



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Medicina
Licenciatura en Biomedicina
Eje de Microbiología

“Estudio de la resistencia a quinolonas y aminoglucósidos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal”

Tesis para obtener el grado de:
Licenciada en Biomedicina

Presenta:

Hania Anai Alcalá Martínez

Directora de Tesis:

Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia

Co-director de Tesis:

Dr. Gerardo Cortés Cortés

Lugar de realización:

Laboratorio de Infecciones Hospitalarias y de la Comunidad
Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias de la
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Puebla, Pue. Mayo 2023

Agradecimientos Institucionales

- A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por ser la casa de estudios en la que me forme durante estos años, en sus instalaciones, laboratorios y aulas, después de una pandemia, aprecie aún más cada uno de sus espacios.
- A la Facultad de Medicina y a la Licenciatura en Biomedicina por todo el apoyo que me fue dado durante estos cinco años de mi formación como profesional.
- Al centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas por el espacio en sus laboratorios y aulas, donde pude desenvolverme como alumna.
- Al Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, lugar en el cual pude realizar el presente trabajo de tesis, bajo la orientación de la D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia.

Agradecimientos Académicos.

- A la D. en C. Rosa del Carmen Rocha Gracia, por su confianza al recibirme como tesista en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, por todo su apoyo, atención, paciencia, y por su valioso tiempo para las revisiones de este trabajo de tesis, por brindarme las herramientas necesarias para llevar a cabo este proyecto, y darme la oportunidad de trabajar con las cepas de AIEC, gracias por permitirme ser parte del grupo tan unido de alumnos que ha creado.
- Al D. en C. Gerardo Córtes Córtes, por su asesoría y dedicación en cada proyecto durante mi estancia en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, por toda su atención, por siempre su disposición y apreciable tiempo, por sus aportaciones, comentarios y sugerencias, así como revisiones de esta tesis, gracias por toda su paciencia, sus consejos, motivaciones y su gran apoyo, de verdad, le agradezco mucho.
- A la M. en C. María Balbuena, por su tiempo, la atención, y la asesoría dentro del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, por el apoyo en el aprendizaje de las técnicas utilizadas, por las aportaciones y comentarios a este proyecto de tesis, así como motivaciones, muchas gracias.
- A mis sinodales D. en C. Silvia María del Carmen García García y D. en C. Liliana López Pliego, por su valioso tiempo para cada comentario, observación y revisión de este trabajo de tesis.

Agradecimientos personales

- A mi Madre, Margarita.

Gracias por todo tu apoyo para que yo pudiera culminar esta etapa de mi vida, por todo el esfuerzo que hiciste para que yo tuviera una formación académica, por siempre confiar y creer en mí, por ser mi inspiración y mi más grande impulso, por motivarme día con día, te agradezco por guiarme, aconsejarme y escucharme con tanto amor, por darme bases fuertes, pues sin mi fe puesta en Dios, nada en mi vida sería posible. Todos mis logros son y serán tuyos.

- A mi padre, Rogelio.

Gracias por todo el esfuerzo que has hecho para que yo pudiera tener una educación, por las herramientas que me has brindado a lo largo de mi vida para llegar siempre a la meta, eres mi ejemplo de constancia, por tu cariño, motivación, y cada consejo, infinitamente gracias.

- A mi hermana Cristina.

Por traer a mi vida tres hermosas motivaciones, pues sin Elena, Sofí, y Naty, mis días definitivamente no serían iguales, y a Carlos por siempre su disposición en ayudarme, gracias.

- A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad.

Por guiarme, enseñarme y resolver cada duda que tenía. A Gerardo, María, Monse, Carlos, Carolina, Cristi, Vero, Alejandra y Jessi, por toda su paciencia y gran disposición al explicarme las técnicas de laboratorio, por los trabajos en colaboración, por la bonita convivencia, su gran apoyo, y consejos en este proceso, definitivamente me llevo un gran ejemplo de compañerismo, muchas, muchas gracias.

Índice

1. Resumen.....	8
2. Introducción.....	9
2.1. Antecedentes generales	9
2.1.1 Enfermedad inflamatoria intestinal.....	9
2.1.2 Epidemiología	9
2.1.3 Etiología	10
2.1.4 Clínica.....	12
2.1.5 Diagnóstico	12
2.1.6 Tratamiento.....	13
2.1.7 <i>Escherichia coli</i>	14
2.1.8 Patotipos.....	14
2.1.9 Quinolonas.....	16
2.1.10 Clasificación y miembros de las Quinolonas.....	17
2.1.11 Mecanismo de acción de las Quinolonas.....	18
2.1.12 Mecanismos de resistencia de las Quinolonas y genes de resistencia involucrados.....	19
2.1.13 Aminoglucósidos.....	21
2.1.14 Clasificación y miembros de los Aminoglucósidos.....	22
2.1.15 Mecanismo de acción de los Aminoglucósidos.....	22
2.1.16 Mecanismo de resistencia de los Aminoglucósidos y genes de resistencia involucrados.....	23
3. Antecedentes.....	24
3.1. Antecedentes generales	24
3.2. Antecedentes específicos	25
4. Justificación	26
5. Planteamiento del problema.....	27
6. Hipótesis científica.....	27
7. Objetivos	27
7.1. Objetivo general <i>in silico</i>	27

7.1.2	Objetivos específicos <i>in silico</i>	27
7.2	Objetivo general experimental.....	28
7.2.1	Objetivos específicos experimentales.....	28
7. 3	Estrategia de trabajo <i>in silico</i>	29
8.	Material y métodos	30
8.1.	Diseño del estudio.....	30
8.2.	Ubicación espacio-temporal	30
8.3.	Muestreo	30
8.3.1.	Definición de la unidad poblacional.....	30
8.3.2.	Selección de la muestra.....	30
8.3.3.	Criterios de selección de las unidades de muestreo.....	30
8.3.3.4	Diseño y tipo de muestreo	31
8.3.3.5.	Tamaño de la muestra	31
8.4.	Definición de las variables y escala de medición.	31
8.5	Metodología <i>in silico</i>	31
8.5.1	Procedimiento <i>in silico</i>	31
8.6	Método Bionfórmatico	32
8.6.1	Procedimiento Bionfórmatico.	32
8.7	Método y recolección de datos experimental	32
8.7.1	Técnicas y Procedimientos (experimental).	33
8.7.2	Cepas de <i>E coli</i>	33
8.7.3	Susceptibilidad a antibióticos	34
8.7.4	Obtención de ADN bacteriano	36
8.7.5	Técnica de hervido.....	36
8.7.6	Cuantificación de ADN.....	36
8.7.7	Caracterización de genes de resistencia	37
8.7.8	Visualización de los productos de PCR	39
8.8	Análisis de datos	39
9.	Resultados	39
9.1	Objetivo <i>in silico</i>	39
9.1.1	Objetivo 1. Búsqueda sistemática en la base de datos PubMed	39
9.1.2	Objetivo 2. Artículos sobre presencia de genes de resistencia hacia las familias de Quinolonas y Aminoglucósidos.....	41

9.2 Objetivos experimentales.....	43
9.2.1 Objetivo 1: Determinar el perfil de susceptibilidad a Quinolonas y Aminoglucósidos.....	43
9.2.2 Objetivo 2: Determinar la presencia de genes plasmídicos <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> y <i>qepA</i> en los aislamientos.....	51
10. Discusión	62
11. Conclusiones.....	67
12. Perspectivas	68
13. Logística.....	68
13.1. Recursos humanos	68
13.2. Recursos materiales	68
13.3. Recursos financieros.....	69
13.4. Cronograma de actividades	69
13.4.1 Gráfica de Gantt.....	69
14. Bioética	70
15. Bibliografía.....	70
Anexo 1. Revisión bibliográfica.	74

1. Resumen

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), se ha asociado a causas multifactoriales, incluyendo la participación de la bacteria *Escherichia coli* adherente invasiva (AIEC). El tratamiento incluye familias de antibióticos ampliamente utilizados en la clínica como las Quinolonas y los Aminoglucósidos, sin embargo, las altas tasas de resistencia a estos antimicrobianos complican la erradicación de clonas patógenas.

En el presente estudio se realizó una búsqueda sistemática de la literatura sobre el papel potencial de AIEC en la EII, y se trabajó con 66 cepas provenientes de donaciones de biopsias de 3 pacientes con EII, dos de ellos con un tratamiento previo a quinolonas. El objetivo fue caracterizar su perfil de susceptibilidad antimicrobiana (Kirby-Bauer), así como la presencia de genes de resistencia a Quinolonas y Aminoglucósidos (por PCR).

Para gentamicina, amikacina (aminoglucósidos) y ácido nalidíxico (quinolona) se analizaron 66 cepas, mientras que para tobramicina, estreptomina (aminoglucósidos) y ciprofloxacino (quinolona) se realizó antibiograma a 29 cepas.

Se observaron resultados con un perfil de resistencia alto para gentamicina 81.80% (54/66 cepas), tobramicina 79.30% (23/29), estreptomina 89.60% (26/29), ácido nalidixico 83.00% (55/66), y ciprofloxacino 79.30% (23/29), mientras que en amikacina se observó un perfil sensible con 85.00% (56/66).

En base al perfil de resistencia se realizó la amplificación de los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* (para 59 cepas de 66), *qepA* (24/29), *aac(6')-Ib-cr* (59/66), del grupo de las quinolonas; y *aac(6')-Ib* (60/66) para aminoglucósidos. Primero se confirmó el tamaño de los genes por medio de un análisis bioinformático en la base de datos NCBI y bionformatics.org, para posteriormente estandarizar las condiciones de amplificación, así como controles positivos para cada uno, a continuación, se identificó la presencia de estos genes por la técnica de PCR. Los resultados para el gen *aac(6')-Ib* mostraron un perfil negativo para todas las cepas (66/66), mientras que para los genes *qnrA* y *qnrS* se identificaron las cepas CUA44 y CCB8, respectivamente.

Con estos resultados se concluye que la resistencia en quinolonas pudo ser adquirida, ya que los pacientes 2 y 3 refirieron tener un tratamiento previo con ciprofloxacino, lo que pudo haber generado presión selectiva en las cepas evaluadas, mientras que para el paciente 1 la resistencia se pudo haber adquirido por medio de transferencia horizontal, ya que también se vio confirmada la presencia del gen *qnrA* por medio de la cepa CUA44. Sin embargo, el mecanismo de resistencia mediado por mutaciones cromosomales, no debe ser descartado.

Palabras clave: Enfermedad Inflamatoria Intestinal, *Escherichia coli* adherente invasiva, Resistencia antimicrobiana, Quinolonas, Aminoglucósidos.

2. Introducción

2.1. Antecedentes generales

2.1.1 Enfermedad inflamatoria intestinal

El término enfermedad inflamatoria intestinal (EII) incluye a un grupo de entidades clínicas que se caracterizan por ser procesos inflamatorios crónicos de etiología desconocida.¹ La EII se caracteriza por afectar principalmente, pero no de forma exclusiva al intestino, como: la Colitis Ulcerosa (CU), la Enfermedad de Crohn (EC), Colitis no clasificada (CI), Colitis Microscópica (CM) y reservoritis.²

Dependiendo del subtipo de enfermedad, la inflamación puede manifestarse a nivel de la mucosa del colon como es en el caso de la CU, o bien, ser crónica y transmural comprometiendo a cualquier parte del tubo digestivo como en la EC.³

La manifestación de los síntomas en la EC y la CU es variable, desde formas leves con sintomatologías poco frecuentes, hasta enfermedades debilitantes que pueden resultar en hospitalización, cirugía y discapacidad⁴. Para la mayoría de los pacientes la EII sigue un curso recurrente, una recaída se caracteriza por síntomas con signos objetivos de inflamación. Ahora se sabe que incluso durante los períodos de remisión la inflamación subclínica a menudo persiste, particularmente en la EC, lo que aumenta el riesgo de progresión a complicaciones, tal daño estructural del intestino requiere con frecuencia cirugía.⁵

2.1.2 Epidemiología

A principios del siglo XXI, la EII se ha convertido en una enfermedad global con una incidencia acelerada en los países recientemente industrializados. Australia tiene una de las tasas de incidencia más altas del mundo con 29.3 por 100,000 habitantes. Sin embargo, este rápido aumento se estabilizó en la última década en

los países desarrollados, observándose un aumento dramático en la incidencia en países en desarrollo.⁵

En los últimos 50 años, en Occidente, la incidencia y prevalencia de la EII ha aumentado. La mayor incidencia anual de EC se encuentra en Norteamérica (20.2 por 100,000 personas al año); mientras que la incidencia anual de CU es mayor en Europa (24.3 por 100,000 personas al año).⁶

Estas enfermedades suelen iniciar o comenzar durante la juventud, sobre todo entre los 15 y los 30 años, pero se observan casos nuevos a cualquier edad⁴. En la actualidad se ha demostrado un aumento en la incidencia de la EII pediátrica a nivel mundial, sobre todo en la EC, pues el registro pediátrico en España refiere un aumento en los últimos veinticinco años en pacientes menores de 18 años hasta el año 2010, siendo más frecuente en varones.⁹

Al parecer, los hispanos y los asiáticos de Norteamérica tienen una prevalencia más baja de EC que los caucásicos. En Latinoamérica existen pocos estudios epidemiológicos sobre la EII, y aunque existen pocas publicaciones, algunos estudios han reportado un crecimiento en la frecuencia tanto de EC como de CU, a pesar de su baja incidencia; por ejemplo, en una región de Brasil se describió un aumento del número de casos de EII desde 1.53 casos/100,000 habitantes a 12.8 casos/100,000 en 25 años, teniendo un predominio en pacientes con CU sobre EC, menores de 40 años.⁶

2.1.3 Etiología

Aunque la etiología de la EII sigue siendo en gran parte desconocida, implica una interacción compleja entre los factores genéticos, ambientales, microbianos y las respuestas inmunes.⁷ Los cambios en el estilo de vida de los países desarrollados

y en vías de desarrollo han contribuido en un aumento en la prevalencia mundial de esta enfermedad.⁶

Los genes implicados en la EII de inicio en la infancia y en la edad adulta se superponen, lo que sugiere predisposiciones genéticas similares. Sin embargo, el hecho de que los factores genéticos representen solo una parte de la varianza general de la enfermedad, indica que los factores microbianos y ambientales pueden interactuar con elementos genéticos en la patogénesis de la EII.⁷

Hasta la fecha, los estudios de asociación del genoma completo han identificado 163 loci de susceptibilidad a la EII. Estos polimorfismos genéticos están asociados con una variedad de vías moleculares críticas para los sistemas inmunitarios innato y adaptativo, como la autofagia (ATG16L1) y el reconocimiento de patógenos (NOD2).⁸

La microbiota intestinal tiene gran importancia en la patogénesis de la EII debido a la relación que existe entre la flora bacteriana y la tolerancia inmunológica del hospedero, la integridad de la barrera mucosa, la angiogénesis y el adecuado desarrollo intestinal.⁷

La microbiota intestinal en pacientes con EII es más inestable que en individuos sanos. En el intestino sano predominan los filos Firmicutes y Bacteroidetes, que contribuyen a la producción de sustratos metabólicos epiteliales. En cambio, la microbiota en pacientes con EC se caracteriza por una relativa falta de Firmicutes y Bacteroidetes, y una sobrerrepresentación de enterobacterias; mientras tanto, una reducción en *Clostridium spp.* y se ha informado un aumento de *Escherichia coli* en la CU.⁷

Existe por tanto una desregulación genéticamente determinada de la respuesta inmune frente a la flora bacteriana que da lugar a activación de linfocitos TCD4 y que produce una inflamación intestinal descontrolada, así como distintos factores

ambientales que se han relacionado con la EII, entre ellos, la lactancia materna como protector para el desarrollo de ésta y otros con el efecto contrario, como una dieta desbalanceada o el consumo de tabaco.⁹

2.1.4 Clínica

En la CU los síntomas inicialmente son graduales e intermitentes. La diarrea con sangre y/o moco y la rectorragia son los síntomas más frecuentes (90% de los pacientes) asociada a pujo, tenesmo rectal y urgencia defecatoria. Dependiendo de la extensión de la enfermedad, se puede acompañar de compromiso del estado general, baja de peso, fiebre o dolor abdominal tipo cólico que cede al obrar.¹⁰

En la clínica es muy proteiforme, con dolor abdominal, diarrea, y pérdida de peso, siendo esta una triada clásica que aparece en el 25% de los pacientes, ya que los síntomas se presentaron de forma insidiosa.⁹

La diarrea puede ser de muchos tipos, no sólo por las localizaciones variables del proceso, sino también porque puede deberse a malabsorción de sales biliares, sobrecrecimiento bacteriano, la propia inflamación o a trastornos motores.⁴

Tanto en la CU como en la EC se encuentran síntomas digestivos y manifestaciones extraintestinales,¹¹ como sarpullido, iritis, úlceras bucales y artralgia, al igual que los antecedentes familiares de la afección,⁵ siendo la mayoría de ellos comunes para ambas enfermedades, sobre todo cuando la EC se limita al colon. A estos síntomas en la edad pediátrica debemos añadir el retraso del crecimiento y el retraso puberal.⁹

2.1.5 Diagnóstico

Estas EII carecen de un marcador diagnóstico patognomónico, por lo tanto, el diagnóstico de la CU y EC se basa en la presencia de un cuadro clínico sugerente más la presencia de alteraciones encontradas en la endoscopia, hallazgos en la

histología, radiología y exámenes de laboratorio, es decir, de la integración de todos estos elementos.¹⁰

Es prioritario establecer el diagnóstico precoz teniendo en cuenta la idiosincrasia del paciente.⁹ En la EC, el retraso en el diagnóstico conduce a daño intestinal acumulativo, fibrosis y discapacidad. En la CU, el diagnóstico temprano y el tratamiento eficaz reducen los riesgos de cáncer colorrectal a largo plazo y la necesidad de cirugía.⁵

Se debe completar una evaluación de enfermedades infecciosas como parte de la evaluación inicial de cualquier paciente que presente diarrea crónica, documentando un cultivo de heces negativo para las bacterias *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* y *Yersinia*, así como para *E. coli* 0157:H7 y *Clostridium difficile*.⁸

2.1.6 Tratamiento

El tratamiento ha ido más allá del control de los síntomas únicamente, con medidas objetivas claras para garantizar generalmente la curación de la mucosa.⁵

En el tratamiento es importante la consideración de los factores pronósticos de cada paciente, determinando parámetros demográficos, clínicos, de laboratorio, endoscópicos e histológicos, estos factores permitirán identificar aquellos pacientes que podrían tener una evolución más desfavorable.¹²

En la EC los fármacos que han demostrado eficacia en ensayos clínicos son los corticoides (tanto los llamados sistémicos como la Budesonida), Azatioprina (o Mercaptopurina), Metotrexato, Infliximab, Adalimumab, Certolizumab, Natalizumab y en determinadas circunstancias los antibióticos (en concreto Metronidazol y Ciprofloxacina).⁴

Los medicamentos actualmente aprobados para uso clínico en la EII, se dirigen al sistema inmunológico para reducir la inflamación e inducir la remisión; puesto que la tolerancia a la enfermedad puede desarrollarse con el tiempo, esto en un 10%-

35% de los pacientes con EC, requiriendo cirugía dentro de un año, por lo que se manifiesta la necesidad de optimizar la terapia médica existente, con un enfoque en la terapia individualizada.¹³

Una opción para actuar desde el punto de vista microbiológico e inmunológico es la modificación de la flora intestinal mediante probióticos, pues su utilización en la EII es desde el punto de vista fisiopatológico una buena alternativa terapéutica.¹⁴

El uso de probióticos sugiere ser una conducta benéfica en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, pues los lactobacilos y bifidobacterias han mostrado mejoría subjetiva como objetiva en los pacientes tratados. En general, el uso de estos suplementos indica ser una práctica acertada, principalmente para el control de síntomas, teniendo en cuenta la condición específica del paciente para tomar decisiones acertadas acerca de su manejo.¹⁵

2.1.7 *Escherichia coli*

E. coli se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo presente en la microbiota normal del colon humano, no esporulante, productor de indol a partir de triptófano, no utiliza citrato como fuente de carbono y no produce acetoina, además de fermentar la glucosa y la lactosa con producción de gas. Como todas las bacterias Gram negativas, la cubierta de *E. coli* consta de tres elementos: la membrana citoplasmática, la membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico constituido por péptido-glucano. Esta última estructura confiere a la bacteria su forma y rigidez permitiéndole resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas.¹⁷ Sin embargo, algunas cepas han adquirido factores de virulencia permitiendo así adaptarse y en algunos casos ser causantes de enfermedades.¹⁶

2.1.8 Patotipos

Se han descrito seis patotipos de *E. coli* involucrados en procesos diarreicos mediante la identificación de factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad, estas son; *E. coli enteropatógena* (EPEC, por sus siglas en inglés), *E. coli enterotoxigénica* (ETEC), *E. coli enteroinvasora* (EIEC), *E. coli shigatoxigénica* (STEC), *E. coli enteroagregativa* (EAEC), *E. coli adherente difusa* (ADEC) y el patotipo más recientemente descrito *E. coli adherente-invasiva* (AIEC).¹⁸

Las cepas de *E. coli* patógenas utilizan un esquema de varios pasos para producir daño, que es similar al utilizado por otros patógenos de la mucosa, estos consisten en la colonización de un sitio de la mucosa, la evasión de las defensas del hospedero, la multiplicación y el daño al hospedero. La mayoría de las cepas patógenas de *E. coli* permanecen extracelulares, pero EIEC es un verdadero patógeno intracelular que es capaz de invadir y replicarse dentro de las células epiteliales y macrófagos.¹⁹

EAEC causa diarrea aguda o persistente, mientras que los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa con sangre, moco y dolor abdominal, pero en algunos casos sólo se presenta diarrea, lo cual la hace indistinguible de la producida por ETEC. La EC está asociada a la presencia en el lumen intestinal de AIEC, que es muy frecuente en el íleon; sin embargo, el proceso inflamatorio puede ocurrir en todo el tracto gastrointestinal. AIEC se aísla con más frecuencia en la mucosa intestinal de pacientes con EC que en sanos y ADEC se ha asociado más a procesos diarreicos de tipo agudo y persistente, más en niños que en adultos.¹⁸

E. coli es el patógeno más común en entornos hospitalarios y comunitarios, y es capaz de causar infecciones que pueden tener consecuencias graves. Las Quinolonas, uno de los antibióticos más comunes en el uso clínico, son armas eficaces para tratar las infecciones por *E. coli*; sin embargo, la resistencia de *E. coli* a las Quinolonas se desarrolla rápidamente y se propaga ampliamente.²⁰

En los últimos años, en cepas resistentes a Quinolonas también se ha observado un aumento de la resistencia a los Aminoglucósidos en *E. coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), así como no productores de BLEE.²¹

2.1 9 Quinolonas

El inicio de cinco décadas de desarrollo y uso de los antibióticos sintéticos denominados Quinolonas está marcado por el descubrimiento del Ácido Nalidíxico en 1962, molécula derivada de la 1,8-naftiridina, con su introducción en 1967 para uso clínico en el tratamiento de infecciones del tracto urinario ocasionadas por bacterias Gram negativas.²²

Años después, en 1984, debido a la introducción de uno o varios átomos de flúor en el núcleo básico, aparecen las primeras 4-fluorquinolonas, también llamadas Quinolonas de segunda generación, encabezadas por la Norfloxacin y seguida por la Pefloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacina, Fleroxacin y Temafloxacin (esta última fuera del mercado por reacciones adversas graves) todas con una importante actividad contra bacterias Gram negativas y escasa contra Gram positivas (exceptuando estafilococos), buena biodisponibilidad por vía oral y excelente tolerancia. En la década del 90 fueron sintetizados varios componentes de esta familia, con mejoras importantes en su biodisponibilidad, vida media y espectro, específicamente sobre *Streptococcus pneumoniae*, las que han sido clasificadas como Quinolonas de tercera generación (Tosufloxacin, Levofloxacin y Sparfloxacin).²³

En 1997 es creada una nueva clasificación, que más adelante se fue ampliando con la aparición de nuevos compuestos. En los últimos tres años han sido aprobadas cinco nuevas Quinolonas (Moxifloxacin, Gatifloxacin, Clinafloxacin, Trovafloxacin y Sitafoxacin) también conocidas como Quinolonas de cuarta generación, las cuales incluyen en su espectro los gérmenes anaerobios.²²

2.1.10 Clasificación y miembros de las Quinolonas.

De acuerdo con su espectro de actividad, las Quinolonas se clasifican dentro de cuatro distintas generaciones.²³

Tabla 1. Miembros de las Quinolonas.

Generación	Representantes	Espectro de Actividad.
1°	Ácido Nalidíxico, Ácido Oxolínico, Ácido Piromídico, Ácido Pipemídico, Rosoxacina, Cinoxacina, Flumequina	Principalmente enterobacterias Bacilos Gramnegativos: <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp.
2°	Ciprofloxacina, Enoxacina, Fleroxacina, Lomefloxacina, Nadifloxacina, Norfloxacina, Ofloxacina, Pefloxacina, Rufloxacina	Mismas que 1ª generación. Espectro extendido en bacilos Gramnegativos, inicia cobertura contra cocáceas Grampositivas y “atípicos” Bacilos Gramnegativos: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>S. maltophilia</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>Campylobacter</i> spp. Cocáceas Grampositivas: <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> Patógenos atípicos: <i>C. trachomatis</i> , <i>Mycoplasma</i> spp
3°	Levofloxacina, Esparfloxacina, Tosufloxacina, Temafloxacina, Grepafloxacina	Mismas que la 2ª generación. Bacilos Gramnegativos, espectro extendido en cocáceas Grampositivas y “atípicos” Bacilos Gramnegativos: Mismos que en 1ª y 2ª generación Cocáceas Grampositivas: <i>S. pneumoniae</i> y <i>S. pyogenes</i> Patógenos atípicos: <i>C. pneumoniae</i> y <i>M. pneumoniae</i>
4°	Balofloxacina, Clinafloxacina, Gatifloxacina, Gemifloxacina, Moxifloxacina, Pazufloxacina, Arenfloxacina,	Mismas que la 3ª generación. Bacilos Grampositivos, espectro extendido en anaerobios y “atípicos” Cocáceas Grampositivas: <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> (resistente a penicilina)

	Sitafloracina, Rovafloxacina, Trovafloracina	Anaerobios: <i>Bacteroides</i> spp., <i>Clostridium</i> spp. Patógenos atípicos: <i>L. pneumophila</i> , <i>C. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>Ureaplasma</i> spp
--	--	--

Fuente: Álvarez-Hernández *et al.*, 2015.

2.1.11 Mecanismo de acción de las Quinolonas.

En el proceso de acción de las Quinolonas se forma un complejo quinolona-enzima-ADN que bloquea todo el progreso del sistema enzimático de replicación del ADN. Como resultado del daño sobre el ADN bacteriano, se produce la muerte celular después de cada replicación. ³²

Las Quinolonas actúan inhibiendo la actividad de dos topoisomerasas bacterianas de tipo II esenciales, estas son la ADN girasa y la topoisomerasa IV, que participan en la modulación del superenrollamiento cromosómico necesario para la síntesis, transcripción y división celular del ADN. Para ejercer sus efectos antimicrobianos, las Quinolonas son primero transportadas al interior de la célula bacteriana mediante un proceso de difusión simple. Aunque ambas enzimas contribuyen al desenrollamiento del ADN que se requiere para que éste pueda ser procesado, pero funcionan de diferente manera: la girasa remueve superenrollamientos positivos y avanza delante de la horquilla de replicación, mientras que la topoisomerasa IV introduce superenrollamientos positivos avanzando detrás de la horquilla de replicación; esta enzima, además, participa en la segregación de los cromosomas posterior a la división celular. ³³

Las topoisomerasas tipo IIA introducen un par de cortes en la cadena sencilla de ADN, uniéndose covalentemente al extremo 5' formando el complejo ADN-topoisomerasa, lo cual relaja el superenrollamiento de la doble hélice. Las Quinolonas se unen al complejo, atrapando a la topoisomerasa en el ADN, lo que da como resultado la inhibición de la replicación. Este nuevo complejo ternario,

ADN-Topoisomerasa-quinolona, bloquea el movimiento de la horquilla de replicación y de los complejos transcripcionales, inhibiendo el crecimiento bacteriano y causando eventualmente la muerte celular. ²²

2.1.12 Mecanismos de resistencia de las Quinolonas y genes de resistencia involucrados.

La adquisición de resistencia a las Quinolonas puede estar asociada con tres tipos de mecanismos. ³³

- Mutaciones cromosómicas que alteran las enzimas diana y su afinidad de unión a fármacos.
- Mutaciones cromosómicas que conducen a una reducción de la acumulación de fármaco por disminución de la captación o aumento de la salida.
- Genes de resistencia adquiridos por plásmidos que producen proteínas de protección diana, enzimas modificadoras de fármacos o bombas de salida de fármacos.
- Mutaciones en proteínas que producen la reducción de la concentración del fármaco.

Para interactuar con sus dianas citoplasmáticas, las Quinolonas deben atravesar la envoltura bacteriana y las mutaciones resultan en una reducción de la concentración intracelular del fármaco; la resistencia ocasionada por estas mutaciones se debe a una menor afinidad de la quinolona por dicho complejo. ³⁵

A diferencia de las especies Gram positivas, la membrana externa Gram negativa representa una barrera de permeabilidad adicional para los fármacos hidrófilos que no pueden difundirse en la célula debido a la región central del lipopolisacárido (LPS) y, por lo tanto, dependen de los canales de porina de la membrana externa para ingresar a la célula.

Por lo tanto, las mutaciones que resultan en pérdida de porina, regulación a la baja de porina o una modificación del tamaño o conductancia del canal de porina darán

como resultado una difusión limitada, sustancialmente más lenta de Quinolonas y otros fármacos en la célula y, en consecuencia, conducirán a resistencia bacteriana a antibióticos. La reducción o pérdida de expresión de porinas como *OmpF*, *OmpC*, *OmpD* y *OmpA* se ha implicado en una mayor resistencia a los antibióticos como las Quinolonas y otros fármacos.³³

- Mutaciones de genes del sitio diana en topoisomerasas de tipo II

El mecanismo más común de resistencia de alto nivel se debe a mutaciones dentro de las regiones determinantes de la resistencia a las Quinolonas (QRDR) de al menos uno de los genes que codifican los objetivos primarios y secundarios de estos fármacos, las topoisomerasas de tipo II (*gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*). Las mutaciones en los QRDR de estos genes dan como resultado sustituciones de aminoácidos que cambian estructuralmente la proteína diana y, posteriormente, la afinidad de unión al fármaco de la enzima.³³

- Resistencia a Quinolonas determinada por los Genes Plasmídicos.

Actualmente se encuentran descritos tres tipos de genes de resistencia a Quinolonas mediados por plásmidos (PMQR), cuyas variaciones se han reportado en diferentes patógenos alrededor del mundo; genes determinantes de resistencia a Quinolonas: *qnr*; gen variante de la Aminoglucósido acetil transferasa: [*aac(6')-Ib-cr*]; y genes codificadores de bombas de eflujo: (*qepA* y *oqxAB*).²³

1.- Los *qnr*, son genes transferibles y confieren baja resistencia, tanto a Quinolonas como a fluoroquinolonas. Se han identificado cinco familias: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS*.

2.- En 2006, Robicsek y cols., describieron, por primera vez, el gen *aac(6')-Ib-cr*, una nueva variante de la Aminoglucósido acetiltransferasa o Aac(6')-Ib, responsable de la resistencia de cepas de enterobacterias hacia amikacina, kanamicina y tobramicina.³⁵ La enzima *Aac(6')-Ib-cr* se distingue de Aac(6')-Ib por la presencia de dos mutaciones puntuales en la misma; *Trp102*→*Arg* y *Asp179*→*Tyr*, ambas responsables de la reducción de la

susceptibilidad de algunas fluoroquinolonas (norfloxacin, ciprofloxacina), sumando este efecto a otros mecanismos codificados por plásmidos.²³

3.- El gen *qepA* codifica para generar una bomba de eflujo tipo *QepA* que confiere resistencia a Quinolonas hidrofílicas como norfloxacina, ciprofloxacina y enrofloxacina por medio del sistema similar a la súperfamilia de bombas de eflujo tipo facilitador mayor (MFS, por sus siglas en inglés). Este gen se identificó en plásmidos pHPA de *E. coli* C316 y en el plásmido pIP1206 de *E. coli* 1450, aislados en Japón y en Bélgica, respectivamente.

2.1.13 Aminoglucósidos

Los Aminoglucósidos han sido una parte importante del arsenal antimicrobiano desde su introducción en el uso clínico en la década de 1940 con la Estreptomicina.²⁴

La aparición posterior de Kanamicina en 1957 y, más tarde, de Gentamicina y Tobramicina constituyeron verdaderos avances en el tratamiento de las infecciones causadas por bacilos Gramnegativos, de manera que dichos antimicrobianos se convirtieron en el tratamiento habitual de estas infecciones. En la década de 1970, los Aminoglucósidos semisintéticos: Dibekacina, Amikacina y Netilmicina demostraron la posibilidad de conseguir compuestos que fueran activos contra cepas bacterianas que habían desarrollado mecanismos de resistencia frente a los Aminoglucósidos iniciales y mostrar un perfil toxicológico distinto.

Los Aminoglucósidos son antibióticos naturales o semisintéticos derivados de actinomicetos.²⁵

La Estreptomicina se aisló por primera vez a partir de unas cepas de *Streptomyces griseus*. La gentamicina y la Netilmicina se derivan de especies del actinomiceto *Micromonospora*.²⁶

La introducción de agentes eficaces y menos tóxicos, como los antimicrobianos β -lactámicos de amplio espectro, alejó el uso de Aminoglucósidos, la reciente aparición de patógenos Gramnegativos multirresistentes y extensivamente farmacorresistentes ha despertado un interés renovado en los Aminoglucósidos,

incluido el desarrollo de nuevas moléculas con potente actividad contra patógenos que de otro modo serían altamente resistentes. ²⁴

2.1.14 Clasificación y miembros de los Aminoglucósidos.

Teniendo en cuenta su estructura química, el término más adecuado para denominar a este grupo de antibióticos sería el de Aminoglucósidos aminociclotoles, ya que están formados por un anillo aminociclitol de 6 carbonos, unido de manera covalente a diferentes grupos de aminoazúcares. La Espectinomicina, por ejemplo, está formada únicamente por un anillo aminocicletol y por tanto no es estrictamente un Aminoglucósido ²⁶

Tabla 2. Miembros de los Aminoglucósidos.

Aminoglucósidos con anillo aminociclitol	Aminociclitol sin aminoglucósido
Familia estreptomina → Estreptomina	Espectinomicina
Familia kanamicina → Kanamicina, Amikacina, Tobramicina, Dibekacina	
Familia gentamicina Gentamicina --→ Netilmicina, Sisomicina Isepamicina	
Familia neomicina → Neomicina Paromomicina	

Fuente : Tsodikova Garneau *et al.*, 2016.

2.1.15 Mecanismo de acción de los Aminoglucósidos.

Los Aminoglucósidos tienen actividad bactericida en la que se unen a la subunidad 30S del ribosoma de las bacterias. Específicamente, se cree que se unen al sitio A (aminoacilo) del ARNr 16S, un componente de la subunidad ribosómica 30S. A través de esta unión, el código genético se lee mal y se interrumpe la traducción, lo que hace que las bacterias no puedan realizar la síntesis de proteínas. ²⁷

Los Aminoglucósidos se difunden a través de canales acuosos formados por proteínas de porina en la membrana externa de las bacterias Gramnegativas para ingresar al espacio periplasmático. Una vez dentro de la célula, los Aminoglucósidos se unen a los polisomas e interfieren en la síntesis de proteínas, al causar una lectura incorrecta y la terminación prematura de la traducción del mRNA.²⁸

2.1.16 Mecanismo de resistencia de los Aminoglucósidos y genes de resistencia involucrados.

Las bacterias pueden ser resistentes a los Aminoglucósidos a través de:

- Inactivación del fármaco por las enzimas microbianas.
- Falla del antibiótico para penetrar intracelularmente.
- Baja afinidad del fármaco por el ribosoma bacteriano.
- Mutaciones y modificaciones ribosómicas.

Tanto en eucariotas como en bacterias, la traducción de proteínas se produce en el ribosoma. El ribosoma bacteriano consta de una subunidad grande (50S) compuesta por ARNr 5S y 23S y 34 proteínas y una subunidad pequeña (30S) compuesta por ARNr 16S y 20 proteínas.²⁹

La resistencia a Aminoglucósidos puede surgir de mutaciones en el gen *rrs*, que codifica el ARNr 16S, que dificulta la unión de Aminoglucósidos. Sin embargo, estas mutaciones no son muy comunes, ya que los cambios en esta maquinaria celular vital suelen ser letales.²⁸

- Enzimas modificadoras de Aminoglucósidos

El mecanismo principal de resistencia a los Aminoglucósidos en *E. coli* es la modificación enzimática que involucra a tres familias de enzimas: acetiltransferasas (AAC), nucleotidil (adenil) transferasa (ANT) y fosfotransferasas (APH).³⁰

- Bombas de Eflujo.

La principal bomba de eflujo de Aminoglucósidos en bacterias Gram-negativas es AcrAD, es un transportador de múltiples fármacos y un miembro de la familia de

bombas de eflujo de resistencia-nodulación-división (RND). El nombre AcrAD describe un sistema de tres componentes que abarca la envoltura celular; AcrD se extiende por la membrana celular más interna y funciona como un antiportador fármaco-protón. AcrA es una proteína de fusión de membrana que se encuentra en el periplasma y TolC es el componente de la membrana externa de la bomba.²⁹

- Modificación de la membrana Celular.

Las modificaciones de las composiciones de la pared celular pueden hacer que sean incluso menos permeables. Debido a sus estructuras catiónicas e hidrófilas, se ha planteado la hipótesis de que los Aminoglucósidos penetran las paredes de las células bacterianas a través de canales de porina en lugar de la difusión directa a través de la bicapa de fosfolípidos. Sin embargo, algunos experimentos han demostrado que los mutantes deficientes en porina todavía son capaces de captar Aminoglucósidos.²⁹

3. Antecedentes

3.1. Antecedentes generales

A la fecha no existen estudios que se enfoquen al estudio de la resistencia en AIEC, lo cual perjudica el tratamiento oportuno, ya que se desconoce la frecuencia de resistencia al antibiótico más utilizado en estos pacientes que es la Ciprofloxacina, sin embargo, entre los pocos estudios se encuentran los siguientes antecedentes.

En 2020 en España, Medina Martínez y colaboradores, examinaron la resistencia antimicrobiana de cepas de AIEC para identificar terapias efectivas. Esta resistencia fenotípica se hizo a 30 antimicrobianos de acuerdo con los estándares del CLSI, donde la proporción de cepas resistentes en Aminoglucósidos y Quinolonas resulto similar entre las cepas AIEC y no AIEC, además de que el 30% de las cepas fueron resistentes a la estreptomicina, pero no a otros Aminoglucósidos que fueron probados, como la Gentamicina y la Amikacina.³⁶

Abdelhalim 2020, Turquía, aislaron cepas de *E. coli* de 17 pacientes con EC y 14 pacientes control, 10 y 7 respectivamente; donde la mayoría 8/10 (80 %) de las cepas similares a AIEC aisladas de pacientes con EC fueron resistentes a antibióticos de la clase Penicilina/Betalactámicos y Aminoglucósidos, mientras que los restantes 15 aislamientos fueron susceptibles.³⁷

3.2. Antecedentes específicos

En Puebla, México en 2018, Barrios Villa y colaboradores estudiaron mediante el uso de protocolos de PCR convencionales la resistencia de un conjunto de cuatro cepas de *E. coli* CTX^R ST131 O25:H4/H30-Rx recolectadas de heces de donantes sanos, y caracterizadas fenotípicamente como AIEC, donde analizaron los patrones de los genes de virulencia y se compararon con los virotipos reportados previamente, ya que recientemente se había reportado el clon ST131 de *E. coli* implicado en infecciones multirresistentes, la mayoría perteneciente al serotipo O25:H4 y clasificado en cinco virotipos principales de acuerdo con los genes de virulencia portados. Además, realizaron PCR y secuenciación de los genes *gyrA* y *parC* de las cuatro cepas de donantes sanos, obteniendo la mutación clásica (S80I y E84V para *parC* y S93L y E97N o S93I y E97V para *gyrA*), mostrando altas tasas de resistencia a las fluoroquinolonas solo detectando mutaciones puntuales en estos genes.

Debido a los diferentes patrones de resistencia encontrados en las cuatro cepas, no observaron una relación entre resistencia y virulencia que sugiriera una coocurrencia de estos rasgos en elementos genéticos móviles, como transposones, plásmidos, bacteriófagos e islas de patogenicidad.

También encontraron patrones de virulencia no reportados, donde ninguno pertenecía a los virotipos que normalmente pertenecen al ST131 clásico, sugiriendo una distribución endémica de genes de virulencia y dos nuevos virotipos, las cuatro cepas estudiadas pertenecían al patotipo AIEC, siendo este el primer reporte de AIEC en México.³⁸

En 2019 Barrios Villa y colaboradores, estudiaron los genomas de cinco cepas AIEC, esto por la demostrada asociación entre la EC y los aislados de este patotipo, destacando 4 islas genómicas novedosas para AIEC y un análisis filogenético que sugiere un nuevo patotipo, mostrando una coexistencia entre los factores de virulencia y resistencia antimicrobiana, con implicaciones en hospederos susceptibles.³⁹

Se analizaron las variaciones en el alelo *fimH* de las fimbrias de tipo I, que están implicadas en la patogenicidad y la asociación con la resistencia a los antimicrobianos. En las cepas ST131 de *E. coli*, *fimH-30-R* relacionado con la resistencia a las Quinolonas, mientras que el *fimH-30-Rx* está relacionado con las β -lactamasas y la resistencia a las Quinolonas. En el análisis se mostró que las cepas de humanos sanos compartían la variante *fimH* (30) y el filogrupo (B2) con la cepa 01 de AIEC incluso cuando están separadas filogenéticamente.

De la misma manera, se identificaron otros factores de virulencia ausentes en las cepas de control AIEC. Cinco sistemas fimbriales diferentes (incluyendo EhaG, YehA/D, PapG, F17D-G y una adhesina no fimbrial), dos sistemas de absorción de hierro (FeuC e IucD) y cuatro toxinas (CbtA, VgrG-1, Cnf1 y HlyE) presentes entre las cinco cepas.³⁹

4. Justificación

Las causas de la EII son variadas, lo que conlleva, algunas ocasiones, a un tratamiento inadecuado en etapas tempranas. Una de las causas que puede estar involucrada en el origen y/o evolución de este padecimiento, es la colonización e invasión de bacterias como *E. coli* Adherente/Invasiva, que, al proliferar en cantidades importantes, ocasiona una respuesta inflamatoria excesiva en el intestino del hospedero, provocando una respuesta mediada por distintos factores inmunológicos que serían los responsables de desencadenar la cascada inflamatoria con lesión de la mucosa intestinal. El tratamiento de padecimientos asociados a *E. coli* incluye familias de antibióticos ampliamente utilizados en la clínica, como las Quinolonas y los Aminoglucósidos; sin embargo, la creciente

resistencia a estos antimicrobianos complica la erradicación de clonas patógenas. Por lo que el presente estudio pretende analizar los mecanismos de resistencia a Quinolonas y Aminoglucósidos en cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII, a fin de estudiar la asociación de clonas resistentes a estos antimicrobianos.

5. Planteamiento del problema

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal asociada a AIEC es un padecimiento complejo de tratar debido a las altas tasas de resistencia de esta bacteria a Quinolonas y Aminoglucósidos.

6. Hipótesis científica

La EII está asociada a clonas de *E. coli* resistentes a Quinolonas y Aminoglucósidos.

7. Objetivos

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

7.1. Objetivo general *in silico*

Realizar una revisión bibliográfica sobre estudios reportados de la presencia de cepas de *Escherichia coli* Adherente/Invasiva (AIEC) en el desarrollo de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), así como los mecanismos de resistencia a antibióticos de las familias de Quinolonas y Aminoglucósidos, depositados en la base de datos del GenBank.

7.1.2 Objetivos específicos *in silico*

1. Realizar una búsqueda sistemática en la base de datos PubMed para identificar bibliografía relevante que informe sobre la presencia de AIEC en la EII, sin incluir un límite para el año de publicación del reporte.

2. Seleccionar aquellos artículos que detallen la presencia de genes de resistencia hacia las familias de Quinolonas y Aminoglucósidos.

7.2 Objetivo general experimental

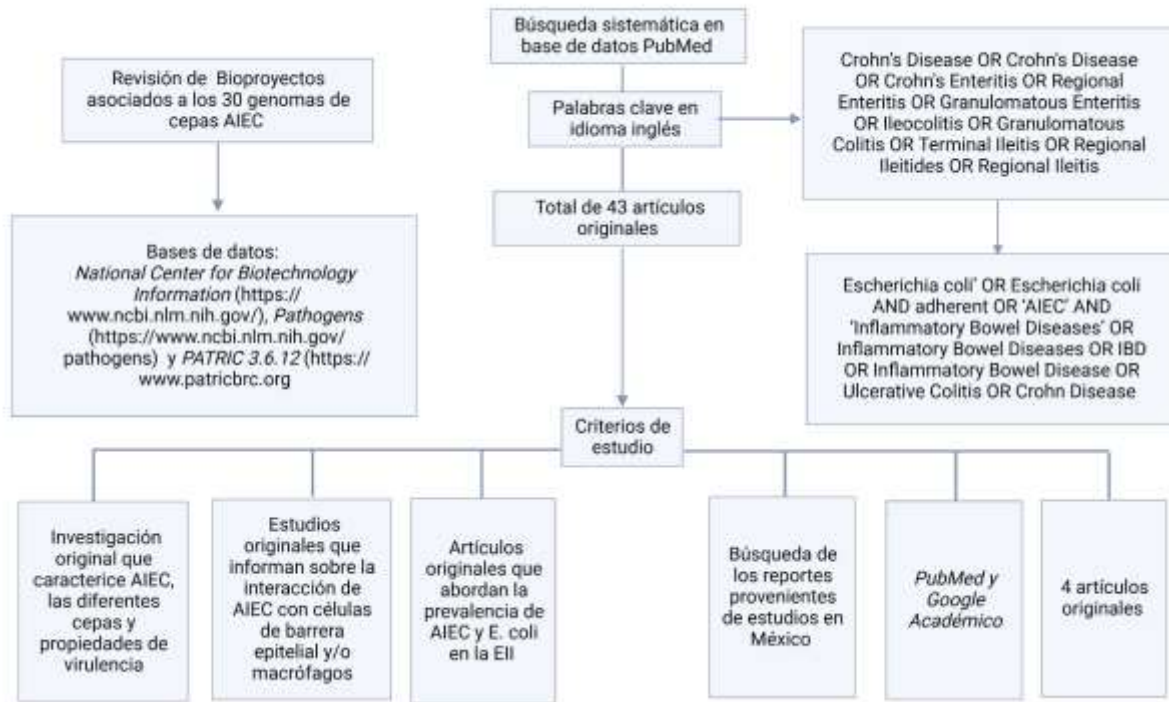
1. Determinar la resistencia a antibióticos de las familias de Quinolonas y Aminoglucósidos en cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII.

7.2.1 Objetivos específicos experimentales

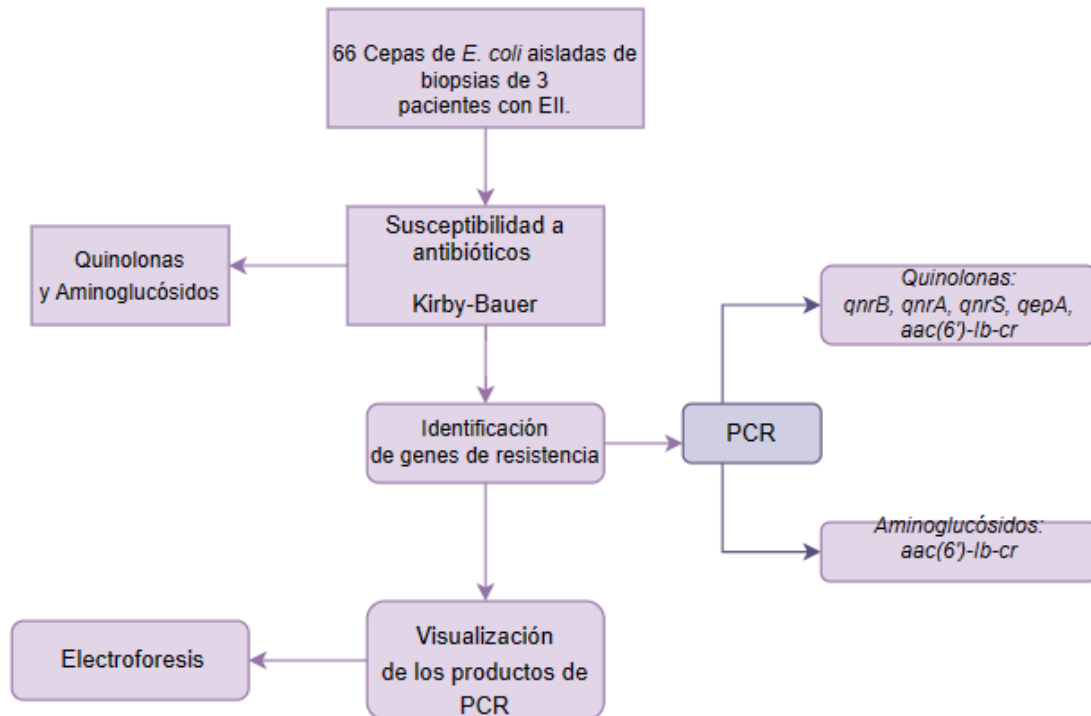
1.- Determinar el perfil de susceptibilidad a Quinolonas y Aminoglucósidos en las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII.

2.- Determinar la presencia de los genes plasmídicos *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* y *qepA* en los aislamientos.

7. 3 Estrategia de trabajo *in silico*.



7. 4 Estrategia de trabajo experimental



8. Material y métodos

8.1. Diseño del estudio

Observacional, ambilectivo.

Se analizó de forma experimental el fenotipo y genotipo de resistencia a Quinolonas y Aminoglucósidos en cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de 3 pacientes con EII. Este fue un estudio prospectivo que permitió analizar los resultados obtenidos y establecer si existe una posible asociación entre la presencia de *E. coli* y la resistencia a estos grupos de antibióticos.

8.2. Ubicación espacio-temporal

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

8.3. Muestreo

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

8.3.1. Definición de la unidad poblacional

El estudio incluyó 66 cepas de *E. coli* aisladas de 3 pacientes con EII.

8.3.2. Selección de la muestra

Aleatoria, no consecutiva y a conveniencia y disposición.

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

8.3.3. Criterios de selección de las unidades de muestreo

8.3.3.1. Criterios de inclusión

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

8.3.3.2. Criterios de exclusión

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

8.3.3.3. Criterios de eliminación

Cepas no identificadas como *E. coli*.

8.3.3.4 Diseño y tipo de muestreo

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

8.3.3.5. Tamaño de la muestra

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

8.4. Definición de las variables y escala de medición.

Las escalas de medición para la susceptibilidad a antibióticos son las establecidas en los criterios del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) 2022, el cual ayuda a determinar si existe resistencia, resistencia intermedia o sensibilidad a los 6 antibióticos que se analizaron en este estudio.

8.5 Metodología *in silico*

Se realizó una búsqueda de la literatura para identificar todas las citas relevantes que han informado sobre la presencia de AIEC en el intestino de pacientes con EII, sin incluir un límite para el año de publicación del reporte.

8.5.1 Procedimiento *in silico*

Se realizó una búsqueda sistemática en la base de datos PubMed utilizando las siguientes palabras clave en idioma inglés: 'Escherichia coli' OR Escherichia coli

AND adherent OR 'AIEC' AND 'Inflammatory Bowel Diseases' OR Inflammatory Bowel Diseases OR IBD OR Inflammatory Bowel Disease OR Ulcerative Colitis OR Crohn Disease OR Crohn's Disease. Se recuperó un total de 145 artículos originales. Esta búsqueda se complementó con una revisión manual de la lista de referencias de los estudios encontrados previamente.

Para la creación de las imágenes para la descripción de dicha revisión bibliográfica se utilizó la página [Biorender.com](https://biorender.com)

8.6 Método Bionfórmatico

Para determinar la presencia de genes plasmídicos *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6)-Ib-cr* y *qepA* en los aislamientos, se procedió a comprobar el tamaño de amplificación por medio de la base de datos NCBI y bioinformatics.org.

8.6.1 Procedimiento Bionfórmatico.

Se realizó una búsqueda en NCBI con el nombre del gen de interés, el cual desplegaba distintas opciones, por lo que se fue examinando de uno en uno.

Se copió la secuencia FASTA del gen seleccionado y se pegó en una hoja de Word, posteriormente con la herramienta buscar se pegaron los oligonucleótidos "Forward" descritos en la Tabla 5 de metodología experimental para así encontrarlos en la secuencia y resaltarlos con un marcador de color.

El complemento inverso del primer "Reverse" se buscó en la página: "Complement reverse" bioinformatics.org, y se localizó en la secuencia FASTA diferenciándolo con otro marcador de color. Finalmente se seleccionó desde el primer F hasta el R para usar el contador de palabras y confirmar el tamaño correcto del gen.

8.7 Método y recolección de datos experimental

La susceptibilidad a antibióticos y el fenotipo BLEE se determinó mediante la técnica de Kirby-Bauer y siguiendo lo establecido en el CLSI 2022.

La amplificación de los genes involucrados en la resistencia a Quinolonas y Aminoglucósidos se llevó a cabo siguiendo los métodos de PCR y electroforesis, bajo las condiciones estandarizadas en el LMHyC.

Los datos fueron recolectados en tablas y formatos Excel, para su posterior análisis.

8.7.1 Técnicas y Procedimientos (experimental).

8.7.2 Cepas de *E coli*

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

Las biopsias fueron obtenidas en centros de salud por personal capacitado. Posteriormente, fueron llevadas al LMHyC y procesadas por la médico pasante Norarizbeth Lara Flores (alumna de servicio social en 2017-2018), para así aislar, identificar y conservar a las cepas de *E. coli* como se ilustra en la figura 1. Cabe mencionar que se obtuvieron 38, 22 y 7 colonias de *E. coli* de las biopsias de cada paciente, respectivamente; por lo que se consideraron como clonas diferentes y se trabajará con todas ellas en el presente protocolo.

Tabla 3. Origen de las cepas de *E. coli* a estudiar.

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

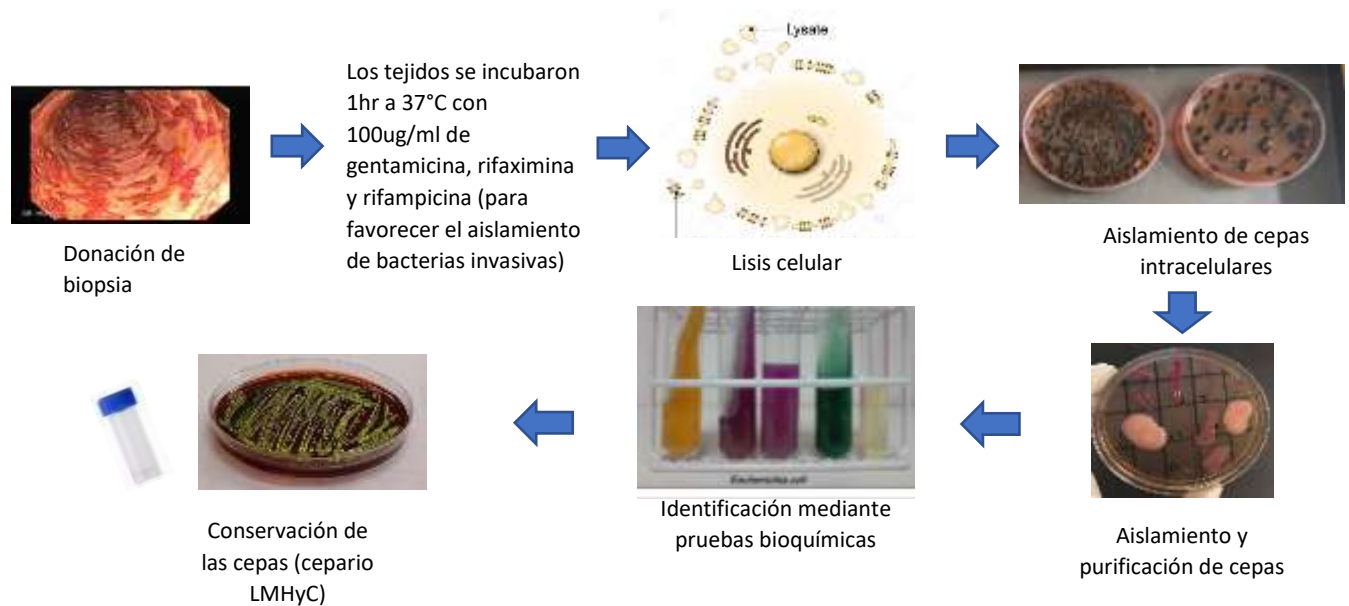


Figura 1. Procesamiento de las biopsias para el aislamiento de *E. coli*.

8.7.3 Susceptibilidad a antibióticos

Para conocer la susceptibilidad a antibióticos, se utilizó el método de Kirby-Bauer y se evaluaron 6 antibióticos, siguiendo la guía del CLSI 2022: Ácido Nalidíxico (NA), Ciprofloxacino (CIP), Gentamicina (GEN), Estreptomina (EST), Amikacina (AMK) y Tobramicina (TOB).

El método de Kirby-Bauer consiste en un antibiograma por difusión de sensidiscos impregnados de cada antibiótico a ensayar, por lo tanto, se utilizó para conocer la susceptibilidad a antibióticos y el fenotipo BLEE.

Procedimiento: De un cultivo previo en agar soya triptica (TSA) por estría cruzada (incubado a 37° C por 24 horas) se tomaron con un asa bacteriológica las colonias aisladas (entre 3-6) y se llevaron a un tubo con 5 mL de Solución Salina isotónica (SSI) al 0.85% masa/volumen de NaCl, para tener una mezcla homogénea

y así poder ajustar la turbidez a 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro equivalente a 0.5 en escala de McFarland. Una vez obtenida esta turbidez se impregnó un hisopo con dicha suspensión y en una placa de agar Muller-Hinton se inocularon utilizando el hisopo, cubriendo el diámetro de la placa para después de extremo a extremo cubriendo el área de la placa de arriba abajo y girando la placa 45° , realizando esto un total de tres veces y al finalizar se pasó el hisopo por la circunferencia de la placa tres veces. La distribución de los sensidiscos se realizó en una sola placa.

Siguiendo la guía del CLSI 2022, se interpretaron los resultados de acuerdo con la siguiente tabla 4; donde se detallan las concentraciones por sensidisco de los antibióticos previamente seleccionados y el diámetro del halo de inhibición que debe tomarse en consideración para conocer la susceptibilidad a dicho antibiótico:

Tabla 4. Antimicrobianos y valores de corte utilizados en la prueba de susceptibilidad.

Grupo o familia	Antimicrobiano	Concentración (µg)	Halo de inhibición (mm) y criterio de interpretación ^a			
			S	SDD	I	R
Quinolonas	Ácido Nalidíxico (ANA)	30	≥19		14-18	≤13
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino (CIP)	5	≥21		16-20	≤20
			≥31		21-30	≤15
Aminoglucósidos	Gentamicina (GEN)	10	≥15		13-14	≤12
	Tobramicina (TOB)	10	≥15		13-14	≤12
	Amikacina (AMK)	30	≥17		15-16	≤14
	Estreptomina (EST)	10	≥15		12-14	≤11

Fuente: CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100... 2022; 32e

8.7.4 Obtención de ADN bacteriano

Con la finalidad de caracterizar los mecanismos de resistencia a Quinolonas y Aminoglucósidos, se procedió a obtener el templado a usar como material genético mediante el método de hervido.

8.7.5 Técnica de hervido.

Con esta técnica se provocó la ruptura celular mediante ebullición, lo que ocasionó la liberación del ADN bacteriano (templado).

A partir de un cultivo puro de 24 h de crecimiento se realizó la siguiente metodología:

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

8.7.6 Cuantificación de ADN

La concentración y pureza del ADN se midió en el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific®) a una absorbancia de 260 y 280 nm. La lectura a 260 nm refleja la concentración de ADN, considerando 1 unidad de densidad óptica equivalente a 50 ug/ml de ADN de doble cadena; mientras que la pureza (únicamente del ADN puro, no del templado) se determina por el cociente entre las absorbancias obtenidas a 260 nm y a 280 nm. Una preparación pura de ADN es aquella con un cociente entre 1.8 y 2.0, siendo menor en caso de que hubiera proteínas o restos de algún reactivo usado en la extracción. La concentración utilizada en las PCR deberá estar en el rango de 300-600 ng/ul.

8.7.7 Caracterización de genes de resistencia

En base al perfil de resistencia, se utilizó una selección de oligonucleótidos específicos para amplificar determinantes de resistencia mediante la técnica de PCR (Tabla 5).

Todos los productos de PCR fueron comparados con un control positivo (previamente secuenciado) para determinar la variante de cada gen. *E. coli* C1550 fue usada como control positivo del gen *qepA*;⁴⁰ *E. coli* C7210 como control para el gen *qnrA*, *E. coli* C7222 como control de los genes *qnrB*, *aac(6')Ib-cr*.⁴¹ Para el gen *qnrS* no se tiene control positivo en el laboratorio, por lo que se considera como resultado presuntivamente positivo aquella banda que corresponda al tamaño esperado en comparación con el marcador de peso molecular.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la identificación de genes de Quinolonas y Aminoglucósidos, así como las condiciones de amplificación y el tamaño del producto de PCR se muestran en la tabla 5:

Tabla 5. Oligonucleótidos y condiciones de reacción utilizados en la amplificación de genes de resistencia a Quinolonas y Aminoglucósidos.

Oligonucleótidos (Secuencia 5' - 3')	Condiciones de amplificación	Referencia (tamaño)	Control positivo
<p>*qnrA</p> <p>QnrAm-F: AGAGGATTTCTCACGCCAGG</p> <p>QnrAm-R: TGCCAGGCACAGATCTTGAC</p>	<p>95°C 10 min. 1 ciclo</p> <p>95°C 45 seg.</p> <p>56°C 1 min. 25 ciclos</p> <p>72°C 15 seg.</p> <p>72°C 3 min. 1 ciclo</p>	<p>Kraychete <i>et al.</i>, 2016</p> <p>(579 pb)</p>	CUA44
<p>*qnrB</p> <p>QnrB-F: GGMATHGAAATTCGCCACTG</p> <p>QnrB-R: TTTGCGYYCGCCAGTCGAA</p>	<p>95°C 5 min. 1 ciclo</p> <p>95°C 1 min.</p> <p>56°C 1 min. 35 ciclos</p> <p>72°C 1 min.</p> <p>72°C 7 min. 1 ciclo</p>	<p>Cattoir <i>et al.</i>, 2008</p> <p>(263 pb)</p>	C3305
<p>*qnrS</p> <p>QnrSm-F: GCAAGTTCATTGAACAGGGT</p> <p>QnrSm-R: TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG</p>	<p>95°C 5 min. 1 ciclo</p> <p>95°C 1 min.</p> <p>55°C 1 min. 35 ciclos</p> <p>72°C 1 min.</p> <p>72°C 7 min. 1 ciclo</p>	<p>Cattoir <i>et al.</i>, 2008</p> <p>(427 pb)</p>	No tiene

*aac(6')-Ib aac(6')-Ib-F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA aac(6')-Ib-R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 45 seg. 60°C 45 seg. 20 ciclos 72°C 45 seg. 72°C 5 min. 1 ciclo	Park <i>et al.</i> , 2006 (482 pb)	A23EC
*qepA QepA-Fnew: GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG QepA-R: CAACTGCTTGAGCCCGTAG	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 45 seg. 57°C 45 seg. 35 ciclos 72°C 45 seg. 72°C 5 min. 1 ciclo	Chirani <i>et al.</i> , 2017 (131 pb)	C1550

*Se ajustaron condiciones de amplificación y controles positivos.

Para realizar las reacciones de PCR se utilizaron los siguientes termocicladores: Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems), T3 y T3000 thermocycler (Biometra), T Professional TRIO Thermocycler (Biometra) y Multigene™ Mini.

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

Tabla 6. Componentes y cantidades utilizados en cada PCR.

Componente (distribuidor)	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Oligonucleótido “forward” (Sigma)	25 uM	0.3 ul	0.3 uM
Oligonucleótido “reverse” (Sigma)	25 uM	0.3 ul	0.3 uM
BIOTAQ™DNA Polimerasa (Bioline)	5 U/ul	0.1 ul	.5 U
Tampón de reacción NH ₄ (Bioline)	10 X	1 ul	10 X
MgCl ₂ (Bioline)	25 mM	1 ul	25 mM
dNTPs mix (Sigma Aldrich)	10 mM	0.4 ul	4 mM
DNA	---	0.5 ul	0.5 ul
Agua miliQ estéril	---	----	---
		50 ul	

8.7.8 Visualización de los productos de PCR

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

8.8 Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados para conocer el fenotipo, la susceptibilidad y resistencia a antibióticos.

9. Resultados

9.1 Objetivo *in silico*

9.1.1 Objetivo 1. Búsqueda sistemática en la base de datos PubMed

Se realizó una revisión de la literatura con el fin de explorar los avances científicos sobre la participación de AIEC como agente causal de EII, ya que produce una invasión intestinal que conlleva a una respuesta inflamatoria.

Esta búsqueda sistemática en la base de datos de PubMed se llevó a cabo utilizando palabras clave en el idioma inglés: 'Escherichia coli' OR Escherichia coli AND adherent OR 'AIEC' AND 'Inflammatory Bowel Diseases' OR Inflammatory Bowel Diseases OR IBD OR Inflammatory Bowel Disease OR Ulcerative Colitis OR Crohn Disease OR Crohn's, complementando con artículos de revisión relevantes sobre el tema.

Los criterios que se incluyeron son investigaciones originales sobre diferentes estudios que informaran sobre la interacción de AIEC con células de barrera y/o macrófagos; y artículos que abordaran la prevalencia de AIEC y *E. coli* en la EII.

***Escherichia coli* Adherente-Invasiva y la EC**

La EC es una enfermedad multifactorial cuya etiología involucra factores ambientales, genéticos, inmunológicos e infecciosos, donde la prevalencia de las cepas de AIEC incrementan las lesiones intestinales en pacientes con este padecimiento.⁴²

Las cepas de AIEC se caracterizan principalmente por su fenotipo cuando interactúan con células eucariotas, concretamente por su adhesión e invasión de células epiteliales intestinales, además de su supervivencia y replicación dentro de los macrófagos sin inducir la apoptosis. La única forma de identificar de manera eficiente las cepas de AIEC es realizando ensayos sobre la interacción entre las bacterias y las células intestinales.

Las primeras cepas de AIEC fueron aisladas a partir de biopsias de pacientes con EC, alrededor del año 1998, exactamente en Lille, Francia, desde entonces, se han identificado diversas cepas a partir de lesiones ileales en otros pacientes.⁴³

La cepa LF82, la cual ha sido constantemente analizada por su relación con este patotipo,⁴⁴ revela la presencia de diversos factores importantes involucrados en la virulencia; sin embargo, las cepas pueden evolucionar de forma independiente a través de adaptaciones al entorno Intestinal.

Mecanismo de Patogenicidad

AIEC induce lesiones inflamatorias en las células epiteliales por medio de fimbrias tipo 1 y fimbrias polares largas. Las Fimbrias tipo 1 son apéndices bacterianos filamentosos comunes que están en la subunidad principal *FimA* y tres subunidades menores, *FimF*, *FimG* y *FimH*,⁴³ esta última subunidad se encuentra en la punta de las fimbrias, y se une a la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno

6 (CEACAM6) expresándose en el lado apical de las células epiteliales intestinales.⁴⁵

Como mecanismo clave en la defensa del huésped para limitar la replicación intracelular de AIEC está la autofagia, la cual es una vía catabólica general involucrada en el mantenimiento de la homeostasis celular, y la cual es activada por el factor de transcripción inducible por hipoxia HIF1.⁴⁶

La translocación de AIEC también puede ocurrir por medio de las células M, que están optimizadas para la adherencia del antígeno y transporte de microorganismos.⁴⁷

La disfunción tanto en la autofagia como en HIF1 se ha visto implicada en un aumento de enfermedades humanas, incluida la EII como EC; sin embargo, en 2020 Sun y colabs., investigaron cómo la inflamación intestinal en la EC se asocia con un aumento de la modificación de O-GlucosilNAcetilación, que se requiere para la activación de NF-kB y la supresión de la autofagia, por lo que dirigirse a O-GlcNAc podría ser una terapia eficaz para la EII.⁴⁸

Ver la versión completa de esta revisión bibliográfica en el anexo 1.

9.1.2 Objetivo 2. Artículos sobre presencia de genes de resistencia hacia las familias de Quinolonas y Aminoglucósidos.

El progresivo conocimiento de que la EII no es una sola enfermedad, sino un grupo de enfermedades con diferentes caminos que llevan a un punto final común de inflamación intestinal granulomatosa tiene implicaciones fundamentales para la terapia.

La disbiosis de la microbiota intestinal se reconoce como un sello distintivo de la EII, pues conduce al crecimiento excesivo de enterobacterias, incluidas las cepas *E. coli* del grupo AIEC, particularmente predominantes, para lo cual se han planteado tratamientos antibióticos a largo plazo con Quinolonas, como, por ejemplo, ciprofloxacina utilizados con frecuencia para tratar la EC, sin embargo, se asocian con un alto riesgo de efectos adversos que resultan en intolerancia al tratamiento.⁴⁹

Actualmente se encuentra poca información en la literatura sobre ensayos de resistencia fenotípica y sobre todo genotípica en cepas AIEC asociadas con la EII, pues los ensayos clínicos de antimicrobianos contra *E. coli* en la EC que se basan en pruebas de susceptibilidad en lugar de selección empírica, tienen más probabilidades de demostrar resultados válidos de dicha terapia.

Entre los resultados que hay sobre estudios realizados se encuentra el de Martínez–Medina, 2020, en el cual se describen características de cepas y perfiles de resistencia, entre Betalactámicos, Quinolonas, Fluoroquinolonas, y Aminoglucósidos, en 49 cepas de *E. coli* que se aislaron de pacientes con EC y sujetos de control a 30 antimicrobianos. Los resultados demostraron susceptibilidad a cefepima, ertapenem, imipenem, amikacina, gentamicina y tigeciclina, mientras que la proporción de cepas resistentes a otros antimicrobianos como Tetraciclinas, Aminoglucósidos y Quinolonas fue similar entre las cepas AIEC y no AIEC; además, el 30% de las cepas eran resistentes a la estreptomina, pero ninguna de ellas era resistente a otros Aminoglucósidos probados, como la amikacina o la gentamicina, con la excepción de una cepa, que fue resistente a la kanamicina.⁵⁰

Otro estudio sobre Quinolonas es el de Dogan 2013, en el cual se estudiaron a pacientes con EC colonizados por AIEC que demostraban resistencia a la ciprofloxacina teniendo implicaciones sustanciales para esta estrategia terapéutica. La ausencia de resistencia a la ciprofloxacina en *E. coli* de pacientes control sugiere que la resistencia podría adquirirse durante el tratamiento, pero no se obtuvo asociación estadísticamente significativa ($P= 0,6$) entre la historia del tratamiento con ciprofloxacina y *E. coli* resistente a ese antibiótico.⁵¹

Si bien la resistencia a ciprofloxacina, tetraciclina, trimetoprima, claritromicina y rifampicina estaba presente en 6/8 pacientes con EC colonizados por AIEC, ninguna de estas cepas fue paralelamente resistente a ciprofloxacina, tetraciclina y trimetoprima. También reportaron respuestas sinérgicas a la terapia combinada con ciprofloxacina, tetraciclina y trimetoprima en *E. coli* asociada a la EC, por lo que el tratamiento combinado podría proporcionar una estrategia de tratamiento más eficaz que la monoterapia cuando se dirige a la AIEC asociada a EC.⁵¹

Otro estudio encontrado es el de Abdelhalim 2020, Turquía, en el cual se aislaron cepas de *E. coli* de 17 pacientes con EC y 14 pacientes control, 10 y 7 respectivamente; donde obtuvieron en la mayoría de las cepas resistencia a los antibióticos (71%) a comparación de los pacientes sanos (29%).³⁷

La mayoría 8/10 (80 %) de las cepas similares a AIEC aisladas de pacientes con EC fueron resistentes a antibióticos de la clase Penicilina/Betalactámicos y Aminoglucósidos, mientras que los restantes 15 aislamientos fueron susceptibles.

Con respecto a las cepas no similares a AIEC, la mayoría de los aislados de EC fueron sensibles a todos los antibióticos, excepto 2 aislados de 6 que fueron resistentes a Penicilina/Betalactámico, Cefalosporina y antibióticos de la clase de los Aminoglucósidos.³⁷

9.2 Objetivos experimentales

9.2.1 Objetivo 1: Determinar el perfil de susceptibilidad a Quinolonas y Aminoglucósidos.

Para las 66 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII se determinó el perfil de resistencia por el método de Kirby-Bauer, como se describe en material y métodos, y en la Imagen 1.

De los cuatro antibióticos Aminoglucósidos analizados (GEN, AMK, TOB, EST), solo a GEN y AMK se pudo analizar el esquema completo de 66 cepas, inicialmente contemplado, mientras que para TOB y EST sólo se realizó antibiograma a 29 cepas (tabla 8), esto debido a la no disponibilidad de sensidiscos de estos antibióticos, para poder completar el experimento. En el caso de la cepa CUA7 para EST se tuvo un detalle técnico, donde en la misma placa se puso un doble disco del mismo antibiótico, por lo que se marca también como cepa faltante en color azul.

Los resultados de dicho procedimiento se muestran en la tabla 7.

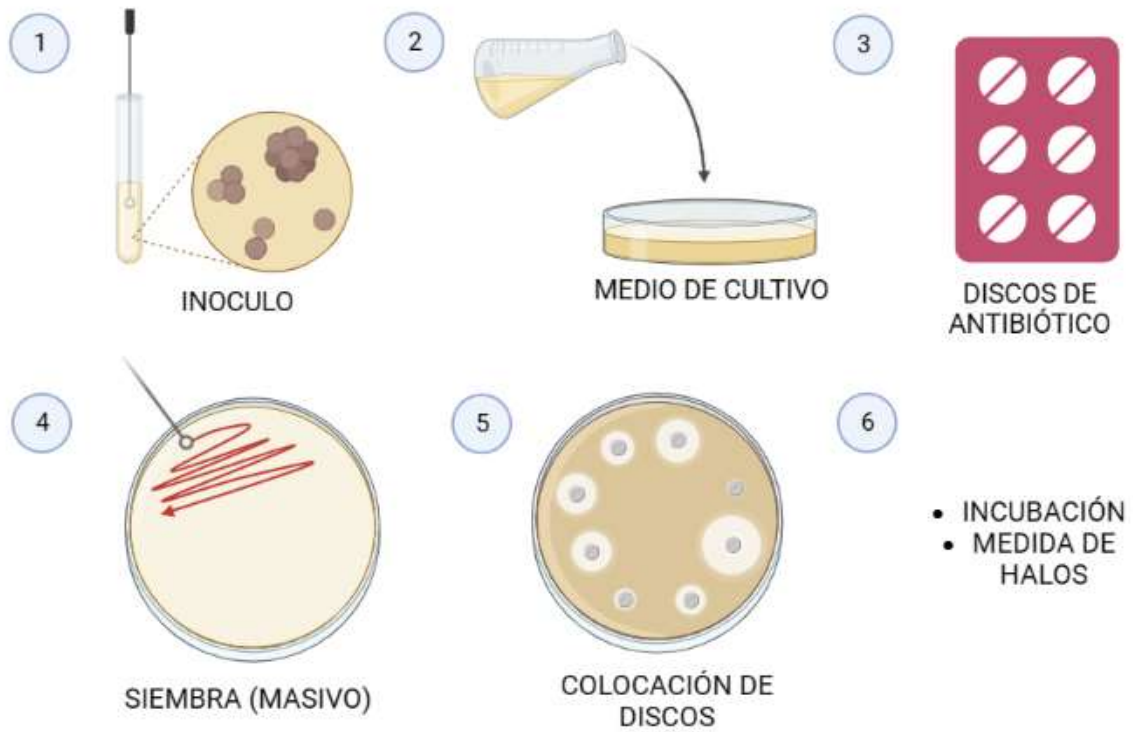
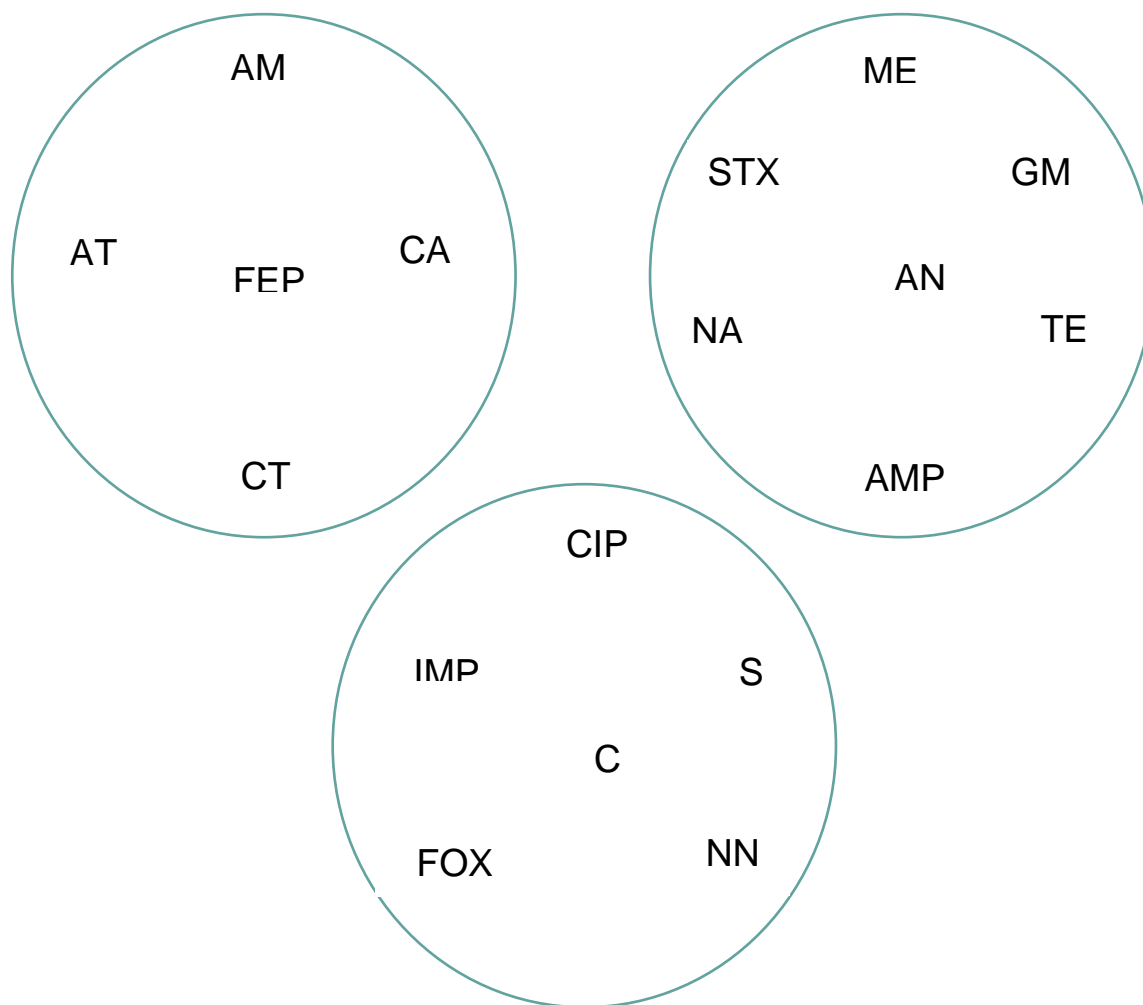


Figura 2. Determinación del perfil de resistencia por el método de Kirby-Bauer.

Figura 3. Distribución de placas utilizada para antibiogramas



Abreviaturas: Ampicilina: AMP, Amoxicilina con Ac. Clavulanico: AMC, cefotaxina: FOX, ceftazidima: CAZ, cefepime: FEP, aztreonam: ATM, imipenem: IMP, meropenem: MEM, ácido nalidixico: NA, ciprofloxacino: CIP, gentamicina- GEN, Tobramicina: TOB, amikacina: AN, estreptomina: EST, tetraciclina: TET, trimetropim sulfametaxona: TMP/STX, cloranfenicol: CLO.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos con la metodología previamente descrita para determinar el perfil de susceptibilidad a Aminoglucósidos, en la Tabla 7, la cual está dividida de acuerdo con el número de paciente; morado: paciente 1, verde: paciente 2: amarillo paciente 3. Las características de cada paciente (edad, genero, origen de la biopsia, tratamiento previo al diagnóstico número de cepas) se detallan en la tabla 3 en Técnicas y Procedimientos.

Tabla 7. Perfil de resistencia Fenotípica en Aminoglucósidos (66 cepas)

AMK	GEN	CEPA	AMK	GEN	CEPA
S	R	CUA17	-	R	CUA30
S	R	CUA16	-	R	CUA22
S	R	CUA15	R	R	CUA28
S	R	CUA20	S	S	CUA2
S	R	CCB18	S	R	CUA6
I	R	CCB13	S	R	CUA3
I	R	CCB15	S	R	CUA21
S	R	CCB16	S	R	CUA1
S	S	CCB19	S	R	CUA19
S	R	CCB17	S	R	CUA25
S	R	CCH1	S	R	CUA18
S	R	CCH4	R	R	CUA29
S	R	CCB11	S	S	CUA7
S	R	CCH14	S	R	CUA5
S	R	CCH5	S	R	CUA9
I	S	CCB10	S	R	CUA4
S	R	CCB2	S	R	CUA38
S	S	CCB3	S	R	CUA37
S	R	CCB12	S	R	CUA34
S	R	CCB8	S	R	CUA12
S	S	CCB5	S	R	CUA24
S	S	CCB1	S	R	CUA10
S	R	CCB7	S	R	CUA39
S	R	CCB4	S	R	CUA14
S	R	CCB6	S	R	CUA32
S	R	CCB9	S	R	CUA36
I	I	CUA42	S	R	CUA27
S	R	CUA44	S	R	CUA31
I	S	CUA55	S	R	CUA11
S	S	CUA57	S	R	CUA35
S	S	CUA69	S	R	CUA23
S	S	CUA67	S	R	CUA13
S	S	CUA50	S	R	CUA33

Morado: paciente 1, verde: paciente 2, amarillo: paciente: 3.

GEN: Gentamicina, AMK: Amikacina, R: cepa resistente; I: intermedia; S: sensible

Tabla 8. Perfil de resistencia Fenotípica en Aminoglucósidos (29 cepas)		
EST	TOB	CEPA
R	R	CUA30
R	R	CUA22
R	R	CUA28
I	S	CUA2
R	R	CUA6
R	R	CUA3
R	R	CUA21
R	R	CUA1
R	R	CUA19
R	R	CUA25
R	R	CUA18
I	R	CUA29
	S	CUA7
R	R	CCB18
R	R	CCB13
R	R	CCB15
R	R	CCB16
R	S	CCB19
R	R	CCB17
R	R	CCH1
R	R	CCH4
R	R	CCB11
R	R	CCB14
R	R	CCH5
R	I	CCB10
R	S	CUA50
R	S	CUA42
R	R	CUA44
R	R	CUA55

Morado: paciente 1, verde: paciente 2, amarillo: paciente: 3, azul: falta por analizar.
 EST: estreptomycin, TOB: tobramicina, R: cepa resistente; I: intermedia; S: sensible

A continuación, se muestran las 37 cepas que faltan por analizar, tanto para Quinolonas como Aminoglucósidos.

CUA5	CUA33
CUA9	CUA16
CUA4	CUA15
CUA38	CUA20
CUA37	CUA17
CUA34	CCB6
CUA12	CCB4
CUA24	CCB2
CUA10	CCB3
CUA39	CCB12
CUA14	CCB8
CUA32	CCB1
CUA36	CCB7
CUA27	CCB5
CUA31	CCB9
CUA11	CUA69
CUA35	CUA67
CUA23	CUA57
CUA13	

Morado: paciente 1, verde: paciente 2, amarillo: paciente: 3.

Tabla 9. Perfil de resistencia Fenotípica en Quinolonas					
CEPA	AN	CIP	CEPA	AN	CIP
CUA30	R	R	CUA17	R	
CUA22	R	R	CUA16	R	
CUA28	R	R	CUA15	R	
CUA2	S	S	CUA20	R	
CUA6	R	R	CCB18	R	R
CUA3	R	R	CCB13	R	R
CUA21	R	R	CCB15	R	R
CUA1	R	R	CCB16	R	R
CUA19	R	R	CCB19	R	R
CUA25	R	R	CCB17	R	R
CUA18	R	R	CCH1	R	R
CUA29	R	R	CCH4	R	R
CUA7	S	S	CCB11	R	R
CUA5	R		CCB14	R	R
CUA9	R		CCH5	R	R
CUA4	R		CCB10	R	I
CUA38	R		CCB2	R	
CUA37	R		CCB3	R	
CUA34	R		CCB12	R	
CUA12	R		CCB8	R	
CUA24	R		CCB5	I	
CUA10	R		CCB1	R	
CUA39	R		CCB7	R	
CUA14	R		CCB4	R	
CUA32	R		CCB6	R	
CUA36	R		CCB9	S	
CUA27	R		CUA42	I	R
CUA31	R		CUA44	I	S
CUA11	R		CUA55	S	S
CUA35	R		CUA57	S	
CUA23	R		CUA69	S	
CUA13	R		CUA67	S	
CUA33	R		CUA50	S	S

Morado: paciente 1, verde: paciente 2, amarillo: paciente: 3, azul: no se realizó antibiograma.
 AN: Acido nalidixico, CIP: Ciprofloxacino. R: cepa resistente; I: intermedia; S: sensible

A continuación, se muestran los resultados obtenidos respecto al perfil de susceptibilidad a Aminoglucósidos.

Tabla 10. Aminoglucósidos				
Antibiótico	Número de cepas	Resistente	Sensible	Intermedio
GEN	66	54 (81.80%)	10 (15.15%)	2 (3.03%)
AMK	66	2 (3.03%)	56 (85.00%)	7 (10.60%)
TOB	29	23 (79.30%)	5 (17.20%)	1 (3.40%)
EST	29	26 (89.60%)	0	2 (6.89%)

En el estudio del análisis de la resistencia a los Aminoglucósidos, aún solo analizando 29 cepas en el caso de TOB y EST, resultó también ser alta la resistencia para GEN (81.80%), TOB (79.30%), y EST (89.60%).

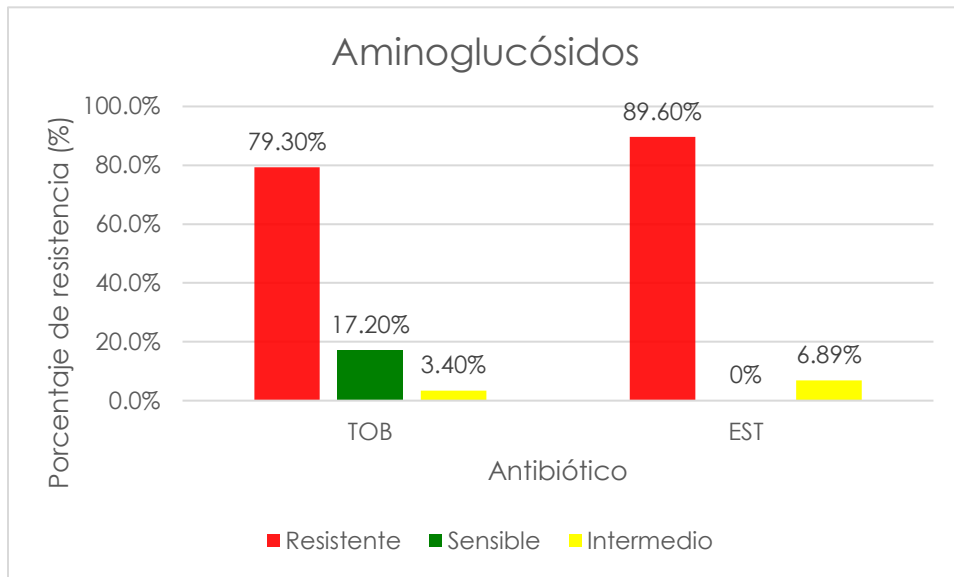


Figura 4. Gráfica del perfil de resistencia a 29 cepas de *Escherichia coli*, aisladas de biopsias de pacientes con EII.

Tobramicina; TOB: Estreptomicina; EST. CLSI; 2022.

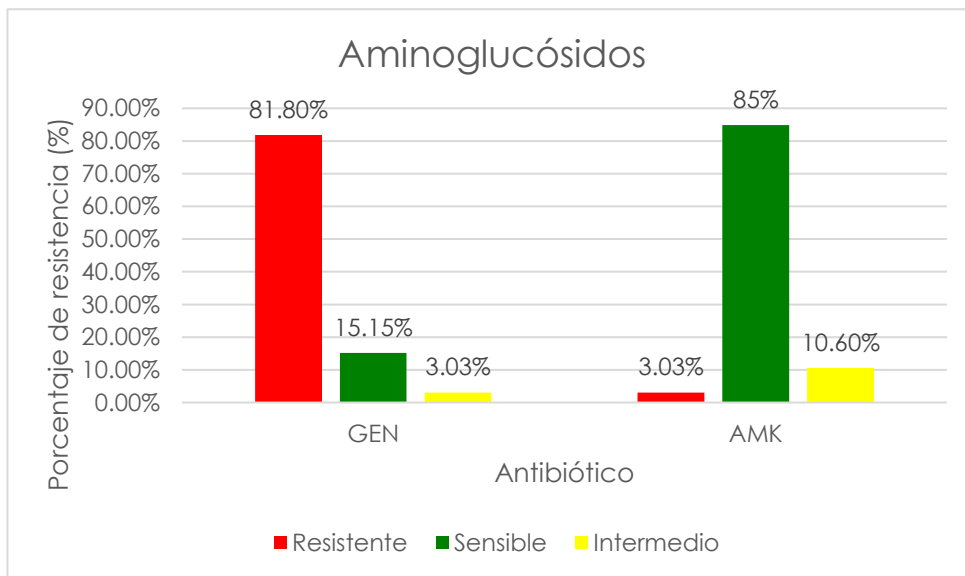


Figura 5: Gráfica del perfil de resistencia de 66 cepas de *Escherichia coli*, aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

Gentamicina; GEN: Amikacina; AMK. CLSI; 2022.

En el análisis realizado, los resultados obtenidos para ambos fueron muy altos, con el 83.00% (55/66) en AN, y el 79.30% (23/29) respecto a CIP.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos respecto al perfil de susceptibilidad a Quinolonas.

Tabla 11. Quinolonas				
Antibiótico	Número de cepas	Resistente	Sensible	Intermedio
AN	66	55 (83.00%)	8 (12.12%)	3 (4.54%)
CIP	29	23 (79.30%)	5 (17.20%)	1 (3.44%)

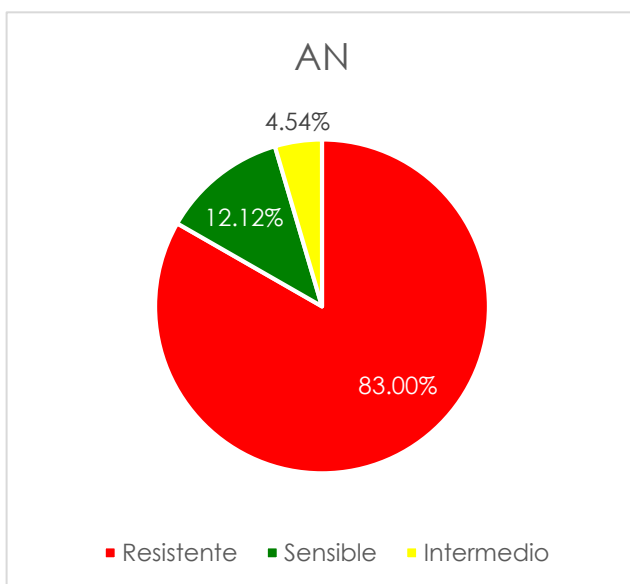


Figura 6. Gráfica del Porcentaje de resistencia de las 66 cepas de *E. coli*, aisladas de pacientes con EII.

Ácido Nalixídico; AN. CLSI; 2022.

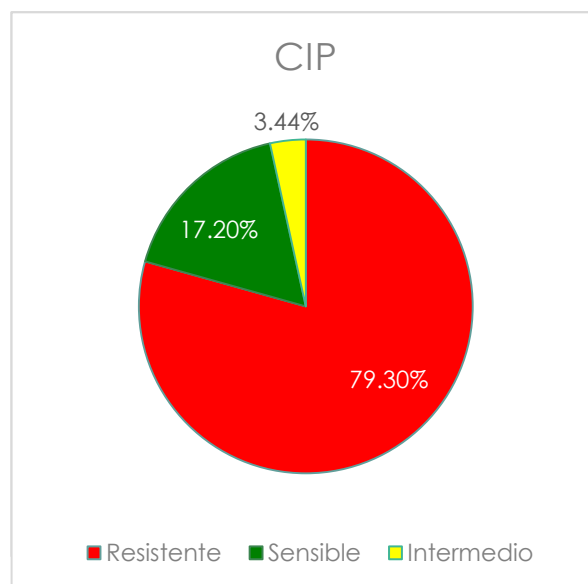


Figura 7. Gráfica del Porcentaje de resistencia de las 29 cepas de *E. coli*, aisladas de pacientes con EII.

Ciprofloxacino; CIP. CLSI; 2022.

9.2.2 Objetivo 2: Determinar la presencia de genes plasmídicos *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* y *qepA* en los aislamientos.

En base al perfil de resistencia se realizó la amplificación de los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* y *qepA* del grupo de las Quinolonas; y *aac(6')-Ib*, correspondientes Aminoglucósidos. Sin embargo, al llevar a cabo las pruebas de PCR para los cinco genes con las condiciones preestablecidas en el laboratorio, los resultados no coincidieron con los esperados respecto a los controles positivos que se estaban utilizando, por lo que se tuvieron que ensayar las condiciones de amplificación, y comprobar el producto de PCR por medio de un ejercicio bioinformático.

Para realizar el ejercicio bioinformático se realizó una búsqueda en NCBI con el nombre del gen de interés, con lo cual se desplegaban distintas opciones, por lo que se fue examinando de uno en uno. Primero se copió la secuencia FASTA del gen seleccionado y se pegó en una hoja de Word, posteriormente con la herramienta buscar de Word se pegaron los oligonucleótidos “Forward” descritos en la Tabla 5 de metodología para así encontrarlos en la secuencia y resaltarlos con un marcador de color.

Para buscar el complemento inverso del primer “Reverse” se utilizó la página: [Complemento inverso \(bioinformatics.org\)](http://Complemento inverso (bioinformatics.org)), y el resultado obtenido se examinó en la secuencia FASTA diferenciándolo con otro marcador de color.

Finalmente se seleccionó desde el primer F hasta el R para usar el contador de palabras y confirmar el tamaño correcto del gen.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos con el ejercicio descrito anteriormente para confirmar el producto de PCR de cada uno de los 5 genes.

qnrB

Primer F: **GGMATHGAAATTCGCCACTG**

Primer R: TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA

Rcompl: **TTCGACTGGCGCGCAA**

Tamaño: **263**

```
>NG_050469.1 Klebsiella pneumoniae pMG298 qnrB gene for quinolone  
resistance pentapeptide repeat protein QnrB1, complete CDS
```

ATGACGCCATTACTGTATAAAAAAACAGGTACAAATATGGCTCTGGCACTCGTTGGCGAAAAAATTGACAGAA
ACCGTTTCACCGGTGAGAAAATTGAAAATAGTACATTTTTTAACTGTGATTTTTTCAGGTGCCGACCTGAGCGG
CACTGAATTTATCGGCTGTCAGTTCTATGATCGTGAAAGCCAGAAAGGGTGCAATTTTAGTCGTGCGATGCTG
AAAGATGCCATTTTTAAAAGCTGTGATTTATCCATGGCGGATTTTCGCAATTCCAGTGCGCTGGCATTGAAA
TTTCGCCACTGCCGCGACAAGGCGCAGATTTCCGCGCGCAAGCTTTATGAATATGATCACCACGCGCACCTG
GTTTTGTAGCGCATATATCACGAATACCAATCTAAGCTACGCCAATTTTTTCGAAAAGTCGTGTTGGAAAAGTGT
GAGCTGTGGGAAAACCGTTGGATAGGTGCCAGGTACTGGGCGCGACGTTTCAGTGGTTCAGATCTCTCCGGCG
GCGAGTTTTCGACTTTCGACTGGCGAGCAGCAAACTTCACACATTGCGATCTGACCAATTCGGAGTTGGGTGA
CTTAGATATTCGGGGCGTTGATTTACAAGGCGTTAAGTTGGACAACCTACCAGGCATCGTTGCTCATGGAGCGA
CTTGGCATCGCGGTGATTGGTTAG

qnrA

Primer F: AGAGGATTTCTCACGCCAGG

Primer R: TGCCAGGCACAGATCTTGAC

Rcompl: GTC AAGATCTGTGCCTGGCA

Tamaño: 579

>NZ_NIJM01000045.1:26597-27253 Shewanella chilikensis strain JC5
NODE_45_length_33020_cov_1239.35, whole genome shotgun sequence
ATGGATATTATTGATAAAGTTTTTCAGCAAGAGGATTTCTCACGCCAGGATTTGAGTGACAGCCGTTTTTCGCC
GCTGCCGCTTTTATCAGTGTGACTTCAGCCACTGTCAGCTGCAGGATGCCAGTTTCGAGGATTGCAGTTTCAT
TGAAAGCGGCGCCGTTGAAGGGTGTCACTTCAGCTATGCCGATCTGCGCGATGCCAGTTTCAAGGCCTGCCGT
CTGTCTTTGGCCAACTTCAGCGGTGCCAACTGCTTTGGCATAGAGTTCAGGGAGTGGCATCTCAAGGGCGCCA
ACTTTTCCCGGGCCCGCTTCTACAATCAAGTCAGCCATAAGATGTACTTCTGCTCGGCTTATATCTCAGTTG
CAACTGGCCTATAACCAACTTGAGTGGCCAATGCCTGGAAAAATGCGAGCTGTTTGAAAACAACCTGGAGCAAT
GCCAATCTCAGCGGCGCTTCCTTGATGGGCTCAGATCTCAGCCGCGGCACCTTCTCCCGCGACTGTTGGCAAC
AGGTCAATCTGCGGGGCTGTGACCTGACCTTTGCCGATCTGGATGGGCTCGACCCAGACGGGTCAACCTCGA
AGGAGTCAAGATCTGTGCCTGGCAACAGGAGCAACTGCTGGAACCTTGGGAGTAATAGTGTGCCGGATTAG

qnrS

Primer F: GCAAGTTCATTGAACAGGGT

Primer R: TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG

Rcompl: CGCCGA ACTCGACGGTTTAGA

Tamaño: 427

>NG_050543.1 Shigella flexneri pAH0376 qnrS gene for quinolone resistance
pentapeptide repeat protein QnrS1, complete CDS
AAATTGAGGGGTTGTAATGTGTTGATGTAACAGGCTTTTATTTTAAATGTCTTGGCATATGTATAATGGTAGTC
TAGCCCTCCTTTCAACAAGGAGTACTCATGGAAACCTACAATCATAATATCGGCACCACAACCTTTTCACATA
AAGACTTAAGTGATCTCACCTTCACCGCTTGCACATTCATTTCGACGACTTTTCGACGTGCTAACTTGCCTGA
TACGACATTCGTCAACTGCAAGTTCATTGAACAGGGTGATATCGAAGGCTGCCACTTTGATGTGCGAGATCTT
CGTGATGCAAGTTTCCAACAATGCCAACTTGCAGTGGCAAACCTTCAGTAATGCCAATTGCTACGGTATAGAGT
TCCGTGCGTGTGATTTAAAAGGTGCCAACTTTCCCGAACAACTTTGCCCATCAAGTGAGTAATCGTATGTA
CTTTTGCTCAGCATTTATTTCTGGATGTAATCTTTTCTATGCCAATATGGAGAGGGTTTGTGTTAGAAAAATGT

GAGTTGTTTGAAAATCGCTGGATAGGAACGAACCTAGCGGGTGCATCACTGAAAGAGTCACTTAAGTCGAG
GTGTTTTTTCCGAAGATGTCTGGGGGCAATTTAGCCTACAGGGTGCCAATTTATGCCA CGCCGAACCTCGACGG
TTTAGATCCCCGCAAAGTCGATACATCAGGTATCAAAATTGCAGCCTGGCAGCAAGAAGTATTCTCGAAGCA
CTGGGTATTGTTGTTTATCCTGACTAATTGCTTTGATGTGTGATTTTAAACGCTCAAATTTATAAAACGAATA
ATATTGTCAACCTTGCAATAATAGACATAGGGACAACCATGTATAAATTTTTTAC

qepA

Primer F: GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG

Primer R: CAACTGCTTGAGCCCGTAG

Rcompl: CTACGGGCTCAAGCAGTTG

Tamaño: 131

>NG_050459.1 Escherichia coli pHPA qepA gene for fluoroquinolone efflux
MFS transporter QepA1, complete CDS
CACGCGCGCTGAATGCGGATGGGTGTTGCCATCGACGGCATGTCGAAATGCGCGCGTTGCCTTCGTCTGTTAA
AGCATTCTTGTCCCAGGATTTTGTAGTATGTCCGCCACGCTCCACGACACCGCAGCGGATCGTCGGAAGGCCA
CCCCGCCGAATGGATCGGCCTGGCCGTGGTGCCTGCGCTGCCTGGTCTACGCCATGGACCTCACGGTGTCT
GAACCTGGCGCTGCCGGTGTCTAGCCGTGAAGTGCAGCCCTCCAGCGCCAGCTTCTCTGGATCCTGGACATC
TACGGCTTCTTCGTGCGCGGCTTCTGATCACCATGGGCACGCTGGGCGACCGCATCGGCCGGCGCCGGCTGT
TGTTGATCGGCGCGGCTTCTTCGCATTCGCCTCGGTGCTCGCGGCGCTGGCCGATAACCGCCGCGCTGTTGAT
CGCGGCGCGCCTTGCTCGGCCTGGCCGGCGCCACCATCGCGCCGTCCACCATGGCGCTGGTCCGCAACATG
TTCCACGACCCGCGCCAGCGCCAGTTCGCCATCGGCGTGTGGATCGCCGCGTTTTTCGTGGGCAGCGCGATCG
GTCCGCTGGTTCGGCGGCGTGTGCTGGAGTTCTTCCACTGGGGCGCCGTGTTCTGGCTCAACGTGCCGGTGTAT
GCTGCTGACGCTGGCGCTCGGCCCTCGCTTCTGCCGAGTATCGTGATCCGGACCGGGGCACCTGGACCTG
GCCAGCGTGTGCTGTGCTGGCGGCGGTGCTGCTGACGATCTACGGGCTCAAGCAGTTGGCCGAGCATGGAG
CGGGCCTCGCCTCGATGGCTGCGCTGCTGGCCGGGCTGGCGGTTCGGGGCGCTGTTTCTGCGCCGCCAGGGCCA
CATCGCTACCCCGCTGCTGGACCTGGCGCTGTTTCGCGCACGCGCCGTTCCGCGCGGCGCTGGCGGCGTATGCG
CTGGCCGCGCTGGCCATGTTTCGGCGTCTACATCTTACATGACGCAGTACCTGCAGCTCGTGTGGGCTGTGCG
CGCTCGAGCCCGGGCTGGCCACGCTGCCCTGGTCCCTGTGCTTTCGTCATCGGTTTCGCTGTTGTGCGCCGCG
CGCGGCGCGCTGGCCGGCGGCGCATCCTCGTTCGTGGGCGTTCGCGCAGCGGCGTTTCGGCTTCGCCGTGCTG
GGGCTGGGGCAGGGCCTGTGGTGGCTGGTGCCGGCCACGATCGTCATGGGCGTGGGCGTGGCGCCGGTGTTC
CCATCGGCAACGAGATCATCATCACCAGCGCGCCGTCCGAGCGCGGGCGCGGCGCTCGGCCTTGTGCGGAGAC
GGTGTCCGAATTCAGCGGCGCGCTGGGCATCGCGCTGTTTCGGCAGCGTTCGGCCTGGTGGTCTACCGGCAGGCG
CTGACCAGCGCGGCGCTGCCCGGCTGCCGGCCGATGCGCTGCAGGCGGCGGTTGCCTCGCTCGGGGGCGCCG
TGCACCTGGCCGACACCCTGCCGGCGTGGCAGGGCGCGGCTTGTGGCGGCGCACGCGGGGCTTACCGGA
TGCCTGCAGGCCACGGCCTGGGCCGGCGCGGTGCTGGTGTGGTGGCCGCTGGGCTGGTGGCGCGCCTGCTG
CGCAAGCGCCAGCGCTCGCATCTGGTTGACCCGCTCGCGTCCGGACCGCGCTGGATTACGCGCGCTGCTGGC
GGGGCGGCTGCAGGTCGCATGGCCTCAGGCGGCTCTTCTGGCTGCGCGAGGTAGACG

aac(6')Ib-cr

Primer F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA

Primer R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT

Rcompl: AAACACGCCAGGCATTGAG

Tamaño: 482

>NG_051438.1 Acinetobacter baumannii aac(6')-Ib gene for aminoglycoside
N-acetyltransferase AAC(6')-Ib3, complete CDS
CATCACAAGTACAGCATCGTGACCAACAGCAACGATTCGGTTCACACTGCGCCTCATGACTGAGCATGACCTT
GCGATGCTCTATGAGTGGCTA AATCGATCTCATATCGTTCGAGTGGTGGGGCGGAGAAGAAGCACGCCCGACAC

```
TTGCTGACGTACAGGAACAGTACTTGCCAAGCGTTTTAGCGCAAGAGTCCGTCCTACTCCATACATTGCAATGCT
GAATGGAGAGCCGATTGGGTATGCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGATGGTGGGAAGAAGAA
ACCGATCCAGGAGTACGCGGAATAGACCAGTTACTGGCGAATGCATCACAACCTGGGCAAAGGCTTGGGAACCA
AGCTCGTTTCGAGCTCTGGTTGAGTTGCTGTTCAATGATCCCGAGGTACCAAGATCCAAACGGACCCGTCGCC
GAGCAACTTGGCAGCGATCCGATGCTACGAGAAAAGCGGGGTTTGAGAGGCAAGGTACCGTAACCACCCAGAT
GGTCCAGCCGTGTACATGGTTCAAACACGCCAGGCATTTCGAGCGAACACGCAGTGATGCCTAACCCCTCCATC
GAGGGGGACGTCCAAGGGCTGGCGCCCTTGGCCGCCCTCATGTCAAACGTTAGGCATTTGTATGAGCATCTT
CGATACTCCACGCTACA
```

```
>NG_051844.1 Pseudomonas aeruginosa pDG-1 aac(6')-Ib gene for
aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib4, complete CDS
TTACGCCGTGGGTCGATGTTTGTATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAA
CAAAGTTAGGCATCACAAAGTACAGCATCGTGACCAACAGCAACGATTCGGTCACACTGCGCCTCATGACT
GAGCATGACCTTGCGATGCTCTATGAGTGGCTAAATCGATCTCATATCGTCGAGTGGTGGGGCGGAGAAG
AAGCACGCCCCGACACTTGCTGACGTACAGGAACAGTACTTGCCAAGCGTTTTAGCGCAAGAGTCCGTCCT
CCATACATTGCAATGCTGAATGGAGAGCCGATTGGGTATGCCAGTCGTACGTTGCTCTTGAAGCGGGGA
CGGATGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGGAGTACGCGGAATAGACCAGTCACTGGCGAATGCATCACA
CTGGGCAAAGGCTTGGGAACCAAGCTGGTTCGAGCTCTGGTTGAGTTGCTGTTCAATGATCCCGAGGTAC
CAAGATCCAAACGGACCCGTCGCCGAGCAACTTGGCAGCGATCCGATGCTACGAGAAAAGCGGGGTTTGAG
AGGCAAGGTACCGTAACCACCCAGATGGTCCAGCCGTGTACATGGTTCAAACACGCCAGGCATTTCGAGCG
AACACGCAGTGATGCCTAACCCCTCCATCGAGGGGGACGTCCAAGGGCTGGCGCCCTTGGCCGCCCTCAT
GTCAAACGTTAGCCACCAAGAAGGTGCCATGAAAACATTTGCCGCATA
```

Para estandarizar y comprobar las condiciones correctas para los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* y *qepA*, y con los resultados obtenidos en el análisis previo, se amplificaron sólo controles positivos para los cinco genes, garantizando así que todos estuvieran en el peso correcto.

Debido al tiempo especificado para terminar este trabajo de tesis, no se finalizó la búsqueda en los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* y *qepA* para el número de cepas con perfil de resistencia contempladas; sin embargo, se estandarizaron las condiciones de amplificación, así como cepas control para el futuro análisis genotípico.

A continuación, se muestra la planeación del experimento:

Tabla 12. Planeación del experimento

Antibiótico	Gen buscado	Total No. Cepas a Evaluar (R, I)	Cepas Evaluadas
Gentamicina Amikacina Trobamicina Estreptomina	<i>aac(6')/lb</i>	60 de 66	**66
Ciprofloxacino	<i>qepA</i>	24 de 29*	10
Ciprofloxacino Acido Nalidíxico	<i>qnrB</i> <i>qnrS</i> <i>qnrA</i>	59 de 66	59
Ciprofloxacino Acido Nalidíxico	<i>aac(6')/lb-cr</i>	59 de 66	59

*Faltan 37 cepas por evaluar

** Evaluadas previo al análisis fenotípico

En el gen *aac(6')-lb-cr* se realizaron dos pruebas de amplificación a los positivos C7222 y A23EC (figura 8), siendo este último el que se utilizó como control, posteriormente se corrieron las cepas resistentes a Quinolonas y Aminoglucósidos, donde los resultados dieron un 100% negativos.

Para el gen *qnrA* se corrió un gel de PCR sólo con controles positivos C7210 (figura 9), sin embargo, el resultado no fue definido debido a la cantidad de bandas que se mostraban, por lo cual se optó por correr la cepa CUA44 la cual previamente se analizó junto con las 59 cepas en perfil fenotípico resistente e intermedio, y se observó favorable para el tamaño del gen buscado, asimismo se cambiaron las condiciones de amplificación previamente usadas de Cattoir *et al.*, 2008, por las de Kraychete, 2016, también descritas en la Tabla 5.

En el caso de *qnrB* no amplificó el control positivo C7222 (figura 10) con el que inicialmente se estaba trabajando, por lo que se cambió de control positivo a C3305, cepa que ya se encontraba previamente en laboratorio, usando las condiciones de amplificación de Cattoir *et al.*, 2008, previamente descritas en la Tabla 5.

Para el gen *qnrS* no se tenía un control positivo en el laboratorio, por lo que se corrió una PCR con la cepa CCB8, la cual previamente se expresó en el tamaño correcto, dentro de las 59 cepas con perfil de resistencia en la prueba fenotípica, y se hizo una prueba con las condiciones de amplificación de Kraychete, 2016, sin embargo, se mostraba un doble bandeo, por lo que se probó con las condiciones de Cattoir *et al.*, 2008.

Con el gen *qepA* se realizó una PCR con el control positivo C1550 para confirmar presencia del gen en dicha cepa, antes de esto se corrieron 10 cepas con perfil de resistencia; sin embargo, ya no se pudieron correr con las condiciones finalmente corroboradas.

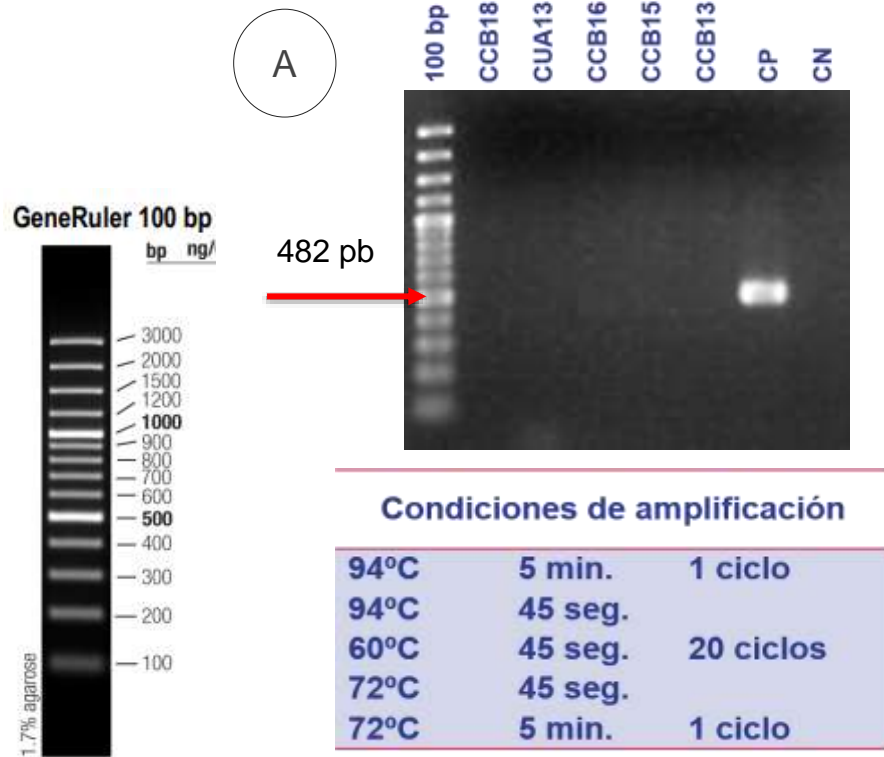
A continuación, se muestran amplificados de los genes utilizados como control positivo para resistencia a Aminoglucósidos y Quinolonas en algunas cepas.

aac(6')-Ib

482pb

Control positivo: A23EC

1.7% agarosa



B

TODAS LAS CEPAS

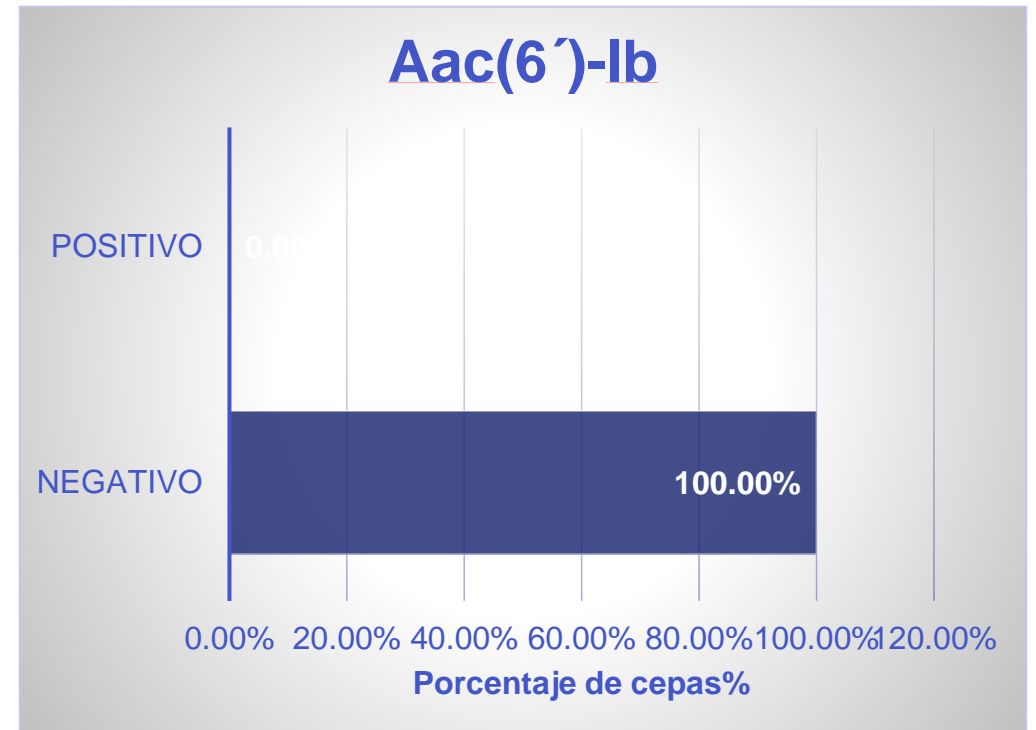


Figura 8: Electroforesis en geles de poliacrilamida al 1% para el análisis del gen *aac(6')-Ib*. Panel A: Se describen las cepas analizadas, , y condiciones de amplificación, Panel B: Resultado de las 66 cepas en porcentaje. (CP: control positivo, CN: control negativo)

qnrA

579pb

Control positivo: C7210 y CUA44

1.7% agarosa

Evaluadas: 59 de 66

Estandarización

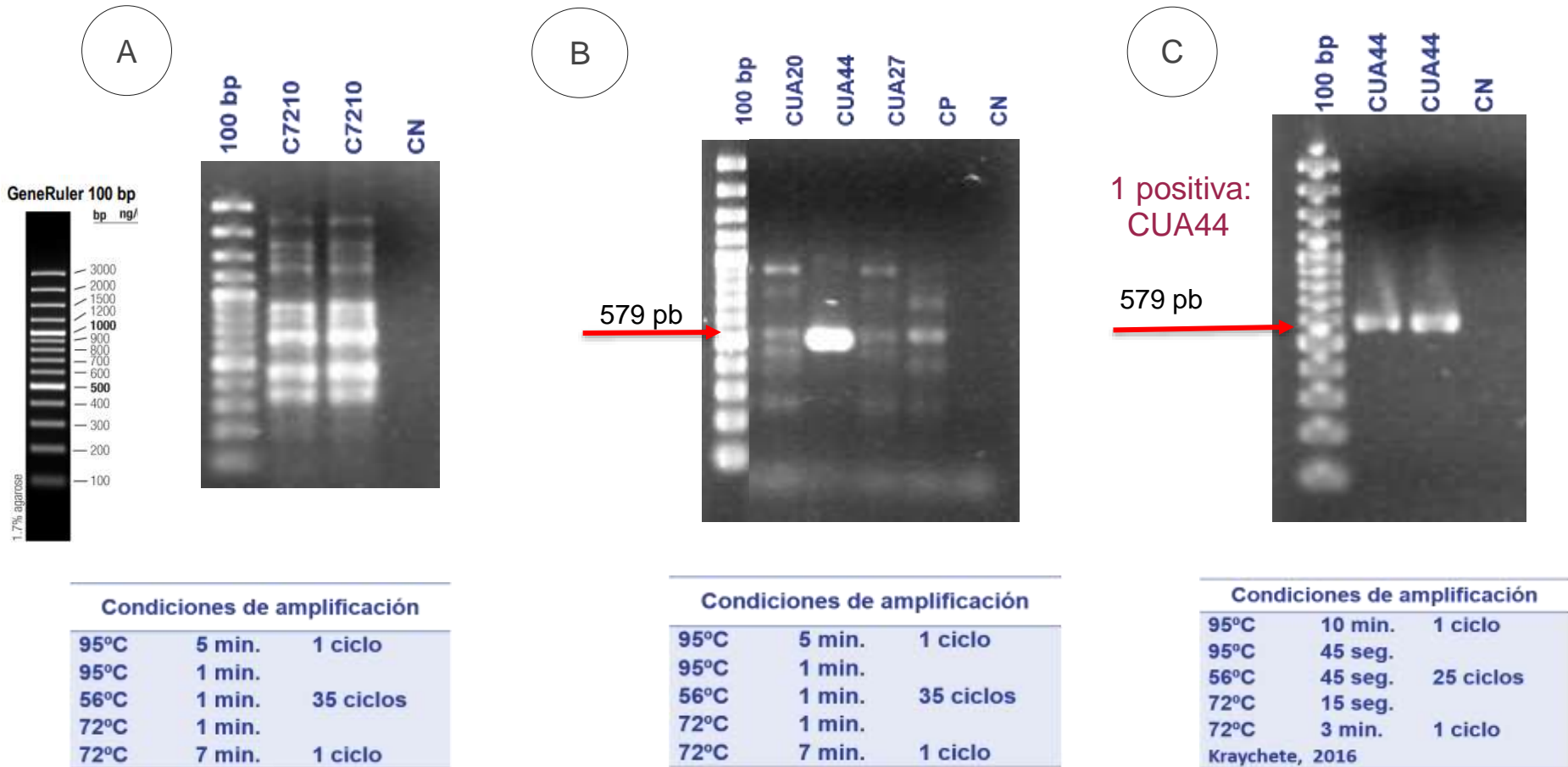


Figura 9: Electroforesis en geles de poliacrilamida al 1% para el análisis del gen *qnrA*. Panel A: Se describe la cepa analizada CP, y condiciones de amplificación, Panel B: Muestra de las 59 cepas analizadas y condiciones de amplificación, Panel C: CUA44 como CP y condiciones de estandarización finales para PCR. (CP: control positivo, CN: control negativo)

qnrB

263pb

Control positivo: C7222 y C3305

1.7% agarosa

Evaluadas: 59 de 66

Estandarización

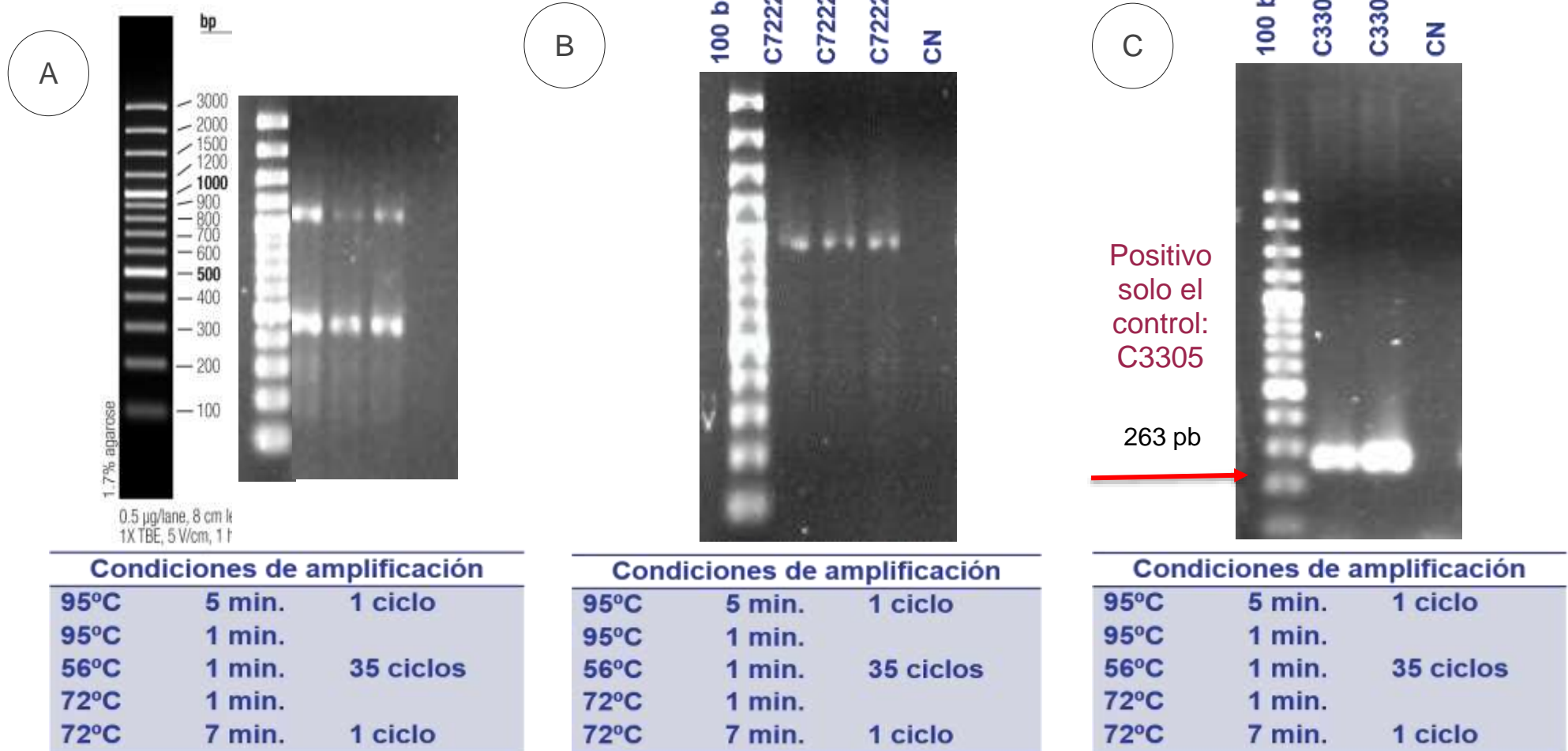
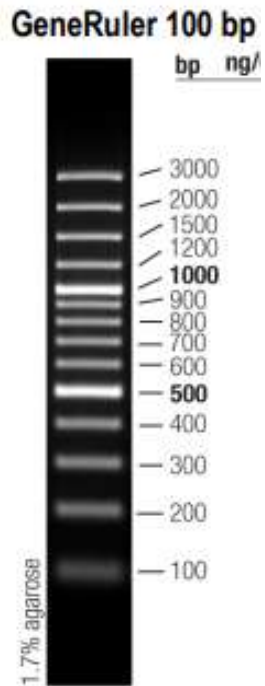


Figura 10: Electroforesis en geles de poliacrilamida al 1% para el análisis del gen *qnrB*. Panel A: Muestra de las 59 cepas analizadas, y condiciones de amplificación, Panel B: C7222 como CP y condiciones de amplificación, Panel C: C3305 como CP y condiciones de estandarización finales para PCR. (CP: control positivo, CN: control negativo)

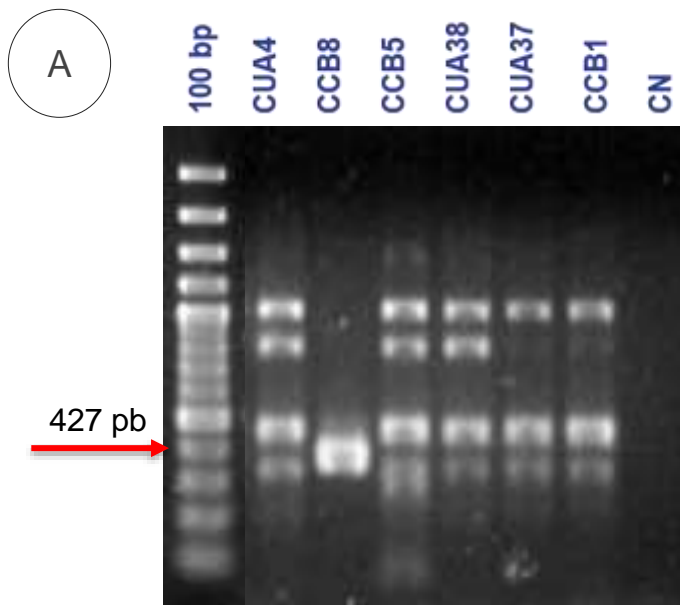
qnrS

427pb

Sin Control positivo
1.7% agarosa



Evaluadas: 59 de 66



Condiciones de amplificación

95°C 5 min.	1 ciclo
95°C 1 min.	
55°C 1 min.	35 ciclos
72°C 1 min.	
72°C 7 min.	1 ciclo

Estandarización



3 positivas:
CUA42
CCB8
CCB5

Condiciones de amplificación

95°C 10 min.	1 ciclo
95°C 45 seg.	
55°C 45 seg.	25 ciclos
72°C 45 seg.	
72°C 3 min.	1 ciclo

Figura 11: Electroforesis en gels de poliacrilamida al 1% para el análisis del gen *qnrS*. Panel A: Muestra de las 59 cepas analizadas, y condiciones de amplificación, Panel B: CCB8 como CP y condiciones de estandarización finales para PCR. (CP: control positivo, CN: control negativo)

qepA

131pb

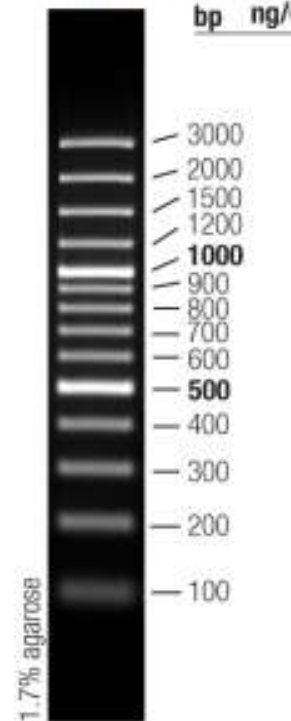
Control positivo: C1550

1.7% agarosa.

Condiciones de amplificación

94°C 5 min.	1 ciclo
94°C 45 seg.	
57°C 45 seg.	35 ciclos
72°C 45 seg.	
72°C 5 min.	1 ciclo

GeneRuler 100 bp



A

Evaluadas: 10 de 24

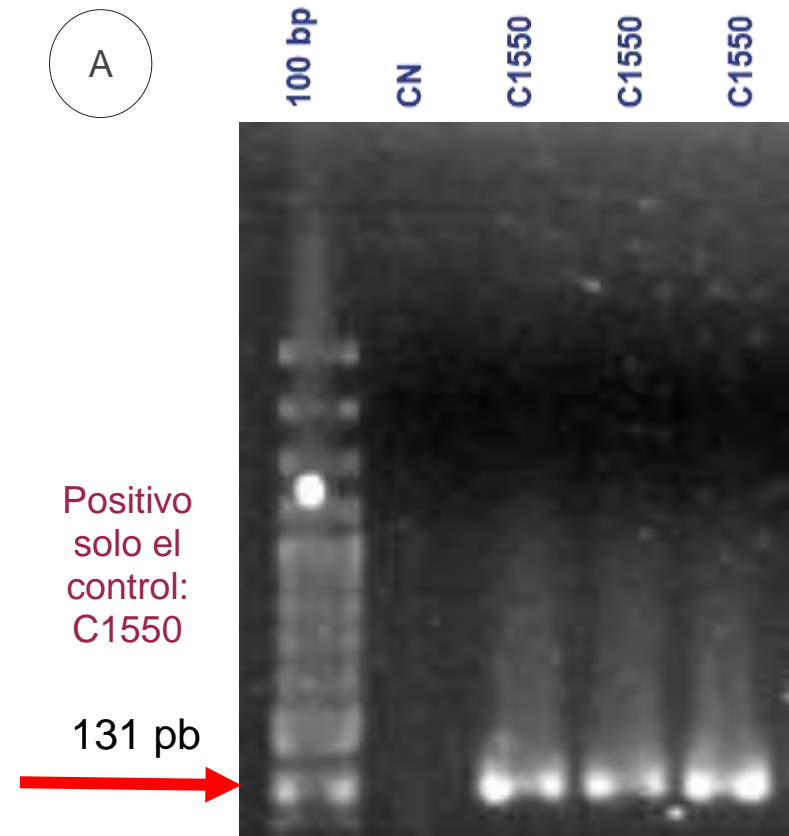


Figura 12: Electroforesis en geles de poliacrilamida al 1% para el análisis del gen *qepA*. Panel A: Muestra de las 10 cepas analizadas, y condiciones de amplificación finales para PCR. (CP: control positivo, CN: control negativo).

10. Discusión

En los últimos años la emergencia y diseminación de bacterias resistentes a antibióticos en los hospitales ha sido un factor de inseguridad muy importante para el médico tratante y el paciente. Las infecciones producidas por estas bacterias pueden conducir a un incremento en la morbilidad y mortalidad, así como a una estancia hospitalaria más prolongada, debido al retraso en la administración de un tratamiento antibiótico adecuado.

Es por ello la importancia y necesidad de conocer los mecanismos bioquímicos y moleculares por los cuales las bacterias adquieren dicha resistencia en cada hospital, ciudad, país e incluso en los diferentes nichos ya sea una comunidad, animales, alimentos, etc.; para tomar acciones y minimizar la resistencia a los antibióticos.

La EII se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, esto debido al elevado número de casos, incapacidad y tasas altas de hospitalización, sin dejar de lado el costo médico directo con la llegada de la terapia biológica. En la EII la disbiosis de la microbiota intestinal se reconoce como un sello distintivo de la enfermedad, conduciendo al crecimiento excesivo de enterobacterias, incluidas las cepas de *E. coli* del grupo AIEC, que son especialmente predominantes.

Sin embargo, a pesar del conocimiento sobre la EII, en México no hay disponibilidad de estudios epidemiológicos formales o de registros actualizados en los que se pueda dar un seguimiento clínico al paciente, dando como resultado un escaso número de estudios relacionados al respecto, sobre todo hacia la importancia de la relación sobre la EII con cepas de AIEC, con el fin de proponer así alternativas más eficientes para el diagnóstico y tratamiento en atención del paciente.

El tratamiento utilizado en la clínica asociado a *E. coli* incluye familias de antibióticos como las Quinolonas, Aminoglucósidos y Metronidazol; sin embargo, las altas tasas de resistencia a estos antimicrobianos complican la erradicación de clonas patógenas como es el caso de AIEC.

En 1998 se describió por primera vez la resistencia Quinolonas mediada por un plásmido, uno de los tres tipos de mecanismos de resistencia a Quinolonas, recordando la presencia de mutaciones cromosómicas que alteran las enzimas diana y su afinidad de unión a fármacos, así como las mutaciones en proteínas que conducen a la reducción de la concentración del fármaco.

Actualmente se encuentran descritos tres tipos de genes de resistencia a Quinolonas mediados por plásmidos (PMQR), el primero se denominó *quinolone resistance* o *qnr* de la cuales surgieron nuevas variantes, como *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*, y más recientes *qnrD* y *qnrC*; posteriormente en 2006 fue descrita el gen variante de la aminoglucósido acetil transferasa (*Aac(6')-Ib-cr*), que originalmente en *E. coli* se consideró solo para aminoglucósidos, sin embargo se reportaría más tarde una variante con dos mutaciones *Trp102*→*Arg* y *Asp179*→*Tyr*, que confiere resistencia a Quinolonas y finalmente los genes codificadores de bombas de eflujo *qepA*.

En este trabajo se estudiaron los aspectos fenotípicos y genotípicos de resistencia a Quinolonas y Aminoglucósidos en 66 cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de 3 pacientes con EII, provenientes de centros de salud, que una vez llevadas al LMHyC fueron procesadas para su aislamiento, identificación y conservación.

Los resultados de expresión fenotípica hacia Quinolonas fueron de resistencia a un 84.8%, seguido de un 10.6% sensible esto para ácido nalidixico, mientras que para ciprofloxacino, un antibiótico utilizado en el tratamiento de la EC, la resistencia fue de un 82.7% de resistencia y el 17.2% sensible, recordando que para este antibiótico sólo se analizaron 29 cepas; sin embargo, el perfil de resistencia fue muy alto, incluso para ácido nalidixico, siendo por arriba del 80%. Estos valores

coinciden con otros reportes como el de Dogan 2012, donde reportaron un hallazgo del 29% de los pacientes 6/8 con EC colonizados por *E. coli*, con resistencia a la ciprofloxacina, comprometiendo su función en cuanto a su capacidad para matar a *E. coli* dentro de los macrófagos.⁵⁰

Es importante recordar que los pacientes 2 y 3 (ver imagen 4) ya tenían un tratamiento previo con Ciprofloxacina, lo cual sugiere que la resistencia se pudo haber adquirido durante el tratamiento, pues pudo haber generado presión selectiva en las cepas evaluadas de estos pacientes. En el caso del paciente 1 uno las altas tasas de resistencia a quinolonas pueden deberse a un evento de transferencia horizontal, ya que no tuvo un tratamiento previo con Ciprofloxacino y presenta un alto índice de resistencia.

Sin embargo, en el estudio de Dogan 2012 también presentaron resultados de ensayo hacia estadística significativa en el cual el 29% de sus pacientes estudiados albergaban resistencia, pero no obtuvieron asociación estadísticamente significativa ($P= 0,6$) entre la historia de tratamiento con este antibiótico y *E. coli* resistente a Ciprofloxacino.⁵¹

Tabla 13. Tratamiento previo con Ciprofloxacino

Paciente	Edad (años)	Género	Origen de la biopsia	Diagnóstico	Tratamiento (previo al diagnóstico)	Número de cepas aisladas	Fenotipo de resistencia AN	Fenotipo de resistencia CIP*
1	23	M	Colon descendente y transverso	CUCI	Trimetoprim/ Sufametoxazol	38	35 CUA44: <i>qnrA</i>	11
2	61	F	Sigmoides	Colitis crónica y diverticulitis	Ciprofloxacino, Rifaximina	22	21	12
3	34	M	Colon descendente y ano	CUCI	Metronidazol, Ciprofloxacino, Ceftriaxona	7	2	1

En el estudio del análisis de la resistencia a los Aminoglucósidos, se obtuvo alta resistencia hacia GEN 53/66 (80.30%), TOB 22/29 (75.80%), y EST 27/29 (93.10%), tomando en cuenta que para TOB y EST solo se analizaron 29 cepas de las 66, para AMK la mayoría de las cepas fue sensible con un 2/57 (86%), datos que coinciden con el reporte de Abdelhalim 2020, en el cual aislaron cepas de 17 pacientes con EC y 14 sanos, 10(59%) y 7 (50%) respectivamente, identificados como AIEC, y en el cual la mayoría 8/10 (80%) de las cepas aisladas fueron resistentes a aminoglucósidos, siendo un punto importante en el desarrollo, progresión y patogenia de esta enfermedad.⁵²

Por otro lado, el estudio de Martínez Medina 2020 demostró que el 30% de las cepas eran resistentes para estreptomina, sin embargo, el resto no fue resistente a otros Aminoglucósidos probados, lo cual concuerda con el resultado obtenido en este trabajo respecto a AMK con el 86% de sensibilidad.

Correspondiente a los resultados genotípicos a Quinolonas se tuvieron que generar nuevas condiciones para PCR a las previstas, esto para el gen *qnrB*, *qnrA* y *aac(6')-Ib-cr*.

Correspondiente al gen *aac(6')-Ib*, se cambió de control positivo por otra cepa ya secuenciada (A23EC), y una vez confirmadas las condiciones de amplificación se evaluaron las 66 cepas resistentes e intermedias para Aminoglucósidos y Quinolonas, donde el 100% de las cepas dieron un resultado negativo, que al ser comparados con la susceptibilidad fenotípica, son contrastantes, puesto que para GEN, TOB, EST el porcentaje de resistencia se encontraba arriba del 80%, entendiéndose así que las cepas no tenían este gen de resistencia en concordancia con el genotipo, entre las que se podrían evaluar otras opciones como la *aac(3)-II* para Aminoglucósidos, u otro mecanismo de resistencia como, por ejemplo, mutaciones cromosómicas en las subunidades *gyrA* y *parC* que alteran las enzimas diana y su afinidad de unión a fármacos para quinolonas.

En el caso de *qnrB* se realizó un cambio de control positivo, ya que al realizarse una prueba inicial solo con esta cepa, se observaba una migración anómala de la banda sin poderse identificar en el peso esperado, lo cual se puede achacar a la degradación de DNA; finalmente se utilizó una cepa del laboratorio, esta fue la cepa C3305 y la cual se corroboró en las condiciones adecuadas de amplificación para ser control positivo de este gen.

Para *qnrA* se utilizó una cepa de las 59 de las 66 cepas que mostraban resistencia, y que se presentaba justo en el tamaño esperado del gen, resaltando entre las demás cepas que mostraban dos bandas no siendo específicas, se descartó contaminación del gel, ya que el control negativo no mostraba alguna inespecificidad, esta cepa fue la CUA44, ensayo del cual se propone como siguiente paso, confirmar por medio de secuenciación para verificar que pertenezca al gen *qnrA*; también se tuvieron que buscar nuevas condiciones de amplificación para este gen.

En el caso del gen *qnrS* se probaron dos condiciones de amplificación diferentes y se realizó PCR con la cepa CCB8 en prueba de las 59 que mostraron resistencia

fenotípica a Quinolonas; sin embargo, al hacerse la PCR no se obtuvo el resultado esperado, sino varios fragmentos de ADN, siendo así inespecífica; aunque también puede deberse a la desnaturalización del DNA.

Para el gen *qepA* se confirmaron condiciones de amplificación y control positivo, sin embargo; por cuestiones de tiempo para realizarse esta tesis, no se realizaron las pruebas finales con las 24 cepas resistentes.

Finalmente, se sugiere los ensayos antimicrobianos en EC que se basan en el conocimiento del fenotipo de la enfermedad, el patotipo bacteriano y la susceptibilidad antimicrobiana tienen más probabilidades de demostrar resultados válidos que los basados en enfoques empíricos no estratificados.

11. Conclusiones

- Las cepas de *E. coli* provenientes de pacientes con EII presentan altas tasas de resistencia a los Aminoglucósidos y Quinolonas evaluadas.
- La resistencia a estos dos grupos de antibióticos no está mediada por la presencia de la *acc(6')Ib* y su variante *aac(6')Ib-cr*.
- El tratamiento previo con Ciprofloxacino puede haber generado presión selectiva en las cepas evaluadas de los pacientes 2 y 3.
- En el caso del paciente 1 uno las altas tasas de resistencia a Quinolonas pueden deberse a un evento de transferencia horizontal.

12. Perspectivas

1. Realizar los antibiogramas faltantes para la conclusión de los resultados en resistencia fenotípica a las 37 cepas faltantes correspondientes a ciprofloxacino, tobramicina y estreptomina.
2. Caracterizar el genotipo de resistencia correspondientes al fenotipo para Quinolonas y Aminoglucósidos con las nuevas condiciones de amplificación y características de cepas control determinadas en este trabajo para los genes *qnrB*, *qnrS*, *qnrA* y *qepA*.
3. Confirmar la presencia del gen *qnrA* en la cepa CUA44 y *qnrS* CCB8 por medio de secuenciación.
4. Determinar un gen de resistencia en concordancia al fenotipo de la enzima *Aac(6')-Ib-cr*, por mutaciones cromosómicas en las subunidades *gyrA* y *parC*.

13. Logística

13.1. Recursos humanos

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

Profesores: D.C Rosa del Carmen Rocha Gracia, D.C. Gerardo Cortés Cortés y MC. María Guadalupe Balbuena Alonso.

13.2. Recursos materiales

- Medio de cultivo MacConkey ® Bioxon.
- Medio de cultivo TSA ® Bioxon.
- Medio de cultivo Muller Hinton ® Bioxon.
- Medio de cultivo TSI ® Bioxon.
- Medio de cultivo LEVINE ® Bioxon.

- Cefotaxima (Sigma-Aldrich).
- Sensidiscos con antibióticos.
- Sensidisco con EDTA.

13.3. Recursos financieros

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

13.4. Cronograma de actividades

13.4.1 Gráfica de Gantt

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

14. Bioética

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

15. Bibliografía

1. Ortiz, B. D. M., Villalba, J. O., & Salim, H. M. Enfermedad de Crohn ileal. Reporte de un caso. In *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas*. 2017; Vol. 50, No. 1, pp. 61-68.
2. Iranzo, B. Análisis descriptivo de los motivos de referencia a interconsulta psicológica en la unidad de coloproctología del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Caracas. *Vitae*. 2018; (76).
3. Silva, F., Gatica, T., & Pavez, C. Etiología y Fisiopatología de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2019; 30(4), 262-272.
4. Gomollón Fernando. Guía clínica GETECCU del tratamiento de la colitis ulcerosa elaborada con la metodología GRADE. *Gastroenterol Hepatol*. 2012; 2 Ed, 443- 458. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gastrohep.2012.11.002>
5. Wright, E. K., Ding, N. S., & Niewiadomski, O. Management of inflammatory bowel disease. *The Medical Journal of Australia*. 2018; 209(7), 318-323.
6. Figueroa, C. Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2019; 30(4), 257-261.
7. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(1): 91-99 DOI: 10.3748/wjg.v20.i1.91.
8. Shapiro, J. M., Subedi, S., & LeLeiko, N. S. Enfermedad inflamatoria intestinal. *Pediatría en revisión*. 2016; 37(8), 337-347. DOI: <https://doi.org/10.1542/pir.2015-0110>.
9. Gómez, M. J., & Viada, J. F. Enfermedad de Crohn. *Adolescere*. 2015; 3, 54-62.
10. Bufadel M.E. Enfermedades Inflamatorias Intestinales en Bases de la Medicina Clínica. 2008.
11. Ortigosa, L. Enfermedad inflamatoria intestinal. *Velazco Benítez CA. Enfermedades Digestivas en niños. Cali, Colombia. Programa Editorial. Universidad del Valle*. 2006;121-45.
12. Quera, R., Simian, D., Pizarro, G., Lubascher, J., Kronberg, U., Ibáñez, P., & Figueroa, C. Desarrollo de investigación y academia a partir de la labor

- clínica: Experiencia de un Programa de Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2019; 30(1), 70-75.
13. Hooper, K. M., Casanova, V., Kemp, S., Staines, K. A., Satsangi, J., Barlow, P. G., & Stevens, C. The inflammatory bowel disease drug azathioprine induces autophagy via mTORC1 and the unfolded protein response sensor PERK. *Inflammatory bowel diseases*. 2019; 25(9), 1481-1496.
 14. Borruel, N. Probióticos y prebióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterología y hepatología*. 2007; 30(7), 419-425.
 15. Coriat, J., Azuero, A. J., Tamayo, S. G., Rodríguez, M. C. R., Cardona, C. C., & Rosselli, D. Uso de probióticos en el síndrome de intestino irritable y enfermedad inflamatoria intestinal: una revisión de la literatura. *Revista colombiana de Gastroenterología*. 2017; 32(2), 141-149.
 16. De La Fuente, M., Chahuán, I., Gutiérrez, R., Díaz-Jiménez, D., Olivares, M., Vidal, R., ... & Hermoso, M. A. Presencia de Escherichia coli intracelular en mucosa intestinal de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal y su asociación con características clínicas y el uso de corticosteroides. *Rev Med Chile*. 2017; 145(9), 1129-1136.
 17. Canet José J. Escherichia Coli: características, patogenicidad y prevención (I). 2016.
 18. Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A., & Vargas-Remolina, L. V. Mecanismos de virulencia de Escherichia coli enteropatógena. *Rev Chilena Infectol*. 2016; 438-450.
 19. Kaper, JB, Nataro, JP y Mobley, HL. Escherichia coli patógena. *Nature revisa la microbiología*. 2004; 2 (2), 123-140.
 20. Gao, F., Wang, P., Yang, H., Miao, Q., Ma, L. y Lu, G. Desarrollos recientes de derivados basados en quinolonas y sus actividades contra Escherichia coli. *Revista europea de química medicinal*. 2018; 157, 1223-1248
 21. Ojdana, D., Sieńko, A., Sacha, P., Majewski, P., Wieczorek, P., Wieczorek, A. y Tryniszewska, E. Base genética de la resistencia enzimática de E. coli a los aminoglucósidos. *Avances en las ciencias médicas*. 2018; 63 (1), 9-13.
 22. Chávez-Jacobo, V. M., Ramírez-Díaz, M. I., Silva-Sánchez, J., & Cervantes, C. Resistencia bacteriana a quinolonas: determinantes codificados en plásmidos. 2015; 34(1), 5-7.
 23. ÁlvarezHernández, D. A., Garza-Mayén, G. S., & Vázquez-López, R. Quinolonas: Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Rev Chilena Infectol*. 2015. 32(5), 499-504.
 24. Serio. W. A., Magalhaes L. M., Blanchard J. S. & Connolly E. Lynn. Amiglucosidos: mecanismo de acción y resistencia. Resistencia a los fármacos antimicrobianos. 2017.
 25. Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016; 6(6), a027029.
 26. Palomino, J., & Pachón, J. Aminoglucósidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; 21(2), 105-115.
 27. Block, M. y Blanchard, DL. Aminoglucósidos. *StatPearls Treasure Island* . 2019.

28. Conan MacDougall. Aminoglucósidos en Goodman & Gilman: La Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 2017; 13e.
29. Garneau-Tsodikova S, Labby KJ. Mecanismos de resistencia a los antibióticos aminoglucósidos: visión general y perspectivas. *Medchemcomm*. 2016 1;7(1):11-27. doi: 10.1039/C5MD00344J.
30. Dowling, A., O'Dwyer, J. y Adley, C. Antibióticos: modo de acción y mecanismos de resistencia. *Centro de Investigación Formatex: Badajoz, España*. 2017; 536-545.
31. Röderova, M., Halova, D., Papousek, I., Dolejska, M., Masarikova, M., Hanulik, V., and Bardon, J. Characteristics of resistance to quinolones in isolates of *Escherichia coli* from humans, animals and the environment in the Czech Republic. *Front Microbiol*. 2017.
32. Patel, K. y Goldman, JL. Problemas de seguridad relacionados con el uso de quinolonas en niños. *Revista de farmacología clínica*. 2016; 56 (9),
33. Correia S., Poeta P., Hébraud Michel., Capelo J.L., & Igrejas Gilberto. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J Assoc Med Microbiol*. 2017; 551–559, 552-554.
34. Arés Álvarez, F., Martínez de la Ossa Sáenz-López, R., & Alfayate Miguélez, S. Quinolonas en Pediatría. *Pediatría Atención Primaria*. 2017; 19(74), e83-e92.
35. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006; 12 (1): 83-8.
36. Martínez-Medina, M., Strozzi, F., Ruiz Del Castillo, B., Serrano-Morillas, N., Ferrer Bustins, N., and Martínez-Martínez, L. Antimicrobial resistance profiles of adherent invasive *Escherichia coli* show increased resistance to β -lactams. *Antibiotics*, 2020, 9(5), 251.
37. Cortés Cortés, G. Caracterización de la resistencia antimicrobiana y tipificación molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes hospederos en Puebla, México. 2016.
38. Barrios-Villa E, Cortés-Cortés G, Lozano-Zaraín P, Arenas-Hernández MMP, Martínez de la Peña CF, Martínez-Laguna Y, Torres C, Rocha-Gracia RDC. Aislados adherentes/invasivos de *Escherichia coli* (AIEC) de personas asintomáticas: nuevos virotipos de *E. coli* ST131 O25:H4/H30-Rx. *Ann Clin Microbiol Antimicrobiano*. 2018 Diciembre 10;17(1):42. DOI: 10.1186/S12941-018-0295-4.
39. Barrios-Villa, E., de la Peña, C. F. M., Lozano-Zaraín, P., Cevallos, M. A., Torres, C., Torres, A. G., & del Carmen Rocha-Gracia, R. Comparative genomics of a subset of adherent/invasive *Escherichia coli* strains isolated from individuals without inflammatory bowel disease. *Genomics*. 2020; 112(2), 1813-1820
40. Rocha-Gracia R, Ruiz E, Romero-Romero S, Lozano-Zarain P, Somalo S, Palacios JM, Caballero P and Torres C. Detection of the plasmid-borne quinolone resistance determinant qepA1 in a CTX-M-15-producing *Escherichia coli* strain from Mexico. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020, 1-3.

41. Cortés Cortés, G. Caracterización de la resistencia antimicrobiana y tipificación molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes hospederos en Puebla, México, 2016.
42. F. L. França, T. J. Wells, D. F. Browning, R. T. Nogueira, F. S. Sarges, A. C. Pereira & M. D. G. de Luna, “Genotypic and phenotypic characterisation of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Rio de Janeiro, Brazil”, 2013.
43. Darfeuille-Michaud, C. Neut, N. Barnich, et al. Presence of adherent *Escherichiacoli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn’s disease. *Gastroenterology*. 1988;115, no. 14, 05–13. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70019-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70019-8)
44. Yang, Y., Liao, Y., Ma, Y., Gong, W., & Zhu, G. The role of major virulence factors of AIEC involved in inflammatory bowel disease—a mini-review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101(21), 7781-7787. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep19032>
45. Ellermann, M., & Sartor, R. B. Intestinal bacterial biofilms modulate mucosal immune responses. *J Immunol Sci*. 2018;2(2), 13.
46. Mimouna, S., Bazin, M., Mograbi, B., Darfeuille-Michaud, A., Brest, P., Hofman, P., & Vouret-Craviari, V. HIF1A regulates xenophagic degradation of adherent and invasive *Escherichia coli* (AIEC). *Autophagy*. 2014;10(12), 2333-2345.
47. Camprubí-Font, C., Ewers, C., Lopez-Siles, M., & Martinez-Medina, M. Genetic and phenotypic features to screen for putative adherent-invasive *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2019;10, 108. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00108>
48. Sun, Q. H., Wang, Y. S., Liu, G., Zhou, H. L., Jian, Y. P., Liu, M. D, Xu, Z. X. Enhanced O-linked GlcNacylation in Crohn's disease promotes intestinal inflammation. *EBioMedicine*. 2020;53, 102693. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102693>
49. Galtier, M., Sordi, L. D., Sivignon, A., De Vallée, A., Maura, D., Neut, C., ... y Debarbieux, L. Bacteriófagos dirigidos a cepas invasivas adherentes de *Escherichia coli* como un nuevo tratamiento prometedor para la enfermedad de Crohn. *Revista de Crohn y colitis*, 2017, 11(7), 840-847.
50. Martinez-Medina M, Strozzi F, Ruiz del Castillo B, Serrano-Morillas N, Ferrer Bustins N, Martínez-Martínez L. Los perfiles de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* invasiva adherente muestran una mayor resistencia a β -lactámicos. *Antibióticos*. 2020; 9(5):251. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050251>
51. Belgin Dogan, PhD, Ellen Scherl, MD, Brian Bosworth, MD, Rhonda Yantiss, MD, Craig Altier, DVM, PhD, Patrick L. McDonough, PhD, Zhi-Dong Jiang, MD, PhD, Herbert L. DuPont, MD, Philippe Garneau, MS, Josee Harel, PhD, Mark Rishniw, BVSc, PhD, Kenneth W. Simpson, BVM & S, PhD, La resistencia a múltiples fármacos es común en *Escherichia coli* asociada con la enfermedad de Crohn ileal, *Inflammatory Bowel Diseases*, Volumen 19, Número 1, 2013, páginas 141–150, DOI: <https://doi.org/10.1002/ibd.22971>
52. Abdelhalim KA, Uzel A, Gülşen Ünal N. Determinantes de virulencia y diversidad genética de cepas de *Escherichia coli* adherente-invasivas (AIEC)

- aisladas de pacientes con enfermedad de Crohn. *Microb Pathog.* 2020 Agosto;145:104233. DOI : 10.1016/j.micpath.2020.104233
53. Kraychete GB, Botelho LA, Campana EH, Picão RC, Bonelli RR. Se actualizó la PCR multiplex para la detección de las seis familias de genes qnr mediados por plásmidos. *Agentes antimicrobianos Chemother.* 2016, 21;60(12):7524-7526. DOI: 10.1128/AAC.01447-16.

Anexo 1. Revisión bibliográfica.

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

^aAlcalá, Martínez-Hania Anai, De la Torre, Perdomo-Carlos, Acevedo, Ocampo-Carolina, ^cCortés, Cortés-Gerardo, ^bLozano, Zarain-Patricia, Rocha, Gracia-Rosa del Carmen

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

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

^cPostdoctoral Scholar-Employee, Department of Microbiology and Environmental Toxicology, UCSC

Resumen

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es un padecimiento emergente mundial que se ha asociado a causas multifactoriales, incluyendo la participación de la bacteria *Escherichia coli* adherente-invasiva (AIEC). A la fecha aún hay muchas interrogantes sobre cómo AIEC puede participar en el desarrollo de esta enfermedad, es por ello que en esta revisión proporcionamos una actualización de la literatura sobre el papel potencial de AIEC en la patogenia de la EII, así como de las estadísticas que se han reportado en México. Realizamos una búsqueda sistemática de la literatura y analizamos un total de 43 reportes científicos obtenidos de bases de datos públicas que sustentan la participación de AIEC como agente causal de EII, ya que genera una invasión intestinal que promueve una respuesta inflamatoria exacerbada. La presente revisión contribuye a explorar los avances

científicos que hasta la fecha ponen en evidencia la participación de AIEC en la EII. A pesar de que la EII es un fenómeno de salud mundial, México cuenta con información limitada, por lo que es necesario dar a conocer información al respecto, accesible a la comunidad médica involucrada en el manejo de estos pacientes, así como a la población en general que curse con estos padecimientos, con la finalidad de evaluar, monitorear y controlar este problema de salud pública.

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

Abstract

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

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

Introducción

Las Enfermedades Inflamatorias Intestinales (EII), que comprenden la enfermedad de Crohn (EC), la colitis ulcerosa crónica idiopática (CUCI), y la colitis indeterminada

inclasificable (CI) son trastornos gastrointestinales inflamatorios idiopáticos crónicos, que afectan a humanos.

La patogenia de las EII es multifactorial e incluye factores de susceptibilidad genética, inmunológicos, ambientales como el estrés, la medicación, la dieta, estimulación de la microbiota entérica y lesión intestinal mediada por el sistema inmunitario. Uno de los factores importantes que se debe tomar en cuenta es la microbiota intestinal, debido a que al estar compuesta por microorganismos, muchos de ellos simbioses, funcionan como una barrera importante de defensa ante microorganismos invasores manteniendo la estabilidad intestinal al producir ácidos grasos de cadena corta como acetato, propionato y butirato, previenen la expansión de cualquier patógeno microbiano, modulan el sistema inmunitario al estimular la producción de citocinas antiinflamatorias como (IL)-10, factor de crecimiento transformante (TGF)- β y disminuyen la activación de células T colaboradoras Th17 y Th1. Sin embargo, bajo la presencia de condiciones disbióticas, algunas bacterias que forman parte de la microbiota intestinal, como las proteobacterias de la familia Enterobacteriaceae pueden aumentar su duplicación, lo que provocaría una disminución de la diversidad bacteriana y pérdida en la estabilidad intestinal. Como resultado, habrá un aumento en las citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-17 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , que activan las células colaboradoras Th17 y Th1 involucradas en la respuesta inflamatoria. Además, se ha observado también, una disminución de las uniones estrechas entre las células que se asocia con una expresión anormal de proteínas de unión estrecha y una pérdida de la permeabilidad en el epitelio intestinal, permitiendo que bacterias de la familia Enterobacteriaceae tengan acceso a capas epiteliales más profundas y provoquen una respuesta inflamatoria intestinal que puede ser desencadenante del desequilibrio en la microbiota intestinal, causado por la proliferación de enterobacterias, como puede ser *Escherichia coli*, lo que conduce a la persistencia del estado inflamatorio intestinal (Fig. 1) (Baldelli et al., 2021)

La frecuente recuperación de *E. coli* adherida a la mucosa ileal y colónica inflamada de pacientes con EC y CUCI ha despertado un gran interés por estas especies

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

EII en México

En este inicio del siglo XXI la EII se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, con la acumulación de un número elevado de casos, tasas altas de hospitalización, incapacidad, mortalidad prematura y un incremento en el costo médico directo con la llegada de la terapia biológica (J.K. Yamamoto Furusho et al., 2020). A pesar de que la EII es un fenómeno de salud mundial, en México no hay disponibilidad sistemática de estudios epidemiológicos formales, ni de registros actualizados basados en la población, en los que se le dé seguimiento clínico al paciente durante cierto periodo de tiempo para el diagnóstico de la EII. Las estadísticas que se tienen en gran medida han sido documentadas por Yamamoto-Furusho y cols., quienes incluso han realizado un consenso mexicano para el diagnóstico y tratamiento de CUCI (J.K. Yamamoto Furusho et al., 2018). Más escasos son aún los estudios relacionados a la asociación de algún factor microbiano como es AIEC con el desarrollo de EII en población mexicana, teniendo como única evidencia el trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, en el que se han analizado las características fenotípicas y genotípicas de *E. coli* aisladas de individuos portadores clínicamente sanos, en las que han identificado a cepas AIEC (Barrios-Villa E et al., 2018; Barrios-Villa E 2020); sin embargo, no hay reportes de aislamientos caracterizados como *E. coli* del patotipo AIEC, a partir de biopsias intestinales de pacientes con EII. Es por ello que surge la necesidad de

realizar un análisis profundo y exhaustivo para explorar las causas multifactoriales de la EII, a fin de proponer alternativas más eficientes para su diagnóstico, tratamiento y atención al paciente, tomando en cuenta los recursos sanitarios con los que cuenta nuestro país, para así, optimizar los costos de este padecimiento que aqueja a miles de mexicanos y que inclusive es desconocido por muchos.

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

Materiales y métodos

Búsqueda y selección de literatura

Debido a la novedad y particularidad del tema, se realizó una búsqueda de la literatura para identificar todas las citas relevantes que han informado sobre la presencia de AIEC en el intestino de pacientes con EII, sin incluir un límite para el año de publicación del reporte. Realizamos una búsqueda sistemática en la base de datos PubMed utilizando las siguientes palabras clave en idioma inglés: 'Escherichia coli' OR Escherichia coli AND adherent OR 'AIEC' AND 'Inflammatory Bowel Diseases' OR Inflammatory Bowel Diseases OR IBD OR Inflammatory Bowel Disease OR Ulcerative Colitis OR Crohn Disease OR Crohn's Disease OR Crohn's Disease OR Crohn's Enteritis OR Regional Enteritis OR Granulomatous Enteritis OR Ileocolitis OR Granulomatous Colitis OR Terminal Ileitis OR Regional Ileitis OR Regional Ileitis. Esta búsqueda se restringió a los artículos en idioma inglés publicados hasta febrero de 2021. Se recuperó un total de 145 artículos originales. Esta búsqueda se complementó con una revisión manual de la lista de referencias de los estudios encontrados previamente. Adicionalmente, se revisaron los Bioproyectos asociados a los 30 genomas de cepas AIEC depositados en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) hasta FECHA, la extensión de Pathogens (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens>) y PATRIC 3.6.12 (<https://www.patricbrc.org>). Se incluyeron estudios que cumplieran con los siguientes criterios: 1) investigación original que caracterice AIEC, las diferentes

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

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

Resultados y discusión de resultados

Epidemiología de AIEC

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

Como consecuencia, la caracterización de los factores ambientales que rigen a este trastorno aún no han podido ser esclarecidos, pues la mayoría de los estudios se

han hecho en países que han sufrido de la occidentalización desde ya varias décadas (Kaplan, et. al, 2016).

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

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

Características fenotípicas de AIEC

***Escherichia coli* Adherente-Invasiva y la EC**

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

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

Mecanismo de adherencia de AIEC en la EII.

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

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

Mecanismo de invasión de AIEC en la EII.

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

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

Una vez que AIEC atraviesa el epitelio intestinal, entra en contacto con los macrófagos, que se replican extensamente dentro del fago-lisosoma, y donde se ha informado que se multiplica 70 veces sin precedentes dentro de las primeras 48 horas de la infección (He et al., 2016) lo que sugiere que puede inhibir la activación de la muerte celular programada (PCD) (Dunne et al., 2013), pues los macrófagos

infectados liberan grandes cantidades de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y no sufren muerte celular (Bringer et. al, 2012).

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

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

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

Respecto a NOD2 como mediador en la inducción de autofagia es importante resaltar su participación para sostener la carga bacteriana intramucosa, especialmente hacia AIEC, y para limitar el resultado de la respuesta inflamatoria

(Negroni et al., 2016), pues las mutaciones en el gen CARD15 / NOD2 están asociadas con el desarrollo anormal y funcional de las PP.

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

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

Mecanismo de replicación de AIEC dentro del macrófago

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

Recientes estudios han demostrado que la vía de señalización del factor de iniciación de la traducción eucariota 2 alfa quinasa 4 (EIF2AK4), el factor 2 de iniciación de la traducción eucariota (EIF2A) y el factor de transcripción activador 4 (ATF4) se inducen en las células epiteliales intestinales después de la infección con AIEC, activando la autofagia para controlar la replicación intracelular de AIEC e

inhibir la inflamación inducida por AIEC en respuesta a diversos estímulos de estrés. La fosforilación de EIF2A en respuesta a la activación de EIF2AK4 aumenta posteriormente la traducción de ARNm específicos que se sabe que son importantes para la remediación del estrés. Se ha demostrado que el papel de la activación de la vía de la autofagia EIF2Ak4-EIF2A-ATF4 en respuesta de infecciones de AIEC mediadas por la vía de ATF4, depende de la transcripción inducida de varios genes de autofagia. Adicionalmente, la vía EIF2AK4/EIF2A/ATF4 está involucrada en el control mediado por autofagia de la replicación intracelular de AIEC y la respuesta inflamatoria, y que la infección por AIEC en ratones *eif2ak4* - / - desencadena la inflamación intestinal (A. Bretin et al., 2018).

Respuesta inmune de células Th17

Las células Th17 se diferencian de las células T vírgenes tras la estimulación con TGF- β e IL-6 (Sutton et al., 2006 ; Ruan et al., 2011), y producen IL-17A, IL-17F, IL-21, IL -22, IL-26 y TNF- α (Cua y Tato, 2010 ; Hundorfean et al., 2012 ;Figura 2). La estimulación con IL-17 activa el dominio SEF/IL-17R (SEFIR), que está estrechamente relacionado con el dominio TIR del receptor IL-17R. Por lo tanto, activa la señalización de NF- κ B y AP-1 a través del activador 1 de NF- κ B (ACT-1) y el factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) (TRAF-6), respectivamente (Moseley et al., 2003 ; Gaffen , 2009 ; Wang et al., 2013). La señalización de NF- κ B y AP-1 induce la secreción de IL-1, IL-6, TNF- α , MMP y péptidos antimicrobianos. Por lo tanto, la IL-17 tiene un papel proinflamatorio y puede proteger contra infecciones extracelulares parasitarias y bacterianas (Ye et al., 2001 ; Raffatellu et al., 2008 ; Lin et al., 2009).). Por cierto, IL-17 e IL-21 se sobreexpresan en la mucosa colónica de pacientes con CU, mientras que IL-17, IL-21 e IL-22 se sobreexpresan en la mucosa colónica de pacientes con EC (Fujino et al., 2003 ; Andoh et al., 2005 ; Monteleone et al., 2005 ; Brand et al., 2006). Por lo tanto, las citocinas relacionadas con Th17 están involucradas en la fisiopatología tanto de la CU como de la EC. En la EC, las células T CD3+ IL-17+ y las células CD68+ se encuentran dispersas en la submucosa y la muscular propia, y algunas de estas células producen IFN- γ (Fujino et al., 2003 ; Annunziato et al., 2007). Los

estudios de asociación del genoma completo han revelado que IL23R y cinco genes implicados en la diferenciación de Th17, a saber, el IL12B, Janus quinasa 2 (JAK2), transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), receptor de quimiocinas con motivo CC 6 (CCR6) y TNFF15 , están asociados con la susceptibilidad a la EC (Barrett et al., 2008).

En pacientes con EC, la IL-17A se sobreexpresa en el intestino estenótico, en comparación con su expresión en los tejidos del área no estenótica (Biancheri et al., 2013). Curiosamente, las expresiones tanto de IL-17A como de HSP47 aumentan en el colon de pacientes con EC activa. Además, la IL-17A promueve la expresión de HSP47 y colágeno I en miofibroblastos intestinales y células CCD-18Co aisladas de pacientes. De hecho, la eliminación de HSP47 en estas células inhibe la producción de colágeno I inducida por IL-17A (Honzawa et al., 2014). Además, el tratamiento con IL-17A de células IEC-6 (una célula del intestino delgado de rata) induce EMT, disminuye la expresión de E-cadherina y aumenta la expresión de vimentina, caracol y α -SMA (Zhang et al., 2018).). También se ha informado que la IL-21 aumenta la respuesta Th1, que, a su vez, estimula a los fibroblastos intestinales para que secreten MMP en respuesta a la EC (Monteleone et al., 2006). Por cierto, las respuestas inmunitarias Th1 y Th17 están involucradas en el modelo de ratones con colitis inducida por ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) (Zhu et al., 2012). De hecho, la administración de un anticuerpo anti-IL-17 a ratones con colitis crónica, que fue inducida por la administración intrarrectal repetida de TNBS, disminuye la expresión de citoquinas relacionadas con la fibrosis, como colágeno 3, TNF- α , metalopeptidasa TIMP inhibidor 1 (TIMP-1) y MMP-2, así como citoquinas inflamatorias, a saber, IL-1 β , TGF- β 1 y TNF- α , lo que finalmente da como resultado una fibrosis suprimida (Zhang et al., 2018 ; Li et al., 2020). Sin embargo, el anticuerpo anti-IL-17A (secukinumab) y el anticuerpo anti-receptor de IL-17 (brodalumab) no lograron demostrar eficacia en el tratamiento de la EC (Hueber et al., 2012 ; Mozaffari et al., 2015). Por lo tanto, en lugar de la inhibición directa de IL-17, las vías descendentes de IL-17, como HSP47, y otras citoquinas basadas en IL-17, como IL-21, pueden ser objetivos para evitar la fibrosis intestinal.

Mecanismo de producción de biopelícula de AIEC

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

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

La EII no es un padecimiento que se reporte obligatoriamente en México. Actualmente, nuestro país no cuenta con una estadística oficial de personas afectadas con EC o CUCI, ni se cuenta con cifras oficiales sobre los costos para diagnosticar y tratar este conjunto de padecimientos, lo que se tiene son extrapolaciones hechas con base a cifras internacionales, ya que no hay disponibilidad sistemática de estudios epidemiológicos nacionales, lo que conlleva a la falta de indicadores que permitan monitorear el número de personas que sufren estos padecimientos. Lo que se tiene son estimaciones de la prevalencia realizadas con base a información cualitativa recopilada en bases de datos administrativas, provenientes de instituciones de atención a la salud del sector público y privado. Este hecho representa un reto importante para la Secretaría de Salud, ya que se estima que las cifras aumenten considerablemente en los próximos años, debido al acelerado estilo de vida y a la influencia del ambiente.

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

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

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

Se describe que AIEC afecta procesos de la célula huésped como la síntesis de proteínas, la transducción de señales, la división celular, la secreción de iones, la transcripción, la función del citoesqueleto y la función mitocondrial (44 , 163). Los estudios sobre AIEC muestran que es capaz de adherirse a la mucosa intestinal al unirse a las moléculas de adhesión celular relacionadas con el antígeno carcinoembrionario 6 (CEACAM6), invadir las células epiteliales intestinales mediante el uso de microfilamentos y microtúbulos de actina de la célula huésped, replicarse intracelularmente, translocarse a través de la barrera del intestino humano, y se mueven hacia tejidos más profundos (162 , 164 , – 168) (Figura 1). Los estudios también muestran que AIEC puede sobrevivir dentro de los macrófagos, estimular la producción de TNF- α y promover una respuesta inflamatoria granulomatosa (89 , 168). Sin embargo, en la actualidad, todavía se sabe poco sobre la patogenia in vivo de AIEC o cualquier gen que sea específico para AIEC, como se ha descrito para otros patotipos de *E. coli*, como ETEC y EAEC. Hasta ahora, las propiedades/características de aptitud vinculadas a AIEC también

se encuentran en otras cepas de *E. coli* y, por lo tanto, no pertenecen específicamente a AIEC. Se necesitan más estudios para caracterizar AIEC, así como su papel potencial en CD y marcadores que pueden usarse para identificar específicamente el patotipo AIEC.

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

Yersiniabactina (Perry and Fetherston, 2011), un agente quelante de hierro, para incorporar hierro a sus células; sin embargo, esta yersiniabactina puede ayudar a algunas bacterias a infectar las capas subepiteliales del intestino, causando inflamación y fibrosis intestinal (Kim et al., 2005 ; Ellermann et al., 2019).

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

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

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

En la actualidad, todavía se sabe poco sobre la patogenia in vivo de AIEC o cualquier gen específico para identificar AIEC, como se ha descrito para otros patotipos de *E. coli*. Se necesitan más estudios para caracterizar AIEC, así como su papel potencial en EC y marcadores que pueden usarse para identificar específicamente el patotipo AIEC.

Además, esta revisión pretende crear conciencia de que al tratarse de una enfermedad de etiología variable y causas múltiples, ningún individuo está exento de padecerla, ya que cualquier alteración como el estrés, el desequilibrio de la

microbiota (la presencia de AIEC), así como condiciones físicas, genéticas, ambientales o inmunológicas, pueden ser un detonante para padecer una EII.

Agradecimientos

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

Poner el proyecto de Conacyt

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

Referencias bibliográficas

1. Abdelhalim, K. A., Uzel, A., & Ünal, N. G. Virulence determinants and genetic diversity of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) strains isolated from patients with Crohn's disease. *Microb Pathog.* 2020;145, 104233.
2. Baldelli, V., Scaldaferrri, F., Putignani, L., & Del Chierico, F. The role of Enterobacteriaceae in gut microbiota dysbiosis in inflammatory bowel diseases. *Microorganisms.* 2021; 9(4), 697.
3. Barrios-Villa, E., Cortés-Cortés, G., Lozano-Zaraín, P., Arenas-Hernández, M. M. D. L. P., Martínez De La Peña, C. F., Martínez-Laguna, Y., Torres, C., & Rocha-Gracia, R. D. C. Adherent/invasive *Escherichia coli* (AIEC) isolates from asymptomatic people: New *E. coli* ST131 O25:H4/H30-Rx virotypes. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 2018; 17(1).
4. Barrios-Villa, E., Martínez de la Peña, C. F., Lozano-Zaraín, P., Cevallos, M. A., Torres, C., Torres, A. G., & Rocha-Gracia, R. del C. Comparative genomics of a subset of Adherent/Invasive *Escherichia coli* strains isolated from individuals without inflammatory bowel disease. *Genomics.* 2020; 112(2), 1813–1820.
5. Bretin, A., Lucas, C., Larabi, A., Dalmaso, G., Billard, E., Barnich, N., Bonnet, R., & Nguyen, H. T. T. AIEC infection triggers modification of gut microbiota composition in genetically predisposed mice, contributing to intestinal inflammation. *Scientific Reports.* 2018; 8(1).
6. Bringer, M. A., Billard, E., Glasser, A. L., Colombel, J. F., & Darfeuille-Michaud, A. Replication of Crohn's disease-associated AIEC within macrophages is dependent on TNF- α secretion. *Lab Invest.* 2012;92(3), 411-419.

7. Bustamante, P., & Vidal, R. Repertoire and Diversity of Toxin–Antitoxin Systems of Crohn’s Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli. New Insight of T his Emergent E. coli Pathotype. *Front Microbiol.* 2020;11, 807.
8. Camprubí-Font, C., Ewers, C., Lopez-Siles, M., & Martinez-Medina, M. Genetic and phenotypic features to screen for putative adherent-invasive Escherichia coli. *Front Microbiol.* 2019;10, 108.
9. Camprubí-Font, C., Lopez-Siles, M., Ferrer-Guixeras, M., Niubó-Carulla, L., Abellà-Ametller, C., Garcia-Gil, L. J., & Martinez-Medina, M. Comparative genomics reveals new single-nucleotide polymorphisms that can assist in identification of adherent-invasive Escherichia coli. *Scientific reports.* 2018;8(1), 1-11.
10. Céspedes, S., Saitz, W., Del Canto, F., De la Fuente, M., Quera, R., Hermoso, M., Vidal, R. M. Genetic diversity and virulence determinants of Escherichia coli strains isolated from patients with Crohn's disease in Spain and Chile. *Front Microbiol.* 2017; 8, 639.
11. Cieza, R., Hu, J., Ross, B. N., Sbrana, E., & Torres, A. G. The IbeA invasin of adherent-invasive Escherichia coli mediates interaction with intestinal epithelia and macrophages. *Infection and immunity.* 2015; 83, 1904-1918.
12. Conte, M. P., Longhi, C., Marazzato, M., Conte, A. L., Aleandri, M., Lepanto, M. S., Schippa, S. Adherent-invasive Escherichia coli (AIEC) in pediatric Crohn’s disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features. *BMC Res Notes.* 2017;7(1), 1-12.
13. Chassaing, B., Rolhion, N., de Vallée, A., Sa’ad, Y. S., Prorok-Hamon, M., Neut, C., Darfeuille-Michaud, A. Crohn disease–associated adherent-invasive E. coli bacteria target mouse and human Peyer’s patches via long polar fimbriae. *J Clin Invest.* 2011;121(3), 966-975.
14. Chassaing, B., Garénaux, E., Carriere, J., Rolhion, N., Guérardel, Y., Barnich, N., Darfeuille-Michaud, A. Analysis of the σ E regulon in Crohn's disease-associated Escherichia coli revealed involvement of the waaWVL operon in biofilm formation. *Journal of bacteriology.* 2015; 197(8), 1451-1465.
15. Costa RFA, Ferrari MLA, Bringer M-A, Darfeuille-Michaud A, Martins FS, Barnich N. Characterization of mucosa-associated Escherichia coli strains isolated from Crohn’s disease patients in Brazil. *BMC Microbiology.* 2020;20(1):178.
16. De la Fuente, M., Franchi, L., Araya, D., Díaz-Jiménez, D., Olivares, M., Álvarez-Lobos, M. Hermoso, M. A. Escherichia coli isolates from inflammatory bowel diseases patients survive in macrophages and activate NLRP3 inflammasome. *Int J Med Microbiol.* 2014;304(3-4), 384-392.
17. Desilets, M., Deng, X., Rao, C., Ensminger, A. W., Krause, D. O., Sherman, P. M., Gray-Owen, S. D. Genome-based definition of an inflammatory bowel disease-associated adherent-invasive Escherichia coli pathovar. *Inflamm Bowel Dis.* 2016;22(1), 1-12.
18. Dogan, B., Suzuki, H., Herlekar, D., Sartor, R. B., Campbell, B. J., Roberts, C. L., Simpson, K. W. Inflammation-associated adherent-invasive Escherichia coli are enriched in pathways for use of propanediol and iron and M-cell translocation. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20(11), 1919-1932.

19. Dreux, N., Cendra, M. D. M., Massier, S., Darfeuille-Michaud, A., Barnich, N., & Torrents, E. Ribonucleotide reductase NrdR as a novel regulator for motility and chemotaxis during adherent-invasive *Escherichia coli* infection. *Infect Immun.* 2015;83(4). 1305-1317.
20. Dunne, K. A., Allam, A., McIntosh, A., Houston, S. A., Cerovic, V., Goodyear, C. S., Wall, D. M. Increased S-nitrosylation and proteasomal degradation of caspase-3 during infection contribute to the persistence of adherent invasive *Escherichia coli* (AIEC) in immune cells. *PLoS One.* 2013;8(7), e68386.
21. Ellermann, M., & Sartor, R. B. Intestinal bacterial biofilms modulate mucosal immune responses. *J Immunol Sci.* 2018;2(2), 13.
22. F. L. França, T. J. Wells, D. F. Browning, R. T. Nogueira, F. S. Sarges, A. C. Pereira & M. D. G. de Luna. Genotypic and phenotypic characterisation of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One.* 2013; 8(7).
23. Guo, Z., Cai, X., Guo, X., Xu, Y., Gong, J., Li, Y., & Zhu, W. Let-7b ameliorates Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* induced intestinal inflammation via modulating Toll-Like Receptor 4 expression in intestinal epithelial cells. *Biochem Pharmacol.* 2018;156, 196-203.
24. He, Y., Liu, S., Kling, D. E., Leone, S., Lawlor, N. T., Huang, Y., Newburg, D. S. The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose modulates CD14 expression in human enterocytes, thereby attenuating LPS-induced inflammation. *Gut.* 2016;65(1), 33-46.
25. J.K. Yamamoto-Furushoa, Y. Gutiérrez-Grobea, J.G. López-Gómezb, F. Bosques-Padillac, J.L. Rocha-Ramírezd. Grupo del Consenso Mexicano de Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática. Consenso mexicano para el diagnóstico y tratamiento de la colitis ulcerosa crónica idiopática. *Rev Gastroenterol Mex.* 2018; 83 (2).144-167.
26. J.K. Yamamoto Furusho, F.J. Bosques Padilla, L. Charúa Guindic, T. Cortés Espinosa, R.M. Miranda Cordero, A. Saez, Y. Ledesma Osorio. "Epidemiología, carga de la enfermedad y tendencias de tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal en México". *Rev Gastroenterol Mex.* 2020; 85(3), 246-256.
27. Kaur N, Chen CC, Luther J, Kao JY. Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes.* 2011; Jul-Aug;2(4):211-6.
28. Larabi, A., Dalmasso, G., Delmas, J., Barnich, N., & Nguyen, H. T. T. Exosomes transfer miRNAs from cell-to-cell to inhibit autophagy during infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli*. *Gut microbes.* 2020;11(6),
29. Lee, J. G., Han, D. S., Jo, S. V., Lee, A. R., Park, C. H., Eun, C. S., Lee, Y. Characteristics and pathogenic role of adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease: Potential impact on clinical outcomes. *PLoS One.* 2019;14(4), e0216165.
30. Martínez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., González-Huix, F., López-Oliu, C., Dahbi, G, Darfeuille-Michaud, A. Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(6), 872-882.

31. McPhee, J. B., Small, C. L., Reid-Yu, S. A., Brannon, J. R., Le Moual, H., Coombes, B. K. Host defense peptide resistance contributes to colonization and maximal intestinal pathology by Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2014;82(8), 3383-3393.
32. Miquel, S., Peyretailade, E., Claret, L., De Vallée, A., Dossat, C., Vacherie, B., Darfeuille-Michaud, A. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PloS one*. 2010;5(9), e12714.
33. Mukhopadhyay, R. Hansen, EM. El-Omar, et al. IBD-what role do Proteobacteria play?. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012; 9, 219–230.
34. Nash, J. H., Villegas, A., Kropinski, A. M., Aguilar-Valenzuela, R., Konczyk, P., Mascarenhas, M., Coombes, B. K. Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. *BMC genomics*. 2010;11(1), 1-15.
35. Negroni, A., Colantoni, E., Vitali, R., Palone, F., Pierdomenico, M., Costanzo, M. Stronati, L. NOD2 induces autophagy to control AIEC bacteria infectiveness in intestinal epithelial cells. *J Inflamm Res*. 2016;65(10), 803-813.
36. Palmela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin G, Hirten R, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2018;67(3):574–87.
37. Pobeguts, O. V., Ladygina, V. G., Evsyutina, D. V., Ereemeev, A. V., Zubov, A. I., Matyushkina, D. S. Fisunov, G. Y. Propionate Induces Virulent Properties of Crohn's Disease-Associated *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2020;11, 1460.
38. Prorok-Hamon, M., Friswell, M. K., Alswied, A., Roberts, C. L., Song, F., Flanagan, P. K, Campbell, B. J. Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC+ *Escherichia coli* expressing *lpfA* and *pks* are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut*. 2014;63(5), 761-770.
39. T. P. Prindiville, R. A. Sheikh, S. H Cohen, et al. *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease. *Emerg Infect Dis*. 2000; 6 (17), 1–4.
40. Thompson, A. P., O'Neill, I., Smith, E. J., Catchpole, J., Fagan, A., Burgess, K. E., Clarke, D. J. Glycolysis and pyrimidine biosynthesis are required for replication of adherent–invasive *Escherichia coli* in macrophages. *Access Microbiol*. 2016;162(6), 954-965.:
41. Viennois, E., Bretin, A., Dubé, P. E., Maue, A. C., Dauriat, C. J. G., Barnich, N., Gewirtz, A. T., & Chassaing, B. Dietary Emulsifiers Directly Impact Adherent-Invasive *E. coli* Gene Expression to Drive Chronic Intestinal Inflammation. *Cell Reports*. 2020; 33(1).
42. Yang, Y., Liao, Y., Ma, Y., Gong, W., & Zhu, G. The role of major virulence factors of AIEC involved in inflammatory bowel disease—a mini-review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101(21), 7781-7787