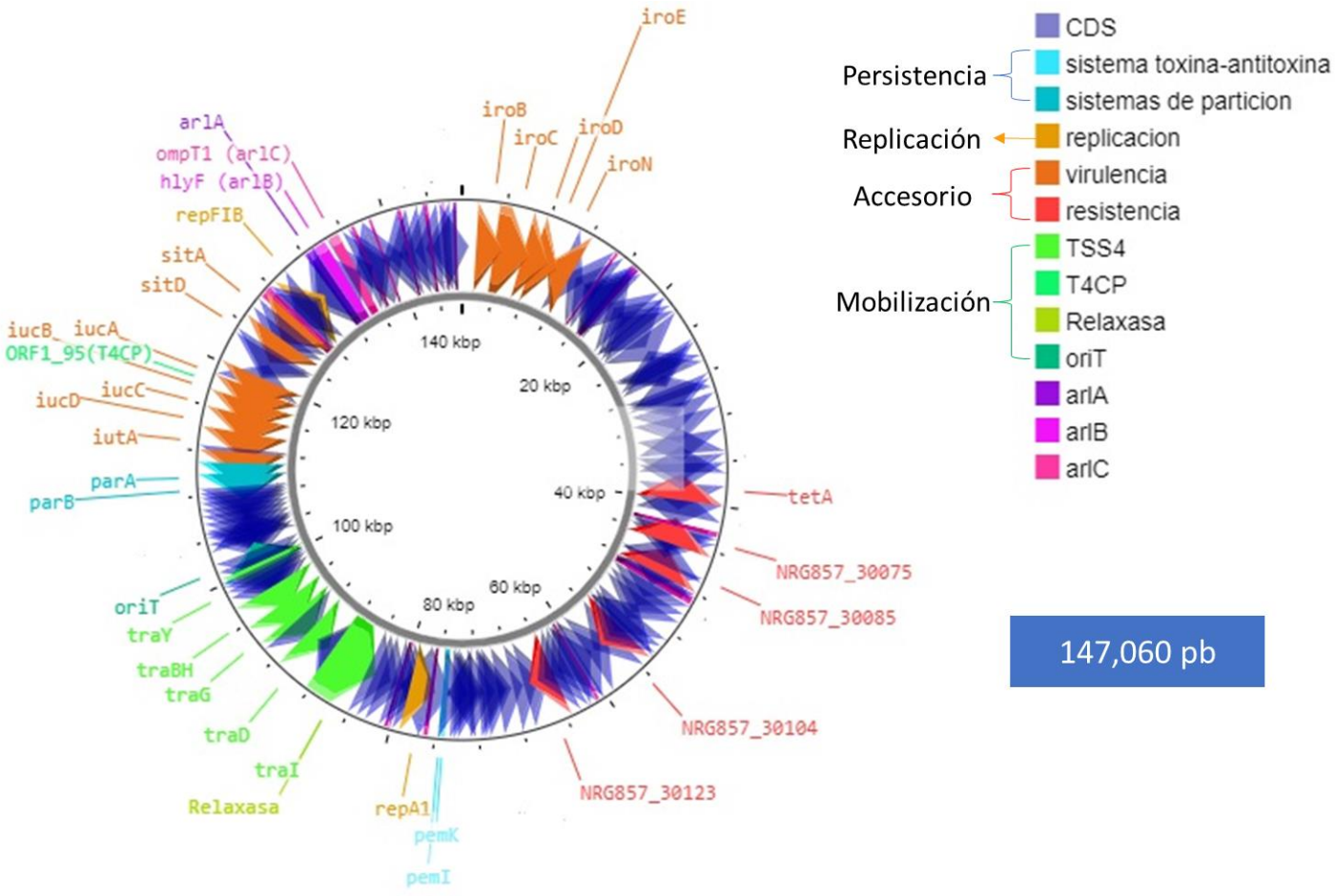


Figura 19. Mapa genómico del plásmido pO83 de la cepa de AIEC NRG857C asociada con la enfermedad de Crohn.

6. DISCUSIÓN

La EII es un conjunto de padecimientos que aumenta continuamente en los países occidentales, y esta tendencia, en las últimas décadas, se ha desplazado a los países recientemente industrializados de Asia y América del Sur (Andoh y Nishida. 2023).

Algunos informes experimentales sugieren que los cambios en la composición de la microbiota intestinal es la causa o la consecuencia de la inflamación en la EII, ya que, la alteración global de la comunidad microbiana intestinal es importante en la patogénesis de dicha enfermedad. Estudios anteriores donde utilizaron muestras fecales identificaron disbiosis en la EII, que se caracteriza por la abundancia de varios microorganismos, entre estos, enterobacterias, principalmente *E. coli* y el patotipo que se le ha asociado a esta enfermedad es el patobionte de *E. coli* adherente invasiva (AIEC) (Mirsepasi *et al.,* 2019).

Por lo cual, al asociar la intervención de AIEC en la EII, el uso de antibióticos podría ser un enfoque lógico para la terapia. Es bien documentado que el tratamiento de pacientes con EII además de incluir fármacos como mercaptopurina, metotrexato, ciclosporina para regular la respuesta inmune, cambios en la dieta y ejercicios, también incluye, aunque de forma empírica el uso de antibióticos como Rifaximina, Ciprofloxacino, β-lactámicos o metronidazol. Sin embargo, hay estudios que han demostrado que el utilizar antibióticos podría ocasionar la resistencia a antibióticos y la diseminación de esta a otras bacterias mediada por plásmidos (Martinez *et al.,* 2020), lo cual a la fecha está poco documentado en cepas AIEC. Debido a esta problemática el presente trabajo se enfocó en estudiar la resistencia y caracterización parcial de los plásmidos de cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de tres pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal, que presuntivamente pueden ser cepas AIEC, así como del análisis de los genomas de cepas caracterizadas como AIEC, depositados en el banco de datos libre.

El perfil de susceptibilidad antimicrobiana realizada a las cepas de estudio, se observó mayor resistencia a los betalactámicos, aunque, se conoce que la

resistencia a betalactámicos es una de las más comunes en *E. coli*, la producción de β-lactamasas constituye el principal mecanismo de resistencia (Woerther *et al.,*2013; Tamayo *et al.,*2021; Salame *et al.,* 2018). Un grupo de β-lactamasas, conocidas como BLEE, tienen la capacidad de hidrolizar y causar resistencia a varios tipos de antibióticos β-lactámicos, incluyendo las cefalosporinas de amplio espectro (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima) y monobactámicos (aztreonam), pero no a las cefamicinas (cefotetan, cefoxitina), ni carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem) (Aguilar, 2015). A pesar de esto, en el presente trabajo se encontró un bajo porcentaje de cepas de *E. coli* productoras de BLEE (24%), las cuales pertenecían únicamente al paciente 1. En comparación con varios estudios realizados en América latina muestran cifras del 21.4% a un 48% de *E. coli* productoras de BLEE (Pinguil *et al.,* 2022).

La mayor parte de las cepas presentaron multidrogorresistencia, observándose una alta resistencia hacia los aminoglucosidos, quinolonas, tetraciclinas e inhibidores de la vía del folato. La multidrogorresistencia evaluada en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con EII ha sido poco estudiada, pero a pesar de eso, conforme a los resultados obtenidos en este trabajo, se observa concordancia con el estudio realizado por Martínez Medina y colaboradores en el 2020, ya que, tanto en cepas AIEC como no AIEC presentan resistencia a varias familias de antibióticos (MDR) (Martínez *et al.,* 2020). Hay ensayos clínicos en pacientes con enfermedad de Crohn donde se ha demostrado que las fluoroquinolonas pueden ser útiles para tratar las fístulas de la enfermedad de Crohn (Dasgupta *et al.,*2018). Sin embargo, existe un riesgo considerable de resistencia a esta familia de antibióticos, lo cual, es lo que se observa en los resultados de este estudio, más del 80% de las cepas (86%) de las cepas de *E. coli* fueron resistentes a ciprofloxacino.

Las enzimas CTX-M se han convertido en el tipo más prevalente de BLEE presentes en microorganismos, durante los últimos años (Aguilar, 2015). Pero en este estudio el gen *bla*$_{\text{CTX-M}}$ fue menos frecuente (41%), la mayor parte de las cepas que poseen el gen son del paciente 1. Por otro lado, considerando que se buscaron las variantes *bla*$_{\text{CTX-M}}$ del grupo 1 y 9, y *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, observamos que esta última fue la más

prevalente. Esto concuerda con un trabajo previo realizado en el grupo de trabajo donde se ha demostrado la presencia de β-lactamasas de espectro extendido CTX-M-15 en cuatro cepas AIEC aisladas de sujetos sanos (Barrios *et al.,* 2018).

Otras BLEE identificadas fue TEM y en menor proporción OXA y SHV. En un estudio realizado en Nepal con cepas de *E. coli* aisladas a partir de muestras urinarias (muestras clínicas), muestran que *bla*$_{TEM}$ es predominante sobre *bla*$_{SHV}$ y *bla*$_{OXA}$ (Chaudhary *et al.,* 2023). Además, cabe resaltar que las cepas que no presentaron un fenotipo BLEE, se les encontró el gen *bla*$_{TEM}$, el cual es altamente prevalente en muestras de pollos y humanos con *E. coli* resistente a ampicilina (Gundran*et al.,*2019), por lo que para corroborar su identidad como BLEE queda como perspectiva enviar a secuenciar el fragmento amplificado de este gen *bla*$_{TEM}$.

Existen diferentes tipos de β-lactamasas de tipo AmpC plasmídicas, sin embargo, CMY es el más comúnmente en *E. coli* como lo han reportado en Asia, Europa y América del Norte (Anjum *et al.,* 2019; Merida *et al.,* 2020). En este estudio no se llegaron encontrar cepas portadoras de *bla*$_{CMY}$, aunque podría sugerirse buscar otros genes de tipo *ampC* plasmídicos, principalmente en las cepas resistentes a cefoxitina.

Los genes involucrados en la resistencia a quinolonas mostraron una prevalencia baja, ya que solo se encontrado en 4 cepas con el gen plasmídico *qnr* (2 cepas con *qnrS,* 1 cepas con *qnrA* y 1 cepa con *qepA*). Sin embargo, las cepas presentan una alta resistencia hacia esta familia de antibióticos lo cual sugiere que la resistencia podría estar conferida por mutaciones puntuales en los *gyrA* y *parC*, con lo que se logra una alta resistencia a quinolonas como el ácido Nalidíxico y la ciprofloxacino como lo reporta Dasgupta y colaboradores (Dasgupta *et al.,* 2018).

Por otro lado, se observó una mayor presencia de los genes de resistencia a tetraciclinas, *tet(A)* (69%) y *tet(B)* (83%), que concuerda con el fenotipo de resistencia presente en las cepas de estudio. Estos genes se encuentran ampliamente distribuidos en cepas de *E. coli*, tal como lo reporta un estudio realizado a cepas *E. coli* aisladas de muestras fecales tomadas de individuos adultos sanos, donde el 55.4% de los aislados de *E. coli* resistentes a tetraciclinas,

el 50% de ellos contenían genes *tet(A)* y/o *tet(B)* asociados a plásmidos (Tawfick *et al.,*2022) o como se reporta en un estudio realizado a muestras ambientales, animales y humanas en Panamá, donde los genes *tet(A)* y/o *tet(B)* se encuentran en un 45% (Ramírez *et al.,* 2023).

Como ya se mencionó antes, la resistencia a los inhibidores de la vía del folato fue muy frecuente, de hecho, trimetoprima (TMP) se usa comúnmente en el tratamiento de infecciones del tracto urinario (ITU) causadas por *E. coli* y se suele utilizar solo o en combinación con sulfametoxazol (SMX) (Somorin *et al.,* 2022). Sin embargo, en pacientes con EII se ha observado la presencia de genes de resistencia a sulfas, el más frecuente, según un estudio realizado en cepas de AIEC, es *sul1* (34.6%) (Martínez *et al.,* 2020). En comparación con los resultados de este trabajo si hubo una presencia alta del gen *sul1* (41%). Otro gen de mayor prevalencia también fue *dfrA7/17*, el cual, ha sido identificado más frecuentemente en otras cepas de *E. coli* (87,1%) (Somorin *et al.,* 2022).

A pesar de que el 20% de las cepas fueron resistentes a cloranfenicol, se observó baja presencia del gen *cmlA* (7%), sugiriendo que esta resistencia podría estar mediada por otros genes involucrados a esta resistencia, que no se buscaron como *catA* y *catB* tal como reporta Martínez Medina y colaboradores en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con enfermedad de Crohn (Martínez *et al.,* 2020).

Al realizar el análisis de los 30 genomas de AIEC observamos que existe una alta presencia de genes que aportan la resistencia a betalactámicos, tal como las 66 cepas de estudio, así como lo reporta Barrio *et al.* y Martínez *et al.,* en cepas de AIEC donde la presencia β-lactamasas es muy frecuente. (Barrios *et al.,*2018; Martínez *et al.,* 2020).

La propagación de los diferentes genes responsables de la resistencia bacteriana a las familias de antibióticos puede ser mediada por transferencia horizontal de genes, a través de plásmidos. Los plásmidos conjugativos juegan un papel muy importante al conferir a las bacterias algunos de estos genes, ya que, por medio de esto, puede llegar a sobrevivir en un medio donde esté presente un antibiótico representando un

gran desafío en la problemática de la resistencia mundial a los antimicrobianos (Pitout & Chen, 2023).

En este estudio, por medio de PFGE, se observó la presencia de varios plásmidos, las cepas que tuvieron más plásmidos fueron las del paciente 1, ya que, estos iban de 2 a 5 plásmidos a diferencia de las cepas de los otros dos pacientes, sin embargo, la mayoría presento un plásmido grande (146 kb a 156 kb). Conforme a este resultado se podría llegar a ver la similitud de estos plásmidos con el plásmido prototipo de AIEC (pO83) el cual mide 147,060 pb, ya que los tamaños son muy parecidos y plásmidos con el mismo replicón entre estos.

También se observó con más frecuencia en las cepas de *E. coli*, la presencia de plásmidos con grupos de incompatibilidad IncF, el cual es responsable de la diseminación de diferentes genes de resistencia a los antibióticos a nivel mundial en la familia *Enterobacteriaceae* de diferentes orígenes y fuentes; típicamente estos plásmidos suelen presentar múltiples replicones conteniendo comúnmente FII, FIA y FIB (Yang *et al.,* 2015; Kopotsa *et al.,* 2019). Los más frecuentes en nuestras cepas fueron FIIB (97%), seguido de FII (71%), sugiriendo que estos plásmidos podrían estar acarreando genes de resistencia a BLEE como *bla*$_{\text{CTX-M}}$, genes de carbapenemasas, de resistencia a aminoglucósidos y de resistencia a quinolonas. Aunque no se determinó la localización de estos genes podríamos sugerir que se encuentran en este tipo de plásmidos.

Otros grupos de incompatibilidad que también se presentaron con alta frecuencia fueron los pertenecientes a los plásmidos colicinogénicos o IncColE (57%) e IncI1 (49%). Los plásmidos ColE, son plásmidos pequeños, movilizables, que se encuentran principalmente en *Enterobacterales* y *Pasteurellaceae.* Varios trabajos han demostrado que estos plásmidos están presentes en aislados comensales y patógenos, donde se ha descubierto que portan genes que confieren resistencia a fluoroquinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas y β-lactámicos, incluidos antibióticos de último recurso como los carbapenémicos e incluso colistina (Ares *et al.,* 2018), por lo que se sugiere identificar que genes de resistencia que podrían estar acarreando los plasmidos en nuestras cepas. En el caso de los plásmidos que

presentaron IncI1, el cual se caracteriza por codificar dos tipos de pili sexuales, un pilus grueso y rígido necesario para el apareamiento y un pilus delgado y flexible que ayuda a estabilizar las bacterias para la transferencia de plásmidos en ambientes líquidos (Foley *et al.,* 2021), fue encontrado únicamente en las cepas del paciente 1 y que presentaron el fenotipo BLEE. También, este tipo de plásmidos se asocian con la diseminación de genes que codifican la resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido o β-lactamasas de tipo AmpC (Smith *et al.,* 2015; Foley *et al.,* 2021), por lo que se sugiere las cepas que presentaron este tipo de plásmido podría estar podría acarreando principalmente los genes que codifican BLEE, además, de conferirle a la bacteria las características mencionadas anteriormente.

Por otra parte, se realizó la búsqueda de Sistemas de Adicción Plasmídica, ya que hay varios estudios donde se ha reportado que este sistema favorece la persistencia plasmídica y su perpetuación en los linajes bacterianos (Boss, 2023). Se identifico una alta prevalencia de *pem*KI (91%), que es un sistema toxina-antitoxina, pero su regulación es por una interacción directa proteína-proteína; a diferencia de *hok-sok* (89%) y *srn*BC (77%), los cuales son sistemas que aseguran la persistencia plasmídica por una regulación por ARN's anti-sentido, una variante de los sistemas toxina-antitoxina, en el que la toxina está codificada por un ARNm estable, el cual, después de su expresión, puede causar la muerte bacteriana cuando alcanza altas concentraciones; la antitoxina, en este caso, es un transcrito pequeño e inestable que funciona como antídoto al unirse al ARN que codifica para la toxina, e inhibe su traducción (Mnif *et al*., 2010; Boss, 2023).

Por otro lado, la presencia de estas cepas de *E. coli* MDR asociadas a la EII, y que poseen un alto contenido de genes de resistencia, además, de poseer plásmidos de diferentes tamaños, así como las naturaleza de los plásmidos reportados en este estudio, sugiere la diseminación de genes de resistencia a antibióticos entre la misma especie y hacia otras bacterias de la microbiota intestinal, limitando las opciones terapéuticas para el paciente, representando un riesgo a la salud pública. Se requiere de estudios adicionales para comprender la patogénesis de este patógeno emergente, sin embargo, este estudio contribuye al conocimiento de la

resistencia que poseen las cepas aisladas de pacientes con EII y que son compartidos con genomas de cepas caracterizadas como AIEC.

9. CONCLUSIONES

1. Se observó que el 87.7% (n=66) de las cepas de *E. coli* recuperadas de biopsias intestinales de pacientes con EII son multidrogorresistentes y presentan un gran número de genes de resistencia.
2. Se aislaron cepas de *E. coli* multidrogorresistentes productoras de BLEE de biopsia del paciente 1.
3. El gen asociado con la resistencia a betalactámicos más frecuente entre las cepas fue *bla*$_{TEM}$.
4. CTX-M y la variante CTX-M-15 están ampliamente diseminadas en las cepas del paciente 1, además, los genes *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}G1}$ y *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}G9}$ fueron encontrados solamente en la cepa CUA33 del paciente 1.
5. Los genes plasmídicos asociados a la resistencia a quinolonas fueron los menos frecuentes.
6. El gen *tet(B)* está ampliamente diseminada en las cepas resistentes a tetraciclinas, así como, los genes *dfrA7/17* y *sul1* en cepas resistentes a trimetoprim y sulfonamidas respectivamente.
7. Las cepas del paciente 1 presentaron mayor número de plásmidos en comparación con las cepas de los otros dos pacientes. Además, el grupo de incompatibilidad Inc I1 estuvo presente en las cepas del paciente 1 que presentaron fenotipo BLEE.
8. Los plásmidos del grupo Inc F y OriColE fueron los más frecuentes en las cepas estudiadas.
9. Los sistemas de adicción de los plásmidos, más comunes en las cepas de los 3 pacientes fueron *pem*KI, *Hok-Sok* y *srn*BC.
10. Algunos plásmidos encontrados en las cepas de *E. coli* presentan el mismo tamaño de 147,060 pb que el plásmido el plásmido prototipo de AIEC pO83.
11. La similitud más común en los 30 genomas de AIEC y las 66 cepas de los pacientes es la alta presencia de genes asociados a la resistencia a β-lactámicos.

12. El gen más común para la resistencia a los inhibidores de la vía del folato es el *dfrA17* tanto en las cepas de estudio como en las genomas de AIEC depositados en el Gen Bank.

13. Los genes asociados a la resistencia a fluoroquinolonas, tetraciclinas y anfenicoles con mayor frecuencia en los genomas de AIEC depositados en el banco de datos libre, son *gyrA* y *parC, tet(A)* y *catB3*, respectivamente.

14. A través de análisis *in silico* realizado a los 30 genomas de AIEC se determinó que presentan multidrogorresistencia similar a las cepas de este trabajo.

10. PERSPECTIVAS

1. Finalizar la caracterización parcial de plásmidos (PFGE/S1, PBRT y SAP) de las cepas de *E. coli* restantes.
2. Realizar mediante la técnica de DPMT (Degenerate primer MOB typing) la búsqueda de la familia de relaxas.
3. Evaluar la transferencia horizontal, mediante ensayos de conjugación de cepas multirresistentes elegidas con base al perfil plasmídico y al contenido génico de resistencia.
4. Determinar la localización de los genomas de resistencia en los plásmidos encontrados en las cepas.
5. Secuenciar el fragmento de la amplificación de las cepas que presentaron los genes *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, *bla*$_{\text{CTX-M}}$ del grupo 1 y grupo 9.
6. Buscar mediante PCR los genes *catA* y *catB*.
7. Realizar la búsqueda de mutaciones en los genes cromosómicos *gyr*A y *par*C, asociados a la resistencia a quinolonas.
8. Realizar el fenotipo de adherencia, invasión, supervivencia en macrófagos y formación de biofilm, para caracterizar las cepas como probables cepas AIEC.
9. Determinar mediante PCR la presencia y búsqueda de los genes *arlA* y *arlC,* involucrados en la resistencia a péptidos antimicrobianos.
10. Realizar el fenotipo de adherencia, invasión, supervivencia en macrófagos y formación de biofilm, para caracterizar las cepas como probables cepas AIEC.
11. Evaluar el filogrupo y el ST al cual pertenecen las cepas.
12. Buscar los genes de virulencia que participan en las cepas de estudio.
13. Secuenciar algunas cepas de interés de acuerdo a los resultados del fenotipo, resistencia, genes de virulencia y perfil plasmidico, además de realizar estudios de genómica comparativa con las secuencias de AIEC ya reportadas.

14. Compara el plásmido prototipo de AIEC (pO83) con los plásmidos encontrados.

15. BIBLIOGRAFÍA

Abdelhalim KA, Uzel A, Gülşen Ünal N. Virulence determinants and genetic diversity of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) strains isolated from patients with Crohn's disease. Microb Pathog. 2020 Aug;145:104233. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104233. Epub 2020 Apr 30. PMID: 32360521.

Águila S. Adalberto, Rodríguez Ariadna, Fernández A. Anabel*., et al. Escherichia coli* diarrogénicos, identificación de patotipos y fenotipos de resistencia antimicrobiana en aislados cubanos. Revista Cubana de Medicina Tropical (2020).

Aguilar, D. (2015). E. coli BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. *Rev Invest Med Sur Mex*, *22*(2), 57-63.

Andoh A, Nishida A. Alteration of the Gut Microbiome in Inflammatory Bowel Disease. Digestion. 2023;104(1):16-23. doi: 10.1159/000525925. Epub 2022 Jul 28. PMID: 35901721.

Anjum M, Madsen JS, Nesme J, Jana B, Wiese M, Jasinskytė D, Nielsen DS, Sørensen SJ, Dalsgaard A, Moodley A, Bortolaia V, Guardabassi L. Fate of CMY-2-Encoding Plasmids Introduced into the Human Fecal Microbiota by Exogenous *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 2019 Apr 25;63(5):e02528-18. doi: 10.1128/AAC.02528-18. PMID: 30885897; PMCID: PMC6496067.

Ares-Arroyo M, Bernabe-Balas C, Santos-Lopez A, Baquero MR, Prasad KN, Cid D, Martin-Espada C, San Millan A, Gonzalez-Zorn B. PCR-Based Analysis of ColE1 Plasmids in Clinical Isolates and Metagenomic Samples Reveals Their Importance as Gene Capture Platforms. Front Microbiol. 2018 Mar 16;9:469. doi: 10.3389/fmicb.2018.00469. PMID: 29615998; PMCID: PMC5864857.

Balbuena-Alonso MG, Cortés-Cortés G, Kim JW, Lozano-Zarain P, Camps M, Del Carmen Rocha-Gracia R. Genomic analysis of plasmid content in food isolates of E. coli strongly supports its role as a reservoir for the horizontal transfer of virulence and antibiotic resistance genes. Plasmid. 2022 Sep-Nov;123-124:102650. doi: 10.1016/j.plasmid.2022.102650. Epub 2022 Sep 18. PMID: 36130651.

Baldelli V, Scaldaferri F, Putignani L, Del Chierico F. The Role of Enterobacteriaceae in Gut Microbiota Dysbiosis in Inflammatory Bowel Diseases. Microorganisms. 2021 Mar 27;9(4):697. doi: 10.3390/microorganisms9040697. PMID: 33801755; PMCID: PMC8066304.

Barrios-Villa, E., Cortés-Cortés, G., Lozano-Zaraín, P., Arenas-Hernández, M. M. D. L. P., Martínez de la Peña, C. F., Martínez-Laguna, Y., ... & Rocha-Gracia, R. D. C. (2018). Adherent/invasive *Escherichia coli* (AIEC) isolates from asymptomatic people: New E. coli ST131 O25: H4/H30-Rx virotypes. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, *17*, 1-11.

Benvenutto Vargas, V. P. Determinación de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) en agua de mar del Circuito de Playas de la Costa Verde. (2017).

Boss L, Kędzierska B. Bacterial Toxin-Antitoxin Systems' Cross-Interactions-Implications for Practical Use in Medicine and Biotechnology. Toxins

(Basel). 2023 Jun 4;15(6):380. doi: 10.3390/toxins15060380. PMID: 37368681; PMCID: PMC10305079.

Buie MJ, Quan J, Windsor JW, Coward S, Hansen TM, King JA, Kotze PG, Gearry RB, Ng SC, Mak JWY, Abreu MT, Rubin DT, Bernstein CN, Banerjee R, Yamamoto-Furusho JK, Panaccione R, Seow CH, Ma C, Underwood FE, Ahuja V, Panaccione N, Shaheen AA, Holroyd-Leduc J, Kaplan GG; Global IBD Visualization of Epidemiology Studies in the 21st Century (GIVES-21) Research Group; Balderramo D, Chong VH, Juliao-Baños F, Dutta U, Simadibrata M, Kaibullayeva J, Sun Y, Hilmi I, Raja Ali RA, Paudel MS, Altuwaijri M, Hartono JL, Wei SC, Limsrivilai J, El Ouali S, Vergara BI, Dao VH, Kelly P, Hodges P, Miao Y, Li M. Global Hospitalization Trends for Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in the 21st Century: A Systematic Review With Temporal Analyses. Clin Gastroenterol Hepatol. 2022 Jul 19:S1542-3565(22)00670-X. doi: 10.1016/j.cgh.2022.06.030. Epub ahead of print. PMID: 35863682.

Camprubí-Font, C., Bustamante, P., Vidal, RM *et al.* Estudio de un algoritmo de clasificación para la identificación de AIEC en cepas *de E. coli* geográficamente distintas . *Informe científico* **10** , 8094 (2020). https://doi.org/10.1038/s41598-020-64894-5

Chaudhary MK, Jadhav I, Banjara MR. Molecular detection of plasmid mediated *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{CTX-M,}$and *bla*$_{SHV}$ genes in Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL) *Escherichia coli* from clinical samples. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2023 May 5;22(1):33. doi: 10.1186/s12941-023-00584-0. PMID: 37147617; PMCID: PMC10163748.

Ciapponi A, Virgilio SA, Berrueta M, Soto NC, Ciganda Á, Rojas Illanes MF, Rubio Martinez B, Gamba J, González Salazar CA, Rocha Rodríguez JN, Scarpellini B, Bravo Perdomo AM, Machnicki G, Aldunate L, De Paula J, Bardach A. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Mexico and Colombia: Analysis of health databases, mathematical modelling and a case-series study. PLoS One. 2020 Jan 27;15(1):e0228256. doi: 10.1371/journal.pone.0228256. PMID: 31986191; PMCID: PMC6984728.

Croxen Matthew A., Law Robyn J., Scholz Roland, Keeney Kristie M., et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia col. (2013). DOI link: https://doi.org/10.1128/cmr.00022-13

Cummings JR, Keshav S, Travis SP. Medical management of Crohn's disease. BMJ. 2008 May 10;336(7652):1062-6. doi: 10.1136/bmj.39547.603218.AE. PMID: 18467414; PMCID: PMC2376027.

Dasgupta N, Paul D, Chanda DD, Chetri S, Chakravarty A, Bhattacharjee A. Observation of a new pattern of mutations in *gyrA* and *parC* within *Escherichia coli* exhibiting fluroquinolone resistance. Indian J Med Microbiol. 2018 Jan-Mar;36(1):131-135. doi: 10.4103/ijmm.IJMM_17_181. PMID: 29735844.

De la Fuente Marjorie, Chahuan Isidora, Gutierrez Rocio, et al. Presencia de *Escherichia coli* intracelular en mucosa intestinal de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal y su asociación con características clínicas y el uso de corticosteroides. Revista Medica Chilena (2017). http://dx.doi.org/10.4067/s0034-98872017000901129

Dogan B, Scherl E, Bosworth B, Yantiss R, Altier C, McDonough PL, Jiang ZD, Dupont HL, Garneau P, Harel J, Rishniw M, Simpson KW. Multidrug resistance is common in *Escherichia coli* associated with ileal Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2013 Jan;19(1):141-50. doi: 10.1002/ibd.22971. PMID: 22508665.

Farfán-García, Ana Elvira, Ariza-Rojas, Sandra Catherine, et al. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. Revista chilena de infectología, 33(4), 438-450 (2016) https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000400009

Foley SL, Kaldhone PR, Ricke SC, Han J. Incompatibility Group I1 (IncI1) Plasmids: Their Genetics, Biology, and Public Health Relevance. Microbiol Mol Biol Rev. 2021 Apr 28;85(2):e00031-20. doi: 10.1128/MMBR.00031-20. PMID: 33910982; PMCID: PMC8139525.

Ghouri YA, Tahan V, Shen B. Secondary causes of inflammatory bowel diseases. World J Gastroenterol. 2020 Jul 28;26(28):3998-4017. doi: 10.3748/wjg.v26.i28.3998. PMID: 32821067; PMCID: PMC7403802.

Gómez, M. M. (2015). Enfermedad inflamatoria intestinal pediátrica. PediatríaIntegral, 119.

Gundran RS, Cardenio PA, Villanueva MA, Sison FB, Benigno CC, Kreausukon K, Pichpol D, Punyapornwithaya V. Prevalence and distribution of bla_{CTX-M}, bla_{SHV}, bla_{TEM} genes in extended- spectrum β- lactamase- producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. BMC Vet Res. 2019 Jul 5;15(1):227. doi: 10.1186/s12917-019-1975-9. PMID: 31277658; PMCID: PMC6612079.

Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature. 2011 Jun 15;474(7351):307-17. doi: 10.1038/nature10209. PMID: 21677747; PMCID: PMC3204665.

Kittana H, Gomes-Neto JC, Heck K, Juritsch AF, Sughroue J, Xian Y, Mantz S, Segura Muñoz RR, Cody LA, Schmaltz RJ, Anderson CL, Moxley RA, Hostetter JM, Fernando SC, Clarke J, Kachman SD, Cressler CE, Benson AK, Walter J, Ramer-Tait AE. Evidence for a Causal Role for *Escherichia coli* Strains Identified as Adherent-Invasive (AIEC) in Intestinal Inflammation. mSphere. 2023 Apr 20;8(2):e0047822. doi: 10.1128/msphere.00478-22. Epub 2023 Mar 8. PMID: 36883813; PMCID: PMC10117065.

Kopotsa K, Osei Sekyere J, Mbelle NM. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. Ann N Y Acad Sci. 2019 Dec;1457(1):61-91. doi: 10.1111/nyas.14223. Epub 2019 Aug 30. PMID: 31469443.

Kothary V, Scherl EJ, Bosworth B, Jiang ZD, Dupont HL, Harel J, Simpson KW, Dogan B. Rifaximin resistance in *Escherichia coli* associated with inflammatory bowel disease correlates with prior rifaximin use, mutations in rpoB, and activity of Phe-Arg-β-naphthylamide-inhibitable efflux pumps. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Feb;57(2):811-7. doi: 10.1128/AAC.02163-12. Epub 2012 Nov 26. PMID: 23183443; PMCID: PMC3553721.

Kotze PG, Underwood FE, Damião AOMC, Ferraz JGP, Saad-Hossne R, Toro M, Iade B, Bosques-Padilla F, Teixeira FV, Juliao-Banos F, Simian D, Ghosh S,

Panaccione R, Ng SC, Kaplan GG. Progression of Inflammatory Bowel Diseases Throughout Latin America and the Caribbean: A Systematic Review. Clin Gastroenterol Hepatol. 2020 Feb;18(2):304-312. doi: 10.1016/j.cgh.2019.06.030. Epub 2019 Jun 25. PMID: 31252191.

Larabi A, Salesse L, Cordonnier C, Etienne-Mesmin L, Barnich N, Dalmasso G, Nguyen HTT. Differential miRNA-Gene Expression in M Cells in Response to Crohn's Disease-Associated AIEC. Microorganisms. 2020 Aug 7;8(8):1205. doi: 10.3390/microorganisms8081205. PMID: 32784656; PMCID: PMC7466023.

Liu Bin, Furevi Axel, Perepelov Andre i V, Guo Xi, et alStructure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. FEMS Microbiology Reviews , Volumen 44, Número 6 (2020), páginas 655–683, https://doi.org/10.1093/femsre/fuz028

Martinez-Medina M, Strozzi F, Castillo BRD, Serrano-Morillas N, Bustins NF, Martínez-Martínez L. Antimicrobial Resistance Profiles of Adherent Invasive *Escherichia coli* Show Increased Resistance to β-Lactams. Antibiotics (Basel). 2020 May 13;9(5):251. doi: 10.3390/antibiotics9050251. PMID: 32414140; PMCID: PMC7277491.

Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. Semin Immunopathol. 2015 Jan;37(1):47-55. doi: 10.1007/s00281-014-0454-4. Epub 2014 Nov 25. PMID: 25420450; PMCID: PMC4281375.

Meconi S, Vercellone A, Levillain F, Payré B, Al Saati T, Capilla F, Desreumaux P, Darfeuille-Michaud A, Altare F. Adherent-invasive Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro. Cell Microbiol. 2007 May;9(5):1252-61. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00868.x. Epub 2007 Jan 11. PMID: 17223928.

Merida-Vieyra J, De Colsa-Ranero A, Calderón-Castañeda Y, Aquino-Andrade A. Detection of CMY-type beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from paediatric patients in a tertiary care hospital in Mexico. Antimicrob Resist Infect Control. 2020 Oct 29;9(1):168. doi: 10.1186/s13756-020-00840-4. PMID: 33121527; PMCID: PMC7596940.

Miquel S, Peyretaillade E, Claret L, de Vallée A, Dossat C, Vacherie B, Zineb el H, Segurens B, Barbe V, Sauvanet P, Neut C, Colombel JF, Medigue C, Mojica FJ, Peyret P, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. PLoS One. 2010 Sep 17;5(9):e12714. doi: 10.1371/journal.pone.0012714. PMID: 20862302; PMCID: PMC2941450.

Mirsepasi-Lauridsen HC, Vallance BA, Krogfelt KA, Petersen AM. *Escherichia coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. Clin Microbiol Rev. 2019 Jan 30;32(2):e00060-18. doi: 10.1128/CMR.00060-18. PMID: 30700431; PMCID: PMC6431131.

M'Koma AE. Inflammatory Bowel Disease: Clinical Diagnosis and Surgical Treatment-Overview. Medicina (Kaunas). 2022 Apr 21;58(5):567. doi: 10.3390/medicina58050567. PMID: 35629984; PMCID: PMC9144337.

Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos [Detection of resistance phenotypes in gram-negative bacteria]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011 Aug-Sep;29(7):524-34.

Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.011. Epub 2011 Jun 21. PMID: 21696863.

Norman A, Hansen LH, Sørensen SJ. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009 Aug 12;364(1527):2275-89. doi: 10.1098/rstb.2009.0037. PMID: 19571247; PMCID: PMC2873005.

Palmela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin G, Hirten R, Barnich N, Ng SC, Colombel JF. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. Gut. 2018 Mar;67(3):574-587. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314903. Epub 2017 Nov 15. PMID: 29141957.

Pinguil Yugsi, Mercy Elizabeth, Estevez Montalvo, Edmundo, Andrade Campoverde, Diego, & Alvarado, María Fernanda. (2022). *Escherichia coli* productora de BLEE de origen comunitario e intrahospitalario. *Vive Revista de Salud*, *5*(14), 518-528. Epub 04 de agosto de 2022.https://doi.org/10.33996/revistavive.v5i14.165

Pitout JDD, Chen L. The Significance of Epidemic Plasmids in the Success of Multidrug-Resistant Drug Pandemic Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli. Infect Dis Ther. 2023 Apr;12(4):1029-1041. doi: 10.1007/s40121-023-00791-4. Epub 2023 Mar 22. PMID: 36947392; PMCID: PMC10147871.

Ramírez-Bayard IE, Mejía F, Medina-Sánchez JR, Cornejo-Reyes H, Castillo M, Querol-Audi J, Martínez-Torres AO. Prevalence of Plasmid-Associated Tetracycline Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Environmental, Animal and Human Samples in Panama. Antibiotics (Basel). 2023 Jan 31;12(2):280. doi: 10.3390/antibiotics12020280. PMID: 36830191; PMCID: PMC9952377.

Rodríguez-Angeles Guadalupe. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México vol.44, no.5. (2002).

Rosen MJ, Dhawan A, Saeed SA. Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents. JAMA Pediatr. 2015 Nov;169(11):1053-60. doi: 10.1001/jamapediatrics.2015.1982. PMID: 26414706; PMCID: PMC4702263.

Salame-Khouri L, Contreras-Pichardo B, Arias-Rodríguez S, et al. Epidemiología de las bacteriemias por *Escherichia coli* en dos hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. An Med Asoc Med Hosp ABC. 2018;63(2):91-95.

Seyedian SS, Nokhostin F, Malamir MD. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. J Med Life. 2019 Apr-Jun;12(2):113-122. doi: 10.25122/jml-2018-0075. PMID: 31406511; PMCID: PMC6685307.

Smith H, Bossers A, Harders F, Wu G, Woodford N, Schwarz S, Guerra B, Rodríguez I, van Essen-Zandbergen A, Brouwer M, Mevius D. Characterization of epidemic IncI1-Iγ plasmids harboring ambler class A and C genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* enterica from animals and humans. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Sep;59(9):5357-65. doi: 10.1128/AAC.05006-14. Epub 2015 Jun 22. PMID: 26100710; PMCID: PMC4538487.

Somorin YM, Weir NM, Pattison SH, Crockard MA, Hughes CM, Tunney MM, Gilpin DF. Antimicrobial resistance in urinary pathogens and culture-independent detection of trimethoprim resistance in urine from patients with urinary tract infection. BMC Microbiol. 2022 May 24;22(1):144. doi: 10.1186/s12866-022-02551-9. PMID: 35610571; PMCID: PMC9128081.

Sub Kim Chung, Gatsios Alexandra, Cuesta Santiago, et al. Characterization of Autoinducer-3 Structure and Biosynthesis in *E. coli*. ACS Central Science (2020) 6 (2), 197-206 DOI: 10.1021/acscentsci.9b01076

Tamayo Contreras, Héctor Luis, Campos Altamirano, María Soledad Lileana, Baca Choque, Yessenia Cristhely, Bazán Tanchiva, Luis, & Neyra Rivera, Carlos David. (2021). Multirresistencia en *Escherichia coli* asociada a Betalactamasas de Espectro Extendido en urocultivos obtenidos en pacientes de una provincia de la Amazonía Peruana. *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, *14*(4), 501-505. Epub 29 de diciembre de 2021.https://dx.doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2021.144.1457

Wang M, Liu JK, Gao T, Xu LL, Zhang XX, Nie JH, Li Y, Chen HX. A platform method for plasmid isoforms analysis by capillary gel electrophoresis. Electrophoresis. 2022 Jun;43(11):1174-1182. doi: 10.1002/elps.202100343. Epub 2022 Apr 28. PMID: 35289414.

Wehkamp J, Götz M, Herrlinger K, Steurer W, Stange EF. Inflammatory Bowel Disease. Dtsch Arztebl Int. 2016 Feb 5;113(5):72-82. doi: 10.3238/arztebl.2016.0072. PMID: 26900160; PMCID: PMC4782273

Wei S, Yang Y, Tian W, Liu M, Yin S, Li J. Synergistic Activity of Fluoroquinolones Combining with Artesunate Against Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. Microb Drug Resist. 2020 Jan;26(1):81-88. doi: 10.1089/mdr.2018.0463. Epub 2019 Nov 22. PMID: 31738637; PMCID: PMC6978754.

Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. Clin Microbiol Rev. 2013 Oct;26(4):744-58. doi: 10.1128/CMR.00023-13. PMID: 24092853; PMCID: PMC3811232.

Yamamoto-Furusho JK, Parra-Holguín NN, Juliao-Baños F, Puentes F, López R, Bosques-Padilla F, Torres EA, Nieves-Jimenéz H, Veitia-Velásquez GR, Jara-Alba ML, Bautista S, Piñol-Jimenez FN, Salgado-Rosado P, Villa-Ovalles KC, Abreu-Martinez YA, Borges Z, Davila-Bedoya S, Otoya-Moreno G, Iadé-Vergara B; EPILATAM study group. Clinical differentiation of inflammatory bowel disease (IBD) in Latin America and the Caribbean. Medicine (Baltimore). 2022 Jan 21;101(3):e28624. doi: 10.1097/MD.0000000000028624. PMID: 35060539; PMCID: PMC8772634.

Yamamoto-Furusho JK, Sarmiento-Aguilar A, Toledo-Mauriño JJ, Bozada-Gutiérrez KE, Bosques-Padilla FJ, Martínez-Vázquez MA, Marroquín-Jiménez V, García-Figueroa R, Jaramillo-Buendía C, Miranda-Cordero RM, Valenzuela-Pérez JA, Cortes-Aguilar Y, Jacobo-Karam JS, Bermudez-Villegas EF; EPIMEX Study Group. Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Mexico from a nationwide cohort study in a period of 15 years (2000-2017). Medicine (Baltimore). 2019

Jul;98(27):e16291. doi: 10.1097/MD.0000000000016291. PMID: 31277162; PMCID: PMC6635231.

Yamamoto-Furusho, J. K., Bosques-Padilla, F. J., Charúa-Guindic, L., Cortés-Espinosa, T., Miranda-Cordero, R. M., Saez, A., & Ledesma-Osorio, Y. (2020). Epidemiología, carga de la enfermedad y tendencias de tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal en México. *Revista de Gastroenterología de México*, *85*(3), 246-256.

Yang QE, Sun J, Li L, Deng H, Liu BT, Fang LX, Liao XP, Liu YH. IncF plasmid diversity in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains from animals in China. Front Microbiol. 2015 Sep 22;6:964. doi: 10.3389/fmicb.2015.00964. PMID: 26441898; PMCID: PMC4585273.

ANEXOS

ANEXO 1

Soluciones

Lisis alcalina (Kieser)

1. Solución 1 para 50 ml
   - Mezclar 15 ml de Sacarosa 0.3 M con 1.25 ml de Tris-HCl 25mM y 2.5 ml de EDTA 25mM pH=8
   - Aforar a 500 ml con de agua destilada, realizar la solución en condiciones de esterilidad y conservar en refrigeración.
2. Solución 2 para 5 ml
   - Mezcla 300 µl de NaOH 5M y 1 ml de SDS 10% en 3.7 ml de agua destilada estéril.
   - Realizar la solución en condiciones de esterilidad y conservar a temperatura ambiente para que no precipite.

PFGE:

1. Buffer TE

   10mM Tris y 1mM EDTA
   - Stock 100 ml de Tris 1M: Pesar 3.028 g de Tris, disolver en agitación y aforar a 100 ml con H2O destilada.
   - Stock 100 ml de EDTA 0.5M pH= 8: Pesar 18.612 g de EDTA, disolver en agitación, ajustar a pH 8 con lentejas de NaOH y aforar a 100 ml con agua destilada.
   - Preparación para 1L: Mezclar 10 ml de Tris 1M + 2 ml de EDTA 0.5M pH= 8, aforar a 1L y esterilizar a 15 libras por 15 min

2. Buffer de lisis

   50 mM Tris; 50 mM EDTA, pH 8; 1% sarcosil; 0.3 mg/ml proteinasa K.

   Preparación para 100 ml:

   - Mezclar 5 ml de Tris 1M + 10 ml de EDTA 0.5M pH= 8 + 80 ml de H2O y esterilizar a 15 libras por 15 min.
   - Dejar enfriar y agregar 5 ml de sarcosil al 20%.

- Al momento de utilizar, agregar 495 µl de proteinasa K (Thermo Fisher Scientific®) y mezclar por inversión.

3. Buffer TBE 10X (PFGE)

   0.89 M Tris, 0.89 M ácido bórico, 0.02 M EDTA pH= 8

   Buffer TBE 10X, para 1L:

   - Pesar 10.78 gr de Tris y 5.5 gr de ácido bórico
   - Disolverlos en 500 ml de agua destilada, en agitación usando el agitador magnético hasta disolver
   - Posteriormente, se agrega 0.7 gr de EDTA (para que este se disuelva se le agrega poco a poco hojuelas de NaOH), en agitación hasta disolver.
   - Ajustar las solución a un pH=8
   - Aforar con agua destilada a 1L y esterilizar a 1º libras por 10 min.
   - Finalmente conservar a temperatura ambiente.

Electroforesis de ADN

1. Buffer TAE 50X (Electroforesis de ADN)

   2 M Tris, 1M ácido acético, 50mM EDTA pH 8

   Preparación de Buffer TAE 50X, para 500 ml:

   - Pesar 30.27 gr de Tris y disolverlos en 100 ml de agua destilada en agitación, usando el agitador magnético.
   - Después de disolver el Tris, agregar 7.12 ml de ácido acético glaciar (100%) y agregar 2.32 gr de EDTA 0.5M (para que este se disuelva se le agrega poco a poco hojuelas de NaOH), mezclar con cuidado.
   - Ya que este disuelto, se procede a medir el pH de la solución y se ajusta a un pH=8
   - Aforar con agua destilada a 500 ml, esterilizar a 15 libras por 15 min y conservar en refrigeración.

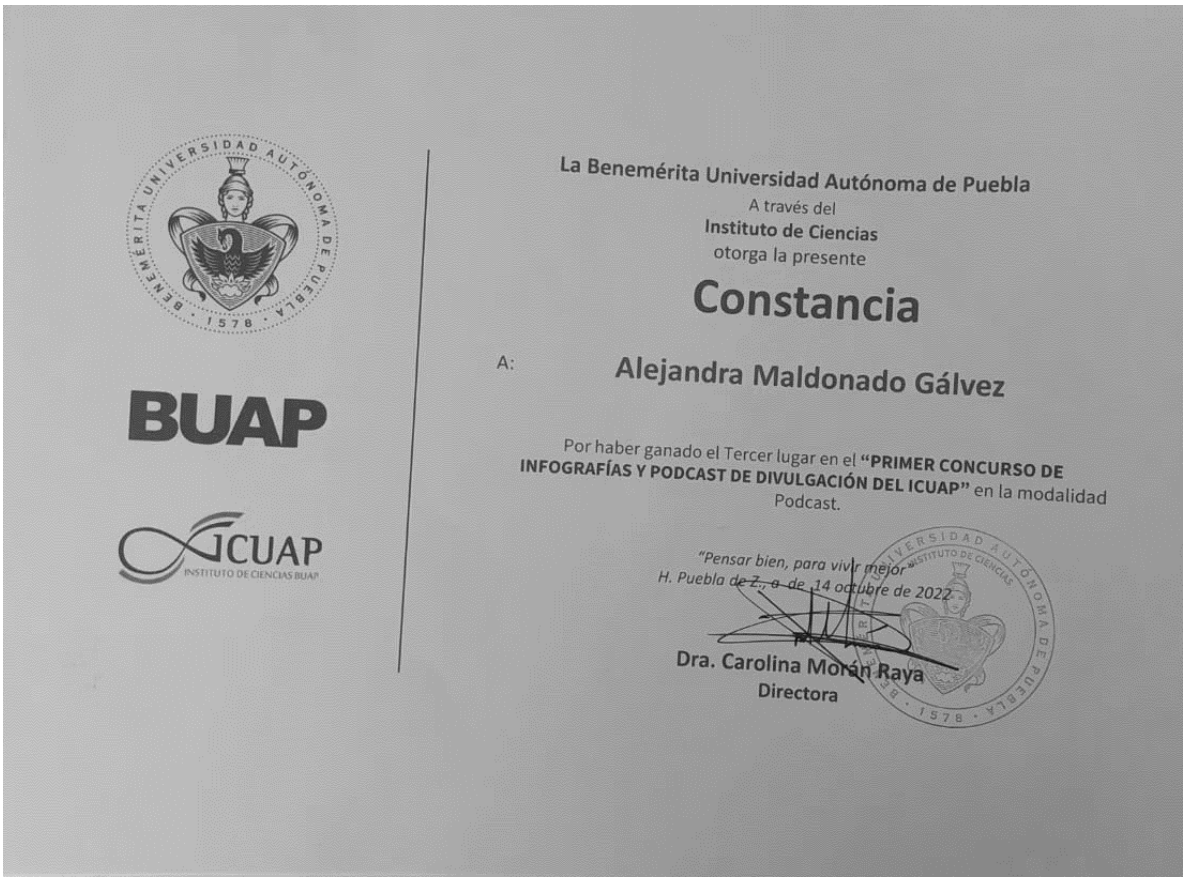
2. Buffer TAE 1X (Electroforesis de AND)

   40mM Tris, 20mM ácido acético, 1mM EDTA pH= 8

Preparación de Buffer TAE 1X, para 1L:

Tomar 20 ml de Buffer TAE 10X y aforarlos con agua destilada a 1L, conservar en refrigeración.

ANEXOS 2
Participación en congresos



La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
A través del
Instituto de Ciencias
otorga la presente

Constancia

A: **Alejandra Maldonado Gálvez**

Por haber ganado el Tercer lugar en el **"PRIMER CONCURSO DE INFOGRAFÍAS Y PODCAST DE DIVULGACIÓN DEL ICUAP"** en la modalidad Podcast.

"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a de 14 octubre de 2022

Dra. Carolina Morán Raya
Directora

La Asociación Mexicana de Infectología Pediátrica, A.C.
con la colaboración del Colegio de Pediatría de Jalisco, A.C.
Otorgan la presente

CONSTANCIA

A: ALEJANDRA MALDONADO GÁLVEZ, MARÍA GUADALUPE BALBUENA ALONSO , CAROLINA ACEVEDO OCAMPO , HANIA A ALCALÁ M , CARLOS A DE LA TORRE PERDOMO , PATRICIA LOZANO ZARAIN , ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

Por su participación en la Sesión de Trabajos Libres con el Trabajo:

Susceptibilidad a antibióticos de cepas de Escherichia coli aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Estamos agradecidos por la alta calidad de su presentación la cual contribuyó al éxito del XL Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica "Dr. Raúl Romero Cabello"
X Reunión Hispano-Mexicana de Infectología Pediátrica,
XXVIII Simposio Nacional de Microbiología Clínica,
XXXII Simposio Nacional de Enfermería en Infectología Pediátrica.
Celebrado en Hotel Fiesta Americana Minerva, Guadalajara, Jalisco.
Del 17-19 de noviembre del 2022

Dr. Enrique Rodríguez Barragán
Presidente Asociación Mexicana de Infectología Pediátrica, A.C.

Dr. Lázaro Larios Medrano
Presidente Colegio de Pediatría de Jalisco, A.C.

UNIVERSIDAD DE SONORA
UNIDAD REGIONAL NORTE
DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
4to Congreso Nacional de Ciencias Bioquímicas
XXV Semana del Día del Químico
Otorga el presente reconocimiento a:
Alejandra Maldonado Gálvez, María G. Balbuena A., Carolina Acevedo O., Hania A. Alcalá M., Carlos A. de la Torre P., Patricia Lozano Z., Rosa del Carmen Rocha Gracia
Por su participación con la ponencia:
Determinación de resistencia antimicrobiana en cepas de Escherichia coli asociada con Enfermedad Inflamatoria Intestinal
Durante el 4to Congreso Nacional de Ciencias Bioquímicas y XXV Semana del Químico 2022, el cual se llevo a cabo de los días 28-30 de noviembre y 01 de diciembre de 2022 en H. Caborca, Sonora.
Dra. Dora E. Valencia Rivera
Jefa de Departamento
M.C. Joaquín Vásquez Quiroga
Director de División
Bryan Haro Bustamante
Alumno Presidente del Comité Organizador
Dr. Jesús Ortega García
Profesor Presidente del Comité Organizador

XLVII
CONGRESO
NACIONAL
INFECTOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA
LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE INFECTOLOGÍA
Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA, A.C.,
otorga la presente constancia a:
ALEJANDRA MALDONADO GÁLVEZ
Por su valiosa participación en el
XLVII Congreso Nacional de Infectologia y Microbiologia Clinica
que se llevó a cabo del 24 al 27 de mayo 2023 en la ciudad de Boca del Río, Veracruz, México
Dr. Gerardo Martínez Aguilar
Presidente
Asociación Mexicana de Infectología
y Microbiología Clínica AC
Dra. Patricia Cornejo Juárez
Vice Presidenta
Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología
Clínica AC

Estudio de clonalidad de cepas de *E. coli* multidrogorresistentes, aisladas de biopsias de un paciente con Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Ibarra-Moreno L.M.[1] , Maldonado-Galvez A[2]. , Balbuena-Alonso M.[2] , Lozano-Zaraín P.[2] , Rocha-Gracia R.[2]

[1]Licenciatura en Biomedicina. Facultad de Medicina
[2]Posgrado en Microbiología. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla