



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**LICENCIATURA EN BIOMEDICINA**

**EJE DE MICROBIOLOGÍA**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO EN:**

**Licenciado en Biomedicina**

**“Análisis de la relación clonal e identificación de genes asociados a resistencia a rifaximina o producción de serin-betalactamasas a través de la secuenciación del genoma completo en cepas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.”**

**PRESENTA:**

**Luis Mario Ibarra Moreno**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**

**CO-DIRECTORA DE TESIS:**

**D.C. María Guadalupe Balbuena Alonso**

**Puebla, Pue.  
Junio 2025.**



## Índice

<b>1. Resumen .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>7</b>
2.1 Enfermedad Inflamatoria Intestinal .....	7
2.2 Diagnóstico .....	7
2.3 Tratamiento .....	8
2.4 Epidemiología .....	9
2.5 Etiología .....	10
2.6 <i>Escherichia coli</i> .....	11
2.7 <i>Escherichia coli</i> adherente-invasiva (AIEC) .....	13
2.8 Resistencia antimicrobiana .....	15
2.9 Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y su importancia en la resistencia antimicrobiana .....	16
2.10 <i>E. coli</i> y la resistencia a rifaximina .....	18
<b>3. Antecedentes.....</b>	<b>20</b>
3.1 Antecedentes generales.....	20
3.2 Antecedentes específicos.....	23
<b>4. Justificación.....</b>	<b>25</b>
<b>5. Planteamiento del problema .....</b>	<b>26</b>
<b>6. Hipótesis científica.....</b>	<b>27</b>
<b>7. Objetivos.....</b>	<b>28</b>
7.1 Objetivo general .....	28
7.2 Objetivos específicos.....	28
7.3 Estrategia de trabajo .....	29
<b>8. Material y métodos .....</b>	<b>30</b>
8.1 Diseño del estudio .....	30
8.2 Ubicación espacio-temporal .....	30
8.3 Muestreo .....	30
8.3.1 Definición de la unidad de la población .....	30
8.3.2 Selección de la muestra .....	31
8.3.3 Criterios de selección de las unidades de muestreo.....	31
8.3.3.1 Criterios de inclusión.....	31
8.3.3.2 Criterios de exclusión.....	31

8.3.3.3	Criterios de eliminación.....	31
8.3.4	Diseño y tipo de muestreo .....	31
8.3.5	Tamaño de la muestra .....	31
8.4	Definición de las variables y escalas de medición .....	32
8.5	Método de recolección de datos .....	32
8.6	Técnicas y procedimientos .....	32
8.6.1	Material biológico.....	32
8.6.2	Determinación de clonalidad .....	32
8.6.2.1	Preparación de insertos.....	32
8.6.2.2	Lisis bacteriana .....	33
8.6.2.3	Digestión enzimática .....	33
8.6.2.4	Preparación del gel de agarosa .....	34
8.6.2.5	Electroforesis .....	34
8.6.2.6	Tinción y visualización del gel.....	34
8.6.3	Realización de dendrogramas de dis/similitud .....	34
8.6.4	Selección de cepas y secuenciación.....	35
8.6.5	Análisis bioinformático de filogenia, genes de virulencia y genes asociados a la producción de serin-betalactamasas .....	35
8.6.6	Identificación de mutaciones <i>in silico</i> en el gen <i>rpoB</i> asociado a la resistencia a rifaximina.....	36
8.7	Análisis de datos.....	36
<b>9.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>38</b>
9.1	Determinación de relación clonal a través de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) con la enzima <i>XbaI</i> .....	38
9.2	Análisis bioinformático de filogenia, genes de virulencia y genes asociados a la producción de serin-betalactamasas .....	42
9.3	Alineamiento de las variantes de FimH en cepas secuenciadas .....	45
9.4	Identificación de mutaciones en el gen <i>rpoB</i> asociadas a la resistencia a la rifaximina.....	48
<b>10.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>52</b>
<b>11.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>58</b>
<b>12.</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>59</b>
<b>13.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>60</b>
<b>14.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>69</b>
14.1	Soluciones PFGE (Anexo 1).....	69

14.2	Sitios de corte de la enzima de restricción <i>XbaI</i> (Anexo 2) .....	70
14.3	Modelado de mutaciones asociadas a la resistencia a rifaximina (Anexo 3) .....	71
14.4	Genomas utilizados en este estudio (Anexo 4).....	74

## 1. Resumen

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es una afección de interés clínico poco reportada en México debido a un diagnóstico incompleto y escasa confirmación. *Escherichia coli* forma parte de la microbiota intestinal y es una de las bacterias mayormente asociadas como agente etiológico de la EII, específicamente el patotipo Adherente/Invasivo (AIEC); sin embargo, la presencia de cepas resistentes a rifaximina y betalactámicos hace difícil un tratamiento efectivo. En este estudio se ensayaron 16 cepas de *E. coli* de un paciente con Colitis Ulcerosa Crónica Indeterminada (CUCI), 19 cepas se obtuvieron de un paciente con Colitis Crónica y Diverticulitis, y una cepa de un paciente con CUCI. Mediante Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) con *XbaI* se determinó la relación clonal de las cepas y posteriormente se llevó a cabo la secuenciación genómica de 6 cepas, por medio de MinION Nanopore 100x. Posteriormente, se realizó la búsqueda *in silico* de mutaciones en el gen *rpoB* (asociadas a la resistencia a rifaximina), genes asociados a la producción de serin-betalactamasas y factores de virulencia de AIEC, comparándolos con genomas AIEC de bases de datos públicas. Los resultados mostraron que las cepas del paciente uno y tres pertenecieron al filogrupo A, mientras que las del paciente dos pertenecieron al filogrupo F. De igual forma, las cepas del paciente uno productoras de BLEE se agruparon en 6 clados y las del paciente dos y tres resistentes a rifaximina en 9. Además, las cepas del paciente uno presentaron alta prevalencia de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>CTX-M15</sub> en comparación con las del paciente dos; mientras que las cepas aisladas del paciente dos mostraron mutaciones en el gen *rpoB* asociadas a resistencia a rifaximina (S574Y y Q513L). Por otra parte, las cepas del paciente dos portaron los genes *chuA* y *ratA*, genes de virulencia asociadas al patotipo AIEC mientras que las cepas del paciente uno solo presentaron *ratA*. De manera interesante la cepa CUA69 proveniente del paciente tres no presentó ninguno de estos genes. El análisis filogenético reveló gran diversidad en los filogrupos, secuenciotipos, variantes de *FimH* y presencia de genes asociados a la producción de serin-betalactamasas. Así mismo, se observó que las cepas en este estudio se agruparon coherentemente por su origen. Finalmente, resulta interesante la presencia de cepas definidas como AIEC recolectadas de las bases de datos que carecían de alguno de los tres genes de virulencia analizados. En conclusión, la identificación de cepas presuntamente pertenecientes al patotipo AIEC MDR, resistentes a rifaximina y productoras de serin-betalactamasas en los tres pacientes con EII demuestra la importancia de establecer un sistema de monitoreo y vigilancia epidemiológica en México que nos permita en primera instancia conocer la diversidad genética de bacterias potencialmente vinculadas a EII, su información genética y la capacidad para compartirla con otras bacterias de importancia clínica o ambientales.

Palabras clave: Enfermedad Inflamatoria Intestinal, AIEC, resistencia a antibióticos, *Escherichia coli*, rifaximina, BLEE.

## **2. Introducción**

### **2.1 Enfermedad Inflamatoria Intestinal**

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es un conjunto de enfermedades crónicas caracterizadas por la inflamación del tracto gastrointestinal. Se clasifican clínicamente en dos tipos principales: la Enfermedad de Crohn (EC), que puede afectar cualquier parte del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano y se caracteriza por una inflamación que abarca todas las capas de la pared intestinal (transmural), y la Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI), que afecta exclusivamente la mucosa del colon. En algunos casos el compromiso colónico no puede clasificarse como EC o CUCI, por lo cual se denomina Colitis Intermedia (CI) (Gompertz & Sedano, 2019). Los síntomas de la EII incluyen dolor abdominal, diarrea con heces sanguinolentas, pérdida de peso y aumento de neutrófilos y macrófagos que producen citocinas, enzimas proteolíticas y radicales libres provocando inflamación y ulceración (Guan, 2019).

### **2.2 Diagnóstico**

Para diagnosticar la EII de forma correcta es necesario correlacionar aspectos clínicos, de laboratorio, histológicos, imagenológicos y endoscópicos. Dentro de los primeros, es importante contar con una historia clínica detallada que incluya información sobre el inicio de los síntomas como la presencia de sangrado rectal, diarrea, dolor abdominal, pérdida de peso, lesiones en la región perianal y síntomas fuera del intestino. Del mismo modo, es fundamental considerar antecedentes familiares, viajes recientes, el uso de medicamentos antiinflamatorios y posibles infecciones (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2017).

Para los exámenes de laboratorio, las variaciones más comunes incluyen anemia, trombocitosis y aumento de marcadores inflamatorios como la Proteína C Reactiva (PCR) y la velocidad de sedimentación globular (VSG). En los pacientes que padecen una afectación extensa del intestino delgado se puede observar hipoalbuminemia y deficiencia de vitaminas (Gompertz & Sedano, 2019). Adicionalmente, otro indicador de la presencia de la

enfermedad es la calprotectina fecal (CF), proteína presente en los leucocitos polimorfonucleares; los niveles de calprotectina en las heces suelen estar elevados en pacientes con diversas inflamaciones intestinales, por lo que sirve como una herramienta útil para identificar qué pacientes podrían necesitar un estudio endoscópico. El uso de la CF como marcador diagnóstico en la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) ha sido ampliamente investigado, mostrando una alta sensibilidad y especificidad. El rango de referencia varía entre 50 y 250  $\mu\text{g/g}$ , con valores menores a 100  $\mu\text{g/g}$  siendo altamente predictivos de la ausencia de EII (Seyedian, Nokhostin & Malamir, 2019) (Gompertz & Sedano, 2019).

Desde el punto de vista imagenológico, la evaluación de la EII del intestino ha incluido técnicas de imagen para evaluar las partes del intestino delgado que no son accesibles a la visualización endoscópica óptica. De forma tradicional, esto se realiza mediante técnicas de imagen por cortes transversales como la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM) para la evaluación de la EII, ya que pueden evaluar simultáneamente las manifestaciones de la enfermedad tanto en la pared intestinal como fuera de ella. Los roles actuales de la imagenología en pacientes con EII incluyen: 1) Diagnóstico inicial para distinguir entre colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (CD); 2) evaluación y progresión de las manifestaciones extraintestinales de la EII; 3) visualización de complicaciones penetrantes de la enfermedad que se extienden fuera de la pared intestinal; y 4) evaluación de la actividad de la enfermedad durante una recurrencia sintomática (Kilcoyne, Kaplan & Gee, 2016).

En cuanto a los aspectos endoscópicos, la íleo-colonoscopia es el procedimiento de elección para la detección y medición de la EII; sin embargo, ésta resulta costosa, invasiva y dolorosa para el paciente (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2017).

### **2.3 Tratamiento**

Para tratar la EII se utilizan principalmente un enfoque convencional y quirúrgico. El tratamiento convencional consiste en la utilización de diferentes fármacos; los aminosalicilatos tópicos y orales son recomendados como primera elección para inducir

remisión en pacientes que padecen la enfermedad leve a moderada (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2017); sin embargo, se ha demostrado que la utilización de diferentes antibióticos como ciprofloxacino (fluoroquinolonas), metronidazol (azoles) y rifaximina (rifamicinas) ya sea de forma individual o combinada representa una terapia efectiva (Nitzan *et al.*, 2016).

De igual forma, dentro del tratamiento quirúrgico, la colectomía suele ser el procedimiento de elección, éste consiste en la remoción de una parte inflamada del colon; sin embargo, no siempre es la opción más recomendada debido a las posibles complicaciones para el paciente. Además, dado que se trata de una enfermedad remitente, existe el riesgo de la reaparición de la inflamación (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2017).

## **2.4 Epidemiología**

Desde el inicio del siglo XXI, la EII se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial que afecta a niños, adolescentes y adultos sin distinción de sexo (Seyedian, Nokhostin & Malamir, 2019). Entre los años 2000 y 2015, en Norteamérica y Europa se reporta una prevalencia estable entre 1.5 y 2 millones de personas que padecen esta enfermedad; en contraste, en América Central, América del sur, Europa del Este, Asia y África la incidencia de la EII se ha incrementado rápidamente en los últimos 20 años, por ejemplo, en el caso de América Latina, la incidencia de EC y CUCI sufrió un incremento en un 140.6 % y 333%, respectivamente (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2019).

Aunque la falta de datos represente un reto para comprender la incidencia de la EII en México, Yamamoto-Furusho y colaboradores en el año 2009 reportaron un aumento en el número promedio anual de casos nuevos de la enfermedad pasando de 28.8 a 76.1 en el periodo de 1996 a 2006 (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2019). Nuevamente, en el año 2019, Yamamoto-Furusho y su equipo de trabajo reportaron que, en el año 2015, fueron atendidos 9,953 casos de EC y 33,060 casos de CUCI en México, dentro de los cuales el grupo etario más afectado fue de 60 a 69 años sin distinción de sexo (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2020).

## 2.5 Etiología

Debido a que su etiología aun no se encuentra totalmente esclarecida es clara, la EII se considera una enfermedad multifactorial en la que intervienen componentes genéticos, ambientales, inmunológicos y relacionados con diversidad y abundancia de la microbiota. A partir de estas observaciones, la hipótesis más aceptada sobre la patogénesis de la EII es que existe una respuesta inmune aberrante contra la microbiota intestinal desencadenada por factores ambientales en un hospedero genéticamente susceptible (Matsuoka & Kanai, 2015).

La microbiota intestinal está compuesta por más de 1,000 especies de microorganismos diferentes, siendo los filos Firmicutes y Bacteroidetes los más predominantes. La composición de la población bacteriana varía a lo largo del tiempo y está influenciada por factores como la edad, la higiene, el clima, la ubicación geográfica, la etnia y la dieta (Nitzan *et al.*, 2016). La microbiota desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la salud intestinal como (I) regular el sistema inmunológico, (II) producir enzimas que ayudan a digerir compuestos que el cuerpo por sí solo no puede procesar completamente, y (III) competir con microorganismos patógenos por el mismo nicho ecológico. Así mismo, la microbiota también contribuye al buen funcionamiento del tracto gastrointestinal, desempeñando un papel crucial en la preservación de la barrera intestinal manteniendo el equilibrio inmunológico del hospedero al promover la activación y función de las células T (Baldelli *et al.*, 2021).

De igual forma, mientras que el hospedero proporciona un ambiente rico en nutrientes y un espacio de residencia para las bacterias intestinales, estas bacterias benefician al hospedero produciendo ácidos grasos de cadena corta como acetato, propionato y butirato, los cuales son una fuente primaria de energía para las células epiteliales del colon (Baldelli *et al.*, 2021). Además, esta interacción mutua entre el hospedero y las bacterias intestinales produce un equilibrio denominado eubiosis, término empleado para definir un estado saludable del intestino en el cual existe una composición equilibrada y diversa de la microbiota intestinal que contribuye al bienestar general del hospedero y favorece funciones biológicas óptimas.

En este sentido, un desequilibrio en la microbiota intestinal, conocido como disbiosis, se ha relacionado con la EII, en la cual se observa la reducción de la diversidad microbiana principalmente Firmicutes y la inflamación crónica del intestino, planteando que la pérdida de bacterias que transforman fibra dietética no digerible en ácidos grasos de cadena corta puede contribuir directamente al desarrollo de la EII (Nitzat *et al.*, 2016). Así mismo, la reducción de un tipo bacterias promueve el crecimiento de otras, particularmente, las enterobacterias pertenecientes al filo Proteobacteria, pueden llegar a representar hasta el 100% de la microbiota anaeróbica de la mucosa ileal que se ve incrementada. En este contexto, se han identificado cepas de *Escherichia coli* que se adhieren en las mucosas ileal y colónica inflamadas de los pacientes. Estas cepas destacan por su capacidad para adherirse e invadir las células epiteliales intestinales (CEI), además de sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos. Debido a estas características, se ha definido un nuevo patotipo denominado *E. coli* adherente-invasiva (AIEC) y evidencias de estudios preclínicos sobre la EII sugieren que esta bacteria desempeña un papel fundamental en la inducción y/o permanencia de la inflamación intestinal en los pacientes afectados (Chervy, Barnich & Denizot).

## **2.6 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es una bacteria bacilar, gram-negativa, anaerobia facultativa, oxidasa negativa e indol positivo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Fue descrita por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodor Escherich, aislándola de heces de un paciente pediátrico con diarrea, esta bacteria coloniza el intestino humano pocas horas después del nacimiento y es considerada parte de microbiota intestinal; sin embargo, aunque muchas cepas se comporten como miembros comensales de la microbiota de animales y humanos, algunas cepas se clasifican como patógenos ya que provocan una amplia variedad de enfermedades, que van desde condiciones autolimitadas hasta enfermedades intestinales y extraintestinales que pueden ser mortales (Mainl, 2013). Si bien, existe una amplia variedad de cepas de *E. coli* con características particulares, se han podido clasificar con varios sistemas; el primero se denomina sistema de serotipificación propuesto en el año 1940 por el

microbiólogo Danés Fritz Kauffman. Este sistema permite definir un grupo inicial con base a la combinación específica de antígenos presentes en diversas estructuras; actualmente el esquema incluye 176 antígenos somáticos (O), 112 antígenos flagelares (H) y 60 antígenos capsulares (K). El antígeno "O" determina el serogrupo y la identificación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, que a veces se relacionan con un cuadro clínico específico (Rodríguez-Angeles, 2002).

También, para abordar de mejor manera la importancia epidemiológica de *E. coli* patógena, Clermont y colaboradores en 2019 desarrollaron una estrategia para la clasificación de filogrupos basada en el ensayo PCR cuádruplex que utiliza los genes *chuA*, *yjaA*, *arpA* y el fragmento genético TspE4.C2, los cuales permiten la identificación de ocho filogrupos designados como A, B1, B2, C, D, E, F y G (Clermont *et al.*, 2019). El uso de la clasificación por filogrupos se ha empleado en el estudio de nichos ecológicos y estilos de vida en patógenos bacterianos, mejorando nuestra comprensión de la estructura de la población proporcionando información epidemiológica importante (Aguirre-Sanchez *et al.*, 2022).

Por su parte, las cepas de *E. coli* determinadas como patógenos se agrupan de acuerdo con sus características de virulencia en nueve patotipos que afectan a los humanos, de los cuales seis son patotipos intestinales o diarreogénicos (DEC) y tres son patotipos que provocan infecciones extraintestinales (ExPEC). Los seis patotipos intestinales son *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* difuso adherente (DAEC); por otra parte, los patotipos ExPEC incluyen a *E. coli* uropatogénica (UPEC), *E. coli* patogénica aviar (APEC) y *E. coli* asociada a meningitis neonatal (NMEC) (Liu *et al.*, 2020). Particularmente, en las últimas décadas, se ha identificado un nuevo patotipo denominado adherente-invasivo (AIEC), que se ha demostrado constituye uno de los principales agentes causales de la EII (Gomez *et al.*, 2016).

## 2.7 *Escherichia coli* adherente-invasiva (AIEC)

En 1998, en Francia, el equipo de Darfeuille y colaboradores fueron los primeros en describir cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de mucosa ileal de pacientes con enfermedad de Crohn (EC), las cuales mostraron una mayor capacidad de adhesión a células Caco-2 y síntesis de pili tipo 1, sugiriendo que dichas cepas están implicadas en las primeras etapas de la patogenicidad de los procesos inflamatorios infecciosos del intestino. Además, ninguna de estas cepas presentó genes de virulencia específicos que permitieran su identificación como algún patotipo diarreogénico (Darfeuille *et al.*, 1998).

A pesar de que a la fecha no se cuenta con un marcador genético, por lo que el método para identificar este patotipo se basa únicamente en evaluar su fenotipo de adherencia, invasión, supervivencia en macrófagos y formación de biopelícula (Camprubí-Font & Martínez-Medina, 2020), sí se han identificado diversos factores de virulencia en AIEC que participan en el proceso de patogenicidad, por ejemplo el pili tipo 1 y los flagelos, permiten la adherencia a las células del hospedero, y le confieren movilidad lo que facilitan la colonización intestinal. También, moléculas efectoras como la proteína OmpA permiten a AIEC utilizar las vesículas de la membrana externa (OMVs) para interactuar con las células del hospedero, transportando adhesinas y toxinas esenciales para su virulencia. La porina OmpC desempeña un papel clave en la adaptación bacteriana al ambiente intestinal, ajustando la permeabilidad de la membrana y facilitando la liberación de OMVs; esta porina también regula los factores de virulencia a través de la señalización sigma, en particular mediante el factor sigma S ( $\sigma$ S), el cual le permite a AIEC resistir el estrés, modular la invasión y persistir en el intestino inflamado (Zheng *et al.*, 2020).

Las cepas AIEC tienen la capacidad de adherirse a las células epiteliales intestinales (CEI) debido a la interacción entre la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 6 (CEACAM6) y FimH, esta última es una adhesina ubicada en la punta de los pili tipo 1, altamente expresada por las bacterias AIEC (Abdelhalim, Uzel & Ünal, 2020). De manera interesante se ha observado que la mayoría de las cepas AIEC presentan

mutaciones en el gen *fimH*, traducidas en la proteína FimH lo que parece modular un nivel de adherencia mayor a a CEI (Camprubí-Font & Martínez-Medina, 2020).

Se ha propuesto que algunas proteínas de membrana externa (OMPs) actúan en conjunto con factores de adherencia y movilidad aumentando la patogenicidad de AIEC. Algunos estudios han mostrado que OmpA está presente en vesículas de membrana externa y actúa mejorando la invasión bacteriana al unirse a la proteína chaperona Gp96, la cual se expresa con mayor frecuencia en la superficie apical del epitelio en pacientes que padecen EC. También, se ha reportado que OmpC desempeña un papel indirecto en el fenotipo AIEC, ya que los niveles de adhesión e invasión disminuyen cuando la expresión de OmpC se reduce mediante la vía reguladora  $\sigma E$  (Camprubí-Font & Martínez-Medina, 2020).

De igual forma, se ha reportado que las cepas de AIEC carecen de la mayoría de los factores de virulencia presentes en cepas patógenas intestinales; aunque si comparten factores de virulencia similares con las cepas de *E. coli* ExPEC; sin embargo, En este sentido, Abdelhalim y colaboradores en 2020 realizaron un estudio con el objetivo de identificar la presencia de genes de virulencia en cepas AIEC; el estudio identificó al gen *chuA*, el cual participa en la captación de hierro y aumenta la capacidad de las cepas para sobrevivir y persistir en el interior de los macrófagos (Abdelhalim, Uzel & Üna, 2020). De igual forma, el gen *ratA* se asoció de manera importante con cepas AIEC, el cual codifica a la toxina asociada a ribosomas que afecta la asociación del ribosoma 70S e inhibe la síntesis de proteínas, aunque cabe señalar que el mecanismo de acción exacto de esta proteína entre las cepas AIEC y su asociación con la EII aún no se encuentra totalmente esclarecido (Abdelhalim, Uzel & Ünal, 2020).

Finalmente, de manera global, se sugiere que estos factores participan en la patogénesis de AIEC de la siguiente manera: inicialmente la bacteria emplea los pili tipo I para adherirse a la superficie mucosa con el antígeno humano (CEACAM6). Esta unión permite a las bacterias establecer un anclaje en el epitelio intestinal, una vez adheridas, las bacterias tienen la capacidad de invadir el epitelio intestinal, lo que marca el inicio de un proceso patológico más complejo (Baldelli *et al.*, 2021). El daño en el epitelio intestinal se ve intensificado por

la lisis de las vesículas endocíticas, lo que a su vez compromete aún más la integridad del epitelio. A través de un mecanismo conocido como pinocitosis, las bacterias logran ingresar a las células del epitelio, permitiéndoles evadir el sistema inmunológico y multiplicarse en los macrófagos; los cuáles una vez activados envían señales al sistema inmunitario, provocando una respuesta inflamatoria crónica al generar la secreción de grandes cantidades de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), una citocina proinflamatoria (Zheng *et al.*, 2022). Esta serie de eventos resalta la complejidad del mecanismo de patogenicidad de AIEC y su asociación con la EII, destacando así la importancia de comprender estas interacciones para desarrollar tratamientos más eficaces.

## **2.8 Resistencia antimicrobiana**

La resistencia antimicrobiana (RAM) se define como la capacidad heredada o adquirida de los microorganismos para crecer en altas concentraciones de antibióticos y existen dos tipos principales: la resistencia intrínseca o natural debido a la presencia o ausencia de ciertas características genéticas, provocando los antibióticos no sean efectivos; y la resistencia adquirida, en la cual las bacterias obtienen resistencia a través de mutaciones en sus genes cromosómicos o mediante la transferencia horizontal de genes a través principalmente de plásmidos, lo que provoca resistencia a los antibióticos (Brauner *et al.*, 2016).

Generalmente la RAM se determina cuantificando la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un antibiótico en particular, en la cual las bacterias resistentes son capaces de multiplicarse y crecer en concentraciones de antibióticos que resultan fatales para otras cepas de la misma especie (Huemer *et al.*, 2020). La resistencia antimicrobiana ha dado lugar a la aparición de bacterias multirresistentes (MDR), que se definen como aquellos microorganismos que presentan resistencia a tres o más clases de antibióticos (Magiorakos *et al.*, 2012). Estas bacterias MDR representan un problema de salud pública a nivel mundial, ya que provocan un retraso en el tratamiento antibiótico adecuado, aumentando así la morbilidad y la mortalidad (Huemer *et al.*, 2020).

Los principales mecanismos que confieren resistencia se clasifican en tres grupos principales de resistencia:

(I) Reducción de las concentraciones de antibióticos intracelulares:

Las concentraciones intracelulares de antibióticos se reducen disminuyendo la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, por ejemplo, mutando porinas que permitirían la entrada de antibióticos en la célula o utilizando bombas de eflujo que promueve su expulsión (Brauner *et al.*, 2016).

(II) Modificación del blanco del antibiótico:

Las mutaciones espontáneas o las modificaciones post-traduccionales de una molécula blanco de antibióticos que puede producir resultando en una interacción poco eficaz con el blanco atenuando la actividad del antibiótico (Huemer *et al.*, 2020).

(III) Inactivación del antibiótico

Existen enzimas las cuales poseen la capacidad de inactivar antibióticos mediante hidrólisis, acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones; éstas son clínicamente importantes debido a su capacidad de ser movilizadas a través de la transferencia horizontal de genes. Un ejemplo de estas enzimas son las betalactamasas, las cuales son capaces de inactivar antibióticos betalactámicos (Poirel *et al.*, 2018).

## **2.9 Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y su importancia en la resistencia antimicrobiana**

Los antibióticos betalactámicos son agentes que poseen acción bactericida interrumpiendo la formación de la pared celular bacteriana gracias a la unión covalente a proteínas de unión a penicilina (PBPs). Estas enzimas están involucradas en los pasos finales de la síntesis de peptidoglucano en bacterias gram-negativas y gram-positivas. De hecho, se conoce que los betalactámicos son los antibióticos más utilizados a nivel mundial debido a que son bien tolerados, poco tóxicos y eficaces al tratar infecciones severas (Bush & Bradford, 2016). Tomando esto en cuenta, la aparición de betalactamasas es crucial debido a que les permite

a las bacterias inactivar antibióticos betalactámicos, lo que limita las opciones de tratamiento y contribuye al aumento de infecciones difíciles de tratar, representando un importante desafío para la salud pública.

Particularmente, las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas bacterianas que confieren resistencia a antibióticos betalactámicos de amplio espectro, incluidas las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Además, la presencia de BLEE se asocia con la resistencia a otros agentes antimicrobianos, como fluoroquinolonas y aminoglucósidos, ya que los genes que codifican estas enzimas suelen encontrarse en plásmidos que también portan genes de resistencia a dichos antibióticos.

Los genes que codifican para BLEE son muy diversos en la naturaleza y se pueden clasificar en varias familias, tales como *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> entre otros (Husna *et al.*, 2023).

En la clasificación de Ambler, las betalactamasas se dividen en cuatro clases: A, B, C y D. Este sistema está basado en secuencias específicas de sus proteínas. Las clases A, C y D utilizan una serina en su centro activo, mientras que la clase B emplea zinc divalente. Otro sistema de clasificación fue el propuesto por Bush-Jacobi-Medeiros, en el que estas enzimas se agrupan en tres categorías de acuerdo con su función: el grupo 1 incluye cefalosporinas clasificadas como clase C, cuyo gen es cromosómico; el grupo 2 abarca betalactamasas con serina en el centro activo, que pertenecen a las clases A y D; y el grupo 3 está formado por metalo-betalactamasas (MBL), correspondientes a la clase B (Sawa, Kooguchi & Moriyama, 2020).

Dado que la inhibición de las betalactamasas depende de su mecanismo enzimático, aquellas pertenecientes a las clases A y D pueden ser inhibidas por compuestos como el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam, que se unen de manera irreversible a la serina de su centro activo. Sin embargo, las betalactamasas de clase C, aunque también poseen serina en su sitio activo, muestran una menor sensibilidad a estos inhibidores tradicionales, aunque pueden ser bloqueadas por avibactam o vaborbactam. Por otro lado, las metalo-betalactamasas de clase B no son inhibidas por estos compuestos debido a su dependencia de

zinc en la catálisis, pero pueden ser afectadas por agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sawa, Kooguchi & Moriyama, 2020).

Las BLEE generalmente se encuentran en microorganismos pertenecientes al grupo de las Enterobacterias, especialmente en *E. coli*, la cual es un modelo de uno de los microorganismos MDR más comunes en el intestino. Las BLEE más comunes incluyen las de tipo CTX-M (principalmente CTX-M-15 y CTX-M-14), TEM (TEM-10, TEM-12) y SHV (SHV-2, SHV-5), las cuales presentan una alta capacidad de hidrólisis de antibióticos betalactámicos. Además, esto resulta importante debido a que genes relacionados con la producción de BLEE pueden diseminarse a otras bacterias y permitir la propagación de la resistencia a cepas comensales susceptibles en el intestino (Kharaghani et al., 2023).

### **2.10 *E. coli* y la resistencia a rifaximina**

La rifaximina es un antibiótico de amplio espectro perteneciente a la familia de las rifamicinas que posee acción bactericida contra una amplia gama de patógenos entéricos, incluyendo bacterias gram-positivas, gram-negativas, aeróbicas y anaeróbicas, además de poseer actividad antiparasitaria intestinal. La rifaximina se une de manera irreversible a la subunidad beta de la ARN polimerasa bacteriana dependiente de ADN, la cual se encuentra codificada por el gen *rpoB*; esta unión interfiere con la producción de proteínas bacterianas esenciales para su supervivencia y replicación (Koo & Dupont, 2010).

La rifaximina se ha propuesto como una buena opción para tratar la EII debido a su espectro de acción, a su baja toxicidad determinada por una baja absorción a nivel intestinal y a que no presenta interacciones medicamentosas (Guslandi, 2011). De hecho, Dogan y colaboradores en 2017, reportaron que la administración de rifaximina en un periodo de 16 semanas puede inducir remisión en pacientes con EII; adicionalmente, demostraron que la rifaximina interfiere en múltiples etapas implicadas en las interacciones hospedero-AIEC relacionadas con la EII, incluyendo la expresión de genes de virulencia, la motilidad, la adhesión e invasión de células epiteliales, la persistencia en macrófagos y la secreción de citocinas proinflamatorias (Dogan *et al.*, 2018); sin embargo, la aparición de cepas resistentes limita su potencial terapéutico. En la actualidad se han descrito mutaciones puntuales en el

gen *rpoB* en cuatro regiones: en el clúster N-terminal (codones 143 a 148) y los clústeres I (codones 505 a 537), II (codones 563 a 575) y III (codones 684 a 690) (Campbell *et al.*, 2001).

Por otra parte , se ha descrito un mecanismo adicional implicado en la resistencia a la rifaximina; la actividad de los sistemas de bombas de eflujo AcrAB-TolC en bacterias gram-negativas, los cuales tienen la capacidad de expulsar compuestos químicamente no relacionados, reduciendo así la concentración intracelular del fármaco. Tanto las mutaciones en el gen *rpoB* como la actividad de las bombas de eflujo AcrAB-TolC, ya sea que esten presentes juntas o de manera independiente, contribuyen al desarrollo de resistencia a la rifaximina (Kothray *et al.*, 2013).

### 3. Antecedentes

#### 3.1 Antecedentes generales

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) ha ganado importancia en los últimos años y se ha posicionado como un problema de salud alrededor del mundo, únicamente en Norteamérica y Europa alrededor de 1.5 y 2 millones respectivamente padecen la enfermedad. En México, Yamamoto-Furusho y colaboradores reportaron que el número promedio anual de casos nuevos incrementó de 28.1 (1987-1996) a 76.1 (1997-2006) y se espera que aumente su incidencia en los próximos 15 años (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2020).

Aunque la etiología de la EII permanezca poco clara, la aparición y desarrollo de esta enfermedad se ha asociado a la presencia de *Escherichia coli* adherente-invasiva (AIEC), un patotipo de reciente denominación (Zheng *et al.*, 2022). En Francia en 1998 Darfeuille y colaboradores describieron por primera vez cepas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias de mucosa ileal de pacientes con Enfermedad de Crohn (EC) que portaban pili tipo 1 y contaban con una mayor capacidad de adhesión a células Caco-2, sugiriendo que estas cepas se encontraban involucradas en procesos inflamatorios e infecciosos del intestino del hospedero. Adicionalmente, ninguna de estas cepas presentó algún gen de virulencia específico que les permitiera identificarse como cierto patotipo diarreogénico de *E. coli* (Darfeuille *et al.*, 1998).

Un año después, también en Francia en 1999, Boudeau y colaboradores realizaron un estudio en el cual se comparó la capacidad de invasión de una cepa de *E. coli* denominada como LF82 aislada de una biopsia de mucosa ileal de un paciente con Enfermedad de Crohn (EC), con respecto a las cepas pertenecientes a los patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* difuso-adherente (DAEC), demostrando así una mayor capacidad de invasión por parte de la cepa LF82, por lo que no se pudo clasificar dentro de uno de los patotipos diarreogénicos, permitiendo proponer un nuevo

patotipo denominado como *Escherichia coli* adherente-invasiva (AIEC) (Boudeau *et al.*, 1999).

En el mismo país en el año 2007 Rolhion y colaboradores describen que las cepas pertenecientes al patotipo AIEC están estrechamente relacionadas con la etiología y patogénesis de la EII; nuevamente reportaron que AIEC no contó con algún marcador genético de virulencia que pudiera diferenciarlo de otros patotipos; sin embargo, propusieron tres criterios fenotípicos de inclusión para designar a AIEC: 1) Capacidad de adhesión e invasión a las células epiteliales intestinales dependiente del reclutamiento de microfilamentos de actina y microtúbulos; 2) Capacidad de supervivencia y replicación en vacuolas dentro de los macrófagos sin desencadenar la muerte de la célula hospedera; 3) Capacidad de inducir la liberación de grandes cantidades de TNF-  $\alpha$  por los macrófagos infectados y la capacidad de formar biopelículas (Rolhion & Darfeuille, 2007).

Un año después, en 2008 en Estados Unidos, Eaves y colaboradores describen una cepa de *E. coli* aislada de una biopsia de una paciente con EC con características similares a la cepa prototipo AIEC LF82; la cepa fue caracterizada como serotipo O83:H1 y nombrada de la misma forma. Adicionalmente, se demostró por primera vez que las cepas O83:H1 y LF82 desempeñan un papel importante en la activación de la respuesta inflamatoria intestinal induciendo la activación de citocinas, así como la inducción de la migración de células inmunitarias en células epiteliales intestinales (Eaves *et al.*, 2008).

Por otra parte, se ha mencionado que el tratamiento farmacológico empleado usualmente para tratar la EII consiste en una combinación de fármacos dentro de los cuales destaca el uso de aminosalicilatos y la rifaximina adicionados con antibióticos betalactámicos, metronidazol o ciprofloxacino. En ese sentido, Dogan y colaboradores reportan que la rifaximina interfiere en las interacciones entre AIEC y el hospedero al inhibir la transcripción de genes de virulencia, lo que reduce su expresión. Como consecuencia, se observa una disminución en la motilidad, la adhesión e invasión de células epiteliales, la persistencia en macrófagos y la secreción de citocinas proinflamatorias (Dogan *et al.*, 2018); sin embargo la aparición de cepas resistentes a este antibiótico suponen una clara limitación en su uso; la rifaximina, al

igual que otras rifamicinas, ejerce su efecto al unirse a la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa bacteriana dependiente de ADN, bloqueando así la elongación del ARN, resultando en la inhibición de la transcripción; Kothary y colaboradores han identificado cepas de *E. coli* resistentes a la rifaximina en pacientes con EII, donde la resistencia se asocia a mutaciones puntuales en el gen *rpoB*, que codifica para la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa. Estas mutaciones se concentran en cuatro regiones del gen *rpoB* y alteran el sitio de acción de la rifaximina, reduciendo su eficacia antimicrobiana (Kothary *et al.*, 2013).

En cuanto a la resistencia a betalactámicos, Martínez y colaboradores en 2020 en España realizaron un estudio en el que se evaluaron los perfiles de susceptibilidad de cepas de AIEC aisladas de pacientes con enfermedad de Crohn y cepas no AIEC frente a 30 antimicrobianos pertenecientes a las familias de betalactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos, quinolonas, inhibidores de la vía del folato y anfenicoles, encontrando que las cepas AIEC presentaron mayor resistencia a los betalactámicos, otorgada principalmente por la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (Martinez-Medina *et al.*, 2020).

Por otra parte, en el año 2023 en Irán, Kharaghani y colaboradores reportaron que la presencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE en pacientes con EII puede propiciar la aparición de una inflamación intestinal subaguda, resultando en una disbiosis intestinal y en una evolución más grave de la enfermedad (Kharaghani *et al.*, 2023). Adicionalmente, el estudio resalta que la alta prevalencia de *E. coli* productora de BLEE debería ser considerada para la correcta selección y aplicación de agentes antimicrobianos como parte fundamental del tratamiento, así como la presencia de cepas de AIEC resistentes a rifaximina, que forma parte del tratamiento de elección.

### 3.2 Antecedentes específicos

En México en el año 2018 en la ciudad de Puebla, Barrios-Villa y colaboradores aislaron cuatro cepas de *E. coli* de muestras de heces de personas clínicamente sanas pertenecientes al secuenciotipo ST131. Las cepas se describieron como AIEC ya que presentaron la capacidad de adhesión, invasión y supervivencia en macrófagos (Barrios-Villa *et al.*, 2018). Nuevamente, Barrios-Villa y colaboradores en 2020 realizaron la secuenciación y análisis bioinformático de cinco genomas de cepas clasificadas como AIEC; estos genomas fueron comparados con las cepas prototipo de AIEC, LF82 y NRG857c (O83:H1) y con la cepa uropatógena CFT073. Los cinco genomas analizados presentaron mayor similitud cepas AIEC y UPEC y adicionalmente se confirmó la presencia de genes de virulencia relacionados frecuentemente con cepas AIEC (*fimA*, *fliC*, *chuA*, *irp2*, *cvaC2*) (Barrios-Villa *et al.*, 2020).

Posteriormente, Lara-Flores en 2018 (datos no publicados) aisló 66 cepas de *E. coli* a partir de biopsias intestinales de tres pacientes con EII. El diagnóstico de los pacientes fue el siguiente:

-Paciente 1: Masculino de 23 años diagnosticado con Colitis Ulcerosa Crónica Indeterminada (CUCI) con un tratamiento previo de trimetoprim/sulfametoxazol, la biopsia se obtuvo del colon descendente y transversal, aislando 37 cepas de *E. coli*.

-Paciente 2: Femenino de 61 años diagnosticado con Colitis Crónica y Diverticulitis. Presentó un tratamiento previo de ciprofloxacino y rifaximina, la biopsia se obtuvo del colon sigmoide, aislando de esta manera 22 cepas.

-Paciente 3: Masculino de 34 años diagnosticado con CUCI con un tratamiento previo de metronidazol, ciprofloxacino y ceftriaxona. En este paciente la biopsia fue obtenida del colon descendente y ano, aislando únicamente 7 cepas de *E. coli*.

Las cepas se conservaron en criopreservación en el cepario del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC) del Centro de Investigaciones de Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Posteriormente, en el año 2023 en el LMHyC, De la Torre-Perdomo sometió a las 66 cepas recuperadas a un ensayo de susceptibilidad frente a rifaximina mediante la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), observando que 20 cepas mostraron una CMI de 32 µg/ml de rifaximina, caracterizándolas de esta forma como resistentes a este antibiótico según Dogan y colaboradores (Dogan *et al.*, 2018), 19 cepas fueron aisladas del paciente 2 y una cepa del paciente 3. Así mismo, en ese mismo estudio se realizó la búsqueda de genomas AIEC en la base de datos pública *GenBank*, identificando 29 genomas, los cuales fueron sometidos al análisis bioinformático para identificar mutaciones en el gen *rpoB* asociadas con la resistencia a rifaximina, encontrando dos polimorfismos no reportadas anteriormente (G329D y A1263E) en las cepas prototipo HM605 y LF82, respectivamente; no se ha demostrado su papel en la resistencia a rifaximina (De la Torre, 2023).

Finalmente, siguiendo el trabajo anterior en el año 2024 Maldonado-Gálvez realizó la determinación del perfil de susceptibilidad de las 66 cepas anteriores frente a 17 antibióticos pertenecientes a 11 grupos utilizando el método de Kirby-Bauer de acuerdo con las especificaciones del manual CLSI 2023 (CLSI, 2023). Todas las cepas se clasificaron como multidrogorresistentes (MDR) según la clasificación de Magiorakos. Además, mediante la técnica de difusión con doble disco se identificaron 16 cepas del paciente 1 como productoras de BLEE (Maldonado-Gálvez, 2024).

Por lo anterior, el presente estudio planteó como objetivo identificar la relación clonal de 36 cepas aisladas de biopsias de pacientes con EII, así como identificar las mutaciones presentes en el gen *rpoB* de 20 cepas resistentes a rifaximina y los genes asociados a la producción de BLEE en cepas secuenciadas a través de un análisis bioinformático.

#### 4. Justificación

La EII es escasamente reportada en México, aunque la última revisión de casos en el año 2015 menciona que existieron 43,013 casos de EC y CUCI en hombres y mujeres. Una de las causas principales es el uso de la colonoscopia considerado el estándar de oro como diagnóstico de EII; sin embargo, este procedimiento resulta limitado ya que puede ser costoso, invasivo y doloroso para el paciente.

Por otra parte, a pesar de que la etiología de la EII es multifactorial, el cambio en el contenido de la microbiota intestinal es considerado un factor determinante; principalmente reflejado en el incremento de enterobacterias, dentro las cuales resalta el patotipo de *E. coli* denominado como AIEC.

Además del tratamiento clásico sugerido por el médico tratante, se integra el uso de la rifaximina, un antibiótico no absorbible de amplio espectro; que en la mayoría de los casos se adiciona en conjunto con otros antibióticos como betalactámicos, ciprofloxacino o metronidazol. Lo anterior puede condicionar a la aparición de cepas AIEC multidrogorresistentes (MDR), y/o productoras de BLEE, lo cual dificulta la aplicación de un tratamiento efectivo. Adicionalmente, puede darse una potencial diseminación de genes de resistencia a otras cepas de interés clínico e incluso medioambientales.

Por lo que el presente trabajo se centró en conocer la relación clonal de cepas MDR y productoras de BLEE recuperadas de biopsias de pacientes con EII, que potencialmente podrían considerarse pertenecientes al patotipo AIEC. Además, mediante un análisis bioinformático, se identificaron mutaciones en el gen *rpoB* y se evaluó la presencia de los genes asociados con la resistencia a betalactámicos y rifaximina.

## 5. Planteamiento del problema

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es un trastorno crónico del tracto gastrointestinal que afecta significativamente la calidad de vida de los pacientes que la padecen. Su etiología es multifactorial, aunque está mayormente asociada al cambio de la microbiota intestinal, resultando en un incremento de bacterias potencialmente patógenas, principalmente enterobacterias. Particularmente, el patotipo *Escherichia coli* adherente invasiva (AIEC) se ha asociado con la aparición de la EII, el cual es caracterizado por su capacidad de adherirse, invadir y sobrevivir dentro de los macrófagos, promoviendo así una respuesta inflamatoria crónica.

La rifaximina, ha sido utilizada en el tratamiento de la EII promoviendo la disminución de este tipo de bacterias; sin embargo, la aparición de cepas AIEC resistentes a rifaximina resultan de importancia clínica ya que limita las opciones terapéuticas y puede contribuir al fracaso del tratamiento. Así mismo, la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en estas cepas agrava aún más la situación del tratamiento, ya que confieren resistencia a una amplia gama de antibióticos betalactámicos, impidiendo el desarrollo de estrategias efectivas para el manejo de la enfermedad y la prevención de la resistencia antimicrobiana.

Finalmente, la carencia de información genética de bacterias como *E. coli* recuperadas de pacientes con EII, representa un problema para tratar de manera eficaz el padecimiento. Por lo que en este trabajo se caracterizó genéticamente la virulencia y resistencia a antibióticos de cepas de *E. coli* asociadas a la EII; lo que permitirá proponer tratamientos efectivos y medidas de control eficaces.

## **6. Hipótesis científica**

Las cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con EII, ya sean resistentes a rifaximina con mutaciones en el gen *rpoB* o productoras de serin-betalactamasas, pertenecen a linajes clonales diferentes; esto de acuerdo con la fuente y sitio anatómico de aislamiento.

## 7. Objetivos

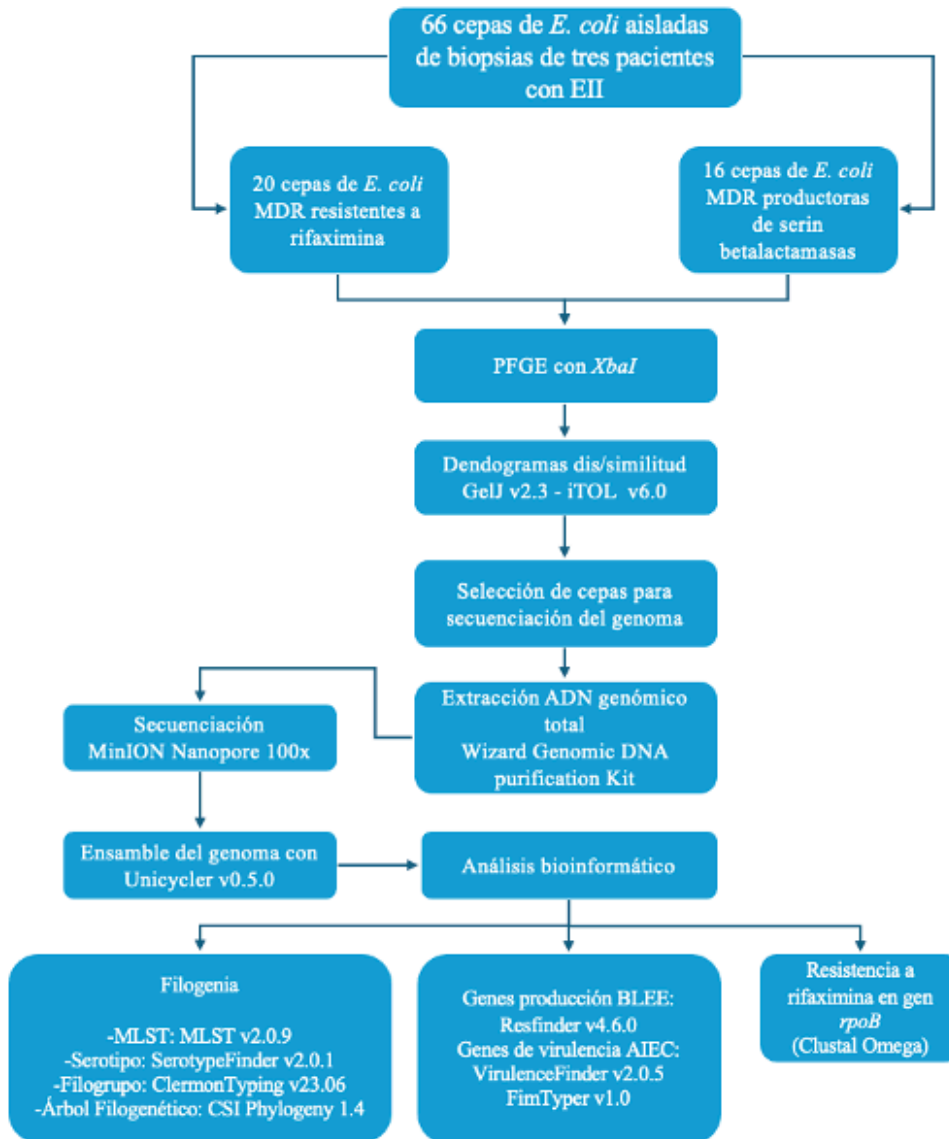
### 7.1 Objetivo general

Determinar la clonalidad e identificar genes asociados a la resistencia a rifaximina y producción de BLEE, en cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

### 7.2 Objetivos específicos

1. Determinar la relación clonal de 36 cepas de *Escherichia coli* reportadas como resistentes a rifaximina o productoras de serin-betalactamasas (TEM, OXA, CTX-M, SHV).
2. Realizar secuenciación del genoma completo de seis cepas de *E. coli* seleccionadas de acuerdo con su relación clonal y resistencia a rifaximina o producción de serin-betalactamasas.
3. Identificar mediante análisis bioinformático las mutaciones en el gen *rpoB* asociados a la resistencia a rifaximina y los genes asociados a la producción de serin-betalactamasas.
4. Identificar mediante análisis bioinformático el secuenciotipo y serotipo de las cepas secuenciadas de AIEC.
5. Determinar la similitud de los genomas secuenciados con genomas de AIEC de bases de datos públicas.

### 7.3 Estrategia de trabajo



## **8. Material y métodos**

### **8.1 Diseño del estudio**

Observacional, transversal.

### **8.2 Ubicación espacio-temporal**

El estudio fue realizado en la ciudad de Puebla, Puebla durante el periodo de agosto de 2023 hasta agosto de 2024, en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC) perteneciente al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias (ICUAP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

### **8.3 Muestreo**

El Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad cuenta con 66 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de tres pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Las biopsias fueron obtenidas en centros de salud por personal capacitado y posteriormente en el LMHyC fueron procesadas por la médica Norarizbeth Lara Flores para aislar, identificar y conservar las cepas de *E. coli*. Posteriormente, todas las cepas que fueron identificadas fenotípica y molecularmente como *E. coli* se sometieron a estudios de susceptibilidad antimicrobiana por Maldonado-Gálvez y de la Torre-Perdomo, recuperando 36 cepas que fueron resistentes a rifaximina o productoras de serin-betalactamasas.

#### **8.3.1 Definición de la unidad de la población**

Se trabajó con 36 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de tres pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal; 16 cepas del paciente uno, 19 cepas del paciente dos y una cepa del paciente tres.

### **8.3.2 Selección de la muestra**

Se seleccionaron todas las cepas identificadas fenotípica y molecularmente como *E. coli* resistentes a rifaximina o productoras de serin-betalactamasas.

### **8.3.3 Criterios de selección de las unidades de muestreo**

#### **8.3.3.1 Criterios de inclusión**

1. Cepas de *E. coli* productoras de BLEE de acuerdo con la técnica de difusión de doble disco.
2. Cepas de *E. coli* resistentes a rifaximina.

#### **8.3.3.2 Criterios de exclusión**

Todas las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal caracterizadas como sensibles a rifaximina y no productoras de serin-betalactamasas.

#### **8.3.3.3 Criterios de eliminación**

Cepas contaminadas o no viables/cultivables.

### **8.3.4 Diseño y tipo de muestreo**

Muestreo no probabilístico a conveniencia del estudio.

### **8.3.5 Tamaño de la muestra**

Se incluyeron 36 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de tres pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal resistentes a rifaximina o productoras de betalactamasas de espectro extendido.

## **8.4 Definición de las variables y escalas de medición**

Se utilizó el coeficiente de DICE para la construcción de dendogramas (Sahni *et al.*, 2018). La ausencia o presencia de genes que codifican serin-betalactamasas, así como las mutaciones en el gen *rpoB* también fueron consideradas como variables.

## **8.5 Método de recolección de datos**

Se contó con una base de datos previa que contuvo los datos fenotípicos de la resistencia a antibióticos; los datos obtenidos para la generación de dendogramas y la ausencia y presencia de genes fueron añadidos a la base de datos, para lo cual se utilizó una tabla de Excel.

## **8.6 Técnicas y procedimientos**

### **8.6.1 Material biológico**

Se trabajó con 36 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de tres pacientes diagnosticados con EII; 16 de estas cepas pertenecen al paciente uno, masculino, diagnosticado con CUCI; 19 cepas pertenecen al paciente dos, femenino, diagnosticado con colitis crónica y diverticulitis; y una cepa perteneciente al paciente tres, masculino, diagnosticado con CUCI. Las cepas fueron aisladas del colon descendente y transverso (paciente uno), colon sigmoide (paciente dos) y colon descendente y ano (paciente tres).

### **8.6.2 Determinación de clonalidad**

Para determinar la clonalidad en las cepas a estudiar se realizó la técnica de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) con la enzima de restricción *XbaI*.

#### **8.6.2.1 Preparación de insertos**

A partir de un cultivo puro crecido en BHI (BD Dioxon) durante 24 horas a 37°C, se realizó una suspensión en 3 ml de buffer TE (10mM Tris y 1mM EDTA) hasta conseguir una turbidez de 3.0 en escala McFarland (equivalente a  $9.0 \times 10^8$  UFC/ml). Se preparó agarosa de bajo punto de fusión (agarose D-5, Pronadisa, Conda) al 1.5% en buffer TE y se mantuvo a 54°C en baño maría; posteriormente se mezcló 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 20 minutos en refrigeración (7°C) (**Anexo 1**).

#### **8.6.2.2 Lisis bacteriana**

Para la lisis bacteriana se utilizaron dos insertos por cepa a los cuales se les añadió 1 ml de buffer de lisis [50 mM Tris; 50 mM EDTA pH 8; 1% sarcosil; 0.3 mg/ml proteinasa K (Thermo Fisher Scientific®)] y se incubó 24 horas a 54°C en baño maría.

Posteriormente se procedió a lavar los insertos, iniciando con la eliminación del buffer de lisis, se realizaron los siguientes lavados, agregando:

- a) Se inició con 10 ml de agua destilada estéril cada 10 min y se incubó a 54°C, tres veces.
- b) 7 ml de Buffer TE cada 10 min y se incubó a 54°C, dos veces.
- c) 7 ml de buffer TE a temperatura ambiente, una vez.

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

#### **8.6.2.3 Digestión enzimática**

Se realizó la digestión de medio inserto de cada cepa con la enzima de restricción *XbaI*. El volumen final del buffer de digestión fue de 100 µl por tubo, a los que se les añadió 2 µl de enzima *XbaI* (New England, Biolabs), 10 µl de Buffer 10X de la enzima y agua miliQ estéril. La mezcla y el inserto se incubó durante 6 h a 37°C.

Reacción:

Enzima *XbaI*: 2 µl

Buffer 10X: 10 µl

Agua: 88 µl

Vol. Final: 100 µl

Una vez finalizado el tiempo, 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®) y se incubó en hielo

durante 10 min. El exceso de sarcosil se eliminó usando papel absorbente momentos antes de cargar el inserto en el gel de agarosa.

Los sitios de corte de la enzima de restricción *XbaI* se presentan en el **Anexo 2**.

#### **8.6.2.4 Preparación del gel de agarosa**

Se preparó un gel de agarosa (Pulsed Field Certified Agarose. Biorad®) al 1.2% disuelta en buffer TBE 0.5X. Los pozos en el gel se llenaron con los insertos, cargando en tres pozos el marcador de peso molecular (MidRange PFGE Marker de New England, BioLabs); finalmente, los pozos se sellaron con agarosa.

#### **8.6.2.5 Electroforesis**

La electroforesis se realizó en la cámara CHEF-DR II (BioRad) con 2,850 ml de buffer 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 segundos durante 23 h a 14°C.

#### **8.6.2.6 Tinción y visualización del gel**

El gel se tiñó durante 5 min en una solución acuosa de 200 ml de bromuro de etidio (BET) [10 µl de BET (Sigma-Aldrich) / 200 ml de agua tridestilada]. El gel se destiñó en agua destilada, se fotografió periódicamente hasta una correcta visualización en el fotodocumentador (Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro).

### **8.6.3 Realización de dendrogramas de dis/similitud**

Una vez realizada la técnica de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados se realizaron dendrogramas de dis/similitud utilizando el software GelJ v2.3 con el coeficiente de similitud DICE (<https://sourceforge.net/projects/gelj/files/geljv2.zip/download>) (Heras *et al.*, 2015) y el dendrograma generado se visualizó con el software iTOL v6.0 (<https://itol.embl.de/>) (Letunic & Bork, 2024).

#### **8.6.4 Selección de cepas y secuenciación**

Con base a los datos obtenidos en los dendrogramas, se seleccionaron 6 cepas para secuenciar su genoma completo.

Las características consideradas fueron:

- Todas las cepas debieron ser resistentes a rifaximina o determinarse como productoras de serin-betalactamasas.
- Con base a la tipificación clonal, que pertenecieran a clados y a orígenes distintos.

Se extrajo el ADN genómico total utilizando el Wizard Genomic DNA Purification Kit siguiendo las indicaciones del fabricante. La secuenciación se realizó mediante MinION Nanopore (Oxford) de lecturas largas y con una profundidad de 100x en la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB) del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

#### **8.6.5 Análisis bioinformático de filogenia, genes de virulencia y genes asociados a la producción de serin-betalactamasas**

Se realizó el ensamble de las secuencias utilizando la herramienta Unicycler v0.5.0. Posteriormente se realizó el análisis de filogenia utilizando el Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages (UPGMA) con base a los SNP, utilizando el gráfico de Newick obtenido con CSI Phylogeny v1.4 (<https://cge.food.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/>), (consultado en septiembre de 2024) (Bortolaia *et al.*, 2020), el MLST se determinó con la herramienta MLST v2.0.9 (<https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>), (consultado en julio de 2024) (Madeira *et al.*, 2024), el serotipo se determinó utilizando SerotypeFinder v2.0.1 (<https://cge.food.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>), (consultado en julio de 2024) (Joensen *et al.*, 2015) y el filogrupo se confirmó utilizando ClermonTyping v23.06 (<http://clermontyping.iame-research.center/>), (consultado en julio de 2024) (Beghain *et al.*, 2018).

Posteriormente se identificaron genes de resistencia asociados a la producción de serin-betalactamasas (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, y *bla<sub>SHV</sub>*) en los genomas de las cepas secuenciadas

utilizando el servicio ResFinder v4.0 (<http://genepi.food.dtu.dk/resfinder/>), (consultado en julio de 2024) (Bortolaia *et al.*, 2020). Adicionalmente, los genes asociados a la virulencia de AIEC fueron identificados utilizando las herramientas VirulenceFinder v2.0.5 (<https://cge.food.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>), (consultado en julio de 2024) (Malberg *et al.*, 2020) y FimTyper v1.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/FimTyper/>), (consultado en julio de 2024) (Roer *et al.*, 2017).

#### **8.6.6 Identificación de mutaciones *in silico* en el gen *rpoB* asociado a la resistencia a rifaximina**

Se identificaron las mutaciones presentes en la secuencia del gen *rpoB* en los genomas de las cepas secuenciadas realizando alineamientos con la secuencia del genoma *Escherichia coli* K12 (NC\_000913.3) como control, mediante la herramienta Clustal Omega Multiple Sequence Alignment (MSA) del EMBL's European Bioinformatics Institute (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) (Madeira *et al.*, 2024). Adicionalmente se identificaron las mutaciones en la estructura de la proteína RpoB mediante el análisis bioinformático. (**Anexo 3**).

#### **8.7 Análisis de datos**

Posteriormente a la realización de la Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) y la generación de dendrogramas de dis/similitud, se realizó un análisis para identificar una posible relación clonal utilizando el coeficiente de similitud de DICE. Este coeficiente se utiliza para evaluar la relación entre aislados, considerando que una cepa está estrechamente relacionada con la cepa del brote si su patrón de PFGE presenta diferencias mínimas en comparación con el patrón del brote. Tales diferencias suelen estar asociadas con cambios genéticos consistentes, como mutaciones puntuales o inserciones/deleciones de ADN, se observar en PFGE por un patrón en la aparición de bandas diferente (Tenover *et al.*, 1995).

Los genomas de las cepas secuenciadas se analizarán utilizando los servicios en línea del Center for Genomic Epidemiology y el servicio de alineamiento de secuencias en línea Clustal Omega para verificar la presencia de serin-betalactamasas y mutaciones en el gen *rpoB* respectivamente.

Finalmente, se expresaron los resultados en frecuencia (genomas con presencia de genes/genomas analizados) de acuerdo con la presencia o ausencia en cada uno de los genomas.

## 9. Resultados

### 9.1 Determinación de relación clonal a través de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) con la enzima *XbaI*

Una vez realizada la técnica de PFGE se generaron los dendrogramas correspondientes. En el primer dendrograma se agruparon las 16 cepas productoras de serin-betalactamasas aisladas del paciente uno en 9 diferentes pulsotipos (**Figura 1**), a la vez que se identificaron 6 clados. (**Tabla 1**).

Los pulsotipos se definen como un patrón distintivo de huella genética generado por PFGE, donde los aislamientos con una similitud  $\geq 80\%$  se consideran parte del mismo pulsotipo, de acuerdo con los criterios de Tenover. Estos criterios establecen cuatro categorías para la clasificación de los aislamientos según el número y tamaño de las bandas observadas:

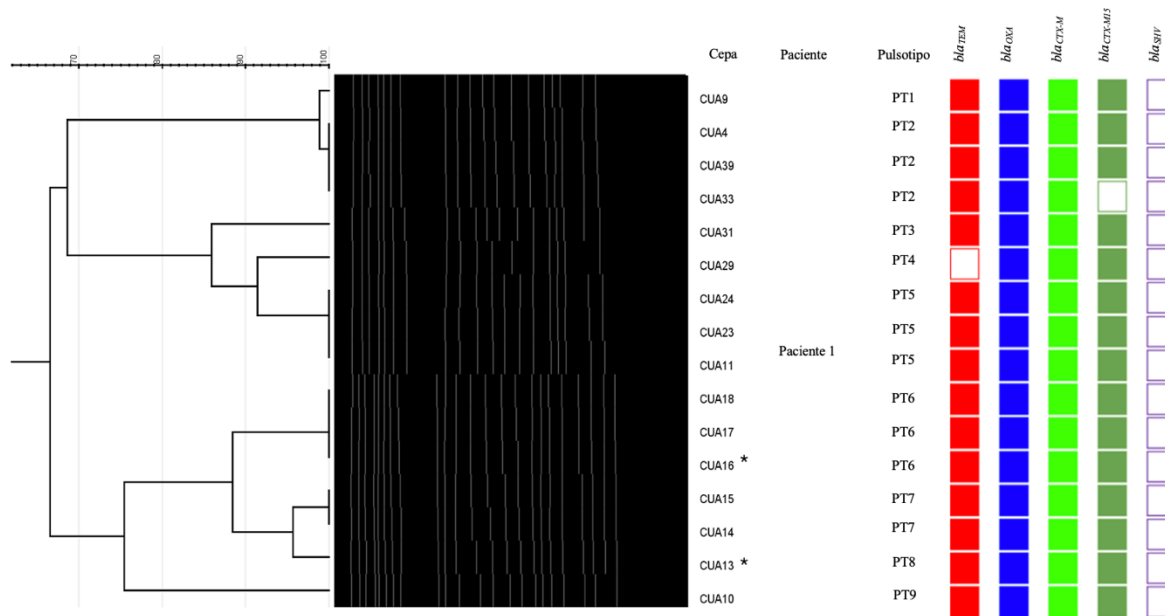
- Indistinguibles: Mismo número y tamaño de bandas. Probablemente la misma cepa.
- Estrechamente relacionadas (1–3 bandas de diferencia): Variación genética menor (ej. mutación puntual, pérdida de plásmido).
- Posiblemente relacionadas (4–6 bandas): Antecesor común pero con divergencia.
- No relacionadas ( $\geq 7$  bandas): Cepas diferentes.

Del mismo modo, según los criterios de Tenover se define un clado como un grupo de aislamientos bacterianos con patrones de bandas altamente similares ( $>85\text{--}90\%$ ), lo que sugiere un ancestro común reciente y posible vinculación epidemiológica.

Para la posterior secuenciación del genoma completo se seleccionaron las cepas CUA13 perteneciente al pulsotipo 8 y al clado “E” y la cepa CUA16 perteneciente al pulsotipo 6 y al clado “D” con base al dendrograma, así mismo se consideró la información del perfil de susceptibilidad de cada cepa de acuerdo con Maldonado-Gálvez, 2024, quien

previamente las caracterizó como MDR al presentar resistencia a 12 antibióticos pertenecientes a 6 clases de antibióticos : betalactámicos (ampicilina y amoxicilina con ácido clavulánico), cefalosporinas (cefoxitina, ceftazidima, cefotaxima y cefepime), monobactamas (aztreonam), quinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacino), aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina) tetraciclinas (tetraciclina) y sulfonamidas (trimetoprim con sulfametoxazol).

Los resultados muestran que el 100% de las cepas (16/16) presentaron los genes *bla<sub>OXA</sub>* y *bla<sub>CTX-M</sub>*, mientras que ninguna cepa presentó el gen *bla<sub>SHV</sub>* (**Figura 1**). Por su parte, El 93% de las cepas (15/16) presentaron los genes *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>CTX-M15</sub>*, excepto las cepas CUA29 y CUA33 respectivamente.



**Figura 1. Dendrograma de dis/similitud de cepas productoras de serin-betalactamasas aisladas del paciente uno.** Valores superiores a 0.9 del coeficiente de DICE se determinó para establecer miembros del mismo linaje clonal. Datos no publicados. Los genes asociados a la producción de serin-betalactamasas fueron determinados por PCR y proporcionados por Maldonado-Gálvez, 2024. \*Cepas secuenciadas. Cuadro relleno: Presencia; cuadro vacío: Ausencia. Realizado con iTOL v6.0.

**Tabla 1. Agrupación de 16 cepas productoras de serin-betalactamasas en clados.**

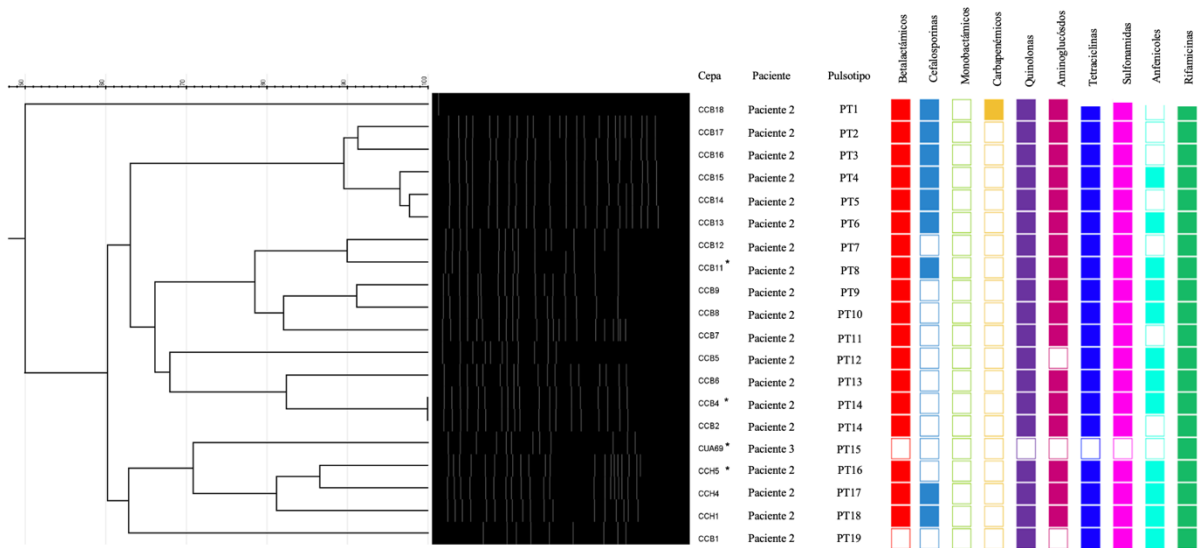
<b>Grupo</b>	<b>Cepas</b>
<b>A</b>	<b>CUA9, CUA4, CUA39, CUA33</b>
<b>B</b>	<b>CUA31</b>
<b>C</b>	<b>CUA29, CUA24, CUA23, CUA11</b>
<b>D</b>	<b>CUA18, CUA17, CUA16</b>
<b>E</b>	<b>CUA15, CUA14, CUA13</b>
<b>F</b>	<b>CUA10</b>

En el segundo dendrograma se agruparon las 20 cepas resistentes a rifaximina aisladas de los pacientes dos (n=19) y tres (n=1) en 19 diferentes pulsotipos (**Figura 2**) y en 13 clados (**Tabla 2**).

De forma complementaria, se seleccionaron las cepas CCB4 perteneciente al pulsotipo 14 y al clado “I” y la cepa CCB11 perteneciente al pulsotipo 8 y al clado “D” con base al dendrograma y su perfil de susceptibilidad reportado por Maldonado-Gálvez, 2024. Las cepas fueron reportadas como resistentes a 9 y 10 antibióticos respectivamente, pertenecientes a 9 clases de antibióticos: betalactámicos (ampicilina y amoxicilina con ácido clavulánico), cefalosporinas (cefoxitina, ceftazidima, cefotaxima y cefepime), monobactamas (aztreonam), quinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacino), aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina), tetraciclinas (tetraciclina), sulfonamidas (trimetoprim con sulfametoxazol), anfenicoles (cloranfenicol) y rifamicinas (rifaximina).

Adicionalmente para la secuenciación se seleccionó la cepa CCH5 debido a que mostró las mismas características de resistencia fenotípica que las cepas CCB4 y CCB11; sin embargo, esta cepa fue aislada de heces, mientras que las cepas CCB4 y CCB11 fueron aisladas de biopsias. Por último, se seleccionó la cepa CUA69 perteneciente al pulsotipo 15 y al clado “J” resaltando que fue la única cepa resistente a rifaximina aislada de la biopsia del paciente tres.

Previamente de la Torre- Perdomo, 2023 reportó que el 100% de las cepas (20/20) presentó resistencia a rifaximina, además 19 cepas presentaron resistencia a quinolonas, tetraciclinas y sulfonamidas, mientras que el 90% de las cepas (18/20) presentó resistencia a betalactámicos, en tanto que el 60% de las cepas (12/20) presentó resistencia a anfenicoles, así mismo, el 45% de las cepas (9/20) presentó resistencia a cefalosporinas, únicamente la cepa CCB18 presentó resistencia a meropenem (carbapenémico) y ninguna cepa presentó resistencia a monobactamas, esta información se compila en la **Figura 2.**



**Figura 2. Dendrograma de dis/similitud de cepas resistentes a rifaximina aisladas de los pacientes dos y tres.** Coeficiente de DICE. Valores superiores a 0.9 del coeficiente de DICE se determinó para establecer miembros del mismo linaje clonal. El perfil de resistencia fue determinado por el método de Kirby-Bauer y proporcionado por Maldonado-Gálvez, 2024.\*Cepas secuenciadas. Cuadro relleno: Resistente; cuadro vacío: Sensible. Realizado con iTOL v6.0.

**Tabla 2: Agrupación de 20 cepas resistentes a rifaximina en clados.**

<b>Grupo</b>	<b>Cepas</b>
<b>A</b>	<b>CCB18</b>
<b>B</b>	<b>CCB17, CCB16</b>
<b>C</b>	<b>CCB15, CCB14, CCB13</b>
<b>D</b>	<b>CCB12, CBB11</b>
<b>E</b>	<b>CCB9, CBB8</b>
<b>F</b>	<b>CCB7</b>
<b>G</b>	<b>CCB5</b>
<b>H</b>	<b>CCB6</b>
<b>I</b>	<b>CCB4, CCB2</b>
<b>J</b>	<b>CUA69</b>
<b>K</b>	<b>CCH5, CCH4</b>
<b>L</b>	<b>CCH1</b>
<b>M</b>	<b>CCB1</b>

## **9.2 Análisis bioinformático de filogenia, genes de virulencia y genes asociados a la producción de serin-betalactamasas**

El análisis incluyó las seis secuencias de las cepas analizadas (CCB4, CCB11, CCH5, CUA69, CUA13 y CUA16), además se utilizaron 45 genomas adicionales provenientes de bases de datos públicas para establecer la filogenia de las cepas en este estudio. Dentro de estos genomas se incluyeron 30 genomas identificados como AIEC que fueron recolectados por Aguirre-Lara, 2023, adicionalmente se emplearon 9 genomas establecidos como genomas prototipo de DEC (EPEC, EAEC, STEC, EHEC, DAEC, EIEC, ETEC) y ExPEC (UPEC, NMEC)) (**Anexo 4**).

Los resultados muestran que las cepas del paciente uno (CUA13 y CUA16) presentaron el secuenciotipo 450 y pertenecieron al filogrupo A, por otra parte, las cepas del paciente dos (CCB4, CCB11 y CCH5) presentaron el secuenciotipo 648 y se asociaron al filogrupo F y la cepa del paciente tres (CUA69) presentó el secuenciotipo 206 y el filogrupo A.

Además de eso, pudimos identificar cuatro de los genes asociados a BLEE (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>CTX-M15</sub>) únicamente en las cepas CUA13 y CUA16 provenientes del paciente uno.

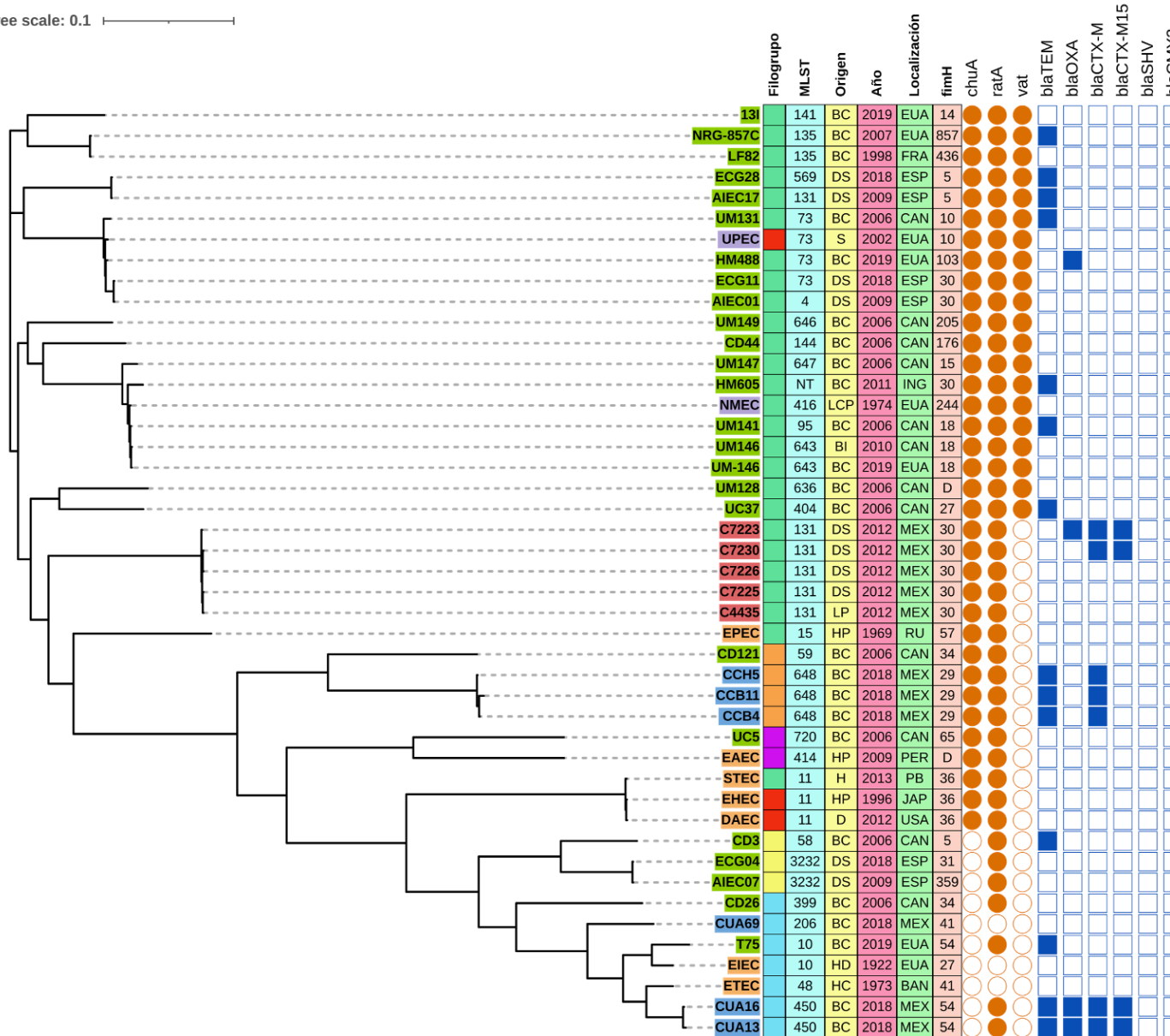
Además al analizar los genes de virulencia se encontró que las cepas del paciente dos CCB4, CCB11 y CCH5 presentaron dos de los tres genes de virulencia *chuA* y *ratA*, mientras que las cepas del paciente uno CUA13 y CUA16 solo presentaron el gen *ratA* y la cepa CUA69 del paciente tres no presentó ninguno de los genes.

Por otra parte, también se caracterizaron los genomas de 45 cepas adicionales provenientes de bases de datos públicas, a través del filogruppo, el MLST, genes asociados a la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), genes asociados a la virulencia del patotipo AIEC, el origen, el año y la localización (**Figura 3**). En los 45 genomas se identificaron seis filogrupos, el 57% (26/45) pertenecieron al filogruppo B2, siendo el más predominante contrastando con los resultados de las 6 cepas analizadas en este estudio (**Figura 3**).

Así mismo, dentro del análisis de seis genes asociados a la producción de BLEE (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>CTX-M15</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CMY2</sub>), el gen *bla*<sub>TEM</sub> estuvo presente en el 31% (14/45) de los genomas, el gen *bla*<sub>CTX-M</sub> estuvo presente en el 15% (7/45), en tanto que los genes *bla*<sub>OXA</sub> y *bla*<sub>CTX-M15</sub> estuvieron presentes en el 9% (4/45), mientras que los genes *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CMY2</sub> no se encontraron en ningún genoma. En contraste, solamente las cepas CUA13 y CUA16 aisladas del paciente uno portaban cuatro de los seis genes asociados a la producción de BLEE (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>CTX-M15</sub>). (**Figura 3**).

Se observó en este estudio que CUA13 y CUA16 unicamente portaron el gen *ratA*, mientras que las cepas CCB4, CCB11 y CCH5 aisladas del paciente dos portaban los genes *chuA* y *ratA* asociados a la virulencia de AIEC. Por su parte, al analizar los tres genes asociados a la virulencia de AIEC (*chuA*, *ratA* y *vat*) observamos que el 44% de los genomas (20/45) presentó los tres genes, el 33% (15/45) únicamente presentó los genes *chuA* y *ratA*, el 15% (7/45) presentó el gen *ratA* y el 7% (3/45) careció de los tres genes (**Figura 3**). .

Tree scale: 0.1



**ID Genoma**

- Bases de datos públicas
- Barrios-Villa (2019)
- Control DEC
- Control ExPEC
- Este estudio (LMHyC)

**Filigrupo**

- A
- B1
- B2
- D
- E
- F

**Genes**

- ● Genotipo AIEC
- ■ Genotipo serin betalactamasa

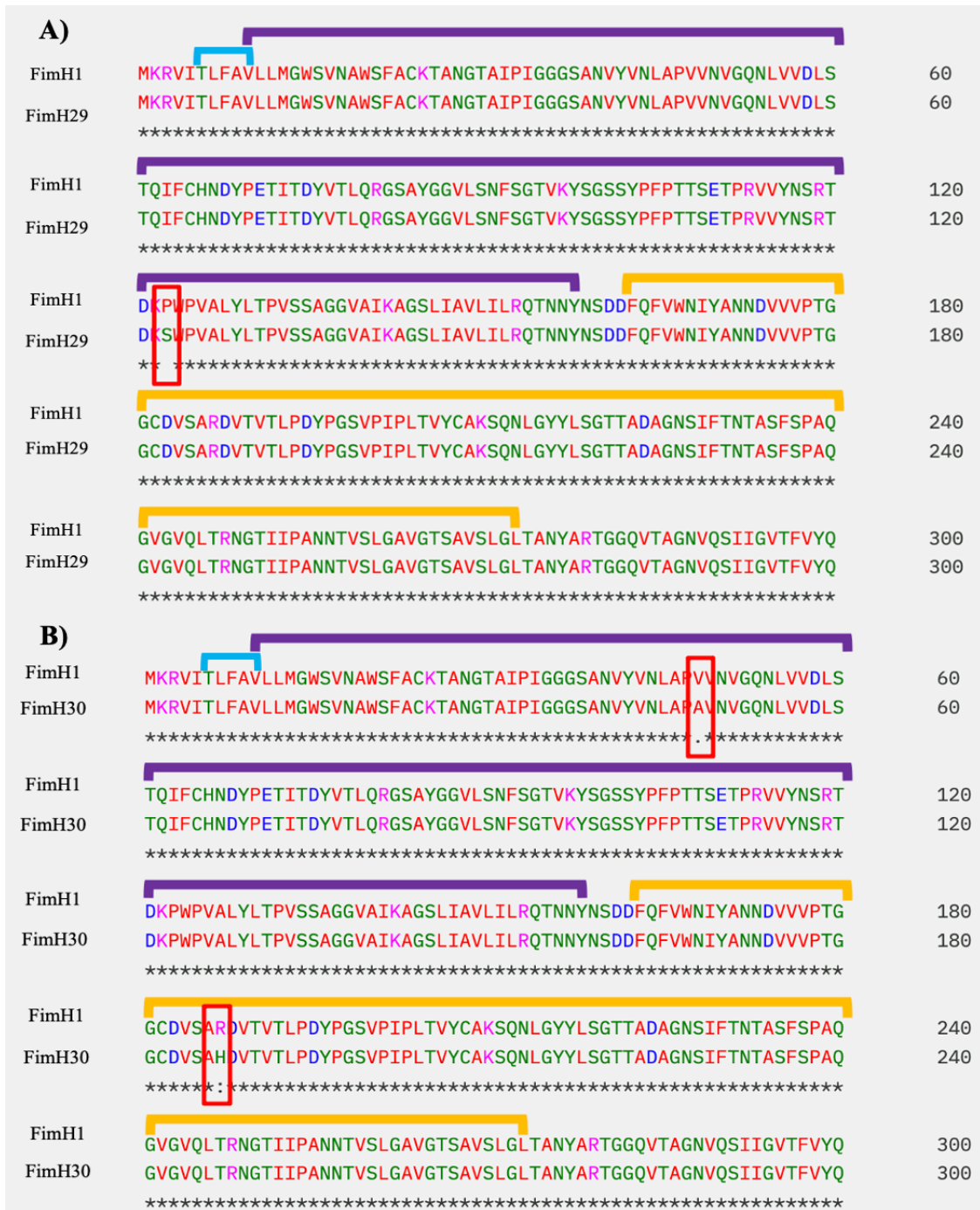
Ausencia Presencia

**Figura 3. Análisis de filogenia de 45 genomas de *Escherichia coli*.** MLST: NT: No tipificable. Origen: BC: Biopsia de colon, DS: Donador sano, S: Sangre, LCP: Líquido cerebroespinal pediátrico, BI: Biopsia de íleo, LP: Líquido peritoneal, HP: Heces pediátricas, H: Heces, HD: Heces diftéricas, HC: Heces coléricas, D: Desconocido. Localización: EUA: Estados Unidos de América, FRA: Francia, ESP: España, CAN: Canadá, ING: Inglaterra, MEX: México, RU: Reino Unido, PER: Perú, PB: Países bajos, JAP: Japón, BAN: Bangladesh. Realizado con iTOL v6.0.

De manera interesante, se observó que todos los genomas de las cepas AIEC proporcionados por Barrios-Villa, 2018 (Barrios-Villa *et al.*, 2018) ubicados geográficamente en Puebla contaron con la variante *fimH*<sub>30</sub> la cual fue la más predominante, mientras que los genomas de las cepas secuenciadas en este estudio presentaron las variantes *fimH*<sub>29</sub> (CCB4, CCB11 y CCH5), *fimH*<sub>41</sub> (CUA69) y *fimH*<sub>54</sub> (CUA13 y CUA16).

### 9.3 Alineamiento de las variantes de FimH en cepas secuenciadas

Al observar la presencia de diferentes variantes de la proteína FimH en las cepas analizadas, se realizaron alineamientos de cada variante de FimH identificada, encontrando que la variante FimH29 (identificada en las cepas CCB4, CCB11 y CCH5) presenta un cambio en el dominio de la lectina (**Figura 4A**); a su vez las variantes FimH30 (identificada en los genomas de cepas AIEC de Barrios-Villa) (**Figura 4B**), FimH41 (identificada en la cepa CUA69) (**Figura 5A**) y FimH54 (identificada en las cepas CUA13 y CUA16) (**Figura 5B**) presentan cambios tanto en el dominio de la lectina como en el dominio de la pilina.



**Figura 4. A) Alineamiento de la proteína FimH de *Escherichia coli* K12 con la variante FimH29. B) Alineamiento de la proteína FimH30** Los recuadros rojos indica un cambio aminoacídicos. Azul: Región del péptido señal, Morado: Región de la lectina, Amarillo: Región de la pilina. Realizado con Clustal Omega.

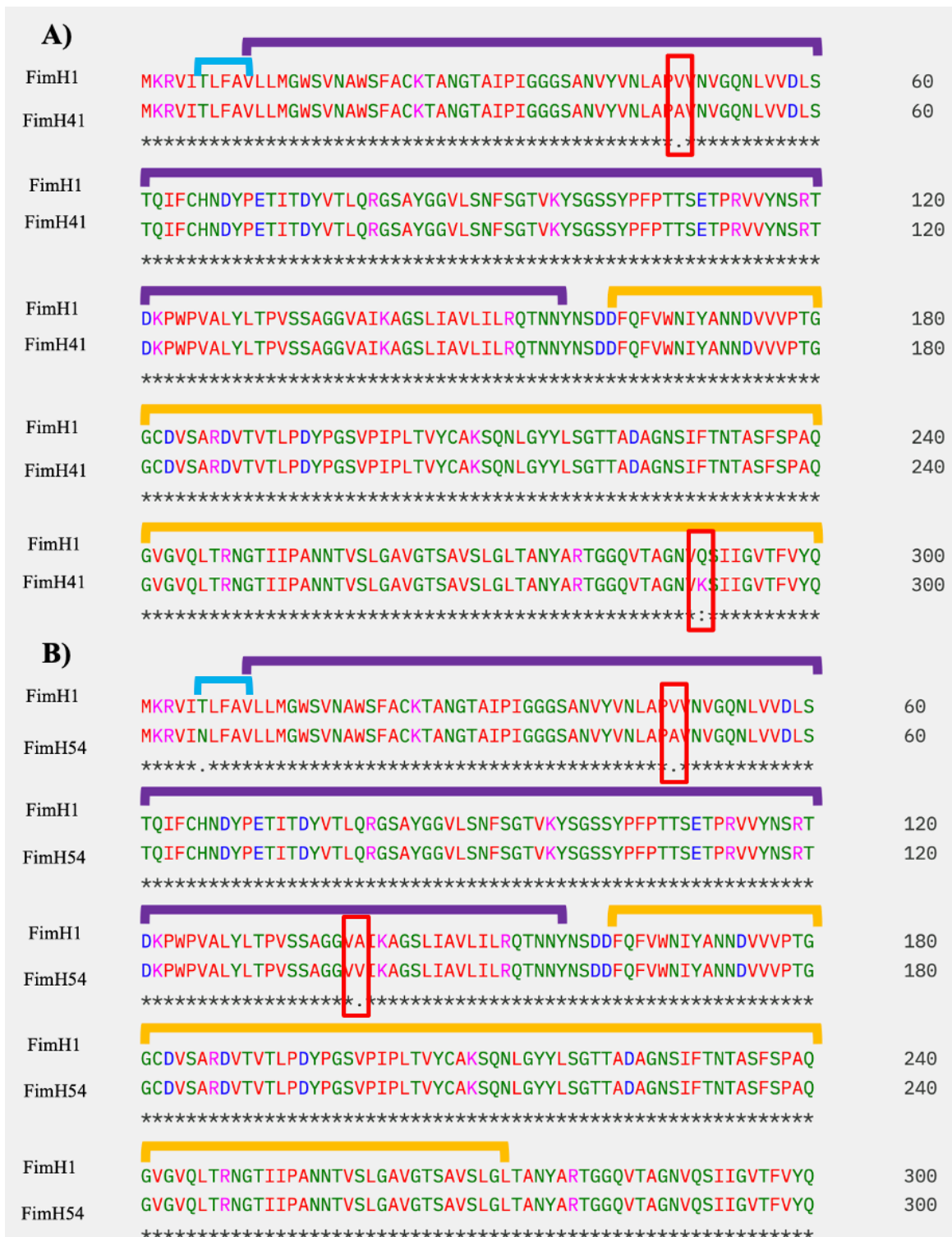


Figura 5. A) Alineamiento de la proteína FimH de *Escherichia coli* K12 con la variante FimH41. B) Alineamiento de la proteína FimH54. Los recuadros rojos indican cambios aminoacídicos. Azul: Región del péptido señal, Morado: Región de la lectina, Amarillo: Región de la pilina. Realizado con Clustal Omega.

#### **9.4 Identificación de mutaciones en el gen *rpoB* asociadas a la resistencia a la rifaximina**

La identificación de mutaciones se realizó mediante alineamientos de la secuencia proteica del gen *rpoB* de las cepas secuenciadas en este estudio con la secuencia proteína del mismo gen de *Escherichia coli* K12 (NP\_418414.1).

En las cepas CCB4 y CCB11 resistentes a rifaximina aisladas del paciente dos, se encontró un cambio aminoacídico S574Y (**Figura 6A**) (**Figura 6B**). En la cepa CCH5 resistente a rifaximina aislada del paciente dos se encontró un cambio aminoacídico Q513L (**Figura 6C**).

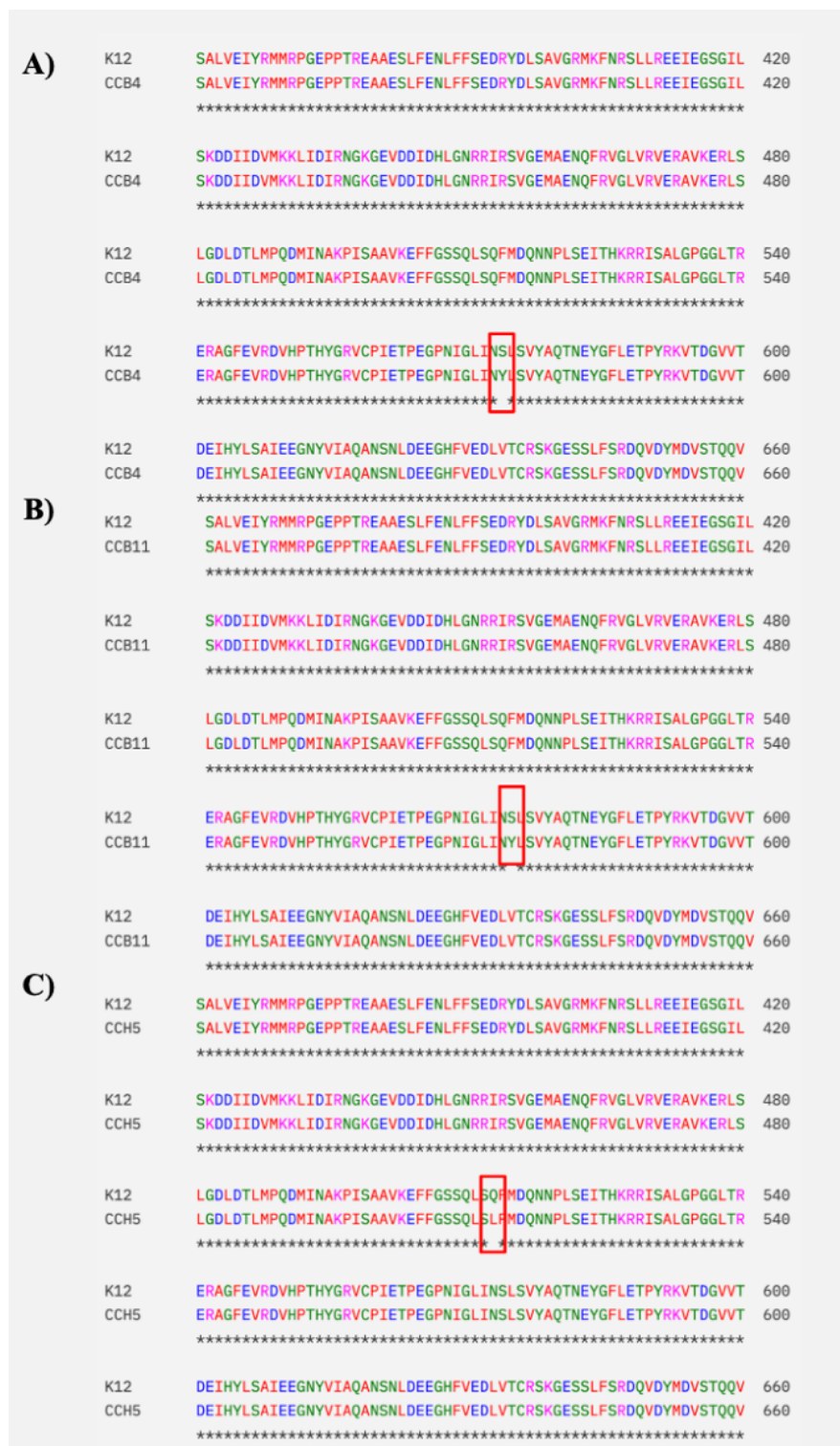
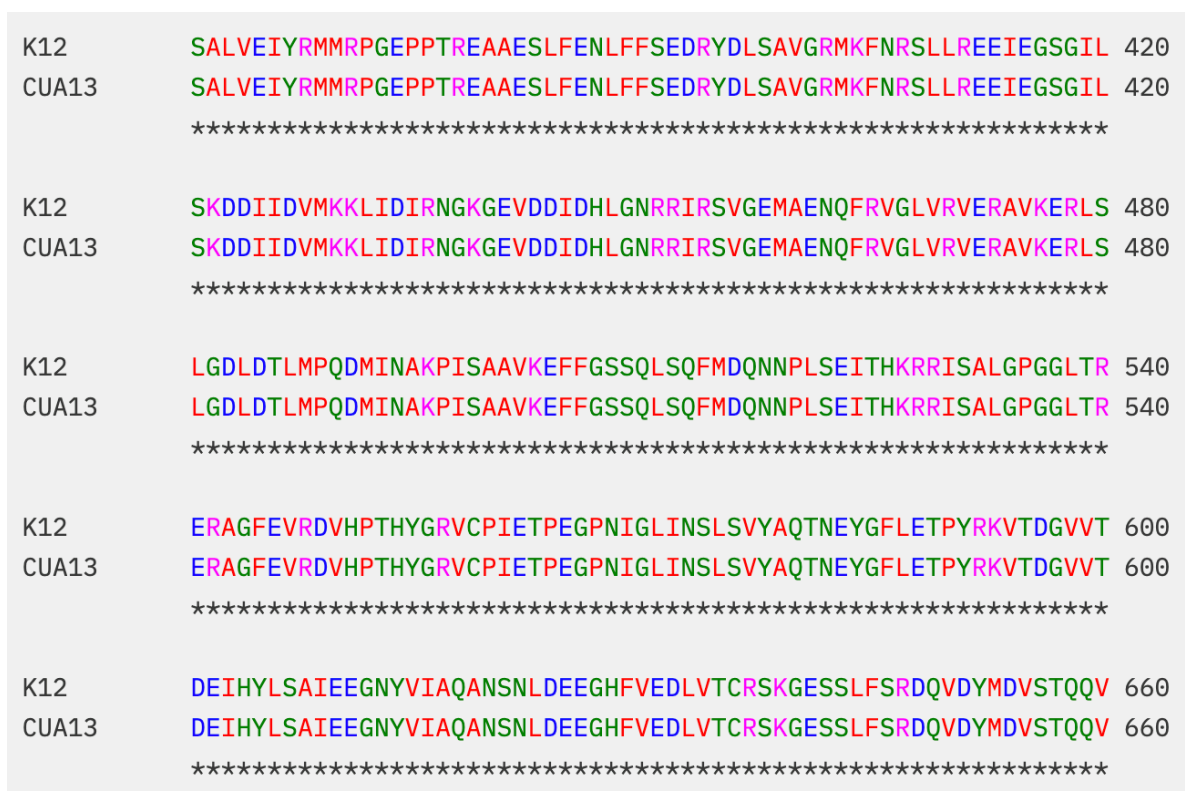


Figura 6. A) Alineamiento de la secuencia proteica del gen *rpoB* de la cepa CCB4 con *rpoB* control de *Escherichia coli* K12. B) Alineamiento de la cepa CCB11. C) Alineamiento de la cepa CCH5. El recuadro rojo indica las posiciones S574Y y Q513L en las cuales existen sustituciones aminoacídicas. Realizado con Clustal Omega.

El análisis se realizó en todas las cepas secuencias incluidas CUA13 y CUA16, esto con la intención de observar si los resultados fenotípicos correspondían de manera adecuada con los análisis genotípicos, mostrando que efectivamente la CUA13 y CUA16 productoras de serín-betalactamasas y sensibles a rifaximina, no presentaron sustituciones, deleciones o adiciones. (Figura 7). Al igual que las cepas anteriores, el aislado CUA69 resistente a rifaximina aislada del paciente tres no mostró sustituciones (Figura 8).



**Figura 7. Alineamiento de la secuencia proteica del gen *rpoB* de la cepa CUA13 con *rpoB* control de *Escherichia coli* K12. No se identificó ningún cambio. Realizado con Clustal Omega.**

```

K12      SALVEIYRMMRPGEPPTREAAESLFENLFFSEDRYDLSAVGRMKFNRSLLREEIEGSGIL 420
CUA69    SALVEIYRMMRPGEPPTREAAESLFENLFFSEDRYDLSAVGRMKFNRSLLREEIEGSGIL 420
*****

K12      SKDDIIDVMKKLIDIRNGKGEVDDIDHLGNRRIRSVGEMAENQFRVGLVRRVERAVKERLS 480
CUA69    SKDDIIDVMKKLIDIRNGKGEVDDIDHLGNRRIRSVGEMAENQFRVGLVRRVERAVKERLS 480
*****

K12      LGDLDTLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGGLTR 540
CUA69    LGDLDTLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGGLTR 540
*****

K12      ERAGFEVRDVHPTHYGRVCPINETPEGPNIGLINLSVYAQTNEYGFLETPYRKVTDGVVT 600
CUA69    ERAGFEVRDVHPTHYGRVCPINETPEGPNIGLINLSVYAQTNEYGFLETPYRKVTDGVVT 600
*****

K12      DEIHLSAIEEGNYVIAQANSNLDEEGHFVEDLVTCRSKGESSLFSRDQVDYMDVSTQQV 660
CUA69    DEIHLSAIEEGNYVIAQANSNLDEEGHFVEDLVTCRSKGESSLFSRDQVDYMDVSTQQV 660
*****

```

**Figura 8.** Alineamiento de la secuencia proteica del gen *rpoB* de la cepa CUA69 con *rpoB* control de *Escherichia coli* K12. No se identificó ningún cambio. Realizado con Clustal Omega.

## 10. Discusión

La EII comprende enfermedades crónicas del intestino de causa no definida las cuales afectan aproximadamente a 6.8 millones de personas alrededor del mundo, aumentando su incidencia las últimas dos décadas en otras regiones como África, Asia y Latinoamérica, lo que ha llevado a los expertos a considerarla un problema de salud mundial en expansión, particularmente en las sociedades industrializadas y urbanizadas (Steinwurz *et al.*, 2023) (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2019).

Yamamoto-Furusho y colaboradores en 2019 (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2019) realizaron el primer y único estudio epidemiológico multicéntrico en México demostrando un amplio incremento en la prevalencia de EII en los últimos años, pasando de 0.30 casos en el año 2000 a 1.83 casos por cada 100,000 habitantes en el año 2015. Además, la creciente incidencia de la EII se considera de origen multifactorial, influenciada por factores como el estilo de vida occidentalizado, los hábitos dietéticos alimentarios, el uso inadecuado o excesivo de antibióticos, y el papel de microorganismos MDR como *E. coli* en el desarrollo de la enfermedad se encuentra poco esclarecido por lo que adquiere mayor relevancia.

Debido a esta problemática, el presente estudio se enfocó en investigar la relación clonal entre cepas de *E. coli* MDR y productoras de serin-betalactamasas obtenidas de biopsias de pacientes con EII que potencialmente podrían clasificarse como miembros del patotipo AIEC, mediante un análisis bioinformático se identificaron mutaciones asociadas a la resistencia a rifaximina en el gen *rpoB*, así como la determinación de la presencia de genes asociados con la resistencia a betalactámicos y virulencia de AIEC.

Usualmente se considera que las cepas de una misma especie bacteriana que son indistinguibles genotípicamente pueden pertenecer a la misma clona (Woodford, Johnson & Spratt, 2004), los resultados obtenidos de la tipificación bacteriana coinciden con lo mencionado anteriormente ya que las cepas analizadas en cada uno de los pacientes mostraron para cada pulsotipo definido una relación indistinguible a partir del análisis de PFGE. Esto sugiere una co-ocurrencia de cepas bacterianas en un mismo paciente que pueden o no estar estrechamente relacionadas entre

si, esto pudiera proveer de ventajas para mantenerse, sobrevivir o colonizar en conjunto el intestino del hospedero.

También, los resultados de este estudio evidenciaron la presencia de los filogrupos A (CUA13, CUA16, CUA69) y F (CCB4, CCB11, CCH5) en cepas aisladas de diferentes pacientes con EII. Esto coincide con lo establecido por el grupo de Nadalian en 2022 el cual realizó un estudio en el que se identificaron filogrupos de 132 aislados de AIEC pertenecientes a biopsias y heces de pacientes con EII ; aunque sus resultados mostraron que los filogrupos más prevalentes fueron el B2 con un 24.2% y el D con un 22.7%; los filogrupos A, B1, F, E y C también fueron identificados con 15.2%, 12.9%, 9.1%, 8.3% y 7.6% respectivamente (Nadalian *et al.*, 2022), contrastando con los resultados en este trabajo que muestran que las cepas de *Escherichia coli* asociadas a EII no se encuentran limitadas a estos filogrupos, resaltando que en este estudio las cepas aisladas de las biopsias pertenecieron a los filogrupos A o C y F, estos resultan importantes debido a que aunque tradicionalmente no se han asociado con una alta virulencia, algunas cepas pueden adquirir genes de virulencia y adaptarse a diferentes nichos. En reportes anteriores se ha observado que el filogrupo A es común en cepas comensales pero que ocasionalmente incluye a cepas patógenas, el filogrupo C se considera como intermedio con cierto potencial patogénico y el filogrupo F comparte similitudes genómicas con B2, lo que sugiere que podría albergar cepas con mayor virulencia. La presencia de AIEC en estos filogrupos sugiere que su patogenicidad no está restringida a linajes específicos, lo que podría influir en su epidemiología y mecanismos de persistencia en la EII (Aguirre-Sanches *et al.*, 2022).

Por otra parte, *E. coli* es uno de los principales microorganismos MDR y productores de BLEE más comunes en el intestino que está relacionado a disbiosis, inflamación intestinal y un desarrollo severo de la EII (Kharaghani *et al.*, 2023). Las cepas aisladas del paciente uno presentaron una alta prevalencia (93%-100%) de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>CTX-M15</sub>, así como la ausencia del gen *bla*<sub>SHV</sub>. Esto coincide con los resultados de Barrios-Villa, 2018 (Barrios-Villa *et al.*, 2018) quién identificó la presencia de betalactamasas pertenecientes a las familias OXA y CTX-M en cepas AIEC aisladas de pacientes sanos. Igualmente, el grupo de Kharagani y colaboradores en 2023 (Kharaghani *et al.*, 2023) analizó cepas de *E. coli* aisladas

de pacientes con EII, identificando la presencia de betalactamasas de espectro extendido, con una mayor prevalencia de las familias TEM y CTX-M.

Se conoce que una opción terapéutica farmacológica para tratar la EII, es la rifaximina debido a que no provoca efectos adversos sistémicos ni interacciones significativas con otros fármacos, además de actuar contra una amplia variedad de bacterias aeróbicas y anaeróbicas tanto gram-positivas como gram-negativas. También reduce la expresión de los factores de virulencia y favorece el crecimiento de bacterias benéficas pertenecientes a los géneros *Bifidobacteria* y *Lactobacilli* debido a la modulación y reducción de la disbiosis intestinal (Valdovinos, 2020). En este estudio, las cepas aisladas del paciente dos, presentaron resistencia frente a rifaximina, así como a otras clases de antibióticos como las quinolonas, tetraciclinas, sulfonamidas, betalactámicos y anfenicoles; mientras que la cepa CUA69 aislada del paciente tres fue sensible a todos los antibióticos probados excepto a rifaximina. Esto es de suma importancia ya que la aparición de bacterias resistentes a rifaximina constituyen un desafío para la salud pública a nivel global, porque retrasan la administración de un tratamiento antibiótico adecuado así como una posible diseminación al ambiente (Kothary *et al.*, 2013).

Los resultados indicaron que tanto las cepas CCB4 y CCB11 contaron con la mutación S574Y mientras que la cepa CCH5 presentó la mutación Q513L en la secuencia proteica de la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa codificada por el gen *rpoB*. La primer mutación había sido descrita por Kothary y colaboradores en 2013 (Kothary *et al.*, 2013) en una cepa de *E. coli* aislada de un paciente con EII, mostrando que la mutación S574Y participa inequívocamente en el desarrollo directo de la resistencia a rifaximina; de igual manera, en el año 2001 el grupo de Campbell (Campbell *et al.*, 2001) identificó la mutación Q513L y documentó que esta interactúa directamente con la rifaximina, alterando la conformación del sitio de unión. Este cambio estructural reduce o impide la unión del antibiótico, lo que favorece la resistencia bacteriana a este fármaco. Cabe mencionar que la cepa CUA69 aislada del paciente tres no presentó ninguna mutación relacionada a la resistencia a rifaximina en la región del gen *rpoB*; esto sugiere la presencia de otro mecanismo que confiere la resistencia a rifaximina, pudiéndose tratar de la actividad de bombas de eflujo AcrAB-TolC (Kothary *et al.*, 2013). En México, este es el primer estudio en notificar la presencia de mutaciones en el gen *rpoB* que confieren resistencia en cepas

de *Escherichia coli* presuntamente pertenecientes al patotipo adherente-invasivo aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

Al analizar los factores de virulencia seleccionados, entre los cuales destaca la adhesina FimH presente en el pili tipo 1 cuyo papel es crucial en la adhesión al receptor CEACAM6 de las CEI para iniciar el proceso de patogénesis (Chervy, Barnich & Denizot, 2020) (Camprbí-Font & Martínez-Medina, 2020), se observó la presencia de la variante FimH54 en las cepas CUA13 y CUA16 aisladas del paciente uno; la variante FimH29 en las cepas CCB4, CCB11 y CCH5 aisladas del paciente dos; y la variante FimH41 en la cepa CUA69 aislada del paciente tres. En este sentido Dreux y colaboradores en 2013 realizaron un análisis de 92 genomas de *E. coli*, 45 genomas AIEC y 47 genomas no AIEC, identificando 59 variantes FimH con base a cambios aminoacídicos en tres dominios, el péptido líder (aminoácidos 6-10), el dominio de la lectina (aminoácidos 11-158) y el dominio de la pilina (aminoácidos 163-273) (Dreux *et al.*, 2013); sus hallazgos mostraron al igual que el del presente estudio que no existe una correlación directa entre variantes específicas relacionadas con el patotipo AIEC, o bien, que estas variaciones contribuyan a la virulencia de manera diferencial; sin embargo, parece prudente no limitar su investigación, sino por el contrario evaluar si esta diferenciación pudiera ser un indicio de la adaptación específica de *E. coli* al estado inflamatorio, lo que representaría una estrategia prometedora para la caracterización molecular de AIEC.

Siguiendo con el análisis de los genes de virulencia, las cepas analizadas CCB4, CCB11 y CCH5 presentaron los genes *chuA* y *ratA*; por otra parte, las cepas CUA13 y CUA16 únicamente presentaron el gen *ratA*, la cepa CUA69 careció de los tres genes y ninguna de las cepas presentó el gen *vat*. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por el grupo de Abdelhalim en 2020 quienes realizaron un estudio con el objetivo de identificar la presencia de genes de virulencia de importancia clínica en cepas AIEC; el estudio identificó al gen *chuA*, el cual participa en la captación de hierro y aumenta la capacidad de las cepas para sobrevivir y persistir en el interior de los macrófagos. Además, se encontró que el gen *ratA*, el cual codifica para la proteína RatA que afecta la asociación del ribosoma 70S e inhibe la síntesis de proteínas, también está significativamente asociado con cepas AIEC aunque, el mecanismo de acción exacto de esta proteína entre las cepas AIEC y su asociación con la EII aún no se ha esclarecido (Abdelhalim,

Uzel & Ünal, 2020). Igualmente, el grupo de Gibold en 2016 identificó en cepas AIEC el gen *vat*, el cual codifica para la proteasa VAT-AIEC y desempeña un papel importante en el primer paso de la infección, ya que favorece la penetración a través de la capa mucosa y su adhesión a las CEI (Gibold *et al.*, 2016).

Particularmente, la variabilidad de la presencia de estos tres genes de virulencia en cepas inclusive previamente caracterizadas como AIEC, recalca la dificultad para establecer un marcador genético, de hecho, actualmente la única forma de identificar cepas AIEC es a través de su fenotipo (adherencia, invasión, supervivencia en macrófagos, formación de biopelícula) (Camprubí-Font & Martínez-Medina, 2020), por lo que existe la posibilidad de proponer un esquema compuesto por una combinación de genes para su identificación molecular con otros candidatos genéticos.

Finalmente, el análisis filogenético realizado que incluyó 45 genomas de *Escherichia coli* dentro de los cuales 9 pertenecieron a patotipos diarreogénicos y extraintestinales y 30 al patotipo AIEC de diferentes especímenes y localizaciones geográficas de aislamiento, mostró una amplia variedad en datos como el filogrupo, el secuenciotipo, variantes de FimH y la presencia de genes de virulencia y producción de serin-betalactamasas. Esto concuerda a lo reportado por el grupo de Camprubí en 2017 que realizó un estudio en el que se concluyó que las diferencias en las secuencias de estos genes podrían no determinar el patotipo de las cepas; aunque, la expresión génica sí debería evaluarse a profundidad porque también podría estar implicada en la determinación del fenotipo (Camprubí-Font *et al.*, 2018). De igual forma, coincide con lo obtenido por el grupo de Barrios-Villa en 2018 el cual sugiere que la combinación de diferentes genes puede desencadenar un proceso inflamatorio complejo que se ve mediado por los parámetros del hospedero y las señales ambientales (Barrios-Villa *et al.*, 2020). Además de que la existencia e interacción de cepas *E. coli* pertenecientes a patotipos diferentes en un proceso de disbiosis podrían tener el potencial patógeno para colonizar y complicar la EII.

En conclusión, este estudio resalta la necesidad de consolidar un diagnóstico para evaluar casos de EII en México de manera adecuada, además de que la asociación de cepas bacterianas de *Escherichia coli* adherente-invasiva como principal agente etiológico debe tomarse a

consideración para profundizar más en el diagnóstico de la enfermedad. También, se muestra que la presencia de cepas MDR productoras de serin-betalactamasas y resistentes a rifaximina acentúa la urgencia de mejorar las terapias antibióticas clásicas para tratar esta enfermedad; resaltando que este es el primer estudio en México y Latinoamérica en notificar la presencia de mutaciones que confieren resistencia a rifaximina en cepas aisladas de un paciente con EII y que en definitiva es necesario establecer un sistema que permita la vigilancia epidemiológica de estas cepas y su contenido genético. Finalmente, la carencia de un marcador genético de virulencia definitivo para este patotipo, pone en evidencia la posibilidad de ampliar un posible esquema para la identificación molecular de cepas AIEC.

## 11. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran una notable diversidad genética entre las cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), incluso dentro de un mismo individuo. Esta evidencia sugiere que no existe un único linaje clonal asociado a la enfermedad. Otro hallazgo notable de este trabajo es que, a diferencia de lo reportado en otros estudios, las cepas analizadas no pertenecieron a los filogrupos B2 o D, comúnmente vinculados al patotipo AIEC, sino a filogrupos como A, C y F.

Adicionalmente, por medio del análisis realizado se detectaron genes de resistencia a betalactámicos así como mutaciones puntuales asociadas a la resistencia a rifaximina, destacando por primera vez la identificación en México de las mutaciones S574Y y Q513L en el gen *rpoB* en cepas aisladas de pacientes con EII.

Por otro lado, se observaron diferencias de las variantes de la adhesina FimH entre cepas, por lo que no parecen ser determinantes para definir la pertenencia al patotipo AIEC. Además, se identificaron genomas provenientes de bases de datos de cepas AIEC que no presentaban los tres genes de virulencia asociados al patotipo, lo que refuerza la idea de que la caracterización de AIEC debe abordarse considerando múltiples factores, en lugar de depender exclusivamente de marcadores genéticos específicos.

En conjunto, este trabajo aporta información novedosa sobre el perfil genético, los patrones de resistencia antimicrobiana y los factores de virulencia de *E. coli* en pacientes mexicanos con EII; sugiriendo la complejidad de la relación entre *E. coli* y esta patología, abriendo nuevas e importantes líneas de investigación orientadas a determinar cómo interactúan los factores bacterianos y los del hospedero en el desarrollo del fenotipo AIEC y cómo esta interacción influye en la respuesta a los tratamientos actualmente disponibles.

## 12. Perspectivas

- Evaluar la presencia de bombas de eflujo inhibidas por Phe-Arg- $\beta$ -naftilamida (PABN) en cepas resistentes a rifaximina aisladas de los pacientes dos y tres.
- Realizar estudios fenotípicos y correlacionar la presencia de genes de virulencia para identificar si las cepas pertenecen al patotipo AIEC.
- Realizar un análisis pangenómico de los 45 genomas utilizados en este estudio.
- Realizar la genómica comparativa (genes de virulencia, genes de resistencia a antimicrobianos y plasmidoma) de las cepas secuenciadas con otros genomas AIEC.
- Determinar el entorno genético de los genes asociados a la producción de serin-betalactamasas en cepas aisladas del paciente uno.
- Realizar ensayos de interacción entre las variantes de FimH con su receptor.

### 13. Bibliografía

1. Gompertz, M., & Sedano, R. (2019). Clinical and endoscopic manifestations in inflammatory bowel disease. *Revista Medica Clinica Las Condes*, 30(4), 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2019.06.002>
2. Guan, Q. (2019). A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Immunology Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7247238>
3. Yamamoto-Furusho, J. K., Bosques-Padilla, F., de-Paula, J., Galiano, M. T., Ibañez, P., Juliao, F., Kotze, P. G., Rocha, J. L., Steinwurz, F., Veitia, G., & Zaltman, C. (2017). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal: Primer Consenso Latinoamericano de la Pan American Crohn's and Colitis Organisation. In *Revista de Gastroenterología de Mexico* (Vol. 82, Issue 1, pp. 46–84). Asociacion Mexicana de Gastroenterologia. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2016.07.003>
4. Seyedian, S. S., Nokhostin, F., & Malamir, M. D. (2019). A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *Journal of Medicine and Life*, 12(2), 113–122. <https://doi.org/10.25122/jml-2018-0075>
5. Kilcoyne, A., Kaplan, J. L., & Gee, M. S. (2016). Inflammatory bowel disease imaging: Current practice and future directions. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 22, Issue 3, pp. 917–932). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i3.917>
6. Nitzan, O., Elias, M., Peretz, A., & Saliba, W. (2016). Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 22, Issue 3, pp. 1078–1087). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i3.1078>
7. Yamamoto-Furusho, J. K., Sarmiento-Aguilar, A., Toledo-Mauriño, J. J., Bozada-Gutiérrez, K. E., Bosques-Padilla, F. J., Martínez-Vázquez, M. A., Marroquín-Jiménez, V., García-Figueroa, R., Jaramillo-Buendía, C., Miranda-Cordero, R. M., Valenzuela-Pérez, J. A., Cortes-Aguilar, Y., Jacobo-Karam, J. S., & Bermudez-Villegas, E. F. (2019). Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Mexico from a

nationwide cohort study in a period of 15 years (2000-2017). *Medicine*, 98(27), e16291. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016291>

8. Yamamoto-Furusho, J. K., Bosques-Padilla, F. J., Charúa-Guindic, L., Cortés-Espinosa, T., Miranda-Cordero, R. M., Saez, A., & Ledesma-Osorio, Y. (2020). Inflammatory bowel disease in Mexico: Epidemiology, burden of disease, and treatment trends. *Revista de Gastroenterología de México*, 85(3), 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2019.07.008>
9. Matsuoka, K., & Kanai, T. (2015). The gut microbiota and inflammatory bowel disease. In *Seminars in Immunopathology* (Vol. 37, Issue 1, pp. 47–55). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00281-014-0454-4>
10. Baldelli, V., Scaldaferri, F., Putignani, L., & del Chierico, F. (2021). The role of enterobacteriaceae in gut microbiota dysbiosis in inflammatory bowel diseases. In *Microorganisms* (Vol. 9, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040697>
11. Chervy, M., Barnich, N., & Denizot, J. (2020). Adherent-invasive *E. coli*: Update on the lifestyle of a troublemaker in Crohn’s disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21103734>
12. Mainil, J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152(1–2), 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.032>
13. Rodríguez-Angeles, Maria. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. 44. 10.1590/S0036-36342002000500011.
14. Clermont O, Dixit OVA, Vangchhia B, Condamine B, Dion S, Bridier-Nahmias A, Denamur E, Gordon D. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ Microbiol*. 2019 Aug;21(8):3107-3117. doi: 10.1111/1462-2920.14713. Epub 2019 Jun 28. PMID: 31188527.
15. Aguirre-Sánchez, J. R., Valdez-Torres, J. B., del Campo, N. C., Martínez-Urtaza, J., del Campo, N. C., Lee, B. G., Quiñones, B., & Chaidez-Quiroz, C. (2022). Phylogenetic group and virulence profile classification in *Escherichia coli* from distinct isolation

sources in Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, 106. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105380>

16. Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A. v., Guo, X., Cao, H., Wang, Q., Reeves, P. R., Knirel, Y. A., Wang, L., & Widmalm, G. (2020). Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 44, Issue 6, pp. 655–683). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz028>
17. Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. In *Brazilian Journal of Microbiology* (Vol. 47, pp. 3–30). Elsevier Editora Ltda. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
18. Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., Dé, J.-F., & Colombel, R. (1998). *Presence of Adherent Escherichia coli Strains in Ileal Mucosa of Patients With Crohn's Disease*.
19. Camprubi-Font, C., & Martinez-Medina, M. (2020). Why the discovery of adherent-invasive *Escherichia coli* molecular markers is so challenging? . *World Journal of Biological Chemistry*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v11.i1.1>
20. Zheng, L., Duan, S. L., Dai, Y. C., & Wu, S. C. (2022). Role of adherent invasive *Escherichia coli* in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World Journal of Clinical Cases*, 10(32), 11671–11689. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v10.i32.11671>
21. Abdelhalim, K. A., Uzel, A., & Ünal, N. G. (2020). The role of major virulence factors and pathogenicity of adherent-invasive *Escherichia coli* in patients with Crohn's disease. In *Przegląd Gastroenterologiczny* (Vol. 15, Issue 4, pp. 279–288). Termedia Publishing House Ltd. <https://doi.org/10.5114/pg.2020.93235>
22. Abdelhalim, K. A., Uzel, A., & Gülşen Ünal, N. (2020). Virulence determinants and genetic diversity of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) strains isolated from patients with Crohn's disease. *Microbial Pathogenesis*, 145. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104233>
23. Mirsepasi-Lauridsen, H. C., Vallance, B. A., Krogfelt, K. A., & Petersen, A. M. (2019). *Escherichia coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel

- Disease. *Clinical microbiology reviews*, 32(2), e00060-18.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.00060-18>
24. Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 14, Issue 5, pp. 320–330). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>
  25. Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*, 21(12). <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
  26. Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
  27. Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>
  28. Bush, K., & Bradford, P. A. (2016).  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
  29. Husna, A., Rahman, M. M., Badruzzaman, A. T. M., Sikder, M. H., Islam, M. R., Rahman, M. T., Alam, J., & Ashour, H. M. (2023). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBL): Challenges and Opportunities. In *Biomedicines* (Vol. 11, Issue 11). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11112937>
  30. Sawa, T., Kooguchi, K., & Moriyama, K. (2020). Molecular diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. In *Journal of Intensive Care* (Vol. 8, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6>

31. Kharaghani, A. A., Harzandi, N., Khorsand, B., Rajabnia, M., Kharaghani, A. A., & Hourii, H. (2023). High prevalence of Mucosa-Associated extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among Iranian patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-023-00630-x>
32. Koo, H. L., & Dupont, H. L. (2010). Rifaximin: A unique gastrointestinal-selective antibiotic for enteric diseases. In *Current Opinion in Gastroenterology* (Vol. 26, Issue 1, pp. 17–25). <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e328333dc8d>
33. Guslandi, M. (2011). Rifaximin in the treatment of inflammatory bowel disease. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 17, Issue 42, pp. 4643–4646). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i42.4643>
34. Dogan, B., Fu, J., Zhang, S., Scherl, E. J., & Simpson, K. W. (2018). Rifaximin decreases virulence of Crohn's disease-associated *Escherichia coli* and epithelial inflammatory responses. *Journal of Antibiotics*, 71(5), 485–494. <https://doi.org/10.1038/s41429-017-0022-y>
35. Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., & Darst, S. A. (2001). Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase Mutations conferring Rif resistance (Rif<sup>R</sup>) map almost exclusively to the rpoB gene (encoding the RNAP subunit) in every organism tested, including *E. coli* netic analyses have provided molecular details of amino. In *Cell* (Vol. 104). Musser.
36. Kothary, V., Scherl, E. J., Bosworth, B., Jiang, Z. D., DuPont, H. L., Harel, J., Simpson, K. W., & Dogan, B. (2013). Rifaximin Resistance in *Escherichia coli* Associated with Inflammatory Bowel Disease Correlates with Prior Rifaximin Use, Mutations in rpoB, and Activity of Phe-Arg- $\beta$ -Naphthylamide-Inhibitable Efflux Pumps. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(2), 811–817. <https://doi.org/10.1128/AAC.02163-12>
37. Boudeau, J., Glasser, A.-L., Masseret, E., Joly, B., & Darfeuille-Michaud, A. (1999). Invasive Ability of an *Escherichia coli* Strain Isolated from the Ileal Mucosa of a Patient with Crohn's Disease. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 67, Issue 9).
38. Rolhion, N., & Darfeuille-Michaud, A. (2007). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. In *Inflammatory Bowel Diseases* (Vol. 13, Issue 10, pp. 1277–1283). <https://doi.org/10.1002/ibd.20176>

39. Eaves-Pyles, T., Allen, C. A., Taormina, J., Swidsinski, A., Tutt, C. B., Eric Jezek, G., Islas-Islas, M., & Torres, A. G. (2008). *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *International Journal of Medical Microbiology*, 298(5–6), 397–409. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.05.011>
40. Martinez-Medina, M., Strozzi, F., Castillo, B. R. del, Serrano-Morillas, N., Bustins, N. F., & Martínez-Martínez, L. (2020). Antimicrobial resistance profiles of adherent invasive *Escherichia coli* show increased resistance to  $\beta$ -lactams. *Antibiotics*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050251>
41. 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., Torres, C., & 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). <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0295-4>
42. Barrios-Villa, E., Martínez de la Peña, C. F., Lozano-Zaraín, P., Cevallos, M. A., Torres, C., Torres, A. G., & Rocha-Gracia, R. del C. (2020). Comparative genomics of a subset of Adherent/Invasive *Escherichia coli* strains isolated from individuals without inflammatory bowel disease. *Genomics*, 112(2), 1813–1820. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.10.013>
43. De la Torre CA. Estudio molecular del mecanismo de resistencia a Rifaximina en cepas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal. [Tesis de Licenciatura]. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2023.
44. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023.
45. Maldonado A. Resistencia y estudio parcial de plásmidos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. [Tesis de Maestría]. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2024.
46. Sahni, R. D., Mathai, D., Sudarsanam, T. D., Balaji, V., Brahamadathan, K. N., Jesudasan, M. V., & Lalitha, M. K. (2018). Extended-Spectrum Beta-lactamase

- Producers: Detection for the Diagnostic Laboratory. *Journal of global infectious diseases*, 10(3), 140–146. [https://doi.org/10.4103/jgid.jgid\\_49\\_17](https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_49_17)
47. Heras, J., Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., & Zarazaga, M. (2015). GelJ - a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>
48. Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>
49. Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
50. Madeira, F., Madhusoodanan, N., Lee, J., Eusebi, A., Niewielska, A., Tivey, A. R. N., Lopez, R., & Butcher, S. (2024). The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae241>
51. Joensen, K. G., Tetzschner, A. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M., & Scheutz, F. (2015). Rapid and Easy *In Silico* Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *Journal of clinical microbiology*, 53(8), 2410–2426. <https://doi.org/10.1128/JCM.00008-15>
52. Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate *in silico* method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microb Genom*. 2018 Jul;4(7):e000192. doi: 10.1099/mgen.0.000192. Epub 2018 Jun 19. PMID: 29916797; PMCID: PMC6113867.
53. Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>

54. Malberg Tetzschner, A. M., Johnson, J. R., Johnston, B. D., Lund, O., & Scheutz, F. (2020). *In Silico* Genotyping of *Escherichia coli* Isolates for Extraintestinal Virulence Genes by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *Journal of clinical microbiology*, 58(10), e01269-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01269-20>
55. Roer, L., Tchesnokova, V., Allesøe, R., Muradova, M., Chattopadhyay, S., Ahrenfeldt, J., Thomsen, M. C. F., Lund, O., Hansen, F., Hammerum, A. M., Sokurenko, E., & Hasman, H. (2017). Development of a Web Tool for *Escherichia coli* Subtyping Based on *fimH* Alleles. *Journal of clinical microbiology*, 55(8), 2538–2543. <https://doi.org/10.1128/JCM.00737-17>
56. Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. v, Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). GUEST COMMENTARY Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 33, Issue 9). <https://journals.asm.org/journal/jcm>
57. Aguirre M. Análisis de la virulencia de cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal y determinación de patotipos. [Tesis de Maestría]. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2023.
58. Steinwurz, F., Machado, M. B., Veitia, G., de Paula, J. A., Bautista Martinez, S., Vergara, B. I., Capdevielle, B., Martinez Silva, F. A., & Ramirez, A. L. (2023). Latin America consensus statement inflammatory bowel disease: importance of timely access to diagnosis and treatment. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 16. <https://doi.org/10.1177/17562848231207312>
59. Woodford, N., Johnson, A., & Spratt, B. G. (n.d.). *Exploring the Concept of Clonality in Bacteria*.
60. Nadalian, B., Nadalian, B., Houri, H., Shahrokh, S., Abdehagh, M., Yadegar, A., & Ebrahimipour, G. (2022). Phylogrouping and characterization of *Escherichia coli* isolated from colonic biopsies and fecal samples of patients with flare of inflammatory bowel disease in Iran. *Frontiers in Medicine*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.985300>
61. Valdovinos, M., A. (2020). Flonorm Rifaximina. 20 años en México. (9). Editora ERGON.

62. Dreux, N., Denizot, J., Martinez-Medina, M., Mellmann, A., Billig, M., Kisiela, D., Chattopadhyay, S., Sokurenko, E., Neut, C., Gower-Rousseau, C., Colombel, J. F., Bonnet, R., Darfeuille-Michaud, A., & Barnich, N. (2013). Point Mutations in FimH Adhesin of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Enhance Intestinal Inflammatory Response. *PLoS Pathogens*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003141>
63. Gibold, L., Garenaux, E., Dalmaso, G., Gallucci, C., Cia, D., Mottet-Auselo, B., Faïs, T., Darfeuille-Michaud, A., Nguyen, H. T. T., Barnich, N., Bonnet, R., & Delmas, J. (2016). The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, 18(5), 617–631. <https://doi.org/10.1111/cmi.12539>
64. Camprubí-Font, C., Lopez-Siles, M., Ferrer-Guixeras, M., Niubó-Carulla, L., Abellà-Ametller, C., Garcia-Gil, L. J., & Martinez-Medina, M. (2018). Comparative genomics reveals new single-nucleotide polymorphisms that can assist in identification of adherent-invasive *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20843-x>

## 14. Anexos

### 14.1 Soluciones PFGE (Anexo 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 H<sub>2</sub>O 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

- **Buffer de lisis**

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

Preparación para 100 ml:

1. Mezclar 5 ml de Tris 1M + 10 ml de EDTA 0.5M pH= 8 + 80 ml de H<sub>2</sub>O y esterilizar a 15 libras por 15 min.
2. Dejar enfriar y agregar 5 ml de sarcosil al 20%.
3. Al momento de utilizar, agregar 495 µl de proteinasa K (Thermo Fisher Scientific®) y mezclar por inversión.

- **Buffer TBE 10X (PFGE)**

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

Buffer TBE 10X, para 1L:

1. Pesar 10.78 g de Tris y 5.5 gr de ácido bórico
2. Disolverlos en 500 ml de agua destilada, en agitación usando el agitador magnético hasta disolver
3. Posteriormente, se agrega 0.7 g de EDTA (para que este se disuelva se le agrega poco a poco hojuelas de NaOH), en agitación hasta disolver.
4. Ajustar las solución a un pH=8.

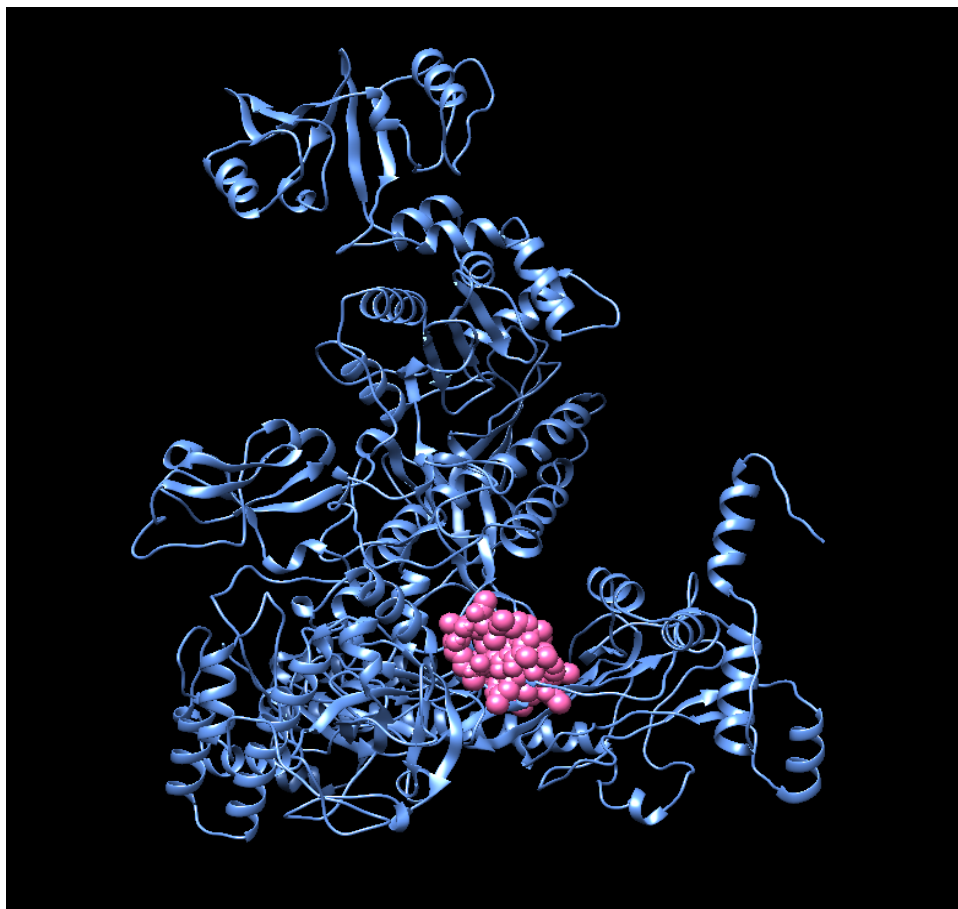
5. Aforar con agua destilada a 1L y esterilizar a 1° libras por 10 min.
6. Finalmente conservar a temperatura ambiente.

#### 14.2 Sitios de corte de la enzima de restricción *XbaI* (Anexo 2)

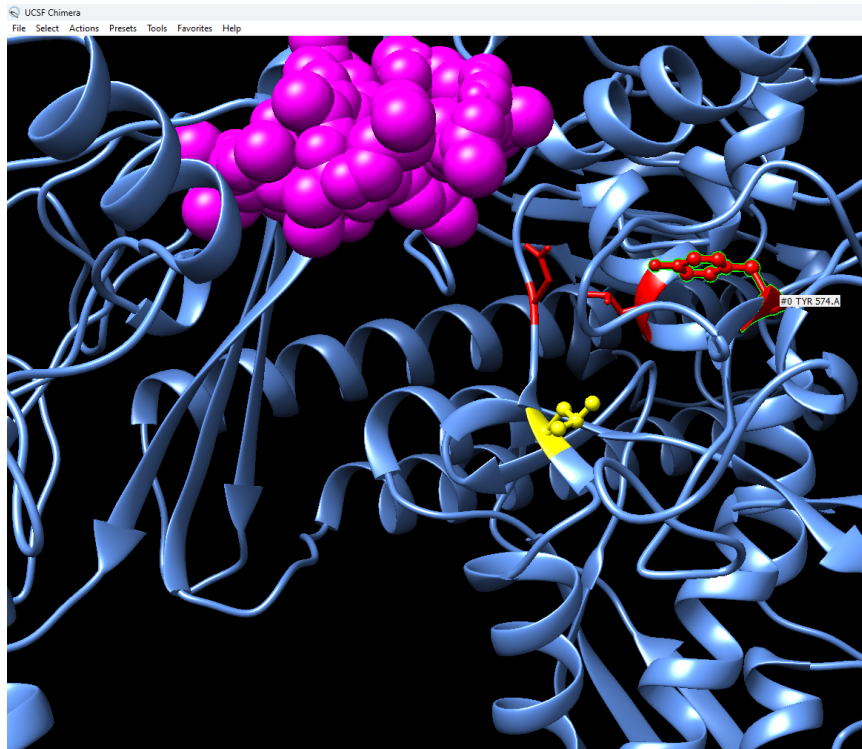


Figura 9. Sitios de corte de la enzima *XbaI*. (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0682>)

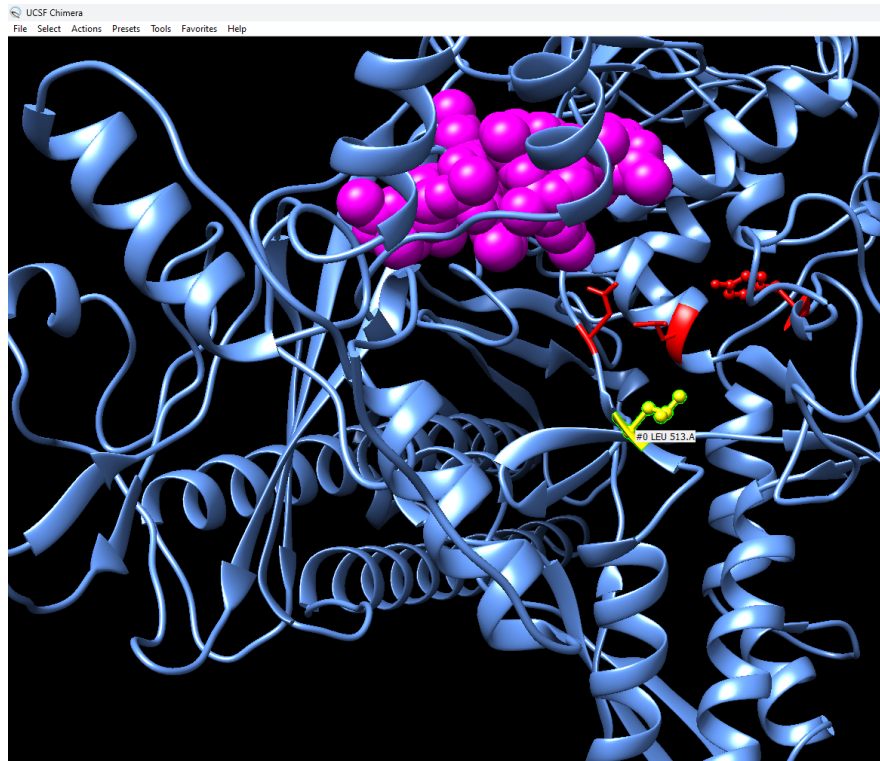
### 14.3 Modelado de mutaciones asociadas a la resistencia a rifaximina (Anexo 3)



**Figura 10. Complejo del gen *rpoB* con rifaximina.** Molécula azul: Subunidad directa de la RNA polimerasa. Obtenida de AlphaFold. Molécula magenta: Rifaximina. Obtenida de Pubchem. Realizado con UCSF Chimera v1.18.



**Figura 11. Mutación S574Y en el gen *rpoB*.** Molécula roja resaltada con verde: Mutación S574Y relacionada con la resistencia a rifaximina. Molécula azul: Subunidad directa de la RNA polimerasa. Obtenida de AlphaFold. Molécula magenta: Rifaximina. Obtenida de Pubchem. Realizado con UCSF Chimera v1.18.



**Figura 12. Mutación Q513L en el gen *rpoB*.** Molécula amarilla resaltada con verde: Mutación Q513L relacionada con la resistencia a rifaximina. Molécula azul: Subunidad directa de la RNA polimerasa. Obtenida de AlphaFold. Molécula magenta: Rifaximina. Obtenida de Pubchem. Realizado con UCSF Chimera v1.18.

#### 14.4 Genomas utilizados en este estudio (Anexo 4)

ID Genoma	No. Acceso	MLST (Atchman)	Filogrupo	Origen	Año	Localización
13I	GCF_008553725.1	141	B2	Biopsia de colon	2019	Estados Unidos
AIEC01	GCF_900130205.1	4	B2	Donador sano	2009	España
AIEC07	GCF_900130225.1	3232	B1	Donador sano	2009	España
AIEC17	GCF_900130175.1	131	B2	Donador sano	2009	España
C4435	NZ_CP027851.1	131	B2	Líquido peritoneal	2012	México
C7223	GCF_004121025.1	131	B2	Donador sano	2012	México
C7225	GCF_004121005.1	131	B2	Donador sano	2012	México
C7226	GCF_004120975.1	131	B2	Donador sano	2012	México
C7230	GCF_004120965.1	131	B2	Donador sano	2012	México
CCB11	Este estudio	648	F	Biopsia de colon (CCD)	2018	México
CCB4	Este estudio	648	F	Biopsia de colon (CCD)	2018	México
CCH5	Este estudio	648	F	Biopsia de colon (CUCI)	2018	México
CD121	GCF_001571595.1	59	F	Biopsia de colon (EC)	2006	Canadá
CD26	GCF_001571685.1	399	A	Biopsia de colon (EC)	2006	Canadá
CD3	GCF_001571665.1	58	B1	Biopsia de colon (EC)	2006	Canadá
CD44	GCF_001571645.1	144	B2	Biopsia de colon (EC)	2006	Canadá
CUA13	Este estudio	450	A	Biopsia de colon (CUCI)	2018	México
CUA16	Este estudio	450	A	Biopsia de colon (CUCI)	2018	México

<b>CUA69</b>	<b>Este estudio</b>	<b>206</b>	<b>A</b>	<b>Biopsia de colon (CUCI)</b>	<b>2018</b>	<b>México</b>
<b>DAEC</b>	<b>GCA_000249295.2</b>	<b>11</b>	<b>E</b>	<b>Desconocido</b>	<b>2012</b>	<b>Estados Unidos</b>
<b>EAEC</b>	<b>GCA_000027125.1</b>	<b>414</b>	<b>D</b>	<b>Heces pediátricas</b>	<b>2009</b>	<b>Perú</b>
<b>ECG04</b>	<b>GCF_900130215.1</b>	<b>3232</b>	<b>B1</b>	<b>Donador sano</b>	<b>2018</b>	<b>España</b>
<b>ECG11</b>	<b>GCF_900130195.1</b>	<b>73</b>	<b>B2</b>	<b>Donador sano</b>	<b>2018</b>	<b>España</b>
<b>ECG28</b>	<b>GCF_900130185.1</b>	<b>569</b>	<b>B2</b>	<b>Donador sano</b>	<b>2018</b>	<b>España</b>
<b>EHEC</b>	<b>GCA_000008865.1</b>	<b>11</b>	<b>E</b>	<b>Heces pediátricas</b>	<b>1996</b>	<b>Japón</b>
<b>EIEC</b>	<b>GCA_000005845.2</b>	<b>10</b>	<b>A</b>	<b>Heces diftéricas</b>	<b>1922</b>	<b>Estados Unidos</b>
<b>EPEC</b>	<b>GCA_000026545.1</b>	<b>15</b>	<b>B2</b>	<b>Heces pediátricas</b>	<b>1969</b>	<b>Reino Unido</b>
<b>ETEC</b>	<b>GCA_000210475.1</b>	<b>48</b>	<b>A</b>	<b>Heces coléricas</b>	<b>1973</b>	<b>Bangladesh</b>
<b>HM488</b>	<b>GCF_008553755.1</b>	<b>73</b>	<b>B2</b>	<b>Biopsia de colon</b>	<b>2019</b>	<b>Estados Unidos</b>
<b>HM605</b>	<b>GCF_000285375.1</b>	<b>No tipificable</b>	<b>B2</b>	<b>Biopsia de colon (EC)</b>	<b>2011</b>	<b>Inglaterra</b>
<b>LF82</b>	<b>CU651637.1</b>	<b>135</b>	<b>B2</b>	<b>Biopsia de colon (EC)</b>	<b>1998</b>	<b>Francia</b>
<b>NMEC</b>	<b>CP007275.1</b>	<b>416</b>	<b>B2</b>	<b>Líquido cerebroespinal pediátrico</b>	<b>1974</b>	<b>Estados Unidos</b>
<b>NRG 857C</b>	<b>GCF_000183345.1</b>	<b>135</b>	<b>B2</b>	<b>Biopsia de colon (EC)</b>	<b>2007</b>	<b>Estados Unidos</b>
<b>STEC</b>	<b>GCA_001281815.1</b>	<b>11</b>	<b>B2</b>	<b>Heces</b>	<b>2013</b>	<b>Países bajos</b>
<b>T75</b>	<b>GCF_008553705.1</b>	<b>10</b>	<b>A</b>	<b>Biopsia de colon</b>	<b>2019</b>	<b>Estados Unidos</b>
<b>UC37</b>	<b>GCF_001571745.1</b>	<b>404</b>	<b>B2</b>	<b>Biopsia de colon (UC)</b>	<b>2006</b>	<b>Canadá</b>

<b>UC5</b>	<b>GCF_001571675.1</b>	<b>720</b>	<b>D</b>	<b>Biopsia de colon (UC)</b>	<b>2006</b>	<b>Canadá</b>
<b>UM-146</b>	<b>GCF_008553695.1</b>	<b>643</b>	<b>B2</b>	<b>Biopsia de colon</b>	<b>2019</b>	<b>Estados Unidos</b>
<b>UM128</b>	<b>GCF_001571725.1</b>	<b>636</b>	<b>B2</b>	<b>Biopsia de colon (UC)</b>	<b>2006</b>	<b>Canadá</b>
<b>UM131</b>	<b>GCF_001571575.1</b>	<b>73</b>	<b>B2</b>	<b>Biopsia de colon (UC)</b>	<b>2006</b>	<b>Canadá</b>
<b>UM141</b>	<b>GCF_001571565.1</b>	<b>95</b>	<b>B2</b>	<b>Biopsia de colon (UC)</b>	<b>2006</b>	<b>Canadá</b>
<b>UM146</b>	<b>GCF_000148605.1</b>	<b>643</b>	<b>B2</b>	<b>Biopsia de ileon (EC)</b>	<b>2010</b>	<b>Canadá</b>
<b>UM147</b>	<b>GCF_001571755.1</b>	<b>647</b>	<b>B2</b>	<b>Biopsia de colon (UC)</b>	<b>2006</b>	<b>Canadá</b>
<b>UM149</b>	<b>GCF_001571585.1</b>	<b>646</b>	<b>B2</b>	<b>Biopsia de colon (EC)</b>	<b>2006</b>	<b>Canadá</b>
<b>UPEC</b>	<b>GCA_000007445.1</b>	<b>73</b>	<b>E</b>	<b>Sangre</b>	<b>2002</b>	<b>Estados Unidos</b>