



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



**INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

“Búsqueda del patotipo *Escherichia coli* Adherente-Invasivo (AIEC) en una colección de cepas aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII)”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA.**

PRESENTA:

BIOL. MARÍA DEL CARMEN GIRÓN PÉREZ

DIRECTORA DE TESIS:

D.C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

PUEBLA, PUE., MÉXICO.

ENERO, 2026.

Puebla, Pue. a 22 de enero 2026

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

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de Maestría de la alumna **María del Carmen Girón Pérez**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Búsqueda del patotipo *Escherichia coli* adherente/invasiva en una colección de cepas aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal”

A nuestro juicio, la alumna **María del Carmen Girón Pérez** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

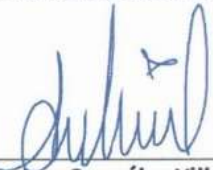
Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. Patricia Lozano Zarain


D.C. Gerardo Cortés Cortés


D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández


D.C. Ana González Villoria



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP)** por los espacios académicos brindados que contribuyeron a mi formación profesional.

A la **Vicerrectoría de la BUAP** por los apoyos otorgados durante mi formación en el posgrado.

Al **Instituto de Ciencias (ICUAP)** por el respaldo académico y administrativo proporcionado durante el desarrollo de este posgrado.

Al **Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas (CICM)** por la admisión al programa de posgrado, los espacios académicos de retroalimentación durante cada seminario, así como por las facilidades y espacios de laboratorio brindados para la realización del presente trabajo de investigación.

Agradezco al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT)** y a la **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación** por la beca otorgada durante el posgrado con numero 1271517.

Al **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHC)**, por darme la oportunidad de pertenecer a su gran equipo de trabajo.

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

A la D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia, por aceptarme como su estudiante de tesis, por permitirme formar parte de su laboratorio y por su orientación académica durante el desarrollo de este trabajo, así como por el apoyo y la comprensión brindados en momentos personales difíciles.

A la D.C. Patricia Lozano Zaráin, una profesora a quién estimo por sus valiosas observaciones a este trabajo, por su apoyo durante las distintas etapas de su desarrollo, por brindarme espacios en el laboratorio y por sus consejos académicos y personales.

A la D.C. Ana María González Villoria, por el apoyo brindado durante el desarrollo y análisis de este trabajo. Las sesiones de análisis y su constante disposición dejaron una huella profunda en mi formación, tanto científica como humana, especialmente en el área de la microbiología. Una mención con especial aprecio.

A la D.C. Margarita María De la Paz Arenas, por los espacios brindados, sus valiosas observaciones durante los tutoriales, las recomendaciones realizadas a lo largo de las clases y, especialmente, por su paciencia.

Al D.C. Gerardo Cortés-Cortés, por formar parte de este comité y por, a pesar de encontrarse a distancia, brindar valiosos comentarios que sin duda contribuyeron a enriquecer este trabajo.

Al D.C. Edwin Barrios Villa, por su constante apoyo y guía en el establecimiento de diversos métodos empleados en este trabajo, así como por fomentar una visión colaborativa de la labor científica, en la que el conocimiento se construye y fortalece a través de redes de apoyo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES Y DEDICATORIA

“Haz lo necesario para lograr tu más ardiente deseo, y acabarás lográndolo”

-Ludwig v. B.

No se llega sola a la meta, y hacerlo acompañada es un privilegio inmenso. Por impulsarme en cada paso para perseguir mis sueños, dedico este trabajo a mis padres, la Dra. Carmelita y el Dr. Pedro. Son, para mí, un ejemplo de vida, entrega y amor incondicional. Dedico también este trabajo a mis compañeros de aventuras, mis hermanos Francisco, Carlos y Alfonso. A mi abuela Elenita.

Dedico con cariño este trabajo a quienes me han acompañado siempre con paciencia y amor: Enver, a mis amigos Blanca Rosalía, Viri Cisneros, Quique Sánchez, Giovanni, Arlen, Jane, Fredy y Víctor. Gracias por los ánimos, las charlas y el afecto compartido; algunos desde los recreos de la infancia y otros a lo largo de mi andar. Gracias por su amor.

Agradezco también a los amigos del laboratorio LMHyC, quienes me regalaron días y tardes de gran compañerismo e hicieron mi estancia en Puebla más liviana: Aline, Erika, Dafne, Diego, Cruz, Jorge, Brenda, Elsi, Pablo, Pao, Oli, Santi, Karen, Gus, Fernanda, Alexia, Faridí, Vianney, Diana y Ale, la Dra Elenita. De manera especial, a mis amigos José y Monse Capilla.

Finalmente, agradezco a Dios, quien siempre me guía por el camino correcto, colocándome con las personas indicadas y en el ejercicio adecuado.

Abreviaturas

EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
EC	Enfermedad de Crohn
UC	Colitis Ulcerosa
AIEC	<i>Escherichia coli</i> Adherente-Invasiva
5 ASA	5-Aminosalicílico
CEACAM6	Molécula de adhesión celular 6 relacionada con el antígeno carcinoembrionario
UFC	Unidad Formadora de Colonia
Ng	Nanogramo
μL	Microlitro
ST	Secuenciotipo
MLST	Tipificación multilocus de secuencias (Multilocus sequence typing)
Bp	Pares de bases
RPM	Revoluciones por minuto
CUCI	Colitis Ulcerosa Crónica Indeterminada
Th1	T helper 1
Th17	T helper 17
IFN-γ	Interferón gamma
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa

INDICE

RESUMEN.....	11
I. INTRODUCCIÓN	12
1.1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	12
1.1.1. LA MICROBIOTA INTESTINAL	16
1.1.2. DISBIOSIS EN LA EII	19
1.1.3. ENTEROBACTERIAS en la EII.....	21
1.2. <i>Escherichia coli</i>	22
1.2.1. Patotipos diarreagénicos de <i>E. coli</i>	25
1.3. <i>Escherichia coli</i> Adherente Invasiva (AIEC).....	32
1.3.1. Generalidades.....	32
1.3.2. Mecanismo de Patogénesis de AIEC.....	33
1.3.3. Formación de Biopelícula.....	36
1.3.4. Resistencia antimicrobiana.....	37
1.3.5. Grupos filogenéticos	38
1.3.6. Secuencia Tipo (ST)	39
II. ANTECEDENTES	40
2.1. Antecedentes internacionales.....	40
2.2. Antecedentes nacionales	42
2.3. Antecedentes directos	43
III. JUSTIFICACIÓN	45
IV. OBJETIVOS.....	46
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
5.1. Estrategia metodológica.....	47
5.2. Material biológico:	48
5.2.1. Reactivación de cepario.....	49
5.2.2. Controles.....	49
5.2.3. Extracción de ADN.....	50
5.2.4. Cuantificación de ADN	50
5.2.5. Determinación de filogrupo por PCR cuádruplex.....	50
5.3. Análisis fenotípico de 22 cepas de <i>E. coli</i> como probables AIEC.....	53
5.3.1. Técnica de cuantificación de biopelícula por método de tinción con Cristal Violeta.....	53

5.3.1.1. Cuantificación de proteínas (método de Bradford)	54
5.3.2. Ensayos de Adherencia Bacteriana a células HeLa	55
5.3.3. Ensayos de Invasión Bacteriana a células HeLa	56
5.3.4. Secuencia Tipo.....	57
VI. RESULTADOS	58
6.1. Determinación del filogrupo y la secuencia tipo de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.	58
6.1.1. <i>Determinación de filogrupo</i>	58
6.1.2. <i>Análisis de Secuencia Tipo (ST)</i>	61
6.2. Determinación del fenotipo de formación de biopelícula, adherencia e invasión en cepas de <i>E. coli</i>	62
6.2.1. Ensayos de formación de biopelícula	62
6.2.2. Ensayos de adherencia bacteriana en células HeLa.....	63
6.2.3. Ensayo de invasión bacteriana en células HeLa.....	69
VII. DISCUSIÓN	70
VIII. CONCLUSIÓN	79
IX.PERSPECTIVAS	80
X. REFERENCIAS	81
XI.ANEXOS	87

INDICE DE FIGURAS	Pag.
Figura 1 Condición de Eubiosis y Disbiosis en pacientes con EII	16
Figura 2 Patogénesis molecular de EPEC, EHEC, ETEC y EAEC	23
Figura 3 Patogénesis de EIEC	27
Figura 4 Patogénesis de DAEC	28
Figura 5 Interacción de <i>Escherichia coli</i> adherente- invasiva (AIEC) con la mucosa intestinal en el contexto de la EII. Ver Anexos	33
Figura 6 Dendrograma de dis/similitud de cepas <i>Escherichia coli</i> productoras de serin-betalactamasas aisladas de biopsias del paciente con EII. Ver Anexos	94
Figura 7 Dendrograma de dis/similitud de cepas de <i>Escherichia coli</i> resistentes a rifaximina aisladas de los pacientes dos y tres.	95
Figura 8 Esquema de trabajo	48
Figura 9 Distribución de los filogrupos de <i>Escherichia coli</i> aisladas de biopsias intestinales de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.	58
Figura 10 Distribución de filogrupos de 37 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de biopsias del paciente 1 con un diagnóstico de Colitis Ulcero Crónica Indeterminada (CUCI)	59
Figura 11. Determinación de filogrupos en 22 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de biopsias del paciente 2 con diagnóstico de Colitis Crónica y Diverticulitis.	60
Figura 12. Determinación de filogrupos en 7 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de biopsias del paciente 3 con diagnóstico de CUCI	60
Figura 13. Análisis bioinformático para la determinación del filogrupo A de la cepa CUA69 aislada del paciente 3.	61
Figura 14. Cuantificación de la formación de biopelícula estática en 22 cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de biopsias intestinales de tres pacientes con EII.	63
Figura 15. Ensayo de adherencia de 22 cepas de <i>Escherichia coli</i> aislada de biopsias de tres pacientes con EII a células HeLa.	65
Figura 16. Ensayo de adherencia a células HeLa de cepas seleccionadas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de biopsias intestinales del paciente 1 con diagnóstico de CUCI.	67
Figura 17. Ensayo de adherencia a células HeLa de cepas seleccionadas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de biopsias intestinales del paciente 2 con diagnóstico de colitis crónica y diverticulitis.	68
Figura 18. Ensayo de invasión en diez cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de biopsias intestinales de dos pacientes con (EII),	69

INDICE DE TABLAS	PAG
Tabla 1. Datos de los pacientes con EII donantes de las biopsias intestinales.	48
Tabla 2. Genotipo de la PCR cuádruplex y asignación de los filogrupos para <i>E. coli</i> (Tomado de Clermont <i>et al.</i> , 2013).	51
Tabla 3. Componentes empleados para la PCR cuádruplex	52
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados y sus condiciones para realizar PCR cuádruples (Clermont <i>et al.</i> , 2013).	52
Tabla 5. Preparación de la curva de BSA	54
Tabla 6. Características generales, filogrupo y secuencia tipo de cepas de <i>Escherichia coli</i> analizadas en el presente estudio	60
Tabla 7. Paciente 1: 37 cepas de <i>Escherichia coli</i>	87
Tabla 8. Paciente 2: 22 cepas de <i>Escherichia coli</i>	88
Tabla 9. Paciente 3: 7 cepas de <i>Escherichia coli</i>	88
Tabla 10.- Condiciones de PCR para la identificación del filogrupo G (Clermont <i>et al.</i> , 2019)	89
Tabla 11. Determinación del filogrupo F en cepas de <i>Escherichia coli</i> mediante PCR según el esquema de Clermont <i>et al.</i> (2013, 2019)	89

RESUMEN

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es una patología multifactorial en cuya predisposición intervienen factores genéticos y ambientales, entre ellos las alteraciones en la composición de la microbiota intestinal. Este desequilibrio, conocido como disbiosis, se ha asociado con la proliferación de enterobacterias, particularmente *Escherichia coli*. En este contexto, se ha descrito un patotipo emergente denominado *Escherichia coli* adherente-invasivo (AIEC), el cual ha sido vinculado con la EII. Hasta la fecha, AIEC se identifica únicamente mediante características fenotípicas, tales como la capacidad de adherirse e invadir células epiteliales intestinales, formar biopelículas y sobrevivir dentro de macrófagos, ya que, a diferencia de otros patotipos diarreagénicos y extraintestinales, no se ha establecido una firma molecular específica que permita su identificación.

En el presente trabajo se evaluaron los fenotipos característicos de AIEC mediante el análisis de una colección de cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de tres pacientes diagnosticados con EII. Adicionalmente, se determinó el grupo filogenético y la secuencia tipo (ST) de algunas de las cepas analizadas. El análisis de tipificación molecular permitió identificar las secuencias tipo ST206, ST405 y ST648, que fueron específicos por paciente, así como la pertenencia de las cepas a distintos grupos filogenéticos, observándose en cada paciente un grupo filogenético con mayor prevalencia como “A o C” en cepas aisladas de biopsias del paciente 1, “F” en el paciente 2 y “D o E” en el paciente 3. Estos resultados evidencian la diversidad genética de las cepas estudiadas y su pertenencia a linajes ampliamente distribuidos dentro de *E. coli*. Los ensayos de formación de biopelícula mostraron que todas las cepas evaluadas presentan esta capacidad, en mayor o menor proporción. Los ensayos de adherencia revelaron una marcada heterogeneidad en los patrones observados, lo que sugiere variabilidad fenotípica entre las cepas. Bajo las condiciones implementadas en este estudio no fue posible establecer un fenotipo de invasión claro entre las cepas estudiadas.

Palabras claves: AIEC, EII, adherencia celular, biopelícula, filogrupo.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es un término colectivo para las enfermedades inflamatorias gastrointestinales crónicas que provocan daño intestinal progresivo y discapacidad en el mismo (Pezhman-Alavinejad *et al.*, 2024; Dolinger *et al* 2024) por lo que se han clasificado en varios tipos clínicos según la lesión, localización y extensión de la pared intestinal (leve, moderada o grave); las principales clasificaciones son *Colitis Ulcerosa* (CU) y la *Enfermedad de Crohn* (EC) (McDowell, Farooq y Haseeb, 2023).

La CU implica una inflamación difusa de la mucosa colónica, con mayor frecuencia, afecta al recto (proctitis) y puede extenderse al colon sigmoideo (proctosigmoiditis), más allá del colon sigmoideo (colitis ulcerosa distal) o abarcar todo el colon hasta el ciego (pancolitis). La EC produce lesiones transmurales en cualquier porción del tracto gastrointestinal (GI), afectando con mayor frecuencia el íleon terminal y el colon (McDowell, Farooq y Haseeb, 2023).

Se trata de una afección de alcance mundial cuya incidencia está aumentando con rapidez, especialmente en los países desarrollados (Kaplan, 2025; Haneishi *et al.*, 2023), como se ha observado en Norteamérica y Europa. La mayoría de los casos se diagnostican en personas de entre 15 y 30 años. No obstante, se ha identificado un segundo pico de aparición alrededor de los 60 años. Además, los datos indican que la EC es más frecuente en mujeres que en hombres (McDowell *et al.*, 2023).

El diagnostico suele ser un desafío, ya que los pacientes suelen cursar con manifestaciones durante la enfermedad activa (recaída) y alternar con periodos de enfermedad inactiva (remisión) de forma diferente en cada uno. Para que este sea adecuado, es necesario un interrogatorio hacia el paciente e identificar la evolución de los síntomas, tratamientos recibidos (antibióticos, antiparasitarios, antiinflamatorios, entre otros). El diagnostico se trata de un conjunto de hallazgos, incluyen análisis de laboratorio, endoscopia, pruebas patológicas y pruebas de imagen (Casanova-Lara *et al.*, 2023). Las pruebas serológicas y de heces se

pueden realizar fácilmente de forma ambulatoria y proporcionan pistas diagnósticas cruciales, sin embargo, la endoscopia ofrece información diagnóstica esencial, que si bien es un procedimiento invasivo, permite obtener biopsias y ésta facilita el diagnóstico de la EII, por lo tanto, la biopsia es crucial para evaluar la actividad histológica de la enfermedad, facilitando una evaluación exhaustiva de la remisión de la enfermedad y ayudando en el desarrollo de estrategias de tratamiento (Min-Hong y Hoon-Baek, 2024).

Los tratamientos disponibles se orientan a disminuir el daño asociado tanto a la EC como a la CU, y su elección depende del grado de severidad del cuadro clínico. Se emplea el uso de aminosalicilatos, como la mesalazina, así mismo, pueden emplearse glucocorticoides orales, inmunomoduladores o corticoides en combinación con los aminosalicilatos, según la respuesta y las necesidades del paciente. En casos refractarios o complicaciones graves, se contempla la posibilidad de recurrir a tratamiento quirúrgico (Dowell *et al.*, 2023). Además, algunos tratamientos incluyen el uso de antibióticos, ya que han demostrado un papel relevante en la EII al modificar la microbiota colónica disbiótica y reducir la respuesta inmunogénica e inflamatoria en los pacientes; un ejemplo de ello es la rifaximina, utilizada como terapia en esta enfermedad (Newton-Amaldoss *et al.*, 2021). Es importante destacar que el uso de antibióticos puede constituir un factor de riesgo independiente para la EII, pues se ha observado que provocan alteraciones en las bacterias simbióticas intestinales en bebés y niños y que éstas se asociaron con el posterior desarrollo de la enfermedad; además, se ha recomendado el uso de probióticos como medida complementaria (Cai *et al.*, 2021).

La EII se considera de origen multifactorial o idiopático debido a la interacción de factores genéticos, inmunitarios y ambientales que ocasionan una regulación diferente de la respuesta inmunitaria a la microbiota intestinal del hospedero (Casanova-Lara *et al.*, 2023).

Fisiopatología de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII):

La EII es una afección compleja y multifactorial caracterizada por la inflamación crónica de la mucosa gastrointestinal. Aunque su etiología precisa sigue siendo

desconocida, se sabe que tanto en la EC como en la CU intervienen diversos factores como la predisposición genética, la desregulación del sistema inmunológico, la disbiosis de la microbiota intestinal y la exposición a determinados factores ambientales. En individuos genéticamente susceptibles, la EII parece expresarse debido a una respuesta inmunitaria anormal y deficiente frente a los microorganismos intestinales, lo que la vincula con una desregulación de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa (Silva *et al.*, 2019; Sáez *et al.*, 2023; Calvez *et al.*, 2025; Dolu y Akpinar, 2025). Asimismo, numerosos locus genéticos se han asociado con la EC, mientras que factores ambientales como el tabaquismo, los hábitos alimentarios, la falta de actividad física y la exposición a antibióticos, influyen en el inicio y progresión de la enfermedad ya que alteran la homeostasis de la microbiota intestinal y exacerban la inflamación. Así mismo, la desregulación inmunitaria, especialmente en las vías Th1, Th2 y Th17, genera un desequilibrio entre respuestas proinflamatorias y reguladoras que perpetúa el proceso inflamatorio crónico (Dolu y Akpinar, 2025).

Predisposición genética

Los avances en la investigación genética, impulsados por el Proyecto Genoma Humano y los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS), han ayudado a descubrir diversos factores de riesgo genéticos para la EII y han ampliado de forma notable el conocimiento sobre sus bases moleculares (Dolu y Akpinar, 2025).

Hasta la fecha, se han implicado más de 240 loci genéticos en la susceptibilidad a la EII, con al menos 30 loci compartidos entre la EC y la CU. NOD2 (*nucleotide oligomerization domain 2*), es clave en la EC, ya que se observan con frecuencia variantes de NOD2 en los pacientes afectados (Dolu y Akpinar, 2025). NOD2 es un gen de reconocimiento de patrones, expresado principalmente en células del sistema inmunitario innato, así como en células epiteliales intestinales. Este receptor inmunitario reconoce el *muramyl dipeptide* (MDP) como una señal indicativa de la presencia bacteriana. Las variantes de NOD2 asociadas con una mayor susceptibilidad al desarrollo de EC presentan una función deficiente en el

reconocimiento de estos productos bacterianos, lo que destaca la relevancia de la microbiota en la patogenia de la EII (Silva *et al.*, 2019).

Factor Inmunológico

La desregulación del sistema inmunitario desempeña un papel central en la patogénesis de la EII, al involucrar interacciones complejas entre las respuestas inmunitarias innata y adaptativa que normalmente mantienen el equilibrio entre la tolerancia a la microbiota comensal y la defensa frente a patógenos; cuando este equilibrio se altera, se produce una activación inmunitaria excesiva que desencadena inflamación crónica y sostiene un estado inflamatorio persistente, acompañado de la desregulación de la barrera epitelial, de las células inmunitarias y de los mediadores secretados por el sistema inmunitario innato, alteraciones observadas principalmente en pacientes con EII (Dolu y Akpinar, 2025).

El sistema inmunitario innato constituye la primera línea de defensa del organismo frente a los invasores microbianos. Los receptores tipo Toll (TLR) y tipo NOD (NLR) cumplen un papel fundamental en la detección de componentes microbianos y en la activación inicial de la respuesta inmunitaria. En la EII, la desregulación de la expresión y función de estos receptores altera la respuesta inmunitaria innata, lo que conduce a una inflamación excesiva, a una pérdida de la tolerancia frente a la microbiota y a una mayor disfunción de la barrera intestinal (Dolu y Akpinar, 2025).

El sistema inmunitario adaptativo, mediado principalmente por linfocitos T y B, es altamente específico, pero requiere más tiempo para activarse por completo. En la enfermedad de Crohn predomina una respuesta Th1 que impulsa la inflamación mediante la producción excesiva de citocinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF- α . En contraste, la colitis ulcerosa muestra un sesgo Th2, con niveles elevados de IL-4 e IL-13 que contribuyen a la inflamación de la mucosa. A su vez, los linfocitos Th17 productores de IL-17, IL-22 y otras citocinas proinflamatorias, aumentan en ambas enfermedades y desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la inflamación crónica y el daño de la mucosa (Dolu y Akpinar, 2025).

Factores ambientales

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la salud ambiental abarca el estudio de los factores físicos, químicos, biológicos, sociales y psicológicos que influyen en la salud humana, la calidad de vida y el bienestar. En el contexto de la EII, varios de estos factores desempeñan un papel fundamental en su progresión, ya que pueden intensificar la predisposición y la susceptibilidad genética del individuo, favoreciendo así su manifestación clínica. La actividad física y una dieta rica en fibra y vegetales están asociadas con una menor incidencia de EII. Por el contrario, el uso de antibióticos se ha relacionado con un mayor riesgo del desarrollo de esta enfermedad, ya que se cree que alteran la composición de la microbiota intestinal y contribuyen a la disbiosis y la inflamación intestinal; además, su impacto es más severo cuando se administran de forma inadecuada durante la infancia. El uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) también se ha vinculado con la aparición de la enfermedad. Factores hormonales como el uso de anticonceptivos orales y las terapias de reemplazo hormonal se han asociado con un mayor riesgo de EII en mujeres. La apendicetomía se ha reconocido como un factor de riesgo para la EC, posiblemente debido a alteraciones en el sistema inmunitario. Asimismo, factores psicológicos relacionados con altos niveles de estrés influyen en el riesgo de EII. Exposiciones tempranas como la lactancia materna, el tipo de parto (vaginal o por cesárea) y el uso de antibióticos en la infancia influyen en el desarrollo de la microbiota intestinal y la maduración del sistema inmunitario, se han asociado con un mayor riesgo de EII en etapas posteriores de la vida. Otros factores vinculados con la creciente prevalencia de la EII en países en desarrollo incluyen la industrialización y la urbanización, ya que se considera que la contaminación atmosférica, los cambios en la dieta y diversas toxinas ambientales contribuyen a esta tendencia (Dolu y Akpınar, 2025).

1.1.1. LA MICROBIOTA INTESTINAL

La microbiota gastrointestinal humana, comienza a desarrollarse en el parto o nacimiento, aunque puede existir una exposición limitada a microorganismos

durante la etapa fetal (Álvarez *et al.*, 2021). Comprende un conjunto de comunidades microbianas, incluyendo virus, bacterias, arqueas y hongos (Aldars-García *et al.*, 2021) y alberga la mayoría de los microorganismos que residen en el cuerpo cuyo contenido genético y capacidad de transformación bioquímica superan ampliamente a los del genoma humano (Shalon *et al.*, 2023). Los seres humanos tenemos más de 200 especies bacterianas diferentes, con una abundancia muy variable en el intestino (Baldelli *et al.*, 2021); en el adulto, el 90% de las bacterias intestinales pertenecen a 2 filos: *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. Las Proteobacterias, Actinobacterias, Fusobacterias y Verrucomicrobia completan el 10% restante junto con pocas especies del dominio Arquea e incluye también levaduras, fagos y protistas (Álvarez *et al.*, 2021).

La microbiota intestinal cumple con tres funciones esenciales en el ser humano:

- 1)** La digestión de nutrientes, pues desempeña un papel clave en el proceso digestivo y en la regulación metabólica del hospedador, ya que parte de los alimentos que no se degradan completamente por enzimas humanas es descompuesta por la microbiota bacteriana, que secreta enzimas capaces de digerir sustratos inaccesibles para el hospedero (Baldelli *et al.*, 2021; Álvarez *et al.*, 2021), es importante destacar que la constitución y diversidad de la microbiota en diferentes secciones del tracto gastrointestinal son altamente variables y su concentración aumenta de manera constante a lo largo del mismo, con pequeñas cantidades en el estómago y concentraciones muy altas en el colon (Álvarez *et al.*, 2021), algunos alimentos que no se absorben llegan al colon donde hay alta densidad de microorganismos con recursos metabólicos adicionales y realizan la fermentación de hidratos de carbono complejos, que generan ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente ácido acético, propiónico y butírico, que son utilizados por los enterocitos como fuente de energía o pasan al torrente circulatorio alcanzando órganos distales y ejerciendo importantes funciones (Baldelli *et al.*, 2021; Álvarez *et al.*, 2021);
- 2)** Proteger al hospedero frente a patógenos, ya que ocurre una competencia entre microorganismos benéficos y patógenos por el mismo nicho ecológico (Baldelli *et al.*, 2021; Shalon *et al.*, 2023) y
- 3)** La microbiota intestinal participa en el desarrollo y la función del sistema inmunológico, la pérdida de este

equilibrio puede provocar desregulación inmune y contribuir a la aparición de trastornos inflamatorios y autoinmunes crónicos (Álvarez *et al.*, 2021; Baldelli *et al.*, 2021). Esto se debe a que desempeña un papel crucial en el mantenimiento del balance entre los linfocitos T cooperadores (Th) y los linfocitos T reguladores (Treg), garantizando la armonía entre las respuestas proinflamatorias y antiinflamatorias (Dolu y Akpinar, 2025).

En las últimas dos décadas, el microbioma se ha convertido en un foco central de la investigación sobre la EII, lo que destaca el papel esencial de la microbiota intestinal en la preservación de la salud del hospedero y del equilibrio metabólico. Las alteraciones en la composición o función de estos microorganismos pueden romper la homeostasis microbiana y desencadenar inflamación intestinal (Dolu y Akpinar, 2025). Factores ambientales como la nutrición, la medicación, la etnia y la ubicación geográfica pueden influir en el microbioma intestinal. Aún no se sabe con certeza si estas alteraciones microbianas son un factor determinante en el desarrollo de la inflamación o una consecuencia del propio proceso inflamatorio. Por lo tanto, la asociación entre el microbioma y la EII aún no se comprende completamente. (Dolu y Akpinar, 2025). Sin embargo, en la actualidad, se han podido realizar análisis multiómicos integrados, los cuales han permitido conocer perfiles comunes y reconocibles que caractericen y distingan las EII, por ejemplo, estos mismos, han proporcionado información sobre la microbiota intestinal y la firma metabólica en la CU (Calvez *et al.*, 2025).

Por lo anterior, se ha observado que la microbiota intestinal desempeña un papel crucial en la salud como en la enfermedad y se ha vinculado estrechamente con la aparición de la EII (Aldars-García *et al.*, 2021). En pacientes con EII se ha descrito una marcada reducción de bacterias benéficas, como *Faecalibacterium* y *Roseburia*, junto con un aumento de taxones proinflamatorios, como *Enterobacteriaceae* y *Fusobacterium* (Dolu y Akpinar, 2025). Este desequilibrio microbiano, conocido como disbiosis, se caracteriza por una disminución en la diversidad y estabilidad de la comunidad microbiana, lo que conlleva a una producción insuficiente de ácidos grasos de cadena corta y otros metabolitos

esenciales que son fundamentales para el mantenimiento de la salud intestinal y la regulación inmunitaria (Dolu y Akpinar, 2025).

1.1.2. DISBIOSIS EN LA EII

La microbiota intestinal puede tener dos estados, Eubiosis o Disbiosis. La Eubiosis se describe por mantener estabilidad intestinal mediante la producción de AGCC, la prevención de la expansión de patógenos y la modulación del sistema inmunológico, favoreciendo citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β y reduciendo la activación de células Th17 y Th1. En cambio, en la Disbiosis, bacterias como las pertenecientes a *Enterobacteriaceae* pueden proliferar en exceso, disminuyendo la diversidad microbiana y la estabilidad intestinal, lo que se refleja en una menor producción de AGCC y un aumento de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-17 y TNF- α que activan células Th17 y Th1; además, se altera la integridad del epitelio intestinal debido a la pérdida de uniones estrechas (figura 1) (Baldelli *et al.*, 2021).

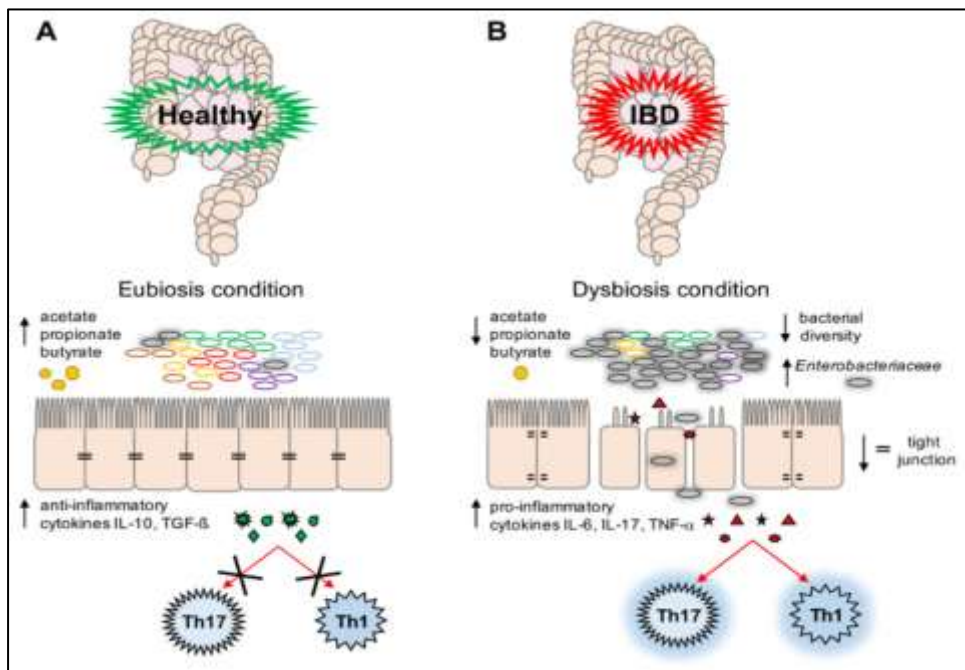


Figura 1. Condición de Eubiosis y Disbiosis en pacientes con EII, y la participación de las Enterobacteriaceae en la patología. Tomado de Baldelli *et al.*, 2021.

La Disbiosis es un hallazgo común en pacientes con EII, quienes presentan pérdida de la diversidad en la microbiota intestinal, en estos pacientes se observa

principalmente la reducción de bacterias del filo Firmicutes, que son beneficiosas y esenciales para la homeostasis intestinal, y un aumento de *Proteobacteria*, especialmente enterobacterias (Baldelli *et al.*, 2021; Hrnčir, 2022). Sin embargo, también se ha registrado que en casos de mayor gravedad clínica hay un aumento de *Veillonellaceae*, *Pasteurellaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Fusobacteriaceae*, junto con una disminución de *Bacteroidales*, *Erysipelotrichales* y *Clostridiales* (Baldelli *et al.*, 2021).

Si bien la etiología de la EII es multifactorial, se ha descrito la presencia de una Disbiosis bacteriana marcada, la cual compromete la barrera intestinal y afecta negativamente al sistema inmunitario y al metabolismo del hospedero (Baldelli *et al.*, 2021; Hrnčir, 2022) por lo tanto, la alteración del estado intestinal puede considerarse una causa y no simplemente una consecuencia de la inflamación gastrointestinal crónica en la EII (Baldelli *et al.*, 2021). Los factores más importantes que afectan negativamente a la microbiota intestinal y causan Disbiosis son los ambientales, en particular las dietas poco saludables, la medicación prolongada, el uso de antibióticos; aunque también puede surgir por enfermedades infecciosas e incluso si no provienen de infecciones gastrointestinales (Baldelli *et al.*, 2021; Hrnčir, 2022).

Es necesario comprender las interacciones entre la microbiota y el hospedero, ya que este conocimiento permite desarrollar terapias basadas en la microbiota, como la introducción de cepas beneficiosas, la eliminación de cepas dañinas (por ejemplo, *Fusobacterium nucleatum*) o el trasplante de microbiota fecal. En este contexto, como se mencionó, la familia *Enterobacteriaceae* puede proliferar de manera súbita; además, en los últimos años una bacteria perteneciente a esta familia, AIEC, se reconoce directamente como una cepa patógena estrechamente vinculada con la EII (Baldelli *et al.*, 2021).

1.1.3. ENTEROBACTERIAS en la EII.

En el humano, estas bacterias que son anaerobios facultativos, son las primeras colonizadoras del tracto gastrointestinal aeróbico en los recién nacidos, una función es agotar el oxígeno para crear un ambiente reducido adecuado para conseguir la colonización de anaerobios estrictos. Después de esto, los fermentadores de oligosacáridos bacterianos, como *Bifidobacterium*, crecen en el tracto gastrointestinal debido a la ingesta de leche materna (Baldelli *et al.*, 2021). Posteriormente, la introducción de una dieta de alimentos sólidos ricos en polisacáridos produce la expansión de anaerobios y fermentadores de polisacáridos como *Bacteroides*, *Clostridium* y *Ruminococcus*, y una disminución simultánea de *Bifidobacterium* y Enterobacteriaceae (Baldelli *et al.*, 2021).

En modelos murinos de EII se describe una Disbiosis de la microbiota intestinal en respuesta a la inflamación, caracterizada por un marcado aumento relativo de enterobacterias. Estos hallazgos respaldan la idea de que, en un entorno inflamado, las enterobacterias presentan una ventaja competitiva respecto a otros miembros comensales de la microbiota. De manera concordante, en cohortes pediátricas con EC se observa que el enriquecimiento de enterobacterias se asocia con un curso más agresivo y con un mayor riesgo de fracaso terapéutico (Baldelli *et al.*, 2021). Para explicar este fenómeno, se propone la hipótesis del oxígeno, la cual sugiere que, en condiciones fisiológicas óptimas, los enterocitos consumen oxígeno mediante procesos de beta-oxidación, generando un ambiente luminal anaeróbico que restringe el crecimiento de aerobios facultativos. En la EII, la inflamación intestinal reduce la beta-oxidación y, en consecuencia, aumenta la disponibilidad de oxígeno en la mucosa, favoreciendo la expansión de Proteobacteria/Enterobacteriaceae y promoviendo un estado de Disbiosis (Baldelli *et al.*, 2021).

Además, en condiciones inflamatorias, se ha demostrado un incremento en la producción de nitrato por el hospedero debido a la pérdida de producción de butirato

ante la presencia de Disbiosis. En consecuencia, los niveles aumentados de oxígeno y nitrato observados en pacientes con EII podrían conducir al sobrecrecimiento de Enterobacteriaceae (Baldelli *et al.*, 2021).

En cuanto a procesos inflamatorios intestinales, se ha documentado que las enterobacterias, poseen una versión más inmunoestimulante del LPS y estas moléculas interactúan con los receptores en las células inmunes para desencadenar la inflamación (Baldelli *et al.*, 2021).

Uno de los miembros bien estudiados de la familia Enterobacteriaceae es *E. coli*, que con frecuencia puede colonizar el intestino humano, esta bacteria se ha propuesto como una posible causa del comienzo de la enfermedad en pacientes con EII; de hecho, varios estudios han encontrado un mayor número de cepas virulentas de *E. coli* aisladas de pacientes con EII con respecto a los controles sanos. La mayoría de las cepas de *E. coli* identificadas en muestras de EII son AIEC (Baldelli *et al.*, 2021).

1.2. *Escherichia coli*

Generalidades

Escherichia coli (*E. coli*) de la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo gram-negativo, no formador de esporas, flagelar, anaerobio facultativo, productor de indol (Mueller y Tainter, 2023), es una bacteria modelo, pues constituye uno de los organismos más estudiados en los campos de la microbiología y la biología molecular. Además, se trata de una bacteria comensal que forma parte de las primeras especies en colonizar el intestino después del nacimiento (Pokharei *et al.*, 2023). Sin embargo, *E. coli* también puede comportarse como un patobionte, ya que, bajo estímulos ambientales específicos y en individuos genéticamente susceptibles, un microorganismo comensal puede transformarse en un patógeno (Baldelli *et al.*, 2021). En consecuencia, en pacientes inmunodeprimidos cuyas

barreras físicas, anatómicas o fisiológicas se encuentran comprometidas, *E. coli* es capaz de causar infecciones sistémicas graves (Pokharei *et al.*, 2023).

E. coli presenta la capacidad de realizar transferencia horizontal de genes (THG), lo que le confiere una amplia variabilidad genética y la capacidad de adquirir factores de virulencia y genes de resistencia; a menudo, los genes de virulencia se encuentran en elementos genéticos movilizables como islas de patogenicidad (PAI), bacteriófagos, secuencias de inserción (IS), integrones, plásmidos o transposones; por lo tanto la THG puede contribuir a que bacterias comensales pierdan o ganen genes y de esta manera volverse patógenas (Pokharei *et al.*, 2023).

Como resultado de la adquisición de genes de virulencia, algunas cepas de *E. coli* difieren de sus contrapartes comensales y adquieren la capacidad de causar enfermedad en diversos animales, incluido el ser humano. En este marco, las cepas patógenas se clasifican en tres grupos basados en criterios genéticos, moleculares y clínicos: (1) cepas comensales presentes en el intestino humano y animal, (2) cepas patógenas intestinales (InPEC) y (3) cepas extraintestinales (ExPEC) (Mirsepasi-Lauridsen *et al.*, 2019; Pokharei *et al.*, 2023). Por lo que, dependiendo de los factores de virulencia que portan, sus mecanismos de infección, su tropismo tisular, las interacciones con las células del hospedero y las manifestaciones clínicas que producen, *E. coli* se categoriza en distintos patotipos.

En cuanto a los patotipos diarreagénicos (InPEC), tradicionalmente se reconocen seis clásicos, aunque se sugiere un nuevo patotipo: (I) *E. coli* enteropatógena (EPEC), una causa de diarrea aguda y prolongada en lactantes; (II) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC/ STEC), que puede causar colitis hemorrágica y síndrome hemolítico urémico (SHU); (III) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), una causa importante de diarrea del viajero; (IV) *E. coli* enteroagregativa (EAEC), asociada a causar diarrea aguda y crónica; V) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), causa de disentería y diarrea acuosa y (VI) *E. coli* difusa-adherente (DAEC) que se asocia con diarrea acuosa en niños pequeños; y recientemente se está estudiando nuevo patotipo

llamado *E. coli* Adherente/Invasivo (AIEC) el cual se asocia con la patogénesis de la EII (Mirsepasi-Lauridsen *et al.*, 2019; Pokharei *et al.*, 2023).

Las cepas Extraintestinales Patogénicas de *E. coli* (ExPEc) incluyen: *E. coli* uropatógena (UPEC), causa frecuente de infecciones del tracto urinario (ITU); *E. coli* meningogénica neonatal (NMEC), causa principal de meningitis neonatal; *E. coli* asociada a septicemia (SEPEC), que puede causar bacteriemia y sepsis y *E. coli* patógena aviar (APEC), que puede causar infecciones respiratorias y sistémicas graves en aves de corral (Pokharei *et al.*, 2023).

La identificación de *E. coli* se realiza mediante medios de cultivo selectivos, como el agar MacConkey, donde la fermentación de lactosa y la producción de indol permiten su diferenciación básica. No obstante, las técnicas moleculares basadas en PCR aportan mayor especificidad para tipificar cepas patógenas. Así, la ETEC se caracteriza por las proteínas LT y ST; la EPEC, por la detección del plásmido *pEAF* o su factor BFP; la EAEC, por el regulón *AggR*; y la EHEC/STEC, por la amplificación de los genes *stx1* y *stx2*. La EIEC se identifica mediante NAAT, y muchas de sus cepas se distinguen por la presencia del gen *lacY*, que codifica la lactosa permeasa (Anderson *et al.*, 2018 citado en Mueller y Tainter, 2023; Mueller y Tainter, 2023).

Otra forma de identificar a los grupos patógeno, son mediante el esquema de serotipificación que desarrollo Kauffman, el cual continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (Maldonado-Galvez, 2023).

Si bien, *E. coli*, está clasificada por ser de los principales agentes diarreagénicos y se transmite por el consumo de agua y alimentos mal cocidos (Farfán-García, 2016), el tratamiento depende de la cepa y de la sintomatología, los expertos recomiendan

la rehidratación y los antidiarreicos, no se recomiendan antibióticos como tratamiento de primera línea debido a los efectos secundarios perjudiciales y su asociación con la resistencia a los antibióticos; sin embargo, en pacientes con enfermedad grave, el uso de antibióticos puede ser razonable (Mueller y Tainter, 2023).

La diarrea fue responsable de la muerte de al menos 370 000 niños en 2019 y de 800 000 muertes al año según datos en 2013 y la segunda causa principal de muerte en niños menores de 5 años de edad. La diarrea es un problema global. La mayoría de estos son causados por InPEC cuyos miembros poseen rasgos de virulencia distintos, diferentes serotipos O:H y síndromes clínicos característicos, aunque comparten algunos pasos en el mecanismo de patogénesis que incluyen una unión a la mucosa intestinal y albergan plásmidos que codifican factores de virulencia (Pokharei *et al.*, 2023).

1.2.1. Patotipos diarreagénicos de *E. coli*

1) *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Entre los patotipos de InPEC, EPEC es una causa importante de diarrea infantil en países en desarrollo, pudiendo producir infecciones subclínicas hasta cuadros fatales. Su sello histopatológico característico son las lesiones de “adherencia y borramiento (A/E)”, que ocurren cuando las bacterias se adhieren íntimamente al epitelio intestinal y alteran el citoesqueleto mediante la acumulación de actina polimerizada bajo los sitios de adhesión (Pokharel *et al.*, 2023).

Además, EPEC se divide en EPEC típica (tEPEC) y EPEC atípica (aEPEC) según la presencia del plásmido pEAF. Ambas presentan patrones de adherencia distintivos: aEPEC puede mostrar adherencia difusa, localizada o agregativa, mientras que tEPEC presenta adherencia localizada. Asimismo, aEPEC causa enfermedades agudas y diarrea sanguinolenta persistente, mientras que tEPEC se asocia a diarrea secretora abundante con moco y pérdidas importantes de agua y

electrolitos. Finalmente, aEPEC se encuentra en humanos y animales, y tEPEC es exclusivamente humano (Pokharel *et al.*, 2023).

Patogénesis molecular de EPEC:

EPEC produce lesiones de "Adhesión y borramiento (A/E)" cuando las bacterias se adhieren íntimamente a los enterocitos. El pilus formador de haces (BFP) permite la adherencia interbacteriana y también a las células epiteliales. Los patógenos contactan a la célula hospedera a través de T3SS y sus efectores. La adhesión íntima de las bacterias con las células epiteliales está mediada por el complejo *Tir-EspA-EspB-EspD* en la membrana del hospedero y la *intimina* en la bacteriana. El sistema de secreción tipo III libera varias proteínas efectoras, incluyendo *Tir*, *EspF*, *EspG*, *EspH* y *MAP* que migran en el citoplasma. Estas interactúan con proteínas del hospedero como N-WASP y *Arp2/3* para causar el reordenamiento de la actina. Se activan la proteína quinasa C (PKC), la fosfolipasa C γ , la quinasa de la cadena ligera de miosina y las quinasas de la proteína activada por mitógenos (MAPK). Estos borramientos complejos conducen a la inflamación intestinal, la permeabilidad intestinal y la pérdida del área de absorción (Figura 2) (Pokharel *et al.*, 2023).

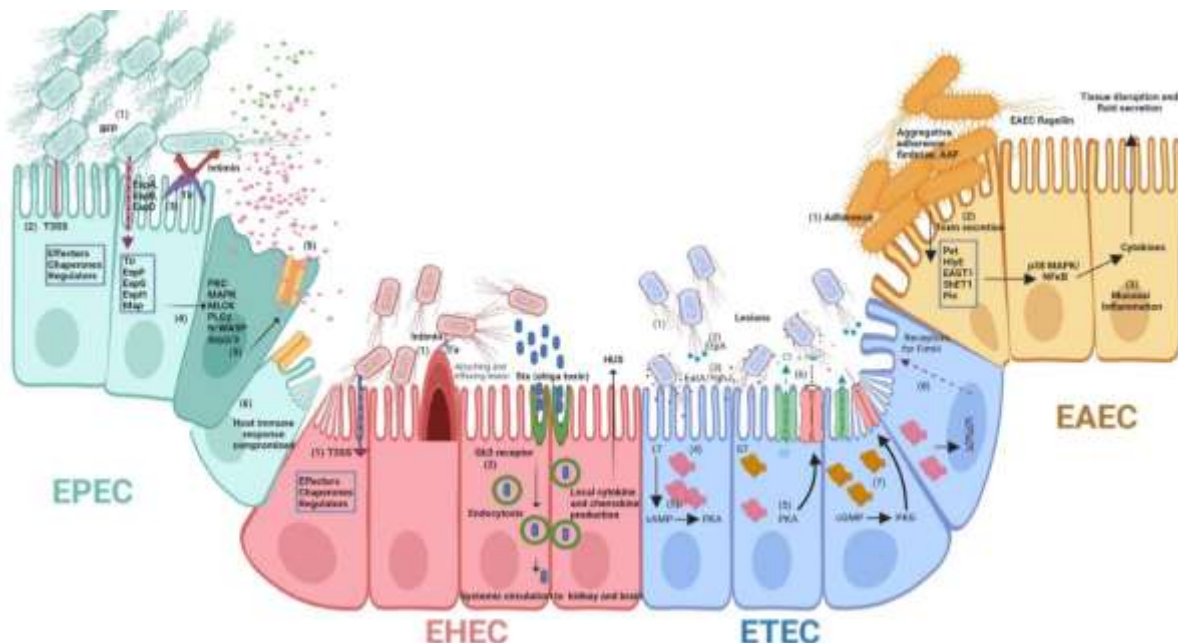


Figura 2. Patogénesis molecular de EPEC, EHEC, ETEC Y EAEC. Tomado de Pokharel *et al.*, 2023.

2) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC/ STEC)

Las cepas de EHEC, también llamadas STEC o VTEC, son *E. coli* productoras distintivas de toxina Shiga, estas cepas infectan el tracto digestivo (el intestino grueso) y causan diarrea hemorrágica, colitis hemorrágica y síndrome hemolítico-urémico (SHU); al igual que EPEC, también producen lesiones de adherencia y borramiento (Pokharel *et al.*, 2023; Medina-Arrollo, 2023).

Patogénesis molecular de EHEC

EHEC también realizan la adhesión y borramiento (A/E), el mecanismo es ligeramente diferente de EPEC ya que *Tir* no está fosforilado. EHEC inyecta proteínas efectoras como *Tir* y *EspFu* en el citoplasma del hospedero a través del T3SS y *Tir* se une a la intimina para unir a las bacterias a la célula hospedera. *Tir* y *EspFu* reclutan factores del hospedero para alterar el citoesqueleto de la célula y la polimerización de la actina. La toxina Shiga (*Stx*; también conocida como verocitotoxina) se libera en respuesta al estrés, lo que contribuye aún más a la enfermedad. La subunidad B de la toxina *Stx* se une al glicosfingolípido globotriaosilceramida (*Gb3*), presente en las balsas lipídicas de la superficie de la célula diana y se internaliza (endocitosis); la toxina Shiga se activa mediante la ruptura de la subunidad A en dos fragmentos por la proteasa furina. La toxina *Stx*, si se absorbe en la circulación sistémica, puede causar daño endotelial directo al aumentar la inflamación, inducir la expresión de citocinas y quimiocinas, e incluso puede dañar órganos importantes, especialmente el riñón y el cerebro (figura 2) (Pokharel *et al.*, 2023).

3) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Se caracteriza por causar “diarrea del viajero” aguda, que afecta a turistas que visitan países de bajos ingresos, predomina en áreas con saneamiento deficiente. ETEC se caracteriza por la producción de enterotoxinas termolábiles (LT) y termoestables (ST), que alteran los mecanismos de secreción en el intestino, lo que lleva a una diarrea acuosa (Pokharel *et al.*, 2023).

Patogénesis molecular de ETEC

Las cepas ETEC, se adhieren a las células epiteliales intestinales con la ayuda de uno o más flagelos peritricos o factores de colonización fibrilar (CF). *EtpA* media la unión de los flagelos con los receptores de glicano presentes en la mucina, *EatA* ayuda a degradar MUC2, la principal mucina secretada por las células caliciformes, mientras que *YghJ* es necesaria para un acceso eficiente a las superficies de los enterocitos. Después, las bacterias liberan LT y ST preformados a sus respectivos receptores en los gangliósidos GM1 y GC-C de la célula hospedera, respectivamente, y activan la producción de monofosfato de adenosina cíclico celular (cAMP), para iniciar cascadas de señalización intracelular que conducen flujo de CFTR y la inhibición de la captación de Na⁺ a través del intercambiador de iones NHE3 Na⁺/H⁺; La toxina termoestable (ST) se une a la guanilato ciclasa C para activar la producción de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), activando la proteína quinasa G (PKG), que fosforila las proteínas del canal iónico y el desarrollo de diarrea. LT modula la transcripción de múltiples genes, incluidos los que codifican CEACAM (moléculas de adhesión celular carcinoembrionaria), que luego sirven como receptores para *FimH* de ETEC que expresan fimbrias tipo 1 (figura 2) (Pokharel *et al.*, 2023).

4) *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

La EAEC es responsable de brotes diarreicos en todo el mundo y se asocia principalmente con diarrea inflamatoria leve y también con diarrea del viajero aguda en niños pequeños y adultos con VIH. Este patotipo se describe por primera vez en 1987 por su patrón de adherencia autoagregativa en “ladrillos apilados” sobre células Hep-2; produce enterotoxinas, citotoxinas secretoras y fimbrias de adherencia agregante (AAF) (Pokharel *et al.*, 2023; Medina-Arroyo, 2023).

Patogénesis molecular de EAEC

La EAEC se adhiere a los epitelios del intestino delgado y grueso formando una biopelícula gruesa, libera enterotoxinas y citotoxinas e induce inflamación de la mucosa. El primer paso de la infección por EAEC consiste en la colonización de la mucosa intestinal por las fimbrias de adherencia agregativas (FAA) I, II y III, lo que

da lugar a un patrón AA característico en forma de red de ladrillos apilados. A esto le sigue la secreción de diferentes enterotoxinas y citotoxinas con diferentes funciones, a saber, la toxina termoestable enteroagregativa (EAST-1), la toxina codificada por plásmidos (*Pet*), la proteína implicada en la colonización (*Pic*), la enterotoxina 1 de *Shigella* (ShET-1) y la hemolisina E (*HlyE*). El papel de estos factores de virulencia y su evolución clínica no está claro, pero se asocian con un aumento de la producción de citocinas y marcadores inflamatorios que provocan inflamación de la mucosa (figura 2) (Pokharel *et al.*, 2023).

5) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Puede causar colitis inflamatoria invasiva y en ocasiones disentería, así como diarrea acuosa. Las cepas de EIEC muestran características genéticas, bioquímicas y patogénicas similares a las de *Shigella*. A diferencia de otros patotipos como EPEC, EHEC y ETEC que se replican e infectan extracelularmente, las cepas de EIEC penetran las células epiteliales, seguida de la lisis de la vacuola endocítica, la multiplicación, movimiento direccional a través del citoplasma y extensión a las células epiteliales adyacentes (Pokharel *et al.*, 2023; Medina-Arrollo, 2023).

Patogénesis de EIEC

Shigella/EIEC comparten un patrón de patogénesis similar (figura 3). Las EIEC se adhieren a la superficie basolateral de los enterocitos y forman un poro en la membrana celular. Los antígenos del plásmido de invasión (*Ipa*) facilitan su captación, seguida de la entrada, multiplicación y propagación intercelular, procesos que culminan en la muerte del enterocito. Tras escapar de la vacuola de entrada, EIEC inicia la polimerización de actina mediante el reclutamiento dependiente de *IcsA* de N-WASP y ARP2/3, lo que permite su motilidad intracelular. Las bacterias liberadas de los enterocitos dañados inducen una nueva fagocitosis en células sanas y repiten el ciclo, replicándose o diseminándose entre células mediante motilidad dependiente de actina, además de poder migrar y multiplicarse en células epiteliales y macrófagos (Pokharel *et al.*, 2023; Medina-Arrollo, 2023).

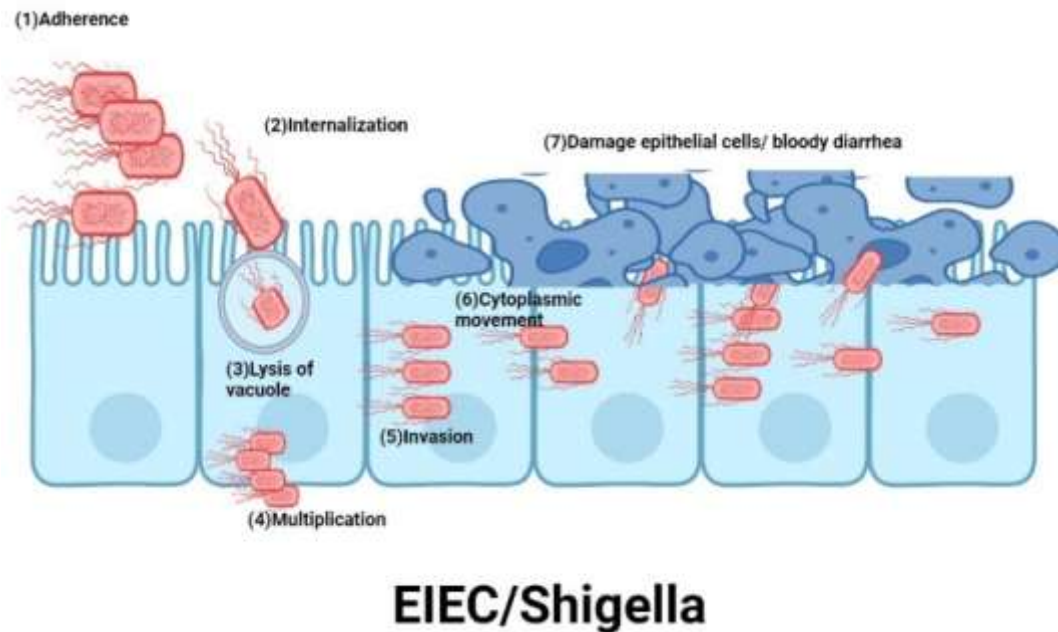


Figura 3. Patogénesis de EIEC. Tomado y modificado de Pokharel *et al.*, 2023.

6) *E. coli* difusa-adherente (DAEC)

Las DAEC se caracterizan por un patrón de adherencia difusa en células epiteliales cultivadas. Alrededor del 75 % de las DAEC albergan adhesinas de la familia *Afa/Dr*, responsables de este fenotipo de adherencia. La infección comienza con la interacción de la familia de adhesinas *Afa/Dr* con receptores unidos a la membrana, incluido el factor acelerador de la descomposición (DAF) por las adhesinas *Afa/Dr/DAF* (*AfaE-I*, *AfaE-II*, *AfaE-III*, *AfaE-V*, *Dr*, *Dr-II*, *Nfa-1* y *F1845*). Una vía de señalización que involucra a la(s) proteína(s) tirosina quinasa(s), la fosfolipasa *Cy*, la fosfatidilinositol 3-quinasa, la proteína quinasa *C* y un aumento de $[Ca^{2+}]$ que controla los reordenamientos de la F-actina asociada al borde en cepillo induce cambios estructurales en las microvellosidades. La toxina serina proteasa (*Sat*) secretada por las DAEC puede alterar la permeabilidad paracelular, lo que resulta en la acumulación de líquido en el intestino. Las interacciones del hospedero con las adhesinas *Afa/Dr* pueden inducir la migración de leucocitos polimorfonucleares (PMNL), lo que promueve la producción de citocinas proinflamatorias, las cuales, a

su vez, promueven la regulación positiva de DAF. Se ha descrito la inducción de proyecciones digitiformes en los enterocitos debido a la transducción de señales causadas por las DAEC (Figura 4).

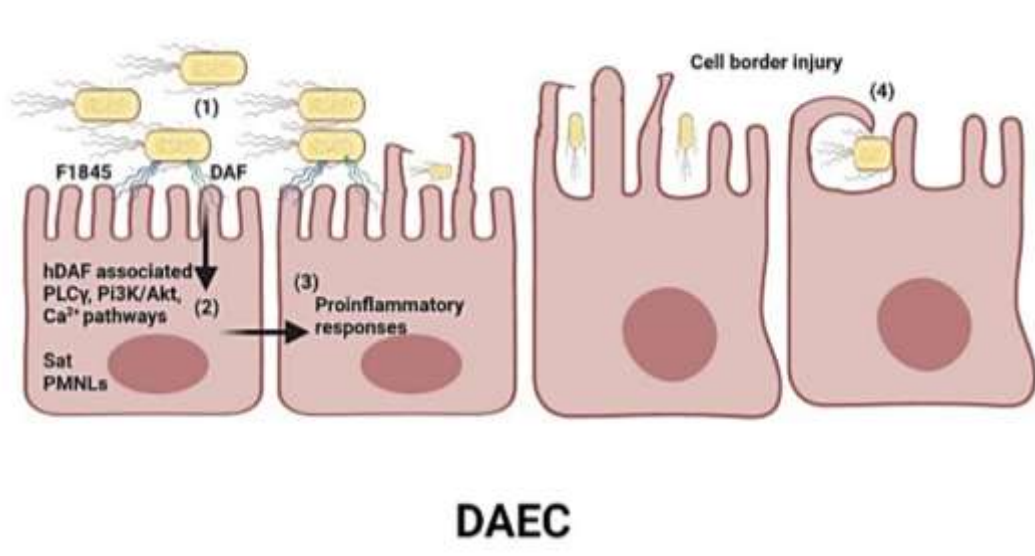


Figura 4. Patogénesis de DAEC. Tomado y modificado de Pokharel *et al.*, 2023.

1.3. *Escherichia coli* Adherente Invasiva (AIEC)

1.3.1. Generalidades

Hace más de dos décadas se identificó un nuevo subtipo de *E. coli*, denominado *E. coli* adherente-invasiva (AIEC), asociado inicialmente con la enfermedad de Crohn (EC). En 1998, el grupo de Darfeuille-Michaud aisló la cepa LF82 a partir de biopsias ileales de pacientes con EC, caracterizada por su marcada capacidad de adherencia. En 1999, Boudeau *et al.*, estudiaron su capacidad de invasión en células epiteliales intestinales, demostrando que carecía de los factores de virulencia típicos de cepas patógenas. Debido a este comportamiento distintivo, se la denominó AIEC.

Desde esta primera descripción, se han aislado AIEC en biopsias intestinales de pacientes con EC, colitis ulcerosa e incluso en individuos sanos, por lo que esta cepa se considera un patobionte, es decir, es capaz de habitar el intestino sin causar daño, pero que bajo alteraciones en la respuesta inmune del hospedero pueden contribuir al desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales (Zangara *et al.*, 2022; Pokheral *et al.*, 2023).

Las cepas AIEC poseen un amplio repertorio de genes, como *fliC*, *ompC* y otros reguladores del pili tipo 1, que median la adherencia e invasión de las células epiteliales. Además, cuentan con diversos factores de virulencia que favorecen la motilidad, la expresión de cápsula y lipopolisacárido (LPS), la resistencia sérica, la captación de hierro, la adhesión e invasión de líneas celulares epiteliales y la formación de biopelículas. Estos determinantes patogénicos están modulados por múltiples elementos bacterianos y vías reguladoras, como lipoproteínas, proteínas like-histona, la ribonucleótido reductasa *NrdR*, el regulador transcripcional flagelar *FliHDC*, el factor sigma *FliA* y los segundos mensajeros *c-di-GMP*, que participan en la interacción con las células epiteliales intestinales (IEC). Asimismo, el factor sigma E contribuye a la formación de biopelículas y las fimbrias polares largas (LPF) que constituyen un rasgo característico de AIEC.

La cepa prototipo LF82 se distingue porque, en lugar de escapar al citoplasma, se replica en fagolisosomas maduros, tolerando el pH ácido, el estrés oxidativo, las enzimas proteolíticas y diversos compuestos antimicrobianos. Esta capacidad de supervivencia y replicación en macrófagos es favorecida por proteínas como *HtrA*, la tiol-disulfuro oxidorreductasa *DsbA*, la proteína de unión a ARN Hfq69 y la oxidorreductasa IbeA70 dependiente de FAD, todas las cuales participan en la resistencia a especies reactivas de oxígeno (ROS).

A pesar de este arsenal genético, ninguno de los genes identificados en AIEC es exclusivo, universal ni indispensable en todas las cepas, por lo que no existe un marcador molecular definitivo para distinguir este patotipo. La alta prevalencia de *E. coli* adherentes en la mucosa ileal de pacientes con enfermedad de Crohn impulsó estudios de caracterización molecular en numerosos aislados clínicos, pero hasta ahora no se han identificado genes de virulencia específicos. En consecuencia, la identificación de AIEC continúa basándose en un esquema fenotípico *in vitro* establecido hace casi 25 años (Palmella *et al.*, 2017; Zangara *et al.*, 2022), que define a las cepas AIEC por su capacidad para: 1) adherirse a IEC, 2) invadir células epiteliales, 3) sobrevivir y/o replicarse en macrófagos y 4) formar biopelículas (Palmella *et al.*, 2017; Camprubí *et al.*, 2020; Baldelli *et al.*, 2021; Zangara *et al.*, 2022).

1.3.2. Mecanismo de Patogénesis de AIEC

AIEC invade las células hospederas de manera similar a otros patógenos como EIEC y *Shigella*. Estas cepas penetran las células epiteliales ya sea invadiendo directamente la capa epitelial o entrando a través de células microfold (M) en el epitelio del intestino delgado (Pokheral *et al.*, 2023). Lo más probable es que los patovares de *E. coli* intestinal penetren en la capa mucosa al promover la degradación de la mucina con proteasas. Se ha informado de una proteasa secretada por AIEC (VAT-AIEC) descrita recientemente y que contribuye a la colonización intestinal en un modelo murino (Palmella *et al.*, 2017). Los péptidos antimicrobianos secretados por el hospedero, pueden ser resistentes para AIEC, se

han documentado genes como *arlA*, que codifica una proteína de la familia Mig-14 implicada en la resistencia a las defensinas, y *Ar/C*, una proteasa de membrana externa de la familia *OmpT*, encargadas de degradar proteínas y péptidos (Paso 1, figura 5).

La adhesión al epitelio intestinal está mediada por pili tipo 1 o *fimH* expresados en la superficie de AIEC uniéndose al receptor, la molécula de adhesión celular 6 (CEACAM6) en los enterocitos ileales (Paso 1, figura 5). La expresión epitelial de CEACAM 6 esta aumentada en individuos con EII lo que aumenta la colonización de la mucosa ileal por AIEC (Baldelli *et al.*, 2021). Se han reportado polimorfismos en la secuencia de la subunidad *fimH* del pilus tipo 1 en cepas de AIEC. Además, se ha demostrado que las fimbrias tipo 1, pueden unirse a la proteína GP2 ubicada en la membrana plasmática apical de las células M.

Se ha documentado que las IEC, en pacientes con EC, tienen niveles reducidos de meprina y esto se ha asociado a promover la producción de la citocina proinflamatoria IL-8, favoreciendo la colonización de AIEC, lo que promueve una pérdida de la Occludina y E-Caderina de las uniones estrechas y con la perdida de la función de la barrera. Asimismo, se ha demostrado que la quitinasa 3 similar a 1 (CHI3L1) desempeña un papel clave en facilitar la infección por AIEC. Aunque su expresión en el intestino es poco común en individuos sanos, se ha reportado que se incrementa durante la inflamación, favoreciendo así la colonización de la mucosa (Low *et al.*, 2013).

Los flagelos en la superficie de AIEC pueden activar al Receptor Tipo Toll 5 (TLR5), aumentando la respuesta inmune inflamatoria ya que activa la vía del factor nuclear Kappa B (*NF-kB*) y la secreción de IL-8 y a su vez, inhibe el proceso de autofagia de las células del hospedero.

Se ha observado que AIEC produce vesículas de membrana externa (OMV) que, mediante las proteínas transmembrana OmpA y OmpC, interactúan con el factor de respuesta al estrés del retículo endoplásmico Gp96, el cual se expresa en la superficie de las células epiteliales intestinales. Esta interacción favorece la fusión

de las OMV con Gp96 y contribuye al proceso de invasión bacteriana (Farfán *et al.*, 2016; Pamella *et al.*, 2017).

Los informes también sugieren que las cepas de AIEC que expresan fimbrias polares largas (LPF) se adhieren a las células M y median la transcitosis de las bacterias (Palmella *et al.*, 2017; Pokheral *et al.* 2023; Zangara *et al.*, 2022) (Paso 2, figura 5). Varias bacterias invasivas como *Yersinia*, *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella spp*, usan células M para atravesar la barrera intestinal, de manera similar a las AIEC, son capaces de entrar y translocar a través de células M (Palmella *et al.*, 2017), por ello las células M de las placas de Peyer también intervienen en la translocación de AIEC a través del pilus FimH y las fimbrias polares largas. Este paso facilita la supervivencia y proliferación de la bacteria dentro de los macrófagos (Abdelhalima *et al.*, 2020).

Una vez que AIEC interactúa con la barrera epitelial, esta forma biopelículas. Se ha documentado que aquellas con el antígeno flagelar H1 son fuertemente productoras de biopelículas.

Los macrófagos son un componentes clave de la defensa inmunitaria innata del intestino al limitar la diseminación microbiana sistémica mediante fagocitosis; sin embargo, AIEC tiene la capacidad para sobrevivir y replicarse dentro de ellos, esto puede ser promovido por la proteína de estrés HtrA, la tiol-disulfuro oxidorreductasa (DsbA), la proteína de unión al ARN (Hfg) y oxidorreductasa IbeA (Pamela *et al.*, 2017) (Paso 3, figura 5) importante para evadir los mecanismos específicos que les permiten resistir a especies reactivas de Oxígeno (ROS). Recientemente se ha descubierto que estos recursos defensivos están agrupados en dos conjuntos regulados de genes, los regulones *soxRS* y *oxyR* y también un gen en particular que contribuye a la capacidad de AIEC para sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos es *gipA*. La expresión de *GipA* se induce por ciertas condiciones intracelulares, gastrointestinales (sales biliares) y fagolisosómicas (ROS y pH ácido). La eliminación de *GipA* disminuye la respuesta proinflamatoria y la replicación de AIEC dentro de los macrófagos. Se ha documentado que la cepa LF82 puede replicarse en neutrófilos y monocitos (Palmela *et al.*, 2017).

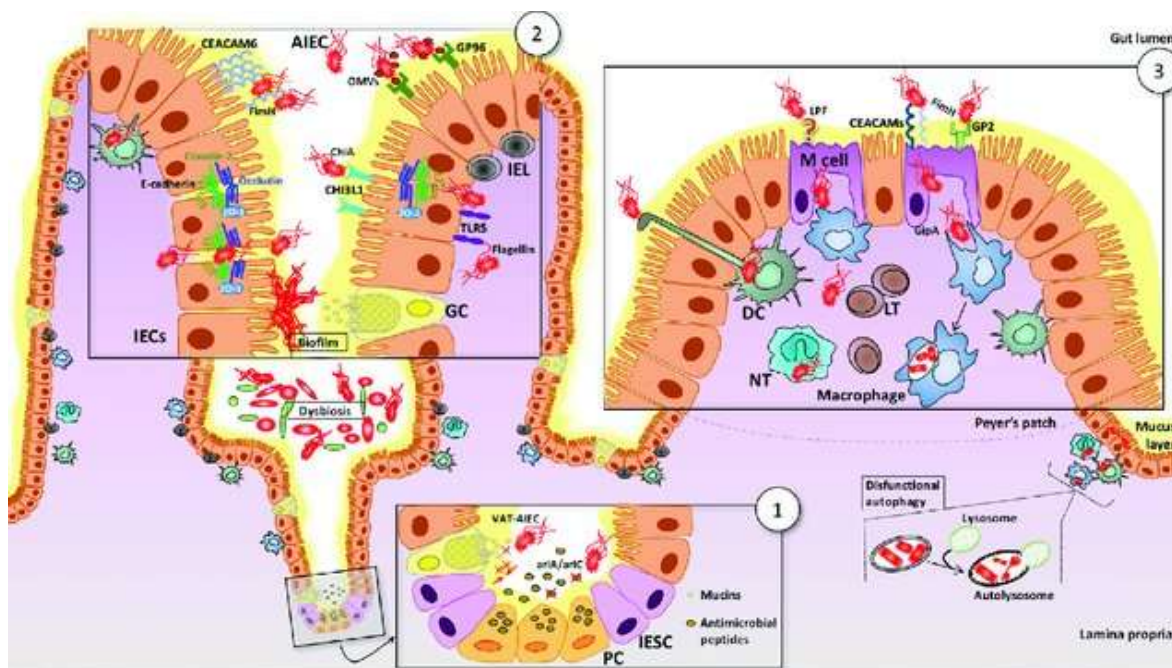


Figura 5. Interacción de *Escherichia coli* adherente- invasiva (AIEC) con la mucosa intestinal en el contexto de la EII. Tomado de Palmela et al., 2017.

Algunos estudios en modelos animales indican que la acumulación de AIEC y otras *E. coli* en el intestino podría ser consecuencia de la inflamación, y que la infección por AIEC puede alterar la microbiota intestinal. Sin embargo, aún no está claro si AIEC desencadena la inflamación que conduce a la EII o si su proliferación es resultado de ella, contribuyendo a su agravamiento (Baldelli et al., 2021). También se ha propuesto que las AIEC asociadas a CU podrían diferir de las detectadas en EC, mostrando mayor invasividad o distintos patrones de expresión génica, aunque su prevalencia es menor (Baldelli et al., 2021). En general, en la EII no se ha identificado un único microorganismo causal, y diversos estudios señalan la posible participación tanto de patógenos específicos (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter* spp., *Campylobacter* spp.) como de comensales alterados funcionalmente, como AIEC o *Bacteroides fragilis* enterotoxigénico (Palmella et al., 2017).

1.3.3. Formación de Biopelícula

La formación de biopelículas es un proceso estructurado mediante el cual las bacterias se adhieren a superficies bióticas o abióticas y producen una matriz extracelular polimérica compuesta por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos

extracelulares y, en algunos casos, lípidos. Esta matriz protege a las bacterias de la desecación, acción de antimicrobianos y respuesta inmunitaria, además de favorecer la comunicación interbacteriana y la organización tridimensional de la biopelícula (Costerton *et al.*, 1999; Flemming y Wingender, 2010). La biopelícula se desarrolla en etapas bien definidas: adherencia reversible, adherencia irreversible, formación de microcolonias, maduración de la arquitectura tridimensional y, finalmente, dispersión celular hacia nuevos nichos (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Este modo de crecimiento confiere a las bacterias ventajas adaptativas significativas, entre las que destacan la tolerancia antibiótica y la persistencia en ambientes hostiles, características que contribuyen a infecciones crónicas o recurrentes.

En *E. coli*, la capacidad de formar biopelículas depende de diversos determinantes como fimbrias tipo 1 (FimH), el flagelo FliC, polisacáridos capsulares, la síntesis de celulosa y la regulación mediada por segundos mensajeros como el c-di-GMP (Pratt & Kolter, 1998; Serra *et al.*, 2013). Estas estructuras facilitan la adherencia inicial y la cohesión entre bacterias dentro de la matriz de la biopelícula. En el caso particular de *E. coli* adherente-invasiva (AIEC), la formación de biopelícula es un rasgo relevante para su patogénesis, ya que permite la persistencia de estas cepas en la mucosa intestinal inflamada y favorece su capacidad de colonización en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Martínez-Medina *et al.*, (2009) demostraron que las cepas AIEC presentan una capacidad significativamente mayor para formar biopelículas en comparación con cepas no AIEC, y que esta característica se correlaciona positivamente con su fenotipo de adherencia e invasión celular. Así, la formación de biopelícula en AIEC constituye un determinante clave que potencia su adaptación al hospedero, su persistencia intracelular y su contribución al proceso inflamatorio intestinal.

1.3.4. Resistencia antimicrobiana

En los últimos años, diversos estudios han mostrado que las cepas adherentes-invasivas de *E. coli* (AIEC) presentan una creciente relevancia clínica debido a su capacidad de persistir en el intestino inflamado y a su tendencia a acumular

mecanismos de resistencia a múltiples antibióticos (Martínez-Medina *et al.*, 2020; Heidari *et al.*, 2024). Investigaciones recientes confirman una notable variabilidad en los perfiles de susceptibilidad de AIEC, con incrementos en genes asociados a resistencia y en la formación de subpoblaciones tolerantes, lo que dificulta la eficacia de terapias convencionales (Pérez-Villalobos *et al.*, 2025). Además, aunque la rifaximina es un antibiótico de uso frecuente en patologías intestinales, su aplicación puede favorecer la selección de bacterias resistentes dentro de la microbiota, lo que plantea un riesgo clínico emergente (Carbonnel *et al.*, 2025). Por ello, estudiar la resistencia antimicrobiana en AIEC, y particularmente la resistencia a rifaximina, es esencial para optimizar estrategias terapéuticas y anticipar fallos de tratamiento en enfermedades intestinales crónicas.

1.3.5. Grupos filogenéticos

En el 2000, Clermont *et al.*, establecieron un método sencillo para la asignación de filogrupos en *E. coli* mediante PCR, este esquema permitió clasificar las cepas en los filogrupos A, B1, B2 Y D. Posteriormente, Clermont *et al.*, (2013) revisaron y ampliaron este sistema, motivados por las inconsistencias detectadas en la clasificación de cepas con el esquema original. En esta actualización incorporaron nuevos cebadores (*arpA*, *chuA*, *yjaA*, *trpA* y *TspE4.C2*) y esto permitió distinguir ocho grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D, E, F y clado I. Esta versión resolvió errores frecuentes en la diferenciación de cepas de los grupos D, E y B1 y aumentó significativamente la sensibilidad y especificidad del método; sin embargo, en 2019 este sistema se actualizó ya que reconocieron al filogrupo G el cual surge de cepas clasificadas como filogrupos D y F y puede distinguirse con la detección del gen *ybgD* (170pb), aunque filogenómicamente muestra una mayor proximidad con F.

Los trabajos de 2000, 2013 y 2019 permitieron clasificar cepas de *E. coli* y relacionar esta diversidad con su comportamiento biológico y clínico, por ejemplo, el grupo A representa principalmente cepas no patógenas que residen a lo largo de la mucosa del tracto gastrointestinal. El filogrupo B1 incluye tanto cepas comensales como algunas pertenecientes al patotipo EHEC. Los filogrupos D1, D2 y E corresponden

a InPEC, mientras que muchos ExPEC pertenecen al grupo B2. Las cepas de *E. coli* genéticamente diversas, pero fenotípicamente indistinguibles se agrupan en el clado críptico I (Pokharei et al., 2023). En el caso de AIEC, las cepas se asignan con mayor frecuencia al filogrupo B2, que contiene más factores de virulencia, aunque también se encuentran en A, B1, D y F (Palmella et al., 2017; Camprubi et al., 2020).

1.3.6. Secuencia Tipo (ST)

La identificación precisa de cepas patógenas es fundamental para la vigilancia epidemiológica, el análisis de la dinámica poblacional microbiana y el diseño de estrategias de control en salud pública. Para ello se han desarrollado diversos métodos de tipificación molecular aplicables tanto a la epidemiología global como a brotes locales. Entre ellos, la tipificación de secuencias multilocus (MLST) analiza la variación nucleotídica en fragmentos internos de genes constitutivos, generalmente siete, cuyos alelos combinados generan un perfil alélico o tipo de secuencia (ST) que caracteriza inequívocamente a cada aislado. Su uso amplio ha sido posible gracias a avances en biología evolutiva bacteriana, secuenciación de alto rendimiento y bases de datos genéticas. Desde la década de 1980, los estudios poblacionales que demostraron la frecuencia del intercambio genético bacteriano impulsaron el desarrollo de MLST. Un objetivo central de este enfoque es disponer de plataformas en línea que integren bases de datos accesibles a investigadores y autoridades sanitarias, útiles para estudios clínicos, epidemiológicos y poblacionales (Pérez-Losada et al., 2017).

II. ANTECEDENTES

2.1. Antecedentes internacionales

En 1998, Darfeuille-Michaud y colaboradores identificaron en biopsias ileales de pacientes con EC un grupo de cepas de *E. coli* con una marcada capacidad de adherencia al epitelio intestinal y sin los genes de virulencia típicos de los patotipos entéricos clásicos. La cepa prototipo LF82 destacó por su notable adherencia. Este hallazgo sentó las bases para considerar que ciertas cepas de *E. coli*, como LF82, podrían desempeñar un papel en la patogénesis de la enfermedad de Crohn mediante e impulsando así el desarrollo de un nuevo campo de investigación sobre este patotipo.

En 1999, Baudeau *et al.*, retoman el trabajo previo de Darfeuille-Michaud, con este antecedente, evaluaron la invasión de LF82 y la compararon con cepas de referencia pertenecientes a patotipos bien establecidos de *E. coli*. Los resultados mostraron que LF82 invade eficientemente células HEp-2, Caco-2 y la línea INT-407, alcanzando niveles significativamente mayores o igual a algunos patotipos de *E. coli*. Además, notaron que los determinantes genéticos responsables de este fenotipo no corresponden a los conocidos en otras cepas patógenas invasivas; observaron la formación de vacuolas endocíticas vinculadas a la patogénesis, sugiriendo que LF82 activa un mecanismo endocítico en células fagocíticas no profesionales que favorece su internalización. Con base en estos hallazgos, concluyeron que LF82 constituye una *E. coli* verdaderamente invasiva que no encaja en los patotipos descritos hasta ese momento, lo que llevó a proponer un nuevo grupo potencialmente patógeno: las cepas *E. coli* adherente-invasiva (AIEC).

Glasser *et al.*, (2001) estudiaron 15 cepas de AIEC aisladas de pacientes con enfermedad de Crohn y demostraron que son capaces de sobrevivir y replicarse dentro de macrófagos sin inducir la muerte celular. Utilizando macrófagos peritoneales murinos, macrófagos derivados de monocitos humanos y la cepa de referencia LF82, confirmaron la supervivencia intracelular de AIEC. Mediante microscopía electrónica observaron que, a las 24 h postinfección, los macrófagos

albergaban grandes vacuolas con abundantes bacterias. Además, las células J774-A1 (una línea celular perteneciente a macrófagos murinos) infectadas con LF82 secretaron 2.7 veces más TNF- α . En conjunto, el estudio mostró que las cepas AIEC sobreviven y se multiplican en macrófagos sin causar apoptosis y que promueven una marcada respuesta proinflamatoria.

Martínez-Medina *et al.* (2009) fueron los primeros en demostrar que la formación de biopelículas es un rasgo distintivo de las cepas AIEC. Partiendo de la sospecha de que estas estructuras podrían estar presentes en la mucosa de pacientes con EC, dado que algunas *E. coli* patógenas las producen, analizaron 27 cepas AIEC y 38 no AIEC aisladas de mucosa intestinal. Encontraron que los índices de formación específica de biopelícula (SBF) fueron significativamente mayores en las cepas AIEC mediante el análisis de la producción, en el que el 65.4 % de las cepas con producción moderada o alta de biopelícula correspondieron a AIEC, mientras que el 74.4 % de las productoras débiles fueron no AIEC ($P = 0.002$). Además, los niveles de adherencia ($P = 0.009$) e invasión ($P = 0.003$) mostraron una correlación positiva con índices más altos de SBF, lo que confirmó que AIEC forma biopelículas de manera más eficiente que otras cepas.

Palmela *et al.* (2018) realizaron una revisión exhaustiva sobre el papel de AIEC en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), especialmente en la enfermedad de Crohn. Describen que AIEC coloniza preferentemente la mucosa ileal inflamada y se adhiere eficientemente a células epiteliales intestinales mediante FimH, que reconoce el receptor CEACAM6 sobreexpresado en la inflamación. Asimismo, explican que AIEC invade células epiteliales, sobrevive y se replica dentro de macrófagos sin inducir apoptosis, promoviendo una respuesta inflamatoria sostenida caracterizada por una elevada producción de TNF- α . El estudio también integra evidencia sobre otros determinantes de virulencia, como flagelina FliC, las proteínas de membrana OmpC/OmpA implicadas en la interacción bacteria-huésped, aunque OmpA ha sido relacionada con la incorporación en vesículas de membrana externa, factores de captación de hierro (*fyuA/ybt*) y mecanismos que modulan la formación de biopelículas (*afaC*, *lpf*, *gipA/lpfA*). Los

autores concluyen que, aunque AIEC no posee un patrón genético exclusivo, su repertorio funcional le permite aprovechar el ambiente inflamado, perpetuar la disbiosis y contribuir a la cronicidad de la EII.

Zangara *et al.*, (2023) presentan una revisión actualizada sobre el potencial patogénico de AIEC en la enfermedad de Crohn, destacando la heterogeneidad molecular de este patotipo y la dificultad de definirlo mediante marcadores genéticos o bioquímicos exclusivos. Las cepas AIEC han sido aisladas de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal utilizando criterios fenotípicos clásicos, pero no se ha identificado un gen o conjunto de genes que sea universalmente exclusivo de AIEC, a pesar de compartir mecanismos de virulencia comunes, como la interacción con receptores epiteliales y la supervivencia en macrófagos. Las variaciones genómicas y metabólicas entre aislados sugieren que múltiples determinantes pueden contribuir a su patogenicidad en diferentes contextos, enfatizando la importancia de considerar tanto factores genéticos como ambientales y de expresión génica para comprender la adaptación de AIEC al nicho inflamado y su capacidad de persistir en el hospedero, lo que complica la identificación de marcadores moleculares definitivos para su clasificación.

2.2. Antecedentes nacionales

En México la literatura sobre AIEC es limitada; sin embargo, destaca el trabajo de Barrios-Villa *et al.*, (2018) que aportaron el primer estudio en México que caracteriza cepas con fenotipo AIEC aisladas de personas clínicamente sanas, esto a partir de heces de donantes sanos de los cuales se aislaron 4 cepas y una cepa se aisló de líquido peritoneal neonatal. Al analizar los aislamientos, estos resultaron ser ST131 O25:H4/H30-Rx. El trabajo identificó nuevos virotipos (F,G y H), genes de virulencia propios de ExPEC y determinantes asociados al patotipo AIEC como las tamposasas *insA* e *insB* como el integron *intl1*.

En 2020, Barrios-Villa *et al.*, analizaron las secuencias genómicas de cinco cepas AIEC previamente caracterizadas y aisladas de individuos sanos (no IBD-AIEC), comparándolas con las cepas de referencia AIEC LF82 y NRG857c, así como con

la cepa de *E. coli* uropatógena extraintestinal CFT073. Las cepas no IBD-AIEC, mostraron hasta un 98 % de identidad nucleotídica respecto a las cepas control. Además, se evaluó la presencia de grupos génicos previamente descritos en aislados AIEC, confirmándose en las cinco cepas no IBD-AIEC los genes *fimA* (subunidad fimbrial principal), *fliC* (flagelina), *fuhD* (proteína de captación de hidroximato férrico), *chuA* (proteína membrana externa como hemo-receptor), *irp2* (proteína permeasa) y *cvaC* (colicina-V), estos genes mencionados han sido reportados en AIEC.

Gómez-Soriano, *et al.*, en 2023 realizó un análisis bioinformático del resistoma plasmídico en 30 genomas de cepas AIEC aisladas de pacientes con EII en distintos países. Su estudio incluyó la filogenia, el plasmidoma y el resistoma, y permitió identificar elementos genéticos asociados con resistencia a antibióticos de uso clínico. Los resultados mostraron una alta heterogeneidad filogenética, con filogrupos, secuenciotipos y serotipos muy variados, probablemente por el origen geográfico diverso de los aislados. La mayoría de las cepas perteneció al filogrupo B2 (23 cepas), mientras que el resto se distribuyó en B1, A, D y F. No obstante, las cepas C4435, C72223, C7225, C7226 Y C7230, provenientes de México compartieron filogrupo (B2), secuenciotipo (ST131) y serotipo (O25:H4), lo que indica una similitud filogenética y además fueron aisladas en la misma región (lo que puede explicar su semejanza).

2.3. Antecedentes directos

En 2019, en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC) del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM) en Puebla, Lara Flores *et al.*, realizaron una colección de **66 cepas de *E. coli*** (tabla 1), las cuales se aislaron a partir de biopsias de tres pacientes con EII: El **paciente 1** fue un hombre de 23 años diagnosticado con CUCI y con tratamiento previo con trimetoprim/sulfametoxazol. El **paciente 2**, una mujer de 61 años con diagnóstico de colitis crónica y diverticulitis, había recibido ciprofloxacino y rifaximina. El **paciente 3** fue un hombre de 34 años diagnosticado con CUCI y tratado

previamente con metronidazol, ciprofloxacino y ceftriaxona. Las cepas obtenidas de estos pacientes se encuentran conservadas en el cepario del LMHyC.

De la colección de 66 cepas de *Escherichia coli* mencionada, Maldonado-Gálvez (2023) analizó la resistencia de las cepas, caracterizó los perfiles de susceptibilidad a antibióticos y evaluó la presencia fenotípica de serín- β -lactamasas y metalo- β -lactamasas. Se observó que el 87.7 % de las cepas fueron multidrogorresistentes. Determino la presencia de genes de resistencia; en el paciente 1 se identificaron cepas productoras de BLEE, siendo *bla*_{TEM} el gen más frecuente; además, se detectaron genes *bla*_{CTX-M} y la variante *bla*_{CTX-M-15}, ampliamente distribuidas entre los aislados del mismo paciente. En contraste, los genes plasmídicos asociados a resistencia a quinolonas fueron los menos comunes.

De esta misma colección, Ibarra-Moreno en 2024, trabajo únicamente con cepas que presentaban perfiles de resistencia a Rifaximina y eran productoras de BLEE+, seleccionando un total de 36 cepas; a éstas, les realizó un análisis de distancia filogenética mediante la interpretación de un dendrograma y el ensayo de Electroforesis en Campos Pulsados (PFGE). Este análisis permitió seleccionar 22 cepas para continuar los ensayos fenotípicos de AIEC para el estudio presente (Figura 6 y 7).

III. JUSTIFICACIÓN

Se ha documentado que la EII, a pesar de ser multifactorial, está ampliamente ligada a la microbiota intestinal y particularmente asociada a la presencia de AIEC, ya que, a pesar de ser parte de la microbiota, algunas cepas pueden presentar un potencial patogénico y comportarse como patobiontes bajo ciertas circunstancias. Por ello, es necesario caracterizar cepas aisladas a través de biopsias de muestras tomadas de diferentes zonas del intestino de personas afectadas por alguna EII, para verificar la presencia del patotipo AIEC, por medio de la descripción de su fenotipo de adherencia, invasión, sobrevivencia en macrófagos y producción de biopelícula. Igualmente, es importante conocer las características fenotípicas propias de AIEC en cepas de *E. coli* aisladas de biopsias intestinales de pacientes mexicanos con EII, con lo cual obtendremos información científica sobre la relación entre la presencia de AIEC y EII en cepas de pacientes nacionales, datos que abonarán a esta línea de investigación internacional.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar cepas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal, como cepas del patotipo Adherente/Invasivas.

Objetivos particulares

1. Determinar el filogrupo y la secuencia tipo de las cepas caracterizadas como AIEC.
2. Determinar el fenotipo de adherencia, invasión y formación de biopelícula en cepas de *E. coli*, aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Estrategia metodológica

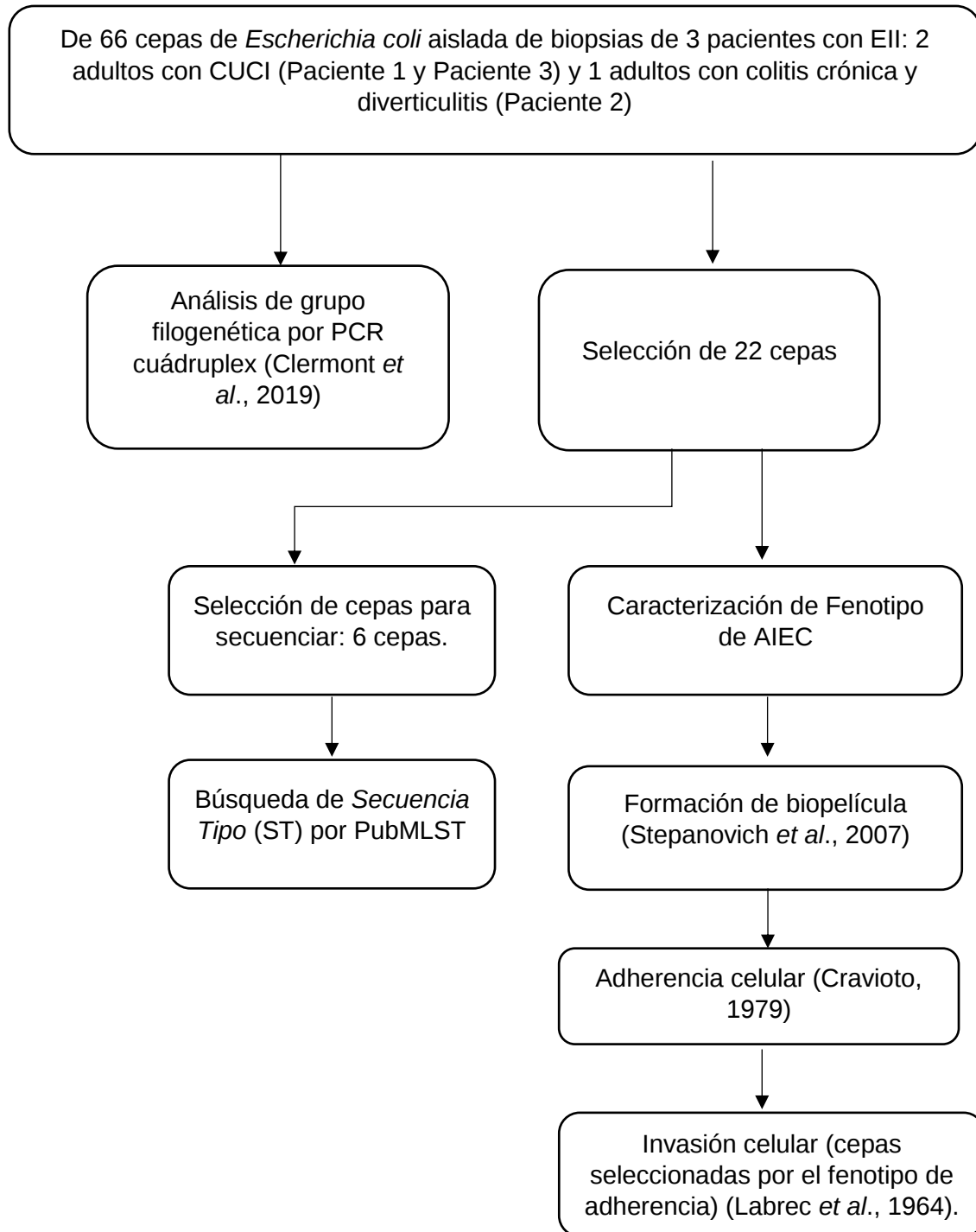


Figura 8. Esquema de trabajo.

5.2. Material biológico:

Se trabajaron con 66 cepas de *E. coli* las cuales pertenecen a un cepario del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC) y fueron aisladas por Lara-Flores en el 2018 a partir de biopsias de tres pacientes adultos de consulta externa privada del estado de Puebla, los cuales dos de ellos fueron diagnosticados con CUCI (paciente 1 y 3) y una paciente femenina con Colitis Crónica con Diverticulitis (paciente 2). Las biopsias fueron obtenidas de distintos sitios del tracto intestinal: colon descendente y transverso de donde se aislaron 37 cepas de *E. coli* (paciente 1); sigmoides en donde se aislaron 19 cepas y tres cepas de heces (paciente 2) y colon descendente de donde se obtuvieron 7 cepas (paciente 3). Estas cepas fueron previamente estudiadas, a las cuales se les determinó su relación clonal por Ibarra-Moreno en 2025 (Figura 6 y 7, ver anexos) y el fenotipo y genotipo de resistencia por Maldonado-Gálvez (2023). Los datos de los pacientes se muestran en la (tabla 1).

Tabla 1. Datos de los pacientes con EI donantes de las biopsias intestinales			
Pacientes	1	2	3
Edad (años)	23	61	35
Sexo	Masculino	Femenino	Masculino
Diagnóstico	CUCI	Colitis crónica y diverticulitis	CUCI
Tratamiento	Trimetoprim/ Sulfametoxazol	Ciprofloxacino y Rifaximina	Metronidazol, Ciprofloxacino y Ceftriaxona
Biopsia	Colon descendente y transverso	Sigmoides y dos cepas de heces	Colon descendente
No. cepas	37	22	7

5.2.1. Reactivación de cepario

Para iniciar el análisis, se verifico mediante la resiembra de cada cepa de la colección, las cuales se encontraban almacenadas en criopreservación a -70°C, esta resiembra nos permitió verificar que las cepas no se encontraran contaminadas. Para ello, se utilizó el Agar Triptona de Soya (TSA) y se sembró inicialmente por estría cruzada para aislar colonias, posteriormente, se seleccionó una colonia aislada para resembrar en masivo con TSA y nuevamente colectar el crecimiento bacteriano y almacenarlo en un criovial constituido por medio BHI con 15% de glicerol en las condiciones antes mencionadas. También se utilizó el medio MacConkey para observar las características de *E.coli*.

5.2.2. Controles

Los controles empleados en los ensayos de este trabajo fueron UPEC CFT073, C7223 Y C4435 (Barrios-Villa *et al.*, 2020).

La cepa *Escherichia coli* CFT073 es una cepa uropatógena (UPEC) de referencia, aislada de un caso de pielonefritis aguda, y ampliamente empleada en estudios de virulencia bacteriana. Se caracteriza por portar múltiples factores de virulencia asociados a la adhesión, captación de hierro, formación de biopelícula, daño al hospedero y persistencia en el hospedador, muchos de ellos localizados en islas de patogenicidad. La secuenciación de su genoma reveló una elevada plasticidad genética y un repertorio virulento representativo de cepas ExPEC, lo que ha permitido su uso como control positivo en ensayos de adherencia, invasión y biopelícula, así como modelo para el estudio de infecciones del tracto urinario (Welch *et al.*, 2002; Flores-Mireles *et al.*, 2015).

La cepa *E. coli* C7223 fue descrita por Barrios-Villa (2020) como un aislado con un fenotipo altamente adherente en células HeLa, la cual mostró mayores niveles de adherencia bacteriana durante el ensayo. Esta cepa fue obtenida a partir de muestras de individuos clínicamente sanos, presentó características fenotípicas

compatibles con el patotipo AIEC, incluyendo capacidad de adherencia celular y formación de biopelícula. Por lo que la cepa C7223 ha sido propuesta como una posible AIEC atípica y se consideró utilizada como control positivo en ensayos de adherencia y biopelícula en este estudio (Barrios-Villa, 2020).

La cepa *E. coli* C4435 fue caracterizada por Barrios-Villa (2020) como una cepa con alta capacidad de invasión celular, evaluada mediante ensayos de protección con antibiótico en células HeLa. C4435 mostró valores superiores de invasión en comparación con otros aislados, lo que permitió su uso como control positivo en ensayos de invasión bacteriana (Barrios-Villa, 2020).

5.2.3. Extracción de ADN

El ADN genómico de las cepas de interés se obtuvo mediante un método de ebullición a partir de colonias bacterianas previamente cultivadas en agar Luria-Bertani (LB) durante la noche. Las colonias se resuspendieron en 500 µL de agua destilada y se sometieron a ebullición durante 15 minutos. Los lisados se centrifugaron a 13,000 rpm 5 minutos; el sobrenadante se recuperó y se transfirió a tubos nuevos. La concentración de ADN se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific®).

5.2.4. Cuantificación de ADN

La concentración del ADN se midió con ayuda de un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific®) a una absorbancia de 260 y 280nm, la lectura de 260nm reflejaba 1 unidad de densidad óptica equivalente a 50 µg/mL de ADN de doble cadena. La concentración final utilizada para las reacciones de PCR fueron de 100 ng/µL.

5.2.5. Determinación de filogrupos por PCR cuádruplex

La determinación de filogrupos de 66 cepas de *E. coli* se realizó siguiendo el método de Clermont *et al.*, 2013 y 2019 que establecen realizar PCR cuádruplex empleando cuatro cebadores *TspE4C2* (152pb), *YjaA* (211pb), *chuA* (288pb) y *arpA* (400pb) las cuales, de acuerdo con las amplificaciones observadas, se designara un filogrupo

(Tabla 2). En el 2019, los autores descubrieron un nuevo filogrupo que puede partir del filogrupo F, se trata del filogrupo G. Para poder diferenciarlas entre sí, se realizó una búsqueda del gen *YbgD* (177pb) mediante PCR (Tabla 11, anexos).

Tabla 2. Genotipo de la PCR cuádruplex y asignación de los filogrupos para *E. coli* (Tomado de Clermont *et al.*, 2013).

Genotipo (PCR cuádruplex)				Filogrupo	Procedimiento
<i>arpA</i> (400 pb)	<i>chuA</i> (288 pb)	<i>yjaA</i> (211 pb)	<i>TspE4.C2</i> (152 pb)		
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+	B2	
-	+	-	+	B2	Debe ser confirmado con la búsqueda del gen <i>ibeA</i> ^a
+	-	+	-	A o C	Usar primers específicos para C, si es C+ es C, sino A
+	+	-	-	D o E	Usar primers específicos para E, si es E+ es E, sino D
+	+	-	+	D o E	Usar primers específicos para E, si es E+ es E, sino D
+	+	+	-	E o clado I	Usar primers específicos para E, si es E-, es clado I, confirmar usando primers de clado críptico ^b
-	-	+	-	Clado I o II	Confirmar usando primers de clado críptico ^b
-	(476) ^c	-	-	Clado III, IV o V	Confirmar usando primers de clado críptico ^b
-	-	-	+	Desconocido	Realizar MLST
-	-	+	+	Desconocido	Realizar MLST
+	-	+	+	Desconocido	Realizar MLST
+	+	+	+	Desconocido	Realizar MLST
-	-	-	-	Desconocido	Confirmar identificación de <i>E. coli</i> con primers <i>uidA</i> , si es positivo confirmar usando primers de clado críptico v/o MLST

Todas las amplificaciones se realizaron conforme a las indicaciones del autor (Tabla 3). Para ello, se preparó una mezcla de reacción que incluyó, de manera adicional, el uso de cuatro cebadores: *arpA*, *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2*, cada uno a una concentración de 0.75 µM.

El análisis electroforético de los productos de PCR se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1%, empleando Buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X. La corrida electroforética se efectuó a 100 V durante 30 minutos. Posteriormente, el gel se tiñó con Bromuro de Etidio (Sigma® Life Science) por 10 segundos y se enjuagó con agua tridestilada durante 30 minutos. La visualización de los geles se realizó utilizando el fotodocumentador de luz UV MiniBis Pro.

Tabla 3. Componentes empleados para la PCR cuádruplex

Reactivos	Concentración inicial	Volumen añadido por reacción (µl)	Concentración final
Agua esteril	-	5.7	-
Buffer de MgCl ₂	25mM	1.0	2.5mM
dNTPs	10µM	0.3	0.2mM
Oligonucleótido Forward 1	25µM	0.3	0.75 µM
Oligonucleótido Reverse 1	25µM	0.3	0.75 µM
Oligonucleótido Forward 2	25µM	0.3	0.75 µM
Oligonucleótido Reverse 2	25µM	0.3	0.75 µM
Oligonucleótido Forward 3	25µM	0.3	0.75 µM
Oligonucleótido Reverse 3	25µM	0.3	0.75 µM
Oligonucleótido Forward 4	25µM	0.3	0.75 µM
Oligonucleótido Reverse 4	25µM	0.3	0.75 µM
Taq DNA polymerase	5U/µl	0.1	0. 5U/µl
Templado de DNA	100ng/ µ	0.5	-
Volumen final		10	

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados y sus condiciones para realizar PCR cuádruplex (Clermont *et al.*, 2013).

Reacción de PCR	Iniciadores (5' --> 3')	Condiciones de la relación	Amplicon (pb)
Cuádruplex	arpA AceK.f: AACGCTATTCGCCAGCTTGC ArpA1.r: TCTCCCCATACCGTACGCTA	94°C 4 min. 1 ciclo 94°C 5 seg. 59°C 20 seg. 30 ciclos 72°C 30 seg. 72°C 5 min. 1 ciclo	400
	chuA chuA.1b: ATGGTACCGGACGAACCAAC chuA.2: TGCCGCCAGTACCAAAGACA		288
	yjaA yjaA.1b: CAAACGTGAAGTGTCAGGAG yjaA.2b: AATGCGTTCCTCAACCTGTG		211
	TspE4.C2 TspE4C2.1b: CACTATTCGTAAGGTCATCC TspE4C2.2b: AGTTTATCGCTGCGGGTCGC		152

5.3. Análisis fenotípico de 22 cepas de *E. coli* como probables AIEC

5.3.1. Técnica de cuantificación de biopelícula por método de tinción con Cristal Violeta

Para poder realizar la cuantificación de biopelícula, se siguió el método establecido por Stepanovic *et al.*, 2007, se analizaron las 22 cepas de *E. coli* seleccionadas del cepario mencionado. Como control se emplearon las cepas de *E. coli* uropatógena CFT073 y C7723.

A partir de un cultivo puro, se tomó una colonia aislada y se inoculó en 5ml de Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) el cual se cultivó a 37°C por 24hrs; luego de ese tiempo, el crecimiento bacteriano se ajustó a 0.5 en la escala de McFarland ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/ml) mediante el uso de un densitómetro marca Grant-Bio, posteriormente, se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta ajustar dicho precultivo a $\sim 1 \times 10^4$ UFC/ml. Se implementó el uso de una placa de Elisa de poliestireno de 96 pozos, del que se utilizaron tres pozos para obtener tres replicas por cepa o cultivo del tubo ajustado a $\sim 1 \times 10^4$ UFC/ml, en cada uno de los pozos se depositaron 180 μ L de caldo BHI y 20 μ L de la muestra y se incubó a 37°C por 24hrs. Para cada cepa se realizaron dos series (una para realizar la cuantificación de biopelícula y otra, para cuantificar proteína), cada serie se realizó por triplicado.

Para cuantificar la biopelícula, se tomó una de las microplacas y se retiró el medio de cultivo con una micropipeta, procurando no tocar las paredes del pozo para evitar el desprendimiento de la biopelícula. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 200 μ L de PBS 1X y se eliminó el excedente. Para fijar la biopelícula, se añadieron 200 μ L de metanol durante 15 minutos; luego se retiró y se dejó secar el remanente a temperatura ambiente. Después, se incorporaron 200 μ L de cristal violeta al 0.1% y se permitió su incubación a temperatura ambiente por 20 minutos. El colorante se eliminó y se efectuaron dos lavados con 200 μ L de agua estéril. Finalmente, la biopelícula teñida se solubilizó con 200 μ L de ácido acético al 30% y se incubó durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó la lectura de la D.O. en un lector de microplacas BioTek® utilizando el software KC Junior® de Biotek Systems con un

filtro de 620 nm. La cuantificación de biopelículas se obtuvo dividiendo la lectura de D.O. entre los mg totales de proteína.

5.3.1.1. Cuantificación de proteínas (método de Bradford)

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay), para lo cual se utilizó la segunda placa, misma que se inoculó de manera simultánea a la placa usada para la cuantificación de biopelícula. Este método, consiste en recuperar primer todo el contenido de cada pozo (200 μ L) después de la incubación cada uno por separado en un microtubo estéril de 1.5 mL y después lavar los pocillos con 200 μ L de $MgSO_4$ 10 mM. Lo siguiente fue centrifugar los microtubos a 13,000 rpm durante 5 minutos para obtener paquetes celulares; el sobrenadante se decantó y se añadieron nuevamente 200 μ L de $MgSO_4$ para repetir el proceso de centrifugación y decantación. Finalmente, el paquete celular obtenido se resuspendió en 200 μ L de PBS y se almacenó a -20 °C. Para la lectura de proteínas se realizó una curva de Albumina Sérica Bovina (BSA) en una microplaca de 96 pocillos estéril; por pocillo, se agregaron 155 μ l de agua inyectable, 5 μ l de la muestra y 40 μ l de reactivo Bradford. Simultáneamente, se realizó una curva de Albumina sérica bovina (BSA), como se muestra en la Tabla 5. La lectura de la D.O. con ayuda de un lector de microplacas de Elisa (Bio Tek Elx800 UV) a una absorbancia de 595nm. Cabe destacar que la concentración de BSA stock utilizada fue de 0.1mg/mL.

Tabla. 5. Preparación de la curva de BSA				
Pocillo	BSA μ g/ μ l H ₂ O	H ₂ O130	Reactivo Bradford	Concentración (μ g)
1	0 μ g/ μ l	160	40 μ l	0
2	0.5 μ g/5 μ l	155	40 μ l	0.5
3	1 μ g/ 10 μ l	150	40 μ l	1
4	2 μ g/ 20 μ l	140	40 μ l	2
5	3 μ g/ 30 μ l	130	40 μ l	3
6	4 μ g/ 40 μ l	120	40 μ l	4
7	5 μ g/ 50 μ l	110	40 μ l	5
8	6 μ g/ 60 μ l	100	40 μ l	6

5.3.2. Ensayos de Adherencia Bacteriana a células HeLa

Para este ensayo se siguió las bases del método establecido por Cravioto (1979) y adaptado a la línea celular HeLa, material celular que fue proporcionado por el Centro de Investigaciones Biomédicas del Oriente (CIBIOR) y el control fue la cepa C7223, que es una cepa que presenta hiper adherencia (Barrios-Villa, 2020). Para realizar el cultivo celular, se usaron botellas estériles de cultivo celular hechas de poliestireno con Medio Mínimo Esencial (MEM) (Sigma-Aldrich ®) el cual fue suplementado con L-arginina, L-asparagina, NaHCO_3 , piruvato, 10% de suero fetal bovino (FBS) (Thermo Fisher Scientific ®) y penicilina con estreptomicina llegando a una concentración de 1% del antibiótico con respecto al medio de cultivo; las placas se incubaron a 37°C con una tensión del 5% de CO_2 hasta el 70-80% de confluencia. Posteriormente para despegar la monocapa, se agregaron 5 mL de PBS como solución de lavado y 0.25% de tripsina y se llevó a incubar por 5 minutos a 37°C, posteriormente el contenido de la botella se pasó a un falcón para centrifugarlo a 1200 RPM por 10 minutos.

Se determinó un promedio de la cantidad de células HeLa crecidas mediante el conteo de celular en los 8 campos de una cámara de Neubauer, y se realizó una solución de las mismas para ajustarlas a 5×10^4 células/mL; se sembraron 500 μL de esta solución ajustada en los pozos de una placa de poliestireno 6 pozos fondo plano a la que se le incorporó un portaobjetos de dimensiones 25 mm x 75 mm, mismo que sirvió como superficie de crecimiento de la monocapa. La placa se incubó durante toda la noche a 37°C con una tensión del 5% de CO_2 . Las monocapas se lavaron con PBS estéril. Posteriormente, a cada pozo se le añadieron 40 μL de una suspensión bacteriana ajustada a 0.5 en la escala de McFarland (equivalente a 1×10^8 UFC/ml) mediante un densitómetro Grant-Bio. Esta suspensión se cultivó en un pozo que contenía medio MEM suplementado con 1% de manosa, y las placas se incubaron durante tres horas a 37 °C con una atmósfera del 5% de CO_2 . Después de la incubación, los pozos se lavaron dos veces con PBS. Las monocapas se fijaron con metanol durante diez minutos y posteriormente se tiñeron con Giemsa. El número de bacterias adheridas se cuantificó directamente al

microscopio en al menos 14 campos por pozo, y los resultados se expresaron como el promedio de bacterias por célula. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.3.3. Ensayos de Invasión Bacteriana a células HeLa

Esta técnica se realizó con modificaciones, pero siguiendo las bases del ensayo de protección a gentamicina de Labrec *et al.*, 1964 en el que se implementó el uso de la línea celular HeLa. El control que usamos se trata de C4435 altamente invasiva (Barrio-Villa, 2019). Las células HeLa se cultivaron con las mismas condiciones mencionadas en el apartado anterior, hasta que alcanzaron el 70-80% de confluencia. Posteriormente, para despegar la monocapa, se agregaron 5 mL de la solución de PBS 1X con 0.25% de tripsina; se incubaron por 10 minutos a 37°C, se centrifugo a 12000 RPM por 10 minutos, se descartó el exceso y el precipitado se resuspendió en medio MEM con 10% SFB. De esta suspensión celular, se realizó un conteo en una cámara de Neubauer considerando 8 campos y se promedió, de esta manera se ajustó la cantidad celular a 5×10^4 células/mL en una dilución; se sembraron 500 μ L de esta solución en una placa de poliestireno de 6 pozos fondo plano al que se le incorporó un portaobjetos de dimensiones 25 mm x 75 mm, mismo que sirvió para la superficie de crecimiento de la monocapa. La placa se incubó durante toda la noche a 37°C con una tensión del 5% de CO₂. Las monocapas se lavaron con PBS estéril dos veces. Posteriormente, a cada pozo se le añadieron 40 μ L de una suspensión bacteriana ajustada a 0.5 en la escala de McFarland (0.5 en la escala de McFarland (equivalente a 1×10^8 UFC/ml) mediante un densitómetro Grant-Bio. Esta suspensión se cultivó en un pozo que contenía 5 ml de medio MEM + 10% de SFB sin antibiótico e inicialmente las placas se incubaron durante 2 hrs y después, al cultivo se le agregó 16 μ g/ml de amikacina siguiendo parámetros establecidos por el CLSI, 2025 y se volvió a incubar por 1 hr. Después de tres horas de incubación, las monocapas infectadas se lavaron dos veces con 5ml de PBS estéril. Para la lisis celular se adicionaron 200 μ L de Triton X-100 al 0.1%. Por cada cepa se obtuvieron cinco muestras para plaqueo. La primera muestra correspondió a 100 μ L del medio MEM suplementado con 1% de manosa y antibiótico, recolectado tras las tres horas de incubación. La segunda muestra consistió en 100 μ L del sobrenadante obtenido después de los lavados con PBS. Las tres muestras

restantes se obtuvieron tras la lisis celular con Triton X-100 al 0.1% y correspondieron a diluciones seriadas 1:10, 1:100 y 1:1000 (10^{-1} – 10^{-3}). Todas las muestras se sembraron en placas de agar TSA para el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). Los ensayos se realizaron por triplicado.

5.3.4. Secuencia Tipo

A partir del estudio de Ibarra-Moreno (2024), el grupo de estudio logro obtener secuencias genómicas de seis cepas de *E. coli* provenientes de la colección inicial. La selección de estas cepas se basó en la interpretación de la distancia genética entre los aislados, determinada mediante un dendrograma construido a partir de los perfiles obtenidos por electroforesis en campo pulsado (PFGE) utilizando la enzima de restricción *XbaI*. Aunque el análisis se realizó sobre 36 cepas con resistencia a rifaximina y fenotipo BLEE+, solo seis cepas fueron seleccionadas para secuenciación CUA13, CUA16, CCB4, CCB11, CCH5 Y CUA69 (figura 6 y 7, ver anexos). Con la finalidad de determinar la secuencia tipo de estas 6 cepas, las secuencias genómicas se sometieron a análisis bioinformáticos mediante el portal de [uso libre PUB-MLST](https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_rmlst_seqdef_kiosk) (https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_rmlst_seqdef_kiosk).

VI. RESULTADOS

6.1. Determinación del filogrupo y la secuencia tipo de las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

6.1.1. Determinación de filogrupo

La determinación del filogrupo se realizó mediante PCR cuádruplex de acuerdo con el método descrito por Clermont *et al.* (2019) en un total de 66 cepas de *E.coli* aisladas de biopsias intestinales. El análisis permitió clasificar las cepas en 6 grupos: “A o C”, “B1”, “D o E”, “F”, “A”, “G” y dentro del Clado I o II; además, dos aislamientos no pudieron ser asignados a un filogrupo específico y se clasificaron como grupo desconocido (Figura 9).

El filogrupo predominante en la población analizada fue A o C, en el cual se concentró principalmente la mayor proporción de cepas aisladas del paciente 1 (Figura 10; Tabla 7-anexos). El segundo filogrupo con mayor representación correspondió al filogrupo F, en el que se agruparon mayoritariamente cepas provenientes del paciente 2 (Figura 11; Tabla 8-anexos).

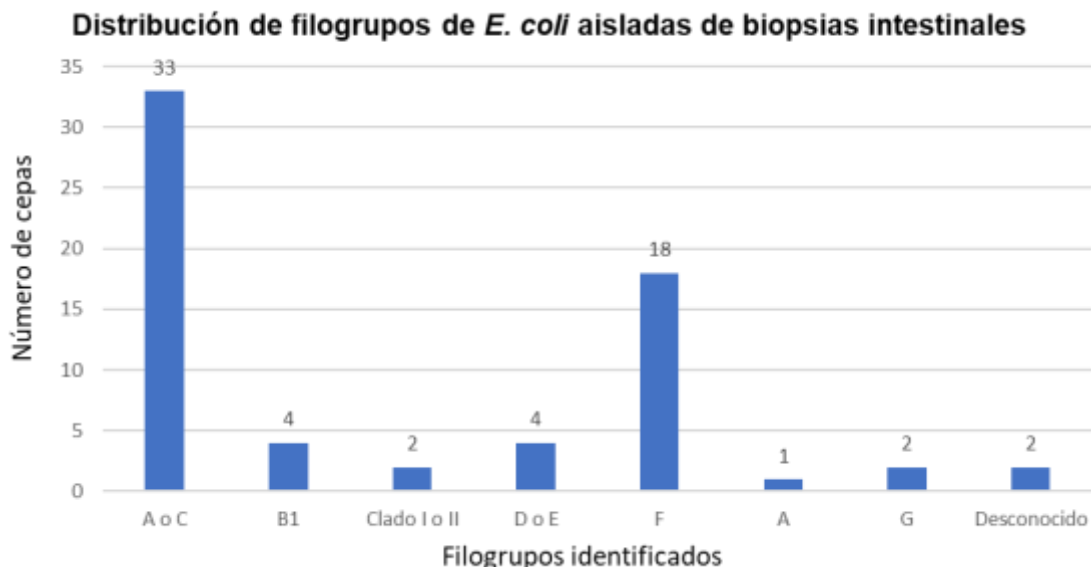


Figura 9. Distribución de los filogrupos de *Escherichia coli* aisladas de biopsias intestinales de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal. La clasificación se realizó mediante PCR cuádruplex (Clermont *et al.*, 2019) más la identificación del filogrupo G por medio del gen *ybgD* (177 pb). Los valores representan el número de cepas por filogrupo (n = 66).

Al analizar la distribución de los filogrupos por paciente, se identificó un predominio de un filogrupo específico en cada caso (Figuras 10, 11 y 12); sin embargo, todos los pacientes presentaron una diversidad variable en la presencia y abundancia de los distintos filogrupos.

En las cepas aisladas del paciente 1 se observó un predominio del filogrupo A o C; no obstante, también se identificaron cepas pertenecientes a los filogrupos D o E, B1, F, G y clado I o II, aunque en menor frecuencia. En conjunto, el paciente 1 presentó la mayor diversidad de filogrupos de entre los 3 pacientes analizados.

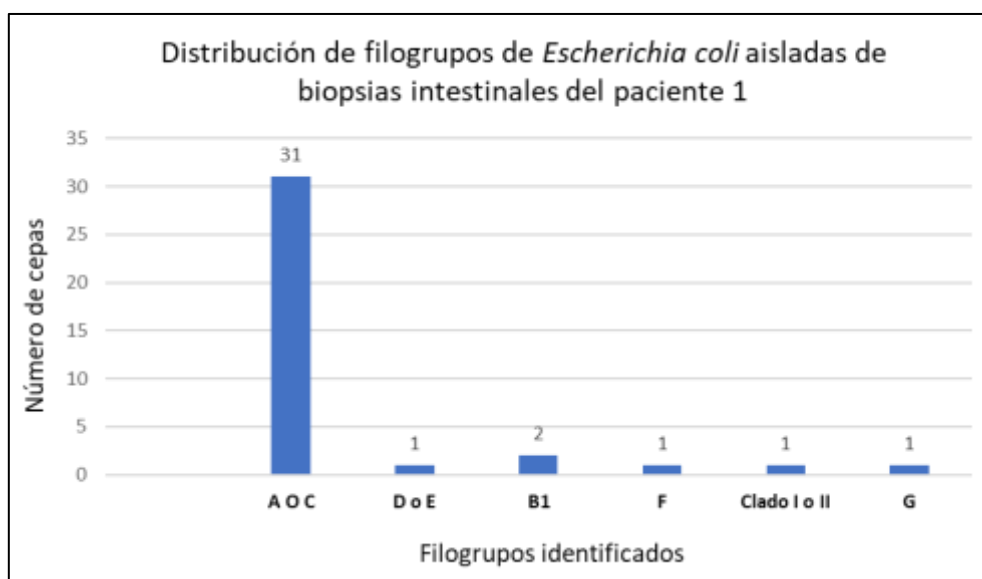


Figura 10. Distribución de filogrupos de 37 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias del paciente 1, con un diagnóstico de Colitis Ulcerosa Crónica Indeterminada (CUCI). La clasificación se realizó mediante PCR cuádruplex (Clermont *et al.*, 2019) más la identificación del filogrupo G por medio del gen *ybgD* (177 pb). Los valores representan el número de cepas por filogrupo.

En las cepas aisladas del paciente 2, diagnosticado con colitis crónica y diverticulitis, se analizaron un total de 22 aislamientos obtenidos a partir de biopsias intestinales (Tabla 1). En este grupo se observó una mayor prevalencia del filogrupo F, mientras que los filogrupos A o C, clado I o II, A y G se presentaron en menor frecuencia. En comparación con el paciente 1, el paciente 2 mostró una menor diversidad de filogrupos (Figura 11).

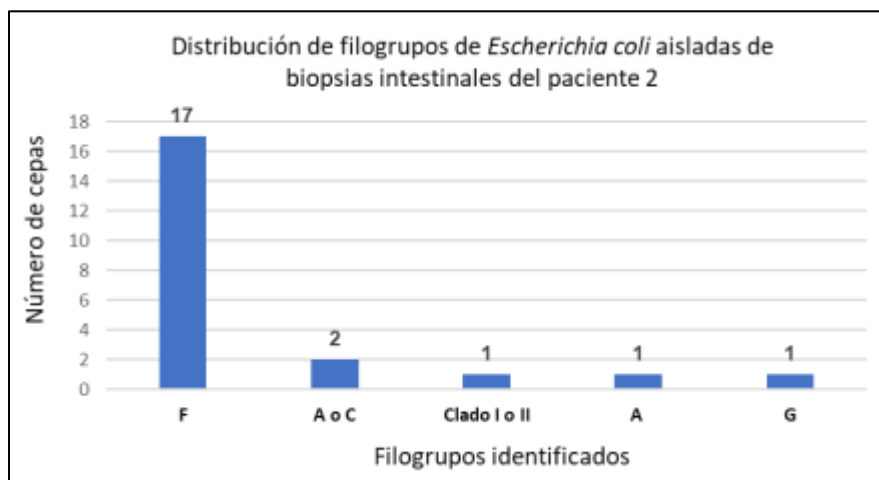


Figura 11. Determinación de filogrupos en 22 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias del paciente 2 con diagnóstico de Colitis Crónica y Diverticulitis. La clasificación se realizó mediante PCR cuádruplex (Clermont *et al.*, 2019) más la identificación del filogrupo G por medio del gen *ybgD* (177 pb). Los valores representan el número de cepas por filogrupo.

En las cepas aisladas del paciente 3 (figura 12), con diagnóstico de Colitis Ulcerosa Crónica Inespecífica, el filogrupo con mayor frecuencia correspondió a D o E, seguido del filogrupo B1. Adicionalmente, dos aislamientos no cumplieron con los criterios establecidos para llegar a una clasificación filogenética mediante el método *in vitro* descrito por Clermont *et al.* (2019) y fueron considerados como grupo desconocido. No obstante, una de estas cepas, identificada como CUA69, pudo ser secuenciada por el equipo de trabajo, por lo que, mediante un análisis bioinformático utilizando la plataforma Clermont typing, se determinó su pertenencia al filogrupo A (Figura 13).

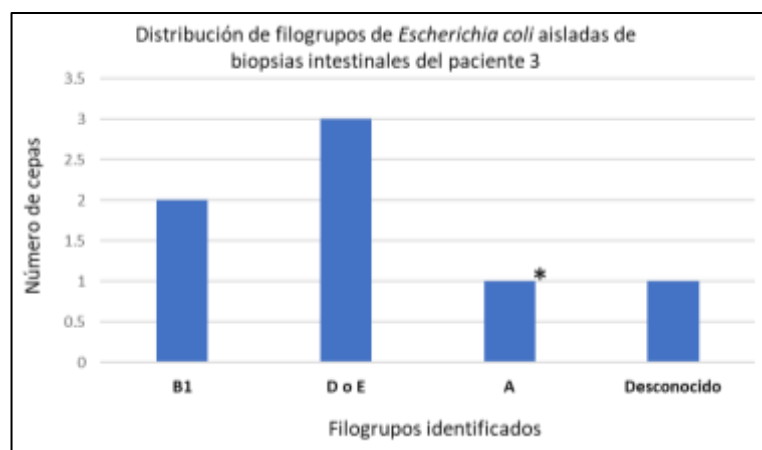


Figura 12. Determinación de filogrupos en 7 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias del paciente 3 con diagnóstico de CUCI. * Cepa identificada por bioinformática.

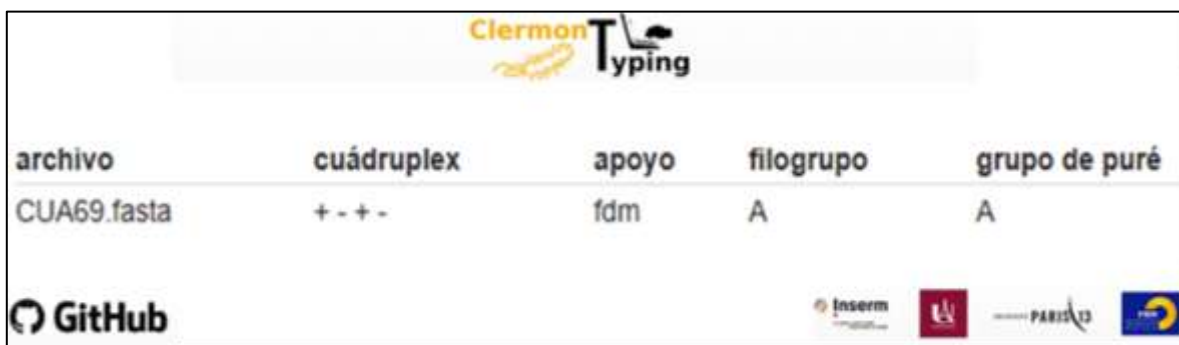


Figura 13. Esquema de análisis bioinformático para la determinación del filogrupo A de la cepa CUA69 aislada del paciente 3, realizado mediante la plataforma de Clermonttyping (<http://clermonttyping.iame-research.center/results.php?job=1767511714243>).

6.1.2. Análisis de Secuencia Tipo (ST)

Los resultados de la determinación de la ST de las seis cepas seleccionadas se resumen en la Tabla 6, en la cual se presentan las características generales de las cepas analizadas, así como los resultados de filogrupo y secuencia tipo determinados en el presente estudio. En conjunto, al analizar las 6 cepas, se identificaron tres secuencias tipo (ST): ST450, ST648 y ST206. Al analizar la distribución por paciente, se observó que las cepas aisladas de cada paciente compartieron una misma Secuencia Tipo y, de manera concordante, pertenecieron al mismo filogrupo.

Tabla 6. Características generales, filogrupo y secuencia tipo (ST) de cepas de <i>Escherichia coli</i> analizadas en el presente estudio						
Paciente	Diagnostico	Zona de biopsia	Tratamiento previo	Cepa	Filogrupo	ST
Paciente 1	CUCI	Colon descendente y transversal	Trimetoprim/sulfametoxazol	CUA16	A o C	ST450
				CUA13	A o C	ST450
Paciente 2	Colitis crónica y diverticulitis	Sigmoides	Ciprofloxacino y rifaximina	CCH5	F	ST648
				CCB11	F	ST648
				CCB4	F	ST648
Paciente 3	CUCI	Colon descendente	Metronidazol, ciprofloxacino y ceftriaxona	CUA69	A	ST206

La tabla presenta la información general de los aislamientos bacterianos analizados, así como los resultados de filogrupo y secuencia tipo (ST) determinados en este estudio para seis cepas seleccionadas con base en trabajo previo de Ibarra-Moreno (2025). Asimismo, se incluye el tratamiento previo recibido por los pacientes antes de la obtención de los aislados.

6.2. Determinación del fenotipo de formación de biopelícula, adherencia e invasión en cepas de *E. coli*

Los ensayos para la caracterización de fenotipos bacterianos, incluyendo la formación de biopelícula y los ensayos de adherencia e invasión a células HeLa, se realizaron en un conjunto de 22 cepas seleccionadas a partir del análisis de clonalidad previamente descrito por Ibarra-Moreno (Figuras 6y 7, ver anexos).

6.2.1. Ensayos de formación de biopelícula

Al comparar el índice de formación de biopelícula, se observó que las 22 cepas de *Escherichia coli* analizadas presentaron capacidad de formación de biopelícula, aunque con variaciones en la magnitud de este fenotipo. Al comparar los valores obtenidos con los de las cepas control de referencia (C7223 y CFT073), se identificaron cepas con índices de formación de biopelícula superiores, similares o inferiores a los controles (Figura 14). De manera particular, la cepa CUA9, aislada del paciente 1, presentó el valor más elevado de formación de biopelícula entre todas las cepas analizadas. En contraste, cepas como CUA39 (paciente 1), CCB6 (paciente 2) y CCB18 (paciente 2) mostraron valores comparables o inferiores a los controles.

En el caso del paciente 1, se analizaron ocho cepas (Figura 14). De estas, las cepas CUA10, CUA15, CUA31 y CUA16 presentaron índice de formación de biopelícula similares a los controles. Por otro lado, las cepas CUA23, CUA13 y, particularmente, CUA9 mostraron índices superiores de formación de biopelícula, destacando esta última como la cepa con mayor índice de producción dentro de este grupo y a nivel general.

Para el paciente 2, se evaluaron trece cepas (Figura 14). La mayoría presentó índices de formación de biopelícula superiores a los controles, con excepción de las cepas CCB6 y CCB18, cuyos valores fueron similares a los controles. La cepa CCB7 mostró el valor más alto dentro de este grupo, seguida, en orden descendente, por CCB11, CCB15, CCB1, CCB9, CCB16, CCH5, CCB4, CCB5 y CCH1, todas con valores por encima de los controles. Las cepas CCH1 y CCH5, aisladas a partir de

heces, también mostraron capacidad de formación de biopelícula ligeramente superior a la de las cepas control. Finalmente, la cepa CUA69, correspondiente al paciente 3, presentó un índice de formación de biopelícula superior al de las cepas control (Figura 14).

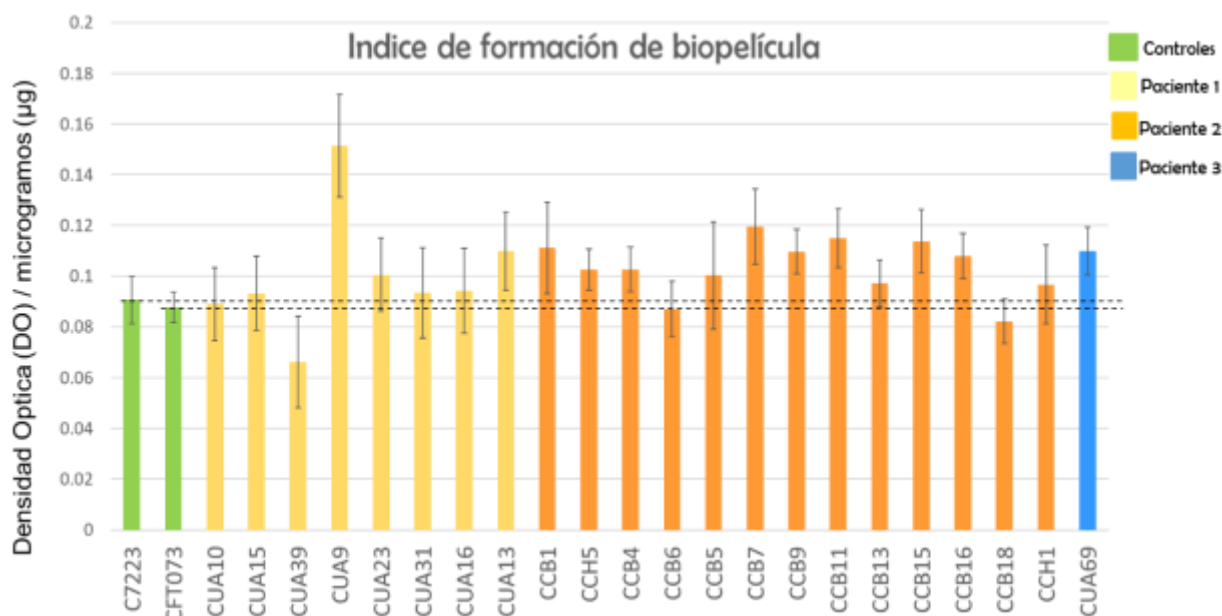


Figura 14. Cuantificación de la formación de biopelícula estática en 22 cepas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias intestinales de tres pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Los ensayos se realizaron por triplicado, con tres réplicas independientes por cepa. Los resultados se expresan como densidad óptica (DO/µg). Se incluyeron como cepas control C7223 y UPEC CFT073. Las cepas se agruparon por paciente y se representaron mediante códigos de color. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas independientes. La línea punteada indica el valor de formación de biopelícula de las cepas control.

6.2.2. Ensayos de adherencia bacteriana en células HeLa

Se evaluaron 22 cepas de *Escherichia coli*, mismas a las que se les determinó el fenotipo de formación de biopelícula. Para el ensayo de adherencia a células HeLa se utilizó la cepa C7223 como control positivo, así como un blanco experimental.

De manera general, ninguna de las 22 cepas analizadas mostró una capacidad de adherencia superior a la del control positivo. La cepa C7223 presentó adherencia

en el 100 % de las células evaluadas (100/100 células HeLa con ≥ 4 bacterias adheridas por célula), por lo que se consideró como referencia de máxima adherencia. En comparación, todas las cepas clínicas mostraron valores inferiores a este control. Entre las cepas analizadas, la cepa CUA23, aislada del paciente 1, presentó el valor más alto de adherencia; sin embargo, este se mantuvo por debajo del observado para la cepa control. Le siguieron, en orden descendente, las cepas CUA15 y CUA9. Al comparar los resultados entre pacientes, las cepas con mayores valores de adherencia correspondieron predominantemente al paciente 1 (figura 15).

Del paciente 1 (figura 15), se analizaron ocho cepas, de las cuales cinco presentaron capacidad de adherencia. Ninguna de ellas superó la adherencia observada en la cepa control C7223. Las cepas CUA9, CUA15 y CUA23 mostraron valores de adherencia superiores en comparación con las cepas de los pacientes 2 y 3. En contraste, las cepas CUA13 y CUA16 presentaron los valores más bajos dentro de este grupo, mientras que las cepas CUA10, CUA31 y CUA39 no mostraron adherencia detectable.

Del paciente 2, se evaluaron trece cepas, de las cuales únicamente cinco presentaron capacidad de adherencia. Los valores observados fueron inferiores a los del control positivo y, en general, menores que los de las cepas más adherentes del paciente 1. La cepa CCB7 presentó el mayor valor de adherencia dentro de este grupo, mientras que CCB11 mostró el valor más bajo entre las cepas adherentes. Las cepas CCH1 y CCH5, aisladas a partir de heces, no presentaron adherencia. Finalmente, la cepa CUA69 (paciente 3), no mostró capacidad de adherencia bajo las condiciones evaluadas (figura 15).

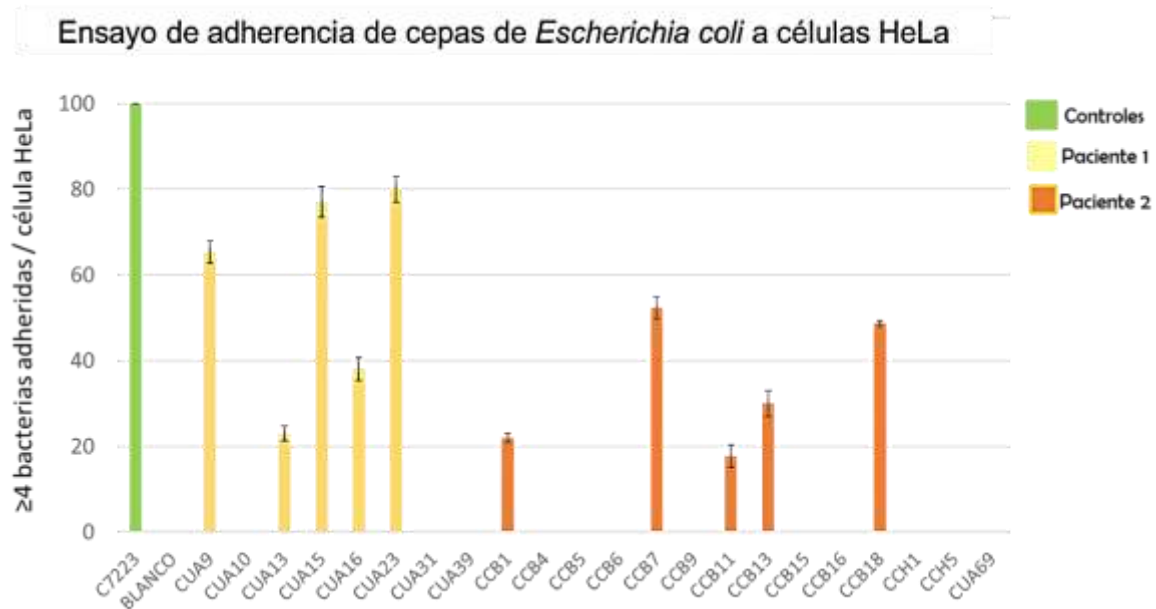


Figura 15. Ensayo de adherencia de 22 cepas de *Escherichia coli* aislada de biopsias de tres pacientes con EII a células HeLa. El conteo se realizó en un total de 100 células HeLa por cepa; únicamente se consideraron positivas aquellas células con ≥ 4 bacterias adheridas. El ensayo se realizó por triplicado. El control positivo fue C7223. Las cepas se agruparon por paciente y se representaron mediante códigos de color. La cepa CUA69 que representa al paciente 3, no presentó adherencia por lo que no se encuentra en el código de color.

Complementario a la cuantificación de la adherencia celular, se obtuvieron micrografías con el fin de evaluar los patrones de adherencia bacteriana a células HeLa. En la Figura 16 se muestran micrografías representativas de la cepa control, el blanco y las cinco cepas adherentes aisladas del paciente 1 (CUA9, CUA13, CUA15, CUA16 y CUA23). La cepa control C7223 presentó un patrón de adherencia agregativa abundante y homogénea, mientras que el blanco no mostró bacterias adheridas.

Al comparar las repeticiones por cepa, se observó que algunos aislamientos mantuvieron un patrón de adherencia similar entre repeticiones. La cepa CUA9 mostró un patrón de adherencia difusa consistente, aunque con un número limitado de bacterias adheridas por célula. De manera similar, las cepas CUA13 y CUA15 presentaron un patrón de adherencia difusa constante en las tres repeticiones analizadas. En contraste, en otras cepas se evidenció heterogeneidad en la

distribución bacteriana entre repeticiones, lo que sugiere variabilidad fenotípica en la interacción con las células HeLa. Las cepas CUA16 y CUA23 presentaron en la primera repetición un patrón de adherencia difusa, mientras que en repeticiones posteriores se observó una disposición compatible con adherencia agregativa. En conjunto, estos resultados indican que el patrón de adherencia fue consistente entre repeticiones en algunas cepas, y en otras mostró variabilidad (Figura 16).

Por otra parte, en la Figura 17 se presentan micrografías correspondientes a la cepa control, el blanco y las cinco cepas adherentes aisladas del paciente 2 (CCB1, CCB7, CCB11, CCB13 y CCB18). Al igual que en el paciente 1, la cepa control C7223 mantuvo un patrón de adherencia agregativa, mientras que el blanco no presentó bacterias adheridas. La cepa CCB1 mostró un patrón de adherencia localizada; sin embargo, posteriormente, en otras repeticiones se observó una disposición compatible con adherencia agregativa. La cepa CCB7 presentó un patrón de adherencia agregativa, aunque con un número limitado de bacterias adheridas a la superficie celular. La cepa CCB11 exhibió un patrón de adherencia difusa, el cual se mantuvo homogéneo entre las repeticiones analizadas, aunque con una menor densidad de bacterias adheridas. Por su parte, la cepa CCB13 presentó un patrón de adherencia agregativa consistente entre repeticiones. Finalmente, en la cepa CCB18 se observó un patrón de adherencia localizada, el cual se mantuvo homogéneo en las repeticiones evaluadas.

En conjunto, el análisis de las micrografías reveló la presencia de distintos patrones de adherencia bacteriana, incluyendo adherencia difusa, localizada y agregativa, tanto en las cepas aisladas del paciente 1 como del paciente 2. Asimismo, se observó que algunas cepas mantuvieron un patrón de adherencia constante entre repeticiones, mientras que otras presentaron variabilidad en la distribución bacteriana, lo que evidencia heterogeneidad fenotípica en la interacción de *E. coli* con las células HeLa.

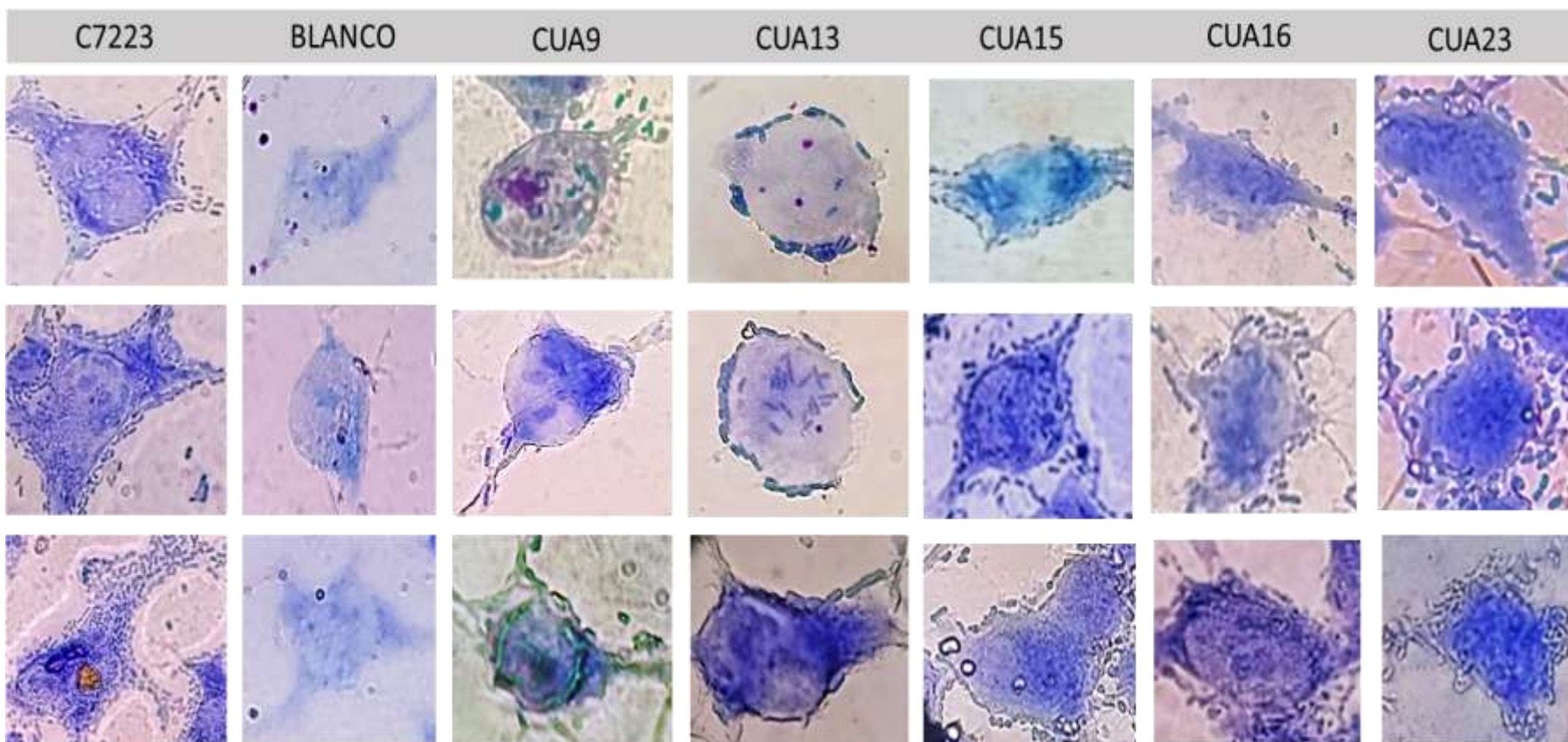


Figura 16. Ensayo de adherencia a células HeLa de cepas seleccionadas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias intestinales del paciente 1 con diagnóstico de CUCI. Las micrografías muestran la interacción bacteria–célula HeLa en un conjunto de ocho cepas evaluadas, incluyendo un control positivo (C7223) y un control negativo (blanco), observadas mediante microscopía óptica con objetivo de inmersión (100×). En cinco de las cepas analizadas se observaron patrones de adherencia bacteriana a la superficie celular; dichas cepas corresponden a CUA9, CUA13, CUA13, CUA15, CUA16 y CUA23. Cada ensayo se realizó por triplicado.

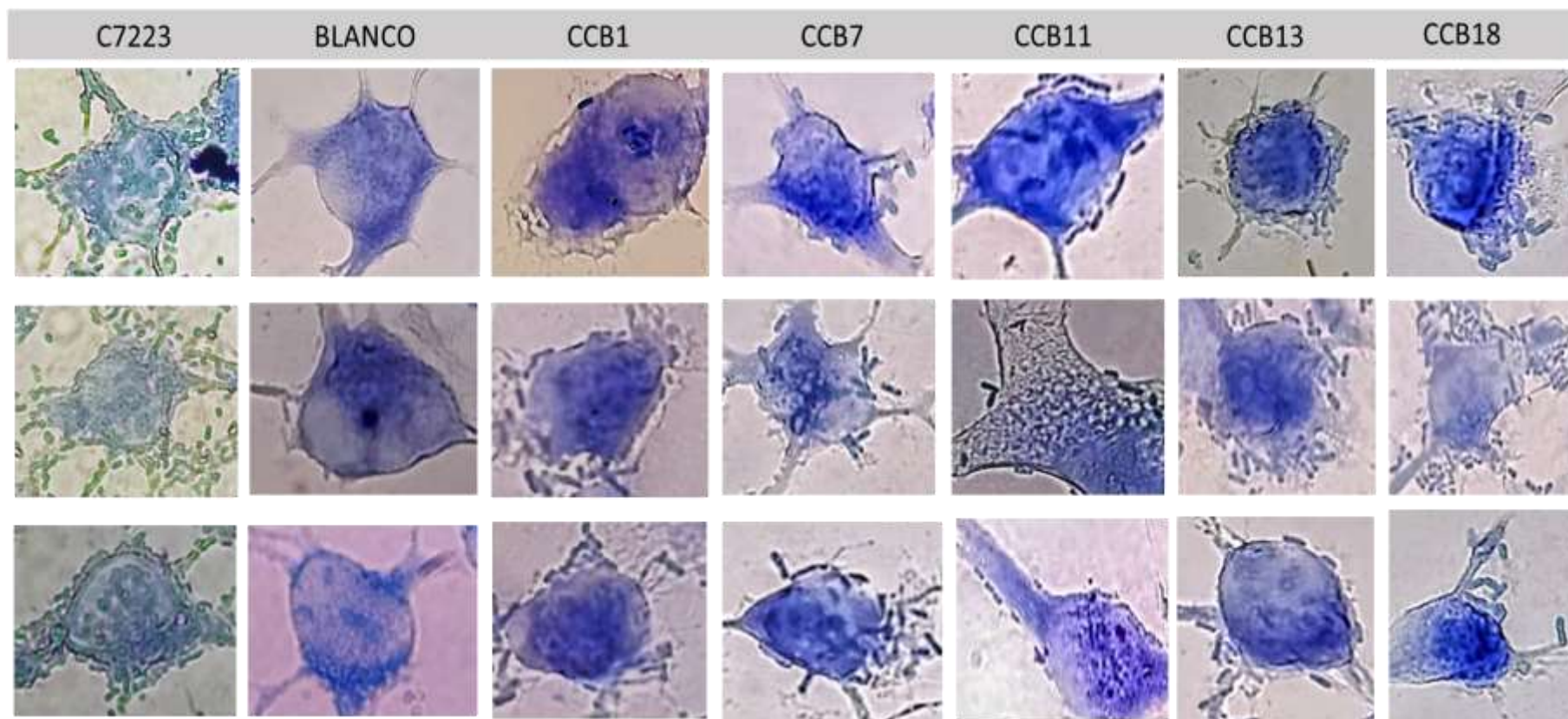


Figura 17. Ensayo de adherencia a células HeLa de cepas seleccionadas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias intestinales del paciente 2 con diagnóstico de colitis crónica y diverticulitis. Las micrografías muestran la interacción bacteria–célula HeLa en un conjunto de **trece cepas evaluadas**, incluyendo un control positivo (C7223) y un control negativo (blanco), observadas mediante microscopía óptica con objetivo de inmersión (100×). En las cepas analizadas se observó adherencia bacteriana a la superficie celular. Cada ensayo se realizó por triplicado.

6.2.3. Ensayo de invasión bacteriana en células HeLa

Para el ensayo de invasión se emplearon las 10 cepas que fueron positivas a adherencia celular, las cuales son: CUA9, CUA13, CUA15, CUA16 Y CUA23 (del paciente 1) y CCB1, CCB7, CCB11, CCB13 Y CCB18 (del paciente 2). Los resultados del ensayo de invasión en estas 10 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias intestinales de dos pacientes con EII, se muestran en la Figura 18. La invasión bacteriana se determinó mediante el ensayo de protección con antibiótico (amikacina), seguido de lisis celular y cuantificación por conteo de unidades formadoras de colonia (UFC/placa). La mayoría de las cepas presentó valores no detectables (ND) o por debajo del límite de cuantificación del ensayo (<LQ), definido como <30 UFC por placa, lo que indica una capacidad invasiva mínima o ausente. Únicamente el control invasivo C4435 y la cepa CUA16, aislada del paciente 1, mostraron valores cercanos al límite de cuantificación (<LQ), sugiriendo una capacidad invasiva limitada pero detectable. El blanco no presentó crecimiento bacteriano, confirmando la ausencia de contaminación. En conjunto, estos resultados indican que las cepas de *E. coli* analizadas no exhiben un fenotipo invasivo robusto en el modelo de células HeLa bajo las condiciones evaluadas.

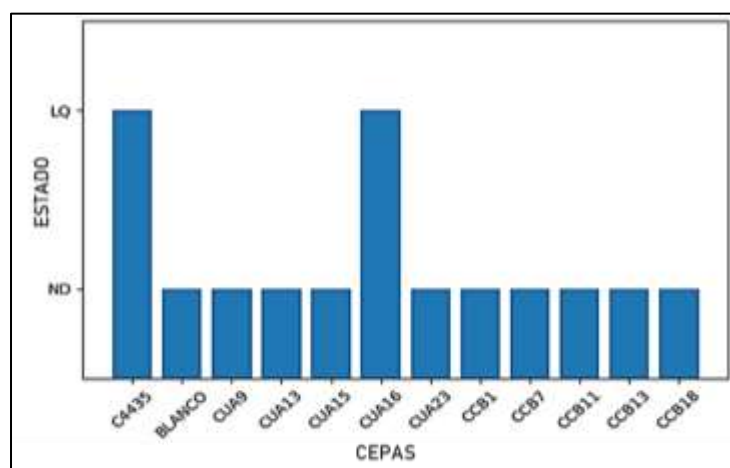


Figura 18. Ensayo de invasión en diez cepas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias intestinales de dos pacientes con (EII), seleccionadas por presentar capacidad de adherencia a células HeLa. La invasión bacteriana se cuantificó mediante el conteo de unidades formadoras de colonia por placa (UFC/placa). Los resultados se expresan como valores No Detectables (ND) o por debajo del Límite de Cuantificación del método (<LQ), definido como conteos inferiores a 30 UFC por placa. La cepa control: C4435. Las cepas CUA9, CUA13, CUA15, CUA16 y CUA23 corresponden al paciente 1, mientras que CCB1, CCB7, CCB11, CCB13 y CCB18 corresponden al paciente 2.

VII. DISCUSIÓN

A lo largo del tiempo, se ha desarrollado un sistema ampliamente reconocido de clasificación filogenética de *Escherichia coli*, el cual actualmente incluye los filogrupos A, B1, B2, C, D, E, F y G, además de clados crípticos. Este sistema se ha consolidado como una herramienta estandarizada para la clasificación filogenética de cepas de *E. coli* (Clermont *et al.*, 2000; 2013; 2019). La ampliación progresiva del esquema, que incorporó los filogrupos C, E, F y G, así como los clados crípticos, ha permitido mejorar la precisión en el análisis de colecciones clínicas y ambientales, reduciendo errores de clasificación previamente reportados.

En el presente estudio, la determinación de filogrupos en una colección de 66 cepas de *E. coli* aisladas a partir de biopsias intestinales de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) permitió la asignación de seis grupos filogenéticos: “A o C”, “B1”, “D o E”, “F”, “A” y “G”, además de un grupo clasificado como “Clado I o II”.

Cabe destacar que la clasificación filogenética no pretende ser una herramienta diagnóstica clínica directa; sin embargo, resulta útil para diferenciar cepas comensales de cepas potencialmente patógenas, particularmente aquellas asociadas a infecciones extraintestinales. En este sentido, se ha documentado que los filogrupos B2 y D se encuentran asociados con la mayoría de las infecciones extraintestinales, como infecciones del tracto urinario, meningitis neonatal y sepsis (Ming-Cheng *et al.*, 2023). En contraste, las cepas comensales se agrupan predominantemente en el filogrupo A (Clermont *et al.*, 2000; 2013), el cual incluye cepas comúnmente residentes de la mucosa gastrointestinal (Pokharei *et al.*, 2023) y que se ha asociado con la ausencia de factores de virulencia (Millán *et al.*, 2014).

Bajo este contexto, resulta fundamental una determinación precisa de los filogrupos agrupados como “A o C”, “D o E” y “Clado I o II”, particularmente del grupo “A o C”, ya que fue el más prevalente en este estudio. Esta precisión es relevante para esclarecer si dichas cepas corresponden a linajes comensales o si pudieran representar cepas con potencial patogénico asociadas al diagnóstico de EII, especialmente considerando que algunas de ellas demostraron, durante los

ensayos fenotípicos, capacidad de formación de biopelícula y adherencia celular. La correcta asignación filogenética es clave, ya que la tipificación por filogrupos es una herramienta valiosa en estudios clínicos, epidemiológicos y evolutivos, al permitir correlacionar el origen clínico, el hábitat y el potencial de virulencia, aunque no sustituye la caracterización basada en genes de virulencia ni en fenotipos bacterianos.

Otra razón que refuerza la importancia del análisis filogenético en cepas aisladas de biopsias intestinales de pacientes con EII es que se ha documentado una proliferación de enterobacterias en este tipo de pacientes. Asimismo, la EII se ha vinculado con un patotipo particular de *E. coli* denominado *adherent-invasive E. coli* (AIEC) (Baldelli *et al.*, 2020). Este patotipo se ha encontrado con mayor frecuencia dentro del filogrupo B2, aunque también ha sido reportado en los filogrupos A, B1, D y F (Palmela *et al.*, 2017; Camprubi *et al.*, 2020).

En relación con los demás filogrupos identificados en este trabajo, se ha descrito que el filogrupo B1 incluye tanto cepas comensales como cepas pertenecientes al patotipo EHEC. Por su parte, los filogrupos D y E han agrupado principalmente cepas InPEC, mientras que las cepas genéticamente diversas, pero fenotípicamente indistinguibles se agrupan en el clado críptico I (Pokharei *et al.*, 2023). El filogrupo F, por otro lado, ha sido documentado como un grupo que alberga cepas comensales del intestino de animales (Cabrera-González *et al.*, 2022); sin embargo, también se ha reportado su asociación con cepas UPEC multirresistentes en aislados clínicos humanos (Ming-Cheng *et al.*, 2023), así como con aislados avícolas capaces de formar biopelícula (Zhuge *et al.*, 2021), algo que se correlaciona con nuestro estudio ya que también observamos en el paciente 2, con filogrupos F, los cuales presentaron mayor producción de biopelícula; además, el filogrupo F se ha asociado con potencial zoonótico para causar enfermedad en humanos (Zhuge *et al.*, 2021). En el presente estudio, resulta relevante destacar que el filogrupo F mostró una alta prevalencia en los aislamientos obtenidos de las biopsias del paciente 2, diagnosticado con colitis crónica y diverticulitis.

En cuanto al filogrupo G, este corresponde a un linaje filogenético independiente, estrechamente relacionado con el filogrupo F, que agrupa cepas previamente clasificadas de manera errónea dentro de este último. Su incorporación al esquema filogenético permitió mejorar la resolución en la clasificación de aislamientos clínicos, animales y ambientales, sin que hasta el momento se asocie de manera directa con un patotipo específico (Clermont *et al.*, 2019).

Adicionalmente, los resultados del presente estudio evidenciaron una mayor prevalencia de un filogrupo específico en los aislamientos obtenidos de cada paciente “A o C” del paciente 1, “F” en el paciente 2 y “D o E” en aislados del paciente tres, lo que sugiere la dominancia de linajes filogenéticamente relacionados dentro de un mismo hospedador, más que una distribución aleatoria de cepas. Este patrón concuerda con estudios previos en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, en los que se ha demostrado que determinadas cepas de *Escherichia coli* pueden colonizar de manera persistente la mucosa intestinal y presentar clonalidad intra-paciente, fenómeno asociado a procesos de adaptación al ambiente intestinal inflamado (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2004). En este contexto, la prevalencia de un filogrupo por paciente podría reflejar una selección favorecida por características propias del hospedador y del microambiente intestinal, más que un efecto directo del filogrupo *per se*. Esta observación se ve reforzada por los resultados de secuencia tipo (ST), ya que en algunos aislados de biopsias de pacientes con EII, se identificaron aislamientos que compartían el mismo ST, lo que apoya la presencia de linajes clonales predominantes dentro de cada individuo.

Como se observa, no es posible asumir de manera concluyente una asociación directa entre la asignación de filogrupo y el carácter patogénico de las cepas de *E. coli*, particularmente en el caso del patotipo AIEC. No obstante, el panorama filogenético documentado proporciona un punto de partida relevante para el análisis de estas asociaciones, especialmente considerando que aún son limitados los estudios que abordan de forma conjunta la relación entre filogrupos y fenotipos bacterianos en los filogrupos C, E, F y el clado I (Ming-Cheng *et al.*, 2023). En este sentido, la identificación de filogrupos como F, C y E resulta fundamental para

caracterizar la diversidad de *E. coli* y su impacto potencial en la salud pública y animal (Ming-Cheng *et al.*, 2023; Sroithongkham *et al.*, 2024). Un ejemplo de lo anterior es la cepa CUA69, la cual fue determinada en el filogrupo A, y aunque se esperaría que fuera comensal, ésta presenta el fenotipo de formación de biopelícula y de adherencia celular y es ST206, la cual se ha reportado como una cepa que codifica genes como *bla*_{CTXM15} y *bla*_{CTXM27} los cuales codifican β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) del grupo CTX-M y confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación, representando un riesgo clínico relevante, además de lo anterior, ST206 se ha asociado con causar enfermedades como diarrea (Funmilola *et al.*, 2020).

En cuanto a las demás ST encontradas fueron ST450 en dos cepas aisladas de biopsias del paciente 1; ST648 en tres cepas aisladas de biopsias del paciente 2.

ST450, es un linaje bacteriano reconocido por encontrarse comúnmente asociado a la resistencia antibióticos B-lactámicos con producción de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), y esto cuadra con el perfil de éstas cepas, CUA16 Y CUA13, pertenecientes al paciente 1, ya que un estudio previo de Maldonado-Galvez (2023), encontró perfiles BLEE+ en estas cepas (Hervé Jacquier *et al.*, 2022) y en el estudio de Jamboraba (2015) fue encontrada en el filogrupo A, mientras que los resultados de nuestro trabajo, se agrupó en “A o C”.

Para la ST648, llama la atención que se identificaron tres cepas CCB4, CCB11 y CCH5 (esta última aislada de heces), a partir del paciente 2, ya que se ha documentado que es un linaje de importancia clínica epidemiológica porque suele ser nosocomial (Piekar *et al.*, 2023) y se vincula con ser causante de enfermedades crónicas en pacientes con fibrosis quística (Voronina *et al.*, 2025), además presenta resistencia extrema a los fármacos β -lactámicos (Piekar *et al.*, 2023); cabe destacar que en nuestro trabajo, éstas cepas son del filogrupo F, presentaron formación de biopelícula y solo CCB11 presentó adherencia celular.

El fenotipo de formación de biopelícula es un fenotipo documentado e implícito para la determinación del patotipo AIEC (Palmella *et al.*, 2017; Camprubí *et al.*, 2020; Baldelli *et al.*, 2021; Zangara *et al.*, 2022); en los aislados analizados, todas las

cepas formaron biopelículas, algunas incluso por encima de la producción detectada en los controles positivos C7223 Y CFT073. De acuerdo con análisis de Barrio-Villa (2020) C7223, pudiera tratarse de una posible AIEC aislada a partir de muestras de pacientes clínicamente sanos, mientras que CFT073 representa a una cepa UPEC, en el que se describe la formación de biopelículas durante su patogénesis en el tracto urinario (Tiaqui-Zhang *et al.*, 2024). UPEC ha sido relacionada con AIEC, ya que de acuerdo con Brzuszkiewicz *et al.*, (2006), la cepa LF82 (cepa AIEC de referencia) comparte un gran número de genes de virulencia con cepas UPEC y concluyen que AIEC es genéticamente más cercano a ExPEC (especialmente UPEC) que a *E. coli* comensales. Cuando nos referimos a la formación de biopelícula, sabemos que en cepas uropatógenas de *Escherichia coli* (UPEC), la formación de biopelículas se ha asociado principalmente con genes de adhesión y de producción de la matriz extracelular, destacando las fimbrias tipo 1 (*fimA* y *fimH*), las fimbrias P (*papA*, *papC*, *papG*) y S/F1C (*sfa/foc*), así como el gen *flu* (antígeno 43) y el sistema *csg*, los cuales favorecen la adhesión inicial, la autoagregación bacteriana y la maduración del biofilm (Danese *et al.*, 2000; Beloin *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2003; Flores-Mireles *et al.*, 2015; Barnhart y Chapman, 2006). De manera similar, en cepas *Escherichia coli* adherente-invasivo (AIEC) se han descrito determinantes compartidos, particularmente las fimbrias tipo 1 (*fimA/fimH*), variantes específicas de *fimH* asociadas a la unión a receptores como CEACAM6, así como *flu* y el sistema *csg*, los cuales contribuyen a la adhesión, agregación y persistencia en la mucosa intestinal inflamada (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Barnich *et al.*, 2007; Dreux *et al.*, 2013; Chassaing *et al.*, 2011). Adicionalmente, AIEC presenta sistemas de captación de hierro como *chuA* y *fyuA*, que favorecen la supervivencia y estabilidad del biofilm en ambientes intestinales inflamados, reforzando la similitud funcional entre ambos patotipos y apoyando la hipótesis de un trasfondo genético y fenotípico compartido (Miquel *et al.*, 2010; Palmela *et al.*, 2017).

Algunas cepas del paciente 1 y 2, que presentan un fenotipo mayor de formación de biopelícula, pudieran sugerir diferencias en la regulación de genes implicados en la adhesión, autoagregación y producción de la matriz extracelular. No se ha

determinado una cuantificación sobre el hecho de cuánta biopelícula se forma, si es de formación débil, fuerte o moderada lo cual se relacione o indique que se trata de una cepa AIEC, solo se acepta la presencia de este fenotipo como parte de la clasificación fenotípica; sin embargo, el fenotipo de formación de biopelícula, no confiere que se trate de AIEC, sino que los fenotipos (adherencia, biofilm, invasión de células y sobrevida en macrófagos) deben interpretarse en conjunto (Palmella *et al.*, 2017).

Aunque la capacidad de formar biopelícula tenga que ver con la capacidad de adherirse a superficies, la adherencia a células eucariotas funciona mediante una interacción específica bacteria-célula que depende de receptores celulares.

Con respecto a los resultados de adherencia bacteriana, ninguna fue tan adherente como la cepa control C7223, una cepa AIEC determinada por Barrios-Villa el cual menciona que, durante los ensayos realizados, C7223, fue la que presentó mayores niveles de adherencia (60.4 bacterias por célula); en nuestro caso, fue el mismo, también fue la cepa con mayor adherencia en comparación a los aislados.

Adicionalmente, no todas las cepas aisladas de un mismo hospedero presentaron capacidad de adherencia a células HeLa, lo que sugiere la existencia de heterogeneidad fenotípica intra-paciente. Este fenómeno ha sido previamente descrito en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, en los cuales cepas de *Escherichia coli* presentan diferencias en su potencial de adhesión y colonización, probablemente como resultado de procesos de adaptación al microambiente intestinal (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2004). Asimismo, la adherencia bacteriana depende de la expresión regulada de adhesinas específicas, como las fimbrias tipo 1, cuya expresión puede variar entre cepas relacionadas o incluso entre subpoblaciones de una misma cepa, contribuyendo a la variabilidad observada en los ensayos de adherencia (Barnich *et al.*, 2007; Martínez-Medina *et al.*, 2009).

En cuanto a los patrones de adherencia observados en las micrográficas obtenidas durante el ensayo, se identificaron tres tipos principales: adherencia localizada,

adherencia difusa y adherencia agregativa, los cuales han sido descritos clásicamente para *Escherichia coli* en modelos celulares epiteliales (Cravioto *et al.*, 1979), El patrón de Adherencia localizada es característica del patotipo EPEC; Adherencia difusa de DAEC y Adherencia agregativa de EAEC.

En *E. coli*, se ha reportado que la expresión de estos patrones no siempre es completamente reproducible entre repeticiones, ya que puede verse influenciada por factores como la regulación diferencial de adhesinas, las condiciones experimentales y la variabilidad fenotípica entre cepas, incluso aquellas genéticamente relacionadas (Nataro y Kaper, 1998; Martinez-Medina *et al.*, 2009). En el caso de AIEC, los patrones de adherencia observados en ensayos celulares no son uniformes ni exclusivos, ya que pueden manifestarse como adherencia difusa o agregativa, e incluso variar entre experimentos. Esta heterogeneidad refleja la plasticidad fenotípica de AIEC y la regulación dinámica de adhesinas como las fimbrias tipo 1, por lo que dichos patrones deben interpretarse de manera complementaria a otros criterios fenotípicos clave, como la invasión celular y la supervivencia intracelular en macrófagos (Camprubí *et al.*, 2020).

Finalmente, en el caso de los ensayos de invasión bacteriana en células HeLa, no se logró observar que las 10 cepas que presentaron adherencia, tengan la capacidad de invadir, ya que, en los resultados, el conteo de UFC por placa, fue muy bajo o nulo para cuantificarlo.

No obstante, durante la ejecución del ensayo se identificó una limitación metodológica importante, ya que el protocolo inicial no contemplaba un paso que permitiera confirmar de manera directa la eliminación de bacterias extracelulares por efecto del antibiótico. Al evaluar este aspecto mediante el cultivo del medio DMEM inoculado y tratado con antibiótico durante 1 h, se observó un crecimiento bacteriano abundante en los primeros ensayos (Figura 19 y 20, anexos). Este hallazgo fue inesperado, considerando que las cepas analizadas presentaban previamente un perfil de sensibilidad al antibiótico (Maldonado-Gálvez, 2023), lo que sugiere que el medio DMEM, por su composición altamente enriquecida, podría favorecer la supervivencia bacteriana tras el tratamiento antibiótico.

Ante esta observación, fue necesario ajustar el diseño experimental mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la modificación de la concentración de amikacina a 16 µg/mL, de acuerdo con las recomendaciones del CLSI (2025), además de establecer un periodo de infección previo de 3 h sin antibiótico. Con estas modificaciones, el crecimiento bacteriano en el medio extracelular se redujo de forma considerable, lo que sugiere una eliminación más eficiente de bacterias no internalizadas y refuerza la necesidad de incorporar controles adicionales en los ensayos de invasión para una interpretación más confiable de los resultados.

Además, es importante considerar que el uso de un medio altamente enriquecido como DMEM podría influir en la supervivencia bacteriana posterior al tratamiento antibiótico. Se ha descrito que ambientes ricos en nutrientes favorecen la recuperación metabólica de bacterias sometidas a estrés por antibiótico, particularmente en el caso de antibióticos bactericidas dependientes del estado metabólico, como los aminoglucósidos (Allison *et al.*, 2011; Brauner *et al.*, 2016). En este sentido, la composición nutricional del DMEM podría contribuir a la viabilidad residual de bacterias tras la eliminación del antibiótico, lo cual ha sido señalado previamente como una limitación inherente a los ensayos de protección con antibiótico realizados en sistemas celulares eucariotas (Ortega *et al.*, 2016).

Sin embargo, agregamos otro paso mediante el cultivo de la muestra en placa, para corroborar que no existieran bacterias externas antes de la lisis de la línea celular con tritón X-100, por ello se sembraron 100 microlitros de PBS que se tomaron luego de dos lavados con 2ml de PBS, y al plaquearla, aun crecían colonias, por lo que se consideró mejorar los lavados agregando 5ml de PBS en vez de 2ml. Modificando estos lavados, se eliminó el crecimiento de las bacterias extracelulares sugiriendo que no existían bacterias externas previo a la lisis (Figura 19 y 20, anexos).

En la Figura 18 se presentan los datos correspondientes al conteo de colonias bacterianas, obtenido a partir del plaqueo de 100 µL de la muestra recuperada tras la lisis celular y diluida a 10^{-1} . En esta figura, los resultados se reportan como No Detectables (ND) o por debajo del Límite de Cuantificación ($< LQ$), ya que el número

de colonias observadas fue inferior al umbral establecido para una cuantificación confiable. Cabe destacar que, para una estandarización óptima del conteo en placa, se considera adecuado un rango mínimo de 30 UFC por placa. Los recuentos bacterianos confiables en placa se consideran dentro del rango de 30 a 300 UFC por placa; valores inferiores a este límite presentan una mayor variabilidad estadística y se reportan como por debajo del límite de cuantificación (ISO, 2017; FDA, 2020; APHA, 2017)

Por lo anterior, observamos que es necesario anexar pasos que involucren la confirmación de que no existan bacterias resistentes de manera exterior antes de realizar la lisis de las células eucariotas, si de confirmar invasión se trata.

En cuanto a la selección del antibiótico, de acuerdo a los resultados de Maldonado-Galvez (2023), se sabe que éstas cepas no poseen resistencia a amikacina, además esta actúa a nivel de la subunidad ribosomal 30S bacteriana, provocando alteraciones conformacionales en el ARNr 16S que afectan el reconocimiento correcto codón-anticodón y la translocación del ARNt, lo que conduce a la inhibición de la traducción y de la síntesis proteica, por lo que no representaba un riesgo para la línea celular.

Es importante destacar que la línea celular empleada puede influir en la caracterización del patotipo *Escherichia coli* adherente-invasivo (AIEC), ya que los estudios fundacionales que definieron este patotipo utilizaron principalmente líneas celulares epiteliales de origen intestinal, como Caco-2 y HT-29, así como modelos de macrófagos, en los cuales se demostró la capacidad de invasión, supervivencia y replicación intracelular bacteriana. En contraste, líneas celulares como HeLa han sido utilizadas históricamente como modelos generales para la evaluación de la adherencia e invasión bacteriana, pero no constituyen el sistema de referencia para la caracterización fenotípica completa de AIEC (Glasser *et al.*, 2001; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). No obstante, se ha documentado la identificación de cepas con características AIEC aisladas de pacientes sanos mediante ensayos realizados en la línea celular HeLa, lo que sugiere que este modelo puede ser útil como

herramienta complementaria para el estudio de fenotipos asociados a AIEC (Barrios-Villa, 2020).

Es importante mencionar que la identificación del patotipo AIEC se basa en un conjunto de fenotipos funcionales, principalmente la capacidad de adherirse e invadir células epiteliales intestinales y, de manera distintiva, sobrevivir y replicarse dentro de macrófagos, en ausencia de genes característicos de otros patotipos diarreagénicos. Otros rasgos, como la formación de biopelícula, se consideran fenotipos asociados que contribuyen a la persistencia bacteriana, pero no constituyen criterios diagnósticos por sí solos (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Barnich *et al.*, 2007; Martínez-Medina *et al.*, 2009; Palmela *et al.*, 2017). Por otro lado, en este trabajo no se realizó el ensayo de sobrevivencia en macrófagos, lo que representa un reto de oportunidad para trabajos futuros.

VIII. CONCLUSIÓN

- ❖ Las 66 cepas analizadas se distribuyeron en múltiples filogrupos (“A o C”, “B1”, “D o E”, “F”, “A”, “G” y clados crípticos), lo que refleja la coexistencia de linajes comensales y potencialmente patógenos en la mucosa intestinal.
- ❖ Se observó una mayor prevalencia de un filogrupo específico por paciente, lo que sugiere dominancia de linajes filogenéticamente relacionados y apoya la existencia de clonalidad intra-paciente, posiblemente favorecida por la adaptación al microambiente intestinal inflamado.
- ❖ El filogrupo F mostró una alta prevalencia en aislamientos del paciente con colitis crónica y diverticulitis y se asoció con una mayor producción de biopelícula, concordando con reportes que lo vinculan con cepas comensales, zoonóticas y UPEC multirresistentes.
- ❖ La identificación de secuencias tipo compartidas entre aislamientos del mismo paciente, reforzó la presencia de linajes clonales predominantes, algunos previamente asociados con resistencia antimicrobiana, formación de biopelícula y persistencia clínica.

- ❖ Todas las cepas formaron biopelícula; sin embargo, este fenotipo no se correlacionó directamente con la adherencia ni con la invasión celular, confirmando que la biopelícula es un rasgo asociado, pero no determinante, del patotipo AIEC.
- ❖ Los ensayos de adherencia evidenciaron heterogeneidad fenotípica tanto entre pacientes como dentro de un mismo hospedero, así como variabilidad en los patrones de adherencia, lo que sugiere regulación diferencial de adhesinas y adaptación bacteriana al hospedador.
- ❖ La mayoría de las cepas no mostró invasión detectable en células HeLa bajo las condiciones evaluadas, lo que resalta la influencia del modelo celular y de las condiciones experimentales en la caracterización fenotípica de AIEC.
- ❖ En conjunto, los resultados indican que la asignación filogenética y los fenotipos de biopelícula, adherencia e invasión deben interpretarse de manera integrada, ya que ninguno de estos parámetros por sí solo permite establecer de forma concluyente el potencial patogénico de las cepas de *E. coli* asociadas a EII.

IX.PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar ensayos de invasión con diferentes modelos celulares.
- ❖ Realizar ensayos de sobrevivencia en Macrófagos.
- ❖ Analizar los factores de virulencia presentes que se han asociados a la formación de biopelícula, adherencia e Invasión en estas cepas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII.

X. REFERENCIAS

- Aldars-García, L.; Chaparro, M. y Gisbert, J.P. (2021). Revisión sistemática: el microbioma intestinal y su posible aplicación clínica en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Microorganismos*. 9 (5), 977; <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050977>
- Alvarez, J.; Fernández-Real, J.M.; Guarner, F.; Gueimonde, M.; Rodríguez, J.M.; Saenz de Pipaon, M. y Sanz, Y. (2021). Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterología y hepatología*. 44(7): 519-535. DOI: [10.1016/j.gastrohep.2021.01.009](https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2021.01.009)
- Anderson, G. G., Palermo, J. J., Schilling, J. D., Roth, R., Heuser, J., & Hultgren, S. J. (2003). Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science*, 301(5629), 105–107. <https://doi.org/10.1126/science.1084550>
- Allison, K. R., Brynildsen, M. P., & Collins, J. J. (2011). *Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides*. *Nature*, 473(7346), 216–220. <https://doi.org/10.1038/nature10069>
- Baldelli, V.; Scaldaferri, F.; Putignani, L. y Del Chierico, F. (2021). The Role of Enterobacteriaceae in Gut Microbiota Dysbiosis in Inflammatory Bowel Diseases. *Microorganisms*, 9(4): 697. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040697>
- Barnhart, M. M., & Chapman, M. R. (2006). Curli biogenesis and function. *Annual Review of Microbiology*, 60, 131–147. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142106>
- Barnich, N., Carvalho, F. A., Glasser, A. L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H., Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, J. F., & Darfeuille-Michaud, A. (2007). CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *Escherichia coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *Journal of Clinical Investigation*, 117(6), 1566–1574. <https://doi.org/10.1172/JCI30504>
- Barrios-Villa, E. (2019). Estudio de la transferencia genética de la resistencia a antimicrobianos en *Escherichia coli* aisladas de diferentes orígenes y genómica comparativa de cepas ST131. Tesis doctoral. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Repositorio Universitario. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/7>
- Barrios-Villa, E., Martínez de la Peña, C. F., Lozano-Zaraín, P., Cevallos, M. A., Torres, C., Torres, A. G., & Rocha-Gracia, R. D. C. (2020). Comparative genomics of a subset of Adherent/Invasive *Escherichia coli* strains isolated from individuals without inflammatory bowel disease. *Genomics*, 112(2), 1813–1820. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.10.013>
- Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 249–289. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_12
- Boudeau, J., Glasser, A. L., Masseret, E., Joly, B., & Darfeuille-Michaud, A. (1999). Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infection and immunity*, 67(9), 4499–4509. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.9.4499-4509.1999>
- Boudeau J, Barnich N, Darfeuille-Michaud A. 2001. La adherencia mediada por pili tipo 1 de la cepa LF82 de *Escherichia coli* aislada de la enfermedad de Crohn está implicada en la invasión bacteriana de las células epiteliales intestinales. *Mol Microbiol* 39:1272–1284. [10.1111/j.1365-2958.2001.02315.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02315.x)
- Cabrera-González, M.; Chávez-Díaz, S.K.; Gamarra-Ramírez, R.G.; Vasquez, H.V.; Quilcate-Pairazaman, C. y Cueva-Rodríguez, M. (2022). Caracterización bioquímica y filogrupos de *E. coli* aislada de heces de terneros con diarrea en la Región Cajamarca, Perú. 32(1). DOI: <https://doi.org/10.52973/rcfcv-32112>

- Cai, Z; Wang, S. y Li, J. (2021). Tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal: una revisión exhaustiva. *Frontiers*. (8). DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.765474>.
- Camprubí-Font, C., Bustamante, P., Vidal, R.M. (2020). Estudio de un algoritmo de clasificación para la identificación de AIEC en cepas de *E. coli* geográficamente distintas . *Informe científico* 10 , 8094. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64894-5>
- Camprubí-Font, C., & Martinez-Medina, M. (2020). Why the discovery of adherent-invasive *Escherichia coli* molecular markers is so challenging?. *World journal of biological chemistry*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v11.i1.1>
- Calvez, V., Puca, P., Di Vincenzo, F., Del Gaudio, A., Bartocci, B., Murgiano, M., Iaccarino, J., Parand, E., Napolitano, D., Pugliese, D., Gasbarrini, A. y Scaldaferri, F. (2025). Nuevos conocimientos sobre la patogénesis de las enfermedades inflamatorias intestinales. *Biomedicinas* , 13 (2), 305. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13020305>
- Carbonnel, F., et al. (2025). A randomized controlled trial of antibiotics targeting adherent-invasive *Escherichia coli* versus placebo in Crohn's disease: the TEOREM trial. *Journal of Crohn's and Colitis*. Oxford Academic. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40512677/> PubMed
- Casanova-Lara, A. I. (2023). Diagnóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal. En J. K. Yamamoto-Furusho (Ed.), *Enfermedad inflamatoria intestinal* (Vol. 1, pp. XX-XX). Editorial Alfil.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Chassaing, B., Rolhion, N., de Vallée, A., Salim, S. Y., Prorok-Hamon, M., Neut, C., Campbell, B. J., Söderholm, J. D., Hugot, J. P., Colombel, J. F., & Darfeuille- Michaud, A. (2011). Crohn disease–associated adherent-invasive *E. coli* colonize and induce strong gut inflammation in mice. *Gut*, 60(4), 516–529. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.223909>
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- Clermont, O., Gordon, D. M., Brisse, S., Walk, S. T., & Denamur, E. (2019). Characterization of the *Escherichia coli* phylogroups by whole-genome sequencing and proposal of a new group, G. *Environmental Microbiology*, 21(8), 3109–3117. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14721>
- Danese, P. N., Pratt, L. A., Dove, S. L., & Kolter, R. (2000). The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology*, 37(2), 424–432. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02008.x>
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A. L., Barnich, N., Bringer, M. A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., & Colombel, J. F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 127(2), 412–421. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.061>
- Dolu, S. y Akpinar, H. (2025). Pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Journal of Enterocolitis*. 4(1): 4-7. DOI: 10.14744/Jenterocolitis.2025.15570

- Dreux, N., Denizot, J., Martinez-Medina, M., Mellmann, A., Billig, M., Kisiela, D., Chattopadhyay, S., Sokurenko, E., Neut, C., Gower-Rousseau, C., Colombel, J. F., Bonnet, R., & Darfeuille-Michaud, A. (2013). Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathogens*, 9(1), e1003141. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003141>
- Farfán-García, A.E.; Ariza-Roja, S.C.; Vargas-Cárdenas, F.A. y Vargas-Remolina, L.V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* Enteropatógena. *Chilena de Infectología*. 33(4): 438-450. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000400009>
- Funmilola A. Ayeni¹ †, Jane Falgenhauer^{2,3†}, Judith Schmiedel^{2,3}, Oliver Schwengers^{2–4}, Trinad Chakraborty^{2,3} and Linda Falgenhauer^{2,3*}. (2020). Detection of blaCTX-M-27-encoding *Escherichia coli* ST206 in Nigerian poultry stocks. *Antimicrob Chemother*. 75: 3070–3072. DOI: 10.1093/jac/dkaa293
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 269–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- Glasser, A. L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M. H., Colombel, J. F., & Darfeuille-Michaud, A. (2001). Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infection and immunity*, 69(9), 5529–5537. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5529-5537.2001>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Haneishi Y, Furuya Y, Hasegawa M, Picarelli A, Rossi M, Miyamoto J. Inflammatory Bowel Diseases and Gut Microbiota. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 14;24(4):3817. doi: 10.3390/ijms24043817. PMID: 36835245; PMCID: PMC9958622.
- Hervé Jacquier^{1,2}, Bachir Assao³, Françoise Chau¹, Ousmane Guindo³, Bénédicte Condamine^{1 5}, Mélanie, (2022). Fecal carriage of ESBL-Producing *E. coli* in a remote region Niger. DOI: <https://doi.org/10.1101/2022.07.07.499258>;
- Hrncir, T. (2022). Gut microbiota dysbiosis: triggers, consequences, diagnostic and therapeutic options. *Microorganism*. 10(3):578 DOI: [10.3390/microorganisms10030578](https://doi.org/10.3390/microorganisms10030578)
- Kamali Dolatabadi, R., et al. (2021). The prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* and its association with inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Medicine*. <https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2021.730243/full>
- Kaplan, GG. La carga mundial de la enfermedad inflamatoria intestinal: de 2025 a 2045. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 22, 708–720 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41575-025-01097-1>
- Labrec, E. H., Schneider, H., Magnani, T. J., & Formal, S. B. (1964). EPITHELIAL CELL PENETRATION AS AN ESSENTIAL STEP IN THE PATHOGENESIS OF BACILLARY DYSENTERY. *Journal of bacteriology*, 88(5), 1503–1518. <https://doi.org/10.1128/jb.88.5.1503-1518.1964>
- Maldonado-Gálvez, A. (2023). Resistencia y estudio parcial de plásmidos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Tesis de maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Repositorio Universitario. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/20503>

- Martínez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J. (2009). Formación de biopelículas como una nueva característica fenotípica de *Escherichia coli* adherente-invasiva (AIEC). *BMC Microbiol* 9, 202. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-202>
- Martínez-Medina, M., Aldeguez, X., González-Huix, F., Acero, D., & García-Gil, L. J. (2009). Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction–denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(12), 1726–1734. <https://doi.org/10.1002/ibd.20944>
- Martínez-Medina, M., Aldeguez, X., López-Siles, M., González-Huix, F., López-Oliu, C., Dahbi, G., et al. (2009). Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: New biofilm-forming strains in Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(7), 2156–2162. <https://doi.org/10.1128/JCM.00245-09>
- Martínez-Medina, M., Strozzi, F., Ruiz Del Castillo, B., Serrano-Morillas, N., Ferrer Bustins, N., & Martínez-Martínez, L. (2020). Antimicrobial resistance profiles of adherent-invasive *Escherichia coli* show increased resistance to β -lactams. *Antibiotics*, 9(5), 251. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050251> [PMC](#)
- McDowell, C.; Farroq U. y Haseeb, M. (2023). Inflammatory Bowel Disease. *Statpearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470312/>
- Medina-Arroyo A.E. (2023). Estandarización y purificación de la proteína recombinante CstH de la cepa de ETEC E9034A. (Tesis de Licenciatura). UNAM. Repositorio universitario. URL <https://ru.dgb.unam.mx/server/api/core/bitstreams/6e1ba939-2fee-4a7c-a8d0-5e6539a163e9/content>
- Miquel, S., Peyretailade, E., Claret, L., de Vallée, A., Dossat, C., Vacherie, B., Zineb, E. H., Segurens, B., Barbe, V., Sauvonnet, N., Neut, C., Colombel, J. F., Medigue, C., & Darfeuille-Michaud, A. (2010). Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS Genetics*, 6(10), e1001193. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001193>
- Ming-Cheng, W.; Yu-Hua, F.; Yen-Zhen, Z.; Carl Jay, B.B.; Wei-Hung, L.; Chao-An, C; Tzu-Ping, L. y Cheng-Yen, K. (2023). Caracterización de filogrupos uropatógenos de *Escherichia coli* asociados con resistencia a los antimicrobianos, distribución de factores de virulencia y fenotipos relacionados con la virulencia. 114 (1). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105493>
- Miranda-Bautista, J.; Pérez-Garvín, L.A.; Marín-Jiménez, I. (2024). Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Colitis ulcerosa. *Midicine*. 14(8):415-425. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.med.2024.04.013>
- Mirsepasi-Lauridsen HC, Vallance BA, Krogfelt KA, Petersen AM.(2019). *Escherichia coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Jan 30;32(2):e00060-18. doi: 10.1128/CMR.00060-18. PMID: 30700431; PMCID: PMC6431131.
- Min-Hong, S y Hoon-Baek, D. (2024). Procedimientos diagnósticos para la enfermedad inflamatoria intestinal: laboratorio, endoscopia, patología, imágenes y más. *Diagnostics*. DOI: [10.3390/diagnostics14131384](https://doi.org/10.3390/diagnostics14131384)
- Mueller, M. y Tainter, C.R. (2023). *Escherichia coli* Infection. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>
- Newton-Amaldoss, M.J.; Ahmed, I.; Kumar, J. y Sharma, A. (2021). Eficacia terapéutica de nanopartículas de polisacárido de goma de tamarindo cargadas con rifaximina en ratas wistar de modelo de EII inducida por TNBS. *Reports of practical Oncology and Radiotherapy*. 26:5. DOI: [10.5603/RPOR.a2021.0100](https://doi.org/10.5603/RPOR.a2021.0100)

- Ortega, A. D., Quereda, J. J., Pucciarelli, M. G., García-Del Portillo, F., & Ramos-Morales, F. (2016). *Limitations of gentamicin protection assays to study bacterial invasion*. *Journal of Microbiological Methods*, 124, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.02.006>
- Palmela, C., Chevarin, C., Xu, Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng, S. C., & Colombel, J. F. (2017). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*, 67(3), 574–587. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314903>
- Pezhman-Alavinejad; Seyed Jalal, H.; Nitin-Behl; Ahmad-Hormati; Abubakr Elbasuny; Naser Ebrahimi, D. (2025). Evolución de la enfermedad Inflamatoria Intestinal en las últimas dos décadas: un estudio cronológico multinacional. *The Lancet*. 70:1-9. DOI: [https://www.thelancet.com/journals/eclinm/article/PIIS2589-5370\(24\)00121-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/eclinm/article/PIIS2589-5370(24)00121-4/fulltext)
- Pérez-Losada M, Arenas M, Castro-Nallar E. Microbial sequence typing in the genomic era. *Infect Genet Evol*. 2018 Sep;63:346-359. doi: 10.1016/j.meegid.2017.09.022. Epub 2017 Sep 21. PMID: 28943406; PMCID: PMC5908768
- Pérez-Villalobos, V., Vidal, R., Hermoso, M. A., & Bustamante, P. (2025). *Persistence phenotype of adherent-invasive Escherichia coli in response to ciprofloxacin, revealing high-persistence strains*. *Microbial Cell*, 12, 173–181. <https://doi.org/10.15698/mic2025.07.854>
- Piekar, M., Álvarez, V. E., Knecht, C., Leguina, C., García Allende, N., Carrera Páez, L., Gambino, A. S., González Machuca, A., Campos, J., Fox, B., Carpio, E., Aguilar, A., Alonso, F. M., Fernández Canigia, L., Quiroga, M. P., & Centrón, D. (2023). Genomic data reveals the emergence of the co-occurrence of bla_{KPC-2} and bla_{CTX-M-15} in an *Escherichia coli* ST648 strain isolated from rectal swab within the framework of hospital surveillance. *Journal of global antimicrobial resistance*, 32, 108–112. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.12.012>
- Pokharel, P., Dhakal, S., & Dozois, C. M. (2023). The Diversity of *Escherichia coli* Pathotypes and Vaccination Strategies against This Versatile Bacterial Pathogen. *Microorganisms*, 11:(2), 344. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020344>
- Pratt, L. A., & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, and chemotaxis. *Molecular Microbiology*, 30(2), 285–293. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x>
- Sáez, A; Herrero-Fernández, B.; Gómez-Bris, R.; Sánchez-Martínez, H. y González-Granado, J.M. (2023). Fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal: sistema inmunitario innato. *Molecular sciences*. 24 (2), 1526; <https://doi.org/10.3390/ijms24021526>
- Serra, D. O., Richter, A. M., Sellers, Y., & Hengge, R. (2013). Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 195(24), 5540–5554. <https://doi.org/10.1128/JB.00946-13>
- Silva, F.; Gatica, T. Y Pave, C. (2019). Etiología y fisiopatología de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Revista Médica Clínica Las Condes*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864019300574>
- Shalon, D., Culver, R. N., Grembi, J. A., Folz, J., Treit, P. V., Shi, H., Rosenberger, F. A., Dethlefsen, L., Meng, X., Yaffe, E., Aranda-Díaz, A., Geyer, P. E., Mueller-Reif, J. B., Spencer, S., Patterson, A. D., Triadafilopoulos, G., Holmes, S. P., Mann, M., Fiehn, O., Relman, D. A., ... Huang, K. C. (2023). Profiling the human intestinal environment under physiological conditions. *Nature*, 617(7961), 581–591. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05989-7>

- Sharma A, Puhar A. (2019). Gentamicin Protection Assay to Determine the Number of Intracellular Bacteria during Infection of Human TC7 Intestinal Epithelial Cells by *Shigella flexneri*. *Bio Protoc.*;9(13):e3292. doi: 10.21769/BioProtoc.3292. PMID: 33654805; PMCID: PMC7854172.
- Sroithongkham, P., Nittayasut, N., Yindee, J.(2024). Multidrug-resistant *Escherichia coli* causing canine pyometra and urinary tract infections are genetically related but distinct from those causing prostatic abscesses. *Sci Rep* 14, 11848. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62028-9>
- Stepanovic, S.; Vukovic,D.; Hola, V.; Bonaventura, S,D.; Cirkovic, I. y Ruzicka,F. (2007). Cuantificación de biopelículas en placas de microtitulación: descripción general de las condiciones de prueba y recomendaciones practicas para la evaluación de la producción de biopelículas por esafilococos. *Pathology microbiology inmunology*. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm.630.x>
- Tianqi-Zhang; Sanhita Ray; Melican,K; Richter-Dahlfors, A. (2024). La maduración de biopelículas de *Escherichia coli* uropatogena nativa vista a través de una lente no intervencionista. 8(1). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2024.100212>
- Voronina, O; Marina S. Kunda1,Natalia N. Ryzhova1,Ekaterina I. Ermolova1ORCIDO,Elizaveta R. Goncharova1,Ekaterina A. Koroleva1,Lidia N. Kapotina1,Elena Yu. Morgunova1,Elena L. Amelina2ORCIDOyNailya A. Zigangirova1. (2025). Infecciones crónicas por *Escherichia coli* ST648 en pacientes con fibrosis quística: efectos *in vitro* de un agente antivirulento. 26(17). DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms26178650>
- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett III, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., ... Blattner, F. R. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 17020–17024. <https://doi.org/10.1073/pnas.252529799>
- Zangara, M.; Darwish; CoombesBK. (2023). Caracterización del potencial patogénico de *Escherichia coli* adherente-invasiva asociada a la enfermedad de Crohn. *American Society for microbiology*. 11:eesp-0018-2022.<https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0018-2022>
- Zhuge, X., Zhou, Z., Jiang, M., Wang, Z., Sun, Y., Tang, F., Xue, F., Ren, J., & Dai, J. (2021). Chicken-source *Escherichia coli* within phylogroup F shares virulence genotypes and is closely related to extraintestinal pathogenic *E. coli* causing human infections. *Transboundary and emerging diseases*, 68(2), 880–895. <https://doi.org/10.1111/tbed.13755>

XI. ANEXOS

Tabla 7. PACIENTE 1: 37 CEPAS DE <i>Escherichia coli</i>													
	CEPA	arpA (400bp)	chuA (288pb)	YjaA (211pb)	TspE4C.2 (152pb)	FILOGRUPO		CEPA	arpA (400bp)	chuA (288pb)	YjaA (211pb)	TspE4C.2 (152pb)	FILOGRUPO
Blee (+)	CUA4	+	-	+	-	A o C	R: FQN Y AMG	CUA27	+	-	+	-	A o C
	CUA9	+	-	+	-	A o C		CUA32	+	-	+	-	A o C
	CUA10	+	-	+	-	A o C		CUA34	+	-	+	-	A o C
	CUA11	+	-	+	-	A o C		CUA35	+	-	+	-	A o C
	CUA13	+	-	+	-	A o C		CUA36	+	+	-	-	D o E
	CUA14	+	-	+	-	A o C		CUA37	+	-	+	-	A o C
	CUA15	+	-	+	-	A o C	R/I: CEFALOSPORINAS	CUA1	+	-	-	+	B1
	CUA16	+	-	+	-	A o C		CUA3	+	-	+	-	A o C
	CUA17	+	-	+	-	A o C		CUA19	+	-	+	-	A o C
	CUA18	+	-	+	-	A o C	I: AMC y FOX	CUA25	+	-	+	-	A o C
	CUA23	+	-	+	-	A o C		CUA38	+	-	-	+	B1
	CUA24	+	-	+	-	A o C	R: AMC, FOX Y CLO	CUA6	+	-	+	-	A o C
	CUA29	+	-	+	-	A o C		CUA22	+	-	+	-	A o C
	CUA31	+	-	+	-	A o C		CUA28	+	-	+	-	A o C
	CUA33	+	-	+	-	A o C		CUA30	+	-	+	-	A o C
	CUA39	+	-	+	-	A o C		CUA21	+	-	+	-	A o C
I: CLO	CUA20	-	-	+	-	Clado I o II	S: PEN, FQN Y AMG	CUA2	-	+	-	-	F
	CUA12	+	-	+	-	A o C		CUA7	-	+	-	-	F
S: CLO	CUA5	+	-	+	-	A o C							

Se muestran los datos de las amplificaciones dadas de acuerdo al método de PCR- Cuadriplex de Clermont et al., 2013. Se observan únicamente 37 cepas que fueron aisladas de biopsias del paciente 1, las cepas fueron agrupadas de acuerdo a perfiles de resistencia obtenidos en el trabajo de Maldonado-Gálvez (2023). Las cepas seleccionadas CUA13 Y CUA16, fueron seleccionadas para secuenciación.

Tabla 8. PACIENTE 2: 22 CEPAS DE <i>Escherichia coli</i>													
	CEPA	arpA (400bp)	chuA (288pb)	YjaA (211pb)	TspE4C.2 (152pb)	FILOGRUPO		CEPA	arpA (400bp)	chuA (288pb)	YjaA (211pb)	TspE4C.2 (152pb)	FILOGRUPO
S: AMC, GEN y TOB	CCB1	-	-	-	+	Clado I o II	RIF(R) y AMC(I)	CCB11	-	+	-	-	F
	CCB19	-	+	-	-	F		CCB12	-	+	-	-	F
	CCB3	+	-	+	-	A o C		CCB17	-	+	-	-	F
R: RIF, AMP, AMC, FOX	CCB10	+	-	-	-	A		CCB2	-	+	-	-	F
	CCB14	-	+	-	-	F		CCB4	-	+	-	-	F
	CCB15	-	+	-	-	F		CCB5	+	-	+	-	A o C
	CCB16	-	+	-	-	F		CCB6	-	+	-	-	F
	CCH5	-	+	-	-	F		CCB7	-	+	-	-	F
								CCB8	-	+	-	-	F
S: C3G, Carbapenem	CCB13	-	+	-	-	F		CCB9	-	+	-	-	F
	CCB18	-	+	-	-	F							
	CCH1	-	+	-	-	F							
	CCH4	-	+	-	-	F							

Datos recabados durante el análisis de PCR-Cuádruplex establecidos en el método por Clermont *et al.*, (2013) para el análisis de filogrupos. Se analizaron 19 cepas aisladas de biopsias y tres muestras a partir de heces (CCH1, CCH4 Y CCH5), del paciente 2. Las cepas se agruparon por perfil de resistencia a antibióticos mediante los datos de Maldonado-Gálvez (2023). Las cepas CCH5, CCB11 Y CCB4 se mandaron a secuenciar.

Tabla 9. PACIENTE 3: 7 CEPAS DE <i>Escherichia coli</i>						
	CEPA	arpA (400bp)	chuA (288pb)	YjaA (211pb)	TspE4C.2 (152pb)	FILOGRUPO
R: AMP, AMC y C3G, I: Carbapenemic os	CUA42	+	-	-	+	B1
	CUA44	+	+	-	+	D o E
	CUA50	+	+	-	+	D o E
	CUA55	-	-	-	+	B1
	CUA67	+	+	-	+	D o E
Sensibles	CUA57	+	-	+	+	Desc
	CUA69	+	-	+	+	Desc

Datos recabados durante para el análisis de filogrupos mediante PCR-Cuádruplex (Clermont *et al.*, 2013). Se analizaron 7 cepas aisladas de biopsias del paciente 3. La cepa CUA69 fue secuenciada. Las cepas se agruparon por perfil de resistencia a antibióticos mediante los datos de Maldonado-

Tabla 10.- Condiciones de PCR para la identificación del filogrupo G (Clermont et al., 2019)			
<i>YbgD</i>	177pb	95°C 3'	1 CICLO
		95°C 5'' 59°C 30'' 72 °C 18''	30 CICLOS
		72°C 7''	1 CICLO

Condiciones de amplificación por PCR para la identificación del filogrupo G de *Escherichia coli* mediante el gen **ybgD** (177 pb), de acuerdo con el esquema propuesto por Clermont et al. (2019)

Tabla 11. Determinación del filogrupo F								
No.	PACIENTE	CEPA	arpA (400bp)	chuA (288pb)	YjaA (211pb)	TspE4C.2 (152pb)		FILOGRUPO
1	1	CUA2	-	+	-	-	-	F
2	1	CUA7	-	+	-	-	+	G
3	2	CCB19	-	+	-	-	-	F
4	2	CCB14	-	+	-	-	-	F
5	2	CCB15	-	+	-	-	-	F
6	2	CCB16	-	+	-	-	-	F
7	2	CCH5	-	+	-	-	-	F
8	2	CCB13	-	+	-	-	-	F
9	2	CCB18	-	+	-	-	-	F
10	2	CCH1	-	+	-	-	-	F
11	2	CCH4	-	+	-	-	-	F
12	2	CCB11	-	+	-	-	-	F
13	2	CCB12	-	+	-	-	+	G
14	2	CCB17	-	+	-	-	-	F
15	2	CCB2	-	+	-	-	-	F
16	2	CCB4	-	+	-	-	-	F
17	2	CCB6	-	+	-	-	-	F
18	2	CCB7	-	+	-	-	-	F
19	2	CCB8	-	+	-	-	-	F
20	2	CCB9	-	+	-	-	-	F

Tabla 11. Determinación del filogrupo F en cepas de *Escherichia coli* mediante PCR según el esquema de Clermont et al. (2013, 2019)

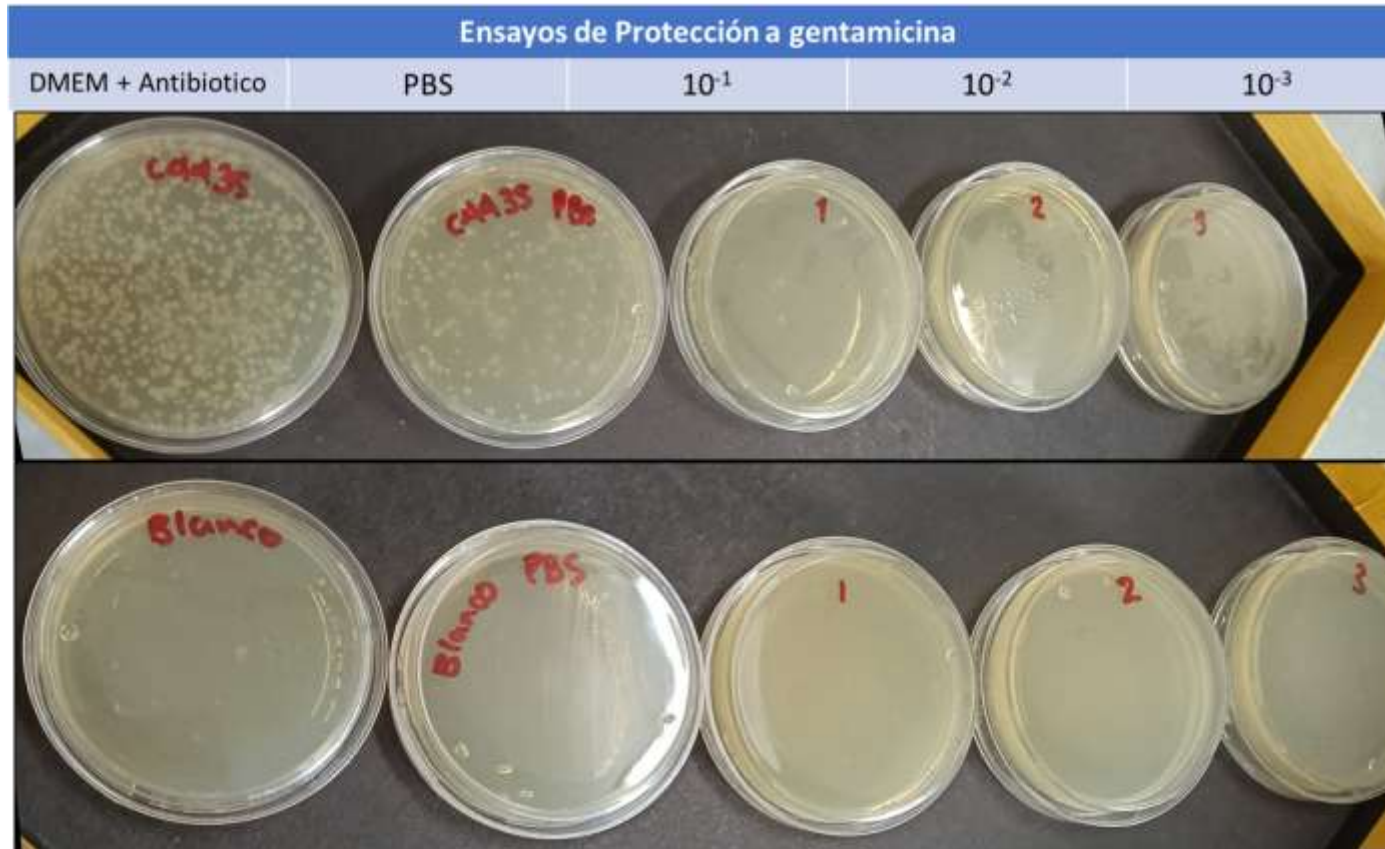


Figura 19. Ensayo de protección con gentamicina para la evaluación de la capacidad de invasión bacteriana en células HeLa. El procedimiento se realizó con base en la metodología descrita por Labrec et al. (1964) y Sharma y Puhar (2019), incorporando pasos adicionales de verificación de bacterias extracelulares. Se realizó el plaqueo de 100 μ L del medio DMEM con antibiótico tras 1 h de incubación posterior a la infección, así como de 100 μ L del sobrenadante obtenido después de dos lavados con PBS (2 mL). Posteriormente, se plaquearon diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) obtenidas tras la lisis celular. Se utilizó la cepa C4435 como control positivo y se incluyó un blanco experimental. Se observó crecimiento bacteriano previo a la lisis celular. El procedimiento se realizó por triplicado. El antibiotico implementado fue según su MIC empleando Caldo Mueller–Hinton (MH) como indica el CISI (2025).



Figura 20. Ensayo de protección con gentamicina para evaluar la capacidad de invasión bacteriana en células HeLa con modificaciones al protocolo. El procedimiento se realizó con base en la metodología descrita por Labrec et al. (1964) y Sharma y Puhar (2019), incorporando pasos adicionales para la verificación de bacterias extracelulares. En la figura se muestra únicamente el comportamiento de la cepa control C4435, previamente descrita por Barrios-Villa como una cepa con alta capacidad invasiva. Las células HeLa fueron infectadas durante 3 h en medio DMEM sin antibiótico, seguido de la adición de amikacina (16 µg/mL) durante 1 h, de acuerdo con los criterios del CLSI (2025) para cepas resistentes. Se realizó el plaqueo de 100 µL del sobrenadante del cultivo y de 100 µL del sobrenadante obtenido tras dos lavados con PBS (5 mL), observándose crecimiento bacteriano mínimo. Posteriormente, se plaquearon diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) obtenidas tras la lisis celular, en las cuales la cepa control C4435 presentó crecimiento de colonias. Se incluyó un blanco experimental y el ensayo se realizó por triplicado.

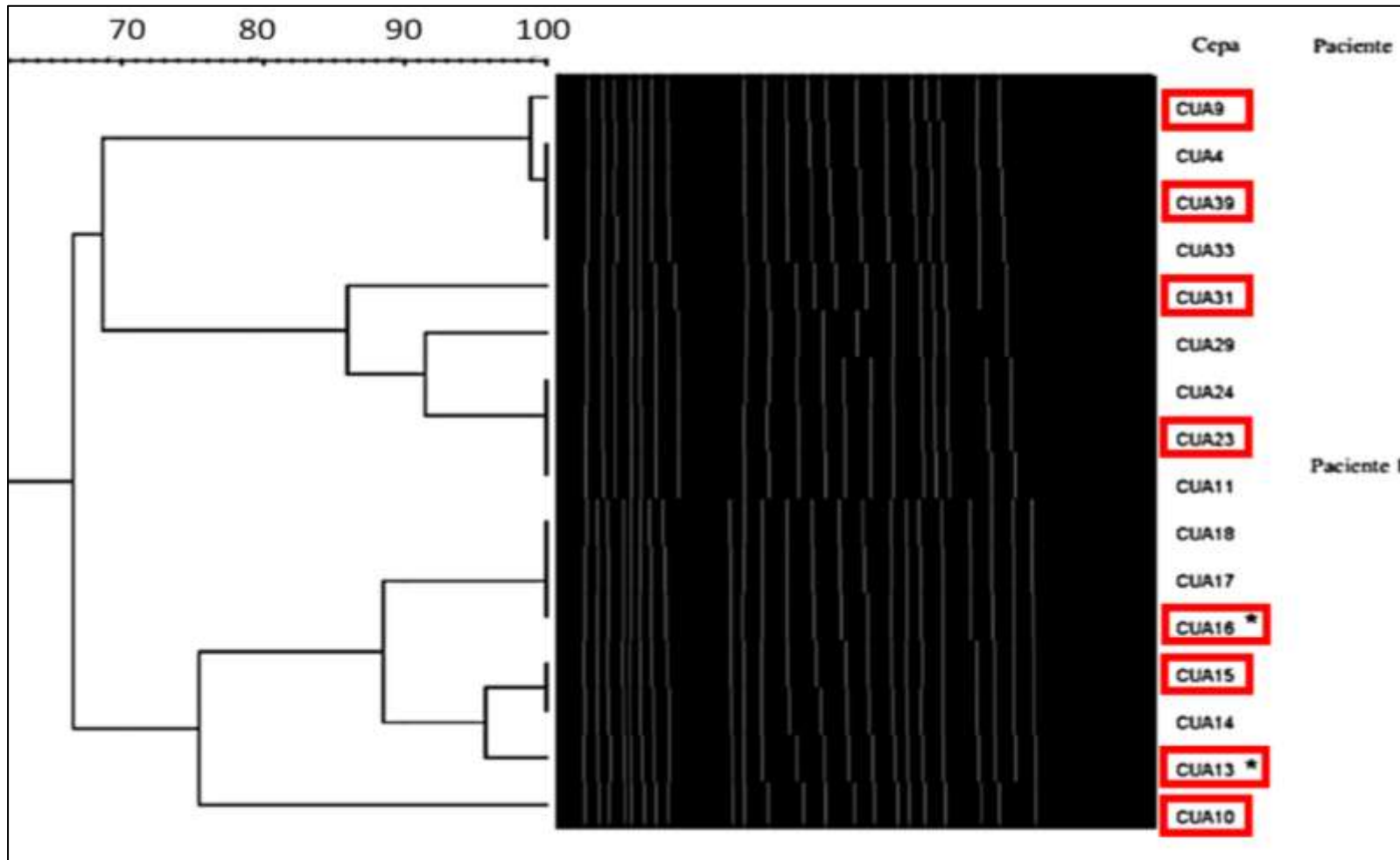


Figura 6. Dendrograma de dis/similitud de cepas *Escherichia coli* productoras de serin-betalactamasas aisladas del biopsias del paciente con EII. Valores superiores a 0.9 del coeficiente de DICE se determinó para establecer miembros del mismo linaje clonal. Datos no publicados. Los genes asociados a la producción de serin-betalactamasas fueron determinados por PCR y proporcionados por Maldonado-Gálvez, 2024. *Cepas secuenciadas. Tomado y modificado de Ibarra-Moreno (2025).

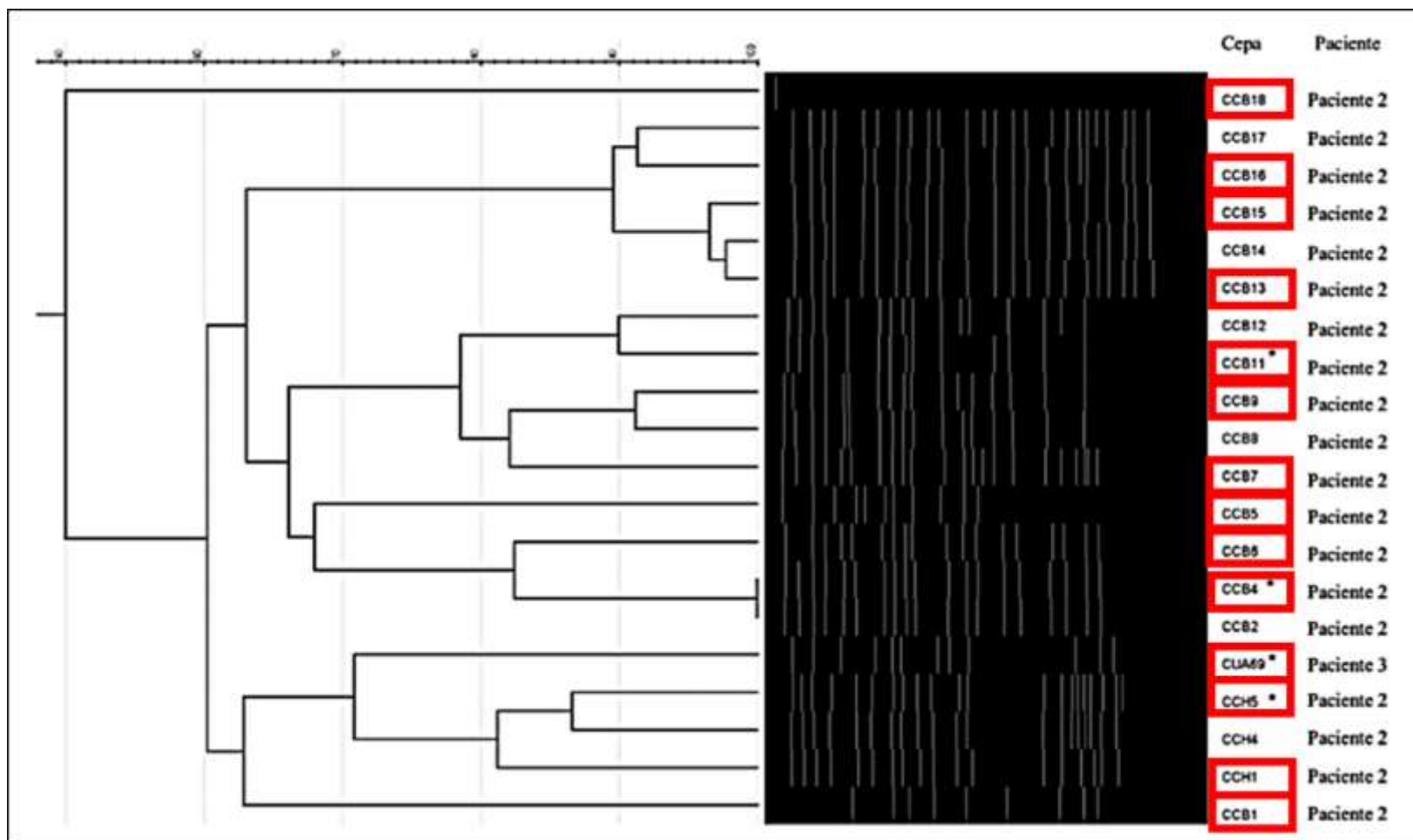


Figura 7. Dendrograma de dis/similitud de cepas de *Escherichia coli* resistentes a rifaximina aisladas de los pacientes dos y tres. Coeficiente de DICE. Valores superiores a 0.9 del coeficiente de DICE se determinó para establecer miembros del mismo linaje clonal. El perfil de resistencia fue determinado por el método de Kirby-Bauer y proporcionado por Maldonado-Gálvez, 2024.*Cepas secuenciadas. Tomado y modificado de Ibarra-Moreno (2025).

