



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

EJE DE MICROBIOLOGÍA

PROTOCOLO DE TESIS:

“Estudio molecular del mecanismo de resistencia a Rifaximina en cepas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal”

PROTOCOLO DE TESIS PARA OBTENER GRADO EN:

Licenciado en Biomedicina

ALUMNO:

Carlos Aarón de la Torre Perdomo

DIRECTORA DE TESIS:

D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Gerardo Cortés Cortés

Índice

Contenido

Agradecimientos.....	4
Resumen.....	7
1. Introducción.....	9
1.1. Antecedentes generales.....	9
1.2. Antecedentes específicos.....	25
3. Planteamiento del problema.....	32
4. Hipótesis científica.....	32
5. Objetivos.....	32
5.1. Objetivo general <i>in silico</i>	32
5.2. Objetivos específicos <i>in silico</i>	33
5.3. Objetivo general experimental.....	33
5.4. Objetivos específicos.....	33
6. Material y métodos.....	33
6.1. Diseño del estudio.....	33
6.2. Ubicación espaciotemporal.....	33
6.4. Muestreo.....	34
6.4.1. Definición de la unidad poblacional.....	34
6.4.2. Selección de la muestra.....	34
6.4.3. Criterios de selección de las unidades de muestreo.....	34
6.4.3.1. Criterios de inclusión.....	34
6.4.3.2. Criterios de exclusión.....	34
6.4.3.3. Criterios de eliminación.....	34
6.4.4. Diseño y tipo de muestreo.....	34
6.4.5. Tamaño de la muestra.....	35
6.5. Definición de las variables y escala de medición.....	35
6.6. Técnicas y procedimientos.....	35
6.8. Análisis de datos.....	42
7. Logística.....	42

7.1. Recursos humanos.....	42
7.2. Recursos materiales	42
7.3. Recursos financieros	42
7.4. Cronograma de actividades.....	43
7.4.1 Gráfica de Gantt.....	43
8. Bioética	43
9. Resultados	43
10. Discusión	49
11. Conclusiones.....	55
12. Perspectivas a Futuro.....	56
13. Bibliografía	57
14. Anexos	62

Agradecimientos.

Quiero expresar mi enorme agradecimiento a todas aquellas personas que estuvieron a mi lado a lo largo de esta enorme etapa de mi vida, a familia y amigos que siempre mantuvieron su apoyo sin importar cuan complicado haya sido este camino que decidí recorrer desde hace 5 años y medio y que desde el día 1 se mantuvieron dándome ánimos para no claudicar, es por ello que este documento está dedicado a todos ustedes.

A mis padres María de Lourdes Perdomo Cercas y José Carlos de la Torre Perdomo quienes siempre se mantuvieron al pendiente de mi progreso como biomédico, apoyándome y dándome ánimos para continuar cada día, enseñándome los valores sin los cuales no hubiera podido sobrellevar este largo camino; valores como la perseverancia, la tenacidad, la humildad, la empatía, el compromiso y sobre todo el amor hacia lo que hago. Gracias a estos valores que, con todo el cariño del mundo, a su incondicional amor y a su enormes deseos de verme como un profesionalista es que el día de hoy he logrado llegar hasta aquí, la culminación de 11 semestres de carrera y de quienes he adoptado una frase que convertí en mi lema para la vida **“Haz las cosas bien y a la primera”**.

A mi hermano Carlos Fabrizzio de la Torre Perdomo quien a pesar de no siempre estar de acuerdo conmigo y ser prácticamente mi opuesto, siempre estuvo ahí para mí dándome su apoyo en las buenas y en las malas, aminorando el estrés del diario con sus comentarios y sus bromas que si bien tienen la gracia de chistes para niños pequeños siempre logran sacarme una risa además de terminar en situaciones bastante alocadas que en palabras de él **“No importa que edad tengamos, siempre vamos a ser niños haciendo las mismas estupideces tengamos 10, 20, 50 u 80 años y todo porque es divertido”**.

A mis abuelos Adela Zamora y Eduardo de la Torre Cáceres por siempre darme su afecto y cariño incondicional, por siempre mostrar su interés ante los temas nuevos que iba aprendiendo conforme pasaban los semestres, nunca dudando de que algún día podrían verme como un biomédico y que el día de hoy me encuentro cada vez más cerca de ese objetivo. A ustedes no me queda más que agradecerles por siempre cobijarme con su cariño desde niño hasta el día de hoy, guiándome con sus anécdotas y enseñanzas de las cuales decidí adoptar

una frase célebre que usaré cada vez que recuerde mi vida universitaria en esta hermosa carrera, aunque eso sí, modificada un poco **“como el primer día, no me arrepiento”**.

A mi abuela María de Jesús Cercas Becerra que en donde quiera que estés no he dudado ni por un segundo que siempre estuviste aquí a mi lado guiándome y protegiéndome, viéndome crecer desde bebé hasta convertirme en un adulto joven, siendo tú, parte fundamental para ser la persona que el día de hoy soy, gracias por siempre haberme dado todo tu amor y cariño, por siempre haberme cuidado, por siempre haber hecho todo para verme feliz.

Cada vez que paso por donde solías vivir llegan a mi 2 sentimientos: una profunda tristeza por el hecho de que ahí vivió una gran mujer que no hizo más darnos todo su cariño y afecto, que a pesar de no poder volver a verte el amor que sembraste en mi quedará eternamente en mi corazón; el otro sentimiento es una enorme motivación porque estoy seguro que cada logro pequeño o grande que he tenido tú lo estás viendo, por lo que no me queda más que seguir avanzando para que donde quiera que estés puedas sentirte orgullosa del niño que viste nacer y hasta el hombre que ayudaste a formar.

A mis 2 grandes amigos Ángel Javier Sánchez Jiménez y Ernesto Sebastián Martínez López, amigos que más que ellos son para mí como hermanos, siendo compañeros de aventuras desde niños, pasando por experiencias inolvidables como adolescentes y que con el paso de los años esta amistad no ha ido más que fortaleciéndose hasta llegar al día de hoy en el que si bien legalmente podemos considerarnos adultos, aún seguimos siendo esos niños que se juntaban en el recreo para hablar acerca de videojuegos; seguimos siendo esos adolescentes que se reunían a platicar que locuras habíamos hecho en nuestras escuelas y riéndonos de cada situación absurda en las que nos metíamos, hasta llegar a esta época donde lo único que quiero ver es como a pesar de que nuestros caminos se alejan cada vez más, nosotros nunca dejaremos de ser inseparables.

A mis amigos **“Los negros”** Alfredo León Aguilar “Chavito” Sergio Diego Palestina Maldonado “Sayaka” Héctor Antonio Santiesteban Mendoza ”Gantala” Fernando Santiesteban Mendoza ”Cancer” Javier Suarez Rolón “Javi” y Nayme Lizeth Lara Casio “Nai”; no hay día que de verdad no agradezca el haberlos conocido, ya que con ustedes he vivido experiencias que atesoraré el resto de mi vida, como la vez que hicimos bailar a un representante de una empresa **“Take on me”** dentro de un camión sólo por que se nos ocurrió,

o la vez que hicimos una carne asada/peda en la que aprendí que es mala idea juntar alcohol con monas chinas ya que el resultado suele ser caótico en la mayoría de los casos, pero siempre muy divertido. A ustedes les agradezco por haber siempre estado ahí para mí, para escucharme cuando tenía algún problema y darme su consejo, para distraerme cuando me sentía agobiado por todo el estrés que conllevaba la carrera, por simplemente ser mis amigos incondicionalmente, a ustedes les debo gran parte de mis alegrías, a ustedes que considero como mi familia, mi familia de **“Players”** que religiosamente cada jueves nos juntábamos con la excusa de jugar cartas de monas chinas para simplemente echar relajo, a ustedes no me queda más que decirles **“Sobres negros!!”**.

A mi querida Ana Ximena Días Alarcón Aguilar **“Pimmy”** gracias por haber estado a mi lado en este largo viaje, siendo mi apoyo incondicional cada día dándome tu opinión y tu consejo cuando más lo necesitaba, gracias por darme tu amor y tu cariño, sin ellos no habría logrado sobrellevar todos los malos momentos que naturalmente aparecieron en mi vida y que gracias a tu ayuda logré superar cada uno de ellos. Gracias por ser siempre mi compañera de épicas aventuras, contigo descubrí que parte de crecer no significa dejar de hacer las cosas que te gustan si importar nada ni nadie, mientras nos hagan felices qué más da.

No sé qué nos depare el futuro, si nuestros caminos se separen o se mantengan juntos como hasta el día de hoy, pero lo que si se es que siempre encontrarás en mí apoyo, afecto, comprensión y cariño de manera incondicional, no dudo que el día de mañana tú también lograrás todo lo que te propongas y espero poder estar ahí para verte como la gran veterinaria que sé que serás.

A mis maestros y compañeros a quienes les debo el haber logrado llegar tan lejos, a la D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia, por siempre darme su apoyo como su alumno corrigiendo mis errores siempre que fuera necesario y resolviendo mis dudas cada vez que una nueva surgía, gracias a su guía es que este proyecto de tesis tomó un rumbo y fue dirigido de principio a fin. Al D.C. Gerardo Cortés Cortés quien desde el día 1 que comenzó este proyecto estuvo ahí para darme su consejo, para compartirme su conocimiento y experiencia, sirviendo como líder de varios proyectos que me demostraron que hacer ciencia es apasionante y hermoso. A la M.C María Balbuena Alonso, Alejandra Maldonado Galvez por haber sido mis guía durante cada experimento realizado en este proyecto, siempre

cuestionándome acerca de los resultados obtenidos con el fin hacerme pensar y reflexionar del porqué de los resultados, es gracias a esos cuestionamientos que el día de hoy soy capaz de entender el porqué de muchas cosas. A mis compañeras Hania Anaí Alcalá Martínez y Carolina Acevedo Ocampo quienes fueron mis colaboradoras durante estos años y con quienes he logrado formar un grupo de trabajo con el que hemos logrado destacar en el desarrollo de proyectos de investigación, a ustedes chicas no me queda más que agradecerles por siempre estar ahí apoyando y trabajando conmigo para que como futuros biomédicos logremos destacar y lograr todas las metas que nos proponíamos.

Por último pero no menos importante, a mi perrita Maggie por haber sido mi compañera de aventuras todos estos años, que sin su apoyo sentimental no hubiera logrado completar cada difícil prueba que surgía, dándome con una simple mirada llena de inocencia y la motivación suficiente para no rendirme, a ti mi pequeña perrihija te debo el no caer ante la depresión y la ansiedad que surgieron en este camino, demostrándome que aún sin poder comunicarte conmigo con palabras siempre estuviste ahí intentándome decir que no me rindiera, que solamente era un mal momento que no duraría siempre. Por ti Maggie intentaré ser siempre la persona que crees que soy.

Nuevamente doy las gracias a todos ustedes por marcar de manera significativa mi vida, por haberme hecho pasar grandes momentos que atesoraré el resto de mi vida y que en gran medida moldearon a la persona que el día de hoy concluye una de las más largas, pesadas, estresantes y desquiciantes etapas de mi vida, pero también una de las más hermosas, bellas, educativas y apasionantes. Es así como concluye este proyecto de 5 años y medio, como comenzó: con un Carlos sentado frente a una computadora a las 4 de la madrugada, pero a diferencia de mi yo de hace 5 años quien investigaba que era la carrera en biomedicina, el día de hoy escribo el punto final con el que concluye mi paso por dicha carrera para dar paso a los nuevos retos que como futuro biomédico tendré que afrontar y superar.

Resumen.

Introducción

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) se define como un conjunto de enfermedades cuya zona de afección abarca al tracto digestivo siendo la región del colon la región más afectada en que se desarrolla una condición inflamatoria exacerbada, dentro de esta denominación se encuentran padecimientos colitis ulcerosa (CU), colitis crónica idiopática (CUCI), colitis microscópica (CM), colitis inclasificada (CI), reservoritis (R) y la enfermedad de Crohn (EC). Estas enfermedades son concideradas como multifactoriales debido a que se les han atribuidos a varios factores el desarrollo y progresión de ésta.

Sin embargo, uno de los factores más importantes a considerar es la presencia de bacterias patógenas como lo es *Escherichia coli* siendo el patotipo adherente invasiva (AIEC) uno de los responsables de la progresión de la EII esto debido a su capacidad de internalizarse y adherirse a los enterocitos formando estructuras como biofilm y escapando de la acción bactericida de los antibióticos utilizados para tratar la EII.

La Rifaximina es un antibiótico implementado para el tratamiento de infecciones intestinales debido a la naturaleza del fármaco, su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la unión de la ARNpolIII con el DNA bacteriano impidiendo la replicación. *E. coli* ha desarrollado diversos mecanismos de supervivencia como lo son las mutaciones en el gen *rpoβ* y en los genes reguladores de las bombas AcrAB-TolC que le permiten continuar su proceso de colonización.

Objetivos

Determinar la resistencia fenotípica de cepas de AIEC a la Rifaximina de muestras de pacientes con EII.

Analizar secuencia de los genes *rpoβ*, *marR* y *acrR* para la búsqueda de mutaciones.

Realizar una revisión bibliográfica donde se resalte el papel de AIEC en el desarrollo de la EII.

Metodología

Se analizó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cepas 66 de AIEC pertenecientes a pacientes con EII mediante la técnica de dilución en placa con una concentración de Rifaximina de 32mg/L.

De manera *in silico* se utilizaron las plataformas BLAST, Clustal Omega, Expasy, Resfinder para el análisis 29 secuencias de los genes *rpoβ*, *marR* y *acrR* de AIEC depositados en el GeneBank.

Se revisó un total de 145 artículos utilizados para la elaboración de un manuscrito en el cual se destaca el papel de AIEC en el desarrollo de la EII.

Resultados

Tras el estudio de la MIC se encontró que 19 cepas presentaron un crecimiento positivo en medios adicionados con Rifaximina, dichas cepas pertenecen en su totalidad a un mismo paciente diagnosticado con una EII.

De manera *in silico* se encontró la presencia de mutaciones en los genes *rpoβ* (3 cepas), *marR* (28 cepas) y una delección al igual que una mutación en el gen *acrR* (2 cepas).

Conclusión

Si bien el índice de incidencia de mutaciones de *rpoβ* es bajo en comparación con los expresados en *marR* y *acrR* no se descarta su papel en el desarrollo de resistencia a Rifaximina debido a que al ser el sitio de acción de dicho antibiótico, los cambios estructurales provisto por las mutaciones por cambio de aminoácido en su secuencia puede llegar a dar como resultado el fallo terapéutico por parte del antibiótico.

1. Introducción

1.1. Antecedentes generales

Enfermedad inflamatoria intestinal. Enfermedad de Crohn

El término enfermedad inflamatoria intestinal (EII) incluye a un grupo de entidades clínicas que se caracterizan por ser procesos inflamatorios crónicos de etiología desconocida, y afectar primordialmente, aunque no de forma exclusiva, al intestino(1). Varias entidades se engloban en este concepto: colitis ulcerosa (CU), enfermedad de Crohn (EC), colitis inclasificada (CI), colitis microscópica (CM) y reservoritis (1–5).

- La **colitis ulcerosa** afecta sólo al colón, es una enfermedad predominante en mucosas (1).
- La **enfermedad de Crohn** puede afectar cualquier tramo del intestino, aunque su localización más frecuente es el íleon, sus síntomas fundamentalmente son la diarrea y/o dolor abdominal. Su clasificación debe realizarse en orden de su localización (ilecólica, ileal, cólica, perianal, o de otras localizaciones), de su patrón clínico (inflamatorio, estenosante o fistulizante) y de su gravedad (leve, moderada y grave)(2–5).
- La **colitis inclasificada** es una entidad inflamatoria del colon que no puede llegar a clasificarse claramente como CU o EC(1).
- La **colitis microscópica** engloba un grupo de trastornos histopatológicamente diferentes, y probablemente muy comunes, pero que afectan a la mucosa, causando diarrea crónica. Este tipo de enfermedades a menudo solo son evidentes tras un estudio cuidadoso de la biopsia(1).
- La **reservoritis** (*pouchitis*) es una entidad de la mucosa, inflamatoria, que afecta aproximadamente al 30-50% de los reservorios ileales(6).

Etiología.

Las EIIs son entidades de origen complejo, en las que tienen que ver la interacción de factores genéticos y ambientales, en la EC existe evidencia de diversas alteraciones genéticas puntuales (al menos 71 hasta la fecha)(2–5). El modelo de transmisión es poligénico, entre los genes identificados hasta el momento se destacan en primer lugar el NOD2/CARD15, que son específicos de la EC y no se observan en la CU(2–5).

En la mayoría de las ocasiones, las mutaciones y alteraciones identificadas sólo parecen ser factores contribuyentes, pero en algún caso particular, la mutación puede ser determinante

como se ha descrito en un caso infantil. Un cambio en la funcionalidad de la IL10 por una alteración genética puntual determinaba una enfermedad que apareció en el primer año de vida, muy agresiva, sin respuesta a los tratamientos convencionales (uso de antiinflamatorios, antibióticos, inmunosupresores y moléculas antiadhesión)(2–5,7,8).

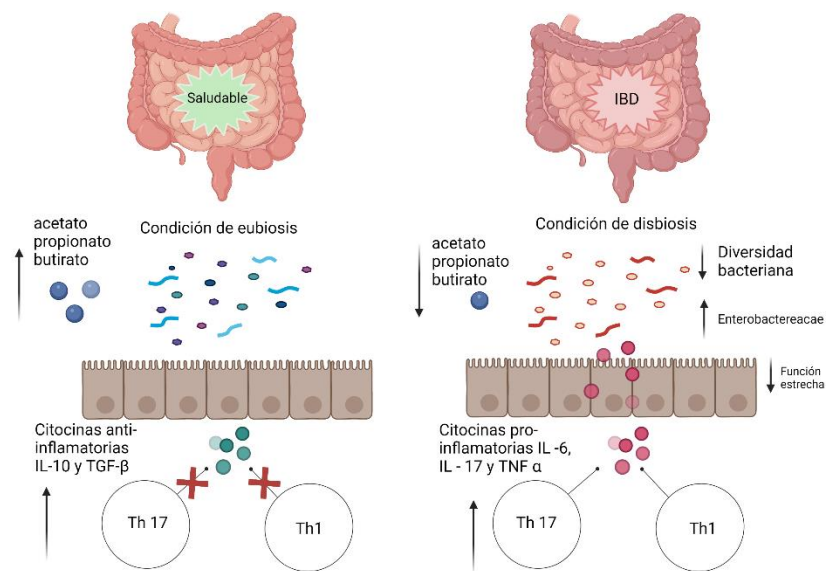


Figura 1 Comparación entre la condición de eubiosis y disbiosis. Durante la condición de eubiosis la diversidad bacteriana perteneciente al microbioma intestinal, mantiene un ambiente óptimo carente de factores inflamatorios que comprometan la integridad de las células intestinales. Por otra parte, al existir una baja de sustancias como acetato, propionato y butirato que favorecen el crecimiento de firmimcutes benéficos, además la presencia de bacterias patógenas, aumenta el desarrollo de moléculas inflamatorias como lo son Il-6, Il-17 y TNF α creando un ambiente inflamatorio en el aparato digestivo y favoreciendo el desarrollo de una EII.

Imagen creada con Biorrender.com.
Modificado de Baldelli V. et. al. 2021

Bacteriodes (*Bifidobacterium*)(2,3,5). Los datos procedentes de varios modelos experimentales confirman que el papel del microbioma intestinal es importante, y que se observan respuestas diferentes con las diversas especies. Variantes genéticas asociadas con el riesgo de EC descritas en los últimos años, se relacionan con los mecanismos de defensa frente a las bacterias, muy particularmente en torno de la fagocitosis de estos microorganismos(2–5), un mecanismo clave en la relación entre virus, bacterias, y células eucariotas, y cuyos fallos pueden resultar en fenotipos muy similares a la EC como se han citado(2–5).

Entre otros factores ambientales, es indudable la contribución del microbioma intestinal, ya que estudios demuestran que la presencia de bacterias en el tracto intestinal es responsable de la aparición y mantenimiento de las lesiones. Dentro de los géneros que conforman el microbioma intestinal se encuentran los Firmicutes (*Faecalibacterium* y *Roseburia*) y los

Clínica

La localización más frecuente, fosa ilíaca derecha, facilita la sospecha con la aparición de un dolor abdominal de carácter cólico, entre 60-90 minutos después de la ingesta y que se alivia tras una fase de borborigmos y expulsión de gases, esto puede sugerir la presencia de una estenosis en el íleon(2-5,8); probablemente debido al edema de la mucosa, a la fibrosis consecutiva, a la reparación cicatricial o a la compresión extrínseca de un asa intestinal por una masa inflamatoria o un absceso. Los pacientes presentan manifestaciones “perianales”, amplio concepto que engloba fisuras, fístulas, abscesos, estenosis anales y otras complicaciones(2,3,8).

La EC puede cursar con complicaciones extraintestinales, alguna de las cuales pueden abocar a un grave deterioro de la condición del paciente, pueden agravarse como consecuencia del uso de corticoesteroides(2-5,8). Otra complicación de extraordinaria importancia es la predisposición a los fenotipos tromboembólicos, que, si bien son mucho mayores en las fases de actividad inflamatoria, puede observarse también en las fases relativamente silentes(2-5,8).

Diagnóstico

Los objetivos que debe cumplir el proceso diagnóstico son:

1. Excluir enfermedades infecciosas (generadas por bacterias transitorias como *Salmonella* o *Vibrio cholerae*)(2-5,8).
2. Obtener datos que tengan un valor predictivo (positivo o negativo) para respectivamente confirmar o excluir una EII(2-5,8).
3. Valorar la extensión y la gravedad de la EII; en caso de un inicio de la EC es primordial excluir el absceso(2-5,8).
4. Evaluar factores de riesgo individualmente que pueden predisponer a una mayor toxicidad del tratamiento, con especial énfasis en la prevención de algunas complicaciones infecciosas (2-5,8).

La analítica es esencial en el diagnóstico diferencial, pero su mayor utilidad reside en valorar la gravedad y las complicaciones de las EII, y en ocasiones en la seguridad de los tratamientos. No se puede establecer un diagnóstico de EC sin asegurar la negatividad de los datos, especialmente cuando se trata de un primer brote inflamatorio(2-5,8).

El uso juicioso de las exploraciones complementarias tiene como objetivos: establecer el diagnóstico, valorar la actividad, valorar la extensión y valorar las complicaciones(2–5,8).

Tratamiento

Para el tratamiento de las EII se incluye: manipulaciones dietéticas, fármacos y tratamiento quirúrgico; algunos aspectos clave de la EC son:

- Se trata de enfermedades crónicas, incurables por lo que a menudo el paciente requiere tratamiento en periodos asintomáticos(2–5,8).
- En ocasiones el mejor tratamiento es, por el contrario, ningún tratamiento(2–5,8).
- El tratamiento debe de ser individualizado(2–5,8).

Epidemiología

La EC es un padecimiento que no posee ninguna predilección entre hombres y mujeres, además de poder aparecer en 2 periodos de la vida de los 20 a 40 años y el segundo de los 50 a los 60 años(4,8). En 2018 la frecuencia anual de aparición fue por ejemplo, en Australia (29,3/100.000 habitantes), Canadá (20,2/100.000), Nueva Zelanda (16,5/100.000) y el norte de Europa (10,6/100.000); mientras que aquellos países con mayor prevalencia se encuentran en Europa (322/100.000), Canadá (319/100.000) y Estados Unidos (214/100.000)(3,4). En 2020 hubo una actualización de la frecuencia de aparición de la EC habiendo un aumento en los casos en las regiones de Norte América (0 - 20.2/ 100,000)(2).

Actualmente se desconocen los factores exactos que desencadenan la aparición de la enfermedad al ser considerada multifactorial; sin embargo, factores genéticos, ambientales, inmunológicos e infecciosos han demostrado ser predisponentes que alteran el estado natural del tracto digestivo favoreciendo la aparición de los primeros signos (4).

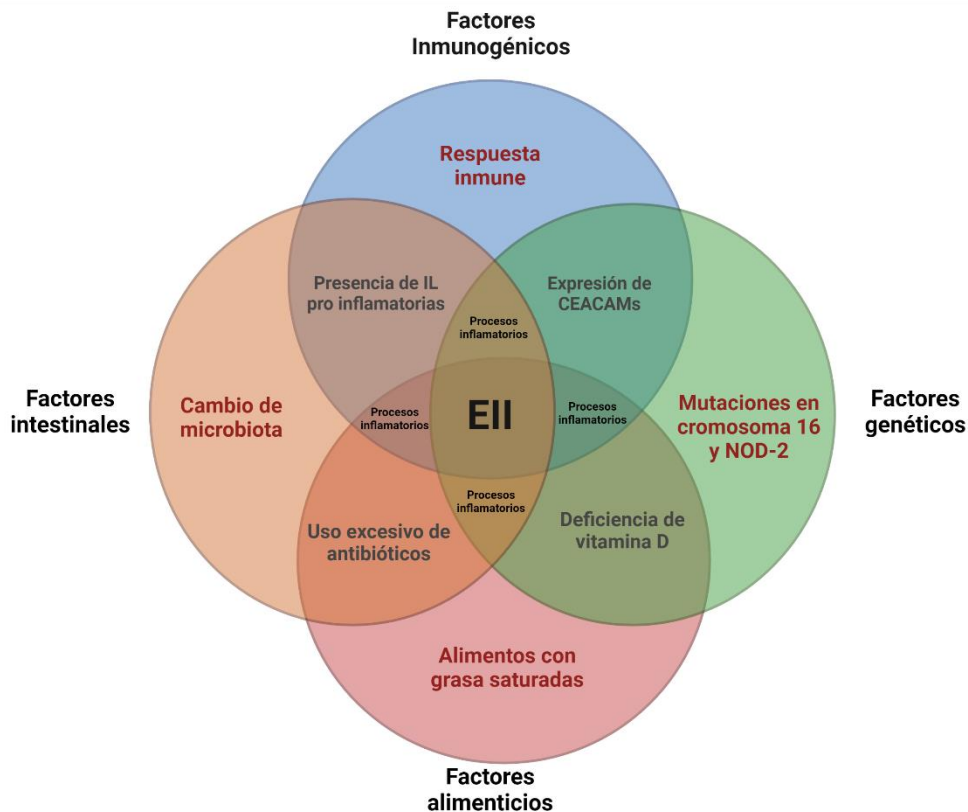


Figura 2 **Factores desencadenantes de EII.** El desarrollo de una EII se ha determinado como de origen multifactorial debido a que no existe hasta el momento, un factor predisponente único que desencadene la enfermedad, sin embargo se han catalogado 4 factores como que en conjunto han demostrado aumentar la probabilidad del desarrollo de una EII, entre ellas se encuentran los factores genéticos, alimenticios, inmunológicos e intestinales; estos pueden actuar en conjunto de esta manera creando un ambiente propicio para el inicio de los primeros rasgos de desarrollo de esta enfermedad.

Imagen creada con Biorreder.com.

Este trabajo, De la Torre C. A. 2022.

Factores Genéticos

Estudios revelan la existencia de 71 locus asociados al cromosoma 17 que pudieran contribuir al desarrollo de la EC debido a alteraciones en los procesos de reconocimiento microbiano y la respuesta del sistema inmune ante estos estímulos, entre los que destacan los relacionados con el control de procesos inflamatorios mediado por moléculas como el TNF- α , interleucinas pro y antiinflamatorias, etc. (2–5).

Cabe resaltar que las mutaciones relacionadas a estos locus se ven reflejadas en la acción de los receptores de reconocimiento de patrones codificado por NOD2 (CARD15), el gen de autofagia ATG16L1 y el gen del receptor de IL-23 (IL23R)(2); este cambio en el funcionamiento repercute en los procesos de reconocimiento y autofagia de bacterias como *Escherichia coli* adherente-invasiva (AIEC) favoreciendo el desarrollo de la EC(2–5).

Por otra parte, se ha documentado que estas mutaciones pueden pasar a la descendencia de personas afectadas por EC ya que en individuos monocigotos la posibilidad de desarrollar la enfermedad ronda el 35%, esta a su vez teniendo una mayor agresividad y prevalencia. Sin embargo, esto no se restringe a gemelos monocigotos ya que estudios de agregación familiar arrojan que individuos dicigotos a pesar de poseer una probabilidad del 3%, son candidatos para el desarrollo de síntomas de EC (2,3,5,8).

Barrera intestinal y alteraciones genéticas

La existencia de defectos en los componentes de la barrera intestinal ha demostrado tener repercusiones bastantes marcadas debido a que este mal funcionamiento puede conllevar a un constante estado de inflamación y polimorfismos de susceptibilidad en genes que codifican proteínas de unión, como E-cadherina, proteína de unión a nucleótidos de guanina subunidad- α 12; así como las uniones estrechas en células epiteliales, la producción defectuosa de péptidos antimicrobianos por parte de la inmunidad innata celular y linfocitos epiteliales, y expresión alterada de proteínas de unión, como E-cadherina, β -catenina y claudinas, generando como consecuencia un aumento en la permeabilidad, característica de las EII como la EC(2).

Factores Ambientales

El desarrollo de la EC alrededor del mundo, ha visto la necesidad de encontrar la relación de factores existentes en el medio ambiente que pudieran fungir como detonantes de esta enfermedad, siendo así que factores como el tabaquismo (siendo una de las más frecuentes), la alimentación propia de cada región, la contaminación en el aire, el estilo de vida, los hábitos de higiene entre otros, han demostrado influir las condiciones fisiológicas del cuerpo, favoreciendo un ambiente interno inflamatorio como consecuencia de la respuesta a estos

factores, por ende dando una mayor predisposición para la aparición de esta enfermedad (3,4).

Factores infecciosos e inmunológicos

El microbioma intestinal ha sido durante muchos años de estudio una parte importante del sistema digestivo, ya que al convivir de manera simbiótica con nosotros es capaz de proveer de beneficios como la producción de nutrientes generados por el proceso metabólico de estos microorganismos (4). Otro papel fundamental es la capacidad de defensa ante microorganismos patógenos manteniendo al margen el crecimiento de estos en el tracto digestivo por la competencia que existe por los nutrientes que llegan (4).

Sin embargo, la microbiota normalmente se llega a ver afectada debido a procesos como lo son las infecciones bacterianas, ya que estas al no ser controladas en primera instancia inducen a la alteración de las condiciones naturales de la microbiota, aumentando el número de patógenos y reduciendo gradualmente el número de organismos comensales; ahora bien el combate de estos organismos dañinos suele darse por el uso de antimicrobianos que al no distinguir entre organismo comensal y patógeno, atacan por igual afectando la homeostasis de la microbiota intestinal (9). Por ello factores como el abuso en la ingesta de antibióticos, ha demostrado contribuir al desarrollo de EC, favoreciendo el crecimiento de microorganismos multidrogosistentes (MDR), que al no verse afectados por los antibióticos y tener paso libre (al no tener una regulación por parte de organismos comensales), pueden comenzar a producir una respuesta inflamatoria intestinal y dañar el epitelio intestinal hasta llegar a desencadenar parte de los síntomas de una EII y llegar hasta la EC(9).

Por otra parte, los factores inmunológicos también juegan parte importante en el desarrollo de EC debido a que la desregulación de esta respuesta puede traer como consecuencia un ambiente inflamatorio debido a la sobreproducción y desequilibrio de moléculas como $INF\alpha$, IL-17, IL-21 e IL-22, una mayor población de células NK, Th17 y Th1, así como la disminución de sustancias antiinflamatorias como la IL-10 y $TGF\beta$ (4,9).

***E. coli*, propiedades generales de enterobacterias**

Fisiología y estructura

E. coli es un miembro frecuente del género *Escherichia*, se asocia a múltiples enfermedades incluyendo gastroenteritis e infecciones extraintestinales como las ITU, meningitis y sepsis (10–12).

Los miembros de la familia de **Enterobacterias** son bacilos gran negativos, no formadores de esporas, de un tamaño intermedio (0,3 a 1,0 x 1,0 a 6,0um). Comparten un antígeno en común (**antígeno común enterobacteriano**)(10,13,14). Todos los miembros pueden crecer rápidamente de formas anaerobias o aerobias (**anaerobias facultativo**) en varios medios no selectivos (sangre) y selectivos (MacConkey). La familia Enterobacteriae tiene unos requerimientos nutricionales sencillos(10,12–14).

- Fermentan glucosa
- Reducen nitratos
- Catalasa positivo
- Oxidasa negativos

La ausencia de actividad de citocromo oxidasa es una característica importante, debido a que se puede determinar rápidamente mediante una sencilla prueba y se utiliza para diferenciar a las enterobacterias de otros bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores (10,12–14). La capacidad de fermentar la lactosa, detectada por cambios de coloración en medios de cultivo que contiene lactosa como el agar MacConkey, da un color rosado-purpura (10,12–14) y la resistencia a sales biliares en algunos medios selectivos también se han utilizados para separar a los patógenos entéricos de los comensales (10,12–14).

El lipopolisacárido (LPS) termoestable es el principal antígeno de la pared celular y está formado por 3 componentes(10,12–14).

1. Polisacárido O (somático más externo)
2. Polisacárido central compartido por todas las enterobacterias
3. Lípido A

El núcleo resulta importante para clasificar un microorganismo como un miembro de las enterobacterias; el polisacárido O es importante para clasificar epidemiológicamente las

cepas dentro de una especie y el lípido A del LPS es responsable de la actividad de la endotoxina, un importante factor de virulencia (10,12–14).

La clasificación epidemiológica (serológica) de las enterobacterias se basa en 3 grandes grupos de antígenos (10,12–14).

1. Polisacárido O somático
2. Antígeno K de la capsula
3. Proteína H de los flagelos bacterianos

Los antígenos O específicos de cada cepa entonces presentes en cada género y especies que están muy relacionados, los antígenos K no se usan frecuentemente para tipificar las cepas, pero son importantes porque pueden intervenir con la detección del antígeno O. Los antígenos H son proteínas flagelares termoestables (10,12–14).

Endotoxinas: son un factor de virulencia que comparten las bacterias Gram negativas aerobias y algunas anaerobias; depende del comportamiento del lípido A del lipopolisacárido que se libera durante la lisis celular, muchos procesos que dan paso a la presencia de infecciones se deben a la actividad del complemento liberando citocinas, provocando leucocitosis, trombocitopenia, coagulación intravascular, fiebre, shock y muerte(10,12).

Cápsula: funciona como protección para la fagocitosis repeliendo la superficie hidrofóbica de los fagocitos, estos antígenos interfieren en la unión de los anticuerpos a las bacterias y son poco inmunogénicas o activadores del complemento(10,12).

Variación de fase antigénica: la expresión de los antígenos O somático, capsula K y los antígenos flagelares H están bajo el control genético del microorganismo, para la protección de la destrucción celular(10,12).

Sistema de secreción tipo III: varias bacterias poseen un mismo sistema efector común para translocar sus factores de virulencia a demás células, actúa como una jeringa de alrededor de 20 proteínas que facilitan la transferencia de factores de virulencia(10,12).

Secuestro de factores de virulencia: las bacterias tienen un comportamiento carroñero con los nutrientes en condiciones *in vivo*, el hierro es un factor importante para el crecimiento de

las bacterias, pero se encuentra adherido a las proteínas hemo, pero las bacterias producen sideróforos para contrarrestar esta unión(10,12).

Resistencia bactericida al suero: la cápsula bacteriana puede proteger del efecto del suero ya que evita la unión de los componentes del complemento a las bacterias y su eliminación(10,12).

Resistencia antibacteriana: la resistencia puede estar codificada en genes acarreados en plásmidos que pueden ser transferidos a otras bacterias de este o de diferentes géneros(10,12).

E. coli es un miembro frecuente del género *Escherichia*, se asocia a múltiples enfermedades incluyendo gastroenteritis (*E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* Enteroagregativa, *E. coli* productora de toxina Shiga, *E. coli* Enteroinvasiva y *E. coli* Adherente Invasiva) e infecciones extraintestinales como las ITU, meningitis y sepsis(10,12).

Patotipos de *E. coli*

***E. coli* enterotoxigénica (ETEC)**

La infección se adquiere fundamentalmente por el consumo de agua o alimentos contaminados por heces, la infección se produce tras 1-2 días de incubación y persiste por 3-5 días. Los síntomas son diarrea acuosa no sanguinolenta, cólicos, náuseas y vómitos(10,12).

Para que ocurra una infección es necesario que la bacteria se una al epitelio a través de proteínas de superficie y donde elabora 2 tipos de endotoxinas: toxinas termoestables (STa y STb) y toxinas termolábiles (LT-I, LT-II), que son codificadas en un plásmido transferible. La toxina termoestable (STa) se asocia también a la enfermedad en humanos y se detecta en el 75% a 80% de las *ECET* ya sea sola o asociada a la toxina termolábil (TL)(10,12–14). Esta toxina es un pequeño péptido que se une al receptor transmembrana de guanilato ciclasa que provoca un aumento del GMPc y por ende produce la hipersecreción de líquidos y la inhabilitación de la absorción de esta(10,12–14).

***E. coli* enteropatógena (EPEC)**

Asociada a enfermedades entéricas, posee un grupo de genes de virulencia localizados en islotes de patogenidad denominados Locus de esfacelamiento de enterocitos (LEE)³ (10,12–14). Las EPEC se subdividen en cepas típicas y atípicas en función de la presencia o no de

un plásmido de factor de adherencia de *E. coli* (EAF)(10,12–14). Su infección se caracteriza por la adhesión bacteriana a las células del intestino delgado con la destrucción de microvellosidades, y su agregación determina la función de micro colonias mediada por los pilis formadores de haces(10,12–14).

***E. coli* Enteroagregativa (EAEC)**

Es un grupo heterogéneo de cepas caracterizadas por su auto aglutinamiento en disposición de pila de ladrillos dispuestas sobre el epitelio del intestino delgado, los genes que codifican toxinas (como la Shiga) son variables en la EAEC(10,12–14). Esta es una de las pocas bacterias asociadas a la diarrea crónica y retraso del crecimiento en niños(10,12–14). Una vez que se adhiere al epitelio se estimula la secreción de las citocinas lo que condiciona el reclutamiento de neutrófilos y la progresión directa de diarrea inflamatoria(10,12–14).

***E. coli* productora de toxina Shiga (STEC)**

Todos los grupos de este tipo se caracterizan por la producción de toxina Shiga 1 o 2(Stx1 o Stx2), el serotipo más común en humanos es el O157:H7, la ingesta de menos de 100 bacterias puede causar enfermedad; la enfermedad va desde una simple diarrea hasta la colitis hemorrágica(10,12–14). La toxina Shiga se adquiere a través de bacteriófagos lisogénicos, ambas poseen una subunidad A con 5 subunidades B y estas últimas se unen a un glucolípido específico de las células del huésped(10,12–14).

***E. coli* Enteroinvasiva (EIEC)**

Son infrecuentes en todos los países debido a su tasa de aislamiento es menor al 10%, las cepas relacionadas son O: O124, O: O143 y O: O164, las bacterias son capaces de invadir y destruir el epitelio del colon para producir enfermedad, los genes que median la invasión son transportados a través de plásmidos (genes *plnu*) de epitelio al colon, el movimiento en el citoplasma y en células adyacentes epiteliales con inflamación producen una ulceración colónica(10,12–14).

***E. coli* Adherente Invasiva (AIEC)**

AIEC es un patotipo el cual posee características peculiares que logran diferenciarla de los demás patotipos existentes de *E. coli*, entre estas características destacan su capacidad de

adhesión y proliferación en células epiteliales (enterocitos) gracias a la unión de AIEC a los receptores CEACAM6 permitiendo su desarrollo hasta lograr formar un biofilm bacteriano. (10,12–14).

Por otra parte AIEC posee la capacidad de internalizarse en el epitelio intestinal con el fin de sobrevivir a la acción del sistema inmune así como de antibióticos que pudieran tener acción en el lumen intestinal, además posee la capacidad de replicarse en el interior de células fagocíticas como son los macrófagos, esto gracias a múltiples mecanismos de resistencia a la acción bactericida dada por un ambiente ácido (pH bajo) y con presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) facilitando su supervivencia y colonización de demás regiones del intestino (10,12–14).

AIEC y la EC

La EC es una enfermedad multifactorial cuya etiología involucra factores ambientales, genéticos, inmunológicos e infecciosos(15). Se ha documentado que la prevalencia de las cepas de AIEC incrementan las lesiones ileales en pacientes con EC (36-52%) comparado con sujetos de control (6-17%)(15,16). La caracterización de las cepas de AIEC ha demostrado que son capaces de adherirse e invadir las células epiteliales intestinales, sobrevivir y multiplicarse en los macrófagos e inducir una fuerte respuesta proinflamatoria(16).

La multiplicación de AIEC dentro de las células del hospedero está controlada por autofagia, un proceso homeostático responsable de la eliminación de componentes citoplasmáticos dañados o patógenos intracelulares a través de la vía lisosomal(16). Recientes estudios han demostrado que la vía de señalización EIF2AK4-EIF2A-ATF4, compuesta por EIF2AK4 (factor de iniciación de la traducción eucariota 2 alfa quinasa 4), EIF2A (factor 2 de iniciación de la traducción eucariota) y ATF4 (factor de transcripción activador 4) induce en las células epiteliales intestinales el comienzo del proceso de autofagia después de la infección con AIEC, esto con el fin de controlar la replicación intracelular de AIEC y disminuir la inflamación provocada por esta(16). En estas condiciones que pueden considerarse como estresantes para las células se produce la activación de EIF2AK4, en respuesta a este proceso se produce la fosforilación de EIF2A que en conjunto con EIF2AK4 aumenta la traducción de ARNm específicos que se sabe que son importantes para la remediación del estrés como

lo es ATF4(16). El grupo de trabajo de Bretin *et al* demostró que esta vía de señalización juega un papel importante para el control de AIEC debido a que ratones *eif2ak4^{-/-}* poseían un proceso de autofagia defectuoso ante la infección de AIEC, una mayor colonización intestinal, así como una inflamación más grave provocada por esta bacteria, en comparación de ratones wild type(16).

Rifaximina

La Rifaximina es perteneciente al grupo de las Rifampicinas, dicho grupo fue descrito en el año de 1957 por Sensi y col., quienes descubrieron su actividad antibiótica en caldos de cultivo de *Streptomyces mediterranei* aislado de una muestra de tierra del sur de Francia (17). De dichos cultivos se obtuvo un grupo de sustancias antibacterianas que fueron denominadas inicialmente como Rifamicinas A, B, C, D y E. Posteriormente, y por la existencia de una larga cadena en forma de asa o puente en su forma estructural, la B resultó ser la más activa y logró ser obtenida en estado casi puro (17). Posteriormente, y por vía sintética, se procedió a la incorporación de diversos radicales en la Rifamicina B lo que ha dado origen a las Rifamicinas semisintéticas que se emplean en la clínica: Rifamicina SV, Rifampicina, Rifamicina y Rifaximina entre otras(17,18).

La Rifaximina es una molécula original descubierta y patentada por Alfa Wassermann en 1980; una implementación del método de preparación, que hizo factible su producción industrial, se desarrolló en 1984(17,18).

Fue aprobada en mayo de 2004 por la FDA para el tratamiento de la diarrea del viajero causada únicamente por cepas no invasivas de *Escherichia coli* en pacientes de 12 años(19). La dosis aprobada es de 200 mg 3 veces al día durante 3 días, y el medicamento no debe usarse en casos complicados por fiebre o sangre en las heces o en pacientes con diarrea debido a patógenos invasivos(19). Esta aprobación se realizó sobre la base de los hallazgos de 3 ensayos clínicos aleatorizados, doble ciego en viajeros con diarrea adquirida en Guatemala, México, Jamaica y Kenia, en los que se observó una reducción en la duración de la diarrea posterior a la administración (19), en viajeros que recibieron Rifaximina, en comparación con los viajeros que recibieron placebo, o en los que se observó una respuesta equivalente a la Rifaximina durante todo el tiempo(19).

La Rifaximina (C₄₃H₅₁N₃O₁₁, PM = 785,9Da) es un agente antimicrobiano análogo estructural de la Rifampicina(17,18). La Rifaximina se obtiene por reacción entre Rifamicina O y 2-amino-4metilpiridina(17,18). La Rifamicina O es la forma oxidada de la Rifamicina B, producto de fermentación del microorganismo de origen *Amycolatopsis mediterranei*(17,18).

La Rifaximina es una nueva molécula antibiótica bactericida, con un amplio espectro de acción sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, tanto aerobias como anaerobias. Su absorción en el tracto gastrointestinal es prácticamente nula (inferior al 1%), lo que favorece la concentración del fármaco en la luz intestinal y, sobre todo, en las heces en forma activa(19,20).

La elevada concentración de la Rifaximina en el tracto gastrointestinal da lugar a una eficaz actividad antibacteriana que erradica las posibles especies patógenas presentes, con lo que se normaliza la función intestinal y se eliminan los síntomas que aparecen cuando ésta se altera(17–19). La Rifaximina es un antibiótico óptimamente tolerado, ya que su nula absorción a nivel gastrointestinal elimina el riesgo de aparición de posibles efectos secundarios(17–19).

Mecanismo de acción:

Como otras Rifamicinas, la Rifaximina se une a la subunidad β de la ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriano, inhibiendo el inicio de la formación de cadenas en la síntesis de ARN(17–19,21). La Rifaximina tiene distintos cristales polimorfos denominados con letras griegas: α , β , γ , δ , ϵ , que son hidratos de Rifaximina con diferente contenido de agua, existe también una forma no cristalina, denominada Rifaximina amorfa, que tiene modificaciones en su proceso de purificación(18,19,22–25). La Rifaximina amorfa y la cristalina contienen el mismo ingrediente activo; sin embargo, entre ambas existen diferentes propiedades fisicoquímicas que modifican considerablemente la solubilidad y biodisponibilidad de cada molécula afectando sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (18,19,22–25).

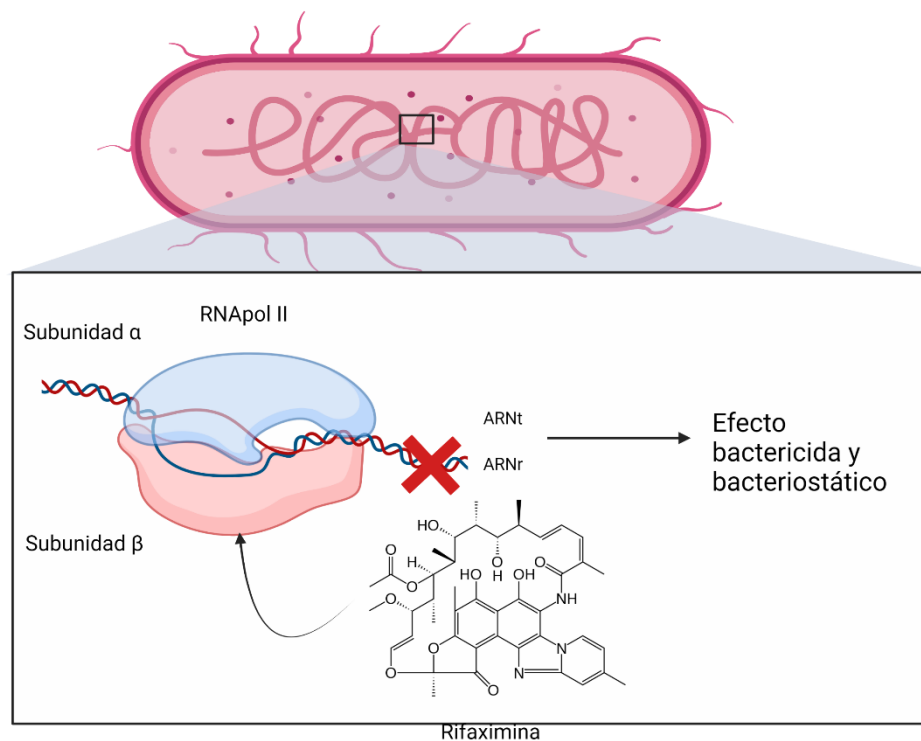


Figura 3 **Mecanismo de acción de Rifaximina.** La Rifaximina al ser un antibiótico perteneciente a la familia de las Rifamicinas, posee un mecanismo de acción que actúa sobre la unidad β de la RNA polimerasa II impidiendo la transcripción del DNA bacteriano bloqueando de esta manera la reproducción de estos microorganismos.

Imagen creada con [Biorrender.com](https://www.biorrender.com/) es Biorrender? 7

Este trabajo, De la Torre C. A. 2022. g

Gen *rpo β*

El gen *rpoβ* posee un papel fundamental para las funciones reproductivas de las bacterias ya que codifica para la subunidad β de la ARNpol II, este gen posee una longitud de 3,219 pares de bases además de ser un gen constitutivo está presente en todos los organismos celulares(26,27).

1.2. Antecedentes específicos

Resistencia de *E. coli* a Rifaximina en el tratamiento de EII

Estudios realizados por Bretin y colaboradores han demostrado que en la EC cepas de AIEC juegan un papel importante para el deterioro intestinal y avance de EII, ya que la mucosa intestinal de los pacientes con EC está colonizada de forma anormal con AIEC que puede adherirse e invadir las células epiteliales intestinales, sobrevivir en los macrófagos e inducir un efecto proinflamatorio en respuesta a su presencia(16). Las cepas de AIEC persisten en el intestino e inducen inflamación en ratones transgénicos CEABAC10 que expresan CAECAM6 humano, el receptor de AIEC (16) (28).

Mecanismos de resistencia

Algunas bacterias pueden exhibir cuatro tipos de resistencia a las Rifamicinas:

1. Resistencia cromosómica de tipo facultativo: estos fueron descritos en *E.coli* además de ser el tipo de resistencia a la que pertenece la mutación en el gen *rpoβ*(17).
2. Resistencia cromosómica de tipo estreptomicina en un solo escalón. Se ha estudiado preferentemente, en bacterias piógenas Gram positivas (estafilococos). La tasa de este tipo de mutantes dentro de la población bacteriana puede ser elevada y, por ello, la resistencia puede expresarse durante el tratamiento(17).
3. Resistencia cromosómica de tipo penicilina, en múltiples escalones. Es el tipo de resistencia observada en las micobacterias. La tasa de mutantes de este tipo suelen ser bajas(17).
4. Resistencia extracromosómica por factores R en Gram negativos, no poseen resistencia cruzada con otros antibióticos ni con los tuberculostáticos(17).

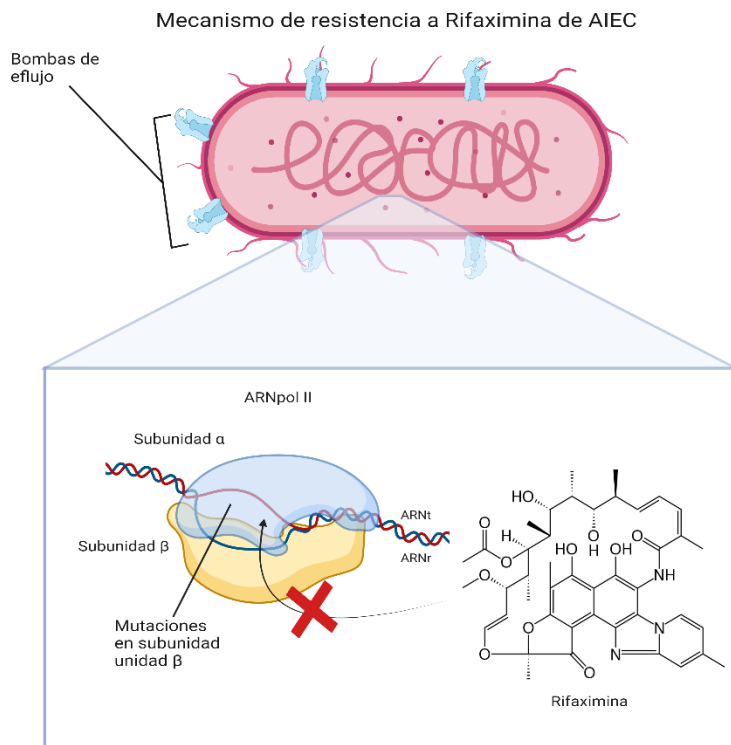


Figura 4 Mecanismo de resistencia a Rifaximina en AIEC. Existen múltiples factores estudiados causantes de la resistencia adquirida del patotipo AIEC ante la acción antimicrobiana de la Rifaximina, entre estos factores destacan las mutaciones desarrolladas en la secuencia de la subunidad β de la ARNpol II impidiendo la unión del fármaco con su sitio diana. Además de las mutaciones existen factores como lo son la presencia de bombas de eflujo que evitan la acción de la Rifaximina sacando el medicamento antes de que este tenga efecto. Los plásmidos también han sido factores estudiados como posibles responsables del acarreo de genes involucrados en el desarrollo de la resistencia al funcionar como material genético extracromosómico.

Imagen creada con Biorrender.com
Este trabajo, De la Torre C. A. 2022.

Mutaciones del gen *rpoβ*

Se ha reportado que la resistencia a la Rifampicina es causada por una alteración estructural en la subunidad β de la ARN Polimerasa, una enzima codificada por el gen *rpoβ*. El mecanismo fue descrito por primera vez en 1981 para *E. coli* (26).

Las mutaciones puntuales en el gen *rpoβ*, que codifica la subunidad, se han relacionado con la resistencia a la Rifaximina y su compuesto original, la Rifampicina(23,28). El

noventa y cinco por ciento de las mutaciones asociadas con la resistencia a Rifamicinas muestra un mapa de cuatro regiones de *rpoβ*: el grupo N-terminal (codones 143 a 148) y Clusters I (codones 505 a 537), II (codones 563 a 575) y III (codones 684 a 690)(23,28).

Otro mecanismo potencial implicado en la resistencia a la Rifaximina es la actividad del sistema de bomba de eflujo de resistencia bacteriana a múltiples fármacos que son capaces de expulsar compuestos químicamente no relacionados, reduciendo así la concentración intracelular del fármaco(23,28).

Phe-Arg -β- naftilamida (PABN) es un inhibidor conocido de bombas de eflujo y se ha demostrado que reduce la concentración mínima inhibitoria (CMI) de Rifaximina y Rifampicina en cepas de *E. coli* tanto resistentes como sensibles *in vitro* debido al bloqueo de bombas de eflujo presentes. *E. coli* al no contar con un mecanismo que impida la llegada del medicamento a su sitio de acción hace posible la utilización de concentraciones menores de antibiótico (23,28,29).

Un estudio multicéntrico realizado en Europa por E. Andre y colaboradores describe que la resistencia a Rifampicina es más simple, ya que prácticamente todas las cepas resistentes presentan una mutación en el gen *rpoβ*, y el 95% de estos se encuentran dentro de una pequeña región de 81 pb llamada Región Determinante de la Resistencia a la Rifampicina (RRDR)(26).

Los estudios realizados en Taiwán por Lai LY y colaboradores encontraron que los codones 431 y 432 de *rpoβ* se encuentran en RRDR y las mutaciones en esta región están relacionadas con la resistencia a Rifampicina. Anteriormente, se informó que las mutaciones en el codón 431 (S⁴³¹ T, S⁴³¹ I, S⁴³¹ R y S⁴³¹ G) estaban asociadas con la resistencia a Rifampicina (30). Varias mutaciones, incluido el codón 431 o 432 de *Rpoβ*, dieron como resultado una resistencia de mayor nivel (CMI > 100 mg/L)(30). También demostraron que la complementación de plásmidos o mutagénesis cromosómica de Q⁴³² *insQ* solo podría causar resistencia a Rifampicina, mientras que la complementación de S⁴³¹ G más Q⁴³² *insQ* resultó en una MIC dos veces mayor(30).

En estudios realizados en Estados Unidos por Kothary y colaboradores en los cuales se evaluaron algunos factores causantes de la resistencia a la Rifaximina, examinaron la resistencia a este antibiótico en 62 cepas de *E. coli* aisladas de la mucosa ileal de 50 pacientes(23). Los pacientes con EC se clasificaron de acuerdo con la Clasificación de Montreal⁽²⁹⁾ como L1 (enfermedad restringida al íleon), L2 (solo afectación colónica) y L3 (afectación ileal y colónica), se encontró que las mutaciones en *rpoβ* solo explicaron la resistencia en 3/12 resistencias importantes, la actividad de las bombas de salida inhibidas por PABN cuenta para la resistencia en 2/12 cepas, mientras que un efecto combinado de ambos mecanismos explicaron la resistencia en la mayoría (7/12) de cepas resistentes(23).

Se han informado ampliamente la presencia de mutaciones en *rpoβ* las cuales influyen en el desarrollo de resistencia a Rifamicinas. La identificación de siete distintos polimorfismos que ocurren en cinco residuos de la subunidad β de la ARN polimerasa han sido determinantes para la progresión de supervivencia de la bacteria ante la acción bactericida de la Rifaximina. De los siete polimorfismos cuatro (Q513H, D516N, H526N, y H526L)

ocurren en residuos que se sabe que interactúan directamente con Rifampicina, y se ha demostrado que las sustituciones en estos confieren resistencia a las Rifamicinas(23).

Entre estos cuatro polimorfismos, se sabe que D516N (en *E. coli*) y H526L (en *Mycobacterium tuberculosis*) están implicados en el desarrollo de resistencia a la Rifampicina, pero, hasta donde se sabe, los cambios específicos de Q513H y H526N no se han informado previamente en la literatura (23). De los tres polimorfismos que no interactúan directamente con el fármaco, N518D se ha identificado previamente en *E. coli* resistente a Rifampicina (23). Aunque el residuo 518 no interactúa directamente con el antibiótico, está presente en la endidura de unión del fármaco y puede afectar indirectamente la unión a la subunidad S574Y; se ha implicado previamente en el desarrollo de resistencia a Rifaximina *in vitro* en *E. coli*, aunque no se sabe que este residuo afecte la unión de Rifamicina directa o indirectamente. S574F se ha informado en la bibliografía como una mutación secundaria en una cepa resistente a Rifampicina sometida a pases en serie que lleva una mutación primaria en otro residuo *rpoβ* (23).

Estudios realizados en Perú por Agapito J. y colaboradores en el que el objetivo general fue identificar las mutaciones β del gen *rpoβ* asociadas con *Rifr* en cepas de *M. tuberculosis* aisladas de la Subregión de Salud Lima Norte, Perú, se documentó el hecho que la resistencia a la Rifampicina ha sido atribuida a mutaciones puntuales, inserciones y deleciones en una región limitada del gen *rpo β* que codifica a la subunidad β de la ARN polimerasa (31). Por lo menos 95% de los aislamientos para Rifampicina que se analizaron en el estudio tuvieron mutaciones en este gen (31). Estas mutaciones asociadas con resistencia fenotípica a Rifampicina son generalmente localizadas en una región de 81 pb con mutaciones en los codones Ser-531, His-526 y Asp-5167 (31).

Dentro de los resultados dados por los estudios de Agapito J. y colaboradores encontraron mutaciones en los codones Ser-531 e His-526 dentro de la región hipervariable de 81 pb del gen *rpoβ*, que son las más frecuentes y su frecuencia relativa es muy similar en distintas regiones geográficas(31). En contraste, la frecuencia relativa de las mutaciones en los codones Asp-516, Gln-513 y Leu-533 varían según las regiones del mundo(31). En el estudio realizado en Estados Unidos de Norteamérica con cepas de *M. tuberculosis* de pacientes

peruanos residentes en Lima y Cuzco se encontró, que las mutaciones más frecuentes estuvieron en los codones Ser-531 y His-526, pero en las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a Rifampicina la frecuencia de la mutación en His-526 fue la mitad. Además, se encontró que 6% de las cepas tuvieron mutaciones en el codón Gln-513(31).

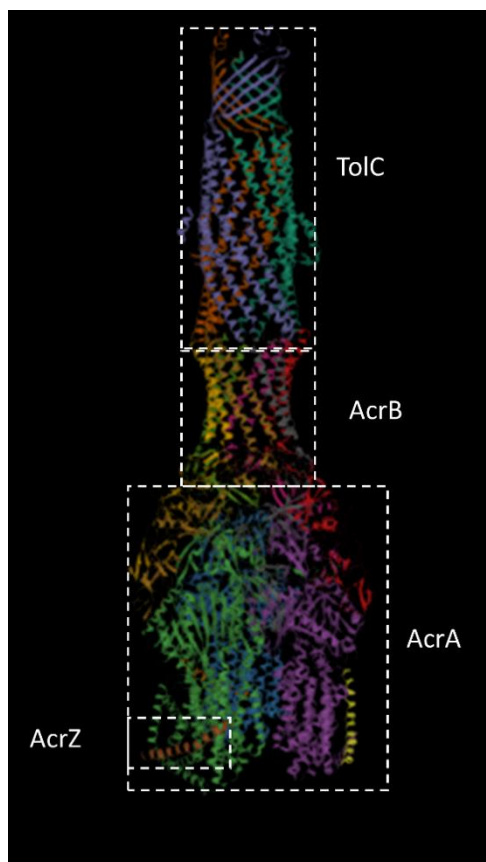


Figura 5 **Cristalografía de la bomba de eflujo AcrABZ-TolC**. En ella se representa la estructura de los componentes de esta bomba siendo las proteínas AcrABZ-TolC los componentes funcionales responsables de la expulsión de fármacos fuera de la célula bacteriana.

Imagen modificada de molstar.com 2022

grupo de las enterobacterias, cuya función es necesaria para la expulsión de fármacos, sin embargo, no de todos, lo que sugiere poseer un papel en el rol de especificidad de los sustratos expulsados (32).

Regulación de las bombas AcrABZ-TolC

Existe un gen responsable del regulamiento de la expresión de las bombas AcrABZ-TolC el cual es llamado *AcrR*, este ha sido estudiado ampliamente en *E.coli* catalogándolo como un

Bombas de eflujo AcrABZ-TolC

Otro mecanismo de resistencia que pueden desarrollar las bacterias para sobrevivir a la acción antimicrobiana son la presencia de las bombas de eflujo, estas bombas han tomado el papel de expulsar el antibiótico que haya logrado ingresar dentro de la bacteria evitando así que estas realicen su acción antimicrobiana. Dentro de estas bombas se encuentran las llamadas AcrAB-TolC presentes en bacterias Gram negativas como *E. coli* (32)

Las bombas AcrAB-TolC están compuestas por un canal de membrana exterior (TolC), un transportador secundario localizado en la membrana interna (AcrB) y AcrA la cual

funciona como una unión entre las proteínas de membrana AcrB y TolC. Existe a su vez un pequeño componente proteico llamado AcrZ el cual se encuentra presente en muchas bacterias pertenecientes al

gen perteneciente a la familia *TetR* los cuales se caracterizan por tener una función de represor transcripcional por ende controlando la sobreexpresión del *AcrAB* mediante su represión. Este gen se localiza río arriba del operón *AcrAB* y se ha descrito su capacidad de reprimir su acción a sí mismo en el momento en el que la bacteria entra en contacto con sustancias o condiciones estresantes (presencia de etanol y sales, etc.), por lo que las alteraciones en su acción represora traen como consecuencia un aumento en la expresión de las bombas *AcrABZ-TolC*; dicha acción se ha estudiado en bacterias MDR como posible causa de su resistencia. Se ha propuesto al gen *AcrS* ubicado en el operón *AcrEF* como un posible represor de la acción de las bombas *AcrABZ-TolC*; sin embargo, aún continua como sujeto de estudio la acción represora de este gen (33,34).

Papel de los genes *Mar* en el control de las bombas *AcrABZ-TolC*

El operón de Resistencia a Múltiples Antibióticos (*Mar*) ha sido estudiado como uno de los factores responsables de la resistencia a los antibióticos, este operón se encuentra expresado de manera separada en dos unidades transcripcionales separadas pero controladas por una misma región en el DNA denominada como *marO*. Este operón está conformado por los genes *marR*, *marA* y *marB*, estos genes son regulados mediante la acción de *marR* el cual posee una acción represora sobre sí mismo y sobre el operón (*marRAB*) que en condiciones normales se mantiene inactivo hasta que las condiciones ambientales con los que interactúan las bacterias cambien generando condiciones estresantes que amerite la represión de *marR*(33). *MarR* es capaz de unirse a regiones palindrómicas en el DNA como lo son dímeros y regiones hélice-vuelta-hélice (HTH), dentro del operón *marRAB* la unión es dada en dos regiones palindrómicas ubicadas entre el operador y *marO* (en donde se ubica el promotor). (33)

La regulación dada por el complejo *marRAB* sobre las bombas AcrABZ-TolC está dado por la expresión de *MarA* cuya acción da como paso la activación de múltiples genes como lo son *acrABZ* y *TolC* dando como resultado la codificación de estas bombas de eflujo. Por otra parte, *marB* posee un papel secundario que funciona en conjunto con *marA*, este gen se encuentra río abajo con respecto a *marA* y posee su propio sitio de unión a ribosomas. Aún se desconoce con exactitud el mecanismo mediante el cual este interactúa con *marA*; sin embargo, se sabe que este gen aumenta los niveles de expresión de *marA* favoreciendo la aparición de las bombas de eflujo y dando paso al desarrollo de una resistencia (33).

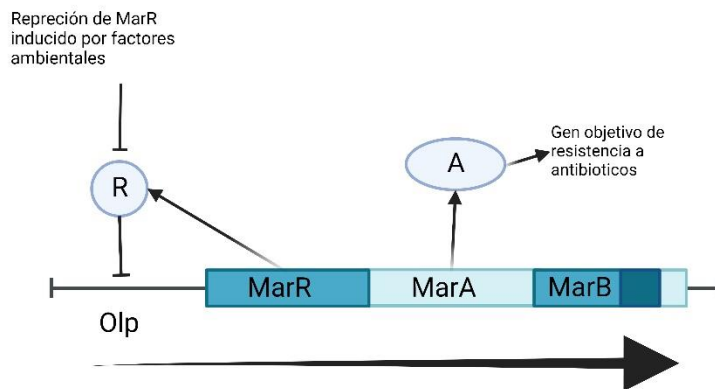


Figura 6 Regulación del operon *marRAB*. El gen *marR* cumple la función de regulador positivo del sistema, ya que la activación de este gen bloquea la acción de *marA* impidiendo la transcripción de los genes AcrABZ-TolC responsables de la producción de bombas de eflujo, evitando la acción antibiótica sobre las bacterias. Imagen creada con Biorrender.com Modificada de Sulavik, M.C et. Al. 1995

Estudios relacionados al control de la expresión del complejo *marRAB* han demostrado que las mutaciones sobre este gen, más específicamente sobre el represor *marR* dan como resultado un aumento en la expresión de los genes pertenecientes a las bombas AcrABZ-TolC, cabe resaltar que no sólo estas bombas poseen un

aumento en su expresión si no que otros genes responsables de resistencia se ven aumentados de igual forma dando como resultado la aparición de bacterias MDR (33,35)

2. Justificación

La EII es un padecimiento crónico del tracto digestivo caracterizada por la aparición de inflamación. Las causas de este padecimiento son multifactoriales, lo que complica un diagnóstico asertivo y un tratamiento adecuado en etapas tempranas. Una de las causas que pudiera estar involucrada en el origen y/o evolución de este padecimiento, es la adherencia e

invasión de *E. coli*, bacteria que puede ocasionar una respuesta inflamatoria excesiva en el hospedero, provocando una respuesta mediada por distintos factores inmunológicos que serían los responsables de desencadenar la cascada inflamatoria con lesión de la mucosa intestinal. Por otro lado, el antibiótico Rifaximina ha sido utilizado como parte de la terapia para tratar a pacientes con este padecimiento; sin embargo, algunas clonas de *E. coli* asociadas a esta enfermedad, presentan altas tasas de resistencia a este agente antimicrobiano. Por lo que el presente trabajo pretende analizar el mecanismo de resistencia a Rifaximina en cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII, a fin de dilucidar el papel de la resistencia a este antimicrobiano en la evolución de EII.

3. Planteamiento del problema

La EII es un padecimiento multifactorial, dentro de los cuales se asocia a la presencia de un patotipo especial de *E. coli* (AIEC); además, es un padecimiento complejo de tratar y dentro de las opciones de tratamiento está la administración de Rifaximina. Sin embargo, se han reportado altas tasas de resistencia de esta bacteria a este antibiótico, lo cual es importante investigar en cepas aisladas de biopsias de pacientes con EII de nuestra población.

4. Hipótesis científica

Las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII presentan resistencia a Rifaximina.

5. Objetivos

Debido al cierre de las instalaciones universitarias derivado de la contingencia sanitaria por la pandemia de COVID-19, el presente trabajo de tesis se dividió en dos partes: análisis *in silico* y análisis experimental.

5.1. Objetivo general *in silico*

Realizar una revisión bibliográfica sobre estudios reportados de la presencia de genomas de cepas de *Escherichia coli* Adherente/Invasiva(AIEC) en el desarrollo de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal(EII), depositados en la base de datos del

GenBank, así como los mecanismos de resistencia a antibióticos de las familias de Rifamicinas.

5.2. Objetivos específicos *in silico*

1. Realizar una búsqueda sistemática en la base de datos PubMed para identificar bibliografía relevante que informe sobre la presencia de AIEC en la EII, sin incluir un límite para el año de publicación del reporte.
2. Seleccionar aquellos artículos que detallen la presencia de genes de resistencia hacia las familias de Rifamicinas.

5.3. Objetivo general experimental

Estudiar el mecanismo de resistencia involucrado en la resistencia a Rifaximina en cepas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

Estudiar la susceptibilidad hacia Rifaximina, de cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII.

5.4. Objetivos específicos

1. Determinar la susceptibilidad fenotípica a Rifaximina en las cepas de *E. coli*.

6. Material y métodos

6.1. Diseño del estudio

Se analizó de forma experimental el fenotipo de resistencia a Rifaximina en cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de 3 pacientes con EII. Este trabajo permitió establecer la frecuencia de resistencia hacia Rifaximina entre las 67 cepas de *E. coli* estudiadas.

6.2. Ubicación espaciotemporal

El proyecto de tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad que pertenece al área de Microbiología Médica del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias (ICUAP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

6.4. Muestreo

El laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC) cuenta con 67 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de 3 pacientes con EII.

Las biopsias fueron obtenidas en centros de salud por personal capacitado. Posteriormente, fueron llevadas al LMHyC y procesadas por la médica pasante Norarizbeth Lara Flores, para así aislar, identificar y conservar a las cepas de *E. coli* en temperaturas de -80°C.

6.4.1. Definición de la unidad poblacional

El estudio incluyó 67 cepas de *E. coli* aisladas de 3 pacientes.

6.4.2. Selección de la muestra

Las cepas ya se encontraban identificadas y resguardadas en congelación en las instalaciones del LMHyC.

Aleatoria, no consecutiva, a conveniencia y a disposición.

6.4.3. Criterios de selección de las unidades de muestreo

6.4.3.1. Criterios de inclusión

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

6.4.3.2. Criterios de exclusión

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

6.4.3.3. Criterios de eliminación

Cepas no identificadas como *E. coli*.

6.4.4. Diseño y tipo de muestreo

Muestreo probabilístico aleatorio. Sin importar en humanos el sexo y la edad.

6.4.5. Tamaño de la muestra

Se incluyeron 67 cepas de *E. coli* aisladas de 3 pacientes con EII.

6.5. Definición de las variables y escala de medición.

Las escalas de medición para la susceptibilidad a Rifaximina se establecieron con base a la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria, según la bibliografía (36,37).

6.6. Técnicas y procedimientos

Cepas de *E coli*

El laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC) cuenta con 67 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de 3 pacientes con EII (ver tabla 1).

Las biopsias fueron obtenidas en centros de salud por personal capacitado. Posteriormente, fueron llevadas al LMHyC y procesadas por la médico pasante Norarizbeth Lara Flores (alumna de servicio social en 2017-2018), para así aislar, identificar y conservar a las cepas de *E. coli* como se ilustra en la figura 7. Cabe mencionar que se obtuvieron 38, 22 y 7 cepas de cada paciente, respectivamente; por lo que se consideraron como clonas diferentes y se trabajó con todas ellas en la presente tesis.

Tabla 1. Cepas de *E. coli* estudiadas.

Paciente	Edad(años)	Género	Origen de la biopsia	Diagnóstico	Tratamiento (previo al diagnóstico)	Número de cepas aisladas
1	23	M	Colon descendente y transversal	CUCI	Trimetoprim/ Sufametoxazol	38
2	61	F	Sigmoides	Colitis crónica y diverticulitis	Ciprofloxacino, Rifaximina	22
3	34	M	Colon descendente y ano	CUCI	Metronidazol, Ciprofloxacino, Ceftriaxona	7

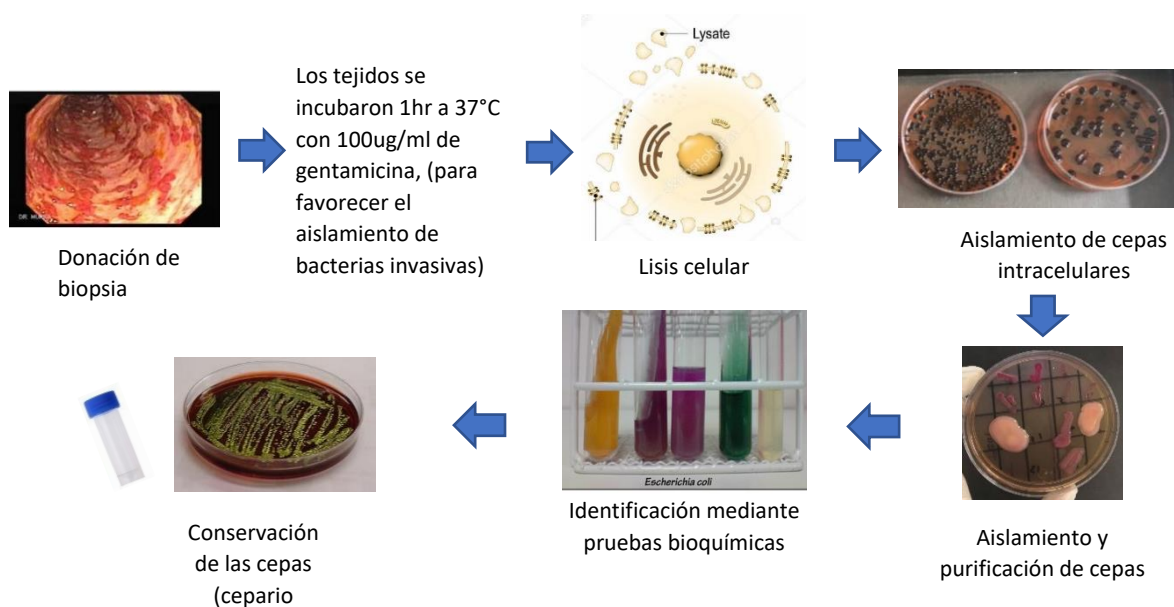


Figura 7 Procesamiento de las biopsias para el aislamiento de *E. coli*.

Susceptibilidad a Rifaximina

Los ensayos de susceptibilidad a Rifaximina se realizaron mediante la técnica de CMI, que consiste en realizar diluciones del antibiótico Rifaximina y sembrar a la bacteria en estudio(38–41).

Las diluciones se realizaron en el medio Agar Müller Hinton adicionado con el antibiótico Rifaximina mediante el método de dilución en agar establecido por el CLSI en el manual M07(37). La CMI se determinó con base a los reportes dados por Dogan, et al., Gomes et al., y Baumert et al., en los que se determinó como punto de corte la concentración para cepas sensibles de $\leq 32 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ para cepas resistentes(38–41). Posteriormente, se inocularon colonias de las 66 cepas de interés en los medios adicionados con Rifaximina, inoculando $2\mu\text{l}$ de la solución compuesta de solución salina isotónica y colonias bacterianas la cual tuvo una turbidez de 0.5 en la escala de Mcfarland en la cual se estima la presencia de $2 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$ (38–41); por último, los medios se incubaron a 37°C por 24 hrs. Pasado ese tiempo se evaluó el crecimiento de las cepas mediante el conteo de colonias en la placa(38–41).

Selección de cepas

Se utilizaron 67 cepas de la bacteria *E. coli* pertenecientes al patotipo AIEC que previamente fueron aisladas y caracterizadas por el laboratorio “Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad” obtenidas de 3 pacientes con padecimientos de Colitis Ulcerosa Idiopática (CUCI) y Colitis Crónica y una cepa de *E. coli* ATCC 25922 como control de crecimiento positivo y como control de sensibilidad ante el antibiótico. Dichas cepas fueron descongeladas en hielo y posteriormente se sembraron en medio TSA ® Bioxon. mediante la técnica de estría cruzada y fueron incubadas a 37°C por 24 horas.

Antibiograma

Para el estudio de la resistencia a la Rifaximina se utilizó el método de dilución en agar (37), adicionando a medio Müller Hinton ® Bioxon una concentración de 32gr/ml de Rifaximina, dicha concentración se estandarizo como Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) gracias a los estudios de Giacopello, Dogan, Gomes y Baumert (38–42), además se utilizó como controles de crecimiento medios Müller Hinton ® Bioxon sin ningún aditamento.

Genome Name	Assembly Accession
Escherichia coli strain AIEC07	GCA_900130225.1
Escherichia coli strain ECG04	GCA_900130215.1
Escherichia coli strain AIEC01	GCA_900130205.1
Escherichia coli strain ECG11	GCA_900130195.1
Escherichia coli strain ECG28	GCA_900130185.1
Escherichia coli strain AIEC17	GCA_900130175.1
Escherichia coli strain C4435	GCA_003999775.1
Escherichia coli strain C7230	GCA_004120965.1
Escherichia coli strain C7226	GCA_004120975.1
Escherichia coli strain C7225	GCA_004121005.1
Escherichia coli strain C7223	GCA_004121025.1
Escherichia coli strain UM-146	GCA_008553695.1
Escherichia coli strain T75	GCA_008553705.1
Escherichia coli strain 131	GCA_008553725.1
Escherichia coli strain HM488	GCA_008553755.1
Escherichia coli strain UM141	GCF_001571565.1
Escherichia coli strain UM131	GCF_001571575.1
Escherichia coli strain UM149	GCF_001571585.1
Escherichia coli strain CD121	GCF_001571595.1
Escherichia coli strain CD44	GCF_001571645.1
Escherichia coli strain CD3	GCF_001571665.1
Escherichia coli strain UC5	GCF_001571675.1
Escherichia coli strain CD26	GCF_001571685.1
Escherichia coli strain UM128	GCF_001571725.1
Escherichia coli strain UC37	GCF_001571745.1
Escherichia coli strain UM147	GCF_001571755.1
Escherichia coli LF82	GCA_000284495.1
Escherichia coli O83:H1 str. NRG 857C	GCA_000183345.1
Escherichia coli HM605	GCA_000285375.1
Escherichia coli UM146	GCA_000148605.1

Figura 7 : Lista de genomas del gen *rpoB* depositados en la plataforma GeneBank hasta noviembre de 2022

De las placas con medio TSA se seleccionaron colonias aisladas de *E. coli* las cuales fueron adicionadas a tubos con 5ml de solución salina isotónica hasta llegar a una turbidez equivalente a 0.5 en la escala de McFarland (10^8 CFU/mL) (37). Posteriormente se realizó una suspensión 1:10 tomando 1ml de la solución anterior y adicionándolo a un segundo tubo con 9ml de solución salina isotónica para finalmente tomar 2µl de la suspensión, volumen en el cual se contienen de 2×10^4 UCF (volumen mínimo para la realización de la técnica) y adicionándolo a ambas

placas con medio MH y MH con Rifaximina (37). Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 hrs para el análisis del crecimiento de colonias bacterianas.

Analisis *In silico* del gen *rpoβ*

En la plataforma GeneBank se buscó el genoma de 29 cepas determinadas como AIEC para la búsqueda de mutaciones relacionadas a la resistencia a Rifaximina en el gen *rpoβ*, utilizando la plataforma CARD y las herramientas bioinformáticas BLAST, ExPasy, Clustal Omega y ResFinder v4.1. Así mismo se analizó la presencia de mutaciones en las bombas de eflujo AcrAB-TolC posiblemente presentes en estos 29 genomas, además de buscar los sistemas de regulación implicados en la activación de las bombas de eflujo como lo es el complejo MarRAB así como las posibles mutaciones en los genes reguladores de este complejo de bombas como lo es *marR* y *acrR*. Se utilizó una cepa mutante diseñada de manera *in silico* con mutaciones dentro de las regiones descritas como responsables de la resistencia a Rifaximina, además se utilizó como un genoma sin mutaciones en el gen *rpoβ*, y *marR* con el fin de servir como un comparativo con las cepas depositadas en el GeneBank.

Búsqueda y selección de literatura

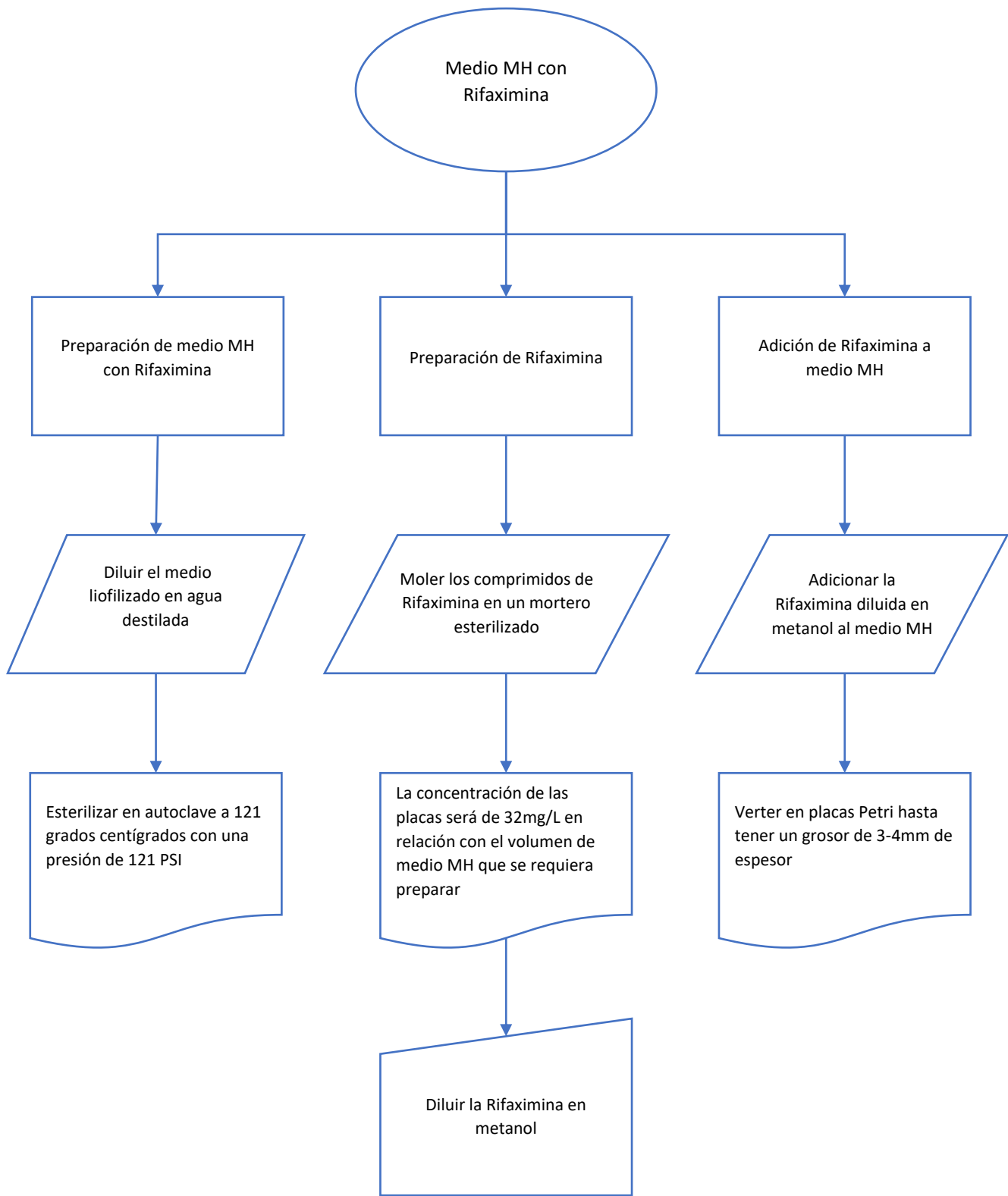
Se realizó una búsqueda de la literatura para identificar todas las citas relevantes que han informado sobre la presencia de AIEC en el intestino de pacientes con EII, sin incluir un límite para el año de publicación del reporte. Realizamos una búsqueda sistemática en la base de datos PubMed utilizando las siguientes palabras clave en idioma inglés: ‘Escherichia coli’ OR Escherichia coli AND adherent OR ‘AIEC’ AND ‘Inflammatory Bowel Diseases’ OR Inflammatory Bowel Diseases OR IBD OR Inflammatory Bowel Disease OR Ulcerative Colitis OR Crohn Disease OR Crohn’s Disease OR Crohn's Disease OR Crohn's Enteritis OR Regional Enteritis OR Granulomatous Enteritis OR Ileocolitis OR Granulomatous Colitis OR Terminal Ileitis OR Regional Ileitides OR Regional Ileitis. Esta búsqueda se restringió a los artículos en idioma inglés publicados hasta diciembre de 2022. Se recuperó un total de 145 artículos originales. Esta búsqueda se complementó con una revisión manual de la lista de referencias de los estudios encontrados previamente. Adicionalmente, se revisaron los Bioproyectos asociados a los 30 genomas de cepas AIEC depositados en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) hasta Diciembre de 2022, la extensión de Pathogens (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens>) y

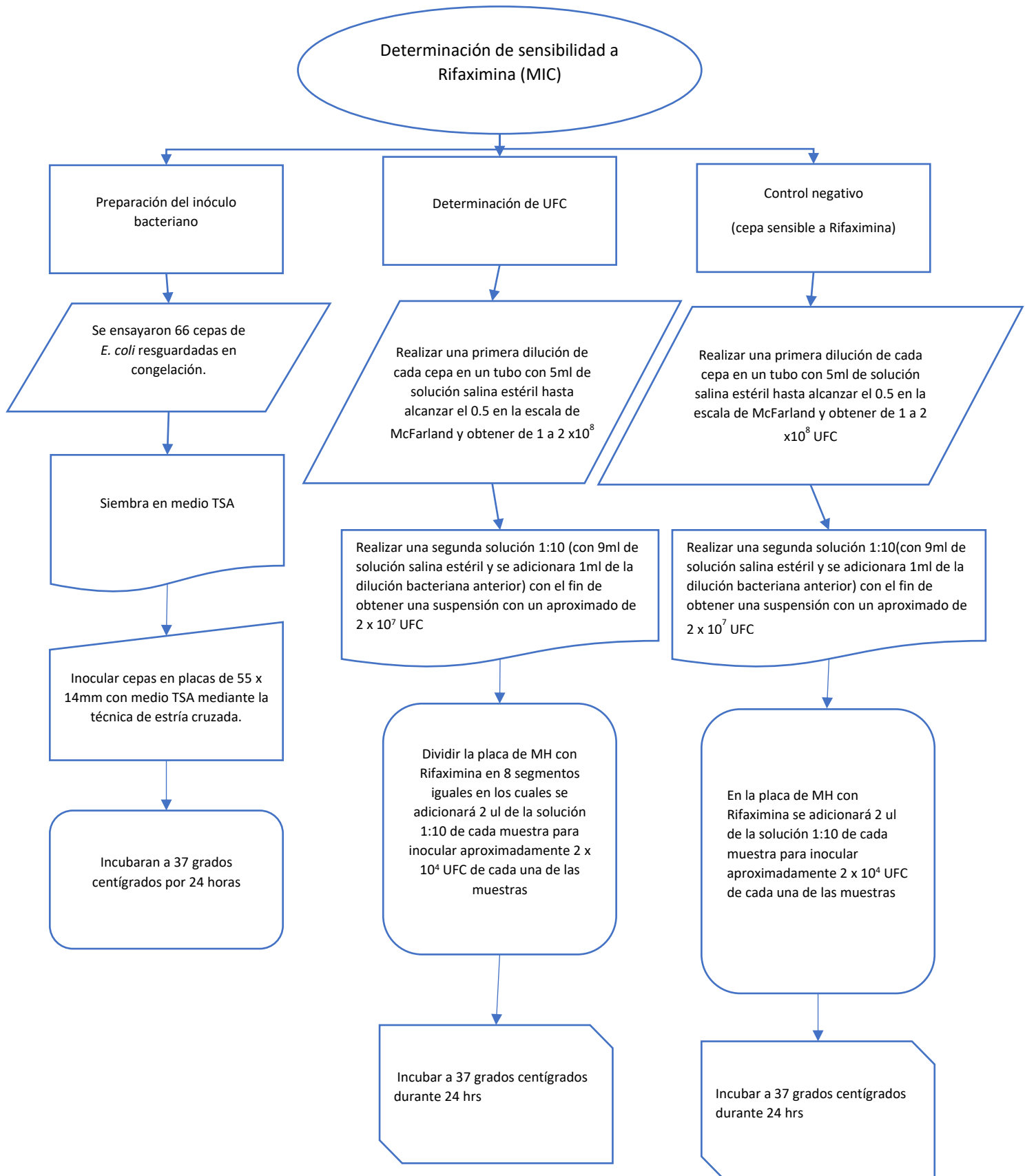
PATRIC 3.6.12 (<https://www.patricbrc.org>). Se incluyeron estudios que cumplieran con los siguientes criterios:

- 1) Investigación original que caracterice AIEC, las diferentes cepas y propiedades de virulencia.
- 2) Estudios originales que informan sobre la interacción de AIEC con células de barrera epitelial y/o macrófagos.
- 3) Artículos originales que abordan la prevalencia de AIEC y *E. coli* en la EII
- 4) Artículos originales que han informado sobre AIEC en la recurrencia postoperatoria de la EII o la actividad de la enfermedad.
- 5) Artículos originales o artículos de revisión que han discutido el posible papel de AIEC en la patogénesis de la EII y cualquier posible intervención terapéutica. Después de la selección, se incluyeron un total de 175 artículos originales.

Para el caso particular de México, se realizó una búsqueda de los reportes provenientes de estudios en nuestro país (descartando los que hubieran sido identificados en la búsqueda inicial). La búsqueda se realizó en PubMed y Google Académico, usando las siguientes palabras clave en inglés y en español: ‘*Escherichia coli* adherente-invasiva en México’, ‘AIEC asociada a Enfermedad Inflamatoria Intestinal en México’. Se identificaron 4 artículos originales, a los que se sumaron los 43 previamente mencionados, haciendo un total de 180 reportes incluidos en la presente revisión bibliográfica.

Diagrama de Trabajo





6.8. Análisis de datos

Este estudio se basó en los parámetros establecidos en el manual del CLSI M07 mediante la técnica de dilución en agar, así como en los utilizados en los trabajos de Gomes *et al.*, Dogan *et al.*, y Baurmet *et al.*,(37–41). Dichos parámetros establecen que se tomarán como cepas resistentes aquellas que demuestren un crecimiento positivo en placas con agar Müller Hinton adicionado con el antibiótico Rifaximina en una concentración de 32 mg/L tras ser inoculadas con una suspensión bacteriana cuya concentración idónea requerida será de $1-2 \times 10^4$ UFC/ml y como cepas sensibles a aquellas cepas que posean un crecimiento negativo en dichas placas siguiendo el mismo procedimiento de inoculación de la solución bacteriana (37–41).

7. Logística

7.1. Recursos humanos

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

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

7.2. Recursos materiales

- Medio de cultivo MacConkey ® Bioxon.
- Medio de cultivo TSA ® Bioxon.
- Medio de cultivo Müller Hinton ® Bioxon.
- Medio de cultivo TSI ® Bioxon.
- Medio de cultivo LEVINE ® Bioxon.
- Rifaximina (Sigma-Aldrich).

7.3. Recursos financieros

Este trabajo fue dirigido y financiado por el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, el cual pertenece al Centro de Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP. Con apoyo de proyectos grupales VIEP-100182644, responsable académica Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia y por el proyecto CB 2017-2018-A1-S-22136 de CONACYT.

7.4. Cronograma de actividades

7.4.1 Gráfica de Gantt

Actividades	Junio – Julio	Agosto – Septiembre	Octubre – Noviembre	Diciembre	Enero-Marzo
Redacción del protocolo	x	x	x		
Experimentación: determinación de concentración mínima inhibitoria			x		
Redacción de trabajo de tesis: análisis de resultados			x	x	
Presentación de Examen Profesional de Defensa de Trabajo de Investigación					x

8. Bioética

Las muestras fueron tomadas con el consentimiento y autorización de los pacientes bajo procedimientos médicos autorizados, y realizados por personal capacitado en las instalaciones médicas correspondientes.

9. Resultados

Revisión bibliográfica

Tras la recopilación y análisis de los datos obtenido de los 180 artículos se realizó un artículo de revisión cuyo título fue denominado como “Asociación de *Escherichia coli* Adherente-Invasiva con la Enfermedad Inflamatoria Intestinal”. En dicho manuscrito se resalta el papel que AIEC posee en el desarrollo y progresión de la EII además de resaltar la situación poco

alentadora que existe en México en cuanto el registro de pacientes con EII ya que no se cuenta con un registro de casos que permita saber la epidemiología que posee esta enfermedad.

El artículo consta de un escrito de 4000 palabras el cual fue realizado en conjunto por el equipo de trabajo conformado por Alcalá, Martínez-Hania Anai, De la Torre, Perdomo-Carlos, Acevedo, Ocampo-Carolina, Cortés, Cortés-Gerardo, Lozano, Zarain-Patricia y Rocha, Gracia-Rosa del Carmen. Este artículo será publicado en una revista de divulgación científica la cual deberá estar indexada al International Society for Biosafety Research (ISBR).

Antibiograma

De las 66 cepas estudiadas todas lograron un crecimiento positivo en las placas control con medio MH en las zonas delimitadas por la adición de la suspensión de bacterias con una

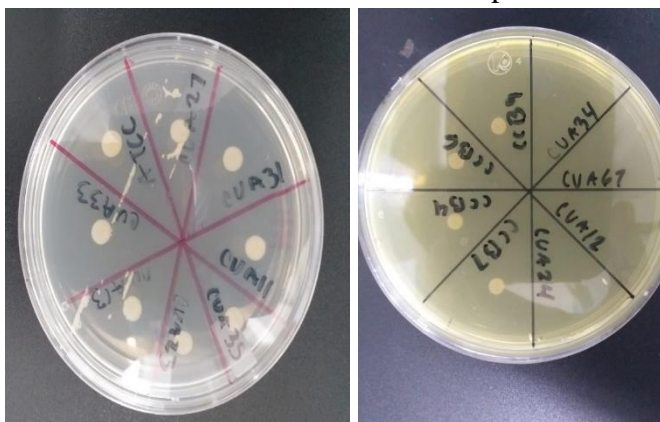
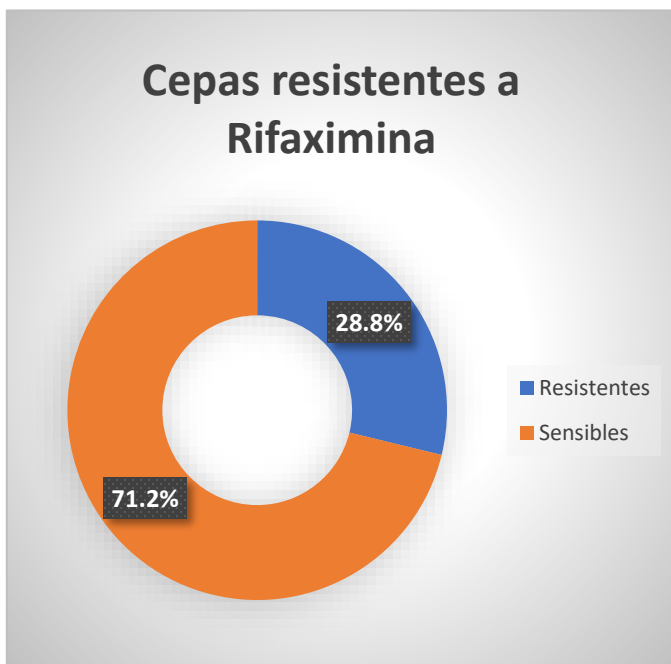


Figura 8: Crecimiento de colonias de cepas de *E. coli* en medio MH (imagen de la izquierda) utilizado como control de crecimiento positivo de las cepas estudiadas. Estas fueron comparadas con el crecimiento de las cepas en medio MH adicionado con una concentración de 32mg/L de Rifaximina (imagen de la derecha tomando) como resistentes a todas aquellas que mostraron un crecimiento positivo en ambos medios. Este trabajo, De la Torre C. A. 2022.

concentración de 2×10^4 UFC lo que permitió tomar como viables los resultados del crecimiento en ambos medios, por otro lado 19 cepas de las 67 testeadas demostraron tener un crecimiento positivo ante la acción de la Rifaximina adicionada a una concentración de 32mg/L a los medios MH por lo que se puede considerar que el 28.8% de las cepas poseen una resistencia fenotípica que les permite su reproducción y crecimiento aun con

la acción del antimicrobiano.

Las 19 cepas resultantes resistentes a la acción de la Rifaximina fueron en su totalidad provenientes de las muestras obtenidas del paciente diagnosticado con Colitis crónica y



Diverticulitis tanto la obtenida mediante biopsia de sigmoide, así como la obtenida de muestras coprológicas (tabla 2). Por otra parte, las muestras obtenidas de pacientes diagnosticados con Biopsia de Colon descendente y transverso, CUCI mediante la biopsia de Ano y colon descendente y Colon descendente y transverso mostraron un crecimiento negativo al no observarse la presencia de colonias bacterianas en las placas de medio MH adicionado con Rifaximina por lo que se tomó dicho

Figura 9 **Cepas resistentes a Rifaximina.** Se muestra que el 28,8% de las cepas estudiadas poseen una resistencia fenotípica a la acción bactericida de la Rifaximina

resultado como negativo, siendo esto equivalente a 47 cepas o al 71.2% de las muestras estudiadas.

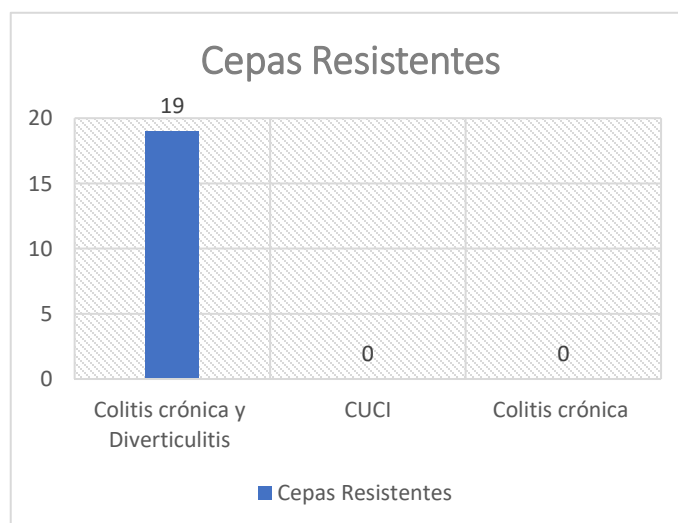


Figura 10 El estudio arrojó que de las 67 cepas estudiadas, las 20 cepas resistentes provienen de un mismo origen siendo aquellas pertenecientes al paciente con Colitis Crónica y Diverticulitis

Análisis *in silico*

Tras el análisis de los genomas de AIEC depositados en la plataforma “GeneBank” y su posterior estudio mediante la herramienta BLAST y CLUSTAL OMEGA se detectaron tres mutaciones en las cepas HM605 (G329D), T75 (N518D) y LF82 (A1263E) en la secuencia correspondiente al gen *rpoβ*. Sin embargo, las mutaciones en las posiciones 329 y 1263 no se han asociado con la resistencia a Rifaximina en otros modelos bacterianos, incluidos AIEC mientras que la presente en la región 518 está presente en el clúster I denotada por el cambio de aminoácido, esta mutación fue reportada anteriormente por Kothari y colaboradores la cual contribuye a la resistencia a Rifaximina. Respecto al complejo AcrAB-TolC este se encontró presente en el 100% de las 30 cepas de AIEC por lo que se buscó la presencia de mutaciones en la bomba AcrAB-TolC dando como resultado que veintinueve secuencias (96.6%), presentaron las mutaciones Y137H y G103S en el represor *MarR* siendo solo la cepa denominada T75 la única carente de esta mutación, mientras que la mutación S3N se detectó en el 36.6% de los genomas. Por otro lado, sólo una cepa presentó mutaciones en el represor del complejo AcrAB-TolC, *acrR* (T213I y N214T); sin embargo, estas mutaciones no se encuentran relacionadas con la resistencia a Rifaximina, ya que la variante asociada a la misma es R45C.

Tabla 3: **Mutaciones detectadas en la bomba de expulsión AcrAB-ToIC.**

Tras estudiar las secuencias depositadas correspondientes a cepas AIEC y su posterior análisis en plataformas

Cepa	AcrA	ToIC	MarA	MarR	AcrS	AcrB	AcrR	rpoβ
AIEC07	1	1	1	0.5	1	1	1	1
LF82	1	1	1	0.5	1	1	1	0.5
ECG04	1	1	1	0.5	1	1	1	1
AIEC01	1	1	1	0.5	1	1	1	1
ECG11	1	1	1	0.5	1	1	1	1
ECG28	1	1	1	0.5	1	1	1	1
AIEC17	1	1	1	0.5	1	1	1	1
C4435	1	1	1	0.5	1	1	1	1
C7230	1	1	1	0.5	1	1	1	1
C2226	1	1	1	0.5	1	1	1	1
UM-146	1	1	1	0.5	1	1	1	1
T75	1	1	1	1	1	1	0	0.5
13I	1	1	1	0.5	1	1	1	1
HM488	1	1	1	0.5	1	1	1	1
UM-141	1	1	1	0.5	1	1	1	1
UM131	1	1	1	0.5	1	1	1	1
CD121	1	1	1	0.5	1	1	1	1
CD44	1	1	1	0.5	1	1	1	1
CD3	1	1	1	0.5	1	1	1	1
UC5	1	1	1	0.5	1	1	0.5	1
CD26	1	1	1	0.5	1	1	1	1
UM-147	1	1	1	0.5	1	1	1	1
083:H1	1	1	1	0.5	1	1	1	1
HM-605	1	1	1	0.5	1	1	1	0.5
UM146	1	1	1	0.5	1	1	1	1
UM149	1	1	1	0.5	1	1	1	1
C7225	1	1	1	0.5	1	1	1	1

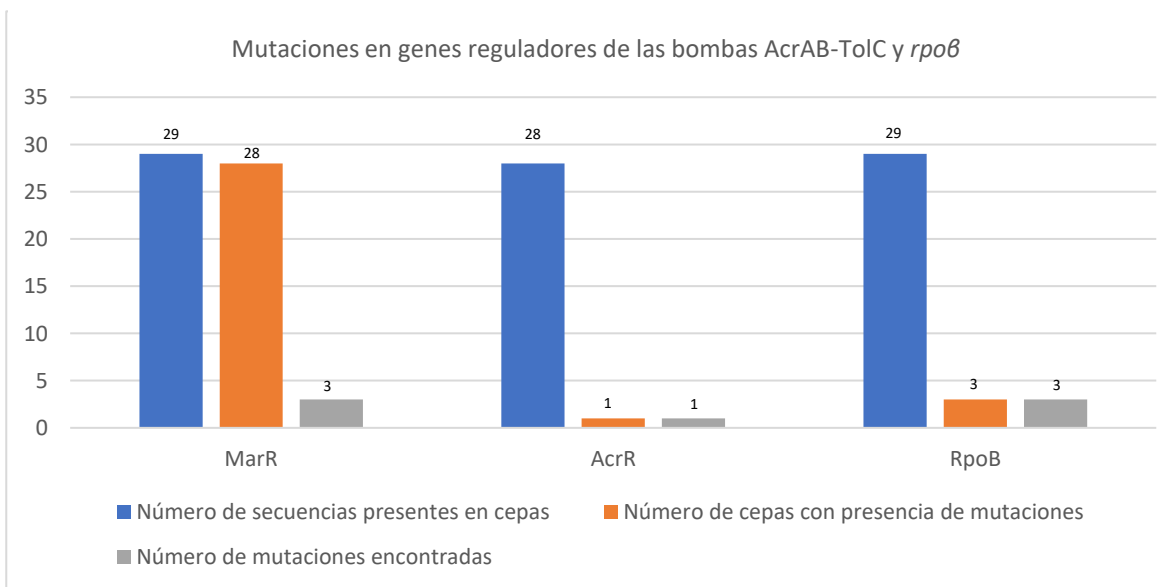
bioinformáticas se encontró la presencia del gen *rpoβ* así como de los genes correspondientes a los codificantes de la bomba AcrAB-ToIC al igual que sus genes reguladores como lo son *acrS*, *marA* y *marR*, fueron asignados los valores 1 para aquellas secuencias que se encontraron presentes sin ninguna mutación, 0.5 para aquellas que presentaron una mutación en su secuencia y 0 para aquellas cuya secuencia no se vio presente, encontrando que las 29 cepas presentaron una mutación en el gen *marR*, una cepa (UC5) presentó una mutación en *acrR* mientras que otra (T75) presentó una ausencia en la secuencia de este gen, en el gen *acrR*. 3 cepas (T75, HM-605 y LF82) presentaron mutaciones en el gen *rpoβ*.

HM605	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	HM605	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
Mutante	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	Mutante	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
AIEC17	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	AIEC17	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
AIEC07	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	AIEC07	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
AIEC81	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	AIEC81	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
CD26	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	CD26	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
CD3	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	CD3	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
EC628	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	EC628	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
LF82	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	LF82	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
NRG857C	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	NRG857C	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
UC5	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	UC5	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
UM131	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	UM131	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
UM147	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	UM147	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
UM_146	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	UM_146	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
UM146	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	UM146	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
UM141	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	UM141	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
UM128	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	UM128	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
UC37	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	UC37	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
T75	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	T75	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
HM488	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	HM488	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
EC604	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	EC604	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
CD121	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	CD121	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
CD44	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	CD44	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
C7230	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	C7230	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
C7226	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	C7226	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
C7225	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	C7225	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
C7223	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	C7223	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
C4435	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	C4435	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
pp08	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	pp08	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
131	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	131	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
ECG11	YIDESTGELICAAEMSLDLDLAKLSQSGHKRIETLFTNLDHGPYISETLRVDPNDRL	360	ECG11	LDGLDITLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGLLTR	540
*****	*****	*****	*****	*****	*****
HM605	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	MarR	MKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
Mut ante	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	T75	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
AIEC17	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	131	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
AIEC07	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	AIEC17	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
CD26	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	EC628	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
CD3	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	LF82	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
EC628	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	NRG857C	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
LF82	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	UC37	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
NRG857C	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	UM141	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
UC5	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	UM146	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
UM131	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	UM_146	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
UM147	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	UM147	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
UM_146	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	AIEC01	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
UM146	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	C4435	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
UM141	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	C7223	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
UM128	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	C7225	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
UC37	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	C7226	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
T75	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	CD30	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
HM488	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	CD26	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
EC604	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	CD44	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
CD121	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	EC604	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
CD44	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	ECG11	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
C7230	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	ECG11	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
C7226	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	UM488	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
C7225	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	UC5	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
C7223	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	UM128	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
C4435	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	UM131	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
pp08	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	UM149	VKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
131	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	MarR_mutante	HNKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
ECG11	GKAFGGQRFGENEVAL EYGAAYTLQELTVKSDVNGRTKMYKNIVDGHIHQEPGMP	1320	MarR_mutante2	HNKSTDLFNEIIPGLRLIHWVQKDRLLNLEYLSPDLTAAQFVLCSTRCAACTIPVEL	60
*****	*****	*****	*****	*****	*****
MarR	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	MarR	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
T75	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	T75	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
131	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	131	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
AIEC17	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	AIEC17	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
EC628	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	EC628	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
HM605	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	HM605	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
LF82	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	LF82	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
NRG857C	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	NRG857C	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
UC37	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	UC37	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
UM141	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	UM141	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
UM146	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	UM146	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
UM_146	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	UM_146	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
UM147	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	UM147	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
AIEC01	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	AIEC01	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
AIEC07	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	AIEC07	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
C4435	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	C4435	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
C7223	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	C7223	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
C7225	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	C7225	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
C7226	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	C7226	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
C7230	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	C7230	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
CD3	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	CD3	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
CD26	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	CD26	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
CD44	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	CD44	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
CD121	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	CD121	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
EC604	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	EC604	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
ECG11	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	ECG11	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
HM488	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	HM488	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
UC5	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	UC5	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
UM128	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	UM128	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
UM131	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	UM131	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
UM149	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	UM149	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
MarR_mutante	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	MarR_mutante	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
MarR_mutante2	KKVLSVDL.GAL.TRLM.DRL.VCKG.VERL.PNPNDRKRGVL.VKL.TT.GGAAT.CEQCHQ.VGQDLH	120	MarR_mutante2	QELTKNLTADAEVATL.EH.LKKVLP	144
*****	*****	*****	*****	*****	*****

Figura 11 Alineación y comparación de secuencias del gen *ropB* y *marR* de cepas AIEC depositados en la GeneBank. El análisis en la plataforma CLUSTAL OMEGA encontró que se presentaron 3 mutaciones por parte de las cepas HM605 (G329D), T75 (N518D) y LF82 (A1263E). El estudio de *marR* arrojó la presencia de mutaciones en la posición S3N, G107S y Y137H. Siendo G107 y Y137H las más predominantes estando presente en 29 de 30 cepas mientras que S3N solo se presentó en la cepa T75.

UC5	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATIE	215
Acr_mutante	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
Acr_sin_mutación	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
AIEC07	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
AIEC01	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
131	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
AIEC017	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
C4435	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
C7223	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
C7225	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
C7526	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
C7530	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
CD3	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
CD26	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
CD44	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
CD121	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
EC604	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
EC611	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
EC628	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
HM488	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
HM605	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
LF82	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
NRG857C	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
UC37	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
UM128	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
UM131	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
UM141	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
UM146	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
UM-146	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
UM147	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
UM149	APQSFDLKKEARDYVAILLLEMYLLCPTLRNPATNE	215
	***** *	

Figura 12 Alineación y comparación de secuencias del gen *acrR* de cepas AIEC depositados en el GeneBank. Tras el análisis en la secuencia en la plataforma CLUSTAL OMEGA se encontrando que únicamente la cepa UC5 poseía un cambio de aminoácido Y213I.



10. Figura 13 **Mutaciones en genes reguladores de bombas AcrAB-TolC.** El análisis arrojó que el gen *marR* fue el que mayor número de mutaciones presenta en su secuencia además de ser el gen con mayor prevalencia en cuanto a la presencia en cepas se refiere estando en 28 de las 29 analizadas con un total de 3 mutaciones diferentes encontradas en su secuencia. Por otra parte *acrR* mostró estar presente en 28 cepas, su secuencia presentó de una mutación en la cepa UC5, al igual que su ausencia en la cepa T75, *rpoB* mostró estar presente en las 29 cepas estudiadas, siendo las cepas T75, HM-605 y LF82 las que presentaron mutaciones diferentes en su secuencia dando como resultado un total de 3 mutaciones encontradas en su secuencia.

Discusión

EII y AIEC

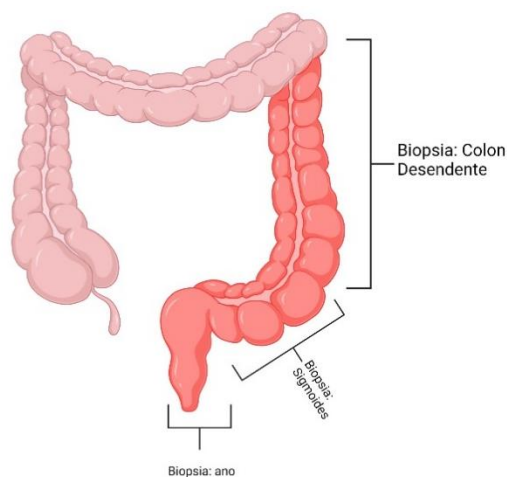


Figura 14 Extensión de la CU. La colitis ulcerosa puede extenderse a lo largo del colon, esta puede originarse en una región e ir progresando a lo largo del tiempo aumentando las zonas afectadas. AIEC puede contribuir con el avance de la enfermedad debido a su capacidad de colonizar el epitelio intestinal, por lo que es necesario tomar muestras de las diferentes zonas afectadas para el estudio de las bacterias que se encuentran a lo largo del tracto intestinal. Imagen creada con Biorrender.com Este trabajo, De la Torre C. A. 2022.

Tras la realización de los estudios de antibiogramas se encontró un total de 19 cepas resistentes a la concentración de 32mg/l, todas provenientes del mismo paciente (diagnosticado con Colitis crónica y Diverticulitis) en comparación de los demás pacientes con CUCI y Colitis crónica lo que pudiera sugerir que a pesar de que CUCI y la Colitis Crónica son enfermedades localizadas en región del colon con diferente grado de severidad y poder ser consideradas como EII (43,44), estas pueden ser tomadas como independientes al desarrollo de la resistencia por parte de AIEC, esto se ve exhibido mediante la comparación de la resistencia de las cepas obtenidas entre los

pacientes con diagnóstico de Colitis Ulcerosa y Colitis Ulcerosa (CU)/Diverticulitis, ya que solamente las cepas de este último poseen resistencia (43,44). Por otro lado, se sugiere que la resistencia a Rifaximina en cepas de este paciente, pudo deberse al tratamiento que se le otorgó al mismo, el cual, desafortunadamente, no fue de nuestro conocimiento.

En este caso al provenir las 19 cepas de un mismo paciente, pero con 2 orígenes diferentes (colon descendente y sigmoides) nos plantea el alcance y la extensión que AIEC posee como agente colonizador de estas regiones del aparato digestivo, siendo una tercera parte del colon la zona afectada, denotada por la presencia de úlceras, que son características propias de una EII, que según la clasificación de Paris utilizada para evaluar la gravedad y distribución de la CU se puede catalogar como un E2 (colitis izquierda); sin embargo, al carecer de más datos acerca del historial médico del paciente que nos den información de la evolución de su enfermedad se hace difícil el poder determinar la severidad y el crecimiento de la CU, además de poder estudiar el avance de la colonización de AIEC sobre la región del colon (45). Un hecho que puede mencionarse es el papel de AIEC en la progresión de una EII, ya que esta es capaz de colonizar progresivamente regiones en el intestino que no se han visto afectadas

formando biopelículas y dañando el epitelio intestinal, aumentando el número de lesiones y dificultando el uso de un tratamiento eficaz que ayude en el combate de esta enfermedad y proporcione una recuperación por parte del paciente(46–48).

Colitis Ulcerosa	
Extensión:	E1: Proctitis
	E2: Colitis Izquierda
	E3: Colitis Extensa
	E4: Pancolitis
Severidad	S0: Nunca severa
	S1: Severa en alguna ocasión
Crecimiento	G0: Sin retraso
	G1: Con retraso

Tabla 4: **Clasificación de Paris**. Esta clasificación permite evaluar la extensión y progresión de la CU mediante un sencillo sistema, gracias a este sistema es posible establecer estrategias que reduzcan la progresión hasta llegar a un punto de control. Medina. E 2013.

Mutaciones en *rpoβ*

En el presente estudio se observó el crecimiento de 19 cepas resistentes a la concentración utilizada como punto de corte (32mg/L) de Rifaximina, esto pudiera sugerir la posibilidad que dichas cepas poseen la mutación en el gen *rpoβ* causada por mutaciones puntuales en los sitios de acción de la Rifaximina; este tipo de resistencia causada por mutaciones puntuales han sido reportadas como la causa más frecuente de la resistencia a este antibiótico en múltiples bacterias, sin embargo, en *E. coli* dichas mutaciones han sido localizadas en el extremo N-terminal (codones 143 a 148) y Clusters I (codones 505 a 537), II (codones 563 a 575) y III (codones 684 a 690), las cuales han sido categorizadas como las causantes de un cambio (esto gracias que este gen es constitutivo de todas las bacterias) (23,28,49).



Figura 15 **Cambios estructurales del gen *rpoB***. Las mutaciones puntuales que se ha visto pueden tener una acción importante sobre el gen *rpoB* al cambiar la estructura de las regiones utilizadas como sitios de unión siendo las regiones denominadas Clusters I y II las que con mayor frecuencia son objetivos de estos cambios impidiendo la acción de la Rifaximina. Imagen modificada de Molstar.com 2022

Estas mutaciones puntuales guardan una estrecha relación con la estructura proteica de la subunidad β de la ARNpol II debido a que la variación de aminoácidos trae como consecuencia un cambio estructural de la proteína, modificando de esta forma el sitio de unión de la Rifaximina y los demás antibióticos de la misma familia, las regiones a las cuales se les ha atribuido la responsabilidad de estos cambios han sido a los residuos cercanos a sitios de unión del antibiótico pertenecientes a los clusters I y II(50). Estudios realizados por E. Wu y A Hiliker demostraron que mutaciones en los residuos (Q513, D516, H526,

S531, I572) en cepas de *E. coli* conferían un cambio estructural de la proteína así como la delección de 9 residuos cambiando la secuencia de 506-FGSS-509 a C506. Este último cambio altera la estructura de β -plegada correspondiente a esa región acortándolas y generando un truncamiento en las α -hélices, este tipo de cambios estructurales pueden ocurrir en cualquier región alterada por estas mutaciones silenciosas que a pesar de ser sutiles y no comprometer la funcionalidad de la proteína son capaces de impedir la correcta unión de la Rifaximina (50,51).

En *E. coli* estas mutaciones son causadas gracias a los errores que se presentan al momento de incorporar nucleótidos en el proceso de replicación, a pesar de tener una tasa muy baja de que estos errores ocurran (5×10^{-10} por genoma y por generación) dado al corto periodo de reproducción que posee *E. coli* (de 20 a 30 minutos) y la extensión en la colonización que esta bacteria tiene a lo largo del aparato digestivo (aproximadamente 10^{11} bacterias/ml), aumenta la posibilidad de que alguna célula bacteriana adquiera una mutación que no altere la funcionalidad, pero le permita sobrevivir a la acción antibacteriana de la Rifaximina dando

como resultado un aumento en la aparición de bacterias cada vez que estas se replican de 1 mutante por cada 50000 millones de células bacterianas a 2000 mutantes cada vez que las bacterias se duplican (52).

AIEC no es ajena a la posibilidad de desarrollar una o más mutaciones que le permita sobrevivir a la acción de la Rifaximina, de esta manera favoreciendo la colonización de más zonas del aparato digestivo ya que al ser solo las variantes resistentes las capaces de reproducirse la posibilidad de un fallo terapéutico aumenta y de igual forma aumenta la posibilidad de la aparición de una EII o se ve agravada en caso de existir alguna inflamación, viéndose afectadas más zonas del aparato digestivo (46,47,53).

Mutaciones en los genes de regulación de las bombas AcrAB-tolC

Otro factor importante que podría explicar la resistencia de las cepas es el posible contacto previo del paciente con el antibiótico o con alguno de su familia utilizado con mayor frecuencia para el tratamiento de EII como la Rifaximina, Rifamicina o Rifampicina ya que la resistencia relacionada a esta familia es la misma a la desarrollada para Rifaximina (23,24,40,54,55). Los mecanismos de resistencia de AEIC como lo es la existencia de genes codificantes de bombas de eflujo AcrAB-TolC (bombas presentes en bacterias gram negativas como *E. coli* y *Salmonella*), así como aquellos que controlan la expresión de los genes reguladores juegan un papel decisivo en cuanto a la supervivencia bacteriana se refiere impidiendo la llegada de la Rifaximina a su sitio de unión en la secuencia de *rpoβ*(32). Por ello el complejo MarRAB ha sido objeto de estudio ya que se sabe que mutaciones en *marR* suelen causar un aumento en la expresión del complejo AcrAB-TolC por la incapacidad de este gen de reprimir correctamente a *marA* y dando paso a la producción excesiva de bombas (56,57).

Analizando los resultados arrojados con el estudio *in silico* de las mutaciones en *marR* se encontró que 28 de las 29 cepas poseen más de 3 (S3N, G107S y Y137H) mutaciones que le podrían conferir una inactivación de su función a *mar*; entre estas mutaciones se encuentran deleciones, inserciones, cambios de marco de lectura y mutaciones sin sentido, siendo el cambio de un solo aminoácido en los residuos involucrados con la unión al DNA el responsable de la pérdida de función de este gen que al no ser un gen esencial para la supervivencia de *E. coli* posee una tasa de mutación mayor además que las cepas que posean

este mutación pueden replicarse dando paso a una mayor población con una sobreexpresión de bombas AcrAB-TolC y de esta manera favorecer el fallo de una terapia antibiótica utilizando Rifaximina.(57).

Mutaciones en *acrR*

AcrR es un gen de regulación local propio del sistema de bombas AcrAB-TolC y catalogado como represor local del operón, estudios realizados sobre la función de este gen arrojan que, si bien la posibilidad de que este gen adquiriera una mutación del tipo de cambio de aminoácido está presente, siendo la mutación en el codón 45 (C133T) la más estudiada ya que se ha demostrado que la presencia de esta mutación da paso a una sobreexpresión por parte del complejo AcrAB (58–60). *AcrR* al pertenecer a la familia TetR su dominio N-terminal posee un sitio de unión a DNA de tipo hélice-vuelta-hélice (HTH) que en cuyo caso de encontrarse con alguna mutación desencadenaría un cambio conformacional del dominio N-terminal que permitiría a *AcrR* desprenderse de su sitio de unión a DNA permitiendo de esta manera el paso al proceso de transcripción del complejo AcrAB(59–61).

Si bien tras el análisis de las secuencias de *AcrR* solo se encontró una cepa con una mutación (Y213I) esta no corresponde a las mutaciones por cambio de aminoácidos reportadas que son causantes de la sobreexpresión de las bombas de eflujo, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la afectación de la funcionalidad de este gen pudiera contribuir a la resistencia a Rifaximina por parte de AIEC como otra posible estrategia para asegurar su eficiencia(58–61).

Implicaciones de las mutaciones en *rpoβ*, *marR* y *AcrR*

Si bien la existencia de estos 3 genes se vio presente en las cepas evaluadas de manera *in silico*, *marR* cuenta con un mayor índice de recurrencia en cuanto a mutaciones se refiere, sin embargo, esto no hace que *rpoβ* se descarte por completo como una posible causa de la resistencia a Rifaximina, esto debido a la naturaleza de estos genes. *marR* y *AcrR* son genes no constitutivos que pudieran considerarse como accesorios ya que si bien le proveen de un método de supervivencia ante antibióticos cuando se ven mutados, en condiciones normales su activación y represión se ve controlada de manera eficiente para evitar una sobreproducción innecesarias de bombas de eflujo AcrAB-TolC en un ambiente no

estresante, las mutaciones que pudieran desarrollarse en estos genes poseen una mayor tasa de expresión debido a que estos cambios no afectan los procesos de replicación de *E. coli* pasando las mutaciones a su descendencia repitiendo el proceso y abriendo camino a la aparición de más mutaciones que puedan afectar o no la funcionalidad de estos genes(62). Es por ello que una estrategia estudiada estos últimos años, es el uso de bloqueadores de estas bombas AcrAB-TolC como un posible tratamiento por parte de moléculas pequeñas y su combinación con un antibiótico, ya que al bloquear la expulsión del antibiótico este puede llegar a su sitio de acción y ejercer su acción antimicrobiana como ocurriría en condiciones normales, no obstante aun es necesario el estudio de estas moléculas pequeñas ya que han demostrado poseer una pobre acción farmacológica y una alta toxicidad. Otras propuestas que actualmente se estudian tiene como posibles estrategias el mejoramiento del diseño molecular de viejos antibióticos con el fin de reducir su eflujo y por último la disminución de la eficacia de las bombas para expulsar el fármaco mediante el bloqueo de Tol-C (63,64).

Rpoβ es un gen constitutivo presente en todas las bacterias responsable de la replicación de *E. coli* por lo que las mutaciones que afecten su funcionalidad darán como resultado la incapacidad de reproducirse por parte de la bacteria, así que únicamente las mutaciones que no comprometan la funcionalidad de *rpoβ* serán las que serán transferidas a la descendencia(65). En el caso de las mutaciones en los Clusters I, II, III y N-terminal han demostrado solo tener efecto sobre la estructura proteica de *rpoβ* tal como la descrita por el cambio de aminoácido N518D, sin llegar a afectar la funcionalidad del gen por lo que la transmisión a la descendencia es posible generando que el sitio de acción de Rifaximina se vea afectado impidiendo su unión(65). Las consecuencias que conlleva una mutación de *rpoβ* en comparación de *MarR* y *AcrR* se podrían considerar de mayor importancia debido a que la Rifaximina nunca podrá ejercer su acción ya que no posee un sitio al cual unirse inutilizando por completo al antibiótico siendo necesario el uso de otro antibiótico con un sitio de acción diferente (66).

11. Conclusiones

Si bien las mutaciones en *rpoβ* demostraron tener un índice de expresión bajo en comparación a las vistas en *marR* y *acrR*, las implicaciones que estas llegaran a tener son de gran importancia debido al hecho de que el impedimento de la unión de la Rifaximina a su sitio

de acción por parte de los cambios estructurales conferidos por las mutaciones pudieran desencadenar un fallo terapéutico en contra de AIEC, favoreciendo su replicación para colonizar más zonas del aparato digestivo y trayendo como consecuencia el agravamiento de alguna EII relacionada con la presencia de AIEC, dando paso a la aparición y desarrollo de un ambiente inflamatorio que desencadene en la progresión de la enfermedad. Es por ello que no se descarta la posibilidad que las 19 cepas de AIEC resistentes a Rifaximina posean alguna mutación que favorezcan su supervivencia ante la acción antimicrobiana de este agente. De igual manera no se deja del lado que la presencia de mutaciones en los reguladores de las bombas de eflujo *AcrAB-TolC* *marR* y *acrR* posean también parte de responsabilidad, siendo que estas mutaciones probaron estar presentes en casi la totalidad de las cepas analizadas de manera *in silico*.

Cabe resaltar que de igual forma existe la posibilidad de que al ser mecanismos de resistencia independientes el uno del otro, puedan verse presentes al mismo tiempo por lo que es de suma importancia el análisis de ambos mecanismos de resistencia en conjunto, con el fin de proponer alternativas que ayuden a los pacientes que padecen una EII ya diagnosticada. Cabe mencionar que, si bien el desarrollo de una terapia contra AIEC no sería una solución total, ya que la EII es multifactorial, si evitaría su progresión a diferentes zonas del aparato digestivo, así como frenar el desarrollo de síntomas de mayor gravedad.

12. Perspectivas a Futuro

Debido a las condiciones adversas causadas por la actual pandemia de COVID-19, muchas de las pruebas que se planeaban realizar no pudieron ser llevadas a cabo por la falta de tiempo para su planeación, por lo que se plantea que en un futuro estas se lleven a cabo y se pueda obtener mayor información acerca de cómo es que las mutaciones en *rpoβ* pudieran generar una resistencia a Rifaximina en cepas de AIEC, debido a que la posibilidad de que estas sean la causa de su supervivencia es más que plausible, por lo que dentro de los experimentos a seguir en un futuro se encuentran:

1. El diseño de primers específicos para las regiones correspondientes a los clusters I, II, III y N-terminal para que por medio de PCR se puedan amplificar dichos genes para su posterior análisis mediante técnicas de secuenciación.

2. Análisis de las secuencias amplificadas mediante herramientas bioinformáticas para la determinación de mutaciones relacionadas a las reportadas en el gen *rpoβ* para su estudio estructural.
3. Búsqueda y determinación de bombas de eflujo AcrAB-TolC en cepas resistentes a Rifaximina mediante el uso de la técnica de dilución en placa combinado con el inhibidor de bombas Phe-arg β-Naftilamida.
4. El diseño de primers específicos para las regiones correspondientes a los genes reguladores *marR* y *acrR* que permita amplificar dichos genes para su posterior análisis mediante técnicas de secuenciación.
5. Análisis de las secuencias amplificadas mediante herramientas bioinformáticas para la determinación de mutaciones relacionadas a las reportadas en los genes *marR* y *acrR*.

13. Bibliografía

1. Gompertz M, Sedano R. Manifestaciones clínicas y endoscópicas en enfermedad inflamatoria intestinal. Revista Médica Clínica Las Condes [Internet]. 2019;30(4):273–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmclc.2019.06.002>
2. Roda G, Chien Ng S, Kotze PG, Argollo M, Panaccione R, Spinelli A, et al. Crohn's disease. Nat Rev Dis Primers [Internet]. 2020;6(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-020-0156-2>
3. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. The Lancet. 2017;389(10080):1741–55.
4. Ballester Ferré MP, Boscá-Watts MM, Mínguez Pérez M. Crohn's disease. Med Clin (Barc) [Internet]. 2018;151(1):26–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2017.10.036>
5. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. The Lancet [Internet]. 2012;380(9853):1590–605. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60026-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60026-9)
6. Calvo Hernan, F. y Caramuto Martins A. Reservoritis. Revista Española de Enfermería. 2008;100:178–178.
7. Panés J, Rimola J. Perianal fistulizing Crohn's disease: Pathogenesis, diagnosis and therapy. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017;14(11):652–64.
8. Veauthier B, Hornecker JR. Crohn's disease: Diagnosis and management. Am Fam Physician. 2018;98(11):661–9.

9. Rahmouni O, Dubuquoy L, Desreumaux P, Neut C. Microbiote intestinal et développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Vol. 32, *Medecine/Sciences*. Editions EDK; 2016. p. 968–73.
10. E. Jawetz, E. A. Melnick, G. F. Brooks JSB y LNO. *Microbiología Medica*. 13th ed. México: Manual Moderno; 1990. 196 p.
11. H. Lodish, A. Berk, L. L. Zipursky, P. Maysudaira, D. Baltimore y J. Darnell. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. México: Panamericana; 2001. 250–260 p.
12. Murray P., Rosenthal K. PM. *Microbiología Medica*. 8th ed. España: ElsevierIE; 2013. 251–260 p.
13. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010;8(3):207–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2298>
14. Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(1):37–54.
15. França FLS, Wells TJ, Browning DF, Nogueira RT, Sarges FS, Pereira AC, et al. Genotypic and Phenotypic Characterisation of Enteroggregative *Escherichia coli* from Children in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*. 2013;8(7).
16. Bretin A, Lucas C, Larabi A, Dalmasso G, Billard E, Barnich N, et al. AIEC infection triggers modification of gut microbiota composition in genetically predisposed mice, contributing to intestinal inflammation. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–14.
17. Dámaso D. *Antibacterianos*. Madrid; 1990. 417–435 p.
18. Calanni F, Renzulli C, Barbanti M, Viscomi GC. Rifaximin: Beyond the traditional antibiotic activity. Vol. 67, *Journal of Antibiotics*. Nature Publishing Group; 2014. p. 667–70.
19. Of R, Cid AIA•. Rifaximin: A Novel Nonabsorbed Rifamycin for Gastrointestinal Disorders [Internet]. 2006. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/42/4/541/384424>
20. Gobernado M, Ponce J. A.-Sociedad Española de Quimioterapia Revisión Rifaximina. Vol. 17, Junio. *Prous Science*; 2004.
21. Novoa-Farias O, Frati-Munari AC, Peredo MA, Flores-Juárez S, Novoa-García O, Galicia-Tapia J, et al. Susceptibilidad a la rifaximina y otros antimicrobianos de bacterias aisladas en pacientes con infecciones gastrointestinales agudas en el sureste de México. *Rev Gastroenterol Mex* [Internet]. 2017;82(3):226–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmex.2016.10.006>
22. Christopher W. *Antibiotics action, origins, resistance*. 1st ed. ASM Press; 2003.

23. Kothary V, Scherl EJ, Bosworth B, Jiang ZD, DuPont HL, Harel J, et al. Rifaximin Resistance in *Escherichia coli* Associated with Inflammatory Bowel Disease Correlates with Prior Rifaximin Use, Mutations in *rpoB*, and Activity of Phe-Arg- β -Naphthylamide-Inhibitable Efflux Pumps. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(2):811–7.
24. Vitali B, Turroni S, Dal Piaz F, Candela M, Wasinger V, Brigidi P. Genetic and proteomic characterization of rifaximin resistance in *Bifidobacterium infantis* BI07. *Res Microbiol*. 2007;158(4):355–62.
25. Pons MJ, Mensa L, Gascón J, Ruiz J. Fitness and molecular mechanisms of resistance to rifaximin in in vitro selected *Escherichia coli* mutants. *Microbial Drug Resistance*. 2012;18(4):376–9.
26. Andre E, Goeminne L, Cabibbe A, Beckert P, Kabamba Mukadi B, Mathys V, et al. Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated *rpoB* gene mutations in pathogenic mycobacteria. Vol. 23, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2017. p. 167–72.
27. Garibyan L, Huang T, Kim M, Wolff E, Nguyen A, Nguyen T, et al. Use of the *rpoB* gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome. *DNA Repair (Amst)*. 2003;2(5):593–608.
28. Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantscheff P, Allez M, et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(6):1566–74.
29. Sáenz Y, Ruiz J, Zarazaga M, Teixidó M, Torres C, Vila J. Effect of the pump inhibitor Phe-Arg- β -naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin [1]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004;53(3):544–5.
30. Lai LY, Hsu LY, Weng SH, Chung SE, Ke HE, Lin TL, et al. A Glutamine Insertion at Codon 432 of RpoB Confers Rifampicin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol*. 2020;11(October):1–7.
31. Agapito J, Neyra V, Castro J, Accinelli R, Rodríguez I, Espinoza JR, et al. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN *rpoB* ASOCIADAS A LA RESISTENCIA A RIFAMPICINA EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR*. Vol. 19, *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2002.
32. Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, et al. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature* [Internet]. 2014;509(7501):512–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13205>

33. Weston N, Sharma P, Ricci V, Piddock LJV. Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in Enterobacteriaceae. *Res Microbiol* [Internet]. 2018;169(7–8):425–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.10.005>
34. Belmans G, Liu E, Tsui J, Zhou B. AcrS Is a Potential Repressor of *acrA* Expression in *Escherichia coli* and Its Deletion Confers Increased Kanamycin Resistance in *E. coli* BW25113. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)*. 2016;20(April):12–7.
35. Cho H, Misra R. Mutational Activation of Antibiotic-Resistant Mechanisms in the Absence of Major Drug Efflux Systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2021;203(14).
36. Lewis J, Weinstein M, Melvin B, Campeau S, Cullen S, Galas M, et al. CLSI M100 ED32_2022.pdf. 2022.
37. Franklin R. Cockerill, Matthew A. Wikler, Jeff Alder, Michael N. Dudley, George M. Eliopoulos, Mary Jane Ferraro, Dwight J. Hardy, David W. Hecht, Janet A. Hindler, Jean B. Patel Mair Powell, Jana M. Swenson, Richard B. Thomson, Jr., Maria M. Traczewski, BLZ. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition. Vol. 32. CLSI; 2012.*
38. Dogan B, Scherl E, Bosworth B, Yantiss R, Altier C, McDonough PL, et al. Multidrug resistance is common in *Escherichia coli* associated with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(1):141–50.
39. Dogan B, Fu J, Zhang S, Scherl EJ, Simpson KW. Rifaximin decreases virulence of Crohn's disease-associated *Escherichia coli* and epithelial inflammatory responses. *Journal of Antibiotics* [Internet]. 2018;71(5):485–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41429-017-0022-y>
40. Baumert PMP, Camp J, Gözl H, Vavra M, Schuster S, Kern W v., et al. Detection of High-Level Rifaximin Resistance in Enteric Bacteria by Agar Screen. *Microbial Drug Resistance*. 2020;26(6):545–9.
41. Gomes C, Ruiz L, Pons MJ, Ochoa TJ, Ruiz J. Relevant role of efflux pumps in high levels of rifaximin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013;107(9):545–9.
42. Giacobello C, Foti M, Passantino A, Fisichella V, Aleo A, Mammina C. Serotypes and antibiotic susceptibility patterns of *Salmonella* spp. Isolates from spur-thighed tortoise, *Testudo graeca* illegally introduced in Italy. *Human and Veterinary Medicine*. 2012;4(2):76–81.
43. Yamamoto-Furusho JK, Gutiérrez-Grobe Y, López-Gómez JG, Bosques-Padilla F, Rocha-Ramírez JL. The Mexican consensus on the diagnosis and treatment of ulcerative colitis. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*

[Internet]. 2018;83(2):144–67. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.rgmxe.2018.04.001>

44. Feuerstein JD, Falchuk KR. Diverticulosis and Diverticulitis. *Mayo Clin Proc.* 2016;91(8):1094–104.
45. Medina E. Enfermedad inflamatoria intestinal (I): clasificación , etiología y clínica. 2013;59–67.
46. Smith EJ, Thompson AP, O’Driscoll A, Clarke DJ. Pathogenesis of adherent-invasive *Escherichia coli*. Vol. 8, *Future Microbiology*. 2013. p. 1289–300.
47. Palmela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin G, Hirten R, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2018;67(3):574–87.
48. Shawki A, McCole DF. Mechanisms of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Adherent-Invasive *Escherichia coli*. Vol. 3, *CMGH*. Elsevier Inc; 2017. p. 41–50.
49. Goldstein BP. Resistance to rifampicin: A review. *Journal of Antibiotics.* 2014;67(9):625–30.
50. Wu EY, Hilliker AK. Identification of Rifampicin Resistance Mutations in *Escherichia coli*, Including an Unusual Deletion Mutation. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2018;27(6):356–62.
51. Severinov K, Soushko M. Rif R mutations in the beginning of the *Escherichia coli* rpoB gene. *Molecular and General Genetics.* 1994;244:120–6.
52. RUIZ SANCHEZ F. El problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos. *Gac Med Mex.* 1957;87(12):18–27.
53. Perna A, Hay E, Contieri M, de Luca A, Guerra G, Lucariello A. Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC): Cause or consequence of inflammation, dysbiosis, and rupture of cellular joints in patients with IBD? Vol. 235, *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc.; 2020. p. 5041–9.
54. Ruiz J, Mensa L, Pons MJ, Vila J, Gascon J. Development of *Escherichia coli* rifaximin-resistant mutants: Frequency of selection and stability. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2008;61(5):1016–9.
55. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell.* 2001;104(6):901–12.
56. Watanabe R, Doukyu N. Contributions of mutations in *acrR* and *marR* genes to organic solvent tolerance in *Escherichia coli*. *AMB Express* [Internet]. 2012;2(1):1–11. Available from: *AMB Express*

57. Alzrigat LP, Huseby DL, Brandis G, Hughes D. Fitness cost constrains the spectrum of marR mutations in ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;72(11):3016–24.
58. Range K, M D, Moser YA. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*. 2012;23(1):1–7.
59. Webber MA, Talukder A, Piddock LJV. Contribution of mutation at amino acid 45 of AcrR to acrB expression and ciprofloxacin resistance in clinical and veterinary *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(10):4390–2.
60. Chowdhury N, Suhani S, Purkaystha A, Begum MK, Raihan T, Alam MdJ, et al. Identification of AcrAB-TolC Efflux Pump Genes and Detection of Mutation in Efflux Repressor AcrR from Omeprazole Responsive Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates Causing Urinary Tract Infections . *Microbiol Insights*. 2019;12:117863611988962.
61. Hirakawa H, Takumi-Kobayashi A, Theisen U, Hirata T, Nishino K, Yamaguchi A. AcrS/EnvR represses expression of the acrAB multidrug efflux genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2008;190(18):6276–9.
62. Ma D, Alberti M, Lynch C, Nikaido H, Hearst JE. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of acrAB genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol Microbiol*. 1996;19(1):101–12.
63. Alenazy R. Drug Efflux Pump Inhibitors: A Promising Approach to Counter Multidrug Resistance in Gram-Negative Pathogens by Targeting AcrB Protein from AcrAB-TolC Multidrug Efflux Pump from *Escherichia coli*. *Biology (Basel)*. 2022;11(9).
64. Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-Franco S, Kern W v., Pagès JM. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: The inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;59(6):1223–9.
65. Adékambi T, Drancourt M, Raoult D. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol*. 2009;17(1):37–45.
66. Dogan B, Scherl E, Bosworth B, Yantiss R, Altier C, McDonough PL, et al. Multidrug resistance is common in *Escherichia coli* associated with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(1):141–50.

14. Anexos

Anexo 1: *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit.*

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

Anexo 2. Diseño de Primers para el gen rpo β

Los primers utilizados para la amplificación de los Clusters I, II y III a los que se le asocian las mutaciones del gen rpo β fueron: 5'AAGTCATCGATATCCGTAACG3' y 5'GCACGTCGCCACGTTCAACC3' por 30 ciclos a 94°C, 30 s, 60°C, 30 s, 72°C, 30 s y una elongación final a 72°C por 10 min. Para la PCR del Cluster N-terminal se utilizó los primers 5'AAGTCATCGATATCCGTAAC3' y 5'GCACGTCGCCACGTTCAACC3' (23).

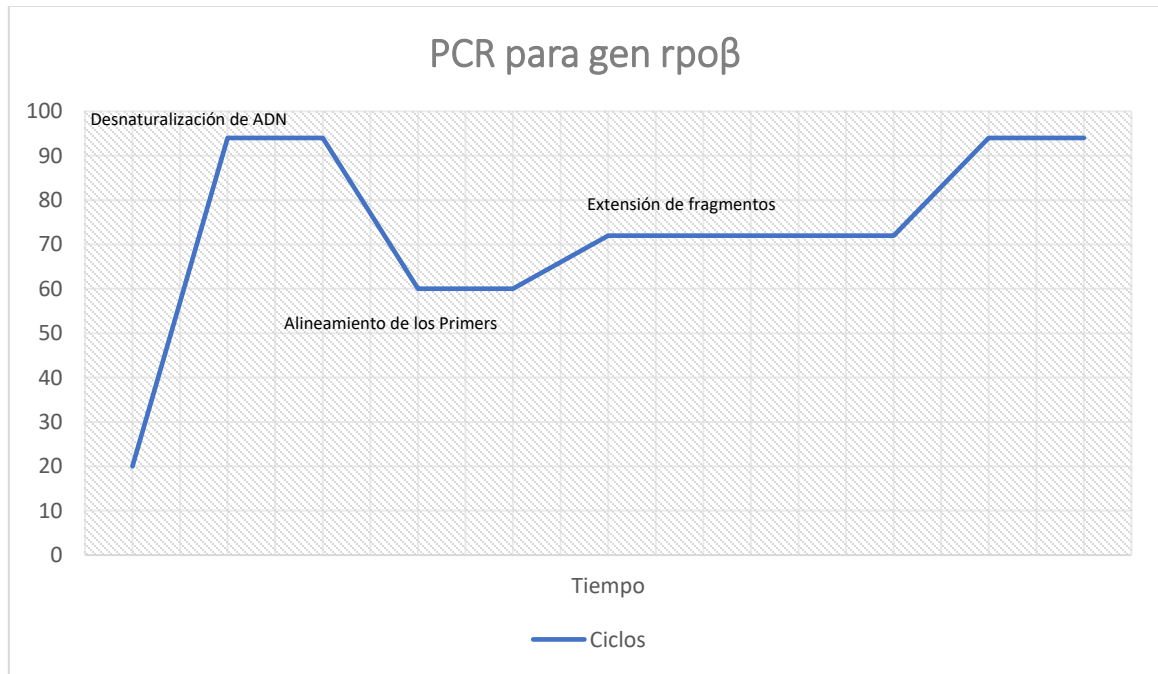


Figura 16 Condiciones de PCR para el gen *rpoβ*

Anexo 3: Revisión bibliográfica

Asociación de *Escherichia coli* Adherente-Invasiva con la Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Alcalá, Martínez-Hania Anai, De la Torre, Perdomo-Carlos, Acevedo, Ocampo-Carolina, Cortés, Cortés-Gerardo, Lozano, Zarain-Patricia, Rocha, Gracia-Rosa del Carmen

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Medicina, Licenciatura en Biomedicina, Calle 13 Sur No. 2702, Col. Los Volcanes, C.P. 72420 Puebla, Puebla.

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Ciencias, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Posgrado en Microbiología, Ciudad Universitaria, Edificio IC

Resumen

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es un padecimiento emergente mundial que se ha asociado a causas multifactoriales, incluyendo la participación de la bacteria *Escherichia coli* adherente-invasiva (AIEC). A la fecha aún hay muchas interrogantes sobre cómo AIEC puede participar en el desarrollo de esta enfermedad, es por ello que en esta revisión proporcionamos una actualización de la literatura sobre el papel potencial de AIEC en la patogenia de la EII, así como de las estadísticas que se han reportado en México. Realizamos una búsqueda sistemática de la literatura y analizamos un total de 43 reportes científicos obtenidos de bases de datos públicas que sustentan la participación de AIEC como agente causal de EII, ya que genera una invasión intestinal que promueve una respuesta inflamatoria exacerbada. La presente revisión contribuye a explorar los avances científicos que hasta la fecha ponen en evidencia la participación de AIEC en la EII. A pesar de que la EII es un fenómeno de salud mundial, México cuenta con información limitada, por lo que es necesario dar a conocer información al respecto, accesible a la comunidad médica involucrada en el manejo de estos pacientes, así como a la población en general que curse con estos padecimientos, con la finalidad de evaluar, monitorear y controlar este problema de salud pública.

Palabras clave: Enfermedad inflamatoria intestinal, AIEC, Colitis ulcerosa crónica idiopática, Enfermedad de Crohn.

Abstract

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is an emerging global condition that has been associated with multifactorial causes, including the participation of *Escherichia coli* adherent-invasive (AIEC). To date there are still many questions about how AIEC can trigger this disease, for this reason we provided an update on the potential role of AIEC in the pathogenesis of IBD, as well as statistics that have been reported in Mexico. We conducted a systematic search of literature and we analyzed 43 scientific reports obtained from public databases that support the participation of AIEC as a causative microorganism of IBD, since it generates an intestinal invasion that leads to an exacerbated inflammatory immune response. This review

contributes to exploring the scientific advances that evidence the involvement of AIEC in IBD. Even though IBD is a global health phenomenon, Mexico has limited information, and it is necessary to propose projects to lead the evaluation, monitoring and control of this public health problem.

Keywords: Inflammatory Bowel Diseases, AIEC, Ulcerative colitis, Crohn's disease.

Introducción

Las Enfermedades Inflammatorias Intestinales (EII), que comprenden la enfermedad de Crohn (EC), la colitis ulcerosa crónica idiopática (CUCI), y la colitis indeterminada inclasificable (CI) son trastornos gastrointestinales inflamatorios idiopáticos crónicos, que afectan a humanos.

La patogenia de las EII es multifactorial e incluye factores de susceptibilidad genética, inmunológicos, ambientales como el estrés, la medicación, la dieta, estimulación de la microbiota entérica y lesión intestinal mediada por el sistema inmunitario. Uno de los factores importantes que se debe tomar en cuenta es la microbiota intestinal, debido a que al estar compuesta por microorganismos, muchos de ellos simbioses, funcionan como una barrera importante de defensa ante microorganismos invasores manteniendo la estabilidad intestinal al producir ácidos grasos de cadena corta como acetato, propionato y butirato, previenen la expansión de cualquier patógeno microbiano, modulan el sistema inmunitario al estimular la producción de citocinas antiinflamatorias como (IL)-10, factor de crecimiento transformante (TGF)- β y disminuyen la activación de células T colaboradoras Th17 y Th1. Sin embargo, bajo la presencia de condiciones disbióticas, algunas bacterias que forman parte de la microbiota intestinal, como las proteobacterias de la familia Enterobacteriaceae pueden aumentar su duplicación, lo que provocaría una disminución de la diversidad bacteriana y pérdida en la estabilidad intestinal. Como resultado, habrá un aumento en las citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-17 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , que activan las células colaboradoras Th17 y Th1 involucradas en la respuesta inflamatoria. Además, se ha observado también, una disminución de las uniones estrechas entre las células que se asocia

con una expresión anormal de proteínas de unión estrecha y una pérdida de la permeabilidad en el epitelio intestinal, permitiendo que bacterias de la familia Enterobacteriaceae tengan acceso a capas epiteliales más profundas y provoquen una respuesta inflamatoria intestinal que puede ser desencadenante del desequilibrio en la microbiota intestinal, causado por la proliferación de enterobacterias, como puede ser *Escherichia coli*, lo que conduce a la persistencia del estado inflamatorio intestinal (Fig. 1) (Baldelli et al., 2021)

La frecuente recuperación de *E. coli* adherida a la mucosa ileal y colónica inflamada de pacientes con EC y CUCI ha despertado un gran interés por estas especies bacterianas en los últimos 20 años. Una propiedad de estas cepas es la capacidad de adherirse e invadir las células epiteliales intestinales (IEC, pos sus siglas en inglés), así como replicarse dentro de los macrófagos y algunas de ellas producir biopelículas en el intestino; por esto, estas cepas de *E. coli* fueron categorizadas como un nuevo grupo patógeno específico llamado *E. coli* adherente-invasiva (AIEC, pos sus siglas en inglés). Varias investigaciones moleculares y basadas en ensayos de adherencia/invasión en cultivos celulares, apoyan un papel importante de AIEC en la EC; sin embargo, existe controversia con respecto a su papel en la patogénesis de CUCI. Por lo que surge la pregunta: ¿las cepas de *E. coli* adherente-invasivas, son causa o consecuencia de la enfermedad?

Figura 1. Describirla. Traducida y modificada de Baldelli et al., 2021

EII en México

En este inicio del siglo XXI la EII se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, con la acumulación de un número elevado de casos, tasas altas de hospitalización, incapacidad, mortalidad prematura y un incremento en el costo médico directo con la llegada de la terapia biológica (J.K. Yamamoto Furusho et al., 2020). A pesar de que la EII es un fenómeno de salud mundial, en México no hay disponibilidad sistemática de estudios

epidemiológicos formales, ni de registros actualizados basados en la población, en los que se le dé seguimiento clínico al paciente durante cierto periodo de tiempo para el diagnóstico de la EII. Las estadísticas que se tienen en gran medida han sido documentadas por Yamamoto-Furusho y cols., quienes incluso han realizado un consenso mexicano para el diagnóstico y tratamiento de CUCI (J.K. Yamamoto Furusho et al., 2018). Más escasos son aún los estudios relacionados a la asociación de algún factor microbiano como es AIEC con el desarrollo de EII en población mexicana, teniendo como única evidencia el trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, en el que se han analizado las características fenotípicas y genotípicas de *E. coli* aisladas de individuos portadores clínicamente sanos, en las que han identificado a cepas AIEC (Barrios-Villa E et al., 2018; Barrios-Villa E 2020); sin embargo, no hay reportes de aislamientos caracterizados como *E. coli* del patotipo AIEC, a partir de biopsias intestinales de pacientes con EII. Es por ello que surge la necesidad de realizar un análisis profundo y exhaustivo para explorar las causas multifactoriales de la EII, a fin de proponer alternativas más eficientes para su diagnóstico, tratamiento y atención al paciente, tomando en cuenta los recursos sanitarios con los que cuenta nuestro país, para así, optimizar los costos de este padecimiento que aqueja a miles de mexicanos y que inclusive es desconocido por muchos.

Esta revisión tiene como objetivo proporcionar una actualización sobre el papel potencial de AIEC en la patogenia de la EII basada en un análisis sistemático de la literatura.

Materiales y métodos

Búsqueda y selección de literatura

Debido a la novedad y particularidad del tema, se realizó una búsqueda de la literatura para identificar todas las citas relevantes que han informado sobre la presencia de AIEC en el intestino de pacientes con EII, sin incluir un límite para el año de publicación del reporte. Realizamos una búsqueda sistemática en la base de datos PubMed utilizando las siguientes palabras clave en idioma inglés: ‘*Escherichia coli*’ OR *Escherichia coli* AND adherent OR ‘AIEC’ AND ‘Inflammatory Bowel Diseases’ OR Inflammatory Bowel Diseases OR IBD OR Inflammatory Bowel Disease OR Ulcerative Colitis OR Crohn Disease OR Crohn’s

Disease OR Crohn's Disease OR Crohn's Enteritis OR Regional Enteritis OR Granulomatous Enteritis OR Ileocolitis OR Granulomatous Colitis OR Terminal Ileitis OR Regional Ileitides OR Regional Ileitis. Esta búsqueda se restringió a los artículos en idioma inglés publicados hasta febrero de 2021. Se recuperó un total de 145 artículos originales. Esta búsqueda se complementó con una revisión manual de la lista de referencias de los estudios encontrados previamente. Adicionalmente, se revisaron los Bioproyectos asociados a los 30 genomas de cepas AIEC depositados en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) hasta FECHA, la extensión de Pathogens (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens>) y PATRIC 3.6.12 (<https://www.patricbrc.org>). Se incluyeron estudios que cumplieran con los siguientes criterios: 1) investigación original que caracterice AIEC, las diferentes cepas y propiedades de virulencia; 2) estudios originales que informan sobre la interacción de AIEC con células de barrera epitelial y/o macrófagos; 3) artículos originales que abordan la prevalencia de AIEC y E. coli en la EII; 4) artículos originales que han informado sobre AIEC en la recurrencia postoperatoria de la EII o la actividad de la enfermedad y 5) artículos originales o artículos de revisión que han discutido el posible papel de AIEC en la patogénesis de la EII y cualquier posible intervención terapéutica. Después de la selección, se incluyeron un total de 175 artículos originales.

Para el caso particular de México, se realizó una búsqueda de los reportes provenientes de estudios en nuestro país (descartando los que hubieran sido identificados en la búsqueda inicial). La búsqueda se realizó en PubMed y Google Académico, usando las siguientes palabras clave en inglés y en español: 'Escherichia coli adherente-invasiva en México', 'AIEC asociada a Enfermedad Inflamatoria Intestinal en México'. Se identificaron 4 artículos originales, a los que se sumaron los 43 previamente mencionados, haciendo un total de 180 reportes incluidos en la presente revisión bibliográfica.

Resultados y discusión de resultados

Epidemiología de AIEC

Las primeras cepas de AIEC fueron aisladas a partir de biopsias de pacientes con EC, alrededor del año 1998, exactamente en Lille, Francia, y desde entonces se han identificado diversas cepas a partir de lesiones ileales en otros pacientes (Darfeuille, et. al, 1988). La EII solía describirse como una enfermedad que afectaba solo a personas de ascendencia europea, particularmente del Reino Unido, América del Norte y Australia. Sin embargo, en los últimos años múltiples estudios han demostrado que su diagnóstico no está limitado por el nivel socioeconómico, la raza, la etnia o las fronteras geográficas.

Como consecuencia, la caracterización de los factores ambientales que rigen a este trastorno aún no han podido ser esclarecidos, pues la mayoría de los estudios se han hecho en países que han sufrido de la occidentalización desde ya varias décadas (Kaplan, et. al, 2016).

Sin embargo, se sabe que la incidencia es mayor en poblaciones urbanas que en rurales, quizá influenciada por condiciones ambientales importantes como estilo de vida, dieta y alimentación, estrés. En la mayoría de los estudios, la incidencia máxima se da entre la segunda y la cuarta década de vida, y se ha mantenido así durante varias décadas. Además, la incidencia en poblaciones establecidas es similar entre hombres y mujeres.

Aquí describir los antecedentes, es decir, los estudios y descubrimientos como se fueron dando los eventos que históricamente aportaron el conocimiento del patotipo AIEC. Aquí incluir la cepa de EEUU también y lo que hay en México (Barrios). Las cepas mejor estudiadas son AIEC LF82 y NRG857C.

Características fenotípicas de AIEC

Escherichia coli Adherente-Invasiva y la EC

La caracterización de las cepas de AIEC ha demostrado que son capaces de adherirse e invadir las células epiteliales intestinales, sobrevivir y multiplicarse en los macrófagos e inducir una fuerte respuesta proinflamatoria (Palmela, et. al, 2018; Costa et al., 2020). La prevalencia en el intestino de las cepas AIEC incrementa las lesiones ileales en pacientes con EC (36-52%) comparado con sujetos control sin EC (6-17%) (F. L. França et al., 2013).

AIEC es un patotipo muy heterogéneo, lo que la hace difícil de caracterizar a nivel molecular. Esta bacteria se comporta como un patobionte, en vez de patógeno verdadero. AIEC es distinta de otros patógenos intestinales pertenecientes al grupo de E.coli, ya que no almacena genes de virulencia específicos, sino que presentan varios asociados con otros patotipos, lo cual hace difícil su identificación molecular.

Mecanismo de adherencia de AIEC en la EII.

Describirlo e incluir figuras

AIEC induce lesiones inflamatorias en las células epiteliales por medio de fimbrias tipo 1 y fimbrias polares largas. Las Fimbrias tipo 1 son apéndices bacterianos filamentosos comunes que están en la subunidad principal FimA y tres subunidades menores, FimF, FimG y FimH (Yang et al., 2017), esta última subunidad se encuentra en la punta de las fimbrias, uniéndose a la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno 6 (CEACAM6) expresándose en el lado apical de las células epiteliales intestinales (Ellermann et al., 2018).

La translocación de AIEC también puede ocurrir por medio de las células M, que están optimizadas para la adherencia del antígeno y transporte de microorganismos (Camprubí Font et al., 2019), y que se encuentran presentes en las Placas de Peyer (PP) (Chassaing et al., 2011).

Mecanismo de invasión de AIEC en la EII.

Incluir las figuras respectivas

Dentro de los factores asociados a la microbiota intestinal se ha estudiado la relación del patotipo AIEC (Chassaing et al., 2011) con la secuencia del genoma en la cepa LF82 (Yang et al., 2017) revelando la presencia de diversos factores importantes involucrados en la virulencia (tabla 1).

Las reductasas de ribonucleótidos (RNR) son enzimas esenciales para la duplicación del material genético durante la división celular, ya que controlan la producción de los desoxirribonucleótidos para la síntesis y reparación del ADN. Las enterobacterias tienen tres clases funcionales de RNR (Ia, Ib y III), donde los de clase III disminuyen la capacidad de AIEC LF82 para colonizar la mucosa intestinal, esto respecto a ratones transgénicos que expresan CEACAM6 humano (Dreux et al., 2015).

Una vez que AIEC atraviesa el epitelio intestinal, entra en contacto con los macrófagos, que se replican extensamente dentro del fago-lisosoma, y donde se ha informado que se multiplica 70 veces sin precedentes dentro de las primeras 48 horas de la infección (He et al., 2016) lo que sugiere que puede inhibir la activación de la muerte celular programada (PCD) (Dunne et al., 2013), pues los macrófagos infectados liberan grandes cantidades de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y no sufren muerte celular (Bringer et. al, 2012).

También se ha identificado una isla genómica codificada por un plásmido (llamada PI-6) en la cepa AIEC NRG857c que confiere un alto nivel de resistencia a péptidos catiónicos y defensinas, este fenotipo se debe a dos genes en PI-6, que codifica una proteína de la familia Mig-14 implicada en la resistencia a defensina, y *arlC*, una familia OmpT proteasa de la membrana externa (McPhee et al., 2014). Otra proteína multifuncional importante para la patogenicidad es OmpA, que media la fagocitosis, la supervivencia y el crecimiento de *E. coli* en los macrófagos, lo que a su vez puede conducir a la lisis de los mismos (Pobeguts et al., 2020).

Como se ha mostrado en estudios, con el uso de la genética, la replicación de AIEC requiere glucólisis y es en gran medida independiente del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la vía del glioxilato, la vía de la pentosa-fosfato-vía y gluconeogénesis (Thompson et al., 2016). Algunos de estos genes codifican la utilización de propanodiol (operón *PduC*) y la adquisición de hierro (operón *ChuA*) relacionándose con la persistencia en macrófagos (Dogan et al., 2014), pues las cepas de AIEC que albergan este gen (*ChuA*) tienen más probabilidades de pertenecer al grupo filogenético B2 y D que pueden colonizar y sobrevivir dentro de las células epiteliales y macrófagos en pacientes con EC (Abdelhalim et al., 2020).

Múltiples variantes de genes del receptor de reconocimiento de patrones (PRR) que detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) se han relacionado con la EII, incluido NOD2 (dominio de oligomerización de unión a nucleótidos que contiene 2), TLR4 (receptor 4 tipo Toll) y NLRP3 (familia de receptores tipo NOD, que contiene 3 dominios pirina) (De la Fuente et al., 2014), donde sólo las cepas de *E. coli* asociadas a la EII portan genes de virulencia, invasividad y supervivencia dentro de los macrófagos, constituyendo un estímulo pro-inflamatorio difícil de controlar (Guo et al., 2018).

Respecto a NOD2 como mediador en la inducción de autofagia es importante resaltar su participación para sostener la carga bacteriana intramucosa, especialmente hacia AIEC, y para limitar el resultado de la respuesta inflamatoria (Negroni et al., 2016), pues las mutaciones en el gen CARD15 / NOD2 están asociadas con el desarrollo anormal y funcional de las PP.

Por otro lado los exosomas mediadores de interacción huésped-AIEC con capacidad para liberar una respuesta pro-inflamatoria, son secretados por células T84 epiteliales intestinales humanas infectadas con AIEC LF82, exhiben un mayor nivel de miR-30c y miR-130a en comparación con producidos por células no infectadas o infectadas con cepas de *E. coli* no patógenas, demostrando así que la transferencia de miARN inducida por infección bacteriana dentro de los exosomas juega un papel en la comunicación de célula a célula a través de la modulación de las respuestas inmunes innatas, favoreciendo la supervivencia del patógeno (Larabi et al., 2020).

Entre otros factores de virulencia se encuentran los referentes a las toxinas, pues aunque AIEC no tienen un repertorio común de sistemas toxina-antitoxina la caracterización molecular de variantes que se han identificado, como HipA-1 y CcdB-1, serán relevantes para identificar su contribución real a la persistencia y/o al estrés (Bustamante et al., 2020).

Mecanismo de replicación de AIEC dentro del macrófago

Incluir figuras

La multiplicación de AIEC dentro de las células hospederas está controlada por autofagia, un proceso homeostático responsable de la eliminación de componentes citoplasmáticos dañados o patógenos intracelulares a través de la vía lisosomal y que es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis intestinal, la regulación de la ecología intestinal, las respuestas inmunitarias intestinales adecuadas y la protección antimicrobiana. Una disfunción de la autofagia se asocia con varias patologías humanas, incluida las EII.

Recientes estudios han demostrado que la vía de señalización del factor de iniciación de la traducción eucariota 2 alfa quinasa 4 (EIF2AK4), el factor 2 de iniciación de la traducción eucariota (EIF2A) y el factor de transcripción activador 4 (ATF4) se inducen en las células epiteliales intestinales después de la infección con AIEC, activando la autofagia para controlar la replicación intracelular de AIEC e inhibir la inflamación inducida por AIEC en respuesta a diversos estímulos de estrés. La fosforilación de EIF2A en respuesta a la activación de EIF2AK4 aumenta posteriormente la traducción de ARNm específicos que se sabe que son importantes para la remediación del estrés. Se ha demostrado que el papel de la activación de la vía de la autofagia EIF2AK4-EIF2A-ATF4 en respuesta de infecciones de AIEC mediadas por la vía de ATF4, depende de la transcripción inducida de varios genes de autofagia. Adicionalmente, la vía EIF2AK4/EIF2A/ATF4 está involucrada en el control mediado por autofagia de la replicación intracelular de AIEC y la respuesta inflamatoria, y que la infección por AIEC en ratones *eif2ak4* - / - desencadena la inflamación intestinal (A. Bretin et al., 2018).

Respuesta inmune de células Th17

Falta incluir las figuras

Las células Th17 se diferencian de las células T vírgenes tras la estimulación con TGF- β e IL-6 (Sutton et al., 2006 ; Ruan et al., 2011), y producen IL-17A, IL-17F, IL-21, IL -22, IL-26 y TNF- α (Cua y Tato, 2010 ; Hundorfean et al., 2012 ;Figura 2). La estimulación con IL-17 activa el dominio SEF/IL-17R (SEFIR), que está estrechamente relacionado con el dominio TIR del receptor IL-17R. Por lo tanto, activa la señalización de NF- κ B y AP-1 a través del activador 1 de NF- κ B (ACT-1) y el factor 6 asociado al receptor del factor de

necrosis tumoral (TNFR) (TRAF-6), respectivamente (Moseley et al., 2003 ; Gaffen , 2009 ; Wang et al., 2013). La señalización de NF- κ B y AP-1 induce la secreción de IL-1, IL-6, TNF- α , MMP y péptidos antimicrobianos. Por lo tanto, la IL-17 tiene un papel proinflamatorio y puede proteger contra infecciones extracelulares parasitarias y bacterianas (Ye et al., 2001 ; Raffatellu et al., 2008 ; Lin et al., 2009).). Por cierto, IL-17 e IL-21 se sobreexpresan en la mucosa colónica de pacientes con CU, mientras que IL-17, IL-21 e IL-22 se sobreexpresan en la mucosa colónica de pacientes con EC (Fujino et al., 2003 ; Andoh et al., 2005 ; Monteleone et al., 2005 ; Brand et al., 2006). Por lo tanto, las citocinas relacionadas con Th17 están involucradas en la fisiopatología tanto de la CU como de la EC. En la EC, las células T CD3+ IL-17+ y las células CD68+ se encuentran dispersas en la submucosa y la muscular propia, y algunas de estas células producen IFN- γ (Fujino et al., 2003 ; Annunziato et al., 2007). Los estudios de asociación del genoma completo han revelado que IL23R y cinco genes implicados en la diferenciación de Th17, a saber, el IL12B, Janus quinasa 2 (JAK2), transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), receptor de quimiocinas con motivo CC 6 (CCR6) y TNFF15 , están asociados con la susceptibilidad a la EC (Barrett et al., 2008).

En pacientes con EC, la IL-17A se sobreexpresa en el intestino estenótico, en comparación con su expresión en los tejidos del área no estenótica (Biancheri et al., 2013). Curiosamente, las expresiones tanto de IL-17A como de HSP47 aumentan en el colon de pacientes con EC activa. Además, la IL-17A promueve la expresión de HSP47 y colágeno I en miofibroblastos intestinales y células CCD-18Co aisladas de pacientes. De hecho, la eliminación de HSP47 en estas células inhibe la producción de colágeno I inducida por IL-17A (Honzawa et al., 2014). Además, el tratamiento con IL-17A de células IEC-6 (una célula del intestino delgado de rata) induce EMT, disminuye la expresión de E-cadherina y aumenta la expresión de vimentina, caracol y α -SMA (Zhang et al., 2018).). También se ha informado que la IL-21 aumenta la respuesta Th1, que, a su vez, estimula a los fibroblastos intestinales para que secreten MMP en respuesta a la EC (Monteleone et al., 2006). Por cierto, las respuestas inmunitarias Th1 y Th17 están involucradas en el modelo de ratones con colitis inducida por ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) (Zhu et al., 2012). De hecho, la administración de un anticuerpo anti-IL-17 a ratones con colitis crónica, que fue inducida por la administración intrarrectal repetida de TNBS, disminuye la expresión de citoquinas relacionadas con la

fibrosis, como colágeno 3, TNF- α , metalopeptidasa TIMP inhibidor 1 (TIMP-1) y MMP-2, así como citocinas inflamatorias, a saber, IL-1 β , TGF- β 1 y TNF- α , lo que finalmente da como resultado una fibrosis suprimida (Zhang et al., 2018 ; Li et al., 2020). Sin embargo, el anticuerpo anti-IL-17A (secukinumab) y el anticuerpo anti-receptor de IL-17 (brodalumab) no lograron demostrar eficacia en el tratamiento de la EC (Hueber et al., 2012 ; Mozaffari et al., 2015). Por lo tanto, en lugar de la inhibición directa de IL-17, las vías descendentes de IL-17, como HSP47, y otras citocinas basadas en IL-17, como IL-21, pueden ser objetivos para evitar la fibrosis intestinal.

Mecanismo de producción de biopelícula de AIEC

Describirlo e incluir figuras

Una vía importante en la patogenia de la cepa LF82 de AIEC, es el factor E, también llamado RpoE, donde se incluyen genes que codifican foldasas periplásmicas, proteasas y chaperonas que interfieren con el plegado de proteínas de la membrana externa (OMP), y se activa por tensiones que interfieren con esta misma, como la osmolaridad encontrada en el tracto gastrointestinal, regulando la adhesión e invasión de las células epiteliales intestinales, así como el proceso en la formación de biopelículas, mediante la regulación de expresión de flagelos y pili tipo 1, (Cieza, et. al, 2015) donde su expresión está regulada al por IFN- γ y TNF- α (Yang, et. al, 2017), además de transcribir una serie de bio-enzimas sintéticas involucradas en fosfolípidos, ácidos grasos, lipopolisacáridos (LPS) y síntesis de oligosacáridos derivados de la membranas, así como una serie de otras envolturas celulares proteicas, incluidas las lipoproteínas, las proteínas de la membrana interna y proteínas de la envoltura de función desconocida (Chassaing, et. al, 2015).

Análisis sistémico de la presencia de E. coli adherente/invasiva (AIEC) en intestino de pacientes con EII

La EII no es un padecimiento que se reporte obligatoriamente en México. Actualmente, nuestro país no cuenta con una estadística oficial de personas afectadas con EC o CUCI, ni se cuenta con cifras oficiales sobre los costos para diagnosticar y tratar este conjunto de padecimientos, lo que se tiene son extrapolaciones hechas con base a cifras internacionales,

ya que no hay disponibilidad sistemática de estudios epidemiológicos nacionales, lo que conlleva a la falta de indicadores que permitan monitorear el número de personas que sufren estos padecimientos. Lo que se tiene son estimaciones de la prevalencia realizadas con base a información cualitativa recopilada en bases de datos administrativas, provenientes de instituciones de atención a la salud del sector público y privado. Este hecho representa un reto importante para la Secretaría de Salud, ya que se estima que las cifras aumenten considerablemente en los próximos años, debido al acelerado estilo de vida y a la influencia del ambiente.

La población con EII más afectada es la que se encuentra en edad productiva, lo que genera también una repercusión económica en el país.

El movimiento de pacientes con EC y CUCI es mundial y también está presente en América Latina cada vez con más fuerza. En México existe la fundación “Vivir con Crohn y CUCI de México”, como un puente permanente de información, educación y apoyo para todas aquellas personas que padecen una enfermedad inflamatoria del intestino con el fin de mejorar su calidad de vida (<https://crohncuci.org.mx>).

En medio de la situación sanitaria que estamos viviendo actualmente, padecimientos como la EII pueden agudizarse, complicando la armonía de vida de los pacientes, que junto con características genéticas de cada individuo y la pérdida del equilibrio en la microbiota intestinal, se favorecen que el patobionte AIEC prolifere en el intestino e interactúe con las células inmunológicas intestinales, exacerbando la respuesta inmunológica del intestino en el hospedero. De ahí el interés de conocer el papel de la bacteria *E. coli* adherente-invasiva en la EII con la finalidad de contribuir en una mejor atención médica al paciente..

Se describe que AIEC afecta procesos de la célula huésped como la síntesis de proteínas, la transducción de señales, la división celular, la secreción de iones, la transcripción, la función del citoesqueleto y la función mitocondrial (44 , 163). Los estudios sobre AIEC muestran que es capaz de adherirse a la mucosa intestinal al unirse a las moléculas de adhesión celular relacionadas con el antígeno carcinoembrionario 6 (CEACAM6), invadir las células epiteliales intestinales mediante el uso de microfilamentos y microtúbulos de actina de la célula huésped, replicarse intracelularmente, translocarse a través de la barrera del intestino humano, y se mueven hacia tejidos más profundos (162 , 164 , – 168) (Figura 1). Los estudios

también muestran que AIEC puede sobrevivir dentro de los macrófagos, estimular la producción de TNF- α y promover una respuesta inflamatoria granulomatosa (89 , 168). Sin embargo, en la actualidad, todavía se sabe poco sobre la patogenia in vivo de AIEC o cualquier gen que sea específico para AIEC, como se ha descrito para otros patotipos de *E. coli*, como ETEC y EAEC. Hasta ahora, las propiedades/características de aptitud vinculadas a AIEC también se encuentran en otras cepas de *E. coli* y, por lo tanto, no pertenecen específicamente a AIEC. Se necesitan más estudios para caracterizar AIEC, así como su papel potencial en CD y marcadores que pueden usarse para identificar específicamente el patotipo AIEC.

Los pacientes con EC tienen una composición de microflora intestinal anormal, y estos microorganismos están estrechamente relacionados con la inflamación y la estenosis intestinal que se observan en la EC. Específicamente, se ha observado una disminución de la aparición de phylum Firmicutes y una mayor aparición de phylum Proteobacteria, especialmente Enterobacteriaceae, en pacientes con EC con inflamación refractaria o estenosis intestinal (Frank et al., 2007 ; Sokol et al., 2020). Además, los polimorfismos genéticos, como en los genes que codifican la proteína 16 like 1 relacionada con la autofagia (ATG16L1) y la proteína 2 que contiene el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2 ; Hugot et al., 2001), están asociados con el riesgo de desarrollar EC (Hampe et al., 2007 ; Parkes et al., 2007). La *Escherichia coli* adherente/invasiva (AIEC) en el intestino se aísla con mayor frecuencia de la parte terminal del íleon de los pacientes con EC, lo que sugiere que la AIEC puede contribuir a la fibrosis (Darfeuille-Michaud et al., 2004 ; Small et al., 2013). ; Rieder et al., 2017). De hecho, AIEC se ha detectado en el 46,7 % de los pacientes con EC en comparación con su aparición en solo el 13,3 % de los sujetos sanos (Sarabi Asiabar et al., 2018). AIEC requiere un sistema de secreción tipo IV (T4SS) para formar biopelículas en el tracto intestinal y asentarse en las células epiteliales intestinales (Figura 2). Además, los aislados de *Escherichia coli* de pacientes con EC son ricos en T4SS, que probablemente esté involucrado en la actividad de la enfermedad (Elhenawy et al., 2021). Curiosamente, los pacientes con anticuerpos séricos contra péptidos microbianos específicos tienen un inicio más temprano de fibroestenosis y muestran complicaciones tempranas de EC (Dubinsky et al., 2008). Además, el creeping fat, específico de la EC, promueve la interacción con las bacterias intestinales que han migrado a la submucosa,

contribuyendo así a la activación de las respuestas inmunitarias (Suau et al., 2021). Estos datos sugieren que la AIEC puede exacerbar la inflamación y la estenosis asociadas con la EC. Además, AIEC secreta Yersiniabactina (Perry and Fetherston, 2011), un agente quelante de hierro, para incorporar hierro a sus células; sin embargo, esta yersiniabactina puede ayudar a algunas bacterias a infectar las capas subepiteliales del intestino, causando inflamación y fibrosis intestinal (Kim et al., 2005 ; Ellermann et al., 2019).

La yersiniabactina secretada por *Escherichia coli* adherente invasiva (AIEC) ayuda a las bacterias a transferirse a la submucosa, y las bacterias en la submucosa tienen una respuesta inmune mutua con la grasa progresiva. Las citocinas relacionadas con las células Th17 promueven la fibrosis al actuar sobre los miofibroblastos.

En resumen, la presente revisión de la literatura contribuye significativamente a explorar los avances científicos que hasta la fecha se han alcanzado sobre el conjunto de enfermedades inflamatorias intestinales como un problema de Salud Pública mundial y que aquejan también, a gran parte de la población mexicana, teniendo como objetivo dar a conocer a la comunidad científica, médica y en general de nuestro país, información científica sobre uno de los padecimientos más relevantes en el área de la gastroenterología.

A pesar de que las EII son un fenómeno de salud mundial y con información sistematizada limitada en nuestro país, debemos ser optimistas y aprovechar los datos y recursos disponibles para proponer proyectos que conlleven a evaluar, monitorear y controlar este problema de salud a niveles locales, con miras a extrapolar y extender las estrategias resultantes a nivel nacional y mundial en un futuro cercano.

En la actualidad, todavía se sabe poco sobre la patogenia in vivo de AIEC o cualquier gen específico para identificar AIEC, como se ha descrito para otros patotipos de *E. coli*. Se

necesitan más estudios para caracterizar AIEC, así como su papel potencial en EC y marcadores que pueden usarse para identificar específicamente el patotipo AIEC.

Además, esta revisión pretende crear conciencia de que al tratarse de una enfermedad de etiología variable y causas múltiples, ningún individuo está exento de padecerla, ya que cualquier alteración como el estrés, el desequilibrio de la microbiota (la presencia de AIEC), así como condiciones físicas, genéticas, ambientales o inmunológicas, pueden ser un detonante para padecer una EII.

Agradecimientos

A la Facultad de Medicina y a la Coordinación de la Licenciatura en Biomedicina, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Poner el proyecto de Conacyt

A Maricruz Martínez, Beatriz Capdevielle y Natalia Henonin, representantes de la fundación “Vivir con Crohn y CUCI de México”.

Referencias bibliográficas

1. Abdelhalim, K. A., Uzel, A., & Ünal, N. G. Virulence determinants and genetic diversity of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) strains isolated from patients with Crohn's disease. *Microb Pathog.* 2020;145, 104233.
2. Baldelli, V., Scaldaferrri, F., Putignani, L., & Del Chierico, F. The role of Enterobacteriaceae in gut microbiota dysbiosis in inflammatory bowel diseases. *Microorganisms.* 2021; 9(4), 697.
3. 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. Adherent/invasive *Escherichia coli* (AIEC) isolates from

- asymptomatic people: New *E. coli* ST131 O25:H4/H30-Rx virotypes. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2018; 17(1).
4. 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. Comparative genomics of a subset of Adherent/Invasive *Escherichia coli* strains isolated from individuals without inflammatory bowel disease. *Genomics*. 2020; 112(2), 1813–1820.
 5. Bretin, A., Lucas, C., Larabi, A., Dalmaso, G., Billard, E., Barnich, N., Bonnet, R., & Nguyen, H. T. T. AIEC infection triggers modification of gut microbiota composition in genetically predisposed mice, contributing to intestinal inflammation. *Scientific Reports*. 2018; 8(1).
 6. Bringer, M. A., Billard, E., Glasser, A. L., Colombel, J. F., & Darfeuille-Michaud, A. Replication of Crohn's disease-associated AIEC within macrophages is dependent on TNF- α secretion. *Lab Invest*. 2012;92(3), 411-419.
 7. Bustamante, P., & Vidal, R. Repertoire and Diversity of Toxin–Antitoxin Systems of Crohn’s Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli*. New Insight of T his Emergent *E. coli* Pathotype. *Front Microbiol*. 2020;11, 807.
 8. Camprubí-Font, C., Ewers, C., Lopez-Siles, M., & Martinez-Medina, M. Genetic and phenotypic features to screen for putative adherent-invasive *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2019;10, 108.
 9. Camprubí-Font, C., Lopez-Siles, M., Ferrer-Guixeras, M., Niubó-Carulla, L., Abellà-Ametller, C., Garcia-Gil, L. J., & Martinez-Medina, M. Comparative genomics reveals new single-nucleotide polymorphisms that can assist in identification of adherent-invasive *Escherichia coli*. *Scientific reports*. 2018;8(1), 1-11.
 10. Céspedes, S., Saitz, W., Del Canto, F., De la Fuente, M., Quera, R., Hermoso, M., Vidal, R. M. Genetic diversity and virulence determinants of *Escherichia coli* strains isolated from patients with Crohn's disease in Spain and Chile. *Front Microbiol*, 2017; 8, 639.
 11. Cieza, R., Hu, J., Ross, B. N., Sbrana, E., & Torres, A. G. The IbeA invasin of adherent-invasive *Escherichia coli* mediates interaction with intestinal epithelia and macrophages. *Infection and immunity*, 2015; 83, 1904-1918.

12. Conte, M. P., Longhi, C., Marazzato, M., Conte, A. L., Aleandri, M., Lepanto, M. S., Schippa, S. Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features. *BMC Res Notes*. 2017;7(1), 1-12.
13. Chassaing, B., Rolhion, N., de Vallée, A., Sa'ad, Y. S., Prorok-Hamon, M., Neut, C., Darfeuille-Michaud, A. Crohn disease-associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J Clin Invest*. 2011;121(3), 966-975.
14. Chassaing, B., Garénaux, E., Carriere, J., Rolhion, N., Guérardel, Y., Barnich, N., Darfeuille-Michaud, A. Analysis of the σE regulon in Crohn's disease-associated *Escherichia coli* revealed involvement of the *waaWVL* operon in biofilm formation. *Journal of bacteriology*. 2015; 197(8), 1451-1465.
15. Costa RFA, Ferrari MLA, Bringer M-A, Darfeuille-Michaud A, Martins FS, Barnich N. Characterization of mucosa-associated *Escherichia coli* strains isolated from Crohn's disease patients in Brazil. *BMC Microbiology*. 2020;20(1):178.
16. De la Fuente, M., Franchi, L., Araya, D., Díaz-Jiménez, D., Olivares, M., Álvarez-Lobos, M. Hermoso, M. A. *Escherichia coli* isolates from inflammatory bowel diseases patients survive in macrophages and activate NLRP3 inflammasome. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(3-4), 384-392.
17. Desilets, M., Deng, X., Rao, C., Ensminger, A. W., Krause, D. O., Sherman, P. M., Gray-Owen, S. D. Genome-based definition of an inflammatory bowel disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* pathovar. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22(1), 1-12.
18. Dogan, B., Suzuki, H., Herlekar, D., Sartor, R. B., Campbell, B. J., Roberts, C. L., Simpson, K. W. Inflammation-associated adherent-invasive *Escherichia coli* are enriched in pathways for use of propanediol and iron and M-cell translocation. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(11), 1919-1932.
19. Dreux, N., Cendra, M. D. M., Massier, S., Darfeuille-Michaud, A., Barnich, N., & Torrents, E. Ribonucleotide reductase *NrdR* as a novel regulator for motility and

- chemotaxis during adherent-invasive *Escherichia coli* infection. *Infect Immun.* 2015;83(4). 1305-1317.
20. Dunne, K. A., Allam, A., McIntosh, A., Houston, S. A., Cerovic, V., Goodyear, C. S., Wall, D. M. Increased S-nitrosylation and proteasomal degradation of caspase-3 during infection contribute to the persistence of adherent invasive *Escherichia coli* (AIEC) in immune cells. *PLoS One.* 2013;8(7), e68386.
21. Ellermann, M., & Sartor, R. B. Intestinal bacterial biofilms modulate mucosal immune responses. *J Immunol Sci.* 2018;2(2), 13.
22. F. L. França, T. J. Wells, D. F. Browning, R. T. Nogueira, F. S. Sarges, A. C. Pereira & M. D. G. de Luna. Genotypic and phenotypic characterisation of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One.* 2013; 8(7).
23. Guo, Z., Cai, X., Guo, X., Xu, Y., Gong, J., Li, Y., & Zhu, W. Let-7b ameliorates Crohn's disease-associated adherent-invasive *E coli* induced intestinal inflammation via modulating Toll-Like Receptor 4 expression in intestinal epithelial cells. *Biochem Pharmacol.* 2018;156, 196-203.
24. He, Y., Liu, S., Kling, D. E., Leone, S., Lawlor, N. T., Huang, Y., Newburg, D. S. The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose modulates CD14 expression in human enterocytes, thereby attenuating LPS-induced inflammation. *Gut.* 2016;65(1), 33-46.
25. J.K. Yamamoto-Furushoa, Y. Gutiérrez-Grobeca, J.G. López-Gómezb, F. Bosques-Padillac, J.L. Rocha-Ramírezd. Grupo del Consenso Mexicano de Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática. Consenso mexicano para el diagnóstico y tratamiento de la colitis ulcerosa crónica idiopática. *Rev Gastroenterol Mex.* 2018; 83 (2).144-167.
26. J.K. Yamamoto Furusho, F.J. Bosques Padilla, L. Charúa Guindic, T. Cortés Espinosa, R.M. Miranda Cordero, A. Saez, Y. Ledesma Osorio. "Epidemiología,

- carga de la enfermedad y tendencias de tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal en México”. *Rev Gastroenterol Mex.* 2020; 85(3), 246-256.
27. Kaur N, Chen CC, Luther J, Kao JY. Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes.* 2011; Jul-Aug;2(4):211-6.
 28. Larabi, A., Dalmasso, G., Delmas, J., Barnich, N., & Nguyen, H. T. T. Exosomes transfer miRNAs from cell-to-cell to inhibit autophagy during infection with Crohn’s disease-associated adherent-invasive E. coli. *Gut microbes.* 2020;11(6),
 29. Lee, J. G., Han, D. S., Jo, S. V., Lee, A. R., Park, C. H., Eun, C. S., Lee, Y. Characteristics and pathogenic role of adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease: Potential impact on clinical outcomes. *PLoS One.* 2019;14(4), e0216165.
 30. Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., González-Huix, F., López-Oliu, C., Dahbi, G, Darfeuille-Michaud, A. Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. coli (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(6), 872-882.
 31. McPhee, J. B., Small, C. L., Reid-Yu, S. A., Brannon, J. R., Le Moual, H., Coombes, B. K. Host defense peptide resistance contributes to colonization and maximal intestinal pathology by Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2014;82(8), 3383-3393.
 32. Miquel, S., Peyretailade, E., Claret, L., De Vallée, A., Dossat, C., Vacherie, B., Darfeuille-Michaud, A. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli strain LF82. *PloS one.* 2010;5(9), e12714.
 33. Mukhopadhyay, R. Hansen, EM. El-Omar, et al. IBD-what role do Proteobacteria play?. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012; 9, 219–230.
 34. Nash, J. H., Villegas, A., Kropinski, A. M., Aguilar-Valenzuela, R., Konczyk, P., Mascarenhas, M., Coombes, B. K. Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other E. coli pathotypes. *BMC genomics.* 2010;11(1), 1-15.

35. Negroni, A., Colantoni, E., Vitali, R., Palone, F., Pierdomenico, M., Costanzo, M., Stronati, L. NOD2 induces autophagy to control AIEC bacteria infectiveness in intestinal epithelial cells. *J Inflamm Res.* 2016;65(10), 803-813.
36. Palmela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin G, Hirten R, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2018;67(3):574–87.
37. Pobeguts, O. V., Ladygina, V. G., Evsyutina, D. V., Eremeev, A. V., Zubov, A. I., Matyushkina, D. S. Fisunov, G. Y. Propionate Induces Virulent Properties of Crohn’s Disease-Associated *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2020;11, 1460.
38. Prorok-Hamon, M., Friswell, M. K., Alswied, A., Roberts, C. L., Song, F., Flanagan, P. K, Campbell, B. J. Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC+ *Escherichia coli* expressing IpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut.* 2014;63(5), 761-770.
39. T. P. Prindiville, R. A. Sheikh, S. H Cohen, et al. *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6 (17), 1–4.
40. Thompson, A. P., O’Neill, I., Smith, E. J., Catchpole, J., Fagan, A., Burgess, K. E., Clarke, D. J. Glycolysis and pyrimidine biosynthesis are required for replication of adherent–invasive *Escherichia coli* in macrophages. *Access Microbiol.* 2016;162(6), 954-965.:
41. Viennois, E., Bretin, A., Dubé, P. E., Maue, A. C., Dauriat, C. J. G., Barnich, N., Gewirtz, A. T., & Chassaing, B. Dietary Emulsifiers Directly Impact Adherent-Invasive *E. coli* Gene Expression to Drive Chronic Intestinal Inflammation. *Cell Reports.* 2020; 33(1).
42. Yang, Y., Liao, Y., Ma, Y., Gong, W., & Zhu, G. The role of major virulence factors of AIEC involved in inflammatory bowel disease—a mini-review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(21), 7781-7787

Anexo 4: Tabla de resultado de crecimiento de cepas estudiadas en medio MH y MH con Rifaximina

Origen	Cepa	Müller Hinton (control de crecimiento positivo)	Müller Hinton/ Rifaximina 32 mg/L	Interpretación
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB18	Positivo	Positivo	Resistente
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB13	Positivo	Positivo	Resistente
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB15	Positivo	Positivo	Resistente
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB16	Positivo	Positivo	Resistente
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB17	Positivo	Positivo	Resistente
Colitis crónica y Diverticulitis Muestra: Copro (hisopo)	CCH1	Positivo	Positivo	Resistente
Colitis crónica y Diverticulitis Muestra: Copro (hisopo)	CCH4	Positivo	Positivo	Resistente
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB11	Positivo	Positivo	Resistente
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB14	Positivo	Positivo	Resistente
Colitis crónica y Diverticulitis Muestra: Copro (hisopo)	CCH5	Positivo	Positivo	Resistente
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB2	Positivo	Positivo	Resistente
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB12	Positivo	Positivo	Resistente
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB8	Positivo	Positivo	Resistente
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB5	Positivo	Positivo	Resistente
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB9	Positivo	Positivo	Resistente
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB1	Positivo	Positivo	Resistente

Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB7	Positivo	Positivo	Resistente
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB4	Positivo	Positivo	Resistente
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB6	Positivo	Positivo	Resistente
CUCI Biopsia:Ano y colon descendente	CUA69	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA30	Positivo	Negativo	Sensible
CUCI Biopsia:Ano y colon descendente	CUA50	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA22	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA28	Positivo	Negativo	Sensible
CUCI Biopsia:Ano y colon descendente	CUA42	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA2	Positivo	Negativo	Sensible
CUCI Biopsia:Ano y colon descendente	CUA44	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA6	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA3	Positivo	Negativo	Sensible
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB19	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA21	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA1	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA19	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA25	Positivo	Negativo	Sensible

Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA18	Positivo	Negativo	Sensible
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB10	Positivo	Negativo	Sensible
CUCI Biopsia:Ano y colon descendente	CUA55	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA29	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA7	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA5	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA9	Positivo	Negativo	Sensible
Dx: Colitis crónica y Diverticulitis Biopsia: Sigmoides	CCB3	Positivo	Negativo	Sensible
CUCI Biopsia:Ano y colon descendente	CUA57	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA4	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA38	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA37	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA34	Positivo	Negativo	Sensible
CUCI Biopsia:Ano y colon descendente	CUA67	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA12	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA24	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia:Colon descendente y transverso	CUA10	Positivo	Negativo	Sensible

Biopsia: Colon descendente y transverso	CUA39	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia: Colon descendente y transverso	CUA14	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia: Colon descendente y transverso	CUA32	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia: Colon descendente y transverso	CUA36	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia: Colon descendente y transverso	CUA27	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia: Colon descendente y transverso	CUA31	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia: Colon descendente y transverso	CUA11	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia: Colon descendente y transverso	CUA35	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia: Colon descendente y transverso	CUA23	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia: Colon descendente y transverso	CUA13	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia: Colon descendente y transverso	CUA33	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia: Colon descendente y transverso	CUA17	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia: Colon descendente y transverso	CUA16	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia: Colon descendente y transverso	CUA15	Positivo	Negativo	Sensible
Biopsia: Colon descendente y transverso	CUA20	Positivo	Negativo	Sensible

Tabla 2. Se muestra el origen de cada cepa estudiada con los resultados arrojados por el estudio de antibiograma. Como resultado 20 cepas resistentes