



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA HOSPITALARIA Y DE LA COMUNIDAD

**“Análisis bioinformático del resistoma y plasmidoma de  
genomas de *Escherichia coli* Adherente-Invasiva (AIEC)”**

**Tesis presentada para obtener el grado de Licenciatura en Químico**

**Farmacobiólogo**

**PRESENTA:**

ERICK GÓMEZ SORIANO

**DIRECTORA DE TESIS:**

D.C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

**CO-DIRECTORA DE TESIS:**

D.C. ALMA LÓPEZ GARCÍA

**CO-ASESOR EXTERNO DE TESIS:**

DR. GERARDO CORTÉS CORTÉS

**13 de noviembre de 2023**

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN: .....	5
3. MARCO TEÓRICO: .....	6
3.1 <i>Escherichia coli</i> y sus patotipos .....	6
3.2 AIEC y enfermedades asociadas.....	7
3.3 Mecanismo de patogenicidad de AIEC .....	8
3.4 Tratamiento .....	9
3.5 Resistencia bacteriana.....	10
3.6 Genes de resistencia plasmídicos en <i>E. coli</i> .....	11
3.7 Elementos genéticos móviles asociados a resistencia a antibióticos. ....	14
3.7.1 Plásmidos.....	14
3.7.2 Transposones .....	15
3.7.3 Integrones .....	16
3.8 Bioinformática .....	17
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	18
6. JUSTIFICACIÓN: .....	19
7. OBJETIVOS .....	19
8. HIPÓTESIS.....	20
9. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....	20
10. MATERIAL Y MÉTODOS:.....	20
11. DIAGRAMA DE TRABAJO:.....	22
12. RESULTADOS.....	22
13. DISCUSIÓN.....	33
14. CONCLUSIONES .....	36

<b>15. PERSPECTIVAS</b> .....	37
<b>16. REFERENCIAS</b> .....	37

## 1. RESUMEN

*Escherichia coli* adherente/invasiva (AIEC) es un patotipo de la enterobacteria *E. coli* recientemente descrito que se ha visto implicado en el desarrollo de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), debido a su capacidad de invadir a las células intestinales y generar una disbiosis que propicia una respuesta inmunitaria exacerbada. Se tiene poca información sobre la resistencia de AIEC a los antibióticos y la presencia de plásmidos que pudieran diseminar genes de resistencia; por lo que la finalidad de esta tesis fue analizar genomas de AIEC depositados en bases de datos públicas hasta marzo de 2022 para determinar su filogenia, plasmidoma y resistoma. Se analizaron 30 genomas de cepas clasificadas como AIEC en la plataforma *Pathosystems Resource Integration Center* (PATRIC) pertenecientes a los filogrupo: B2 (23), B1 (3), A (), D (1) y F (1). Las cepas presentaron más de 40 genes de resistencia por genoma, siendo genes relacionados a bombas de eflujo de antibióticos los más frecuentemente encontrados. De los 30 genomas, 20 presentaron plásmidos, siendo 10 con plásmidos conjugativos, 6 movilizables y 4 no movilizables. Los principales grupos de incompatibilidad plasmídicos que estuvieron presentes en la mayoría las cepas (3 cepas no presentaron) fueron IncFIB (16), IncFII (11), Col156 (9) y ColRNAI (8). Los elementos genéticos móviles en los genomas estuvieron dominados por secuencias de inserción y repeticiones invertidas miniaturas, aunque también hubo presencia de transposones en algunos genomas. Con los resultados obtenidos se ponen en evidencia la presencia de plásmidos que albergan genes de resistencia a antibióticos en AIEC, así como, otros elementos genéticos móviles que pueden diseminar determinantes de resistencia, lo que significa un riesgo para el éxito terapéutico al tratar la colonización por AIEC en pacientes que padezcan EII.

## 2. INTRODUCCIÓN:

*Escherichia coli* es una bacteria ampliamente estudiada debido a que es parte de la microbiota humana, este microorganismo tiene diversos patotipos, entre ellos, *E. coli* adherente/invasiva (AIEC, por sus siglas en inglés), de reciente descripción y con implicaciones en Enfermedades Inflammatorias Intestinales (EII), especialmente en la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, problemas de salud con poca atención en el México. Debido a la capacidad de AIEC para colonizar el intestino y contribuir a la aparición y/o complicaciones de EII, es necesario el uso de antibióticos, para reducir el daño causado por esta bacteria (Ciapponi *et al.*, 2020; Palmela *et al.*, 2018).

El uso constante de antibióticos ha favorecido el desarrollo de la resistencia contra ellos, siendo este un problema que ha venido de la mano con el mismo descubrimiento de los antibióticos. Las bacterias tienen diversos mecanismos para manifestar resistencia contra los antibióticos, tales como: la producción de enzimas que inactivan el antibiótico, el uso de sistemas de expulsión como bombas de eflujo de antibióticos y cambios en la permeabilidad.

Los plásmidos tienen la facilidad de diseminar genes resistentes a otras bacterias, causando incluso resistencia en poblaciones enteras de microorganismos. Estos elementos bacterianos de resistencia han sido investigados en *E. coli*, encontrándose reportes de estudios de cepas aisladas de procesos clínicos humanos y animales, alimentos y ambiente, por lo que existe un aumento considerable de la resistencia a nivel mundial, encontrándose bacterias resistentes a antibióticos de múltiples familias provocando cepas multidrogorresistentes. (Clark *et al.*, 2019b; Iredell, 2022).

Para conocer los genes que portan cepas de *E. coli*, el uso de herramientas como la secuenciación masiva ha sido indispensable, ya que esta proporciona información sobre la presencia, localización y asociación de genes de resistencia, siendo indispensable el uso de plataformas como herramientas bioinformáticas para su análisis y la búsqueda de genes de resistencia a antibióticos en los genomas de

diversos microorganismos, desde un gen que codifica una enzima capaz de inhibir un antibiótico o hasta un plásmido con múltiples genes de resistencia.

Por lo anterior, en este trabajo se realizó un análisis de genomas AIEC, obtenidos de la base de datos del *GenBank*, empleándose herramientas bioinformáticas para determinar su filogenia, resistoma y plasmidoma con el propósito de brindar información sobre el contenido genético y genes de resistencia que pudieran ser transferidos horizontalmente en este patotipo de *E. coli*.

### **3. MARCO TEÓRICO:**

#### **3.1 *Escherichia coli* y sus patotipos**

La bacteria *Escherichia coli* es un habitante en la microbiota intestinal de vertebrados e inclusive de algunas plantas, que tiene una alta capacidad de ser patógeno en mamíferos y aves; es clasificado como una enterobacteria predominante entre bacterias anaeróbicas facultativas del tracto digestivo, pero en menor cantidad que las bacterias anaerobias (Belotserkovsky *et al.*, 2018).

Aunque la mayoría de su linaje corresponde a bacterias comensales, existen patotipos clasificados, en dos grandes grupos, el primero corresponde a *E. coli* patógena extraintestinal, abreviada en inglés como ExPEC, refiriéndose a patotipos con capacidades dañinas fuera del tracto digestivo, donde podemos encontrar a *E. coli* asociada a meningitis neonatal (NMEC) y *E. coli* asociada a infección de tracto urinario (UPEC). El segundo grupo corresponde a *E. coli* patógena intestinal, abreviada en inglés como InPEC, siendo patotipos con capacidad dañina en tracto digestivo, en este grupo tenemos a *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* adherente difusa (DAEC) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). Por otra parte existe un último patotipo llamado *E. coli* adherente invasiva (AIEC) siendo este el que nos comente para esta investigación (Belotserkovsky *et al.*, 2018; Palmela *et al.*, 2018; Rojas-Lopez *et al.*, 2018).

### 3.2 AIEC y enfermedades asociadas

AIEC es el patotipo más recientemente clasificado, fue descrito a finales de la década de los noventa en Francia (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998), y a partir de su descubrimiento se dio paso a su caracterización fenotípica, demostrando capacidad de adherencia e invasión a las células epiteliales del tracto digestivo, de replicación en macrófagos y de formación de biopelículas. Aun así, hasta la actualidad no existe un marcador molecular definido como los demás patotipos para caracterizar a AIEC; este hecho complica su caracterización en comparación a otros patotipos, teniendo que hacer pruebas fenotípicas como cultivos celulares para su identificación (Palmela *et al.*, 2018).

Facilitar la identificación de AIEC es importante por su relación con la EII idiopática, siendo una enfermedad crónica con dos tipos de manifestación, la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa; aunque no es del todo claro si AIEC causa estas enfermedades o sólo genera que se compliquen, ya que también ha sido encontrado en personas sin padecimientos relacionados. (Astley *et al.*, 2021; Barrios-Villa *et al.*, 2018; Palmela *et al.*, 2018; Rahmouni *et al.*, 2018). La enfermedad de Crohn es una enfermedad con la peculiaridad de inflamación crónica del tracto digestivo, principalmente del íleon terminal, estando relacionada con una desregulación del ambiente intestinal, microbiota y susceptibilidad de factores inmunológicos. En cambio, la colitis ulcerativa también se caracteriza por inflamación crónica pero es ubicada en el colon o el recto (Sakuraba *et al.*, 2014).

Se sabe que la invasión por AIEC es favorecida por un desequilibrio en la microbiota intestinal, mejor conocido como disbiosis, que es causada por distintas razones, entre las más destacables están el uso de antibióticos orales, una alimentación con poca fibra e hipercalórica y/o predisposición genética (Chervy *et al.*, 2020; Perna *et al.*, 2020). Martínez Medina (2014) ha reportado una relación positiva entre el cáncer colorrectal y la presencia de AIEC, ya que se logró aislar una cepa de este tipo de un paciente con dicho padecimiento (Martinez-Medina & Garcia-Gil, 2014).

La EII idiopática en México es una problemática con poca atención, debido a que no hay información reglamentada para su análisis; sin embargo, existen

estimaciones realizadas en México, siendo estas de 15.65 - 71.19 casos por cada 100,000 habitantes en 2015-2016 para la colitis ulcerativa y de 15.45 - 18.08 casos por cada 100,000 habitantes para la enfermedad de Crohn (Ciapponi *et al.*, 2020). Esta enfermedad afecta a la población adulta, principalmente mayores de 35 años y muestra una tendencia a la alta, reflejada en el aumento en la media de nuevos casos anuales de 28.8 en 1987-1996 a 76.1 en 1997-2006 (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2020).

### 3.3 Mecanismo de patogenicidad de AIEC

Los mecanismos de patogenicidad de AIEC son singulares, inicialmente ocurre la adherencia a células epiteliales del tracto digestivo por medio de la proteína FimH, la cual interactúa con la proteína “carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6” (CEACAM6), que es un receptor en enterocitos, y el receptor tipo Toll 4 (TLR4) (Chevalier *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2017). Además, favorece la invasión e inflamación activando a IL-8 y la quimiocina CCL20. En algunos pacientes con EII idiopática, existe sobreexpresión de CEACAM6 debido a la estabilización de Factor inducible por hipoxia (HIF), favoreciendo la colonización de AIEC (Chervy *et al.*, 2020; Martinez-Medina & Garcia-Gil, 2014). Cuando esta invasión ocurre, fomenta la producción del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y otras citocinas proinflamatorias, causando disbiosis, fomentando la internalización de AIEC al epitelio intestinal y una mayor proliferación de AIEC, sin generar la muerte dentro de los macrófagos (Martinez-Medina *et al.*, 2020; Palmela *et al.*, 2018; Perna *et al.*, 2020; Shaler *et al.*, 2019). Una particularidad de enfermedad de Crohn es el desarrollo de granulomas, relacionado con la misma invasión de AIEC (Rolhion & Darfeuille-Michaud, 2007).

*Escherichia coli* adherente invasiva tiene la capacidad de habitar y reproducirse dentro de macrófagos, evitando su muerte. La replicación de AIEC ocurre dentro de los fagosomas maduros, a pesar del ambiente extremo (alto pH, especies reactivas de oxígeno y enzimas proteolíticas), las proteínas implicadas para la supervivencia son la proteína HtrA, la tiol-disulfuro oxidoreductasa DsbA, la proteína de unión a ARN Hfq y la oxidoreductasa IbeA dependiente de FAD. Para evadir la muerte del

macrófago, AIEC utiliza la nitroasilación S y la degradación proteasomal de caspasa-3 en macrófagos infectados. Otra capacidad de AIEC es evitar la respuesta del interferón (IFN- $\gamma$ ) y del activador de la fosforilación de la transcripción (Martinez-Medina & Garcia-Gil, 2014; Palmela *et al.*, 2018).

La formación de biopelículas está asociada con la flagelina, una proteína de formación de los flagelos bacterianos y también con largas fimbrias polares, ya que entre estas forman una red que fortalece la formación de microcolonias; además de que FimH también contribuye a este fenómeno (Chevalier *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2015). Asimismo, se ha visto que la formación de biopelículas es fomentada por dietas altas en polisacáridos, lo cual también aumenta la capacidad invasiva de AIEC (Chervy *et al.*, 2020).

### 3.4 Tratamiento

Para tratar la EII, una de las principales opciones es el uso de antibióticos, como metronidazol, ciprofloxacina, rifaximina y aminoglucósidos, aunque como antes se mencionó, este tratamiento puede producir disbiosis, por eso su uso es recomendable solo si AIEC coloniza el tracto digestivo. (Chervy *et al.*, 2020; Palmela *et al.*, 2018). Existen otras alternativas como el uso de probióticos, sustancias químicas o proteínas que ayudan a reducir la colonización por AIEC, pero no favorecen su eliminación, por ejemplo, el uso de probióticos como *Saccharomyces cerevisiae* causa la unión con AIEC debido a la presencia de manosa en su pared celular lo cual tiene afinidad por el pili tipo 1 presente en el exterior de AIEC, de esta manera favorece esta unión en vez de unirse con el tracto digestivo. También se ha implementado el uso de sustancias químicas como derivados de manosa o inulina que evitan la interacción entre FimH y CEACAM6, bloqueando los sitios de unión o de igual manera, el uso de enzimas capaces de degradar a FimH, inhibir la respuesta inflamatoria o impedir la degradación de mucina (Chervy *et al.*, 2020; S. Liu *et al.*, 2021).

Algunas medidas con la capacidad de eliminar a AIEC son el uso de colicinas, bacteriocinas con capacidad selectiva, para competir contra otras bacterias (Chervy *et al.*, 2020). Otra alternativa es el uso de bacteriófagos, ya que estos son muy

específicos y sólo afectan a un determinado tipo de bacteria (se pueden utilizar para eliminar solamente a AIEC) (S. Liu *et al.*, 2021). También el favorecer la autofagia promueve reducción de la invasión por AIEC (Chervy *et al.*, 2020). Por último el trasplante de microbiota fecal, ha sido efectivo en otras infecciones en el tracto intestinal, ya que restaura la microbiota, aunque todavía no existe algún análisis de esta terapia aplicada contra colonización por AIEC (S. Liu *et al.*, 2021; Palmela *et al.*, 2018).

### **3.5 Resistencia bacteriana**

Los antibióticos son sustancias bactericidas o bacteriostáticas con gran variedad de mecanismos, aplicadas para eliminar infecciones causadas por bacterias, aunque en la actualidad conocemos a los antibióticos como medicamentos, en realidad se han utilizado sustancias bactericidas desde hace cientos de años, existiendo evidencia de uso de remedios contra infecciones desde la antigüedad (Lee Ventola, 2015b).

La resistencia bacteriana a antibióticos es una problemática mundial, teniendo relevancia a nivel nosocomial debido a las complicaciones en pacientes hospitalizados, llegando a causar la muerte, puesto que no hay un tratamiento oportuno efectivo (OMS, 2020). En la actualidad la identificación de bacterias multidrogo-resistentes no se limita al ambiente hospitalario, sino involucra cada vez más a cepas recuperadas de alimentos, muestras ambientales y personas clínicamente sanas (Morris & Cerceo, 2020).

La multiresistencia está íntimamente relacionada al resistoma, refiriéndose a todos los genes de resistencia presentes en un organismo. Este fenómeno se ha incrementado con el paso de los años a causa de diversos factores como el aumento en el uso de antibióticos en la ganadería, acuicultura, clínica humana, veterinaria, las migraciones globales, saneamiento deficiente, malos sistemas de alcantarillado y sobrepoblación (Wang *et al.*, 2018). Además, otros puntos que han causado gran impacto han sido las prescripciones incorrectas y la poca innovación en el desarrollo de antibióticos, reduciendo su investigación en los últimos años (Lee Ventola, 2015b).

Debido a este impacto, se han creado diversas medidas para combatir la resistencia bacteriana como campañas para el uso adecuado de los medicamentos, adquirir únicamente antibióticos por medio de recetas y regular el uso de antibióticos en los alimentos y como promotores del crecimiento animal, lo cual ha traído algunas mejoras considerables principalmente en los países donde se han aplicado estas medidas (Rather *et al.*, 2017). Otra forma de combatir la resistencia bacteriana es la investigación y producción de nuevos antibióticos, pero en los últimos años esto ha disminuido considerablemente porque no es rentable para las empresas farmacéuticas, implicando el desarrollo de pocos antibióticos de amplio espectro y con precios altos (Lee Ventola, 2015a).

Los microorganismos generan resistencia de diversas maneras, por ejemplo, producción de enzimas, que tienen la capacidad de modificar la estructura del antibiótico (como las  $\beta$ -lactamasas) o modificando el sitio donde efectúan su acción antimicrobiana. Otro mecanismo es la disminución de la permeabilidad en la pared celular por medio de porinas, reduciendo la cantidad de antibiótico intracelular (Lowe, 2016). El desarrollo de estos mecanismos ocurre naturalmente al recibir un estímulo estresante o transmisión de genes entre bacterias, generalmente de la misma especie, pero este fenómeno también puede ocurrir entre diferentes especies. Los plásmidos se han descrito como una herramienta importante de las bacterias para la transmisión de genes, principalmente a través de la conjugación. La transmisión de genes de resistencia aumenta considerablemente cuando existe un mal uso y abuso de antibióticos, ya sea por poco seguimiento o automedicación, ya que aumenta la probabilidad de supervivencia de las bacterias (Reygaert, 2018).

Enfocándose en *E. coli*, esta genera resistencia a través de cuatro mecanismos: modificaciones del sitio blanco, enzimas, bombas de eflujo y cambios de permeabilidad. Cabe recalcar que cada uno de los mecanismos es aditivo, ya que no se interrumpe uno con el otro (Correia *et al.*, 2017).

### **3.6 Genes de resistencia plasmídicos en *E. coli***

El aumento de genes resistentes a antibióticos en plásmidos específicamente en *E. coli*, se ha debido al uso extensivo de antibióticos, generalmente causado por

cantidades de antibiótico en niveles menores a la concentración mínima inhibitoria en el ambiente, ocurriendo este fenómeno en diversas partes del mundo. Como en un estudio en China donde se analizó el efecto del *quorum sensing* en plásmidos de *E. coli*, el cual favoreció la transmisión del plásmido cuando se expresaron autoinductores del *quorum sensing*, se encontró como en concentraciones bajas de antibióticos aumentaron los genes *bla*, *aphA*, *tetA* y *tetR* con capacidad de resistencia contra kanamicina, ampicilina y tetraciclina (Zhang *et al.*, 2018).

Muchos estudios están enfocados en el análisis de genes de resistencia a quinolonas como *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrVC*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* y *qqxAB*, los cuales reducen la capacidad antimicrobiana modificando la estructura del antibiótico, el sitio de acción o por medio de bombas de eflujo (Correia *et al.*, 2017; Gordon & George, 2015). Las quinolonas tienen un gran uso en el ambiente clínico y en la industria alimentaria debido a su amplio espectro, sin embargo, esto ha incrementado la resistencia contra estos antibióticos; este efecto es favorecido por la transferencia de plásmidos, los cuales se manifiestan en ambientes estresantes (Naeem *et al.*, 2016; San Millan, 2018). En un estudio realizado en Brasil se analizó *E. coli* enteropatógena atípica (aEPEC), un patotipo implicado en diarrea en infantes. En este análisis se tenían 126 cepas recolectadas, en ellas encontraron 18 cepas con plásmidos, de las cuales 11 cepas poseían resistencia antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, ácido nalidíxico y tetraciclina) (Silva *et al.*, 2020). En un estudio semejante en China, con 30 cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) aisladas de pacientes adultos con diarrea, 26 eran resistentes a azitromicina, un medicamento ampliamente utilizado para combatirlo. Se encontró también un plásmido con el gen *mphA*, que confiere resistencia a macrólidos (Xiang *et al.*, 2020).

Además, en Alemania en un ambiente ganadero se encontró la presencia de genes *qnr* en *E. coli*, demostrando la presencia de este gen plasmídico. A pesar de que la prevalencia del gen *qnr* entre las bacterias aisladas fue relativamente baja (3.7%), existe el riesgo del contacto de cepas multirresistentes con otros microorganismos (Juraschek *et al.*, 2021). También en un estudio realizado en animales en Túnez se

encontraron genes plasmídicos que confieren resistencia a quinolonas (*qnrS1* y *qnrB1*), además de mutaciones cromosómicas (Kilani *et al.*, 2020).

Por otra parte, en un estudio realizado en India en agua contaminada para identificar resistencia de diversas bacterias contra antibióticos y metales pesados, se analizó la resistencia a quinolonas, de 16 cepas de *E. coli*, 9 contaban con el gen plasmídico *qnrS*, además de ser resistentes a metales pesados (Siddiqui *et al.*, 2020). En otro estudio en Chile en un ambiente de acuicultura con uso de quinolonas existían genes de resistencia como *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* (Tomova *et al.*, 2018); en Nigeria donde se analizaron cepas de *E. coli* en desagües, estas cepas tenían altos porcentajes de genes de resistencia como *aac(6')-Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA* y *oqxAB* (Adekanmbi *et al.*, 2022). Otro caso es el análisis realizando en China donde se investigó en carne de cerdo una cepa de *E. coli* con 3 plásmidos (p974-IncF p974- NDM p974- MCR) esta cepa multirresistente presentaba resistencia a ciprofloxacina, carbapenem y colistina, siendo esta una señal preocupante debido a que las infecciones son difíciles de tratar y su presencia en alimentos (X. Liu *et al.*, 2022).

En una investigación realizada en perros con colitis granulomatosa asociada a *E. coli* invasiva se encontró resistencia contra fluoroquinolonas, es importante destacar que esta *E. coli* invasiva tiene similitudes con AIEC en enfermedad de Crohn. En el estudio se logró aislar 26 cepas de *E. coli* resistentes, siendo la mayoría de estas con alteraciones cromosómicas, como mutaciones en *gyrA* (26/26), *parE* (11/26) y *parC* (24/26), en contra parte a la transferencia de plásmidos donde sólo fueron 7/26, siendo 4 cepas con el plásmido que portaba *qepA*, 2 con *aac (6')-Ibcr* y una con *qnrS*; la mayoría de estas cepas fueron multirresistentes. Aun así, los datos obtenidos relacionados con la transferencia de plásmidos, son parecidos a los de humanos en EUA y Europa (Manchester *et al.*, 2021). En otro estudio realizado en perros con colitis granulomatosa donde se identificó la resistencia a fluoroquinolonas, se encontró que cepas de *E. coli* con resistencia es menos móvil e invasiva en comparación a cepas sensibles (Dogan *et al.*, 2020).

Mientras tanto en ambientes clínicos existen diversos casos de resistencia plasmídica, como en Irán donde se logró aislar 437 cepas de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, de las cuales 10 cepas de *E. coli* resultaron con genes *ampC* mediados por plásmidos (*bla<sub>DHA</sub>* y *bla<sub>CIT</sub>*), estos son genes relacionados a resistencia a  $\beta$ -lactámicos (Robotjazi *et al.*, 2021), parecido a la investigación anterior pero en Sudáfrica donde a partir de cepas aisladas de *E. coli* y *K. pneumoniae* se encontró resistencia a colistina en 12 cepas de *E. coli*, además de encontrarse el gen *mcr-1*, un gen plasmídico relacionado con la resistencia a colistina (Newton-Foot *et al.*, 2017). También en Nepal se encontró *mcr-1*, sólo que el análisis fue en muestras de pollos y humanos, en estos se aislaron 76 y 56 cepas de *E. coli* en ese mismo orden, donde 21/76 y 11/56 tenían al gen *mcr-1* (Muktan *et al.*, 2020).

### **3.7 Elementos genéticos móviles asociados a resistencia a antibióticos.**

#### **3.7.1 Plásmidos**

Los plásmidos son estructuras circulares extracromosómicas autorreplicables con la capacidad de dar mayor supervivencia al microorganismo en condiciones adversas, como en presencia de antibióticos, metales pesados, especies reactivas de oxígeno, o pueden aumentar la patogenicidad. Los plásmidos principalmente se localizan en bacterias pero también existen en hongos y levaduras (Iredell, 2022; Walker, 2012). Los plásmidos son extracromosómicos y accesorios porque sería un gasto en términos del fitness bacteriano generar proteínas con capacidad de ocasionar resistencia cuando no hay estas condiciones. Esta misma situación ocurre en mutaciones cromosómicas, las cuales tienen una ventaja contra antibióticos, pero generalmente traen desventajas en el funcionamiento de enzimas esenciales para la supervivencia, disminuyendo su eficacia (Gordon & George, 2015; Shintani *et al.*, 2015).

Los plásmidos pueden ser transferidos por medio de división bacteriana, ya que esta también replica al plásmido recibiendo la célula hija (transferencia vertical). Otro proceso de transmisión de plásmidos es la transferencia horizontal a través de la conjugación, hecho que puede ocurrir entre diferentes bacterias. Para que ocurra la

transferencia de plásmidos es necesario que exista el sitio de transferencia (*oriT*), la proteína relaxasa, la proteína de acoplamiento tipo IV (T4CP) y el sistema de secreción tipo IV (T4SS) (Shintani *et al.*, 2015). Un plásmido en particular puede estar distribuido en diversas bacterias de distintas especies, puede estar presente o ausente en un mismo tipo de organismo ya que no son parte del genoma central debido a que generalmente se manifiestan en condiciones adversas (Clark *et al.*, 2019b).

A pesar de que los plásmidos no sean esenciales para las bacterias, su prevalencia ha aumentado, en especial plásmidos con genes de resistencia a antibióticos que codifican para enzimas o bombas de eflujo. La resistencia contra antibióticos ha aumentado con el paso de los años, en algunos casos desde el mismo descubrimiento de antibióticos como las penicilinas o los macrólidos se han encontrado genes de resistencia, u otros como en las quinolonas, han tardado más de 30 años en reportarse genes de resistencia. Esta situación viene a la par con la presencia de plásmidos, ya que al existir mayor exposición de las bacterias a los antibióticos, los microorganismos con plásmidos persistirán, transmitiéndolos a otras bacterias mediante conjugación (Clark *et al.*, 2019b).

Existen plásmidos que portan genes asociados a la resistencia contra antibióticos como aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprima, tetraciclinas, macrólidos, fosfomicina y quinolonas, siendo grupos muy analizados los genes en plásmidos relacionados a quinolonas, aminoglucósidos y  $\beta$ -lactámicos, ya que este tipo de antibióticos llevan muchos años en la parte clínica. En estos plásmidos podemos encontrar genes como *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>SHV</sub>, implicados en la resistencia contra  $\beta$ -lactámicos o también genes resistentes a quinolonas como *qnr* (Kumar, 2021; Li *et al.*, 2019).

### 3.7.2 Transposones

Los transposones son elementos compuestos de ADN con la capacidad de unirse al genoma, generando una mutación. Esto puede ocasionar que un gen no pueda expresarse (el transposón a la región codificante) o se exprese mucho más (el transposón se une a la región reguladora), y tiene la capacidad de moverse entre

el cromosoma y los plásmidos. Los transposones están compuestos por 2 partes esenciales repetidas invertidas en cada extremo y una secuencia que codifica una transposasa, la enzima con la capacidad de mover al transposón de un sitio a otro. Las secuencias más sencillas son conocidas como secuencias de inserción (IS) y poseen sólo transposasa; en cambio las secuencias más grandes conocidas como transposón compuesto (Tn) tienen diversos contenidos además de la transposasa (Kumar, 2021).

Las IS son la forma más básica de elementos genéticos móviles y estas sólo pueden codificar a la transposasa; la secuencia está rodeada por secuencias repetidas invertidas (10-40 pares de bases en tamaño). La transposasa además de tener la capacidad enzimática de mover la secuencia, también puede regularse. La secuencia de la transposasa es *orfAB* y la proteína reguladora es *orfA*. Para que ocurra el movimiento de IS deben existir marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) por un desplazamiento del marco de lectura el cual ocurre en la traducción, esto no ocurre frecuentemente porque podría dañarse el cromosoma. Las acciones de las secuencias de inserción pueden interferir con la transcripción del gen, provocando una mutación ya sea por delección, inserción o duplicación (Clark *et al.*, 2019a).

Los transposones compuestos, al ser de mayor tamaño pueden tener diferente contenido, como genes de resistencia a los antibióticos, genes de virulencia y genes metabólicos, siendo esto una importante rasgo de supervivencia que puede estar tanto en ADN cromosómico como en plásmidos (Clark *et al.*, 2019a). Se ha encontrado por ejemplo el Tn21 portando genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos como *bla<sub>OXA</sub>* y *bla<sub>PSE</sub>*, además de resistencia contra mercurio y trimetoprima (Sultan *et al.*, 2018).

### 3.7.3 Integrones

Los integrones son los elementos de adquisición de genes por medio de expresión y almacenamiento de casetes, ubicados en cromosomas, plásmidos y transposones. El integrón está compuesto por 3 partes: un gen que codifica la integrasa (*intI*), un sitio de integración específico (*attI*), y un promotor funcional (*Pc*).

Los integrones capturan los ORF exógenos a través de la recombinación específica del sitio y proporcionan al casete su función (Clark *et al.*, 2019a; Sultan *et al.*, 2018).

Los casetes por lo general portan genes de resistencia a antibióticos, pero son incapaces de replicarse o propagarse por sí solos, para eso necesitan estar unidos a un integrón por medio del *attI*. El integrón tiene una relación estrecha con los transposones, ya que estos mueven genes al ADN cromosómico y plásmidos para manifestar la resistencia contra antibióticos. Los integrones pueden ser clasificados en 4 clases: Clase 1 a 4 (de acuerdo con la secuencia de la integrasa *intI*), siendo las 3 primeras clases asociadas a elementos genéticos móviles y la última asociada al cromosoma. En los integrones Clase 1 se han localizado genes de resistencia como *qacEΔ1*, *sul1*, *aadA* al igual que genes de resistencia a trimetoprima. En Clase 2 se han encontrado *sat1*, *aadA1* y *dfrA1*; en Clase 3 a *bla<sub>IMP-1</sub>* y en Clase 4 genes asociados a resistencia contra cloranfenicol y fosfomicina (Sultan *et al.*, 2018).

### 3.8 Bioinformática

La bioinformática, se refiere al uso de herramientas electrónicas para el análisis de información biológica; es una nueva área con diversas aplicaciones, en particular en la microbiología debido a la gran cantidad de datos a analizar, como pueden ser análisis de genomas, el descubrimiento de un fármaco, modelaje molecular, sólo por mencionar algunos.

Desde el conocimiento de la estructura del ADN el uso de la bioinformática es esencial para el entendimiento de la genética, siendo casi indispensable para analizar los datos obtenidos en un genoma, este análisis de manera manual sería una tarea ardua (Akhtar *et al.*, 2022). Este es uno de los motivos del porque la bioinformática y la genética ahora son áreas muy allegadas. En la actualidad el uso de herramientas electrónicas para el análisis de genomas es diverso, al igual el uso de bases de datos, ya sean para el análisis de estructuras como cromosomas, plásmidos u otras estructuras extracromosómicas, además de conocer el funcionamiento del genoma (Kumar, 2021).

#### 4. MARCO DE REFERENCIA

En España se realizó un estudio para conocer la resistencia a antibióticos (principalmente  $\beta$ -lactámicos) en cepas AIEC y no AIEC; se analizaron 49 aislados en total, siendo 22 cepas AIEC. Las cepas AIEC presentaron mayor resistencia contra  $\beta$ -lactámicos que las no AIEC, además sólo una cepa AIEC presentó resistencia a quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina, marbofloxacina y enrofloxacina), siendo la cepa AIEC24, la que presentó resistencia también a otros antibióticos. Esto sugiere que las quinolonas pudieran ser una opción de tratamiento más viable en comparación a otros antibióticos como  $\beta$ -lactámicos para combatir AIEC en enfermedad de Crohn (Martinez-Medina *et al.*, 2020).

Por otra parte, en Canadá se realizó un estudio donde se aisló a *E. coli* NRG857c (AIEC) de un paciente con enfermedad de Crohn, el genoma entero de esta bacteria fue secuenciado completamente encontrándose un plásmido con genes resistentes a antibióticos como aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclina y trimetoprima; también se caracterizaron 6 islas genómicas (PI-1 a PI-6) (Nash *et al.*, 2010). De igual manera en Canadá donde se analizó la cepa NRG857c en el plásmido anteriormente descrito en la isla genómica PI-6 se localizó un gen resistente a péptidos antimicrobianos, donde eliminaron a PI-6 logrando disminuir la invasión causada por AIEC (McPhee *et al.*, 2014).

Más recientemente en un estudio en México, se analizaron diversas cepas de *E. coli*, entre ellas cuatro cepas AIEC (C7223, C7225, C7226 y C7230) aisladas de personas sanas; mismas que portaron diversos genes de virulencia, además de genes de resistencia contra  $\beta$ -lactámicos y quinolonas (Barrios-Villa *et al.*, 2018).

#### 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

AIEC es un patotipo poco estudiado debido a su reciente descubrimiento, por lo que es necesario realizar análisis genómicos con la ayuda de herramientas bioinformáticas, para conocer el contenido de genes de resistencia, mecanismos genéticos de transferencia y su filogenia, entre otras características. Además, AIEC se han asociado a la EII, una problemática poco atendida en nuestro país y con una tendencia al alza. El presente análisis se realizó mediante el uso de herramientas

bioinformáticas para determinar la filogenia, resistoma y plasmidoma de genomas de AIEC depositados en el *GenBank* y en el Pathosystems Resource Integration Center (*PATRIC*).

## **6. JUSTIFICACIÓN:**

Es importante realizar un análisis en AIEC por tener una estrecha relación con la EII (enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa) y evidenciar genes asociados a la resistencia a antibióticos acarreados por plásmidos. La información relacionada a AIEC y genes de resistencia en plásmidos es limitada, por esa razón es necesario identificar posibles plásmidos y genes de resistencia. La mayoría de los análisis realizados en cepas obtenidas de pacientes sólo describen sus características fenotípicas o maneras de reducir el impacto. La información es limitada respecto a genes portados por plásmidos en AIEC, además de que EII es un problema en el país con poca atención y con aumento en su incidencia.

## **7. OBJETIVOS**

### **General**

Caracterizar el resistoma y plasmidoma de genomas de *E. coli* Adherente-Invasiva (AIEC) depositados en la base de datos del *GenBank*.

### **Objetivos particulares**

1. Determinar el filogrupo, serotipo y la secuencia tipo de los genomas AIEC depositados en el *GenBank*.
2. Determinar el perfil de resistencia de genomas de AIEC.
3. Caracterizar parcialmente el perfil plasmídico de genomas AIEC.
  - a. Identificar el replicón de plásmidos contenidos en genomas AIEC
  - b. Determinar elementos de conjugación (SST4, relaxasa, oriT, TC4P) contenidos en los plásmidos de genomas AIEC.
4. Identificar elementos genéticos móviles relacionados con el entorno de genes de resistencia a antibióticos.

## 8. HIPÓTESIS

Las cepas de AIEC presentan plásmidos que portan genes de resistencia a antibióticos.

## 9. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Este trabajo fue un estudio descriptivo, en el que se incluyeron cepas AIEC proporcionadas por el Pathosystems Resource Integration Center (*PATRIC*) (<https://www.patricbrc.org/>). Se buscaron genomas “AIEC” y sólo se incluyeron las cepas bacterianas de *E. coli* clasificadas como “AIEC”. Se descargó el genoma de cada cepa seleccionada en el *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Al tener el genoma de cada cepa se determinó su filogenética, por medio de las plataformas Clermont typing (<http://clermontyping.iame-research.center/> v. 21.03) para determinar el filogrupo, SeroType Finder (<https://cge.food.dtu.dk/services/SerotypeFinder-2.0/>, v. 2.0.1) para determinar el serotipo y PubMLST (<https://pubmlst.org/>) para el secuenciotipo. Finalmente, se identificaron los elementos plasmídicos con ayuda de COPLA (<https://castillo.dicom.unican.es/copla/>), CARD (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rqi>, v. 5.2.1) para el análisis de los genes de resistencia, *oriT*-Finder (<https://tool-mml.sjtu.edu.cn/oriTfinder/oriTfinder.html>, v 1.1) para el análisis de elementos de conjugación y Mobile Element Finder (<https://cge.food.dtu.dk/services/MobileElementFinder/>, v 1.0.3) para el análisis de elementos móviles genéticos.

## 10. MATERIAL Y MÉTODOS:

Este trabajo se realizó de manera *in silico* analizando datos mediante diversas plataformas bioinformáticas, descritas en la tabla 1.

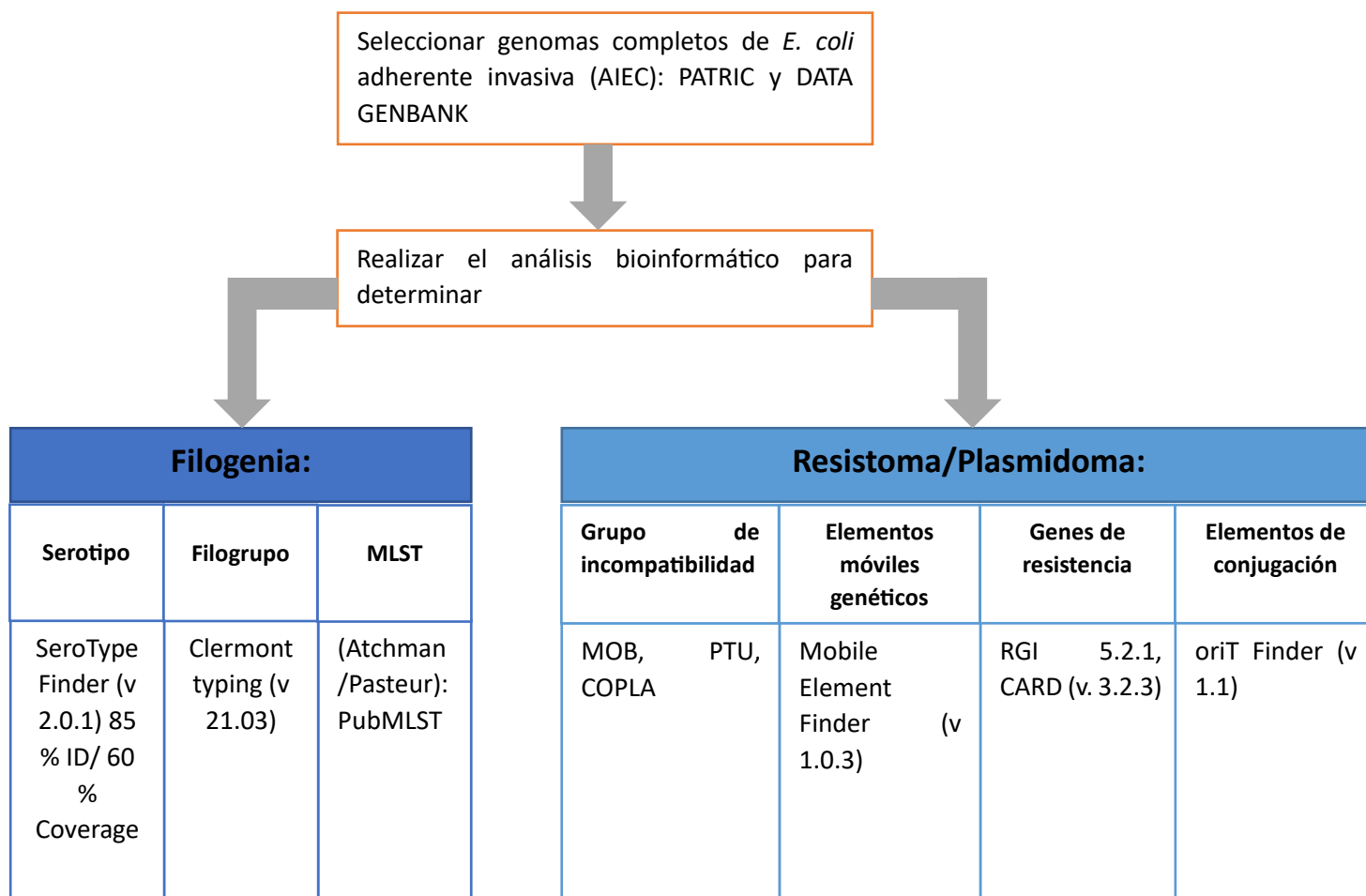
**Tabla 1.** Plataformas bioinformáticas para el análisis de AIEC.

Nombre	Link	Función
Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC)	<a href="https://www.patricbrc.org/">https://www.patricbrc.org/</a>	Análisis del genoma

<b>GenBank</b>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a>	Análisis del genoma
<b>Clermont typing</b>	<a href="http://clermontyping.iame-research.center/">http://clermontyping.iame-research.center/</a>	Determinar filogrupo
<b>SeroType Finder</b>	<a href="https://cge.food.dtu.dk/services/SerotypeFinder-2.0/">https://cge.food.dtu.dk/services/SerotypeFinder-2.0/</a>	Determinar serotipo
<b>PubMLST</b>	<a href="https://pubmlst.org/">https://pubmlst.org/</a>	Determinar filogenética
<b>COPLA</b>	<a href="https://castillo.dicom.unican.es/copla/">https://castillo.dicom.unican.es/copla/</a>	Análisis de elementos plasmídicos
<b>CARD</b>	<a href="https://card.mcmaster.ca/analyze/rqi">https://card.mcmaster.ca/analyze/rqi</a>	Análisis de genes de resistencia
<b>OriT-Finder</b>	<a href="https://tool-mml.sjtu.edu.cn/oriTfinder/oriTfinder.html">https://tool-mml.sjtu.edu.cn/oriTfinder/oriTfinder.html</a>	Análisis de elementos de conjugación
<b>Mobile Element Finder</b>	<a href="https://cge.food.dtu.dk/services/MobileElementFinder/">https://cge.food.dtu.dk/services/MobileElementFinder/</a>	Análisis de Elementos móviles genéticos

Para seleccionar las cepas de AIEC en *PATRIC* (<https://www.patricbrc.org/>), se consideraron sólo las cepas de *E. coli* clasificadas como patotipo “AIEC” y que tuvieran el genoma ensamblado completamente.

## 11. DIAGRAMA DE TRABAJO:



## 12. RESULTADOS

Después de realizar el análisis bioinformático se obtuvieron diversos datos, donde se recolectaron 30 cepas clasificadas como AIEC en *PATRIC*: 13I, AIEC01 AIEC07, AIEC17, C4435, C7223, C7225, C7226, C7230, CD3, CD26, CD44, CD121, ECG04, ECG11, ECG28, HM488, HM-605, LF82, NRG857c, T75, UC5, UC37, UM128, UM131, UM141, UM146, UM-146, UM147 y UM149 (Tabla 2). Las cepas C4435, C7223, C7225, C7226 y C7230 fueron reportadas en México, las cepas CD3, CD26, CD44, CD121, NRG857c, UC5, UC37, UM128, UM131, UM141, UM146, UM147 y UM149 en Canadá, las cepas AIEC01, AIEC07, AIEC17, ECG04, ECG11 y ECG28 en España, las cepas 13I, HM488, T75 y UM-146 en EUA, finalmente la cepa HM-605 Reino Unido y LF82 en Francia. Todas las cepas fueron aisladas en humanos. La mayoría de las cepas (23 de 30) pertenecen al filogruppo

B2, las demás cepas son del filogrupo B1 (3 de 30), A (2 de 30), D (1 de 30) y F (1 de 30). Respecto al secuencia tipo y serotipos, se encontraron similitudes, siendo C4435, C7223, C7225, C7226 y C7230 las que comparten los mismos, junto con ECG04 y AIEC07, LF82 y NRG857c, AIEC01 y HM488, UM146 y UM-146, AIEC17 y ECG28 (Tabla 2).

En los 30 genomas se detectaron de 40-57 genes relacionados con la resistencia a antibióticos, y solo en 2 de ellos (UM146 y NRG857c) se identificaron plásmidos. En 3 de los genomas (C7226, LF82 y UC5) no fueron detectados replicones plasmídicos, por otra parte, 10 genomas no mostraron la presencia del origen de replicación plasmídico OriT, siendo ellos AIEC07, C4435, C7225, C7226, C7230, LF82, T75, UC5, UC37 y UM141. Las cepas que tienen la proteína de acoplamiento tipo IV (T4CP), son las cepas 13I, AIEC01, AIEC17, CD3, ECG04, ECG28, HM488, HM605, NRG857c, T75, UC37, UM146 y UM147. Las cepas que tienen el sistema de secreción tipo IV (T4SS) son las cepas 13I, AIEC01, AIEC17, C7223, CD3, ECG11, ECG28, HM488, HM605, LF82, NRG857c, T75, UC37, UM146 y UM147. (Tabla 3).

Como se mencionó anteriormente, los genomas de AIEC presentaron 40-57 genes relacionados a resistencia a antibióticos, presentado 3 de ellos más de 50 genes: NRG857C con 57 genes, C7223 con 55 y UM128 con 53. Estos genes fueron clasificados dependiendo de su mecanismo de acción contra antibióticos: eflujo de salida de antibióticos, inactivación del antibiótico, alteración del sitio blanco del antibiótico y remplazo del sitio blanco. De los 30 genomas casi todos los genes de resistencia presentados fueron de bombas de eflujo de salida de antibióticos siendo de 34-43 genes por genoma; los otros más comunes son de inactivación del antibiótico estando de 1-8 genes presentes, mientras que los genes de alteración del sitio blanco fueron de 3-5 genes, y finalmente de 1-3 genes de remplazo del sitio blanco sólo detectados en 11 genomas (Figura 1). Los promedios de genes para cada mecanismo de acción se muestran en la tabla 4.

**Tabla 2.***Cepas clasificadas como AIEC recopiladas de PATRIC*

Cepa	País de sumisión	Huésped	Año de recolección	Fecha de finalización del estudio	Filogrupo	Secuenciotipo	Serotipo	Ensamblaje
<b>13I</b>	EUA	Humano	ND	09/17/2019	B2	141	O50:H6	GCA_008553725.1
<b>AIEC01</b>	España	Humano	ND	03/14/2018	B2	73	O6:H1	GCA_900130205.1
<b>AIEC07</b>	España	Humano	ND	03/14/2018	B1	3232	O22:H7	GCA_900130225.1
<b>AIEC17</b>	España	Humano	ND	03/14/2018	B2	569	O134:H31	GCA_900130175.1
<b>C4435</b>	México	Humano	2010	01/07/2019	B2	131	O25:H4	GCA_003999775.1
<b>C7223</b>	México	Humano	2012	01/29/2019	B2	131	O25:H4	GCA_004121025.1
<b>C7225</b>	México	Humano	2012	01/29/2019	B2	131	O25:H4	GCA_004121005.1
<b>C7226</b>	México	Humano	2012	01/29/2019	B2	131	O25:H4	GCA_004120975.1
<b>C7230</b>	México	Humano	2012	01/29/2019	B2	131	O25:H4	GCA_004120965.1
<b>CD3</b>	Canadá	Humano	2006	02/23/2016	B1	59	O58:H25	GCF_001571665.1
<b>CD26</b>	Canadá	Humano	2006	02/23/2016	A	399	O8:H30	GCF_001571685.1
<b>CD44</b>	Canadá	Humano	2006	02/23/2016	B2	58	O16:H6	GCF_001571645.1
<b>CD121</b>	Canadá	Humano	2006	02/23/2016	F	144	O1:H7	GCF_001571595.1
<b>ECG04</b>	España	Humano	ND	03/14/2018	B1	3232	O22:H7	GCA_900130215.1
<b>ECG11</b>	España	Humano	ND	03/14/2018	B2	73	O6	GCA_900130195.1
<b>ECG28</b>	España	Humano	ND	03/14/2018	B2	569	O134:H31	GCA_900130185.1
<b>HM488</b>	EUA	Humano	ND	09/17/2019	B2	73	O6:H1	GCA_008553755.1
<b>HM-605</b>	Reino Unido	Humano	ND	05/23/2011	B2	ND	O1:H7	GCA_000285375.1
<b>LF82</b>	Francia	Humano	ND	01/26/2009	B2	135	O83:H1	GCA_000284495.1
<b>NRG857c</b>	Canadá	Humano	ND	11/29/2010	B2	135	O83:H1	GCA_000183345.1
<b>T75</b>	EUA	Humano	ND	09/17/2019	A	10	O101:H10	GCA_008553705.1
<b>UC5</b>	Canadá	Humano	2006	02/23/2016	D	404	O17/O77:H41	GCF_001571675.1
<b>UC37</b>	Canadá	Humano	2006	02/23/2016	B2	720	O75:H5	GCF_001571745.1
<b>UM128</b>	Canadá	Humano	2006	02/23/2016	B2	636	O21:H7	GCF_001571725.1

<b>UM131</b>	Canadá	Humano	2006	02/23/2016	B2	73	O50:H1	GCF_001571575.1
<b>UM141</b>	Canadá	Humano	2006	02/23/2016	B2	95	O18:H7	GCF_001571565.1
<b>UM146</b>	Canadá	Humano	ND	09/23/2010	B2	643	O18ac:H7	GCA_000148605.1
<b>UM-146</b>	EUA	Humano	ND	09/17/2019	B2	643	O18ac:H7	GCA_008553695.1
<b>UM147</b>	Canadá	Humano	2006	02/23/2016	B2	647	O109:H5	GCF_001571755.1
<b>UM149</b>	Canadá	Humano	2006	02/23/2016	B2	646	O22:H5	GCF_001571585.1

ND: dato no disponible en el bioproyecto del genoma.

**Tabla 3.***Información del plasmidoma en genomas recopilados de AIEC*

Cepa	Ensamblaje	N° genes resistente	N° Plásmidos	Replicones	Ori T	Relaxas a	T4C P	T4SS
<b>13I</b>	GCA_00855372 5.1	51	ND	IncFIB(AP001918);IncFIC(FII);IncI1;p0111	1	1	1	1
<b>AIEC01</b>	GCA_90013020 5.1	48	ND	Col156;ColRNAI;IncFIB(AP001918);IncFII(29)	1	1	1	1
<b>AIEC07</b>	GCA_90013022 5.1	46	ND	ColRNAI	0	0	0	0
<b>AIEC17</b>	GCA_90013017 5.1	50	ND	ColRNAI;IncFIB(AP001918);IncFII(29);IncQ1	1	1	1	1
<b>C4435</b>	GCA_00399977 5.1	46	ND	IncFIB(AP001918)	0	0	0	0
<b>C7223</b>	GCA_00412102 5.1	55	ND	IncFIA;IncFII	1	0	0	1
<b>C7225</b>	GCA_00412100 5.1	46	ND	IncFIB(AP001918)	0	0	0	0
<b>C7226</b>	GCA_00412097 5.1	46	ND		0	0	0	0
<b>C7230</b>	GCA_00412096 5.1	47	ND	Col156;IncFIB(AP001918)	0	0	0	0
<b>CD3</b>	GCF_001571665 .1	45	ND	IncFII	1	1	1	1
<b>CD26</b>	GCF_001571685 .1	40	ND	Col440I;ColRNAI;IncFIB(K);IncR;pESA2	1	0	0	0
<b>CD44</b>	GCF_001571645 .1	47	ND	Col(MG828);ColpVC	1	1	0	0
<b>CD121</b>	GCF_001571595 .1	47	ND	Col(BS512);Col156;Col156;ColRNAI	1	0	0	0
<b>ECG04</b>	GCA_90013021 5.1	46	ND	ColRNAI	1	1	1	0
<b>ECG11</b>	GCA_90013019 5.1	47	ND	Col156;IncFIB(AP001918);IncFII(29)	1	1	0	1

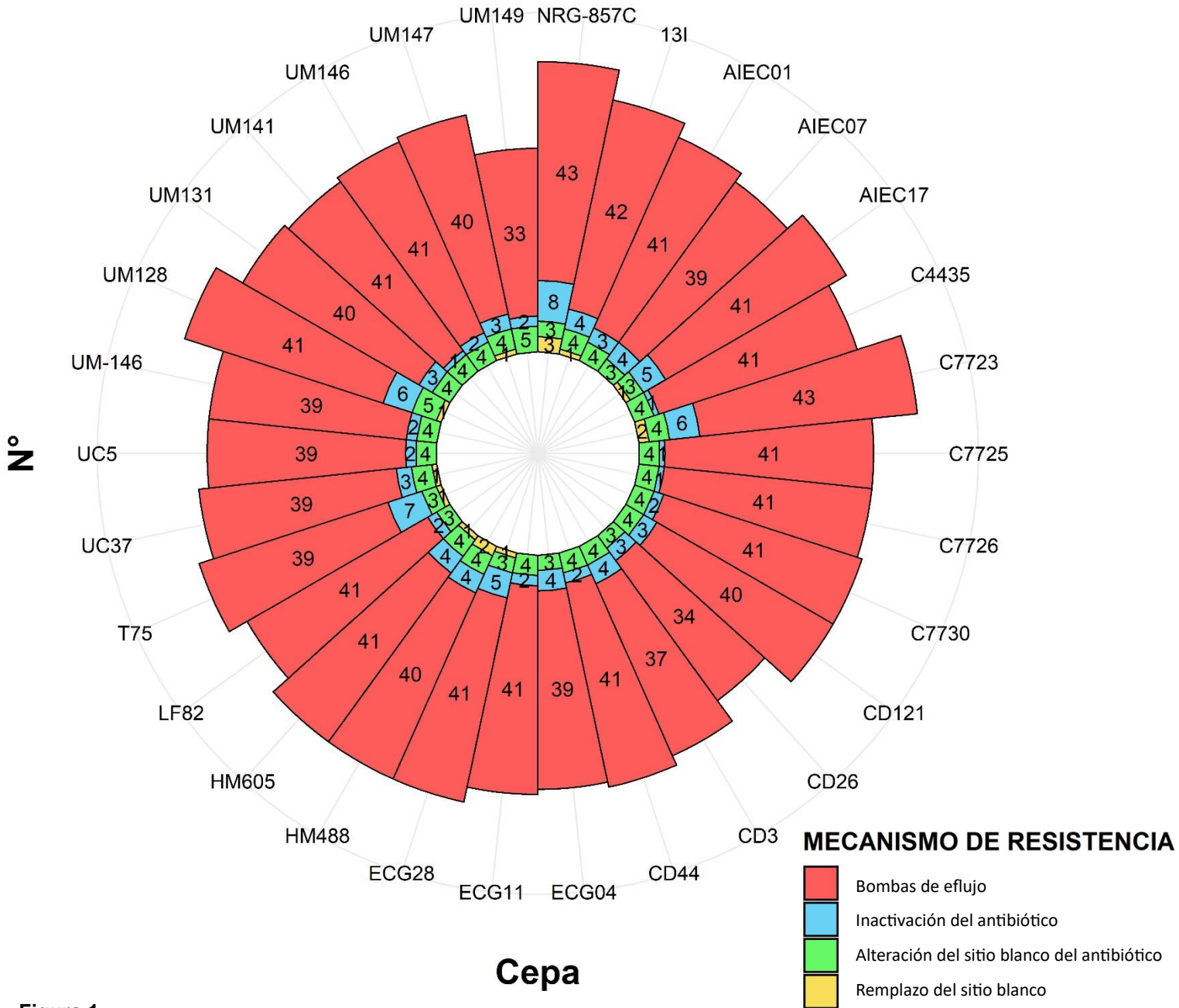
<b>ECG28</b>	GCA_90013018 5.1	50	ND	ColRNAI;IncFIB(AP001918);IncFII(29);IncQ1	1	1	1	1
<b>HM488</b>	GCA_00855375 5.1	50	ND	Col156;Col8282;IncFIA;IncFIB(AP001918);IncFII(pAMA1167-NDM-5)	1	1	1	1
<b>HM-605</b>	GCA_00028537 5.1	50	ND	Col(MG828);Col(MG828);Col156;Col8282;IncB/O/K/Z;IncFIB(AP001918);IncFII	1	1	1	1
<b>LF82</b>	GCA_00028449 5.1	46	ND		0	0	0	0
<b>NRG857 c</b>	GCA_00018334 5.1	57	1	IncFIB(AP001918);IncFIC(FII);IncQ1	1	1	1	1
<b>T75</b>	GCA_00855370 5.1	50	ND	IncX1	0	1	1	1
<b>UC5</b>	GCF_001571675 .1	45	ND		0	0	0	0
<b>UC37</b>	GCF_001571745 .1	47	ND	IncX1	0	1	1	1
<b>UM128</b>	GCF_001571725 .1	53	ND	ColRNAI;IncFIA;IncX1;IncX3	1	1	0	0
<b>UM131</b>	GCF_001571575 .1	47	ND	Col440I;Col440II;ColpVC	1	1	0	0
<b>UM141</b>	GCF_001571565 .1	46	ND	IncFIB(AP001918)	0	0	0	0
<b>UM146</b>	GCA_00014860 5.1	47	1	Col156;IncFIB(AP001918);IncFII(29)	1	1	1	1
<b>UM-146</b>	GCA_00855369 5.1	45	ND	Col156;IncFIB(AP001918);IncFII(29);IncFII(pRSB107)	1	1	0	0
<b>UM147</b>	GCF_001571755 .1	48	ND	IncFIB(AP001918);IncFII(pSE11);Incl	1	1	1	1
<b>UM149</b>	GCF_001571585 .1	41	ND	Col156;Incl	1	0	0	0

ND: dato no disponible en el bioproyecto del genoma.

Por otra parte, algunos genomas compartieron los mismos grupos de incompatibilidad, en particular aquellos que presentaron el mismo secuenciotipo, como las cepas AIEC07 y ECG04, (ST-3232) y el grupo de incompatibilidad ColRNAI, ECG28 y AIEC17 (ST569), y grupos de incompatibilidad IncFIB, IncFII, IncQ1 y ColRNAI, C4435 y C7225 (ST131) y el grupo IncFIB. En cambio, hay otros genomas que comparten varios grupos de incompatibilidad, siendo el más común el IncFIB (en 16 cepas), IncFII (11), Col156 (9) y, ColRNAI (8). Sólo en 3 genomas no fueron detectados grupos de incompatibilidad (LF82, C7226 y UC5). (Figura 2).

Dependiendo de la información obtenida en cuanto a los grupos de incompatibilidad, la presencia de OriT, relaxasa, T4SS y T4CP, se clasificó la capacidad de movilización de los plásmidos presentes en los genomas AIEC. Cabe mencionar que los genomas LF82, UC5 y C7226 no presentaron plásmidos (no tienen replicón); los genomas 13I, AIEC01, AIEC17, ECG28, HM605, HM488, NRG857c, UM146 y UM147 presentaron los cuatro módulos de categorización para plásmidos conjugativos; mientras que ECG04, CD44, UM128, UM131, UM-146 y T75 tienen grupos de incompatibilidad, OriT, relaxasa y T4SS (no T4CP), por lo que se clasificaron como movilizables. Por último, las cepas T75, UC37, AIEC07, C4435, C7225, C7230 y UM141 no tuvieron OriT (Figura 3).

Los elementos genéticos móviles en AIEC son variados, predominado las secuencias de inserción y repeticiones invertidas miniatura, ya que todos esos elementos estuvieron presentes en los 30 genomas. Por otra parte, 9 genomas poseen transposones compuestos, 6 presentaron transposones y 3 mostraron la presencia de elementos conjugativos integrativos. 16 genomas presentaron relación entre replicones y/o genes de resistencia con los elementos genéticos móviles detectados en estas cepas (Figura 4).



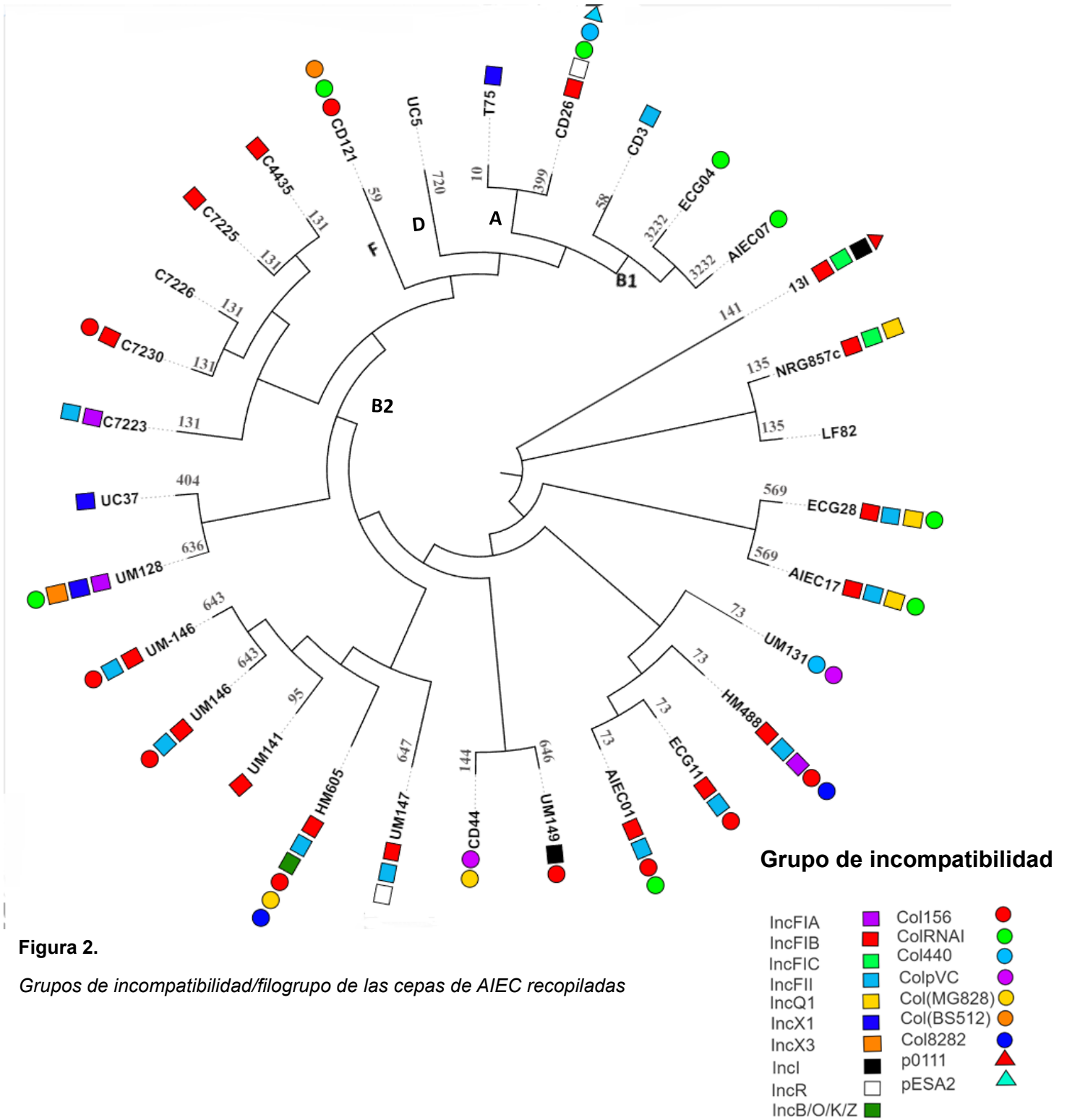
**Figura 1.**

Número de genes de resistencia a antibióticos en genomas recopilados de AIEC

**Tabla 4.**

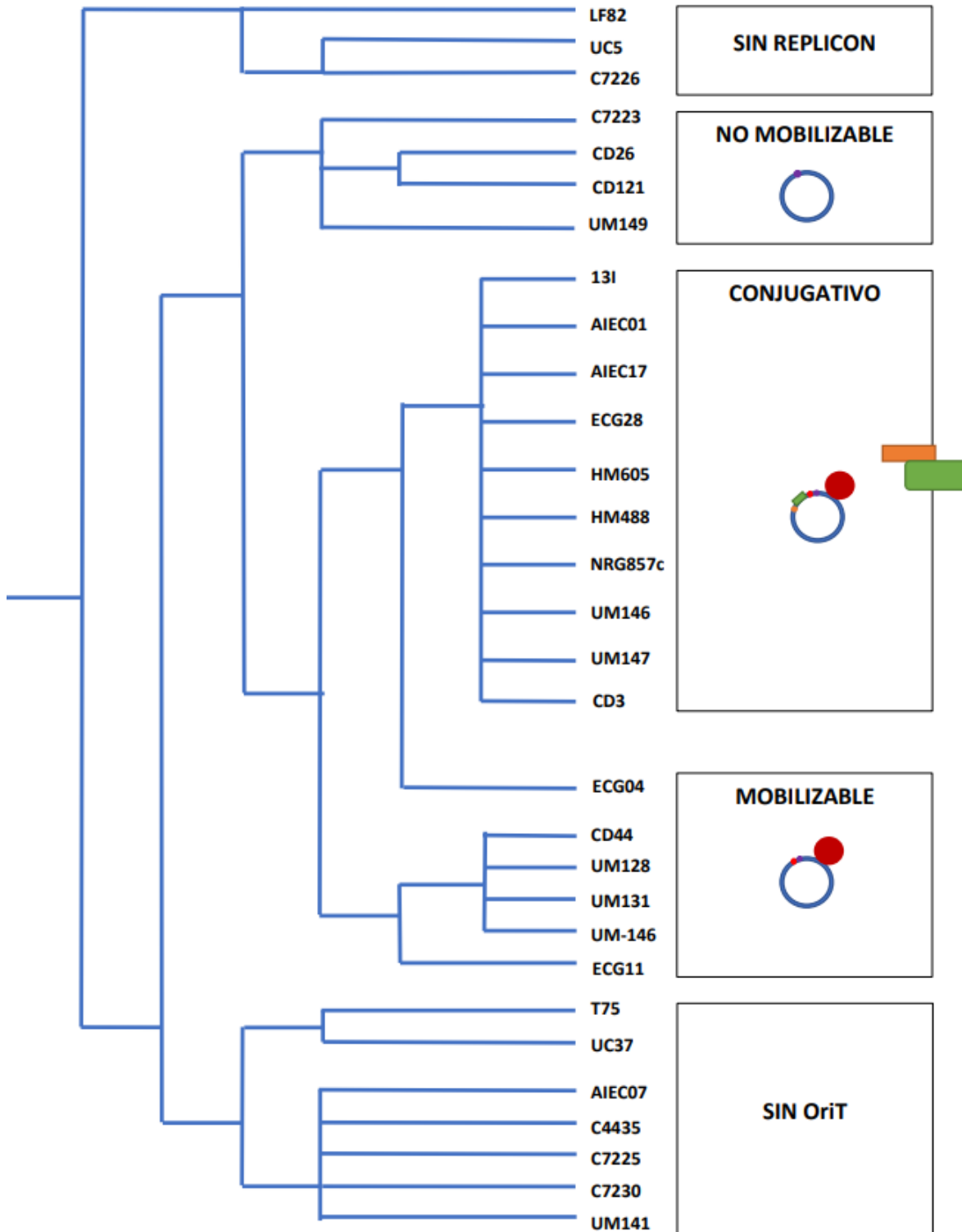
Promedio de genes por mecanismo de resistencia a antibióticos en genomas recopilados de AIEC

Mecanismo de resistencia	Promedio de genes	Número de cepas
Eflujo de salida de antibióticos	40	30
Inactivación del antibiótico	3.3	30
Alteración del sitio blanco del antibiótico	3.67	30
Reemplazo del sitio blanco	1.36	11



**Figura 2.**

*Grupos de incompatibilidad/filogrupo de las cepas de AIEC recopiladas*

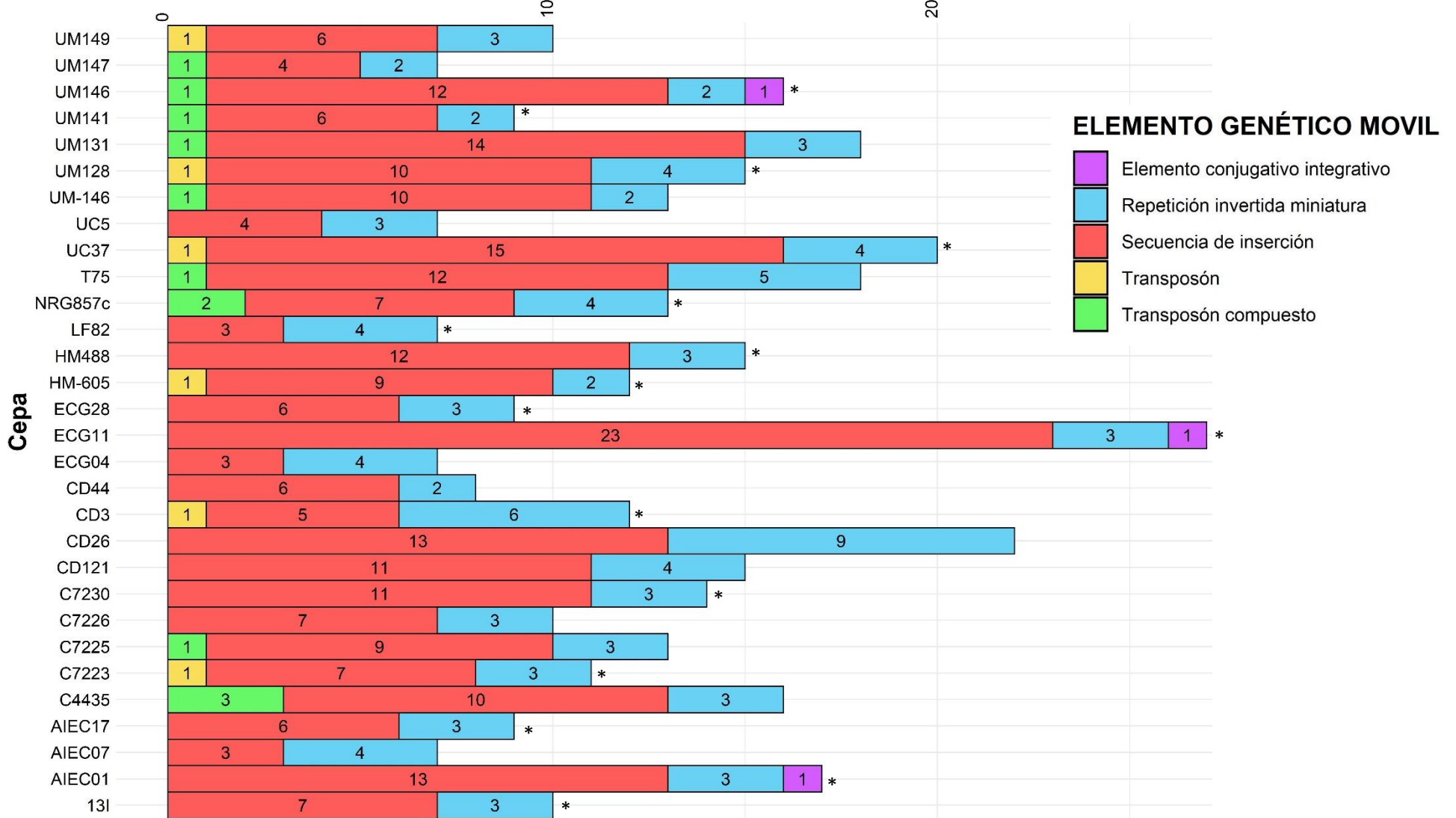


**Figura 3**

*Clasificación de la movilidad plasmídica en los genomas AIEC recopiladas con base a cuatro módulos de categorización*

Plásmido: Azul, OriT: Morado, Relaxasa: Rojo, T4CP: Naranja, T4SS: Verde

### Nº de elementos genéticos móviles



**Figura 4**

Elementos genéticos móviles detectados en cepas de AIEC recopiladas

Nota: \*\* se detectaron replicones y/o genes de resistencia antimicrobiana relacionados a elementos genéticos móviles

### 13. DISCUSIÓN

En esta investigación se trabajó con 30 genomas de cepas de AIEC, donde analizamos la filogenia, plasmidoma y resistoma. Estas cepas fueron aisladas de humanos que cursaban con una EII en distintos países (Canadá, España, EUA, Francia, México y Reino Unido). La información obtenida en este proyecto contribuye al conocimiento sobre AIEC y describe los elementos genéticos que albergan genes de resistencia a antibióticos comúnmente usados en la clínica para tratar a pacientes que cursen un padecimiento intestinal donde el patotipo AIEC está involucrado.

La información relacionada a genes de resistencia plasmídicos en AIEC es limitada, siendo fundamentales el estudio realizado por Barrios-Villa *et al.* quien localizó diversas cepas de AIEC, además de genes de resistencia; el estudio de Nash *et al.* que describió el plásmido de la cepa NRG857c y el estudio por Martínez-Medina *et al.* donde se analizaron diversas cepas de AIEC y no AIEC para conocer el perfil de resistencia a antibióticos (Barrios-Villa *et al.*, 2018; Martínez-Medina *et al.*, 2020; Nash *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en los genomas AIEC, indican que no existe una relación filogenética clara, ya que los filogrupos, secuenciotipos y serotipos son variados, lo que puede deberse a que las cepas provienen de distintos países de mundo. Aun así, la mayoría de estas cepas pertenecen al grupo B2 (23 cepas), las demás son de distintos grupos como B1 (3), A (2), D (1) y F (1), solo hay alta relación entre algunos genomas de dos cepas del mismo secuenciotipo, con la excepción de las cepas C4435, C7223, C7225, C7226 y C7230, compartiendo el mismo filogrupo, secuenciotipo y serotipo, estas cepas provienen de México y fueron aisladas en la misma región geográfica, lo que puede explicar su semejanza filogenética (Barrios-Villa *et al.*, 2018).

Respecto a los genes de resistencia detectados, se observa una gran prevalencia de genes de eflujo de salida (hasta 40 genes por cepa), siendo el principal mecanismo en comparación a los demás que tienen menos de 10 genes. Los mecanismos de eflujo de salida actúan contra distintas familias de antibióticos,

reduciendo la concentración del antibiótico dentro de la bacteria (Correia *et al.*, 2017). Aun así, existe una alta prevalencia de genes de resistencia en los genomas AIEC, haciendo evidente su capacidad de resistir diversos antibióticos. Esta prevalencia puede ser por el abuso de antibióticos al igual que puede ser por no cumplir el tratamiento contra una invasión de AIEC adecuadamente. (Chervy *et al.*, 2020).

Los plásmidos que presentan grupos de incompatibilidad IncR, IncF, p0111, IncX1 e IncI1-1, tienen mayor carga de genes de resistencia y virulencia que otros grupos. El grupo de incompatibilidad IncF está ampliamente relacionado con el ambiente clínico y presenta gran cantidad de genes de resistencia contra antibióticos como  $\beta$ -lactámicos, carbapenémicos y aminoglucósidos. Por otra parte, otros grupos de incompatibilidad presentaron resistencia como: ColRNA, IncI, IncN, IncX, IncH, NT y p0111 están relacionados a resistencia a  $\beta$ -lactámicos; IncX3 a carbapenémicos; IncHIA y IncI a colistina en *E. coli* de origen clínico y alimentario (Balbuena-Alonso *et al.*, 2022). La mayoría de los grupos de incompatibilidad descritos son IncF (32 genomas) distribuidos en casi todas las cepas de AIEC, siendo una posible señal de una mayor distribución de genes de resistencia. También se detectaron algunos grupos de incompatibilidad relacionados a plásmidos con alta carga de resistencia como IncR (1), p0111 (1) y IncX1 (1).

En la mayoría de los genomas fueron detectados distintos grupos de incompatibilidad (27), excepto en 3 genomas. Realizando una comparación entre los filogrupos y los grupos de incompatibilidad identificados, de los 23 genomas clasificados como filogrupo B2 los grupos de incompatibilidad más frecuentes son IncFIB (15), IncFII(10), Col156 (8), ColRNAI (4), IncFIA (3) e IncQ1 (3), estando los demás grupos de incompatibilidad en una frecuencia de 2 o menor. En los demás genomas se presentaron los grupos de incompatibilidad de la siguiente manera: filogrupo B1 (3) presentaron ColRNAI (2) e IncFII (1); filogrupo A (3) IncFIB (1), IncX1 (1), IncR (1), ColRNAI (1), Col440 (1) y PESA2 (1); filogrupo D (1) no se detectaron ningún grupo de incompatibilidad; filogrupo F (1) se detectó Col156 (1), ColRNAI (1)

y Col(BS512). Con esta información vemos que los grupos de incompatibilidad IncFIB e IncFII están presentes en la mayoría de las cepas.

Haciendo una comparación con los secuenciotipos y los grupos de incompatibilidad existe una mayor relación como: siendo las cepas UM146 y UM-146 con el secuenciotipo ST643 que comparten IncFIB, IncFII y Col156; el caso de las cepas ECG11 y AIEC01 con el ST73 comparten IncFIB, IncFII y Col156; las cepas ECG28 y AIEC17 con ST569 con IncFIB, IncFII, IncQ1 y ColRNAI; las cepas C4435 y C7225 pertenecieron al ST131 con IncFIB; las cepas AIEC07 y ECG04 al ST3232 con ColRNAI. Las cepas dos cepas con plásmidos son NRG857c y UM146, la cepa NRG857c presentó los grupos de incompatibilidad IncFIB, IncFIC e IncQ1 y la cepa UM146 presentó IncFIB, IncFII y Col156.

Los genomas y plásmidos analizados por Balbuena-Alonso provienen del ambiente clínico y alimentos, fueron 161 y 1624 respectivamente. De estos se encontró que el 30.3 % fueron plásmidos conjugativos y el 6.3 % movilizables en ambiente clínico, en alimentos 27.3 % conjugativos y 9.3 % movilizables, siendo estos plásmidos con capacidad de transferencia horizontal de genes (*Balbuena-Alonso et al., 2022*). Estos números son parecidos a los obtenidos en AIEC, siendo 33.3 % conjugativos y 10 % movilizables.

En los genomas LF82, UC5 y C7226 no se detectó algún replicón, en otras no se detectó la región OriT a pesar de tener todos los demás componentes como en T75 y UC37, sólo las cepas AIEC07, C4435, C7225, C7230 y UM141 tenían replicón. Las cepas CD26, CD121, C7223 y UM149 no tenían relaxasa por lo cual son posibles plásmidos no movilizables. Las cepas ECG04, CD44, UM128, UM131, UM-146 y ECG11 no tienen T4SS y/o T4CP siendo posibles portadores de plásmidos movilizables. Finalmente, las cepas 13I, AIEC01, AIEC17, ECG28, HM605, HM488, NRG857c, UM146, UM147 y CD3 pueden tener plásmidos conjugativos, siendo las cepas NRG857c y UM146 las cuales tienen plásmidos de acuerdo a NCBI. Con esta información vemos como 19 cepas tienen plásmidos con la capacidad de ser transmisibles horizontalmente a otras bacterias, haciendo evidente el nivel de adaptación y resistencia antibióticos en el patotipo AIEC.

Todas las cepas presentaron secuencias de inserción y repeticiones invertidas miniaturas, predominado las secuencias de inserción, en menor incidencia tienen transposones. Además 17 cepas tenían elementos genéticos móviles con relación a replicones y/o genes de resistencia. Los elementos genéticos móviles son importantes de relacionar como en el estudio por Martínez-Medina *et al.*, donde se encontró en AIEC la enzima dihidropteroato sintasa (Sul1) que provee resistencia a las sulfonamidas y que está asociada a integrones de clase 1 (*intl1*). En este estudio las cepas que presentaron el gen *sul1* también presentaron *intl1*. La presencia de *intl1* puede asociarse también con plásmidos y transposones, una de las principales maneras de propagación y portación de genes de resistencia (Martínez-Medina *et al.*, 2020).

#### 14. CONCLUSIONES

AIEC es un patotipo de reciente descubrimiento, de suma importancia en el padecimiento de alguna EII por el papel crítico que se le ha asignado en la invasión del tracto digestivo, empeorando la salud del paciente.

Las conclusiones de este trabajo se resumen a continuación:

1. Al ser un patotipo relativamente moderno la información relacionada con su plasmidoma y resistoma es limitada, donde se puede reconocer la gran prevalencia de genes de resistencia contra antibióticos entre las cepas de AIEC siendo en promedio, más de 40 genes por cepa, donde la mayoría de estos genes fueron de eflujo de salida de antibióticos. Además, las cepas presentaron diversos elementos genéticos móviles, todas presentaron secuencias de inserción y repetición invertida miniatura, junto con las 19 cepas podrían presentar plásmidos con capacidad de ser transferibles siendo más evidente la presencia de plásmidos en AIEC.
2. Este patotipo como observamos tiene una amplia distribución por el mundo, además de una gran variedad filogenética (B2, B1, A, D y F), existiendo sólo una relación entre ciertas cepas que comparten el mismo secuenciotipo las cuales provenían del mismo país.

3. Con la información recopilada se contribuye al conocimiento del panorama sobre AIEC, siendo un patotipo con resistencia hacia antibióticos; además de poseer plásmidos, lo cual es una señal de que puede darse la transferencia horizontal de genes que contribuyen a la resistencia/invasión provocada por AIEC.
4. La presencia de genes de resistencia a antibióticos y plásmidos en AIEC, es un factor de como estos microorganismos aumentan sus capacidades de evasión a antibióticos, de ahí la importancia de utilizar y buscar nuevas alternativas para el tratamiento contra la resistencia/invasión causada por AIEC.

## 15. PERSPECTIVAS

Algunos puntos a destacar para continuar con futuras investigaciones son:

1. Hacer genómica comparativa del patotipo AIEC con otros patotipos de *E. coli* depositados en bases de datos públicas.
2. Buscar genes implicados en la resistencia a metales pesados y a especies reactivas de oxígeno en genomas de AIEC.
3. Extrapolar el análisis bioinformático realizado en esta tesis a la colección de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con EII que resguarda el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del Instituto de Ciencias ICUAP.

## 16. REFERENCIAS

- Adekanmbi, A. O., Akinlabi, O. C., & Olaposi, A. V. (2022). High carriage of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes by cefotaxime-resistant *Escherichia coli* recovered from surface-leaking sanitary sewers. *Arch Microbiol.* 204(2):1–8. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02627-6>
- Akhtar, N., Siddharth, K., Prerna, S., & Goyal, D. (2022). Emerging Modalities in Mitigation of Antimicrobial Resistance. In N. Akhtar, K. S. Singh, Prerna, & D. Goyal (Eds.), *EMMAR*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-84126-3>
- Astley, D. J., Masters, N., Kuballa, A., & Katouli, M. (2021). Commonality of

- adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from patients with extraintestinal infections, healthy individuals and the environment. *Eur J Clin Microbiol. Infect. Dis.* 40(1):181–192. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04066-5>
- Balbuena-Alonso, M. G., Cortés-Cortés, G., Kim, J. W., Lozano-Zarain, P., Camps, M., & del Carmen Rocha-Gracia, R. (2022). Genomic analysis of plasmid content in food isolates of *E. coli* strongly supports its role as a reservoir for the horizontal transfer of virulence and antibiotic resistance genes. *Plasmid.* 123–124(September). <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2022.102650>
- Barrios-Villa, E., Cortés-Cortés, G., Lozano-Zaraín, P., Arenas-Hernández, M. M. D. L. P., Martínez De La Peña, C. F., Martínez-Laguna, Y., Torres, C., & Rocha-Gracia, R. D. C. (2018). Adherent/invasive *Escherichia coli* (AIEC) isolates from asymptomatic people: New *E. coli* ST131 O25:H4/H30-Rx virotypes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 17(1):1–11. <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0295-4>
- Belotserkovsky, I., Sansonetti, P. J., Jenkins, C., Slater, S. L., Sagfors, A. M., Pollard, D. J., Ruano-Gallego, D., Frankel, G., Shenoy, A. R., Furniss, R. C. D., Goddard, P. J., Clements, A., Yair, Y., Gophna, U., Paitan, Y., Nesta, B., & Pizza, M. (2018). *Escherichia coli*, a Versatile Pathogen. In G. Frankel & E. Z. Ron (Eds.), *Curr Top Microbiol Immunol.* 416(1). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-99664-6>
- Chervy, M., Barnich, N., & Denizot, J. (2020). Adherent-invasive *E. coli*: Update on the lifestyle of a troublemaker in Crohn's disease. *Int J Mol Sci.* 21(10):1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms21103734>
- Chevalier, G., Laveissière, A., Desachy, G., Barnich, N., Sivignon, A., Maresca, M., Nicoletti, C., Di Pasquale, E., Martinez-Medina, M., Simpson, K. W., Yajnik, V., Sokol, H., Adegbamigbe, T., Ahmad, T., Arnott, I., Bouhnik, Y., Carbonnel, F., Colombel, J. F., Doherty, G., Bonny, C. (2021). Blockage of bacterial FimH prevents mucosal inflammation associated with Crohn's disease. *Microbiome.* 9(1):1–16. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01135-5>
- Ciapponi, A., Virgilio, S. A., Berrueta, M., Soto, N. C., Ciganda, A., Illanes, M. F. R.,

- Martinez, B. R., Gamba, J., Salazar, C. A. G., Rodríguez, J. N. R., Scarpellini, B., Perdomo, A. M. B., Machnicki, G., Aldunate, L., de Paula, J., & Bardach, A. (2020). Epidemiology of inflammatory bowel disease in Mexico and Colombia: Analysis of health databases, mathematical modelling and a case-series study. *PLoS ONE*. 15(1):1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228256>
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. R. (2019a). Mobile DNA. *Mol Biol*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813288-3.00025-2>
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. R. (2019b). Plasmids. *Mol Biol*. (pp. 712–748). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813288-3.00023-9>
- Correia, S., Poeta, P., Hébraud, M., Capelo, J. L., & Igrejas, G. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J Med Microbiol*. 66(5):551–559. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000475>
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., & Colombel, J. F. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 115(6):1405–1413. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70019-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70019-8)
- Dogan, B., Zhang, S., Kalla, S. E., Dogan, E. I., Guo, C., Ang, C. R., & Simpson, K. W. (2020). Molecular and phenotypic characterization of *escherichia coli* associated with granulomatous colitis of boxer dogs. *Antibiotics*. 9(9):1–16. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090540>
- Gordon, D., & George, J. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 176(1):139–148. <https://doi.org/10.1111/nyas.12830>.Mechanisms
- Iredell, J. (2022). Antimicrobial Resistance. In V. Kumar, V. Shriram, A. Paul, & M. Thakur (Eds.). *Microbiol Aust*. 40(2). Springer Nature Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-3120-7>
- Juraschek, K., Deneke, C., Schmogger, S., Grobbel, M., Malorny, B., Käsbohrer, A.,

- Schwarz, S., Meemken, D., & Hammerl, J. A. (2021). Phenotypic and genotypic properties of fluoroquinolone-resistant, qnr-carrying *Escherichia coli* isolated from the German food chain in 2017. *Microorganisms*. 9(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061308>
- Kilani, H., Ferjani, S., Mansouri, R., Boutiba-Benboubaker, I., & Abbassi, M. S. (2020). Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among *Escherichia coli* strains isolated from animals in Tunisia: Specific pathovars acquired qnr genes. *JGAR*. 20:50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.023>
- Kumar, V. S. A. (2021). Advances in Bioinformatics. In V. Singh & A. Kumar (Eds.), *Genet Eng Biotechnol News*. 24(6). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-33-6191-1>
- Lee Ventola, C. (2015a). The antibiotic resistance crisis: Part 2: Management strategies and new agents. *P & T*. 40(5):344–352.
- Lee Ventola, C. (2015b). The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. *P & T*. 40(4), 277–283.
- Li, Q., Chang, W., Zhang, H., Hu, D., & Wang, X. (2019). The role of plasmids in the multiple antibiotic resistance transfer in ESBLs-producing *Escherichia coli* isolated from wastewater treatment plants. *Front Microbiol*. 10(APR):1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00633>
- Liu, S., Zhao, W., Lan, P., & Mou, X. (2021). The microbiome in inflammatory bowel diseases: from pathogenesis to therapy. *Protein Cell*. 12(5):331–345. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00745-3>
- Liu, X., Li, R., Chan, E. W. C., Xia, X., & Chen, S. (2022). Plasmid-mediated ciprofloxacin, carbapenem and colistin resistance of a foodborne *Escherichia coli* isolate. *Food Control*. 137:108937. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108937>
- Lowe, J. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Annu Rep Med Chem*.

4(2):1–37. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>

Manchester, A. C., Dogan, B., Guo, Y., & Simpson, K. W. (2021). *Escherichia coli*-associated granulomatous colitis in dogs treated according to antimicrobial susceptibility profiling. *J Vet Intern Med.* 35(1):150–161. <https://doi.org/10.1111/jvim.15995>

Martinez-Medina, M., & Garcia-Gil, L. J. (2014). *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 5(3):213. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v5.i3.213>

Martinez-Medina, M., Strozzi, F., Castillo, B. R. Del, Serrano-Morillas, N., Bustins, N. F., & Martínez-Martínez, L. (2020). Antimicrobial resistance profiles of adherent invasive *escherichia coli* show increased resistance to  $\beta$ -lactams. *Antibiotics.* 9(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050251>

McPhee, J. B., Small, C. L., Reid-Yu, S. A., Brannon, J. R., Moual, H. Le, & Coombes, B. K. (2014). Host defense peptide resistance contributes to colonization and maximal intestinal pathology by Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 82(8):3383–3393. <https://doi.org/10.1128/IAI.01888-14>

Morris, S., & Cerceo, E. (2020). Trends, epidemiology, and management of multi-drug resistant gram-negative bacterial infections in the hospitalized setting. *Antibiotics.* 9(4):1–20. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040196>

Muktan, B., Thapa Shrestha, U., Dhungel, B., Mishra, B. C., Shrestha, N., Adhikari, N., Banjara, M. R., Adhikari, B., Rijal, K. R., & Ghimire, P. (2020). Plasmid mediated colistin resistant *mcr-1* and co-existence of OXA-48 among *Escherichia coli* from clinical and poultry isolates: first report from Nepal. *Gut Pathog.* 12(1):1–9. <https://doi.org/10.1186/s13099-020-00382-5>

Naeem, A., Badshah, S. L., Muska, M., Ahmad, N., & Khan, K. (2016). The current case of quinolones: Synthetic approaches and antibacterial activity. *Molecules.* 21(4). <https://doi.org/10.3390/molecules21040268>

- Nash, J. H. E., Villegas, A., Kropinski, A. M., Aguilar-Valenzuela, R., Konczyk, P., Mascarenhas, M., Ziebell, K., Torres, A. G., Karmali, M. A., & Coombes, B. K. (2010). Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics*. 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-667>
- Newton-Foot, M., Snyman, Y., Maloba, M. R. B., & Whitelaw, A. C. (2017). Plasmid-mediated mcr-1 colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* clinical isolates from the Western Cape region of South Africa. *Antimicrob Resist Infect Control*. 6(1):1–7. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0234-8>
- Palmela, C., Chevarin, C., Xu, Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng, S. C., & Colombel, J. F. (2018). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*. 67(3):574–587. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314903>
- Perna, A., Hay, E., Contieri, M., De Luca, A., Guerra, G., & Lucariello, A. (2020). Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC): Cause or consequence of inflammation, dysbiosis, and rupture of cellular joints in patients with IBD? *J. Cell Physiol*. 235(6):5041–5049. <https://doi.org/10.1002/jcp.29430>
- Rahmouni, O., Vignal, C., Titécat, M., Foligné, B., Pariente, B., Dubuquoy, L., Desreumaux, P., & Neut, C. (2018). High carriage of adherent invasive *E. coli* in wildlife and healthy individuals. *Gut Pathog*. 10(1):1–11. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0248-7>
- Rather, I. A., Kim, B. C., Bajpai, V. K., & Park, Y. H. (2017). Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. *Saudi J. Biol. Sci*. 24(4):808–812. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.01.004>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*. 4(3):482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Robotjazi, S., Nikkhahi, F., Niazadeh, M., Amin Marashi, S. M., Peymani, A., Javadi, A., & Kashani, A. H. (2021). Phenotypic Identification and Genotypic

- Characterization of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Iran. *Curr Microbiol.* 78(6):2317–2323. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02479-9>
- Rojas-Lopez, M., Monterio, R., Pizza, M., Desvaux, M., & Rosini, R. (2018). Intestinal pathogenic *Escherichia coli*: Insights for vaccine development. *Front Microbiol.* 9:1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00440>
- Rolhion, N., & Darfeuille-Michaud, A. (2007). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 13(10):1277–1283. <https://doi.org/10.1002/ibd.20176>
- Sakuraba, A., Iwao, Y., Matsuoka, K., Naganuma, M., Ogata, H., Kanai, T., & Hibi, T. (2014). Endoscopic and pathologic changes of the upper gastrointestinal tract in Crohn's disease. *Biomed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2014/610767>
- San Millan, A. (2018). Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context. *Trends Microbiol.* 26(12):978–985. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.007>
- Shaler, C. R., Elhenawy, W., & Coombes, B. K. (2019). The Unique Lifestyle of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 431(16):2970–2981. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.023>
- Shintani, M., Sanchez, Z. K., & Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: Classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front Microbiol.* 6:1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00242>
- Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., Gogry, F. A., Husain, F. M., Alsalme, A., & Rizwanul Haq, Q. M. (2020). Plasmid-mediated ampicillin, quinolone, and heavy metal co-resistance among esbl-producing isolates from the Yamuna River, New Delhi, India. *Antibiotics.* 9(11):1–17. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110826>
- Silva, S. S., Monfardini, M. V., & Scaletsky, I. C. A. (2020). Large plasmids encoding antibiotic resistance and localized-like adherence in atypical enteropathogenic

- Escherichia coli* strains. *BMC Microbiol.* 20(1):1–8. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01809-4>
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., & Haq, Q. M. R. (2018). Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Front Microbiol.* 9:1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02066>
- Tomova, A., Ivanova, L., Buschmann, A. H., Godfrey, H. P., & Cabello, F. C. (2018). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Genes and Class 1 Integrons in Quinolone-Resistant Marine Bacteria and Clinical Isolates of *Escherichia coli* from an Aquacultural Area. *Microb Ecol.* 75(1):104–112. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1016-9>
- Walker, A. (2012). Welcome to the plasmidome. *Nat Re. Microbiol.* 10(6):379. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2804>
- Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Aslam, M. A., & Qamar, M. U. (2018). Antibiotic resistance : a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist.* 11:1645–1658.
- Xiang, Y., Wu, F., Chai, Y., Xu, X., Yang, L., Tian, S., Zhang, H., Li, Y., Yang, C., Liu, H., Qiu, S., Song, H., & Sun, Y. (2020). A new plasmid carrying mphA causes prevalence of azithromycin resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* serogroup O6. *BMC Microbiol.* 20(1):1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01927-z>
- Yamamoto-Furusho, J. K., Bosques-Padilla, F. J., Charúa-Guindic, L., Cortés-Espinosa, T., Miranda-Cordero, R. M., Saez, A., & Ledesma-Osorio, Y. (2020). Inflammatory bowel disease in Mexico: Epidemiology, burden of disease, and treatment trends. *Rev Gastroenterol Mex.* 85(3):246–256. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2019.07.008>
- Yang, Y., Liao, Y., Ma, Y., Gong, W., & Zhu, G. (2017). The role of major virulence factors of AIEC involved in inflammatory bowel disease—a mini-review. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 101(21):7781–7787. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8507-y>

- Zhang, Y., Ma, Q., Su, B., Chen, R., Lin, J., Lin, Z., Wang, D., & Yu, Y. (2018). A study on the role that quorum sensing play in antibiotic-resistant plasmid conjugative transfer in *Escherichia coli*. *Ecotoxicology*. 27(2):209–216. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1886-0>
- Zhou, M., Yang, Y., Chen, P., Hu, H., Hardwidge, P. R., & Zhu, G. (2015). More than a locomotive organelle: flagella in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 99(21):8883–8890. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6946-x>