



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**INSTITUTO DE CIENCIAS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**“ESTUDIO DEL RESISTOMA, VIRULOMA Y  
PLASMIDOMA DE CEPAS DE *Leclercia adecarboxylata*  
RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS, AISLADAS DE UN  
BROTE HOSPITALARIO”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA) CON OPCIÓN EN:  
MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

**PRESENTA:**

LBM. BRENDA PACHECO FLORES

**DIRECTORA DE TESIS:**

D.C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

**CODIRECTOR:**

D.C. EDWIN BARRIOS VILLA

PUEBLA, PUE.

ENERO, 2025



**BUAP**

Puebla, Pue. a 11 diciembre 2024.

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


Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de maestría de la alumna **Brenda Pacheco Flores**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**“Estudio del Resistoma, viruloma y plasmidoma de cepas de *Leclercia adecarboxylata* resistentes a carbapenémicos, aisladas de un brote hospitalario”**


A nuestro juicio, la alumna **Brenda Pacheco Flores** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

  
D.C. Patricia Lozano Zarain

  
D.C. Miguel Castañeda Lucio

  
D.C. Margarita Ma. de la Paz Arenas Hernández

  
D.C. Ruth Ana María González Villoria

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, por ser mi casa de estudios durante todos estos años, por permitirme desarrollar como estudiante en sus aulas, laboratorios e instalaciones.

Al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas** por el apoyo para realizar mis estudios de posgrado en sus instalaciones, por el conocimiento obtenido dentro del centro y por el respaldo económico recibido en los congresos.

Al **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad** del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por recibirme nuevamente y permitirme realizar el presente trabajo de tesis en sus instalaciones y bajo la dirección de la D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia.

Al **Dr. Cesar Raúl González Bonilla** y a los hospitales que donaron los aislados bacterianos utilizados para realizar este trabajo de tesis: **HP-CMNO, CMNO Especialidades, CMNO HG-O, HG Zona 21** y al **RHG regional 180 de Tlajomulco.**

Se agradece a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado** por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Eje IV. Modelo de Investigación abierta y compartida. Objetivo 13. Formar recursos humanos que impacten positivamente el contexto social y científico como consecuencia de su accionar en una comunidad para lograr una educación desarrolladora de la transformación. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2021-2025.

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología**, por la beca otorgada durante los estudios de maestría, con número de becario 8223099. Esta tesis forma parte de los proyectos de CONAHCyT de Ciencia Básica. No. solicitud: 2022-000018-02NACF-01674.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la **D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, por su invaluable apoyo, por confiar en mí y recibirme como tesista de posgrado. Aprecio mucho las herramientas y conocimientos que me ha brindado a lo largo de estos años, así como su atención, amabilidad y tiempo dedicado a las revisiones que hicieron posible la culminación de esta tesis. Gracias también por los convivios en el laboratorio y por formar, junto con la Dra. Paty un grupo de trabajo admirable y lleno de compañerismo.

A la **D.C. Patricia Lozano Zarain**, por todo el apoyo y atención tanto dentro como fuera del laboratorio. Agradezco el valioso tiempo que ha dedicado en las revisiones de esta tesis, por los buenos comentarios y sugerencias que me han servido mucho para poder culminar con este proyecto, su comprensión y respaldo durante mi estancia en su laboratorio han sido fundamentales.

Al **D.C. Edwin Barrios Villa**, mi más sincero agradecimiento por su disposición para resolver mis dudas, así como el tiempo y la atención que ha tenido para revisar el presente trabajo. Gracias por permitirme seguir siendo su alumna, a pesar de la distancia, y por todo el conocimiento que me ha compartido acerca de estas cepas. Su valioso aporte en las revisiones de este y futuros proyectos es profundamente apreciado.

A la **D.C. Margarita María De La Paz Arenas Hernández**, todo mi agradecimiento por el tiempo dedicado en la revisión de este trabajo, así como por sus valiosos comentarios y sugerencias que han contribuido significativamente a mejorar este proyecto. Aprecio los conocimientos compartidos en el aula, los cuales han sido de gran importancia en mi formación.

Al **D.C. Miguel Castañeda Lucio**, siempre estaré agradecida por el ánimo y apoyo que me brindó a lo largo de este proyecto. Gracias por sus valiosas aportaciones durante los tutorales y por la disposición de revisar el presente trabajo de tesis, siempre con el objetivo mejorar.

A la **D.C. R. Ana María González Villoria**, le agradezco sinceramente su tiempo y disposición en la revisión detallada de este trabajo. Sus comentarios y sugerencias han sido importantes para mejorar esta tesis. Gracias también, por su apoyo y los momentos compartidos dentro del laboratorio.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

### A mi querida madre: Ma. Isabel

Con todo mi amor y gratitud.

Mamá, gracias por ser y por estar. Por tu profundo amor y apoyo constante. La confianza que has puesto en mí me ha impulsado a hacer cosas de las que no sabía que era capaz. Tu amor, sacrificio y dedicación me han dado la fuerza para seguir adelante, y sin ti, este logro no habría sido posible. Gracias por enseñarme la importancia de la perseverancia, por ser mi más grande inspiración y por brindarme siempre un hombro en el cual apoyarme. Este trabajo es, en gran parte, el reflejo de tu apoyo incondicional y consecuencia de que, incluso en los momentos más difíciles, nunca has soltado mi mano. Valoro todos tus cuidados durante este proceso, tu amistad, paciencia, amor, respeto y cariño. El amor incondicional que me tienes ha sido mi mayor apoyo, y no hay palabras suficientes para agradecer todo lo que haces por mí. Gracias por estar siempre a mi lado, por entenderme y por ser mi guía constante.

Te amo siempre y en todo momento estaré agradecida por todo lo que has hecho por mí.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>10</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
1.1 GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>LECLERCIA</i> .....	11
1.1.1 <i>LECLERCIA ADECARBOXYLATA</i> .....	13
1.1.2 IMPORTANCIA CLÍNICA DE <i>L. ADECARBOXYLATA</i> .....	14
1.2 RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS .....	15
1.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA.....	17
1.3.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS .....	18
1.3.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS CARBAPENÉMICOS.....	19
1.3.3 RESISTENCIA A OTROS GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS.....	20
1.3.4 BOMBAS DE EFLUJO.....	21
1.3.5 PLÁSMIDOS DE RESISTENCIA.....	22
1.4 FACTORES DE VIRULENCIA.....	24
1.4.1 FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS.....	25
<b>2 ANTECEDENTES.....</b>	<b>26</b>
2.1 ANTECEDENTES GENERALES.....	26
2.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	27
<b>3 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
4.1 OBJETIVO GENERAL .....	30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>5 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO.....</b>	<b>31</b>
<b>6 MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
6.1 CEPAS DE ESTUDIO .....	32
6.1.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	34
6.1.2 SECUENCIACIÓN DE GENOMAS DE <i>L. ADECARBOXYLATA</i> : .....	34
6.1.3 CEPAS CONTROL .....	35
6.2 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	36
6.2.1 DETERMINACIÓN DE PERFIL DE RESISTENCIA (KIRBY-BAUER).....	36
6.2.2 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN AGAR PARA ANTIBIÓTICOS CARBAPENÉMICOS Y FOSFOMICINA.....	37
6.2.3 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI), MÉTODO DE ELUSIÓN DE DISCOS PARA COLISTINA (MICROMÉTODO). .....	38
6.2.4 DETERMINACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE BOMBAS DE EXPULSIÓN EN PRESENCIA DE UN INHIBIDOR. ....	39
6.2.5 EXTRACCIÓN DE TEMPLADO DE ADN BACTERIANO (TÉCNICA DE EXTRACTO HERVIDO).....	40
6.2.6 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO (MÉTODO DE KIESER).....	40
6.2.7 DETERMINACIÓN DE PERFIL PLASMÍDICO MEDIANTE PFGE-S1.....	42
6.2.8 CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PLÁSMIDOS .....	44
6.2.8.1 TIPADO DE PLÁSMIDOS POR “PCR-BASED REPLICON TYPING” (PBRT).....	44

6.2.8.2	CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PLÁSMIDOS POR MOB .....	45
6.2.9	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO Y SECUENCIACIÓN.....	46
6.2.9.1	CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PLÁSMIDOS Y DETERMINACIÓN DE GENES <i>IN SÍLICO</i> .....	46
6.2.10	CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULAS (MÉTODO DE TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA).....	48
6.2.11	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS (MÉTODO DE BRADFORD).....	49
<b>7</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
7.1	DETERMINACIÓN DE NIVELES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS CARBAPENÉMICOS Y PARTICIPACIÓN DE BOMBAS DE EXPULSIÓN DE LA FAMILIA RND. ....	50
7.2	GENOTIPO DE RESISTENCIA <i>IN SILICO</i> .....	52
7.3	DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO DE RESISTENCIA A COLISTINA.....	54
7.4	RESISTENCIA A FOSFOMICINA Y ANÁLISIS DEL GEN <i>FOSA<sup>LA2</sup></i> .....	55
7.5	IDENTIFICACIÓN DE DETERMINANTES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE <i>L. ADECARBOXYLATA</i> .....	57
7.6	CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN CEPAS DE <i>L. ADECARBOXYLATA</i> .....	59
7.7	DETERMINACIÓN DEL PERFIL PLASMÍDICO DE LAS CEPAS DE <i>L. ADECARBOXYLATA</i> .....	60
7.8	IDENTIFICACIÓN DEL NÚMERO Y TAMAÑO DE PLÁSMIDOS MEDIANTE PFGE-S1 .....	61
7.8.1	CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PLÁSMIDOS (GRUPOS INC Y RELAXASAS MOB) DE LAS CEPAS DE <i>L. ADECARBOXYLATA</i> .....	62
7.8.2	CARACTERIZACIÓN PARCIAL <i>IN SÍLICO</i> DE PLÁSMIDOS DE GENOMAS DE <i>L. ADECARBOXYLATA</i> .....	63
<b>8</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>74</b>
<b>10</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>75</b>
<b>11</b>	<b>REFERENCIAS:.....</b>	<b>77</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Características fenotípicas clave para la diferenciación de especies de <i>Leclercia</i> .	12 y 13
2	Resultados de los ensayos citológicos	24
3	Características de las cepas aisladas del brote hospitalario en Guadalajara, Jalisco 2019.	32-34
4	Cepas control	35
5	Puntos de corte para la determinación del fenotipo de resistencia establecidos en el CLSI 2024 para Enterobacterias (excluyendo <i>Salmonella/Shigella</i> ) del CLSI 2024.	36
6	Puntos de corte de MIC para Enterobacterias (excluyendo <i>Salmonella/Shigella</i> ) del CLSI 2024.	38
7	Puntos de corte del EUCAST 2024 en Enterobacterias.	39
8	Componentes utilizados en cada PCR para la determinación de replicones plasmídicos	45
9	Preparación de la curva BSA	50
10	Concentración Mínima Inhibitoria y participación de bombas de expulsión en cepas de <i>L. adecarboxylata</i> (n=28)	51-52
11	Características plasmídicas de cepas de <i>L. adecarboxylata</i> encontradas <i>in vitro</i> .	62-63
12	Características de plásmidos identificados <i>in silico</i> en tres genomas de <i>L. adecarboxylata</i> .	66-67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Estructura general de las $\beta$ -lactamasas representativas de las clases A, B, C y D.	18
2	Clasificación de los diferentes mecanismos de resistencia a los fármacos en Enterobacteriaceae resistentes a carbapenémicos (CRE).	20
3	Principales bombas de eflujo presentes en bacterias gram-negativas.	22
4	Genotipo de resistencia en genomas de <i>L. adecarboxylata</i> .	53
5	Micro método de elusión de discos de colistina, adaptado por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR).	54
6	Método de determinación de susceptibilidad a colistina (1 $\mu$ g/mL) en agar MH en las cepas Lac-8, Lac-29 y Lac-34.	54
7	Concentración mínima inhibitoria a fosfomicina por dilución en agar suplementado con 25 $\mu$ g/mL de glucosa-6-fosfato.	55
8	Resultados de la CMI para fosfomicina en 28 cepas de <i>L. adecarboxylata</i> .	56
9	Comparación de entornos genéticos del gen <i>fosA</i> <sup>LA2</sup> .	56
10	Genes de virulencia presentes en genomas de <i>L. adecarboxylata</i> .	57
11	Correlación de genes de virulencia encontrados en genomas de <i>L. adecarboxylata</i> respecto a los encontrados en microorganismos patógenos para el humano.	58
12	Cuantificación de biopelícula estática en 19 cepas de <i>L. adecarboxylata</i> .	59
13	Electroforesis en geles de agarosa al 1% del perfil plasmídico de las cepas de <i>L. adecarboxylata</i> obtenido mediante lisis alcalina.	60
14	Electroforesis en geles de agarosa al 1.2% de los perfiles plasmídicos de las cepas de <i>L. adecarboxylata</i> obtenido mediante PFGE-S1.	61
15	Replicones Inc y relaxasas presentes en 16 genomas de <i>L. adecarboxylata</i> .	64
16	Cromosomas de tres genomas de <i>L. adecarboxylata</i> .	65

## RESUMEN

El género *Leclercia* se encuentra ampliamente distribuido en el suelo, el agua y forma parte de la microbiota en animales y humanos. Su identificación bioquímica es difícil debido a las similitudes con *Escherichia coli*. Actualmente son reconocidas tres especies: *L. adecarboxylata*, *L. pneumoniae* y *L. tamurae* sp. *L. adecarboxylata* es un patógeno oportunista que ha adquirido mayor relevancia en la última década debido a la emergencia de cepas resistentes a los antibióticos, específicamente a los carbapenémicos. El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el resistoma, el viruloma y el plasmidoma de cepas de *L. adecarboxylata* resistentes a carbapenémicos, las cuales fueron aisladas durante un brote hospitalario ocurrido en Guadalajara, Jalisco en 2019. Se estudiaron 28 cepas de *L. adecarboxylata* obtenidas de cinco hospitales afectados por el brote en Jalisco: HP-CMNO, CMNO Especialidades, CMNO HG-O, HGZ-21 y HGR-180. A las cepas se les confirmó el perfil de susceptibilidad a carbapenémicos (por Kirby-Bauer), el nivel de resistencia a colistina, fosfomicina, imipenem y meropenem (mediante la CMI). Se evaluó la participación de bombas de eflujo (ensayo de inhibición), la capacidad de las cepas para producir biopelículas estáticas (método de cristal violeta). Los plásmidos de las cepas se caracterizaron parcialmente *in vitro* (Kieser y PFGE+S1), se amplificaron grupos de incompatibilidad (PBRT) y relaxasas MOB (PCR). Se determinó la presencia de genes de resistencia, virulencia, de grupos de incompatibilidad Inc y relaxasas de forma *in silico* en secuencias genómicas obtenidas previamente en otros estudios. Finalmente se seleccionaron tres cepas y secuenciaron para realizar la búsqueda de sistemas toxina-antitoxina y determinar qué tipo de plásmido albergaban. Como resultados, se confirmó que el 100% (28/28) de las cepas eran resistentes a carbapenémicos, sensibles a colistina con una CMI  $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$ , y resistentes a fosfomicina, con una CMI de 512  $\mu\text{g/mL}$ . Las CMIs para meropenem fueron de 32  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que para imipenem de 8,16 y 32  $\mu\text{g/mL}$ . En el 100% (28/28) y en el 92.86% (26/28) de las cepas existe una participación de bombas de eflujo cuando se prueban junto a meropenem e imipenem, respectivamente. En los genomas analizados (10/16) se encontraron genes relacionados con la resistencia a aminoglucósidos [*aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib3*, *aadA2*, *aph(3')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *aph(6)-Id*], quinolonas [*aac(6')-Ib-cr*, *qnrB*, *qnrS*],  $\beta$ -lactámicos (*bla<sub>TEM-1B</sub>*, *bla<sub>SHV-12</sub>*), cloranfenicol (*catB4*, *catA2*), sulfonamidas (*sul1*), inhibidores de la síntesis de folato (*dfrA12*, *dfrA19*), colistina (*mcr-9*), carbapenémicos (*bla<sub>NDM-1</sub>*) y componentes de la bomba de eflujo RND. Todas las cepas evaluadas (19) tienen la capacidad de formar biopelículas. El 100% (28/28) de las cepas tienen plásmidos, con un promedio de 6 a 7 plásmidos, de 7 a 380 kb. Los replicones encontrados *in vitro* en el 100% de las cepas (12/12) fueron IncFIC, ColE y CoeETp, y las relaxasas MOBF12, MOBP51, mientras que MOBH11 en el 91.66% (11/12). Los grupos IncHI2 e IncHI2A se encontraron en el estudio bioinformático al igual que la relaxasa TrwC. La caracterización de estas cepas de *L. adecarboxylata* sugiere que esta bacteria posee mecanismos de virulencia, resistencia y de transferencia horizontal de genes, que le brindan el potencial de convertirse un patógeno emergente, importante de monitorear.

**Palabras clave:** *Leclercia adecarboxylata*, resistencia antimicrobiana, plásmidos, virulencia, biopelículas.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades del género *Leclercia*

Los primeros registros del género *Leclercia* se tienen gracias al médico francés Henri Leclerc por su estudio bioquímico de enterobacterias pigmentadas en 1962, dicho trabajo describe un bacilo gram-negativo aislado a partir de agua potable con características bioquímicas muy similares a las de *Escherichia coli*, por lo que se le agrupó dentro de esta especie como “*Escherichia adecarboxylata*” (Leclerc, 1962).

También fue considerada por Ewing y Fife en 1972 como *Enterobacter agglomerans* debido a la producción de un pigmento amarillo en agar sangre de cordero y no metabolizar lisina, ornitina o arginina (Ewing & Fife, 1972; Gavini *et al.*, 1989). Por otro lado, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) se refirieron a estas cepas como Grupo Entérico 41, hasta que Tamura en 1986 hicieron una reclasificación, gracias a la llegada de análisis moleculares mediante la comparación del ARNr 16S y técnicas de electroforesis de ácidos nucleicos en 86 cepas, por lo que se les asignó un nuevo género llamado “*Leclercia*”, con una especie: *L. adecarboxylata* (Tamura *et al.*, 1986; González-Meléndez y Jaimes-González 2023).

Actualmente el género *Leclercia* cuenta con tres especies: *L. adecarboxylata*, *L. pneumoniae* y *L. tamurae* sp. (Tamura *et al.*, 1986; Hönemann *et al.*, 2022; Maddock *et al.*, 2022).

La primera, fue aislada en Alemania en el año 2022 de un paciente pediátrico con neumonía y sepsis; de acuerdo con los perfiles genotípicos, secuenciación e hibridación *in silico* de ADN-ADN en donde se determinó un promedio de identidad menor al 95% lo que representa una nueva especie, denominada *L. pneumoniae* con la cepa tipo 49125T (Hönemann *et al.*, 2022). La segunda, fue descrita en el mismo año a partir de diversos análisis de la rizósfera de robles en Hatchlands Park, Reino Unido. Los hallazgos de bacterias promotoras del crecimiento resaltaron al género *Leclercia*, pero gracias a una clasificación exhaustiva mediante secuenciación de genomas completos, análisis filogenómicos, análisis de

secuenciación multilocus de genes *housekeeping* (MLST), análisis filogenéticos del ARNr 16S y pruebas fenotípicas se logró la identificación de un taxon nuevo: *L. tamurae*, en la cual resaltan genes implicados en biorremediación, producción de fitohormonas, solubilización de potasio y fosfato, adquisición de nitrógeno y hierro, asimilación de azufre y fijación de dióxido de carbono; características que ayudan directamente al crecimiento de las plantas aumentando la disponibilidad de nutrientes (Tie *et al.*, 2021; Maddock *et al.*, 2022).

El género *Leclercia* se encuentra principalmente en el suelo y el agua, forma parte de la microbiota en animales y humanos. Su identificación por métodos convencionales es difícil debido a características bioquímicas similares al género *Escherichia*. Dentro de las especies de *Leclercia* existen diferencias metabólicas que podrían ayudar a diferenciarlas (Tabla 1); sin embargo, la identificación se realiza de forma confiable por medio de sistemas automatizados con espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) o de un análisis de secuenciación de genomas completos (González-Arenas *et al.*, 2011; Mayfield *et al.*, 2019; Maddock *et al.*, 2022).

**Tabla 1. Características fenotípicas clave para la diferenciación de especies de *Leclercia*.**

Reacción	<i>Leclercia adecarboxylata</i> (n = 4)	<i>Leclercia pneumoniae</i> 49125 <sup>T</sup>	<i>Leclercia tamurae</i> (n = 5)
Sorbitol	–	–	+
Sacarosa	V <sup>a</sup>	–	–
Acidificación de:			
D-adonitol	+	ND	–
Dulcitol	V <sup>a</sup>	ND	+
Metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido	–	ND	V <sup>b</sup>
D-trehalosa	+	+	V <sup>a</sup>
D-rafinosa	V <sup>a</sup>	ND	–
D-lyxose	V <sup>b</sup>	ND	V <sup>a</sup>
D-arabitol	+	–	–
2-cetogluconato de potasio	+	ND	–
5-cetogluconato de potasio	–	–	V <sup>b</sup>

Palatinose	V <sup>a</sup>	–	–
Malonato	V <sup>b</sup>	+	+
N-acetil-β-glucosaminidasa	–	–	V <sup>a</sup>
Utilización de:			
Sacarosa	–	–	V <sup>a</sup>
Estaquiosa	V <sup>a</sup>		–
D-salicina	+	ND	V <sup>a</sup>
3-metilglucosa	–	ND	V <sup>a</sup>
Ácido D-aspartico	+	ND	–
Pectina	V <sup>a</sup>	ND	–
Ácido cítrico	–	ND	V <sup>a</sup>
Ácido α-ceto-glutámico	–	ND	–
Ácido D-málico	V <sup>a</sup>	ND	V <sup>b</sup>
Teluro de potasio	–	ND	V <sup>b</sup>
Tween 40	+	ND	V <sup>a</sup>
Ácido α-hidroxi-butírico	V <sup>a</sup>	ND	V <sup>a</sup>
Ácido β-hidroxi-D,L-butírico	–	ND	V <sup>b</sup>
Ácido fórmico	+	ND	V <sup>b</sup>
Resistente a:			
D-serina	–	ND	V <sup>a</sup>
Ácido nalidixico	V <sup>b</sup>	ND	+
Troleandomicina	–	ND	V <sup>a</sup>

+, reacción positiva; –, reacción negativa; V, variable dentro de la especie; <sup>a</sup>, positivo para el tipo de cepa; <sup>b</sup>, negativo para el tipo de cepa. Tabla tomada y modificada de Maddock *et al.*, 2022

### 1.1.1 *Leclercia adecarboxylata*

Es un bacilo gram-negativo de phylum Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden Enterobacteriales, familia *Enterobacteriaceae* y género *Leclercia*. Se encuentra presente en ambientes acuáticos, en superficies terrosas y constituye parte de la microbiota de animales (principalmente de granja: cerdos, gallinas, conejos) y humanos. Entre sus características microbiológicas *L. adecarboxylata* es una bacteria de un tamaño aproximado a 1-3 μm, móvil, aerobia facultativa, oxidasa negativa, catalasa positiva, mesófila, con flagelos peritricos, no produce la enzima beta glucuronidasa, ni descarboxilasa para el ácido glutámico, la lisina, la ornitina o la arginina; esta bacteria crece de manera óptima a 37°C, a un pH de 6 a 8 y sus colonias son similares a las de *E. coli* o *Pantoea agglomerans* en agar MacConkey

(Adapa *et al.*, 2019; Espinoza *et al.*, 2022; Hönemann *et al.*, 2022; González-Meléndez y Jaimes-González 2023).

*L. adecarboxylata* puede ser erróneamente identificada como *E. coli* debido a sus propiedades bioquímicas similares. Es importante identificar a *L. adecarboxylata* en muestras clínicas para asegurar un diagnóstico y tratamiento oportuno, así como para obtener más información epidemiológica. Inicialmente esta bacteria fue descrita como ambiental y no patógena; sin embargo, actualmente ha adquirido importancia en el ámbito médico y se ha catalogado como un patógeno oportunista, asociado principalmente a personas con inmunosupresión causando infecciones monomicrobianas, así como en personas inmunocompetentes con infecciones mono y polimicrobianas (Keren *et al.*, 2014; Mayfield *et al.*, 2019; Zayet *et al.*, 2021; Maddock *et al.*, 2022).

### **1.1.2 Importancia clínica de *L. adecarboxylata***

En el ambiente clínico, *L. adecarboxylata* se ha aislado principalmente en muestras de heces, heridas y fluidos corporales como: sangre, orina, esputo, fluido peritoneal o pus. Si bien son muy diversos los sitios de aislamiento se ha observado que, en personas con enfermedades subyacentes graves, se aísla principalmente de catéteres, heridas abiertas, con la presencia de algún dispositivo médico móvil, o con algún tipo de inmunosupresión causando infecciones monomicrobianas. En cambio, en personas inmunocompetentes provoca infecciones tanto mono como polimicrobianas, en estos pacientes puede llegar a causar bacteriemias, sepsis, neumonía, infecciones del tracto urinario, infecciones de tejidos blandos, endocarditis, peritonitis, infecciones gastrointestinales y celulitis (Adapa *et al.*, 2019; Spiegelhauer, *et al.*, 2019; Courtois *et al.* 2020; Keyes *et al.*, 2020; Malik *et al.*, 2021; Hönemann *et al.*, 2022; Legese *et al.*, 2022).

La historia clínica de *L. adecarboxylata* se remonta a 1991 cuando fue documentado primer caso clínico. Los casos fueron aumentando paulatinamente y para julio de 2020 se habían notificado aproximadamente 74 casos en revistas internacionales; como mencionamos anteriormente los casos más frecuentes se presentan en

personas inmunocomprometidas, en donde los principales factores de riesgo están asociados al uso de catéter central, neoplasias malignas, procedimientos invasivos, entre otros. En contraparte, en los pacientes inmunocompetentes las infecciones se producen especialmente en tejidos blandos y en asociación de heridas con un entorno acuático; y de manera excepcional se ha aislado en sangre (Davenport & Land, 2007; Merza, *et al.*, 2019; Malik *et al.*, 2021).

*L. adecarboxylata* se describía comúnmente como susceptible a los antibióticos; sin embargo, a partir del año 2012 han incrementado los reportes de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) de importancia clínica y epidemiológica, principalmente en casos clínicos aislados, en Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) y en brotes (Correa *et al.*, 2012; Merza *et al.*, 2019; Garza-González *et al.*, 2021; Barrios-Villa *et al.*, 2023).

## 1.2 Resistencia a los antibióticos

*L. adecarboxylata* es susceptible a múltiples familias de antimicrobianos, entre ellos las cefalosporinas, los carbapenémicos, los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas, y también a antibióticos como la colistina y la tigeciclina (Correa *et al.*, 2012; Espinoza *et al.*, 2022). No obstante, también existen cepas resistentes a la penicilina y a la fosfomicina. En la última década se han reportado cepas multidrogoresistentes (MDR), principalmente a  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y sulfonamidas, siendo de mayor interés las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y más recientemente las cepas productoras de carbapenemasas, destacando las de tipo NDM-1 (Shin *et al.*, 2012; Alosaimi *et al.*, 2020; Zayet *et al.*, 2021; Espinoza *et al.*, 2022).

La primera cepa de *L. adecarboxylata* productora de BLEE reportada se aisló en 2003 por Mazzariol *et al.*, esta cepa presentaba resistencia a ceftazidima, cefotaxima, aztreonam y cefepime, portadora de la  $\beta$ -lactamasa SHV-12.

La incidencia de *L. adecarboxylata* MDR era baja, siendo que para el año 2012 se tenía registro de apenas 4 cepas MDR alrededor del mundo, las cuales albergaban los genes *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>, y fue hasta el siguiente año que se reportó la

primera carbapenemasa VIM-1 que le otorgaba resistencia a meropenem. Igualmente, en 2013 pero en Israel a partir de cultivos de vigilancia rectal se reportó un aislado de *L. adecarboxylata* portadora del gen *bla<sub>KPC-2</sub>* localizado en el transposón *Tn4401*, que le confería un fenotipo de resistencia a ertapenem, imipenem y meropenem; siendo esta cepa la primera del género *Leclercia* que mostró una resistencia a tres antibióticos carbapenémicos (Mazzariol *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2012; Papagiannitsis *et al.*, 2013; Geffen *et al.*, 2013).

La primera carbapenemasa de tipo NDM en *L. adecarboxylata* fue descrita en China en 2015 en una cepa con un perfil de resistencia a penicilina, inhibidores de  $\beta$ -lactámicos, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos, el aislado portaba el plásmido pP10164-NDM con los genes *bla<sub>NDM-1</sub>* y *ble<sub>MBL</sub>* (resistencia carbapenémicos y a bleomicina, respectivamente) (Sun *et al.*, 2015); en 2016 informaron que la cepa contaba con dos plásmidos más, que portaban genes de resistencia para antibióticos  $\beta$ -lactámicos, macrólidos, quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas, anfenicoles, compuestos de amonio cuaternario, sulfonamidas, trimetoprim y rifampicina y además, genes que le otorgaban resistencia a siete metales pesados (mercurio, plata, cobre, níquel, cromo, arsénico y telurio) (Sun *et al.*, 2016). El segundo caso de *L. adecarboxylata* productora de una carbapenemasa NDM-1 se documentó en España en 2017, este aislado portaba los genes *bla<sub>NDM-1</sub>* y *bla<sub>SHV-12</sub>* en un plásmido conjugativo (Riazzo *et al.*, 2017).

Una cepa más se caracterizó en el año 2019, conocida como Z96-1, la cual portaba una carbapenemasa de tipo IMP-4, siete plásmidos y genes que le conferían resistencia a múltiples antibióticos, entre ellos a carbapenémicos, cefalosporinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y fenicoles, con los genes *bla<sub>IMP-4</sub>*, *aac(3)-Ib*, *qnrS1*, *catB4* y *mcr-4.3*. El gen *bla<sub>IMP-4</sub>* se encontraba en un plásmido IncN y el gen *mcr-4.3* en un plásmido de tipo ColE10; sin embargo, el aislado era sensible a la colistina, por otra parte, albergaba un plásmido pZ96-1\_6 similar a uno descrito en *K. pneumoniae* pKPC45a y además el plásmido pZ96-1\_2 codificaba la replicasa

RepB y las toxinas de la familia RelE/ParE, y de la familia PemK/MazF (Sun *et al.*, 2019).

Para el año 2020 ya se tenía conocimiento de múltiples cepas MDR en diversos países. El hallazgo de Cheng en 2020 fue describir la primera cepa de *L. adecarboxylata* con la presencia de una bomba de eflujo tipo resistance-nodulation-division (RND); esta cepa fue aislada a partir de heces de un conejo de granja en China, el aislado presentaba altos niveles de resistencia al florfenicol, cloranfenicol, tetraciclina y linezolid, contando con genes que le confieren resistencia a distintas familias de antimicrobianos [*mdfA*, *floR*, *aac(6)-Ib-cr*, *arr-3*, *dfrA27*, *aadA16*, *qacEΔ1*, *sul1* y *floR*], alojados en dos plásmidos: pLA64 y pLA109; también se identificaron genes reguladores de los sistemas RND (*ramA*, *baeSR*, *ttgR* y *acrR*), de los cuales solo dos (*ramA* y *baeSR*) eran reguladores positivos a la transcripción de las bombas de eflujo de tipo RND (Cheng *et al.*, 2020).

Las enterobacterias resistentes a los carbapenémicos (CRE) se han convertido en una grave amenaza para la salud pública, causando infecciones graves para las que las opciones terapéuticas son limitadas, con una tasa de mortalidad de hasta el 26-44% (Falagas *et al.*, 2014). En un estudio en China sobre la vigilancia a nivel nacional de CRE indicó que los genes *bla<sub>KPC-2</sub>* y *bla<sub>NDM</sub>* eran responsables de la resistencia fenotípica en el 90% a carbapenémicos, mientras que el gen *bla<sub>IMP</sub>* se encontró en solo el 3% de las cepas de CRE (Zhang *et al.*, 2017).

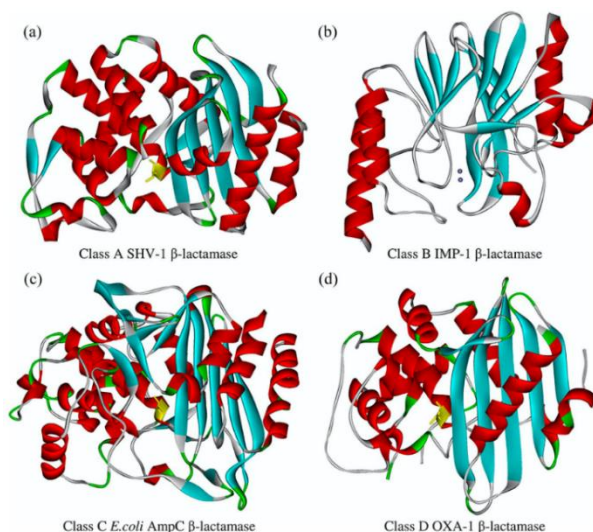
### **1.3 Mecanismos de resistencia**

En las bacterias gram-negativas, incluidas las de la familia *Enterobacteriaceae*, se conocen diversos mecanismos de resistencia a los antibióticos como: la producción de enzimas que hidrolizan los antibióticos, la expresión de bombas de eflujo y la modificación de sitios diana (De Angelis *et al.*, 2020).

### 1.3.1 Mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos

La resistencia a los antibióticos betalactámicos está mediada por múltiples mecanismos, pero el más estudiado es la producción de enzimas llamadas  $\beta$ -lactamasas, las cuales hidrolizan el enlace amídico del anillo betalactámico inhibiendo la acción del fármaco, que actúa en la última etapa de la síntesis del peptidoglicano, teniendo como consecuencia la resistencia a antibióticos betalactámicos como las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (Wilson *et al.*, 2018). Ambler, en 1980 estableció una clasificación con base en su estructura molecular de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de la enzima, creando los grupos A, B, C y D, donde las clases A, C y D se agrupan por tener un residuo de serina en su sitio activo, mientras que la clase B utiliza al zinc como cofactor (Figura 1) (Ambler, 1980; Miller *et al.*, 2019).

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) surgen debido a mutaciones en las enzimas  $\beta$ -lactamasas que dan como resultado una inactivación a las aminopenicilinas, carboxipenicilinas, aztreonam, y cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, pero no inactivan a las cefamicinas ni a los carbapenémicos (Castellanos *et al.*, 2014; De Angelis *et al.*, 2020).



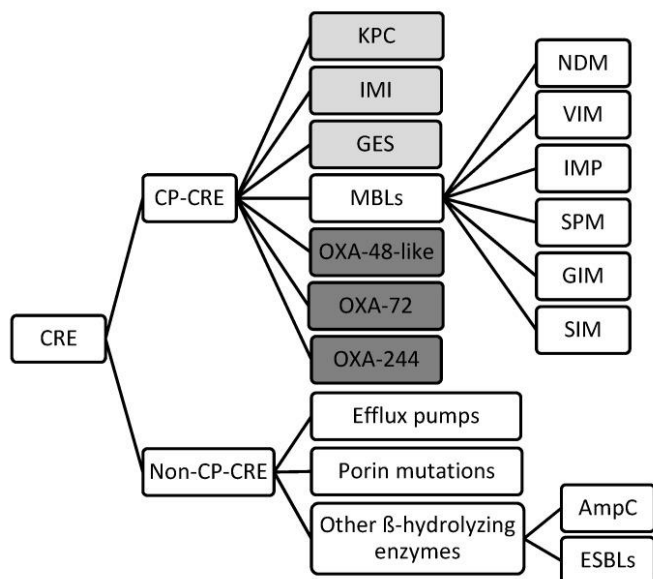
**Figura 1. Estructura general de las  $\beta$ -lactamasas representativas de las clases A, B, C y D.** a)  $\beta$ -lactamasas clase A: SHV-1 (reactivo sulfhidriilo variable-1), b)  $\beta$ -lactamasas clase B IMP-1 (resistencia al imipenem), c)  $\beta$ -lactamasas clase C (ampC  $\beta$ -lactamasas). d)  $\beta$ -lactamasas clase D OXA-1 (oxacilinasas-1). Los sitios activos de las serina- $\beta$ -lactamasas son de color amarillo, y los iones metalobeta-lactamasas de zinc se muestran como esferas grises. Tomado de De Angelis *et al.*, 2020

### 1.3.2 Mecanismos de resistencia a antibióticos carbapenémicos

El principal mecanismo de resistencia a los carbapenémicos es la producción de carbapenemasas ubicadas dentro de las clases A, B y D de Ambler. Las enzimas de la clase A y D (serin- $\beta$ -lactamasas) poseen un grupo serina en su centro activo, no hidrolizan aztreonam y son inhibidas en mayor medida por ácido clavulánico y ácido fenilborónico (Morejon, 2012; De Angelis *et al.*, 2020). Las de clase B (metalo- $\beta$ -lactamasas) dependen de la presencia de Zinc, hidrolizan a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, exceptuando a aztreonam y son inhibidas por quelantes del zinc como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido dipicolínico (Cercenado, 2015; De Angelis *et al.*, 2020).

En la actualidad las enzimas serin- $\beta$ -lactamasas con actividad carbapenemasas más importantes son: KPC, IMI, OXA y SME; siendo los genes *bla*<sub>KPC-2</sub> *bla*<sub>OXA-1</sub> los reportados en el género *Leclercia* (Geffen *et al.*, 2013), mientras que las carbapenemasas de tipo metalo- $\beta$ -lactamasa mayormente estudiadas son: IMP, VIM y NDM; con reportes en las últimas décadas de genes *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>IMP-4</sub> y *bla*<sub>VIM1</sub> en cepas de *L. adedecarboxylata* (Papagiannitsis *et al.*, 2013; Garcia-Fulgueiras *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015; Riazzi *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2019; De Angelis *et al.*, 2020).

Las enterobacterias resistentes a los antibióticos carbapenémicos (CRE), representan un peligro para la salud a nivel mundial. Estos microorganismos se pueden volver resistentes a los carbapenémicos a través de tres mecanismos: la producción de enzimas, la presencia de bombas de eflujo y por mutaciones de las porinas. En general, las CRE se dividen en dos subgrupos principales: CRE productora de carbapenemasas (CP-CRE) y CRE no productora de carbapenemasas (no CP-CRE) (Figura 2) (Suay-García & Pérez-García, 2019).



**Figura 2. Clasificación de los diferentes mecanismos de resistencia a los fármacos en *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos (CRE).** Gris claro: Clase A de Ambler, Blanco: Clase B de Ambler, Gris oscuro: Clase D de Ambler. CP: Productora de carbapenemasa; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa; IMI:  $\beta$ -lactamasa que hidroliza imipenem; GES:  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido de Guiana; MBLs: Metallo- $\beta$ -lactamasa; OXA: oxacilinas; NDM: metalo- $\beta$ -lactamasa de Nueva Delhi; VIM: Imipenemasa Verona; IMP: carbapenemasa resistente al imipenem descrita en *Pseudomonas*; SMP: metalo- $\beta$ -lactamasa de São Paulo; GIM: imipenemasa alemana; SIM: Seúl imipenemasa; AmpC: ampicilinas tipo C; BLEE:  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. Tomada de Suay-García, & Pérez-Gracia, 2019.

### 1.3.3 Resistencia a otros grupos de antibióticos

La fosfomicina es un antibiótico cuyo uso se ha vuelto a emplear para tratar infecciones causadas por bacterias gram-negativas, aunque su uso está recomendado principalmente en cepas de *E. coli* aisladas de infecciones de tracto urinario (ITU) (CLSI, 2024). Los mecanismos de resistencia a la fosfomicina a nivel cromosómico incluyen la permeabilidad reducida del antibiótico debido a mutaciones en los transportadores glicerol-3-fosfato (GlpT) y glucosa-6-fosfato (UhpT) o por mutaciones en la enzima diana MurA. Los mecanismos de resistencia transferibles son la producción de metaloenzimas FosA, que inactivan a la fosfomicina catalizando la apertura del anillo oxirano e impidiendo su función para la inhibición de la síntesis de la pared celular (Cattoir *et al.*, 2018; Mattioni & Bitar, 2023).

La enzima FosA está codificada por el gen *fosA*, que tiene ubicación plasmídica y cromosómica, distribuidos ampliamente en los genomas de especies como: *Kluyvera georgiana*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Salmonella entérica*. En 2019 Poirel describe la cepa *E. coli* 376 que albergaba un gen *fosA* en un plásmido y que no correspondía con ningún gen *fosA* conocido hasta ese momento (*fosA1* a *fosA7*), por lo que fue identificado como *fosA8*, el cual

presentaba una identidad del 98% con el gen *fosA*<sup>LA</sup>, codificado en el cromosoma de *L. adecarboxylata* USDA-ARS-USMARC -60222 (Alrowais *et al.*, 2015; Poirel *et al.*, 2019), concluyendo que a pesar de que *L. adecarboxylata* rara vez se identifica como una fuente de infecciones humanas, existen especies que poseen determinantes de resistencia a la fosfomicina a nivel cromosómico, y que podría actuar como un reservorio de genes de resistencia (Poirel *et al.*, 2019).

#### **1.3.4 Bombas de eflujo**

Otro importante elemento de resistencia lo constituyen las bombas de eflujo, las cuales son complejos anclados a la membrana que participan en la expulsión de antibióticos, detergentes, colorantes, toxinas y biocidas. También son componentes clave en la resistencia antibiótica de algunas enterobacterias, permitiéndoles una mayor persistencia y supervivencia en entornos hostiles (Serra-Valdés, 2017).

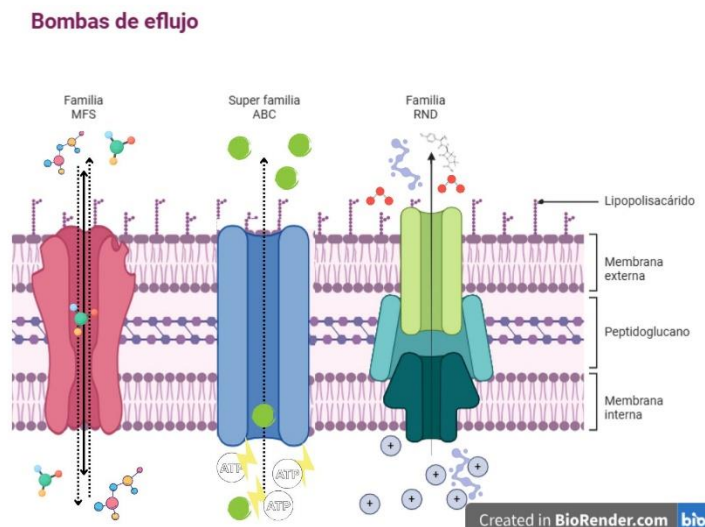
Las bombas de eflujo funcionan utilizando la energía del gradiente electroquímico de protones o ATP para expulsar diversos compuestos que le resulten tóxicos a la célula. Estos sistemas pueden ser clasificados en diferentes grupos, como:

- Bombas de eflujo de tipo RND: Formadas por tres componentes: proteína transportadora (membrana interna), proteína de fusión de membrana y una porina (membrana externa); utilizan el gradiente de protones como fuente de energía, son responsables de la resistencia a una amplia gama de antibióticos y son particularmente relevantes en bacterias gram-negativas (Opazo *et al.*, 2009).
- Bombas de eflujo de tipo MATE (multidrug and toxic compound extrusion): Compuesta de una sola proteína, la cual posee 12 dominios transmembrana que utiliza la fuerza protón-motriz o el gradiente de Na<sup>+</sup> como fuente de energía (Pérez-Varela *et al.*, 2019).
- Bombas de tipo MFS (Major Facilitator Superfamily): Son sistemas compuestos por una sola proteína de membrana, presentes tanto en eucariontes como en procariontes, transportando sustratos a través de la membrana citoplasmática, por tres mecanismos: simporte, antiporte y

uniporte (Opazo *et al.*, 2009).

- Bombas de tipo ABC (ATP-Binding Cassette): Utilizan ATP como fuente de energía para el transporte de sustratos (Hillman, 2022).

Algunas cepas clínicas de *L. adedecarboxylata* actualmente han mostrado resistencia a múltiples clases de antibióticos, lo que se ha asociado principalmente a la presencia de betalactamasas; sin embargo, la actividad de bombas de eflujo también es de suma importancia. Hasta la fecha, las bombas de eflujo RND son las mayormente encontradas en bacterias gram-negativas y tienen un papel importante en la resistencia a antibióticos (Alav *et al.*, 2018). Un reporte en China informó de una cepa de *L. adedecarboxylata* con una bomba de eflujo tipo RND, que le otorgaba resistencia al florfenicol, cloranfenicol, tetraciclina y linezolid, y que contaba con los reguladores: *ramA*, *baeSR*, *ttgR* y *acrR*, de los cuales los primeros dos eran reguladores positivos activando la transcripción de las bombas de eflujo tipo RND (Cheng *et al.*, 2020).



**Figura 3. Principales bombas de eflujo presentes en bacterias gram-negativas.** Elaboración propia en BioRender.com

### 1.3.5 Plásmidos de resistencia

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómicas autorreplicables que facilitan la adaptación de las bacterias a nuevas condiciones externas. Estos se componen de diferentes módulos, aseguran la replicación, estabilidad, transferencia y cuentan con un módulo accesorio, en el que se albergan genes que pueden

proporcionar funciones adicionales, como genes de virulencia, genes de resistencia, genes que codifican para vías metabólicas u otros rasgos, dependiendo de las condiciones selectivas para el crecimiento bacteriano (Brovedan *et al.*, 2020). Un mecanismo mediante el cual las bacterias adquieren nuevos rasgos, como factores de virulencia o resistencia, es a través de la transferencia horizontal de genes (THG), que se lleva a cabo a través de tres procesos conocidos como transformación, transducción y conjugación. De estos, el mecanismo de conjugación es el principal empleado por las bacterias, en el cual participan plásmidos conjugativos, así como por elementos integrativos (Hernández-Ramírez *et al.*, 2019).

En *L. adecarboxylata*, la presencia de plásmidos en fue reportada entre 2015 y 2016 en China. Se describieron los plásmidos pP10164-NDM, que albergaba genes *bla*<sub>NDM-1</sub> y *ble*<sub>MBL</sub>, así como los plásmidos pP10164-2 y pP10164-3, que portaban genes de resistencia para diversos antibióticos, compuestos de amonio cuaternario, y metales pesados. Este hallazgo representó el primer aislado con la coexistencia de tres plásmidos de resistencia a múltiples fármacos (Sun *et al.*, 2016).

El segundo caso fue en 2017 en una cepa de *L. adecarboxylata* productora de una carbapenemasa NDM-1 localizada en un plásmido conjugativo perteneciente al subgrupo Inc-X3 en España (Riazzo *et al.*, 2017).

Otra cepa en la que se informaron plásmidos fue en la Z96-1 descrita en 2019, que albergaba siete plásmidos, uno de tipo IncN que portaba a una carbapenemasa IMP-4, un plásmido de tipo ColE10 con el gen *mcr-4.3* (inactivo), un plásmido pZ96-1\_6 similar a uno descrito en *K. pneumoniae* pKPC45a y además el plásmido pZ96-1\_2 que codificaba la replicasa RepB y las toxinas de la familia RelE/ParE, y PemK/MazF (Sun *et al.*, 2019).

En 2020 ya se tenía conocimiento de múltiples cepas portadoras de plásmidos de resistencia y en China se describieron dos plásmidos: pLA64 y pLA109 en una cepa de *L. adecarboxylata* aislada a partir de heces de un conejo de granja en China, dichos plásmidos albergaban los genes *mdfA*, *floR*, *aac-(6')-Ib-cr*, *arr-3*, *dfrA27*, *aadA16*, *qacEΔ1*, *sul1* y *floR* (Cheng *et al.*, 2020).

Por último, Yescas-Zazueta en 2024 reportaron cepas mexicanas de *L. adecarboxylata* que portaban de uno a siete plásmidos, con un rango de 7 a 125 kb y que al menos el 80% de las cepas albergaban varios sistemas de adicción plasmídica, como ParDE, VagCD y CcdAB (Yescas-Zazueta *et al.*, 2024).

#### 1.4 Factores de virulencia

El conocimiento acerca de la vía de transmisión y patogenicidad de *L. adecarboxylata* es limitado; sin embargo, se especula que el trauma de la piel y la posterior exposición al agua o la contaminación de la microbiota bacteriana de la piel facilitan su entrada y promueve el riesgo de infección (González-Meléndez y Jaimes-González 2023).

Se tienen suficientes reportes clínicos de *L. adecarboxylata* causante de infecciones monomicrobianas en pacientes inmunodeprimidos y se especula que requiere de otras bacterias coinfectantes para establecer biopelículas y por lo tanto una infección en sujetos inmunocompetentes. Sin embargo, se han descrito algunos casos de infección monomicrobiana en pacientes sin afecciones subyacentes (Spiegelhauer, *et al.*, 2019).

Muresu en 2010 en Argelia, realizaron entre otros experimentos análisis citológicos de la patogenicidad de bacterias endófitas aisladas de nódulos de la raíz de leguminosas silvestres, entre las cuales destaca *L. adecarboxylata* HP23 mostrando un patrón de resistencia a múltiples antibióticos y un efecto citotóxico *in vitro* sobre células epiteliales humanas Hep-2, pero sin la capacidad de adherirse o invadir las células, como se muestra en la tabla 2 (Muresu *et al.*, 2010).

**Tabla 2. Resultados de los ensayos citológicos**

Especie (Cepa)	Citotoxicidad	Tinción de azul trypan*	Adhesión	Invasividad	Prueba FAS
<i>Leclercia adecarboxylata</i> (HP23)	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

FAS: Prueba de tinción de actina fluorescente; \* Prueba realizada para determinar la cuantificación de la viabilidad celular. Tabla tomada y modificada de Muresu *et al.*, 2010

Recientemente en un análisis de cepas de *L. adecarboxylata* aisladas de diversas fuentes en México, se encontraron genes de virulencia asociados con la adhesión, genes relacionados con toxinas y la presencia de plásmidos con un rango de 7 a 125 kb con la presencia de sistemas de adicción plasmídica como ParDE, VagCD y CcdAB, resaltando la presencia de elementos de virulencia y mostrando la importancia de esta bacteria como un patógeno emergente (Yescas-Zazueta *et al.*, 2024).

#### **1.4.1 Formación de biopelículas**

Las biopelículas son agrupaciones de microorganismos que colonizan y se adhieren a superficies bióticas y abióticas, están formadas por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) de lípidos, ácidos nucleicos, polisacáridos y proteínas, producto de las mismas bacterias para formar una red de polímeros que aseguran que las bacterias permanezcan estacionarias. La formación de biopelículas está altamente relacionada con el *quorum sensing*, mecanismo por el cual las bacterias se comunican, reconocen, producen y responden ante moléculas llamadas autoinductores, permitiéndoles tener ventajas frente a sus hospederos como: mayor resistencia a factores exógenos (incluyendo a antibióticos) y a la supervivencia frente al sistema inmunológico (Venkatesan *et al.*, 2015; Bellich *et al.*, 2018; Alav *et al.*, 2018).

El proceso de formación de biopelículas comienza con la unión a la superficie colonizadora mediante proteínas (adhesinas, fimbrias y flagelos), formando microcolonias que secretan sustancias poliméricas extracelulares de las cuales se rodean, desencadenando la maduración y organización de la biopelícula, para que finalmente ocurra el desprendimiento de células planctónicas que les permite propagarse y colonizar otros sitios cercanos (Guerra *et al.*, 2022).

Se ha observado que la formación de biopelículas les permite a los microorganismos patógenos persistir frente a antibióticos; sin embargo, en el género *Leclercia* la capacidad de formar biopelículas se ha descrito en procesos de biorremediación como el tratamiento del colorante naranja ácido en reactores con cepas de *L.*

*adecarboxylata*, *Leuconostoc citreum*, *Bacillus cereus* y *Rhodotorula mucilaginosa* (Chang et al., 2023).

También se ha descrito recientemente la capacidad de algunas bacterias para formar biopelículas en acero inoxidable en una planta láctea de ultra pasteurización en Argelia en donde se identificaron 59 aislamientos gram-positivos y 24 aislamientos de bacterias gram-negativas como *Acinetobacter schindleri*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter xiangfangensis*, *Leclercia adecarboxylata* y *Raoultella ornithinolytica* (Didouh et al., 2023).

Recientemente, en México se han estudiado cepas de *L. adecarboxylata* aisladas de origen clínico, de vegetales, de suelo y de diversas regiones del país, las cuales tienen una alta capacidad de formar biopelículas (Yescas-Zazueta et al., 2024).

A pesar de que existen numerosos casos clínicos documentados de *Leclercia* en asociación con otras especies bacterianas, lo que probablemente facilita la supervivencia de estos patógenos oportunistas frente a infecciones como endocarditis, bacteriemia, sepsis e incluso infecciones asociadas a dispositivos médicos, los reportes específicos sobre la participación de cepas clínicas en la formación de biopelículas son limitados. En estos casos, se sospecha que la capacidad de formar biopelículas podría ser un factor clave en su virulencia y patogénesis (Courtois et al., 2020).

## **2 ANTECEDENTES**

### **2.1 Antecedentes generales**

Se han documentado casos clínicos de infecciones por *L. adecarboxylata*, alrededor de todo el mundo, principalmente ligados a personas con algún tipo de inmunosupresión, asociadas con el uso de dispositivos médicos, como catéteres venosos centrales y respiradores, lo que facilita la entrada de la bacteria al torrente sanguíneo o al tracto respiratorio.

En México el primer aislamiento de *L. adecarboxylata* fue reportado por la Secretaría de Salud del Estado de Jalisco, quien informó 69 casos de Infección en el Torrente Sanguíneo (ITS) asociados a la contaminación de viales de nutrición parenteral total (NPT) en una población principalmente pediátrica. Ocurrió en 15 hospitales, 13 de la Zona Metropolitana de Guadalajara y 2 en Tepatlán. De dichos casos se reportaron 2 defunciones, de las cuales el Comité Estatal de Vigilancia Epidemiológica asoció solo una al brote por *L. adecarboxylata* (Secretaría de Salud, 2019).

La confirmación del brote se publicó el 28 de febrero de 2021 por Garza-González *et al.*, en el cual presentan evidencia epidemiológica, microbiológica y molecular de cepas provenientes de tres de los quince hospitales afectados por *L. adecarboxylata*; el estudio mostró 31 aislados de *L. adecarboxylata* identificados por MALDI-TOF, resistentes a aztreonam, cefepime, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, ertapenem, imipenem, meropenem y trimetoprima/sulfametoxazol. Las cepas albergaban los genes *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> y un análisis de replicones identificaron los grupos de incompatibilidad IncFII, IncHI2 e IncHI2A. La secuenciación genómica de 2 cepas indicó que albergaban genes que codifican resistencia a los aminoglucósidos [*aac* (6') - *Ib3*, *aadA2b*, *aph* (3'') - *Ib*, *aph* (3') - *Ia* y *aph* (6) - *Ia*], β-lactámicos (*bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub> y *bla*<sub>SHV-12</sub>), quinolonas [*aac* (6') - *Ib-cr*], trimetoprima (*dfrA19*), colistina (*mcr-9*), fenicoles (*catA2*) y sulfonamidas (*sul1*). También se indicó un linaje principal altamente relacionado con el brote en los tres centros médicos, con patrones de restricción detectados con un porcentaje de similitud que oscilaba entre el 90 y el 100% (Garza-González *et al.*, 2021).

## 2.2 Antecedentes específicos

En el laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC) se han analizado cepas de *L. adecarboxylata* provenientes de cinco de los quince hospitales donde ocurrió el brote en Guadalajara, Jalisco principalmente de una población pediátrica y asociado a nutrición parenteral total.

En el periodo de junio 2019 a junio de 2021 se estudiaron 28 cepas de *L. adecarboxylata* provenientes de cuatro hospitales de la zona metropolitana y uno de Tepatlán en Guadalajara, Jalisco; de las cuales el 100% fueron MDR, especialmente resistentes a carbapenémicos. En 21 cepas (75%) se identificó el gen *bla*<sub>NDM</sub>, mediante PCR. Por análisis bioinformático de 16 genomas se identificaron genes *bla*<sub>NDM-1</sub> y *bla*<sub>TEM-1B</sub> en todas las cepas y en el 93.75% (15/16) se localizó el gen *bla*<sub>SHV12</sub>. Diecisiete aislados provenientes de diferentes centros médicos, se sometieron a la técnica de PFGE para determinar la relación clonal y presentaron coeficientes de Dice mayores de 0.8, lo que indicó que estas cepas se encuentran estrechamente relacionadas, hallazgo de especial interés, ya que son cepas que pertenecen al primer brote reportado en México causado por *L. adecarboxylata* resistente a carbapenémicos (Pacheco-Flores *et al.*, 2021).

### 3 JUSTIFICACIÓN

*L. adecarboxylata* es considerado un patógeno oportunista emergente causante de infecciones asociadas a la atención sanitaria principalmente en personas con algún tipo de inmunodeficiencia, ligado a altas tasas de morbi y mortalidad. Esto podría deberse a su capacidad de adquirir determinantes de virulencia y resistencia, especialmente a los antibióticos carbapenémicos, que son usados como última elección terapéutica. La resistencia a estos antimicrobianos es resultado de un conjunto de mecanismos que aún se desconocen en este género; sin embargo, en otras bacterias de la familia de las enterobacterias, destaca la adquisición de genes de resistencia a través de transferencia horizontal de genes acarreados en plásmidos. Este mecanismo representa un gran potencial de diseminación, un importante riesgo a la salud y un serio problema en el tratamiento y control de infecciones hospitalarias. Por lo que este estudio permitirá ampliar el conocimiento acerca de los determinantes de resistencia y virulencia, así como las características de los plásmidos circulantes en cepas mexicanas de *L. adecarboxylata*, para poder sugerir en un futuro medidas para controlar la diseminación de cepas multidrogoresistentes.

## 4 OBJETIVOS

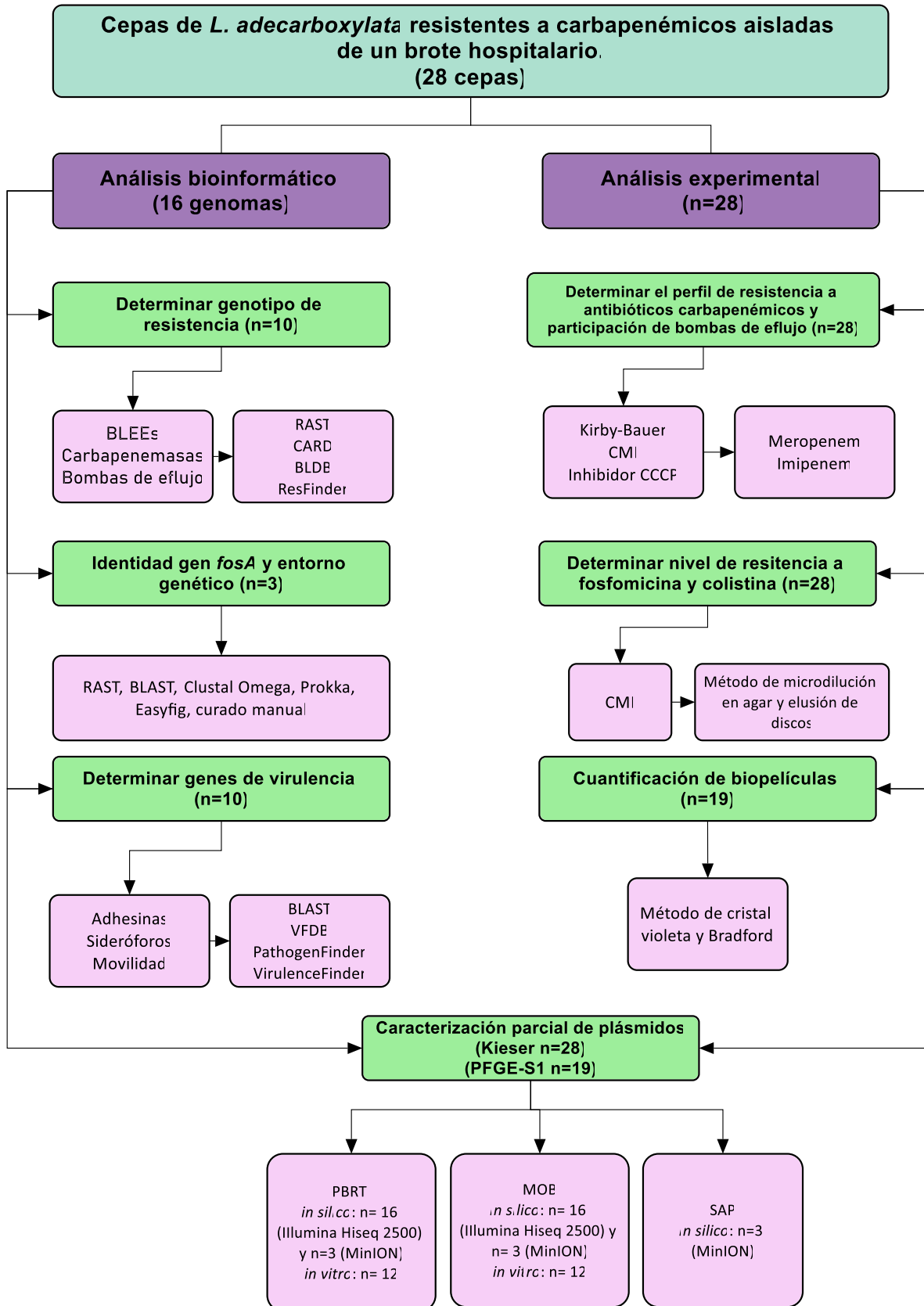
### 4.1 Objetivo general

Estudiar el resistoma, viruloma y plasmidoma de cepas de *Leclercia adecarboxylata* resistentes a carbapenémicos, aisladas de un brote hospitalario, en México.

### 4.2 Objetivos específicos

- I. Estimar los niveles de resistencia a antibióticos carbapenémicos de cepas de *L. adecarboxylata* resistentes, aisladas de un brote hospitalario, en México.
- II. Evaluar la contribución de las bombas de eflujo de la familia RND en la resistencia a carbapenémicos en cepas de *L. adecarboxylata*.
- III. Determinar el genotipo de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos de las cepas de *L. adecarboxylata* mediante la identificación *in silico* de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, carbapenemasas y bombas de eflujo.
- IV. Identificar el gen *fosA*, determinar su entorno genético y el nivel de resistencia a fosfomicina de las cepas portadoras del gen.
- V. Determinar mediante bioinformática la presencia de genes de virulencia que codifiquen para adhesinas, invasinas, y genes implicados en la formación de biopelículas en las cepas de *L. adecarboxylata*.
- VI. Determinar la capacidad de formación de biopelículas en las cepas de *L. adecarboxylata*.
- VII. Caracterizar parcialmente *in silico* los plásmidos presentes en algunas cepas de *L. adecarboxylata* (identificación PBRT, relaxasas, sistema toxina-antitoxina).
- VIII. Caracterizar experimentalmente, de forma parcial, los plásmidos presentes en algunas cepas de *L. adecarboxylata* (tamaño y número de plásmidos).

## 5 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



## 6 MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Cepas de estudio

Se trabajó con 28 cepas de *L. adecarboxylata* que fueron previamente identificadas como cepas MDR y contaban con fenotipo de resistencia a antibióticos carbapenémicos mediante Kirby Bauer. Las cepas fueron aisladas de pacientes (27) que cursaron con infecciones asociadas a la atención sanitaria y de un vial de alimentación parenteral (1) relacionado con la aplicación de nutrición parenteral total a estos pacientes en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), de 5 hospitales de la zona metropolitana y de Tepatitlán en Guadalajara, Jalisco:

- Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente (HP-CMNO).
- Centro Médico Nacional de Occidente Especialidades (CMNO especialidades).
- Hospital Regional 180 de Tlajomulco (HGR-180).
- Centro Médico Nacional de Occidente Hospital Ginecología y Obstetricia (CMNO HG-O).
- Hospital General de zona 21 (HGZ-21).

Todas las cepas fueron aisladas de pacientes con antecedentes de recibir nutrición parenteral total (NPT) en su estadía en los centros médicos y fueron cepas causantes de un brote multihospitalario en el periodo de mayo-junio de 2019.

Las 28 cepas de *L. adecarboxylata* fueron parcialmente estudiadas por Pacheco-Flores *et al.*, en el año 2021 y sus características se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3. Características de las cepas aisladas de un brote multihospitalario en Guadalajara, Jalisco 2019.**

Cepa	Origen	Fenotipo de resistencia	Genotipo de resistencia
*Lac-1	Paciente masculino/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, NA, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV-12, <i>bla</i> TEM-1B
*Lac-2 <sup>a</sup>	Paciente masculino/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV-12, <i>bla</i> TEM-1B
Lac-3	Paciente recién nacido/	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, AN, CIP, FOS, C,	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> TEM

	Sangre	STX.	
Lac-4	Paciente recién nacido/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> TEM
*Lac-5	Paciente masculino/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, TE, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV-12, <i>bla</i> TEM-1B
*Lac-6	Paciente recién nacido/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV-12, <i>bla</i> TEM-1B
Lac-7	Paciente femenino/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, NA, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> TEM
Lac-8	Paciente recién nacido/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> TEM
*Lac-9	Paciente recién nacido/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV-12, <i>bla</i> TEM-1B
*Lac-10	Paciente recién nacido/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV-12, <i>bla</i> TEM-1B
Lac-11	Paciente femenino recién nacido/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, FEP, MEM, IMP, ERT, GM, CIP, FOS, C, TE, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> TEM
Lac-12	Paciente recién nacido/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> TEM
*Lac-13	Paciente recién nacido/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV-12, <i>bla</i> TEM-1B
*Lac-14	Paciente masculino/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, AN, GM, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV-12, <i>bla</i> TEM-1B
Lac-15	Paciente masculino/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> TEM
Lac-16	Paciente recién nacido/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> TEM
*Lac-17	Paciente recién nacido/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV-12, <i>bla</i> TEM-1B
Lac-18	Paciente masculino/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> TEM
*Lac-20	Paciente masculino/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV-12, <i>bla</i> TEM-1B
Lac-21	Paciente recién nacido/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> TEM
*Lac-23 <sup>b</sup>	Paciente masculino/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, NA, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV-12, <i>bla</i> TEM-1B
*Lac-25	Paciente masculino/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, AN, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV-12, <i>bla</i> TEM-1B
*Lac-27	Paciente masculino/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, NA, FOS, C,	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV-12, <i>bla</i> TEM-1B

		STX.	
Lac-29 <sup>b</sup>	Paciente masculino/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV-12, <i>bla</i> TEM-1B
Lac-32 <sup>a</sup>	Paciente masculino/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> TEM
*Lac-34	Vial de Nutrición parenteral	AMC, AMP, CAZ, CTX, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> TEM-1B
*Lac-36	Paciente femenino/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV-12, <i>bla</i> TEM-1B
*Lac-40	Paciente recién nacido/ Sangre	AMC, AMP, CAZ, CTX, ATM, FEP, MEM, IMP, ERT, CIP, FOS, C, STX.	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> SHV-12, <i>bla</i> TEM-1B

\*: Cepas que cuentan con genoma secuenciado por Barrios-Villa.

<sup>a</sup>: Cepas provenientes de un mismo paciente. <sup>b</sup>: Cepas provenientes de un mismo paciente. AMC: amoxicilina con ácido clavulánico; AMP: ampicilina; CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; ATM: aztreonam; FEP: cefepime; MEM: meropenem; IMP: imipenem; ETP: ertapenem; AN: amikacina; GM: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; NA: ácido nalidíxico; FOS: fosfomicina; C: cloranfenicol; TE: tetraciclina; SXT: trimetoprima/sulfametoxazol.

### 6.1.1 Consideraciones éticas

Los aislados clínicos se recolectaron durante un muestreo de rutina de los diferentes hospitales (HP-CMNO, CMNO Especialidades, CMNO HG-O, HGZ-21 y al HGR-180); fueron muestras no consecutivas (incluyendo dos casos en los cuales se obtuvieron dos muestras del mismo paciente; sin embargo, se desconoce el periodo entre ambas tomas de la muestra). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS (número R-2020-785-003). No se trabajó con las muestras y los datos de los pacientes se mantuvieron bajo anonimato. Las cepas analizadas fueron elegidas por conveniencia por los diferentes hospitales y donadas al Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, por el Dr. Cesar Raúl González Bonilla.

### 6.1.2 Secuenciación de genomas de *L. adedecarboxylata*:

Tres cepas fueron seleccionadas para realizar secuenciación del genoma completo, por lo que los genomas se enviaron a secuenciar a la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB) del Instituto de Biotecnología (IBt) UNAM, mediante lecturas largas (MinION Oxford Nanopore), el análisis de la calidad se realizó con la herramienta fastQC.

([https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/bad\\_sequence\\_fastqc.html](https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/bad_sequence_fastqc.html)) y los ensamblajes se realizaron con el programa Unicycler v0.5.0 (Wick *et al.*, 2017). La anotación de genomas se realizó bajo línea de comandos con PROKKA (Rapid Prokaryotic Genome Annotation) (Seemann, 2014), con la herramienta online RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Overbeek *et al.*, 2014) y con la plataforma Galaxy (usegalaxy.org) (Blankenberg *et al.*, 2011).

### 6.1.3 Cepas control

Se emplearon diversas cepas que sirvieron como controles positivos y negativos en los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana, determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI), inhibición de bombas de eflujo, producción de biopelículas y en la electroforesis en gel de campos pulsados con enzima S1 (PFGE-S1) (Tabla 4).

**Tabla 4. Cepas control**

Cepa	Microorganismo	Experimento	Donada por:
ATCC25922	<i>E. coli</i>	Susceptibilidad a carbapenémicos	Dra. Margarita María de la Paz Arenas Hernández
C2-007	<i>E. coli</i>	Susceptibilidad a colistina	Dr. Jesús Ulises Garza Ramos y Dra. Patricia Lozano Zaráin
14669	<i>K. pneumoniae</i>	Susceptibilidad a colistina	Dr. Jesús Ulises Garza Ramos y Dra. Patricia Lozano Zaráin
PE21	<i>P. aeruginosa</i>	Control positivo CMI Control positivo bombas de eflujo	LMHyC-CICM, BUAP
PAO1	<i>P. aeruginosa</i>	Control negativo CMI Control negativo bombas de eflujo	Dr. Miguel Castañeda
AN54	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Cepa control para lisis alcalina	LMHyC-CICM, BUAP
CFT073	<i>E. coli</i>	Control positivo biopelículas	Dra. Margarita María de la Paz Arenas Hernández
EAEC	<i>E. coli</i>	Control positivo biopelículas	Dra. Margarita María de la Paz Arenas Hernández
NCTC50192	<i>E. coli</i>	Cepa referencia para PFGE con 4 plásmidos (155 kb, 66 kb, 48 kb y 7 kb)	Dr. Ulises Garza Ramos

## 6.2 Técnicas y procedimientos

### 6.2.1 Determinación de perfil de resistencia (Kirby-Bauer)

Se determinó la susceptibilidad a antibióticos carbapenémicos y a fosfomicina mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer de acuerdo con los estándares del Clinical and Laboratory Standards Institute, M100 ED34:2024 (CLSI, 2024), a pesar de que el uso de fosfomicina únicamente este recomendado para aislados de *E. coli* de tracto urinario, se realizaron estas pruebas para tener una idea del comportamiento de *L. adedecarboxylata* basándonos en los puntos de corte para enterobacterias utilizando las directrices del CLSI.

Se realizó una suspensión bacteriana a partir de un cultivo puro con 24 horas de crecimiento en agar TSA. Se suspendieron de 3 a 4 colonias en un tubo con 3 mL de solución salina isotónica al 0.85% de NaCl, y se ajustó la turbidez a 0.5 en la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). Posteriormente se impregnó un hisopo estéril con la suspensión, y se sembró en placas de agar Müeller-Hinton (MH) en forma de césped para obtener un crecimiento uniforme en toda la placa. Después, se colocaron los discos con antibióticos en las placas y se dejaron incubar de 18 a 24 horas a 37°C.

Posteriormente se midieron los tamaños de los halos de inhibición y se analizaron los resultados según los estándares del CLSI, 2024 (Tabla 5).

**Tabla 5. Puntos de corte para la determinación del fenotipo de resistencia establecidos en el CLSI 2024 para *Enterobacterias* (excluyendo *Salmonella/Shigella*) del CLSI 2024.**

Grupo o familia	Antimicrobiano		Concentración (µg)	Interpretación de la medida del halo (mm)			
				S	SDD	I	R
Carbapenémicos	Imipenem	IMP	10 µg	≥ 23	-	20-22	≤ 19
	Meropenem	MEM	10 µg	≥ 23	-	20-22	≤ 19
Fosfonatos	Fosfomicina	FOS	200 µg	≥ 16	-	13-15	≤ 12

Tomado de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2024. S: sensible; SDD: Sensible Dependiente de Dosis I: intermedio; R: resistente.

### **6.2.2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en agar para antibióticos carbapenémicos y fosfomicina**

Para determinar la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, se empleó la técnica de dilución en agar. Se prepararon placas de agar MH, a las que se añadieron diversas concentraciones de antibióticos; para imipenem y meropenem se usaron concentraciones de 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , mientras que para fosfomicina concentraciones de 32, 64, 128, 256, 512 y 1024  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Cada placa contenía un volumen final de 20 mL de agar con la cantidad correspondiente de antibiótico según la dilución requerida. En el caso de la fosfomicina, fue necesario además suplementar con 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de glucosa-6-fosfato.

A partir de un cultivo puro en Agar Soya Trypticaseína (TSA), se preparó una suspensión equivalente al tubo 0.5 de MacFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL), utilizando el mismo procedimiento que en la prueba de difusión en disco (Kirby-Bauer). Luego, se realizó una dilución 1:10 ( $1.5 \times 10^7$  UFC/mL) de esta suspensión en SSI, tomando 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana y 900  $\mu\text{L}$  de SSI para un volumen total de 1000  $\mu\text{L}$ . Posteriormente, de la dilución de cada cepa bacteriana se colocaron por triplicado 2  $\mu\text{L}$  en placas de agar MH, las cuales contenían diferentes concentraciones del antibiótico a evaluar, que iban desde 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , resultando en un inóculo final aproximado de  $1.5 \times 10^4$  UFC/mL. Se usó una placa de MH sin antibiótico como control de crecimiento y las cepas ATCC25922 y PE21 como controles negativo y positivo, respectivamente, dado que se conocen sus valores de CMI para los antibióticos en estudio. Las placas se incubaron durante 18 horas a 37 °C.

Finalmente se realizó la lectura de cada placa para determinar la CMI de cada cepa y se analizaron los resultados según los puntos de corte del CLSI, 2024 (Tabla 6).

**Tabla 6. Puntos de corte de MIC para Enterobacterias (excluyendo *Salmonella/Shigella*) del CLSI 2024.**

Antibiótico	Punto de corte CMI (µg/mL)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Meropenem	≤ 1	2	≥ 4
Imipenem	≤ 1	2	≥ 4
Fosfomicina	≤ 64	128	≥ 256

Tomado de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2024.

### **6.2.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI), método de elusión de discos para colistina (Micrométodo).**

La actividad de colistina frente a un aislado bacteriano, se midió mediante la metodología de microdilución con elusión de discos de colistina adaptado por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) del Protocolo Original de la Universidad de California en Los Ángeles (UCLA), USA 2017, del Servicio Antimicrobianos INEI. ANLIS Malbrán.

#### **Preparación de tubos de colistina:**

De manera aséptica, se añadieron discos de colistina (10 µg) a tubos con 10 mL de caldo Müeller Hinton estéril, previamente ajustado catatónicamente con concentraciones de 20 mg de Ca<sup>2+</sup>/L y 10 mg de Mg<sup>2+</sup>/L.

Para obtener concentraciones de colistina de 1, 2, 4 y 8 µg/mL, se agregaron 1, 2, 4 y 8 discos, respectivamente. Los discos se dejaron eluir durante 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se homogenizó el contenido y con una pipeta estéril se tomó 1mL y se transfirió a un tubo nuevo estéril. De cada elución se evaluaron diez cepas.

#### **Procedimiento:**

A partir de un cultivo puro en agar TSA con crecimiento de 24 horas, se preparó un inóculo con SSI al 0.85% ajustado a una turbidez equivalente a 0.5 de Mc Farland (1.5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL). Se añadieron 5 µL del inóculo ajustado a cada tubo con 1 mL de caldo con concentraciones de 1, 2, 4 y 8 µg/mL de colistina, obteniendo un

inóculo final aproximado de  $1.5 \times 10^4$  UFC/mL en cada tubo, se homogenizó suavemente y se incubó a 37°C por 18 horas.

### Interpretación:

Finalmente se realizó la lectura e interpretación, comparando los resultados con un control positivo (*K. pneumoniae* cepa 14669) y un control negativo (*E. coli* ATCC25922). La turbidez de los tubos se examinó, y la CMI se determinó como la concentración más baja en la que no se observa turbidez. Los resultados se interpretaron con base a la guía EUCAST 2024, como se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7. Puntos de corte del EUCAST 2024 en Enterobacterias.**

Antibiótico	Punto de corte CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Colistina	$\leq 2$	-	$\geq 2$

Tomado de The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2024.

#### 6.2.4 Determinación de la participación de bombas de expulsión en presencia de un inhibidor.

Se determinó la participación de bombas de expulsión de la familia RND involucradas en la resistencia a los antibióticos meropenem e imipenem utilizando el inhibidor de bombas de eflujo: carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 25 mg/L. Primero, se verificó que CCCP no fuera tóxico para las cepas control y cepas de estudio; para esto, los aislados se sembraron en ausencia y en presencia de 25 mg/L del inhibidor en placas de MH. Posteriormente se realizaron placas con concentraciones de 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64  $\mu\text{g/mL}$  de antibióticos carbapenémicos (IMP y MEM), más la concentración establecida de CCCP. La cepa PAO1 se utilizó como control negativo y la cepa PE21 como positivo. Finalmente, se interpretaron los resultados de estos experimentos realizados por triplicado realizando una comparación de crecimiento de las CMI en presencia y en ausencia del inhibidor de bombas de expulsión (EPIs)

y se consideró una participación positiva de estas cuando la CMI disminuía 4 o más veces en presencia de CCCP (Menichini *et al.*, 2020; Słoczyńska *et al.*, 2023).

### **6.2.5 Extracción de templado de ADN bacteriano (Técnica de extracto hervido)**

Con la metodología de extracto hervido se provocó la ruptura de células bacterianas ocasionando la liberación del templado de ADN bacteriano. A partir de un cultivo puro en placa de agar MacConkey con 24 horas de crecimiento se sembró 1 colonia en 3mL de medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) y se incubó durante 24 horas, posteriormente se colocaron 1.5 mL del crecimiento en caldo en un microtubo estéril y se centrifugó durante 3 minutos a 13000 revoluciones por minuto (rpm), el sobrenadante se decantó en recipiente de desecho y se colocaron los 1.5 mL de caldo restante para volver a centrifugar por 3 minutos a 13000 rpm. Se decantó nuevamente el sobrenadante, cuidando de no perder la pastilla y se agregaron 500  $\mu$ L de agua inyectable estéril para homogeneizar la pastilla.

A continuación, los microtubos se sometieron a temperatura de ebullición durante 15 minutos a baño maría. Después se dejaron enfriar durante 5 minutos para volver a centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos.

Para recuperar el material genético de los restos celulares se tomó únicamente el sobrenadante y éste se transfirió a un nuevo microtubo Eppendorf estéril para medir la concentración y pureza del ADN con un equipo NanoDrop 2000c a 260 nm. Se ajustó la concentración a 200 ng/ $\mu$ L y finalmente se almacenaron -20°C.

### **6.2.6 Extracción de ADN plasmídico (Método de Kieser)**

Esta técnica desnaturaliza el ADN plasmídico y el cromosómico y posteriormente los renaturaliza; pero en el proceso, el ADN cromosómico no se aparea rápidamente, lo que causa que sea atrapado por complejos proteicos que luego se precipitan, en cambio el ADN plasmídico se renaturaliza más rápido y adquiere su conformación natural.

La extracción del ADN plasmídico se realizó mediante el método de Kieser (1984), con ligeras modificaciones que se detallan a continuación:

A partir de un cultivo puro de las cepas en TSA, se inoculó 1 colonia en 5 mL de caldo Luria Bertani (LB) y se incubaron en agitación por 18-24 horas a una temperatura de 37 °C. Posteriormente, se centrifugaron 1.5 mL del precultivo a 13,000 rpm durante 5 min repitiendo este paso para poder obtener todas las células de los 5 ml de cultivo.

Después de obtener la pastilla bacteriana se le agregaron 400 µL de la solución 1 de lisis (Anexo 2), la pastilla se resuspendió suavemente con ayuda de la micropipeta; después se le agregaron 100 µL de lisozima por cepa (10mg/ml) mezclando suavemente por inversión y se incubó a 37°C durante 30 min.

Posterior a la incubación se le adicionaron 250 µL de la solución 2 de lisis (Anexo 2) y se mezcló en el vórtex y se incubaron a 55 °C durante 30 min (revisándolas y mezclándolas por inversión cada 10 min). Después de la incubación, los tubos se atemperaron en un baño de agua a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se le adicionaron 80 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se mezcló con el vórtex hasta obtener una solución blanquecina homogénea. Después, los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 20 min a 4°C. Posteriormente, se tomaron 700 µL del sobrenadante y se colocaron en un tubo Eppendorf nuevo, con el cuidado de no tomar el sedimento que contiene las proteínas, ni la fase orgánica que contienen el fenol.

A continuación, a los 700 µL de sobrenadante se le agregaron 300 µL de acetato de potasio 3M, se mezcló por inversión y se incubó en hielo a 4°C toda la noche. Al siguiente día, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min.

Después se transfirió el sobrenadante (600 µL aprox.) a un microtubo estéril (volver a centrifugar en los casos en los que se observe restos del sedimento para limpiar mejor la muestra). En el sobrenadante se encontraba el ADN plasmídico y se precipitó agregando 750 µL de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión y se dejó precipitar a -20 °C durante 20 min. Mas tarde, se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm durante 15 min. Después por decantación se eliminó todo el alcohol cuidando de no perder la pequeña pastilla del fondo del microtubo y se adicionan 1000 µL de etanol frío al 70% centrifugando a 13,000 rpm por 10 min, al finalizar por

decantación se eliminó todo el alcohol y se dejó secar el microtubo destapado en condiciones de esterilidad.

Después se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de agua estéril y se dejó rehidratar el ADN durante 1 hora a 37 °C o durante toda la noche a 4 °C.

Finalmente se cuantificó el ADN en el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific®) ajustado a 100 ng/  $\mu\text{L}$  y se corrieron 3  $\mu\text{L}$  del ADN plasmídico en un gel de agarosa al 0.7 % que se visualizó con Bromuro de Etidio (BET) (Sigma ® Life Science) y un transiluminador (MiniBis Pro ®).

### **6.2.7 Determinación de perfil plasmídico mediante PFGE-S1**

Para determinar el número y el tamaño de los plásmidos presentes en las cepas se realizó la técnica de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) utilizando la nucleasa S1 y empleando la cepa de referencia NCTC50192 que contiene 4 plásmidos de tamaños conocido conforme a la metodología descrita por Cortés-Cortés, 2016 (Anexo 1) al cual se le realizaron modificaciones que se describen a continuación:

#### **Preparación de insertos**

A partir de un cultivo puro crecido en TSA durante 24 hrs, se tomó una colonia aislada la cual se sembró de forma masiva en agar BHI e incubó por 24 horas a 37°C. Del crecimiento, se tomó toda la superficie de la placa y se colocó en un microtubo estéril de 1.5mL con 1000  $\mu\text{L}$  de SSI al 0.85%, se homogeneizó y centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se decantó, quedando el paquete celular, el cual se resuspendió en 1 mL de Buffer TE (Tris 10mM y EDTA 1mM) y se ajustó la turbidez del tubo a 3 en la escala de McFarland ( $9 \times 10^8$  UFC/mL). Por otro lado, se preparó agarosa de bajo punto de fusión (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad®) al 1.5% con buffer TE y se mantuvo a baño María a 54°C.

Para preparar el inserto, se mezclaron 500  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana con 500  $\mu\text{L}$  de agarosa, se mezcló rápidamente y se distribuyó en los moldes para formar los insertos. Se dejó solidificar 10 minutos en refrigeración a 4°C.

## **Lisis Bacteriana**

Se emplearon 2 insertos a los que se les añadió 2 mL de Buffer de Lisis (Tris 50mM; EDTA 50mM; Sarcosil al 1%; 0.3 mg/ml proteinasa K) y se dejó incubar en baño María a 54°C durante 24 horas.

## **Lavado de insertos**

Se retiró el Buffer de lisis y se realizaron los siguientes lavados en baño María a 54°C:

- 3 lavados con 7 mL de agua tridestilada estéril cada 10 minutos.
- 2 lavados con 7mL de Buffer TE cada 10 minutos.
- 1 lavado a temperatura ambiente con 7 mL de Buffer TE.

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

## **Digestión Enzimática**

Se colocó medio inserto en 100 µL de solución de digestión [Para cada cepa, se utiliza: Enzima S1 (1.6 µL), Buffer de la enzima 5X (20 µl), agua inyectable estéril (78.4 µl)] y se dejó incubar a 37°C durante 40 minutos. Posteriormente, la reacción se detuvo colocando el inserto en un tubo con 150 µL de solución de paro (EDTA 50mM: Sarcosil 1%) e incubando en hielo durante 10 minutos para posteriormente cargarlos en un gel de agarosa al 1% evitando el exceso de sarcosil y empleando como cepa de referencia la *E. coli* NCTC 50192, ya que contiene 4 plásmidos de tamaños conocidos: 155.8, 61.3, 40.1 y 7 kb.

## **Preparación del gel de Agarosa**

Se preparó un gel de agarosa al 1%, empleando agarosa certificada para campos pulsados (BioRad®) con Buffer TBE 0.5X (Tris 0.89M; EDTA 0.02M; Ácido Bórico 0.89M). Los pocillos del gel se rellenaron con los insertos, colocando la cepa NCTC 50192 en los extremos y se sellaron con agarosa a 50°C.

## **Electroforesis, tinción del gel y visualización**

La electroforesis se realizó en una cámara de campos pulsados CHEF-DR II (BioRad®) con 3 litros de TBE 0.5X suplementado con tiourea 75  $\mu$ M (Merck®). A un gradiente de voltaje de 6 V/cm y una rampa lineal pulsada de 1 a 30 segundos durante 22 horas a 14°C.

El gel se tiñó con 200 mL de BET (4  $\mu$ g/mL) durante 5 minutos, y para eliminar el exceso de BET se mantuvo en agua tridestilada durante 10 minutos y se visualizó utilizando el fotodocumentador de luz UV MiniBis Pro. El gel se verificó cada hora hasta obtener correcta visualización de las bandas plasmídicas.

## **Determinación de peso molecular de los plásmidos**

El peso molecular aproximado de los plásmidos se determinó con ayuda del programa “Gel Quant Express”, que elabora una curva de calibración, considerando el Rf (Distancia de migración + distancia recorrida) con el peso molecular de los plásmidos de la cepa control NCTC 50192 y con base en esta se obtiene un tamaño aproximado de los plásmidos en el gel.

### **6.2.8 Caracterización parcial de plásmidos**

#### **6.2.8.1 Tipado de plásmidos por “PCR-based replicon typing” (PBRT)**

Para la caracterización de plásmidos se utilizó la metodología de tipificación de replicones descrita por Carattoli *et al.*, 2005 y la búsqueda de las relaxasas MOB siguiendo el método descrito por Alvarado *et al.*, 2012.

Este enfoque permitió caracterizar los plásmidos de las cepas no secuenciadas a través de la identificación de grupos de incompatibilidad (Inc). Para determinar el/los replicón/es presentes en las cepas se siguió la metodología de PBRT descrita por Carattoli y colaboradores para enterobacterias en 2005, que se basa en la búsqueda de grupos Inc mediante PCRs multiplex y simples; también se realizó la búsqueda de replicones no descritos por la metodología anterior, pero reportados por García-Fernández *et al.*, 2009 y Villa *et al.*, 2010. La detección de los grupos de incompatibilidad plasmídica Inc se enfocó en los grupos A/C, B/O, ColE, ColETp,

FIA, FIC, FII, FrepB, HI1, HI2, I1, K, L/M, N, P, R, U, W, X y Y. Todos los oligonucleótidos empleados y las condiciones se encuentran en la tabla I del Anexo 3. Los componentes de las PCR triplex y los de las PCR simples están especificados en la tabla 8.

**Tabla 8. Componentes utilizados en cada PCR para la determinación de replicones plasmídicos**

Componente	Concentración stock	Volumen por tubo <sup>a</sup>	Concentración final de reacción
Oligonucleótido forward	25 µM	0.3 µl	0.75 µM
Oligonucleótido reverse	25 µM	0.3 µl	0.75 µM
TAQ DNA Polimerasa	5 U/µl	0.1 µl	0.5 U
Buffer 10X	10 X	1µl	1 X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1µl	2.5 mM
dNTPs mix	10 mM	0.4 µl	0.4 mM
DNA <sup>b</sup>	---	0.3 µl	---
Agua miliQ estéril	---	5.9µl <hr/> 10 µl	---

<sup>a</sup>: cantidades usadas en un PCR simplex. En el caso de las PCR múltiplex, la cantidad de oligonucleótido extra añadido fue restado del volumen de agua, conservando así el volumen final requerido. <sup>b</sup>: se usó DNA total obtenido mediante el método de hervido, o plasmídico obtenido por lisis alcalina.

### 6.2.8.2 Caracterización parcial de plásmidos por MOB

La caracterización parcial de plásmidos mediante el método descrito por Alvarado *et al.*, 2012, se basa en la diversidad de relaxasas que poseen los plásmidos movilizables y conjugativos, las cuales se han agrupado en 18 subfamilias nombradas MOB. Se realizó la búsqueda de las relaxasas C12, F11, F12, H2, H11, H121, Q11, Q12, P3, P4, P11, P12, P14, P51, P52, P53 y P131 pertenecientes a las diferentes subfamilias; los oligonucleótidos y condiciones empleados se muestran en la tabla II del Anexo 3.

## 6.2.9 Extracción de ADN genómico y secuenciación

La extracción del ADN genómico para secuenciación se realizó mediante el Kit de extracción Wizard Genomic DNA Purification Promega, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (Anexo 1).

La pureza del ADN fue evaluada mediante la determinación del cociente de las absorbancias 260/280 nm considerando como una buena pureza un valor de 1.7 a 2.0 y la integridad del ADN fue evaluada por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% tiñendo el gel con BET a una concentración de 4 ng/ $\mu$ L, para después tomar la fotografía en el fotodocumentador de luz UV MiniBIS Pro y determinar la integridad del ADN para la secuenciación.

Las cepas Lac-8, Lac-13 y Lac-34 se secuenciaron por la plataforma MinION de Oxford Nanopore (Li *et al.*, 2018) y con 100X de profundidad en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBt), unidad Cuernavaca.

El análisis de la calidad de las lecturas crudas se realizó con el programa FastQC. También se realizó un ensamble híbrido de la cepa Lac-34 debido a que se contaba también con las secuencias cortas de una secuenciación anterior, realizada mediante Illumina Hiseq 2500. Los ensamblajes híbridos de lecturas de Illumina y MinION Oxford Nanopore se realizaron con Unicycler v0.5.0. Por otro lado, la anotación de los ensamblajes se realizó bajo línea de comandos con PROKKA (Seemann, 2014), con la herramienta online RAST (Overbeek *et al.*, 2014) y con Galaxy (Blankenberg *et al.*, 2011).

### 6.2.9.1 Caracterización parcial de plásmidos y determinación de genes *in silico*

También se realizó la caracterización parcial de los plásmidos encontrados en los 3 ensamblajes obtenidos por la secuenciación MinION (Oxford Nanopore), realizando una búsqueda dirigida de genes de resistencia, de virulencia, de los grupos de Incompatibilidad descritos por Carattoli *et al.*, 2005, de las relaxasas descritas por Alvarado *et al.*, 2012; de sistemas toxina/antitoxina (TA) más estudiados en enterobacterias [PemK–PemI, CcdA–CcdB, RelB–RelE, ParD–ParE, VagC–VagD,

Hok–Sok, PndA–PndC y SrnB–SrnC (Mnif *et al.*, 2010)] y de otros elementos genéticos móviles utilizando las siguientes herramientas bioinformáticas:

- PLACNETW (<https://castillo.dicom.unican.es/upload/>) (Vielva *et al.*, 2017) permite visualizar la presencia de probables plásmidos.
- ResFinder (<http://www.genomicepidemiology.org/>) v.4.1 del “Center for Genomic Epidemiology” (Bortolaia *et al.*, 2020). Para la búsqueda de genes de resistencia.
- Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) v.3.2.6 (Alcock *et al.* 2023). Para búsqueda de genes de resistencia.
- “Beta-Lactamase DataBase” (BLDB) (<http://bldb.eu/>) (Naas *et al.*, 2017) para corroborar la presencia de estas enzimas.
- Virulence Finder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>) para identificar posibles genes de virulencia.
- VFDB 2019 (Virulence Factors DataBase) (Liu *et al.*, 2019) para identificar genes de virulencia.
- MobileElementFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MobileElementFinder/>) v.1.0.3 para la búsqueda de elementos genéticos móviles como transposones simples (Tn), transposones compuestos (CTn) y secuencias de inserción (IS).
- MOBscan (<https://castillo.dicom.unican.es/mobscan/>) (Garcillán-Barcia *et al.*, 2019) se utilizó para buscar las familias relaxasas MOB.
- oriTfinder (oriTfinder (sjtu.edu.cn) para búsqueda de oriT, SST4 y T4CP.
- IslandViewer 4 (<https://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer>) (Bertelli *et al.*, 2017) para la búsqueda de islas genómicas.
- Circos (www.circos.ca). Como software de correlación de genomas.
- MAUVE versión 20150226 (Darling *et al.*, 2004) y CLC Sequence Viewer versión 8.0 se usaron para alinear y comparar las secuencias plasmídicas.
- Galaxy Galaxy (usegalaxy.org) (Blankenberg *et al.*, 2011) para obtener archivos gbk de las secuencias.
- Easyfig 2.2.5 (Sullivan *et al.*, 2011) para la representación y comparación gráfica de los plásmidos.

- Proksee (<https://proksee.ca/projects/new>) se usó para esquematizar los plásmidos circularmente.
- GraphPad Prism 10.2.2 para realizar análisis estadístico de la formación de biopelículas.
- BLAST, NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
- SequenceMassager(<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>).
- Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).
- Translate tool ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>).

#### **6.2.10 Cuantificación de biopelículas (Método de tinción con cristal violeta)**

La cuantificación de biopelículas se llevó a cabo conforme a la metodología descrita por Stepanovic *et al.*, 2007 con ligeras modificaciones y como controles positivos de la producción de biopelículas se emplearon las cepas de *E. coli* CFT073 y EAEC. La metodología empleada parte de un cultivo puro crecido en TSA con un crecimiento de 24 hrs, del cual se tomó una colonia aislada y se inoculó en agar BHI y se dejó incubar a 37°C durante 24 horas. Después, las colonias se resuspendieron en SSI al 0.85% y se ajustó al tubo 0.5 en la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) para realizar diluciones seriadas 1:10 hasta ajustar el inóculo a una concentración de  $1 \times 10^4$  UFC/mL. Posteriormente, en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos, se depositaron 180 µL de caldo BHI y se agregaron 20 µL de cada muestra ajustada obteniendo un total en cada pocillo de 200 µL, cada cepa se sembró por triplicado y realizando el mismo procedimiento en otra placa de poliestireno para realizar la cuantificación de biopelículas y de proteínas en las mismas condiciones, a 37°C durante 24 horas.

Posteriormente, se tomó una de las microplacas para llevar a cabo la cuantificación de biopelículas y se retiró el cultivo con una micropipeta sin tocar la pared ni el fondo del pocillo, luego se realizaron 2 lavados con 200 µl de PBS 1X y se retiraron en un solo movimiento en un recipiente de desecho, después se agregaron 200 µl de metanol para fijar la biopelícula y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente; el metanol se retiró con una micropipeta y se dejó que el restante se

secara a temperatura ambiente. Después se agregaron 200  $\mu$ L de cristal violeta al 0.1% y se dejó incubar a temperatura ambiente por 20 minutos, para después retirar el colorante en un movimiento en el recipiente de desecho, además se realizaron 2 lavados con 200  $\mu$ L de agua estéril y finalmente la biopelícula tenida se solubilizó con 200  $\mu$ L de ácido acético al 30% o metanol y se dejó incubar por al menos 30 minutos para después realizar la lectura de la densidad óptica (D.O.) a 620nm y se empleó el lector de microplacas Bio Tek Elx800 UV. La cuantificación de biopelículas se obtuvo dividiendo la lectura de la D. O. entre los mg totales de proteína.

#### **6.2.11 Cuantificación de proteínas (Método de Bradford)**

La cuantificación de proteínas se realizó con la segunda placa y al mismo tiempo que el método de tinción con cristal violeta; se utilizó el método de Bradford (Bio Rad Protein Assay). El cual consiste en recuperar el contenido de cada pozo por separado en un microtubo estéril de 1.5mL y lavar los pocillos con 200  $\mu$ L  $MgSO_4$  10mM para posteriormente obtener paquetes celulares centrifugando los microtubos a 13,000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se decantó y se agregaron nuevamente 200  $\mu$ L de  $MgSO_4$  para repetir el procedimiento de centrifugación y decantación, posteriormente el paquete celular obtenido se resuspendió con 200  $\mu$ L PBS y se guardó a  $-20^{\circ}C$ .

Para la lectura de proteínas se realizó una curva de Albumina Sérica Bovina (BSA) como se muestra en la tabla 9, en una microplaca de 96 pocillos estéril; a la par se cuantificaron las muestras de proteínas obtenidas añadiendo para cada muestra: 155  $\mu$ L de agua estéril, 5  $\mu$ L de muestra del paquete de proteínas obtenido y 40  $\mu$ L del reactivo de Bradford; cada pocillo se homogeneizó con la ayuda de una micropipeta para realizar la lectura de la D.O. con ayuda de un lector de microplacas de Elisa (Bio Tek Elx800 UV) a una absorbancia de 595nm.

**Tabla 9. Preparación de la curva BSA**

Pocillo	BSA (µL)	Agua estéril (µL)	Reactivo Bradford (µL)	Concentración (µg)
1	0	160	40	0
2	5	155	40	0.5
3	10	150	40	1
4	20	140	40	2
5	30	130	40	3
6	40	120	40	4
7	50	110	40	5
8	60	100	40	6

## **7 RESULTADOS**

### **7.1 Determinación de niveles de resistencia a antibióticos carbapenémicos y participación de bombas de expulsión de la familia RND.**

Se trabajó con 28 cepas de *L. adecarboxylata* previamente caracterizadas como MDR, con una resistencia a carbapenémicos, a las cuales se le confirmó dicho perfil frente a imipenem y meropenem, mediante la técnica de difusión en discos (Kirby-Bauer). El 100% de las cepas (28/28) mantuvo la resistencia a esta clase de antibióticos, por lo tanto, se determinó la CMI para meropenem e imipenem y a la par se realizó el ensayo de inhibición de bombas de expulsión, con el objetivo de evaluar la participación de estas como mecanismo de resistencia a dichos antibióticos.

Antes del experimento, se realizó un ensayo de toxicidad para garantizar que el inhibidor carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP) no resultara tóxico para las cepas en estudio. Todas las cepas estudiadas crecieron a una concentración de 25 mg/L del inhibidor. De acuerdo con Sánchez-Carbonel *et al.*, 2021, la prueba se considera con un fenotipo positivo para la participación de bombas de expulsión cuando se observa que la CMI disminuye al menos 4 diluciones en presencia de CCCP.

Considerando que el CLSI 2024, marca como punto de corte para la determinación de la CMI de meropenem una concentración igual o mayor a 1 µg/mL. Se observó que el 100% de las cepas (28/28) presentaban resistencia a MEM presentando la

misma CMI de 32 µg/mL. Sin embargo, en presencia de CCCP y MEM, se observó un efecto del inhibidor en todas las cepas, con una reducción significativa de 4 o más diluciones en la CMI que van de 32 y bajan hasta 2 µg/mL. En el 78.6% (22/28) de las cepas, la CMI disminuyó 4 veces (de 32 a 8 µg/mL), mientras que en el 7.1% (2/28), la CMI disminuyó 8 veces (de 32 a 4 µg/mL) y en el 14.3% (4/28) de las cepas, la CMI se redujo 16 veces (de 32 a 2 µg/mL). Estos resultados sugieren que existe una participación importante de bombas de expulsión en el mecanismo de resistencia a meropenem.

En el caso de imipenem, el CLSI 2024 establece como punto de corte una concentración igual o mayor a 1 µg/mL, se observó una variabilidad en las CMIs en todas las cepas. El 57.12% (16/28) de las cepas presentó una CMI de 16 µg/mL, el 17.86% (5/28) una CMI de 32 µg/mL, y solo el 7.14% (2/28) tuvo una CMI de 8 µg/mL. En presencia de CCCP e IMP, se observó un efecto del inhibidor en el 92.85% (26/28) de las cepas, de las cuales el 75% (21/28) mostró una reducción de 4 veces en la CMI y el 17.86% (5/28) una disminución de 8 veces; sin embargo, solo el 7.14% (2/28) mostró una disminución de 2 veces; esto último no se considera significativo para la participación de las bombas de expulsión en la resistencia a IMP. La Tabla 10 muestra un resumen de estos resultados.

**Tabla 10. Concentración Mínima Inhibitoria y participación de bombas de expulsión en cepas de *L. adedecarboxylata* (n=28)**

CEPA	CMI (µg/mL)			
	MEM	MEM+CCCP	IMP	IMP+CCCP
Lac-1	32	2	32	4
Lac-2*	32	2	8	4*
Lac-3	32	8	16	4
Lac-4	32	8	16	4
Lac-5	32	8	16	4
Lac-6*	32	8	8	4*
Lac-7	32	2	16	4
Lac-8	32	4	16	4
Lac-9	32	8	16	4
Lac-10	32	8	16	4

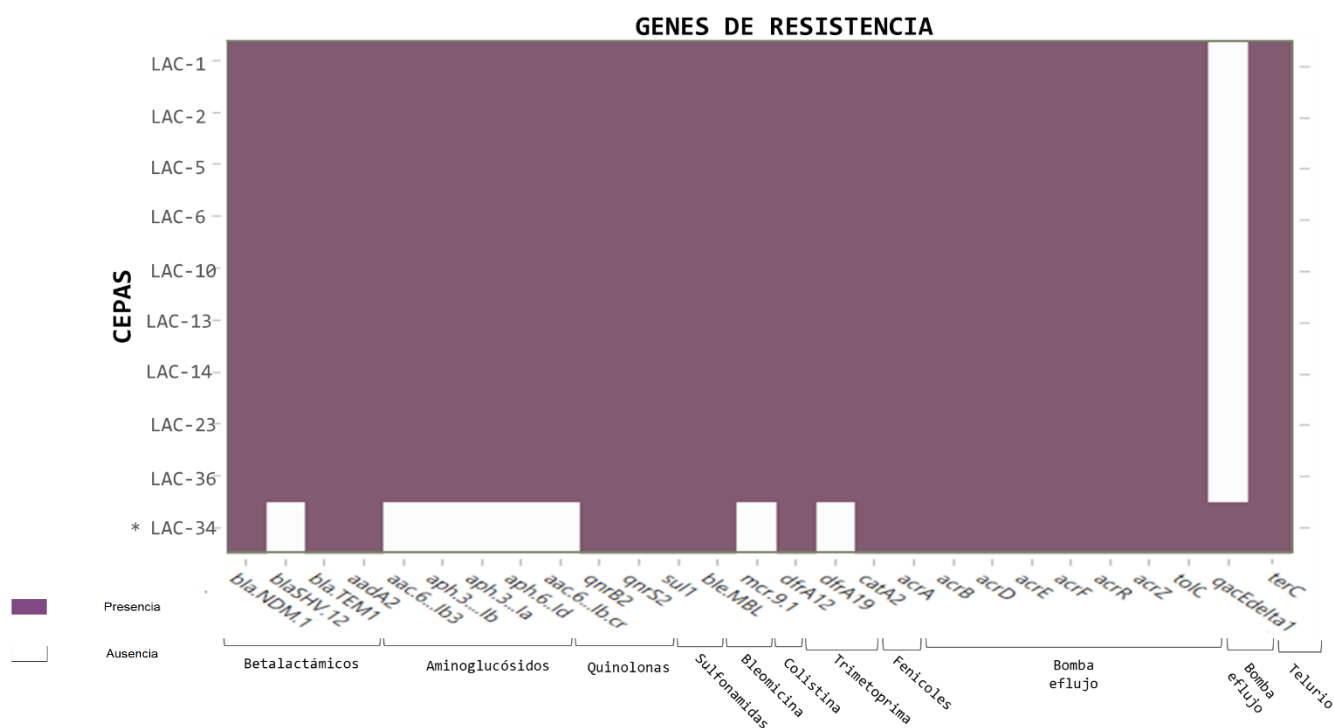
Lac-11	32	8	16	4
Lac-12	32	8	16	4
Lac-13	32	8	16	4
Lac-14	32	4	16	4
Lac-15	32	8	16	4
Lac-16	32	8	32	4
Lac-17	32	8	16	4
Lac-18	32	8	16	4
Lac-20	32	8	16	4
Lac-21	32	8	16	4
Lac-23	32	8	16	4
Lac-25	32	8	32	4
Lac-27	32	2	32	4
Lac-29	32	8	16	4
Lac-32	32	8	32	4
Lac-34	32	8	16	2
Lac-36	32	8	16	2
Lac-40	32	8	16	4

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria; MEM: meropenem; IMP: imipenem; CCCP: carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona; \*: Cepas en las que no se observó un efecto significativo en la disminución de la CMI en el ensayo con imipenem.

## 7.2 Genotipo de resistencia *in silico*

El análisis del genotipo de resistencia se realizó a partir de los 16 genomas secuenciados, de los cuales, fueron seleccionados 10 (Lac-1, Lac-2, Lac-5, Lac-6, Lac-10, Lac-13, Lac-14, Lac-23, Lac-34 y Lac-36) para la identificación de genes de resistencia. La selección se fundamentó en la integración completa (100%, 28/28) de cepas de *L. adecarboxylata* en un único dendograma generado a partir de patrones de restricción obtenidos en PFGE con la enzima XbaI (Pacheco-Flores, 2021). Este enfoque permitió clasificar las cepas en distintos clados y elegir aquellas representativas de cada uno (Anexo 4).

ResFinder 4.1 y CARD 3.2.6 se emplearon para determinar la presencia de genes de resistencia, entre los cuáles se encontraron en el 100% de los genomas (10/10) los genes *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> (resistencia a betalactámicos), *aadA2* (resistencia a aminoglucósidos), *qnrB2*, *qnrS2* (resistencia a quinolonas), *sul-1* (resistencia a sulfonamidas), *bla*<sub>MBL</sub> (resistencia a bleomicina), *dfrA12*, (resistencia a trimetoprima), *catA2* (resistencia a fenicoles), *acrA*, *acrB*, *acrR*, *acrZ*, *tolC* (bomba de eflujo de la familia RND) y *terC* (resistencia al telurio); mientras que el 90% de los genomas (9/10) se encontraron los genes *bla*<sub>SHV</sub> (resistencia a betalactámicos), *aac(6')-Ib3*, *aph(3')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *aph(6')-Id*, *acc(6')-Ib-cr* (resistencia a aminoglucósidos), *mcr-9* (resistencia a colistina) y *dfrA19* (resistencia a trimetoprima). Únicamente en el genoma proveniente del vial de nutrición parenteral (LAC-34) se localizó a *qacEΔ1* (resistencia a antisépticos) como se muestra en la Figura 4.

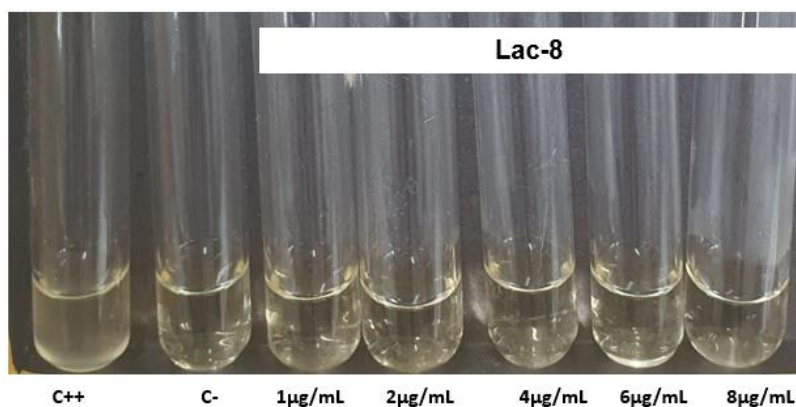


**Figura 4. Genotipo de resistencia en genomas de *L. adecarboxylata*.** \*: Genoma proveniente del vial de nutrición parenteral total. Morado: presencia de genes. Blanco: ausencia de genes.

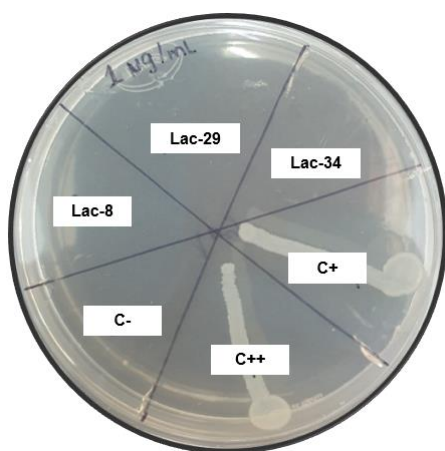
### 7.3 Determinación del fenotipo de resistencia a colistina

El análisis del genoma *in silico* nos permitió determinar el gen *mcr-9* y con base en eso, se realizó la susceptibilidad a colistina con los protocolos descritos en el apartado 6.2.2 y 6.2.3, a pesar de que no forma parte de los objetivos de este trabajo. Como control positivo se usó la cepa C2-007 de *E. coli* que contiene el gen *mcr-1* localizado en un plásmido y la cepa 14669 de *K. pneumoniae* con mutación a nivel cromosomal del gen *mgrB*. Como control negativo la cepa ATCC25922 de *E. coli*.

Los resultados con las dos metodologías empleadas mostraron que el 100% de cepas (28/28) son susceptibles a la colistina con puntos de corte  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$  (Figura 5 y 6).



**Figura 5. Micro método de elusión de discos de colistina, adaptado por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR).** Lac-8: cepa representativa de *L. adecarboxylata*; C++: Control positivo de *K. pneumoniae*.; C-: Control negativo ATCC25922 de *E. coli*

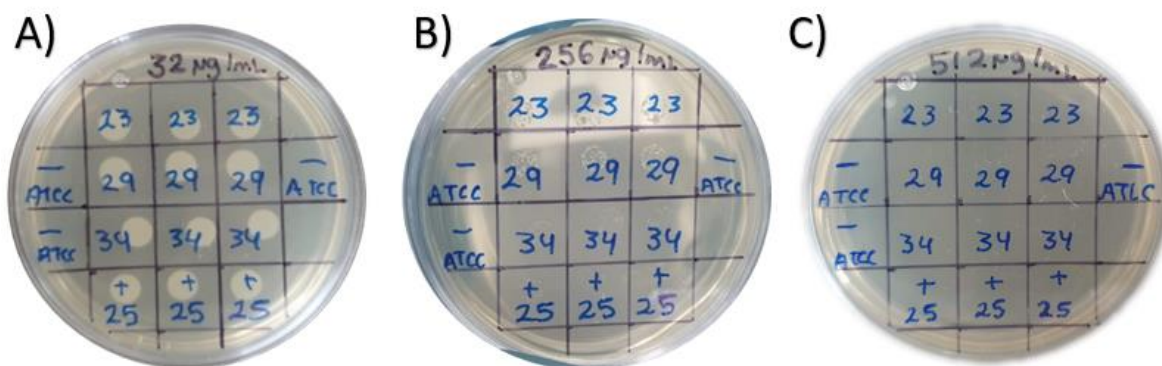


**Figura 6. Método de determinación de susceptibilidad a colistina (1  $\mu\text{g/mL}$ ) en agar MH en las cepas Lac-8, Lac-29 y Lac-34.** C-: Control negativo ATCC25922 de *E. coli*; C+: C2-007 de *E. coli*; C++: 14669 de *K. pneumoniae*; Lac-8, Lac-29, Lac-34: cepas representativas de *L. adecarboxylata*. Placa de MH con colistina a una concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$ .

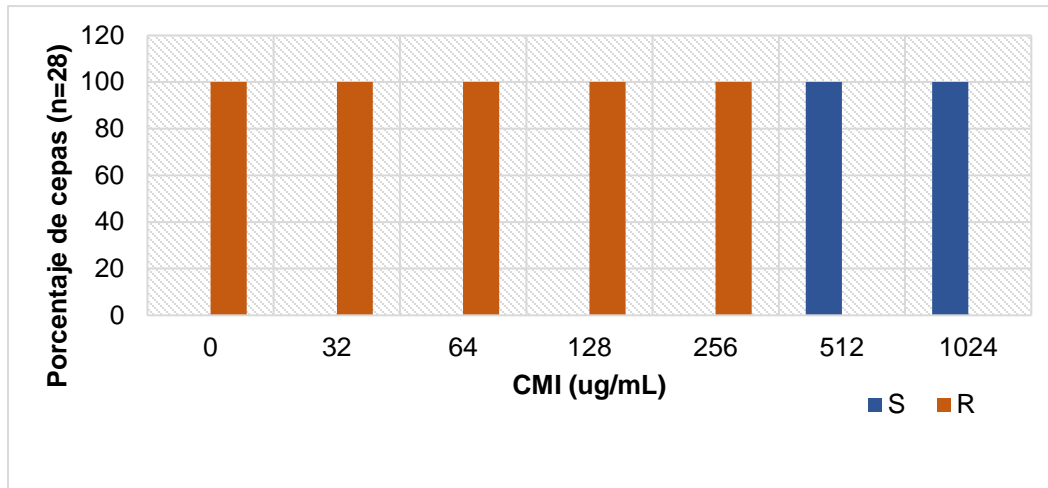
#### 7.4 Resistencia a fosfomicina y análisis del gen *fosA*<sup>LA2</sup>

Para la determinación del fenotipo de resistencia a fosfomicina, se tenía conocimiento que 26 de 28 cepas habían sido categorizadas anteriormente como resistentes a fosfomicina por el método de Kirby-Bauer (Pacheco-Flores, 2021). En este estudio, se determinó la concentración mínima inhibitoria de todas las cepas (28/28), debido a que se tiene como referencia el genotipo de resistencia *in silico*, y se encontró el gen *fosA* en las secuencias, trabajo publicado en 2023 (Barrios-Villa *et al.*, 2023). Como control negativo se usó la cepa ATCC25922 de *E. coli*.

Nuestros resultados mostraron en todas las cepas (28/28) resistencia a fosfomicina con una CMI de 512 µg/mL (Figura 7 y 8).

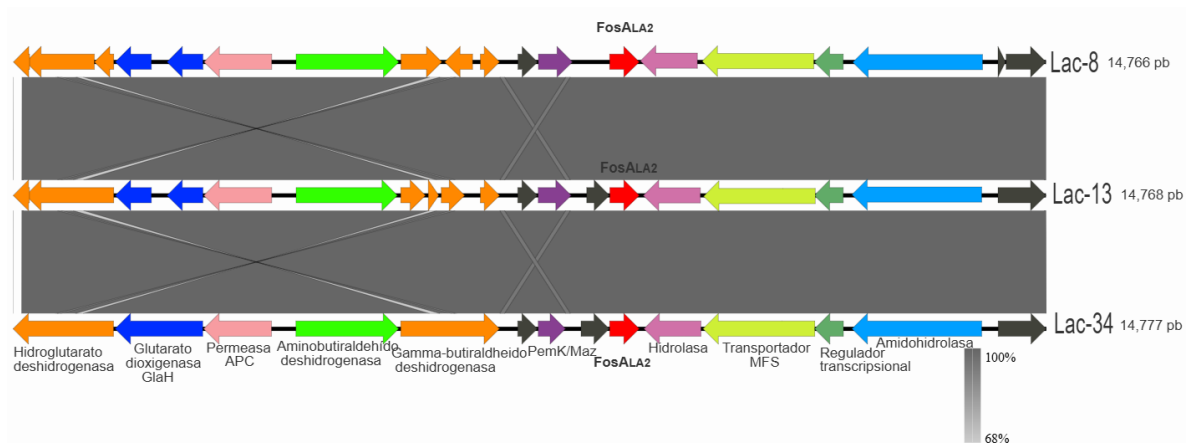


**Figura 7. Concentración mínima inhibitoria a fosfomicina por dilución en agar suplementado con 25 µg/mL de glucosa-6-fosfato.** A) CMI de cepas representativas del experimento (ATCC: Cepa ATCC25922 como control negativo de *E. coli*, 23: Lac-23, 29: Lac-29, 25: Lac-25 y 34: Lac-34) en dilución en agar a una concentración de 32 µg/mL de fosfomicina, en donde se observa un crecimiento abundante. B) CMI de cepas representativas del experimento en dilución en agar a una concentración de 256 µg/mL de fosfomicina, en donde se observa una disminución del crecimiento. C) CMI de cepas representativas en dilución en agar a una concentración de 512 µg/mL de fosfomicina, en donde se observa nulo crecimiento.



**Figura 8. Resultados de la CMI para fosfomicina en 28 cepas de *L. adedecarboxylata*.** CMI: Concentración mínima inhibitoria; S: Sensible; R: Resistente.

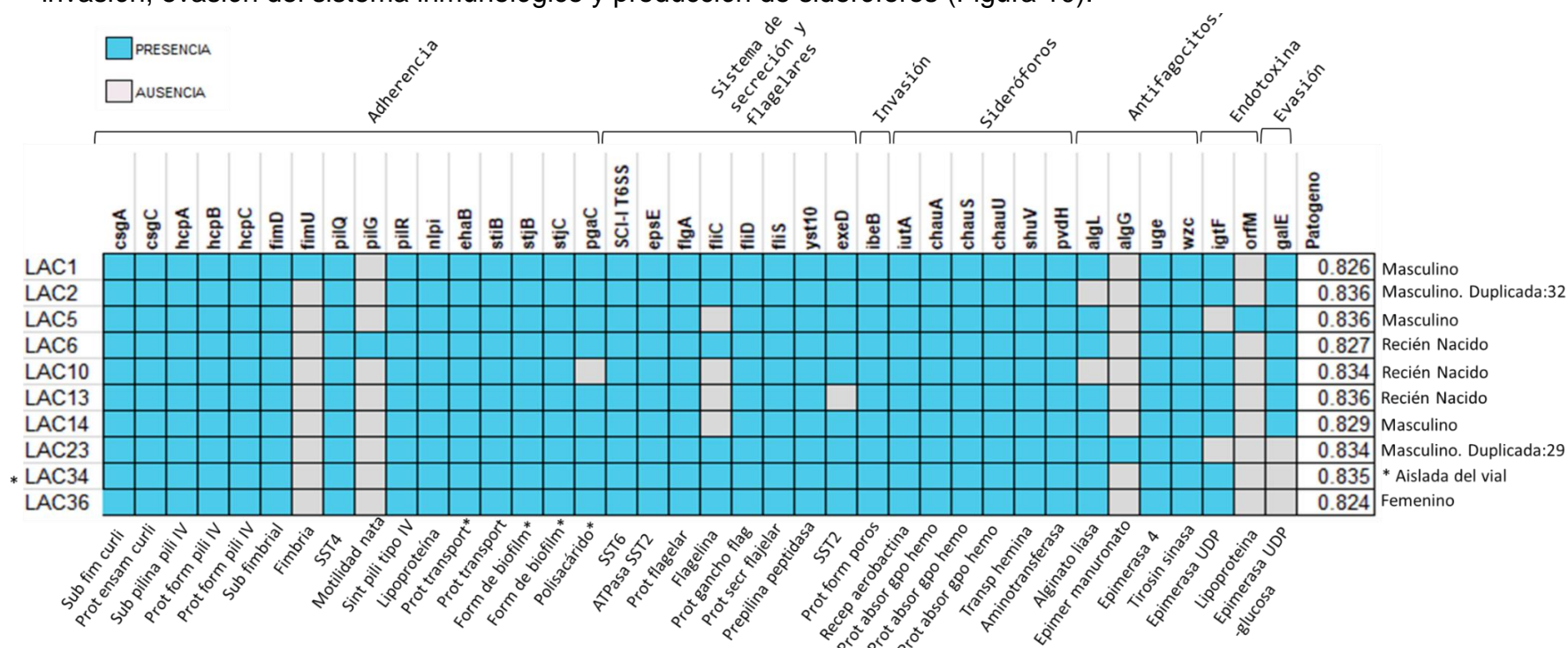
Al determinar la presencia del gen *fosA* en las secuencias analizadas, se determinó que esta variante pertenece a la familia FosA8, con la cual comparte un 96.45% de identidad y en este trabajo fue identificada como *fosA<sup>LA2</sup>* (Barrios-Villa *et al.*, 2023), debido a que el primer gen *fosA<sup>LA</sup>* se encuentra documentado por Poirel *et al.*, 2019 en la cepa de *L. adedecarboxylata* USDA-ARS-USMARC -60222. La secuencia de *fosA<sup>LA2</sup>* se encuentra en Genbank con el número de acceso MDC6635501.1. También se realizó una comparación de los entornos genéticos del gen en los genomas de Lac-8, Lac-13 y Lac-34 que fueron secuenciados por MinION (Oxford Nanopore), como se muestra en la Figura 9, observando ligeros cambios río abajo.



**Figura 9. Comparación de entornos genéticos del gen *fosA<sup>LA2</sup>*.** Contexto genético del gen *fosA<sup>LA2</sup>* a nivel cromosómico de cepas de *L. adedecarboxylata*. Rojo: proteína *FosA<sup>LA2</sup>*; Negro: proteínas hipotéticas. El color gris indica el porcentaje de identidad BLAST. Los genes del entorno genético del gen *fosA<sup>LA2</sup>* aparecen en colores y su nombre en la base de la figura.

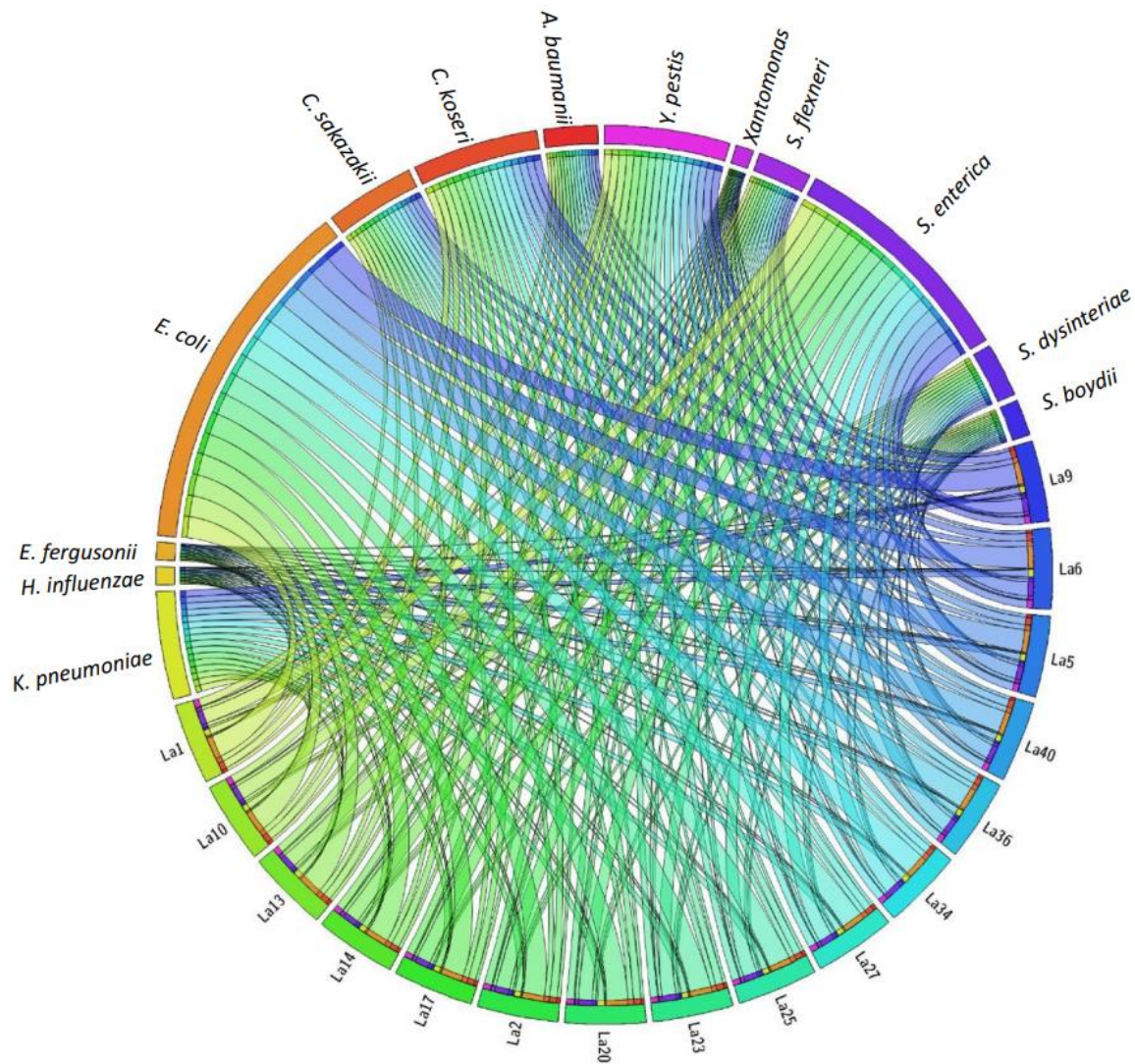
## 7.5 Identificación de determinantes de virulencia en cepas de *L. adecarboxylata*

Para identificar los genes de virulencia, se seleccionaron 10 genomas de acuerdo con el genotipo de resistencia y se realizó la búsqueda de estos determinantes, debido al conocimiento limitado de factores de virulencia de *L. adecarboxylata*. En el 100% (10/10) de los genomas se obtuvo un índice de 0.8, lo que sugiere una alta probabilidad de que estos genomas correspondan a un patógeno para humano (un valor cercano a 1.0 indica mayor correlación entre familias de genes asociados a patogenicidad). Se identificaron genes relacionados con la adherencia bacteriana, sistemas de secreción, invasión, evasión del sistema inmunológico y producción de sideróforos (Figura 10).



**Figura 10. Genes de virulencia presentes en genomas de *L. adecarboxylata*.** \*LAC34: Genoma del aislado del vial de nutrición; \* (eje x): Factores de virulencia relacionados con la producción de biopelículas; Color azul: presencia de genes; Color gris: ausencia de genes.

A partir de los datos obtenidos se construyó un diagrama de circos que muestra la relación entre los determinantes de virulencia de las cepas de *L. adecarboxylata* y los determinantes de virulencia presentes en otros géneros y especies como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Chronobacter sakazakii*, *Enterobacter fergusonii*, *Citrobacter koseri*, *Acinetobacter baumannii*, *Yersinia pestis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae* y *Shigella boydii*, todos considerados patógenos para el humano, como se muestra en la Figura 11.

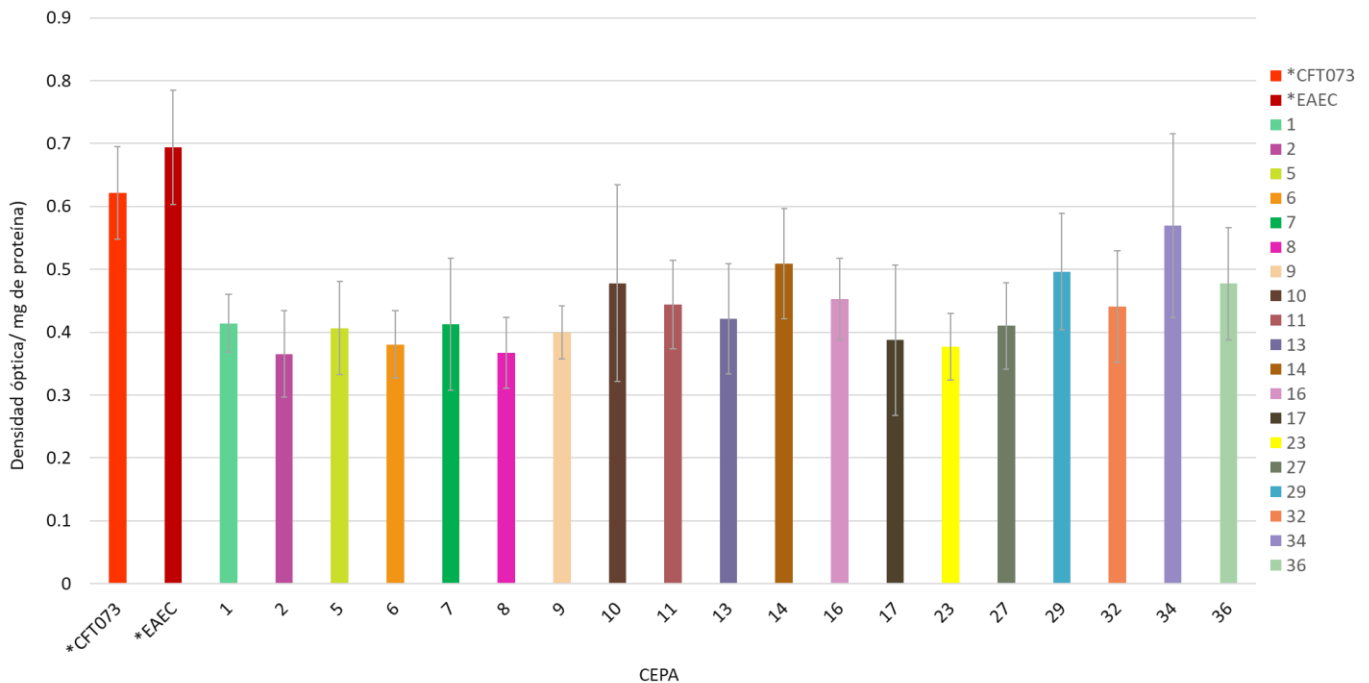


**Figura 11.** Correlación de genes de virulencia encontrados en genomas de *L. adecarboxylata* respecto a los encontrados en microorganismos patógenos para humanos. Las barras de color diferencian los nombres de los microorganismos predichos como patógenos para el humano, el tamaño de cada barra representa un mayor o menor número de genes de virulencia encontrados en PathogenFinder (Barrios-Villa *et al.*, 2023).

## 7.6 Capacidad de formación de biopelículas en cepas de *L. adecarboxylata*

Para determinar la capacidad de producción de biopelículas en cepas de *L. adecarboxylata*, se trabajaron únicamente con 19 cepas, diez elegidas con base al análisis de virulencia y nueve por el genotipo de resistencia. Se emplearon las cepas EAEC y CFT073 como controles positivos de formación de biopelículas. La cepa EAEC mostró una mayor formación de biopelículas en comparación con la cepa CFT073 bajo las condiciones ensayadas.

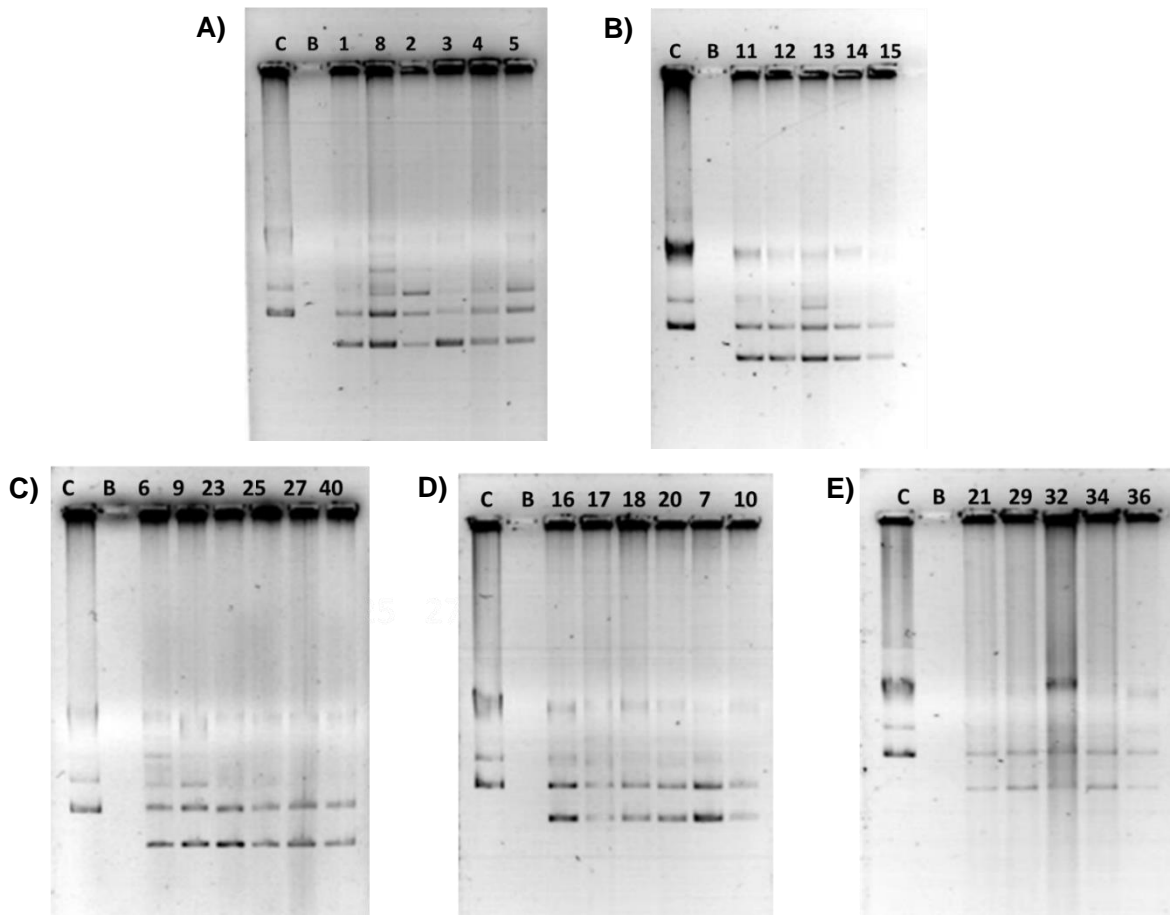
En contraste, las cepas de *L. adecarboxylata* analizadas no presentaron diferencias significativas en la producción de biopelículas en relación con las cepas control, según los resultados obtenidos mediante tres análisis de ANOVA y las pruebas post hoc de Dunnett, Tukey y Bonferroni (Anexo 5) arrojan un valor de  $P = >0.9999$ , por lo que las cepas de *L. adecarboxylata* aisladas del brote hospitalario se clasificaron como productoras fuertes de biopelículas (Figura 12).



**Figura 12.** Cuantificación de biopelícula estática en 19 cepas de *L. adecarboxylata*. Ensayos realizados por triplicado y repetidos tres veces. Análisis de datos mediante ANOVA y pruebas estadísticas de Dunnett, Tukey y Bonferroni (valor de  $P = >0.9999$  en cada análisis). \*: Cepas control.

## 7.7 Determinación del perfil plasmídico de las cepas de *L. adecarboxylata*

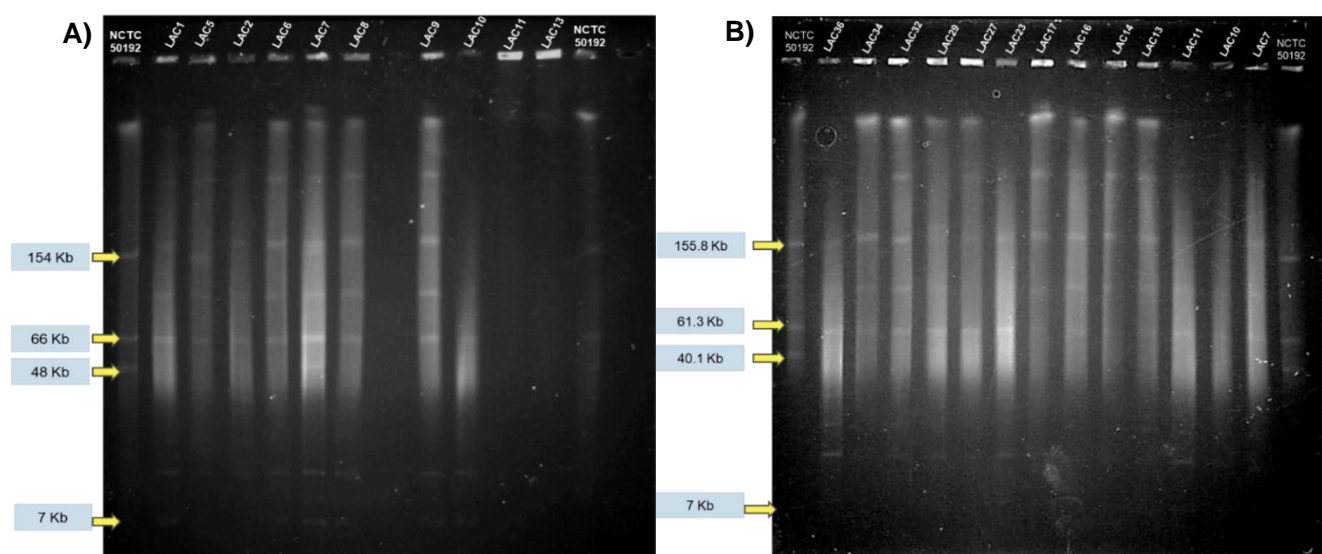
Para conocer si las cepas de *L. adecarboxylata* del estudio tienen la presencia de plásmidos, se realizó extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina a todas las cepas (n=28). Como control positivo a la presencia de plásmidos se empleó la cepa AN54 de *A. haemolyticus*, la cual posee 5 plásmidos de tamaños conocidos. El análisis del perfil plasmídico indicó la presencia de bandas plasmídicas en el 100% de las cepas evaluadas, como se muestra en la Figura 13.



**Figura 13. Electroforesis en geles de agarosa al 1% del perfil plasmídico de las cepas de *L. adecarboxylata* obtenido mediante lisis alcalina.** En todos los paneles C: Cepa control positivo (AN54 de *A. haemolyticus* con plásmidos de 45.4, 12.8, 11.4, 6.4 y 4.7 kb) y B: Blanco. **Panel A)** Perfil plasmídico de cepas 1: Lac-1, 8: Lac-8, 2: Lac-2, 3: Lac-3, 4: Lac-4 y 5: Lac-5. **Panel B)** Perfil plasmídico de cepas 11: Lac-11, 12: Lac-12, 13: Lac-13, 14: Lac-14 y 15: Lac-15. **Panel C)** Perfil plasmídico de cepas 6: Lac-6, 9: Lac-9, 23: Lac-23, 25: Lac-25, 27: Lac-27 y 40: Lac-40. **Panel D)** Perfil plasmídico de cepas 16: Lac-16, 17: Lac-17, 18: Lac-18, 20: Lac-20, 7: Lac-7 y 10: Lac-10. **Panel E)** Perfil plasmídico de cepas 21: Lac-21, 29: Lac-21, 32: Lac-32, 34: Lac-34 y 36: Lac-36.

## 7.8 Identificación del número y tamaño de plásmidos mediante PFGE-S1

Los resultados obtenidos con la metodología de Kieser indicaron que las 28 cepas de *L. adecarboxylata* fueron portadoras de plásmidos. Sin embargo, se seleccionaron únicamente 19 cepas de acuerdo con el análisis de virulencia del apartado 7.5 y con el dendograma del Anexo 4, para identificar el número y tamaño de plásmidos mediante electroforesis en gel de campo pulsado utilizando la enzima S1 (PFGE-S1). La movilidad relativa de los plásmidos se evaluó con el software GelQuant Express y fue comparada con la movilidad de los plásmidos presentes en la cepa de referencia NCTC 50192 de *E. coli*. Los resultados indicaron un promedio de 6 a 7 plásmidos en las cepas de *L. adecarboxylata*, con tamaños que oscilan entre 7 y 380 kb (Figura 14).



**Figura 14. Electroforesis en geles de agarosa al 1.2% de los perfiles plasmídicos de las cepas de *L. adecarboxylata* obtenido mediante PFGE-S1.** En ambos paneles NCTC 50192 es cepa control de *E. coli* con 4 plásmidos de tamaños conocidos (154, 66, 48 y 7 kb). **Panel A)** Perfil electroforético de cepas Lac-1, Lac-5, Lac-2, Lac-6, Lac-7, Lac-8, Lac-9, Lac-10, Lac-11 y Lac-13. **Panel B)** Perfil electroforético de cepas Lac-36, Lac-34, Lac-29, Lac-27, Lac-23, Lac-17, Lac-16, Lac-14, Lac-13, Lac-11, Lac-10 y Lac-7.

### 7.8.1 Caracterización parcial de plásmidos (grupos Inc y relaxasas MOB) de las cepas de *L. adecarboxylata*

La caracterización *in vitro* de los plásmidos en las cepas de *L. adecarboxylata* se realizó en un subgrupo de 12 cepas (Lac-3, Lac-4, Lac-7, Lac-8, Lac-11, Lac-12, Lac-15, Lac-16, Lac-18, Lac-21, Lac-29 y Lac-32) de las cuales no se disponía de datos de secuenciación, y para obtener una caracterización parcial de todas las cepas de estudio. La detección de los grupos de incompatibilidad plasmídica Inc se realizó mediante PCR, enfocándose en los grupos descritos en el Anexo 3. Los resultados indicaron la presencia de los replicones IncFIC, IncColE e IncColETp en el 100% de las cepas evaluadas (12/12) (Tabla 11).

Adicionalmente, se investigó la presencia de relaxasas de los grupos MOB mediante PCR, realizando una búsqueda de los grupos que se detallan en el Anexo 3. En promedio, las cepas analizadas presentaron entre 2 y 3 relaxasas distintas, identificando la presencia de las relaxasas F12 y P51 en el 100% de las cepas (12/12) y la relaxasa H11 en el 91.6% (11/12), como se resume en la Tabla 11.

**Tabla 11. Características plasmídicas de cepas de *L. adecarboxylata* encontradas *in vitro*.**

Cepa	No. plásmidos	Tamaño (kb)	Replicón	Relaxasa
Lac-1	6	≈274, 158, 107, 66, 13, 6.8	ND	ND
Lac-2	7	≈275.6, 160, 108, 67, 28, 12.6, 7	ND	ND
*Lac-3	Presenta, ND	ND	IncFIC, IncColE, IncColETp	MOBF12, MOBP51, MOBH11.
*Lac-4	Presenta, ND	ND	IncFIC, IncColE, IncColETp	MOBF12, MOBP51, MOBH11.
Lac-5	7	≈274.3, 154, 108, 65, 40.6, 28, 12.6	ND	ND
Lac-6	7	≈274, 158, 107, 66, 13, 6.8	ND	ND
*Lac-7	7	≈275, 158, 150, 107, 66, 17.8, 6.8	IncFIC, IncColE, IncColETp	MOBF12, MOBP51, MOBH11.
*Lac-8	7	≈276, 158, 107, 66, 13, 7	IncFIC, IncColE, IncColETp	MOBF12, MOBP51, MOBH11.
Lac-9	6	≈278.5, 160, 108, 66, 13, 5.8	ND	ND

Lac-10	6	≈270, 158, 107, 66, 13, 5.6	ND	ND
*Lac-11	6	≈270, 158, 107, 66, 13, 7	IncFIC, IncColE, IncCoIETp	MOBF12, MOBP51, MOBH11.
*Lac-12	Presenta, ND	ND	IncFIC, IncColE, IncCoIETp	MOBF12, MOBP51, MOBH11.
Lac-13	6	≈272, 161, 109, 60.2, 13.2, 6.8	ND	ND
Lac-14	6	≈274, 161.1, 107.3, 60.2, 13.2, 6.8	ND	ND
*Lac-15	Presenta, ND	ND	IncFIC, IncColE, IncCoIETp	MOBF12, MOBP51, MOBH11.
*Lac-16	6	≈272, 161.1, 107.3, 60.2, 13.2, 6.8	IncFIC, IncColE, IncCoIETp	MOBF12, MOBP51, MOBH11.
Lac-17	6	≈272, 161.1, 107.3, 60.2, 13.2, 6.8	ND	ND
*Lac-18	Presenta, ND	ND	IncFIC, IncColE, IncCoIETp	MOBF12, MOBP51, MOBH11.
*Lac-21	Presenta, ND	ND	IncFIC, IncColE, IncCoIETp	MOBF12, MOBP51, MOBH11.
Lac-23	6	≈272, 161.1, 107.3, 60.2, 13.2, 6.8	ND	ND
Lac-27	6	≈274, 161, 107, 60.2, 13.2, 6.8	ND	ND
*Lac-29	6	≈168.8, 160.5, 107, 60.2, 13.2, 6.8	IncFIC, IncColE, IncCoIETp	MOBF12, MOBP51
*Lac-32	6	≈278, 160, 107, 61.3, 13.2, 6.8	IncFIC, IncColE, IncCoIETp	MOBF12, MOBP51, MOBH11.
Lac-34	6	≈278.5, 162, 107, 61, 13, 5.6.	ND	ND
Lac-36	6	≈268, 156, 111.6, 60.8, 13.2, 6.8	ND	ND

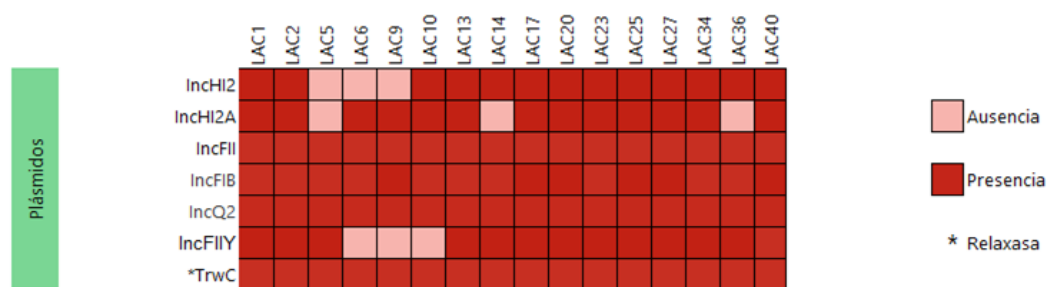
Color azul: Cepas sometidas a PFGE-S1 para determinación de número y tamaño de plásmidos.

\*: Cepas sometidas a búsqueda de replicones Inc y MOB mediante PCR. ND: No determinado.

### 7.8.2 Caracterización parcial *in silico* de plásmidos de genomas de *L. adecarboxylata*

Como parte de la caracterización parcial de plásmidos, se realizó secuenciación masiva de tres cepas (Lac-8, Lac-13 y Lac-34), seleccionadas por la ubicación de

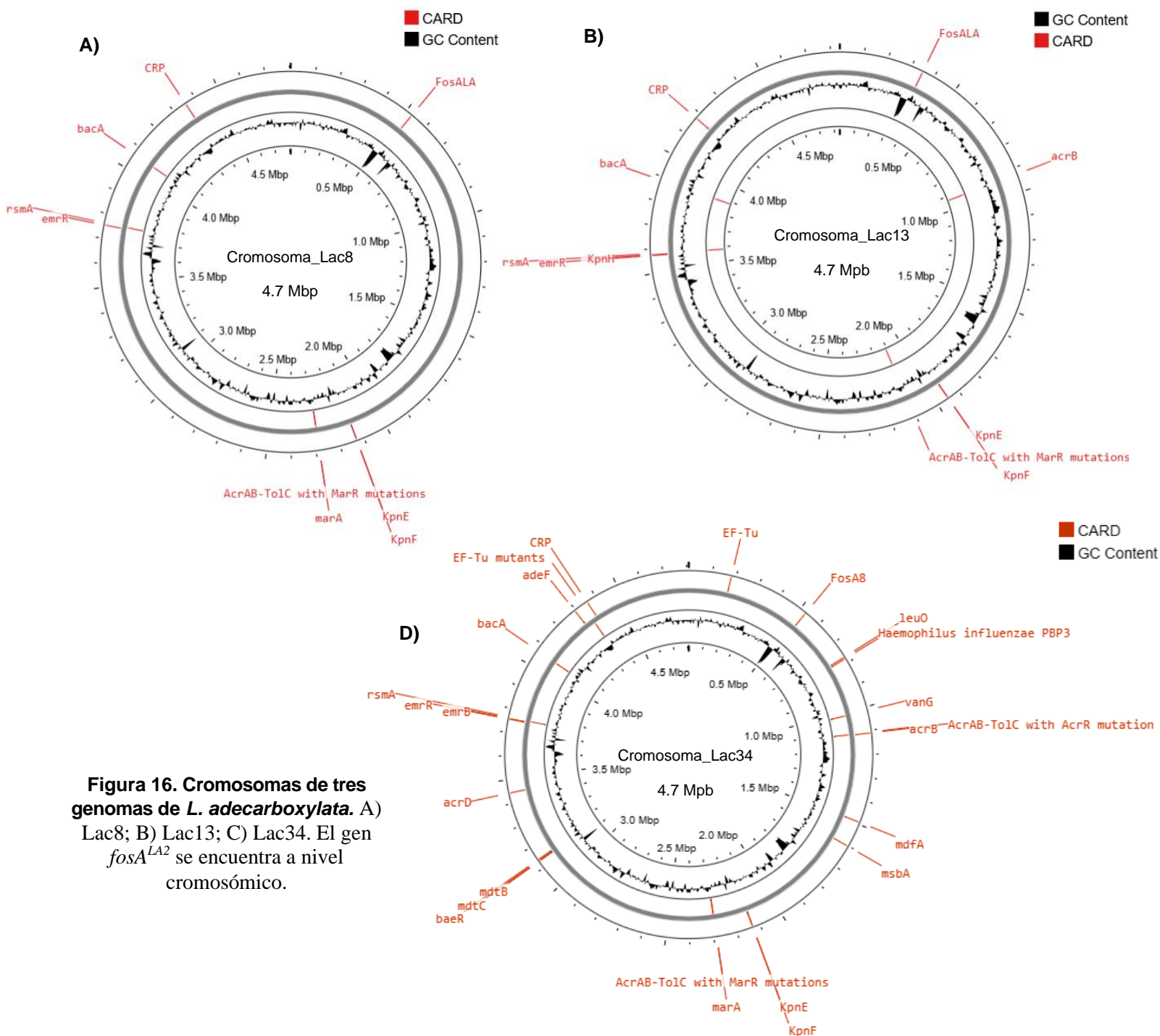
clados observada en el dendograma del Anexo 4. Las secuencias preliminares se ensamblaron con Unicycler v0.5.0, lo que permitió generar un ensamble híbrido de Lac-34, combinando las secuencias de dos tecnologías (Illumina Hiseq y MinION). Esta doble secuenciación permitió el cierre del cromosoma y la identificación de seis plásmidos en los genomas. Sin embargo, el análisis *in silico* de plásmidos comenzó con los 16 genomas con los que contábamos, intentando identificar replicones Inc, relaxasas MOB y sistemas toxina/antitoxina, ya que no fue posible determinar el número y tamaño de los plásmidos presentes en los genomas obtenidos por Barrios-Villa. En el 100% de los genomas (16/16) se identificaron los grupos IncFII, IncFIB, IncQ2. Aunque no se detectaron relaxasas MOB, se identificó la relaxasa TrwC con actividad de integrasa en todos los genomas. Además, en el 81.25% (13/16) se encontraron los grupos IncHI2, IncHI2A e IncFIY, como se muestra en la Figura 15.



**Figura 15. Replicones Inc y relaxasas presentes en 16 genomas de *L. adecarboxylata*.** Color rojo: Presencia de genes; Color rosa: Ausencia de genes; \*: Relaxasa TrwC.

Como se mencionó anteriormente, en cada ensamblaje se identificaron 7 contigs, de los cuales, uno correspondía al cromosoma y 6 a los plásmidos. En la Figura 16 se esquematizan los cromosomas de las tres cepas, observándose que en todos se encuentra el gen *fosA<sup>LA2</sup>* a nivel cromosómico. En cada plásmido se realizó la búsqueda de genes de resistencia y módulos de movilización (SSTA, T4CP y oriT), lo que permitió clasificarlos como conjugativos o movilizables, datos que se resumen en la Tabla 12. Los plásmidos fueron nombrados según su tamaño de la siguiente manera: para el genoma de Lac-8, los plásmidos fueron designados como pLA8.1, pLA8\_2, pLA8\_3, pLA8\_4, pLA8\_5 y pLA8\_6; para el genoma de Lac-13, como pLA13\_1, pLA13\_2, pLA13\_3, pLA13\_4, pLA13\_5 y pLA13\_6; y para el genoma de Lac-34, como pLA34\_1, pLA34\_2, pLA34\_3, pLA34\_4, pLA34\_5 y pLA34\_6.

Además, en los tres genomas se realizó la búsqueda de sistemas toxina-antitoxina y se identificaron genes asociados con ocho sistemas de adicción plasmídica: *ccdA-ccdB* (100%), *kacA-ataT* (33.3%), *hipA-hipB* (66.6%), *higA-higB* (66.6%), *relB-relE* (66.6%), *prpA-prpT* (100%), *vagC-vagD* (66.6%), y *mntA-hepT* (33.3%) (Tabla 12).



**Figura 16. Cromosomas de tres genomas de *L. adedecarboxylata*. A) Lac8; B) Lac13; C) Lac34. El gen *fosA*<sup>LA2</sup> se encuentra a nivel cromosómico.**

**Tabla 12. Características de plásmidos identificados *in silico* en tres genomas de *L. adecarboxylata*.**

Cepa	Plásmidos: Tamaño (kb)	Genotipo resistencia	Inc	MOB	oriT	SST4	T4CP	Categoría	SAP
Lac-8	pLA8.1 (278.5 kb)	<i>aac(6')-ib7; aac(6')-lb7; ant(3'')-lla; aph(3'')-lb; aph(3'')-la; aph(6)-ld; mcr-9; bla<sub>SHV</sub>; bla<sub>TEM-1B</sub>; catII; dfra19; qacEΔ1; sul1</i>	IncHI2; IncHI2 A	MOB H	P	P	P	Conjugativo	<i>relB-relE hipA-hipB</i>
	pLA8.2 (168 kb)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	ND	<i>prpA-prpT</i>
	pLA8.3 (107 kb)	<i>aac(6')-ib7; qnrB20; aada2; d fra 12; qacEΔ1; sul1</i>	NP	MOB P	P	P	P	Conjugativo	
	pLA8.4 (62.7 kb),	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	NP	MOB F	NP	NP	NP	Movilizable	<i>kacA-ataT ccdA-ccdB</i>
	pLA8.5 (7.3 kb)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	ND	NP
	pLA8.6 (4.8 kb)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	ND	NP
Lac-13	pLA13.1 (170.4 kb)	<i>aac(6')-ib7; aac(6')-lb7; ant(3'')-lla; aph(3'')-lb; aph(3'')-la; aph(6)-ld; mcr-9; bla<sub>SHV</sub>; bla<sub>TEM-1B</sub>; catII; dfra19; qacEdelta1; sul1</i>	IncHI 2; IncHI 2A	MOB H	P	P	P	Conjugativo	<i>relB-relE hipA-hipB</i>
	pLA13.2 (168 kb)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	ND	<i>higA-higB prpA-prpT vagC-vagD</i>
	pLA13.3 (107 kb)	<i>aac(6')-ib7; qnrB20; aada2; d fra 12; qacEΔ1; sul1</i>	NP	MOB P	P	P	P	SI	NP
	pLA13.4 (62.8 kb),	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	NP	MOB F	NP	NP	NP	Movilizable	NP
	pLA13.5 (7.3 kb)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	ND	NP
	pLA13.6 (4.8 kb)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	ND	NP
Lac-34	pLA34.1 (278.5 kb)	<i>bla<sub>TEM-181</sub>; catII</i>	IncHI 2; IncHI 2A	NP	P	NP	NP	Movilizable	NP
	pLA34.2 (168 kb)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	ND	<i>higA-higB mntA-hepT prpA-prpT vagC-vagD</i>

pLA34.3 (107 kb)	<i>aac(6')- ib7;qnrb20;aada2;d fra 12; qacEΔ1;sul1</i>	NP	MOB P	P	P	P	Conjugativo	NP
pLA34.4 (63 kb),	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	NP	NP	NP	NP	NP	Movilizable	<i>ccdA-ccdB</i>
pLA34.5 (7.3 kb)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	ND	NP
pLA34.6 (4.8 kb)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	ND	NP

Color verde: Características de los plásmidos identificados en el genoma de Lac-8; Color rosa: Características de los plásmidos identificados en el genoma de Lac-13; Color naranja: Características de los plásmidos identificados en el genoma de Lac-34. NP: No presente. P: Presente. ND: No determinado. oriT: Origen de transferencia. SST4: Sistema de secreción tipo IV. T4CP proteína de acoplamiento tipo 4. SAP: Sistemas de adición plasmídica.

## 8 DISCUSIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró en 2021 que la resistencia a los antimicrobianos es una de las diez principales amenazas para la salud pública a las que se enfrenta la humanidad. Entre las principales causas de la aparición de microorganismos farmacorresistentes, destaca el uso inadecuado y excesivo de antimicrobianos (OMS, 2021).

En este contexto, la OMS ha establecido la necesidad de identificar y actualizar periódicamente los patógenos bacterianos clasificados en categorías crítica, alta y media en función de su impacto en salud pública (Anexo 6). Las bacterias gram-negativas resistentes a los antibióticos lideran estas listas, con particular énfasis en enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación y a carbapenémicos (OMS, 2024).

En años recientes, el número de reportes de cepas resistentes sobre el género *Leclercia* ha aumentado significativamente, aunque persisten importantes vacíos en el conocimiento acerca de este microorganismo y su interacción con el hospedero en los niveles tanto clínico como molecular. En particular, *L. adecarboxylata*, originalmente descrita como una bacteria ubicua y sensible a los antibióticos, ha emergido en la última década como un patógeno multirresistente productor de BLEEs, como las cepas reportadas por Mazzariol *et al.*, 2003, Shin *et*

*al.*, 2012, Akinbami *et al.*, 2018, Alosaimi *et al.*, 2020 y más recientemente cepas productoras de carbapenemasas (Papagiannitsis *et al.*, 2013, Sun *et al.*, 2015, Riazzi *et al.*, 2017, Garza-Gonzales *et al.*, 2021).

En este trabajo se analizaron cepas y genomas de *L. adecarboxylata* provenientes de un brote multihospitalario registrado en 2019, el cual representa la primera descripción de infecciones por dicha bacteria en México (Garza-González *et al.*, 2021). Este brote se suma al reportado en Colombia por Correa *et al.*, 2012, pero asociado a la contaminación de viales de heparina, en donde también tuvo protagonismo *L. adecarboxylata*. Continuando con el trabajo previamente desarrollado en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (Pacheco-Flores, 2021), se complementó el análisis de las cepas del brote con la búsqueda de genes asociados con la resistencia antimicrobiana y la virulencia, así como la caracterización parcial de los plásmidos que portan estas cepas multirresistentes.

El análisis cuantitativo realizado mediante pruebas de concentración mínima inhibitoria según los estándares del CLSI 2024 permitió relacionar la presencia del gen *bla<sub>NDM-1</sub>* con los niveles de resistencia a antibióticos carbapenémicos y comprender el mecanismo de resistencia de las cepas. Todas las cepas mostraron una CMI de 32 µg/mL para meropenem; sin embargo, se observaron variaciones en la CMI para imipenem. Debido a estas variaciones y de acuerdo con la literatura, se evaluó la contribución de las bombas de eflujo en la resistencia a los carbapenémicos. Este hallazgo es consistente con estudios previos como el de Sánchez-Carbonel *et al.* 2021, en el que se analizó el efecto del inhibidor CCCP sobre la resistencia a carbapenémicos en *Acinetobacter baumannii*. En el caso de *L. adecarboxylata*, se observó que un alto porcentaje de las cepas (92.86%) presentó una disminución significativa de la CMI (al menos cuatro veces) para meropenem e imipenem tras la inhibición de las bombas de eflujo, lo que sugiere que estos sistemas contribuyen de manera importante a la resistencia a carbapenémicos. Este estudio es la segunda descripción de la presencia de bombas

de eflujo tipo RND en *Leclercia*, siendo la primera reportada en una cepa de origen animal en China (Cheng *et al.*, 2020).

También se evaluó la susceptibilidad de las cepas de *L. adecarboxylata* frente a colistina, a pesar de no ser un objetivo específico, se identificó genotípicamente la presencia del gen *mcr-9* en los genomas analizados y se emplearon dos metodologías distintas para la determinación cuantitativa de la susceptibilidad. Todas las cepas mostraron una CMI  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ . Este hallazgo sugiere que, a pesar de la presencia del gen *mcr-9* en los genomas, no parece estar involucrado en la resistencia a colistina y es posible que existan mutaciones en la región promotora del gen o en los reguladores de transcripción, que impidan su expresión o función adecuada, lo que podría explicar la falta de actividad observada. Esta hipótesis merece mayor investigación mediante estudios bioinformáticos y análisis genéticos adicionales. Además, determinó la localización del gen en un plásmido conjugativo IncHI2, lo que coincide con lo reportado por Hutton *et al.* 2023, quienes identificaron la presencia de *mcr-9* en un plásmido IncFII de una cepa de *L. adecarboxylata* aislada de una pantalla en una biblioteca. Esto resalta la capacidad de *L. adecarboxylata* de portar genes de resistencia a antibióticos en plásmidos conjugativos, lo que puede facilitar la transferencia horizontal de estos genes a otras bacterias, potenciando la diseminación de genes de resistencia.

Adicionalmente, se investigó la resistencia a fosfomicina mediada por la variante *fosA<sup>LA2</sup>*, con CMI elevadas (512  $\mu\text{g/mL}$ ) en todas las cepas. Este hallazgo, junto con la descripción de otros sistemas de resistencia cromosómicos y plasmídicos, subraya el potencial de estas cepas para propagar genes de resistencia en entornos clínicos y comunitarios, poniendo en alerta a los sistemas de vigilancia epidemiológica (Carroll *et al.*, 2019). El gen *fosA<sup>LA2</sup>* se identificó en los genomas analizados a nivel cromosómico, y este estudio indica los niveles de resistencia que podría otorgar la variante de esta metaloenzima. Cabe mencionar que el uso *in vitro* de fosfomicina está recomendado por el CLSI únicamente contra cepas de *E. coli* aisladas de infecciones urinarias; sin embargo, este antibiótico ha sido empleado como opción en el tratamiento de infecciones por enterobacterias

MDR y por ERC como *K. pneumoniae*, ya que es de los “antibióticos viejos” que han vuelto a llamar la atención por la susceptibilidad vista en cepas MDR (Suay-García, & Pérez-Gracia, 2019).

En 2021, Biggel y colaboradores evaluaron en *K. pneumoniae* ESBL DR09 la CMI para fosfomicina debido a que la cepa albergaba el gen *fosA*<sup>8</sup> en un plásmido IncN-IncR. El gen *fosA*<sup>8</sup> y las secuencias adyacentes eran homólogas a la región cromosómica de *fosA*<sup>8</sup>, pero de *L. adecarboxylata* USDA-ARS-USMARC-60222 (Poirel *et al.*, 2019). *K. pneumoniae* mostró valores altos de CMI (>1024 mg/L), siendo menores los valores encontrados en las cepas de *L. adecarboxylata* de nuestro estudio, lo que podría justificarse, ya que FosA<sup>LA2</sup> es una variante de la familia FosA<sup>8</sup>, datos publicados en 2023 por Barrios-Villa, como complemento de este trabajo (Anexo 7).

Para que una infección produzca enfermedad, las bacterias primero deben librar defensas e incubarse dentro de algún nicho del hospedero. El mecanismo exacto de propagación de *L. adecarboxylata* a los humanos no es del todo claro, pero implica la destrucción de la barrera cutánea por heridas, traumatismos, catéteres o asociaciones con ambientes acuáticos (Adapa *et al.*, 2019; Courtois *et al.* 2020; Keyes *et al.*, 2020; Harper *et al.*, 2022).

En este trabajo se identificaron genes relacionados con la resistencia y virulencia de *L. adecarboxylata* mediante estudio *in silico* en 10 ensamblados. En el análisis bioinformático encontramos genes que podrían estar involucrados en la resistencia a diversas clases de antibióticos, como a aminoglucósidos [*aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib3*, *aadA2*, *aph(3')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *aph(6)-Id*], quinolonas [*aac(6')-Ib-cr*, *qnrB*, *qnrS*], β-lactámicos (*bla<sub>TEM-1B</sub>*, *bla<sub>SHV-12</sub>*), cloranfenicol (*catB4*, *catA2*), sulfonamidas (*sul1*), inhibidores de la síntesis de folato (*dfrA12*, *dfrA19*), colistina (*mcr-9*), carbapenémicos (*bla<sub>NDM-1</sub>*) y componentes de la bomba de eflujo de la familia RND (*acrA*, *acrB*, *acrD*, *acrE*, *acrF*, *acrR*, *acrZ*, *tolC*), con la diferencia que la cepa proveniente del vial de nutrición parenteral (Lac-34) no portaba *bla<sub>SHV-12</sub>*, *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib3*, *aadA2*, *aph(3')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *aph(6)-Id*, *mcr-9*, ni *dfrA19*.

En cuanto a factores de virulencia, se identificaron *in silico* genes asociados con adherencia, motilidad flagelar, formación de biopelículas y captación de hierro, sugiriendo una posible adaptación de *L. adecarboxylata* para colonizar sitios específicos en el hospedero. Estos resultados representan un avance en la comprensión del potencial patogénico de este microorganismo y abren nuevas líneas de investigación sobre su interacción con el hospedero y su capacidad de persistir en el ambiente.

Entre los genes de virulencia destacan los relacionados con la adherencia y el movimiento flagelar como: *fimD*, *flgA*, *fliC*, *fliD*, *flis*, *yst10*, *pilQ*, *pilR*, *nlpj*, *csgA*, *csgC*, *hcpA*, *hcpB*, *hcpC*, genes que podrían estar involucrados con la expresión de proteínas de superficie que les permitan su movimiento y adhesión, el cual es un paso necesario para la patogenicidad bacteriana en otras enterobacterias, lo que podría hablar de una adaptación de estas cepas para invadir y colonizar otros ambientes. También se determinó el gen *ibeB* que codifica para una proteína formadora de poros, la cual pudiera estar involucrada con su capacidad de invasión de tejidos, como se ha reportado en cepas de *E. coli* O161-K99-STa (Ling *et al.*, 2016).

De la misma forma se encontraron genes relacionados con la captación de hierro (sideróforos) presentes en bacterias patógenas como mecanismo de adquisición de hierro en el hospedero tras una infección. Algunos de ellos como como *iutA* reportado en *E. coli* uropatógena; *chuA* y *chuS* en *E. coli* enterohemorrágica O157:H7; *chuS* en el género *Yersinia* y *pvdH* reportada en *Pseudomonas* spp. para sintetizar pioverdina. A la fecha, dentro del género *Leclercia* no existen reportes de factores de virulencia, mucho menos, en relación con sideróforos (Vandenende, *et al.*, 2004; Lyles, & Eichenbaum, 2018; Ikeda *et al.*, 2021; Kholik *et al.*, 2024). El único trabajo que habla de determinantes de la virulencia en las cepas de *L. adecarboxylata* es muy reciente, en el cual reportan genes relacionados con la adherencia como: *fimH*, *afa-draBC*, *sfaD/focC*, *papC*, *papG-II*, *fliCD*; relacionados con evasión inmune: *agn43*, con la adquisición de hierro: *iroN*, y que codifiquen a toxinas: *hlyA*, *vata*, *ibeA* y *cnf-1* (Yescas-Zazueta *et al.*, 2024). Esto representa un

campo amplio de investigación para el género, lo que sugiere realizar múltiples análisis para determinar que los genes encontrados tienen alguna implicación con su potencial de patogénesis.

La capacidad de *L. adecarboxylata* de producir biopelículas se ha dejado ver en los últimos años, este estudio representa otra base para continuar con la investigación de estas cepas clínicas en relación con la producción de biopelículas bajo diversas condiciones. A partir de 19 cepas de *L. adecarboxylata* se comprobó la alta capacidad que tienen de producir biopelículas estáticas en monocultivo. A diferencia de los recientes reportes, en donde se asocia con otros géneros bacterianos para producir biopelículas, como lo reportado por Kumawat y colaboradores en 2019, donde solo analizaron el comportamiento de *L. adecarboxylata* LSE-1 y *Bradyrhizobium* sp LSBR-3 como bacterias endófitas prometedoras en el crecimiento y la formación de biopelículas en cultivo mixto para la producción de fosfatasas y deshidrogenasa que ayudan a la descomposición de materia orgánica y mejoran la fertilidad del suelo. Así mismo, Haque y colaboradores en 2022, evaluaron la capacidad de 65 rizobacterias para producir biopelículas, de las cuales 21 exhibieron esta característica, encontrando por secuenciación a géneros como *G. arilaitensis*, *E. cloacae*, *E. acetylicum*, *S. saprophyticus*, *P. poae*, *B. subtilis* y *L. adecarboxylata* (ESK12) y los clasificaron como aislados halotolerantes formadores de biopelículas.

Didouh en 2023 reportó la capacidad de bacterias para formar biopelículas en acero inoxidable en una planta láctea en Argelia. Identificaron 59 aislamientos gram-positivos y 24 aislamientos gram-negativos en donde se destaca la capacidad limitada de *L. adecarboxylata* para producir biopelículas en monocultivo y como un indicador de un saneamiento deficiente. Otro reporte de la presencia de *L. adecarboxylata* en biopelículas mixtas se describió en polihidroxicanoatos recuperados en un reactor de lecho móvil para el tratamiento con naranja ácido 7. Se identificaron cuatro cepas principales: *L. adecarboxylata*, *L. citreum*, *B. cereus* y *R. mucilaginoso*, las cuales exhiben características de producir biopelículas densas y capacidad de biorremediación (Chang *et al.*, 2024)

Además, en el periodo de 2018-2021, en la cruz Roja de Rockville, E.U. ocurrieron transfusiones de unidades plaquetarias contaminadas con *Acinetobacter spp.*, *S. saprophyticus* y *L. adecarboxylata* o una combinación de estas, razón por la que evaluaron a estas bacterias en monocultivos y cultivos mixtos. Los cultivos que involucraron a *L. adecarboxylata* aumentaron la producción de biopelícula demostrando en este estudio la capacidad de este género para formar esta estructura (Hapip *et al.*, 2024). Finalmente, Yescas-Zazueta y colaboradores en 2024, también describen la capacidad de *L. adecarboxylata* como un rasgo característico del género, ya que identificaron la prevalencia de dicha característica en cepas de origen clínico y ambiental.

Por último, se realizó una caracterización parcial de los plásmidos mediante análisis *in vitro* e *in silico*, identificando replicones de tipo IncH, IncHI2A, IncF, IncFIIY, IncQ2, ColE; relaxasas MOBH, MOBP, MOBF, y TrwC, lo que coincide con lo reportado por Garza-Gonzales y colaboradores en 2021, quienes mencionan la presencia de grupos de incompatibilidad IncFII, IncH12 e IncH12A en el análisis del genoma de tres cepas MDR de *L. adecarboxylata* provenientes del brote en México.

En el presente estudio, también se identificaron grupos de incompatibilidad que pertenecen a plásmidos colicinogénicos (IncColE), estos plásmidos se han asociado en *E. coli* con la diseminación de genes *qnrB*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>CMY</sub>*, *sul1 y 2*, *tetA* y *strA/B*, lo que concuerda con el genotipo de resistencia encontrado en las cepas de *L. adecarboxylata* (Alvarado *et al.*, 2012; Rozwandowicz *et al.*, 2018). Los replicones IncF, IncFIIY, IncH, IncHI2A, MOBH, MOBP y MOBF han sido reportados en plásmidos conjugativos en *E. coli* y otras enterobacterias asociados con la presencia y la propagación de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos (MOB-C, MOB-F, MOB-H y MOB-P) (Carattoli, 2009; Alvarado *et al.*, 2012; Garcillán-Barcia *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015; Rozwandowicz *et al.*, 2018), lo cual es de importancia debido a que estas cepas son portadoras de genes de resistencia a antibióticos carbapenémicos, por lo tanto tienen la capacidad de diseminar estos genes por conjugación.

Por último, se identificaron genes que codifican para los sistemas toxina-antitoxina: *ccdA-ccdB*, *prpA-prpT*, *relB-relE*, *hipA-hipB*, *kacA-ataT*, *higA-higB*, *vagC-vagD* y *mntA-hepT*, resultados que se suman a lo reportado por Yezcas-Zazueta y colaboradores en 2024, quienes reportan la presencia de los sistemas ParD-E, Hok-Sok, VagC-D, CcdA-B, PndA-C y PemK-A, en cepas de *L. adecarboxylata* en México. Estos sistemas les confieren a los plásmidos, la capacidad de persistir en las bacterias asegurando su prevalencia y diseminación (Schaufler *et al.*, 2013). Estos resultados resaltan el riesgo potencial de diseminación de genes de resistencia mediante conjugación, subrayando la importancia de una vigilancia constante y estrategias integrales para mitigar la propagación de bacterias potencialmente patógenas multirresistentes, como las cepas de *L. adecarboxylata* descritas en este estudio.

## 9 CONCLUSIONES

1. Este estudio muestra cepas de *L. adecarboxylata* MDR provenientes de un brote hospitalario con una CMI importante a carbapenémicos (8,16 y 32 µg/mL), así como la presencia de una bomba de eflujo de la familia RND que pudiera estar involucrada en la resistencia a antibióticos carbapenémicos.
2. El gen *mcr-9* encontrado en los genomas de *L. adecarboxylata* parece no tener actividad para la resistencia a las polimixinas, ya que todas las cepas son sensibles a colistina.
3. En los genomas de *L. adecarboxylata* se identificó la variante *fosA<sup>LA2</sup>*, la cual puede tener una participación en la resistencia a fosfomicina con una CMI de 512 µl/mL. El gen *fosA<sup>LA2</sup>* se encuentra a nivel cromosómico, lo que cual, puede contribuir significativamente a la creciente preocupación por la resistencia antimicrobiana.
4. Este estudio identifica genes que podrían participar en el movimiento, adhesión, en su capacidad de invasión y es el primer reporte de determinantes en la adquisición de hierro de *L. adecarboxylata*, lo que proporciona bases de su mecanismo de virulencia.

5. Se evidenció la capacidad de *L. adecarboxylata* para producir biopelículas, evento que junto con los genes de resistencia que alberga en plásmidos conjugativos y movilizables, hacen que esta bacteria represente una señal de alerta epidemiológica y resalta la necesidad de ser vigilada y monitoreada.
6. Las relaxasas más frecuentes en los plásmidos que portan las cepas de *L. adecarboxylata* fueron de la familia MOB-F y MOB-P, seguida de MOB-H e *in silico* la relaxasa TrwC.
7. Los grupos de incompatibilidad IncF, ColE y ColETp se identificaron *in vitro* en todas las cepas de *L. adecarboxylata*, mientras que los grupos IncHI2 e IncHI2A fueron los mayormente encontrados en el estudio bioinformático y son plásmidos con potencial de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos de última elección terapéutica, lo cual representa una señal de alerta epidemiológica en los hospitales, principalmente para pacientes inmunocomprometidos.

## 10 PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos para medir la actividad de otras bombas de eflujo y analizar su relación con la resistencia observada a otras clases de antibióticos.
- Realizar ensayos de las cepas de *L. adecarboxylata* en modelos *in vitro* e *in vivo* para evaluar la virulencia de estas cepas y su interacción con el sistema inmunológico de un hospedador como *Galleria mellonella*.
- Investigar y estimar el nivel de supervivencia en macrófagos y en otros modelos *in vivo* de cepas de *L. adecarboxylata*.
- Realizar ensayos para evaluar la importancia de los sideróforos en la patogénesis de *L. adecarboxylata*.
- De acuerdo con los ensayos de virulencia y supervivencia, proponer un posible mecanismo de patogénesis en cepas de *L. adecarboxylata* MDR.
- Investigar como contribuye a la resistencia y a la virulencia la capacidad de *L. adecarboxylata* para formar biopelículas estáticas y aéreas en presencia de diferentes clases de antibióticos.

- Evaluar la integridad de las regiones promotoras del gen *mcr-9* y realizar análisis bioinformáticos para posteriormente clonar el gen en *E. coli* y evaluar si en otro vector confiere resistencia a colistina.
- Comparar los plásmidos que acarrean estas cepas con otros plásmidos encontrados dentro del género en otros países u orígenes.
- Comparar la presencia de genes de virulencia en secuencias de *L. adecarboxylata* depositadas en bases de datos provenientes de diversos orígenes con las secuencias de los genomas de las cepas de este estudio.
- Realizar estudios epidemiológicos en México para determinar la prevalencia y la distribución de cepas de *L. adecarboxylata* en diferentes entornos, para realizar estudios de rastreo genético.
- Utilizar técnicas de tipificación molecular, como MLST (Multi-Locus Sequence Typing) y análisis de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) para analizar cepas de *L. adecarboxylata* aisladas de diferentes fuentes y tratar de comprender su adaptación a entornos clínicos.
- Investigar la eficacia de nuevos antimicrobianos o combinaciones de estos en cepas de *L. adecarboxylata* resistentes a carbapenémicos.
- Evaluar la capacidad de *L. adecarboxylata* para metabolizar diferentes sustratos (como metales pesados) en procesos de biorremediación.

## 11 REFERENCIAS:

- Adapa S., Konala V., Nawaz F., Javed T., Dhingra H., Gutiérrez I.A. & Ramírez M.L. (2019). Peritonitis from *Leclercia adecarboxylata*: An emerging pathogen. 7(4): 829–831. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1002/ccr3.2094>.
- Alav, I., Sutton, J. M., & Rahman, K. M. (2018). Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73(8), 2003–2020. <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>.
- Akinbami, O., Olofinsae, s. & Ayeni, F. (2018), Prevalence of extended spectrum betalactamase and plasmid mediated quinolone resistant genes in strains of *Klebsiella pneumonia*, *Morganella morganii*, *Leclercia adecarboxylata* and *Citrobacter freundii* isolated from poultry in. South Western Nigeria. PeerJ6:e5053;DOI10.7717/peerj.5053.
- Alcock *et al.* 2023. CARD 2023: Expanded Curation, Support for Machine Learning, and Resistome Prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 51, D690-D699.
- Alosaimi RS, Muhmmmed Kaaki M. (2020). Catheter-Related ESBL-Producing *Leclercia adecarboxylata* Septicemia in Hemodialysis Patient: An Emerging Pathogen? *Case Rep Infect Dis*.1–3. 10.1155/2020/7403152.
- Alrowais, H., McElheny, C. L., Spychala, C. N., Sastry, S., Guo, Q., Butt, A. A., & Doi, Y. (2015). *Fosfomycin Resistance in Escherichia coli, Pennsylvania, USA. Emerging Infectious Diseases*, 21(11), 2045–2047. doi:10.3201/eid2111.150750.
- Alvarado, A., Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2012,). A Degenerate Primer MOB Typing (DPMT) Method to Classify Gamma-Proteobacterial Plasmids in Clinical and Environmental Settings. *PLoS ONE*. Public Library of Science (PLoS). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0040438>.
- Ambler R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 289(1036), 321–331. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>.
- Antimicrobial Agents Division. National and Regional Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance. National Institute of Infectious Diseases. Servicio Antimicrobianos INEI. Intituto Malbrán. (2017). Protocolos Colistin. Argentina. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/2017/09/protocolos-colistin>.
- Barrios-Villa, E., Pacheco-Flores, B., Lozano-Zaraín, P., Del Campo-Ortega, R., de Jesús Ascencio-Montiel, I., González-León, M., Camorlinga-Ponce, M., Gaytán Cervantes, F. J., González Torres, C., Aguilar, E., González Ibarra, J., Torres López, F. J., Rosas-Vargas, H., González-Bonilla, C. R., & del Carmen Rocha-Gracia, R. (2023). Genomic insights of *Leclercia*

- adecarboxylata* strains linked to an outbreak in public hospitals in Mexico. *Genes and Genomics*, 45(5), 569-579. <https://doi.org/10.1007/s13258-022-01348-4>.
- Bertelli, C., Laird, M. R., Williams, K. P., Simon Fraser University Research Computing Group, Lau, B. Y., Hoad, G., Winsor, G. L., & Brinkman, F. S. L. (2017). IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic acids research*, 45(W1), W30–W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx343>.
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., Malhotra-Kumar, S., ... Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 75(12), 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.
- Bellich, B., Lagatolla, C., Tossi, A., Benincasa, M., Cescutti, P., & Rizzo, R. (2018). Influence of bacterial biofilm polysaccharide structure on interactions with antimicrobial peptides: A study on *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061685>.
- Biggel, M., Zurfluh, K., Treier, A., Nüesch-Inderbilen, M., & Stephan, R. (2021). Characteristics of *fosA*-carrying plasmids in *E. coli* and *Klebsiella spp.* isolates originating from food and environmental samples. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 76(8), 2004–2011. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab119>.
- Blankenberg, D., Coraor N., Von Kuster, G., Taylor, J. & Nekrutenko. A. (2011). Integrating diverse databases into an unified analysis framework: a Galaxy approach. *Database Oxford*. 29;2011:bar011. doi:10.1093/database/bar011.
- Brovedan M. A., Cameranesi M. M., Limansky A. S., Morán-Barrio J., Marchiaro P., Repizo G. D. (2020). What do we know about plasmids carried by members of the *Acinetobacter* genus? *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36 (8), 109. doi: 10.1007/s11274-020-02890-7.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of microbiological methods*, 63(3), 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.018>.
- Carattoli A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(6), 2227–2238. <https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>.
- Carreón-Leon, E., (2019). Tesis de Maestría. Estudio molecular de la resistencia y virulencia de Cepas de *Escherichia coli* productoras de β-lactamasas de espectro extendido aisladas de vegetales crudos. Posgrado en Microbiología,

- Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldemann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., & Wiedmann, M. (2019). Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype *Typhimurium* Isolate. *mBio*, *10*(3), e00853-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00853-19>.
- Castellanos T., Marshal A. & Rodríguez D. (2014). Mechanisms of resistance to beta-lactams in Gram-negative bacteria. *Revista Cubana de Salud Pública*. *40*(1):129-135.
- Cattoir V., & Guérin, F. (2018). *How is fosfomycin resistance developed in Escherichia coli? Future Microbiology*. doi:10.2217/fmb-2018-0294
- Cercenado E. (2015). Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio. *Quimioterapia*. *28*(1):8-11.
- CLSI. (2024). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. (34th ed.): Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI Supplement M100.
- Chang, J. Y., Syauqi, T. A., Sudesh, K., & Ng, S. L. (2024). Insights into biofilm development on polyhydroxyalkanoate biofilm carrier for anoxic azo dye decolourization of acid orange 7. *Bioresource technology*, *393*, 130054. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.130054>
- Cheng, C., Ying, Y., Zhou, D., Zhu, L., Lu, J., Li, A., ... Zhu, M. (2020). *RamA, a transcriptional regulator conferring florfenicol resistance in Leclercia adecarboxylata R25. Folia Microbiologica*.doi:10.1007/s12223-020-00816-2.
- Correa AL., Mazo LM., Valderrama MP., Restrepo A. & Jaimes J. (2012). Descripción de un brote de bacteriemia por *Leclercia adecarboxylata* probablemente asociado al uso de viales contaminados de heparina. *Asociación colombiana de infectología*.*16*(2):117-121.
- Cortés-Cortés, G., (2016). Tesis Doctoral. Caracterización de la resistencia antimicrobiana y tipificación molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes hospederos en Puebla, México. Posgrado en Microbiología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Courtois, M. F., Hernando, A., Jokanovich, M. V., Paruelo, F., & Plata, F. (2020). Colonización de catéter por *Leclercia adecarboxylata*: reporte de un caso pediátrico [Catheter colonization by *Leclercia adecarboxylata*: a pediatric case report]. *Archivos argentinos de pediatría*, *118*(4), e418–e420. <https://doi.org/10.5546/aap.2020.e418>.
- Darling, A. C., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T. (2004). Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome research*, *14*(7), 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>.
- De Angelis, G., Del Giacomo, P., Posteraro, B., Sanguinetti, M., & Tumbarello, M. (2020). *Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of  $\beta$ -*

- Lactam Resistance in Enterobacteriaceae. International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 5090. doi:10.3390/ijms21145090.
- Davenport, P., & Land, K. J. (2007). *Isolation of Leclercia adecarboxylata from the blood culture of an asymptomatic platelet donor. Transfusion*, 47(10), 1816–1819. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01397.x.
- Didouh, N., Khadidja, M., Campos, C., Sampaio-Maia, B., Boumediene, M. B., & Araujo, R. (2023). Assessment of biofilm, enzyme production and antibiotic susceptibility of bacteria from milk pre- and post-pasteurization pipelines in Algeria. *International journal of food microbiology*, 407, 110389. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110389>.
- Espinoza, Carlos, Cabedo, María José, González, Belén, & Ramírez, Claudia. (2022). *Leclercia adecarboxylata. Revista chilena de infectología*, 39(3), 319–320. <https://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182022000200319>.
- EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2024). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0. Disponible en: [v\\_14.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/Download_center/v_14.0/Breakpoint_Tables.pdf) (eucast.org).
- Ewing, W. H., & Fife, M. A. (1972). *Enterobacter agglomerans (Beijerinck) comb. nov. (the Herbicola-Lathyri Bacteria). International Journal of Systematic Bacteriology*, 22(1), 4–11. doi:10.1099/00207713-22-1-4.
- Falagas, M. E., Tansarli, G. S., Karageorgopoulos, D. E., y Vardakas, K. Z. (2014). Muertes atribuibles a infecciones por *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos. *Emerger. Infecta. Dis.* 20, 1170–1175. doi:10.3201/eid2007.121004.
- García-Fernández, A., Chiaretto, G., Bertini, A., Villa, L., Fortini, D., Ricci, A., & Carattoli, A. (2008). Multilocus sequence typing of Inc11 plasmids carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1229–1233. doi:10.1093/jac/dkn131.
- García-Fulgueiras, V., Seija, V., Aguerrebere, P., Cordeiro, N. F., & Vignoli, R. (2014). First report of a clinical isolate of *Leclercia adecarboxylata* harbouring multiple resistance genes in Uruguay and review of the literature. *Journal of global antimicrobial resistance*, 2(2), 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.01.002>.
- Garcillán-Barcia, M. P., Ruiz del Castillo, B., Alvarado, A., de la Cruz, F., & Martínez-Martínez, L. (2015). *Degenerate primer MOB typing of multiresistant clinical isolates of E. coli uncovers new plasmid backbones. Plasmid*, 77, 17–27. doi:10.1016/j.plasmid.2014.11.00.
- Garcillán-Barcia, M. P., Redondo-Salvo, L., & de la Cruz, F. (2019). MOBscan: Automated Annotation of MOB Relaxases. *Methods in Molecular Biology*. Springer US. [http://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7\\_21](http://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_21).

- Garza-González, E., Bocanegra-Ibarias, P., Rodríguez-Noriega, E., González-Díaz, E., Silva-Sanchez, J., Garza-Ramos, U., Contreras-Coronado-Tovar, I. F., Santos-Hernández, J. E., Gutiérrez-Bañuelos, D., Mena-Ramirez, J. P., Ramírez-De-Los-Santos, S., Camacho-Ortiz, A., & Morfín-Otero, R. (2021). Molecular investigation of an outbreak associated with total parenteral nutrition contaminated with NDM-producing *Leclercia adecarboxylata*. *BMC infectious diseases*, 21(1), 235. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-05923-0>.
- Gavini F., Mergaert J., Beji A., Mielcarek C., Izard D., Kersters K., De Ley J. (1989). Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing & Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov.. *Int J Syst Bacteriol* 39, 337–345.
- Geffen, Y., Adler, A., Paikin, S., Khabra, E., Gorenshtein, S., Aronov, R., & Carmeli, Y. (2013). *Detection of the plasmid-mediated KPC-2 carbapenem-hydrolysing enzyme in three unusual species of the Enterobacteriaceae family in Israel. Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(3), 719–720. doi:10.1093/jac/dks443.
- González-Arenas E., González-Castillo Z., Gómez-Guillermoprieto L. & Ordóñez-Gutiérrez E. (2011). Sepsis nosocomial por *Leclercia adecarboxylata* en un lactante. *Acta pediátrica de México*. 32(5):1-4.
- González-Meléndez R. y Jaimes-González L. (2023). Diagnóstico microbiológico de *Leclercia adecarboxylata*. Universidad Nacional Autónoma de México; Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Grantham, W. J., Funk, S. S., & Schoenecker, J. G. (2015). *Leclercia adecarboxylata* Musculoskeletal Infection in an Immune Competent Pediatric Patient: An Emerging Pathogen? *Case reports in orthopedics*, 2015, 160473. <https://doi.org/10.1155/2015/160473>
- Guerra, M. E. S., Destro, G., Vieira, B., Lima, A. S., Ferraz, L. F. C., Hakansson, A. P., Darrieux, M., & Converso, T. R. (2022). *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Their Role in Disease Pathogenesis. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 12: Frontiers Media. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.877995>.
- Hapip, C. A., Fischer, E., Feldman, T. P., & Brown, B. L. (2024). Formation of Single-Species and Multispecies Biofilm by Isolates from Septic Transfusion Reactions in Platelet Bag Model. *Emerging infectious diseases*, 30(9), 1819–1828. <https://doi.org/10.3201/eid3009.240372>.
- Haque, M. M., Biswas, M. S., Mosharaf, M. K., Haque, M. A., Islam, M. S., Nahar, K., Islam, M. M., Shozib, H. B., Islam, M. M., & Ferdous-E-Elahi (2022). Halotolerant biofilm-producing rhizobacteria mitigate seawater-induced salt stress and promote growth of tomato. *Scientific reports*, 12(1), 5599. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09519-9>.

- Harper, H., Logan, J., Kubat, R., & Jones, M. (2022). *Leclercia adecarboxylata* catheter-related bacteraemia in an immunocompromised patient. *BMJ case reports*, 15(3), e247496. <https://doi.org/10.1136/bcr-2021-247496>.
- Hernández-Ramírez, K. C., Chávez-Jacobo, V. M., Valle-Maldonado, M. I., Patiño-Medina, J. A., Díaz-Pérez, S. P., Jácome-Galarza, I. E., ... Ramírez-Díaz, M. I. (2017). *Plasmid pUM505 encodes a Toxin–Antitoxin system conferring plasmid stability and increased Pseudomonas aeruginosa virulence. Microbial Pathogenesis*, 112, 259–268. doi:10.1016/j.micpath.2017.09.060.
- Hillman, Tatiana. (2022). Reducing bacterial antibiotic resistance by targeting bacterial metabolic pathways and disrupting RND efflux pump activity. *Iberoamerican Journal of Medicine*, 4(1), 60-74. Epub 22 de enero de 2024. <https://dx.doi.org/10.53986/ibjm.2022.0008>.
- Hönemann, M., Viehweger, A., Dietze, N., Johnke, J., & Rodloff, A. C. (2022). *Leclercia pneumoniae* sp. nov., a bacterium isolated from clinical specimen in Leipzig, Germany. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 72(3), 10.1099/ijsem.0.005293. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005293>.
- Hutton, W., Allman, E., McKeown, C., Singer, A. C., & Roberts, A. P. (2023). Complete genome sequence of mcr-9 containing *Leclercia adecarboxylata*. *Microbiology resource announcements*, 12(9), e0048123. <https://doi.org/10.1128/MRA.00481-23>.
- Ikeda, M., Kobayashi, T., Fujimoto, F. et al. (2021). The prevalence of the *iutA* and *ibeA* genes in *Escherichia coli* isolates from severe and non-severe patients with bacteremic acute biliary tract infection is significantly different. *Gut Pathog* 13, 32 <https://doi.org/10.1186/s13099-021-00429-1>.
- Kholik, K., Sukri, A., Riwu, K. H. P., Kurniawan, S. C., & Khairullah, A. R. (2024). Detección de la *chuA* gen que codifica las especies enterohemorrágicas invasoras *Escherichia coli* O157:H7 utilizando qPCR en muestras de heces de caballo en la isla de Sumbawa, Indonesia. *Revista veterinaria abierta*, 14(4), 1051–1058. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2024.v14.i4.12>.
- Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*, 12(1), 19-36. doi:10.1016/0147-619X(84)90063-5.
- Keren, Y., Keshet, D., Eidelman M., Geffen Y., Raz-Pasteur A & Husseincls K. (2014). *Leclercia adecarboxylata* a New and Unfamiliar Marine Pathogen?. *Journal of Clinical Microbiology*. 52(5):1775-1776.
- Keys, J., Johnson, E. P., Epelman, M., Cadilla, A., & Ali, S. (2020). *Leclercia adecarboxylata*: An Emerging Pathogen Among Pediatric Infections. *Cureus*, 12(5), e8049. <https://doi.org/10.7759/cureus.8049>.
- Kumawat, K.C., Sharma, P., Singh, I. et al. (2019). Co-existence of *Leclercia adecarboxylata* (LSE-1) and *Bradyrhizobium* sp. (LSBR-3) in nodule niche for

- multifaceted effects and profitability in soybean production. *World J Microbiol Biotechnol* 35, 172 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2752-4>
- Leclerc H. (1962). *Biochemical study of pigmented Enterobacteriaceae*. Ann. Inst. Pasteur Paris.102:726–741.
- Legese, M. H., Asrat, D., Swedberg, G., Hasan, B., Mekasha, A., Getahun, T., Worku, M., Shimber, E. T., Getahun, S., Ayalew, T., Gizachew, B., Aseffa, A., & Mihret, A. (2022). Sepsis: emerging pathogens and antimicrobial resistance in Ethiopian referral hospitals. *Antimicrobial resistance and infection control*, 11(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s13756-022-01122-x>.
- Ling, C., Jiang, J., Song, K., Zhang, K., Shi, Y., Feng, G., Ni, H., Zhu, L., Wang, P., & Yan, G. (2016). *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica*, 56(6), 974–982.
- Li, R., Xie, M., Dong, N., Lin, D., Yang, X., Wong, M. H. Y., et al. (2018). Efficient generation of complete sequences of MDR-encoding plasmids by rapid assembly of MinION barcoding sequencing data. *GigaScience* 7, 1–9. doi: 10.1093/gigascience/gix132.
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., & Yang, J. (2019). VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic acids research*, 47(D1), D687–D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>
- Lyles, K. V., & Eichenbaum, Z. (2018). Del huésped hemo al hierro: el espectro en expansión de enzimas degradadoras del hemo utilizadas por las bacterias patógenas. *Fronteras en microbiología celular y de infecciones*, 8, 198. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00198>.
- Maddock, D., Arnold, D., Denman, S., & Brady, C. (2022). *Description of a novel species of Leclercia, Leclercia tamurae sp. nov. and proposal of a novel genus Sylvania gen. nov. containing two novel species Sylvania hatchlandensis sp. nov. and Sylvania confinis sp. nov. isolated from the rhizosphere of oak*. *BMC microbiology*, 22(1), 289. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02711-x>.
- Mattioni Marchetti, V., Hrabak, J., & Bitar, I. (2023). Fosfomicin resistance mechanisms in *Enterobacterales*: an increasing threat. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1178547. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1178547>.
- Malik, K., Davie, R., Withers, A., Faisal, M., & Lawal, F. (2021). A case of *Leclercia adecarboxylata* endocarditis in a 62-year-old man. *IDCases*, 24, e01091. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01091>.
- Mayfield C., Haglin J., Konda S., Tejwani M. & Egol K. (2019). Post-operative Orthopedic Infection with Monomicrobial *Leclercia adecarboxylata*. 9(3):1-4. doi: 10.2106 / JBJS.CC.18.00297.
- Mazzariol, A., Zuliani, J., Fontana, R. y Cornaglia, G. (2003). Aislamiento a partir de hemocultivo de una cepa de *Leclercia adecarboxylata* que produce una

- betalactamasa de espectro extendido SHV-12. *Revista de microbiología clínica*, 41 (4), 1738-1739. doi: 10.1128 / jcm.41.4.1738-1739.2003.
- Menichini, M., Lari, N. & Rindi, L. (2020). Effect of efflux pump inhibitors on the susceptibility of *Mycobacterium avium* complex to clarithromycin. *J Antibiot* **73**, 128–132. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0245-1>.
- Merza, N., Lung, J., Taha, A., Qasim, A., Frost, J., & Naguib, T. (2019). *Leclercia adecarboxylata* Cholecystitis with Septic Shock in Immunocompetent Patient. *Case reports in critical care*, 2019, 5057071. <https://doi.org/10.1155/2019/5057071>.
- Michael J. Satlin, James S. Lewis II, Melvin P. Weinstein, Jean Patel, and Romney M. Humphries; Gunnar Kahlmeter, Christian G. Giske, and John Turnidge (for EUCAST). *Clin Inf Dis* (2020); 71: e523-9.
- Miller, L. M., Silver, C. D., Herman, R., Thomas, G. H., Krauss, T. F., & Johnson, S. D. (2019). Surface-Bound Antibiotic for the Detection of  $\beta$ -Lactamases. *ACS Applied Materials and Interfaces*. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b05793>.
- Mnif, B., Vimont, S., Boyd, A., Bourit, E., Picard, B., Branger, C., ... Arlet, G. (2010). *Molecular characterization of addiction systems of plasmids encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1599–1603. doi:10.1093/jac/dkq181.
- Morejon M. (2012) Carbapenemasas, una amenaza actual. *Rev Cub Med Int Emerg*. 11(4):2613-2618.
- Muresu, R., Maddau, G., Delogu, G. *et al*. Bacteria colonizing root nodules of wild legumes exhibit virulence-associated properties of mammalian pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek* 97, 143–153 (2010). <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9396-6>.
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R. A., Dabos, M. L., Zavala, A., Dortet, L., Retailleau, P., & Iorga, B. I. (2017). Beta-lactamase database (BLDB) - structure and function. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32(1), 917–919. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2021). Resistencia a los antimicrobianos. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2024). La OMS pone al día la lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>.
- Opazo C, Andrés, Mella M, Sergio, Domínguez Y, Mariana, Bello T, Helia, & González R, Gerardo. (2009). Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a antimicrobianos. *Revista chilena de*

- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., et al. (2014). The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 42, D206–D214. doi: 10.1093/nar/gkt1226.
- Pacheco-Flores B., (2021). Tesis de Licenciatura. Relación clonal y caracterización molecular de la resistencia de *Leclercia adecarboxylata* aislada de hospitales de Guadalajara, Jalisco. Posgrado en Microbiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Papagiannitsis, C. C., Študentová, V., Hrabák, J., Kubele, J., Jindrák, V., & Žemličková, H. (2013). Isolation from a Nonclinical Sample of *Leclercia adecarboxylata* Producing a VIM-1 Metallo- $\beta$ -Lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), 2896–2897. doi:10.1128/aac.00052-13.
- Pérez-Varela, M., Corral, J., Aranda, J., & Barbé, J. (2019). Roles of Efflux Pumps from Different Superfamilies in the Surface-Associated Motility and Virulence of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(3), e02190-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02190-18>.
- Poirel L., Vuillemin X., Kieffer N., Mueller L., Descombes M., & Nordmann P. (2019). Identification of FosA8, a Plasmid-Encoded Fosfomicin Resistance Determinant from *Escherichia coli*, and Its Origin in *Leclercia adecarboxylata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 63(11).doi:10.1128/AAC.01403-19.
- Riazzo, C., López-Cerero, L., Rojo-Martín, M. D., Hoyos-Mallecot, Y., Fernández-Cuenca, F., Martín-Ruíz, J. L., ... Navarro-Marí, J. M. (2017). *First report of NDM-1-producing clinical isolate of Leclercia adecarboxylata in Spain. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(3), 268–270. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.04.013.
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73(5), 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>.
- Sánchez-Carbonel, A., Mondragón, B., López-Chegne, N., Pena-Tuesta, I., Huayan Dávila, G., Blichtein, D., Carrillo-Ng, H., Silva-Caso, W., Aguilar-Luis, M., Del ValleMendoza, J., (2021). The effect of the efflux pump inhibitor carbonyl cyanide mchlorophenylhydrazone (CCCP) on the susceptibility to imipenem and cefepime in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 16, e0259915.
- Schaufler, K., Wieler, L. H., Semmler, T., Ewers, C., & Guenther, S. (2013). ESBL-plasmids carrying toxin-antitoxin systems can be "cured" of wild-type

- Escherichia coli using a heat technique. *Gut pathogens*, 5(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-34>
- Secretaría de Salud. (2019). Secretaría de Salud emite aviso preventivo por brote de *Leclercia adecarboxylata*[Internet]. [Fecha de acceso 20 de marzo de 2024]; Disponible en: 183. Secretaría de Salud emite aviso preventivo por brote de *Leclercia adecarboxylata* | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx (www.gob.mx).
- Serra Valdés, Miguel Ángel. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3), 402-419. Recuperado en 06 de septiembre de 2024, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2017000300011&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011&lng=es&tlng=es).
- Shin G., You MJ., Lee H. & Lee CS. (2012). Catheter-Related Bacteremia Caused by Multidrug-Resistant *Leclercia adecarboxylata* in a Patient with Breast Cancer. *Journal of Clinical Microbiology*. 50(9):3129-3132.
- Słoczyńska, A.; Wand, M.E.; Bock, L.J.; Tyski, S.; Laudy, A.E. (2023). Efflux-Related Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Is Associated with Two-Component Regulatory Efflux Systems' Alteration and Insertion of  $\Delta$ AbaR25-Type Island Fragment. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 9525. <https://doi.org/10.3390/ijms24119525>
- Spiegelhauer, M. R., Andersen, P. F., Frandsen, T. H., Nordestgaard, R. L. M., & Andersen, L. P. (2019). *Leclercia adecarboxylata*: a case report and literature review of 74 cases demonstrating its pathogenicity in immunocompromised patients. *Infectious diseases (London, England)*, 51(3), 179–188. <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1536830>.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Bonaventura, G. DI, Djukic, S., Ruzicka, F., & Bonaventura, D. G. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. All Rights Reserved Journal Compilation C, 115, 891–900.
- Suay-García, & Pérez-Gracia. (2019). Present and Future of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Infections. *Antibiotics*, 8(3), 122. doi:10.3390/antibiotics8030122.
- Sullivan, M. J., Petty, N. K., y Beatson, S. A. (2011). Easyfig: un visualizador de comparación de genomas. *Bioinformática* 27, 1009–1010. doi: 10.1093/bioinformática/btr039.
- Sun, F., Yin, Z., Feng, J., Qiu, Y., Zhang, D., Luo, W., ... Zhou, D. (2015). Production of plasmid-encoding NDM-1 in clinical *Raoultella ornithinolytica* and *Leclercia adecarboxylata* from China. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00458.

- Sun, F., Zhou, D., Sun, Q., Luo, W., Tong, Y., Zhang, D., ... Xia, P. (2016). *Genetic characterization of two fully sequenced multi-drug-resistant plasmids pP10164-2 and pP10164-3 from Leclercia adecarboxylata*. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep33982.
- Sun, Q., Wang, H., Shu, L., Dong, N., Yang, F., Zhou, H., ... Zhang, R. (2019). *Leclercia adecarboxylata From Human Gut Flora Carries mcr-4.3 and blaIMP-4-Bearing Plasmids*. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.02805.
- Tamura, K., Sakazaki, R., Kosako, Y. *et al.* *Leclercia adecarboxylata* Gen. Nov., Comb. Nov., antes conocida como *Escherichia adecarboxylata*. *Current Microbiology* 13, 179-184 (1986). <https://doi.org/10.1007/BF01568943>.
- Tie, Y., Zhu, W., Zhang, C., Yin, L., Zhang, Y., Liu, L., *et al.* (2021). *Identification of two Myrosinases from a Leclercia adecarboxylata strain and investigation of its tolerance mechanism to Glucosinolate hydrolysate*. *J Agric Food Chem*. 2021;69:14151–64.
- Vandenende, C. S., Vlasschaert, M., & Seah, S. Y. (2004). Caracterización funcional de una aminotransferasa necesaria para la biosíntesis de sideróforos de pyoverdina en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Revista de bacteriología*, 186(17), 5596–5602. <https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5596-5602.2004>.
- Venkatesan, N., Perumal, G., & Doble, M. (2015). Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future microbiology*, 10(11), 1743–1750. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.69>.
- Vielva, L., de Toro, M., Lanza, V. F., & de la Cruz, F. (2017). PLACNETw: a web-based tool for plasmid reconstruction from bacterial genomes. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 33(23), 3796–3798. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx462>.
- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., & Carattoli, A. (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(12), 2518-2529. doi:10.1093/jac/dkq347.
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., and Holt, K. E. (2017). Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol.* 13:e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
- Wilson, H. & Török, M. (2018). Extended-spectrum b-lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Microb. Genom.* doi: 10.1099/mgen.0.000197.
- Yang, Q. E., Sun, J., Li, L., Deng, H., Liu, B. T., Fang, L. X., Liao, X. P., & Liu, Y. H. (2015). IncF plasmid diversity in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains from animals in China. *Frontiers in microbiology*, 6, 964. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00964>

- Yescas-Zazueta, V., Rocha-Gracia, R. D. C., González-Bonilla, C. R., Ayala-Zavala, J. F., Enciso-Martínez, Y., Carreón-León, E. A., González Corona, B. A., Valencia, D., Ballesteros-Monrreal, M. G., & Barrios-Villa, E. (2024). Resistance phenotype and virulence potential of *Leclercia adecarboxylata* strains isolated from different sources. *Microbiology (Reading, England)*, 170(4), Artículo 001457. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001457>.
- Zayet, S., Lang, S., Garnier, P., Pierron, A., Plantin, J., Toko, L., Royer, P. Y., Villemain, M., Klopfenstein, T., & Gendrin, V. (2021). *Leclercia adecarboxylata* as Emerging Pathogen in Human Infections: Clinical Features and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(11), 1399. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111399>.
- Zhang, R., Liu, L., Zhou, H., Chan, E. W., Li, J., Fang, Y., et al. (2017). Vigilancia nacional de cepas clínicas de enterobacteriaceae (CRE) resistentes a los carbapenémicos en China. *EBioMedicina* 19, 98–106. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.04.032.

# ANEXOS

## ANEXO 1. Metodologías

### Protocolo de extracción de ADN genómico por el kit de extracción Wizard Genomic DNA Promega

A partir de un cultivo puro crecido durante 18 horas a 37°C en caldo BHI (3mL) con agitación:

1. Agregue 1 mL de un cultivo a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
2. Centrifugar a 13,000 rpm durante 2 minutos para sedimentar las células. Retire el sobrenadante. Y repita nuevamente el paso 2 para formar una pastilla de células.
3. Agregue 600 µl de solución de lisi. Pipetear suavemente hasta que las células se vuelvan a suspender.
4. Incubar a 80 °C durante 5 minutos para lisar las células; Luego enfriar a temperatura ambiente 10 min.
5. Agregue 4 µl de solución de RNasa al lisado celular. Invierta el tubo suavemente 5 veces para mezclar.
6. Incubar a 37 °C durante 60 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
7. Agregue 200 µl de Solución de Precipitación de Proteínas al lisado celular tratado con RNasa. Vortex vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos para mezclar la Solución de Precipitación de Proteína con el lisado celular.
8. Incubar la muestra en hielo durante 5 minutos.
9. Centrifugar a 13,000 rpm durante 3 minutos.
10. Transfiera el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml que contiene 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente. Nota: Puede quedar algo de sobrenadante en el tubo original que contiene el sedimento de proteínas. Deje este líquido residual en el tubo para evitar contaminar la solución de ADN con la proteína precipitada. En caso de tomar proteínas en el microtubo nuevo, centrifugar nuevamente a 13,000 rpm durante 2 minutos.

11. Mezclar suavemente por inversión hasta que las hebras de ADN formen una masa visible.
12. Centrifugar a 13,000–16,000 × g durante 2 minutos.
13. Vierta cuidadosamente el sobrenadante y drene el tubo en papel absorbente limpio. Agregue 600 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente e invierta suavemente el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN.
14. Centrifugar a 13,000–16,000 × g durante 2 minutos. Aspirar cuidadosamente el etanol.
15. Vacíe el tubo en un papel absorbente limpio y deje que la pastilla se seque al aire durante 10–15 minutos.
16. Agregue 100µl de solución de rehidratación de ADN al tubo y rehidrate el ADN incubando a 65 °C durante 1 hora. Mezcle periódicamente la solución golpeando suavemente el tubo. Alternativamente, rehidrate el ADN incubando la solución durante la noche a temperatura ambiente o a 4 °C.
17. Almacenar el ADN a 2–8 °C

### **Metodología para la Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (Cortés-Cortés, 2016)**

#### **Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)**

Después de la extracción plasmídica se realizará la electroforesis en gel de campos pulsados. El procedimiento incluye lisis de la bacteria embebida en un “*plug*” de agarosa de bajo punto de fusión, seguido de tratamiento con nucleasa S1 que lineariza los plásmidos y por último se hace la electroforesis en gel de campos pulsados para separar las moléculas de plásmidos. Se seguirá el protocolo propuesto por Cortés-Cortés 2016, para *E. coli*.

#### ***Preparación de los insertos:***

A partir de un cultivo puro crecido durante 24 h en agar BHI, se realizará una suspensión en 1 ml de Buffer SE (75mM NaCl y 25mM EDTA, pH 8) hasta conseguir una absorbancia de 1.35-1.5 a 610 nm. Se preparará agarosa al 1.5% en tampón

TE (10mM Tris y 1mM EDTA) y se mantendrá a 54°C. Se preparará una mezcla de 0.5 ml de la suspensión bacteriana con 0.5 ml de agarosa y se crearán moldes (insertos). Se dejará solidificar 10 minutos en refrigeración.

***Lisis bacteriana:***

Se emplearán 3 insertos por cepa, a los que se añadirán 3 ml de Buffer de lisis [50 mM Tris; 50 mM EDTA pH 8; 1% sarcosil; 0.3 mg/ml proteinasa K y se dejará incubar durante 24 h en baño María a 54°C.

***Lavado de los insertos:***

Se eliminará el Buffer de lisis y se realizarán lavados en baño María a 54°C, agregando:

- 3 ml de agua destilada estéril cada 10 min, tres veces.
- 3 ml de Buffer TE cada 10 min, dos veces.
- 3 ml de Buffer TE a temperatura ambiente, una vez.

Los insertos se conservarán en 3 ml de Buffer TE a 4°C hasta su utilización.

***Digestión enzimática:***

Se hará una digestión de medio inserto de cada cepa con la enzima *XbaI*, generando fragmentos de acuerdo con los sitios de corte específicos de la enzima. El volumen final del tampón de digestión será de 100 µl por tubo, a los que se les añadirá 40 U de enzima *XbaI*, 10 µl de Buffer 10X de la enzima y agua estéril. La mezcla y el inserto se dejarán incubar durante 40min h a 37°C.

Reacción:

Enzima S1: 1.6 µl

Buffer 5X: 20 µl

Agua: 78.4 µl

Vol. Final: 100 µl

La reacción se detendrá poniendo los insertos en tubos con EDTA 0.5M/1% de sarcosil y dejando incubar en hielo durante 10 min. El exceso de sarcosil se retirará con papel absorbente antes de cargar el inserto en el gel de corrimiento.

***Preparación del gel de agarosa:***

El gel de agarosa se preparará al 1.2% disuelta en TBE 0.5X. Los pozos se rellenarán con los insertos, cargando en el primer y último pozo el marcador de peso molecular; finalmente, los pozos se sellarán con agarosa.

***Electroforesis:***

La electroforesis se llevará a cabo en una cámara de campos pulsados con 2 L de TBE 0.5X suplementado con tiourea. El gradiente de voltaje será de 6 V/cm y se empleará una rampa lineal pulsada de 1 a 30 seg durante 23 hrs a 14°

## **ANEXO 2. Soluciones**

### **Soluciones para lisis alcalina**

#### Solución 1

- Sacarosa 0.3 M: Pesar 3.0807grs y aforar a 30 mL con agua destilada (esterilizar por membrana).
- Tris-HCl 25mM pH:8; Pesar 0.0454 grs y aforar a 15 mL con agua destilada estéril (esterilizar 10Lbs por 10 min).
- EDTA 25mM pH=8; Pesar 0.13959 grs y aforar a 15 mL con agua destilada estéril (esterilizar 10Lbs por 10 min).

#### Solución 2

- Acetato de potasio 3M: Pesar 14.72 grs y aforar a 50 mL con agua destilada estéril (esterilizar 10Lbs por 10 min).
- SDS; Pesar 0.5 grs y aforar a 4 mL con agua destilada estéril (esterilizar 10Lbs por 10 min).
- NaOH 5M: Pesar 0.399 grs y agregar 2 mL agua destilada estéril

Mezcla 300  $\mu$ l de NaOH 5M y 1 ml de SDS 10% en 3.7 ml de agua

Cálculos para 15 cepas aproximadamente:

2mL de NaOH, 30 mL de sacarosa, 15mL de Trisi-HCl, 15 mL de EDTA, 4mL de SDS y 50 mL de Acetato de potasio.

### **Soluciones para campos pulsados (PFGE)**

1. Tris 1M, para 50 mL pH:8.0

Pesar 3.028 g de Tris, disolver en 40 mL de agua destilada en agitación y aforar a 50 mL , esterilizar a 10 libras por 10 minutos y conservar en refrigeración.

2. EDTA 0.5M para 20 mL pH: 8.0

Pesar 3.7224 g de EDTA, disolver en 10 ml de agua destilada en agitación con un pH alcalino entre 8 y 10 (el EDTA solo se disuelve a un pH alcalino), una vez disuelto el EDTA se ajusta a pH 8 con de NaOH 50% y HCL concentrado y se aforar a 20 ml con agua destilada, esterilizar a 10 lbs por 10 min. y conservar en refrigeración.

3. TBE 10X, para 300 mL pH:8.0

- Tris 0.89M, Ácido bórico 0.89M, EDTA 0.02M

Pesar 32.344 gr de Tris y 16.5gr de ácido bórico y disolverlos en 200 mL de agua destilada estéril, en agitación usando el agitador magnético (la disolución de estos componentes es tardada incluso en agitación constante), agregar 2.233 gr de EDTA o 12 mL de EDTA 0.5M pH=8 y aforar con agua destilada estéril a 300mL, conservar a temperatura ambiente. Nota: 300mL alcanzan para 2 corridas electroforéticas.

4. Buffer de lisis para 50 mL (Preparar al momento de uso)

- Tris 50 mM; EDTA 50 mM, pH 8

Mezclar 2.5 mL de Tris 1M + 5 mL de EDTA 0.5M pH= 8 + 42.5 mL de agua destilada estéril.

5. Buffer TE para 1 L

- Tris 10mM y EDTA 1mM pH= 8

Mezclar 10 ml de Tris 1M + 2 ml de EDTA 0.5M pH= 8, aforar a 1L y esterilizar a 10 libras por 10 min

### ANEXO 3. Oligonucleótidos y condiciones de PCR

**Tabla I. Secuencias de oligonucleótidos y condiciones de las PCR, usados para la determinación de los grupos Inc (Carattoli *et al.*, 2019)**

Oligonucleótido (Secuencia)	Ciclos	Condiciones de reacción	Tamaño Esperado (pb)	Referencia
<b>PCR Multiplex1</b>				
IncHI1-F: GGAGCGATGGACTTTCAGTAC IncHI1-R: TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30seg Extensión: 72°C/1min	471	Carattoli <i>et al.</i> , 2005
IncHI2-F: TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC IncHI2-R: GGCTCACTACCGTTGTCATCCT			644	
IncI1-F: CGAAAGCCGGACGGCAGAA IncI1-R: TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT			139	
<b>PCR Multiplex2</b>				
IncX-F: AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT IncX-R: TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30seg Extensión: 72°C/1min	376	Carattoli <i>et al.</i> , 2005
IncL/M-F: GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG IncL/M-R: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG			785	
IncN-F: GTCTAACGAGCTTACCGAAG IncN-R: GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			559	
<b>PCR Multiplex3</b>				
IncFIA-F: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG IncFIA-R: GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30seg Extensión: 72°C/1min	462	Carattoli <i>et al.</i> , 2005
IncFIB-F: TCTGTTTATTCTTTTACTGTCCAC IncFIB-R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			683	

IncW-FCCTAAGAACAACAAAGCCCCCG IncW-R: GGTGCGCGGCATAGAACCGT			242	
<b>PCR Multiplex4</b>				
IncY-F: AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG IncY-R: GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTTT	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30seg Extensión: 72°C/1min	765	Carattoli <i>et al</i> , 2005
Incp-F: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA Incp-R: TCACGCGCCAGGGCGCAGCC			534	
IncFIC-F: GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG IncFIC-R: TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT			262	
<b>PCR Multiplex5</b>				
IncA/C-F: GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA IncA/C-R: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30seg Extensión: 72°C/1min	465	Carattoli <i>et al</i> , 2005
IncT-F: TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT IncT-R: TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT			750	
IncFII-F: CTGATCGTTTAAGGAATTTT IncFII-R: CACACCATCCTGCACTTA			258- 262	
IncFrepB-F: TGATCGTTTAAGGAATTTTG IncFrepB-R: GAAGATCAGTCACACCATCC	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30seg Extensión: 72°C/1min	270	Carattoli <i>et al</i> , 2005
IncK/B-F: GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC IncK-R: TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30 seg Extensión: 72°C/1min	160	Carattoli <i>et al</i> , 2005
IncK/B-F: GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC IncB/O-R: TCTGCGTTCGCCAAGTTCTGA	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30 seg Extensión: 72°C/1min	159	Carattoli <i>et al</i> , 2005

IncR-F: TCGCTTCATTCCTGCTTCAGC IncR-R: GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30 seg Extensión: 72°C/1min	251	García- Fernández <i>et al.</i> , 2009
Incu-F: TCACGACACAAGCGCAAGGG Incu-R: TCATGGTACATCTGGGCGC	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30 seg Extensión: 72°C/1min	843	García- Fernández <i>et al.</i> , 2009
oricoIE-F: GTTCGTGCATACAGTCCA oricoIE-R: GGCGAAACCCGACAGGACT	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30 seg Extensión: 72°C/1min	187	García- Fernández <i>et al.</i> , 2009
oricoIE-F: GTTCGTGCATACAGTCCA oricoLETP-R: GGTTTACCGGTGTCATTCC	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30 seg Extensión: 72°C/1min	106	García- Fernández <i>et al.</i> , 2009
IncFIIY-F: TGGYAGGGAAGTGGTTCTG IncFIIY-R: GTRAGTCACACCTTCCCGC	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30 seg Extensión: 72°C/1min	227	Villa <i>et al.</i> , 2010
IncFIIs-F: CTAAAGAATTTTGATGGCTGGC IncFIIs-R: CAGTCACTTCTGCCTGCAC	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30 seg Extensión: 72°C/1min	259-260	Villa <i>et al.</i> , 2010
IncFIIY-F: TGGYAGGGAAGTGGTTCTG IncFIIY-R: GTRAGTCACACCTTCCCGC	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30 seg Extensión: 72°C/1min	227	Villa <i>et al.</i> , 2010
IncFIIs-F: CTAAAGAATTTTGATGGCTGGC IncFIIs-R: CAGTCACTTCTGCCTGCAC	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30 seg Extensión: 72°C/1min	259-260	Villa <i>et al.</i> , 2010
IncFIIK-F: TCTTCTTCAATCTTGGCGGA IncFIIK-R: GCTTATGTTGCACRGAAGGA	30	Desnaturalización: 94°C/1min Alineamiento: 60°C/30 seg Extensión: 72°C/1min	142-148	Villa <i>et al.</i> , 2010

\*Desnaturalización Inicial: 94°C/5min; Extensión Final: 72°C/5min

**Tabla II. Secuencias de oligonucleótidos y condiciones de las PCR, usados para la determinación de relaxasas MOB (Carreón-Leon *et al.*, 2019).**

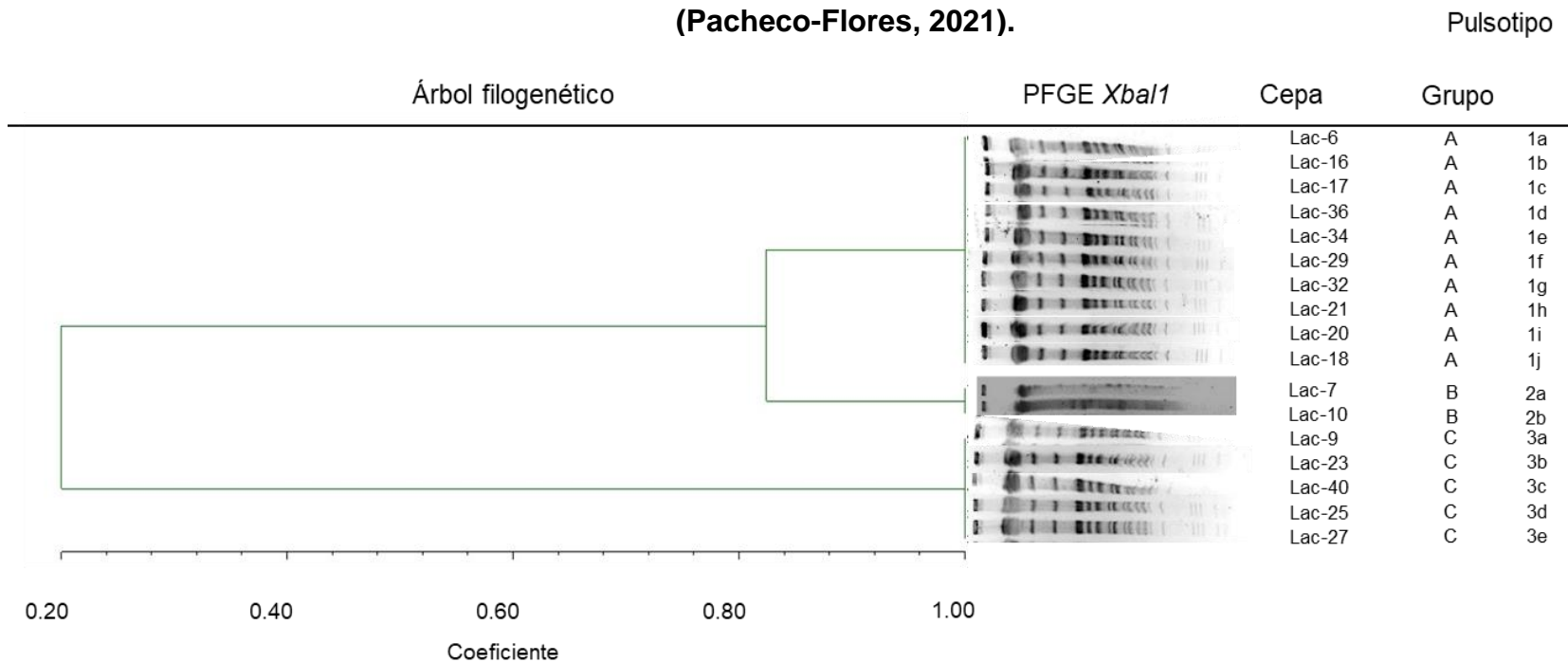
<b>Oligonucleótido MOB (Secuencia)</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Condiciones de reacción</b>	<b>Tamaño esperado (pb)</b>	<b>Referencia</b>
F11-F: GCAGCGTATTACTTCTCTGCTGCCGAYGAYTAYTA F11-R: ACTTTTGGGCGCGGARAABTGSAGRTC	25	Desnaturalización:94°C/30s Alineamiento: 53°C/30 s Extensión: 72°C/30s	234	Alvarado
F12-F: AGCGACGGCAATTATTACACCGACAAGGAYAAAYTAYTA F1-R: ACTTTTGGGCGCGGARAABTGSAGRTC	25	Desnaturalización:94°C/30s Alineamiento: 55°C/30 s Extensión: 72°C/30s	234	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
P11-F: CGTGCGAAGGGCGACAARACBTAYCA P1-R: AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTRTCNGTRTC	25	Desnaturalización:94°C/30s Alineamiento: 60°C/30 s Extensión: 72°C/30s	180	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
P12-F: GCACACTATGCAAAAAGATGATACTGAYCCYGT P1-R: AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTRTCNGTRTC	30	Desnaturalización:94°C/30s Alineamiento: 53.8°C/30 s Extensión: 72°C/30s	189	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
P131-F: AACCCACGCTGCAARGAYCCVGT P1-R: AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTRTCNGTRTC	30	Desnaturalización:94°C/30s Alineamiento: 59°C/30 s Extensión: 72°C/30s	180	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
P14-F: CGCAGCAAGGACACCATCAAYCAYTAYRT P1-R: AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTRTCNGTRTC	25	Desnaturalización:94°C/30s Alineamiento: 50°C/30 s Extensión: 72°C/30s	174	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
P3-F: CCGTGAGCCAAATCACACAGAATATKRTBTT P3-R: CGAAAGCCAACATGAACATGHGGATKHTC	25	Desnaturalización:94°C/30s Alineamiento: 50°C/30 s Extensión: 72°C/30s	177	Alvarado <i>et al.</i> , 2012

P4-F: GCGTTCAGGATGGTCYBTCSATGCC P4-R: CGGTTTTGACCGTCAGATGSVMATGCGG	25	Desnaturalización:94°C/30s Alineamiento: 64°C/30 s Extensión: 72°C/30s	163	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
P51-F: TACCACGCCCTATGCGAARAARTAYAC P5-R: CCCTTGTCTGGTGYTSNACCCA	30	Desnaturalización:94°C/30s Alineamiento: 58°C/30 s Extensión: 72°C/30s	167	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
P52-F: GATAGCTTGATTTTAATAACACCAAYACYTAYAC P5-R: CCCTTGTCTGGTGYTSNACCCA	30	Desnaturalización:94°C/30s Alineamiento: 58°C/30 s Extensión: 72°C/30s	175	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
P53-F: GGGCTCGCACGAYCAYACNGG P53-R: GCCCAGCCCTTTTCRTGRTRTG	30	Desnaturalización:94°C/30s Alineamiento: 65°C/30 s Extensión: 72°C/30s	345	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
Q11-F: CAATCGTCCAAGGCGAARGCNGAYTA Q11-R: CGCTCGGAGATCATCAYTGYCAYTG	30	Desnaturalización:94°C/30s Alineamiento: 50°C/30 s Extensión: 72°C/30s	331	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
Q12-F: CTGGAATATACTGAACACGGNAAYATGCC Q12-R: ATCCTTGGTGTTAGCACGTTTRAARWAYTG	30	Desnaturalización:94°C/30s Alineamiento: 52°C/30 s Extensión: 72°C/30s	341	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
H121F: GCCAGCTTCCGAATCACAYCAYCAYCG H121R: GTCGCTTGTCGCGCCACCGDATRAARTA	25	Desnaturalización:94°C/30s Alineamiento: 59°C/30 s Extensión: 72°C/30s	313	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
H2-F: AGTTCCCAGCCTCAGAAATCCAYCAYCAYKC H2-R: GCGGACCGTGCCANGGRTGCCA	25	Desnaturalización:94°C/30s Alineamiento: 68°C/30 s Extensión: 72°C/30s	264	Alvarado <i>et al.</i> , 2012

\*Desnaturalización Inicial: 94°C/4min ; Extensión Final: 72°C/10min

#### ANEXO 4.

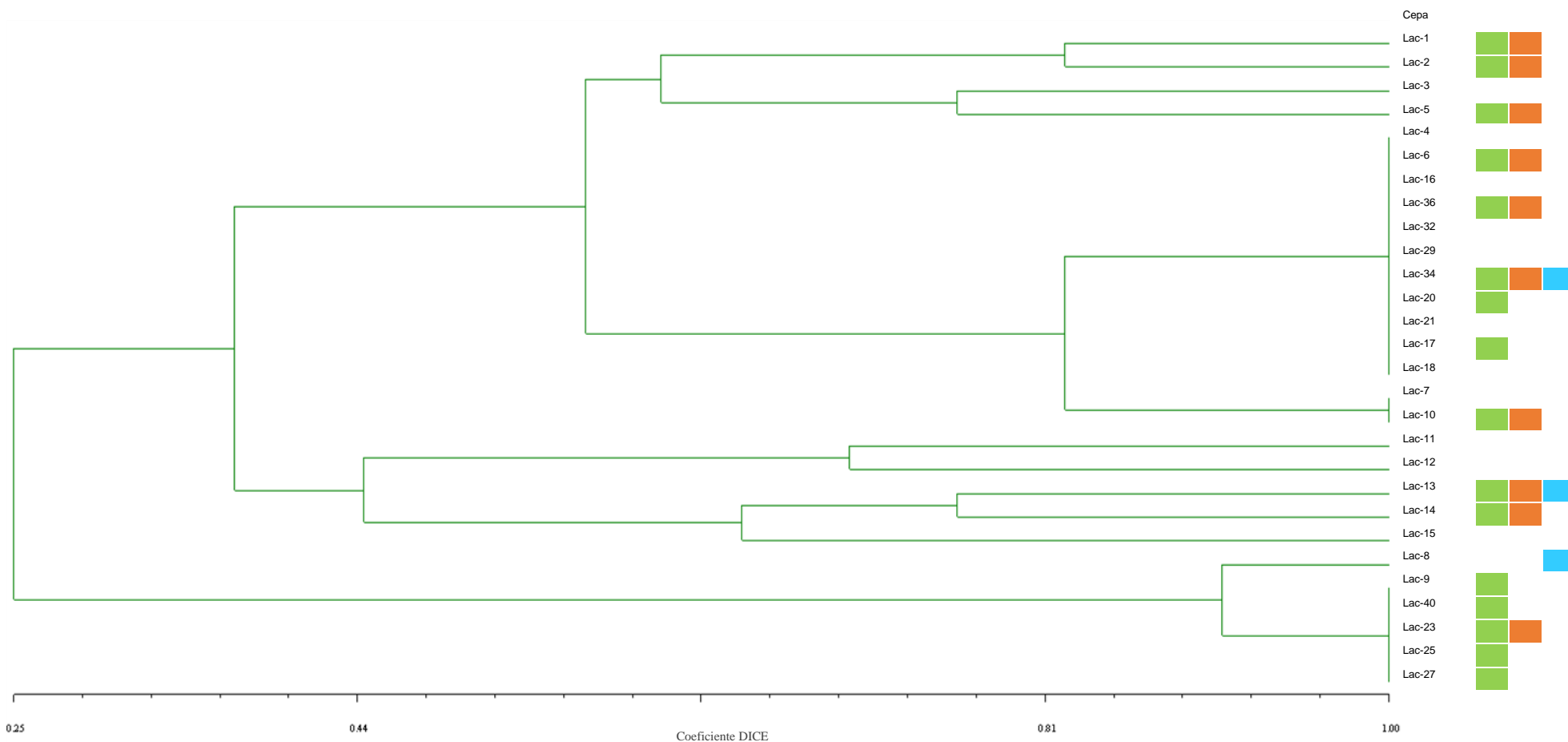
**Figura I. Dendograma de patrones de restricción con la enzima *Xba*I  
(Pacheco-Flores, 2021).**



Dendograma UPGMA y PFGE de los patrones de restricción obtenidos de la digestión enzimática con la enzima *Xba*I, de las cepas Lac-6\*, Lac-16, Lac-17\*, Lac-36\*, Lac-34\*, Lac-29, Lac-32, Lac-21, Lac-20\*, Lac-10\*, Lac-18, Lac-7, Lac-9\*, Lac-23\*, Lac-40\*, Lac-25\*, Lac-27\*, en donde se observan 3 grupos estrechamente relacionados (A, B y C).

\*: Cepas secuenciadas

**Figura II. Dendograma completo de patrones de restricción con la enzima XbaI  
(Pacheco-Flores, este estudio).**



**Figura 4. Dendrograma de los patrones de restricción de las 28 cepas de *L. adedecarboxylata* obtenidos de la digestión con XbaI.**  
Datos tomados y modificado de Pacheco-Flores, 2021.

- Genomas ensamblados por Barrios-Villa.
- Genomas elegidos para realizar análisis bioinformáticos en este trabajo.
- Genomas secuenciados para realizar análisis bioinformáticos de plásmidos en este trabajo.

## ANEXO 5. Análisis estadístico formación de películas.

**Figura I. Análisis ANOVA en herramienta Graph Prism 10.2.2 para las cepas productoras de biopelículas mediante prueba Dunnett**

ANOVA results			ANOVA results			ANOVA results			ANOVA results		
Ordinary one-way ANOVA			Ordinary one-way ANOVA			Ordinary one-way ANOVA			Ordinary one-way ANOVA		
ANOVA results			Multiple comparisons			Multiple comparisons			Multiple comparisons		
1	Table Analyzed	Data 1	1	Number of families	1						
2	Data sets analyzed	A-U	2	Number of comparisons per family	20						
3			3	Alpha	0.05						
4	<b>ANOVA summary</b>		4								
5	F	0.001353	5	<b>Dunnett's multiple comparisons test</b>	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value	A-?	
6	P value	>0.9999	6	CFTF073 vs. EAEC	-0.03015	-3.984 to 3.924	No	ns	>0.9999	B	EAEC
7	P value summary	ns	7	CFTF073 vs. 1	0.07829	-3.876 to 4.032	No	ns	>0.9999	C	1
8	Significant diff. among means (P < 0.05)?	No	8	CFTF073 vs. 2	0.08698	-3.867 to 4.041	No	ns	>0.9999	D	2
9	R squared	0.0006440	9	CFTF073 vs. 5	0.07143	-3.882 to 4.025	No	ns	>0.9999	E	5
10			10	CFTF073 vs. 6	0.08682	-3.867 to 4.041	No	ns	>0.9999	F	6
11	<b>Brown-Forsythe test</b>		11	CFTF073 vs. 7	0.05918	-3.895 to 4.013	No	ns	>0.9999	G	7
12	F (DFn, DFd)	0.0001581 (20, 42)	12	CFTF073 vs. 8	0.09030	-3.864 to 4.044	No	ns	>0.9999	H	8
13	P value	>0.9999	13	CFTF073 vs. 9	0.08428	-3.870 to 4.038	No	ns	>0.9999	I	9
14	P value summary	ns	14	CFTF073 vs. 10	0.02014	-3.934 to 3.974	No	ns	>0.9999	J	10
15	Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No	15	CFTF073 vs. 11	0.06026	-3.894 to 4.014	No	ns	>0.9999	K	11
16			16	CFTF073 vs. 13	0.06191	-3.892 to 4.016	No	ns	>0.9999	L	13
17	<b>Bartlett's test</b>		17	CFTF073 vs. 14	0.03287	-3.921 to 3.987	No	ns	>0.9999	M	14
18	Bartlett's statistic (corrected)		18	CFTF073 vs. 16	0.05890	-3.895 to 4.013	No	ns	>0.9999	N	16
19	P value		19	CFTF073 vs. 17	0.06260	-3.891 to 4.017	No	ns	>0.9999	O	17
20	P value summary		20	CFTF073 vs. 23	0.08832	-3.866 to 4.042	No	ns	>0.9999	P	23
21	Are SDs significantly different (P < 0.05)?		21	CFTF073 vs. 27	0.07196	-3.882 to 4.026	No	ns	>0.9999	Q	27
22			22	CFTF073 vs. 29	0.03538	-3.919 to 3.989	No	ns	>0.9999	R	29
			23	CFTF073 vs. 32	0.05512	-3.899 to 4.009	No	ns	>0.9999	S	32
			24	CFTF073 vs. 34	-0.006952	-3.961 to 3.947	No	ns	>0.9999	T	34
			25	CFTF073 vs. 36	0.04263	-3.911 to 3.997	No	ns	>0.9999	U	36
			26								
			27	<b>Test details</b>	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q

Figura II. Análisis ANOVA en herramienta Graph Prism 10.2.2 para las cepas productoras de biopelículas mediante prueba Bonferroni

ANOVA results						ANOVA results								
Ordinary one-way ANOVA						Ordinary one-way ANOVA								
ANOVA results						Multiple comparisons								
1	Table Analyzed	Data 1				1	Number of families	1						
2	Data sets analyzed	A-U				2	Number of comparisons per family	210						
3						3	Alpha	0.05						
4	<b>ANOVA summary</b>					4	<b>Bonferroni's multiple comparisons test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95.00% CI of diff.</b>	<b>Below threshold?</b>	<b>Summary</b>	<b>Adjusted P Value</b>		
5	F	0.001353				6	CFTF073 vs. EAEC	-0.03015	-5.243 to 5.183	No	ns	>0.9999	A-B	
6	P value	>0.9999				7	CFTF073 vs. 1	0.07829	-5.134 to 5.291	No	ns	>0.9999	A-C	
7	P value summary	ns				8	CFTF073 vs. 2	0.08698	-5.126 to 5.300	No	ns	>0.9999	A-D	
8	Significant diff. among means (P < 0.05)?	No				9	CFTF073 vs. 5	0.07143	-5.141 to 5.284	No	ns	>0.9999	A-E	
9	R squared	0.0006440				10	CFTF073 vs. 6	0.08682	-5.126 to 5.300	No	ns	>0.9999	A-F	
10	<b>Brown-Forsythe test</b>					11	CFTF073 vs. 7	0.05918	-5.154 to 5.272	No	ns	>0.9999	A-G	
12	F (DFn, DFd)	0.0001581 (20, 42)				12	CFTF073 vs. 8	0.09030	-5.122 to 5.303	No	ns	>0.9999	A-H	
13	P value	>0.9999				13	CFTF073 vs. 9	0.08428	-5.128 to 5.297	No	ns	>0.9999	A-I	
14	P value summary	ns				14	CFTF073 vs. 10	0.02014	-5.193 to 5.233	No	ns	>0.9999	A-J	
15	Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				15	CFTF073 vs. 11	0.06026	-5.152 to 5.273	No	ns	>0.9999	A-K	
16						16	CFTF073 vs. 13	0.06191	-5.151 to 5.275	No	ns	>0.9999	A-L	
17	<b>Bartlett's test</b>					17	CFTF073 vs. 14	0.03287	-5.180 to 5.246	No	ns	>0.9999	A-M	
18	Bartlett's statistic (corrected)					18	CFTF073 vs. 16	0.05890	-5.154 to 5.272	No	ns	>0.9999	A-N	
19	P value					19	CFTF073 vs. 17	0.06260	-5.150 to 5.275	No	ns	>0.9999	A-O	
20	P value summary					20	CFTF073 vs. 23	0.08832	-5.124 to 5.301	No	ns	>0.9999	A-P	
21	Are SDs significantly different (P < 0.05)?					21	CFTF073 vs. 27	0.07195	-5.141 to 5.285	No	ns	>0.9999	A-Q	
22						22	CFTF073 vs. 29	0.03538	-5.177 to 5.248	No	ns	>0.9999	A-R	
23	<b>ANOVA table</b>	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>	<b>P value</b>	23	CFTF073 vs. 32	0.05512	-5.158 to 5.268	No	ns	>0.9999	A-S
24	Treatment (between columns)	0.06833	20	0.003416	F (20, 42) = 0.001353	P>0.9999	24	CFTF073 vs. 34	-0.006952	-5.220 to 5.206	No	ns	>0.9999	A-T
25	Residual (within columns)	106.0	42	2.525			25	CFTF073 vs. 36	0.04263	-5.170 to 5.255	No	ns	>0.9999	A-U
26	Total	106.1	62				26	EAEC vs. 1	0.1004	-5.104 to 5.321	No	ns	>0.9999	B-C
27							27	EAEC vs. 2	0.1171	-5.096 to 5.330	No	ns	>0.9999	B-D
28	<b>Data summary</b>						28	EAEC vs. 5	0.1016	-5.111 to 5.314	No	ns	>0.9999	B-E
29	Number of treatments (columns)	21					29	EAEC vs. 6	0.1170	-5.096 to 5.330	No	ns	>0.9999	B-F
30	Number of values (total)	63					30	EAEC vs. 7	0.08934	-5.123 to 5.302	No	ns	>0.9999	B-G
31							31	EAEC vs. 8	0.1205	-5.092 to 5.333	No	ns	>0.9999	B-H

Figura III. Análisis de la comparación ANOVA de una vía con la herramienta Graph Prism 10.2.2 para las cepas productoras de biopelículas con prueba Tukey.

ANOVA results						ANOVA results								
Ordinary one-way ANOVA						Ordinary one-way ANOVA								
ANOVA results						Multiple comparisons								
1	Table Analyzed	Data 1				1	Number of families	1						
2	Data sets analyzed	A-U				2	Number of comparisons per family	210						
3						3	Alpha	0.05						
4	<b>ANOVA summary</b>					4								
5	F	0.001353				5	<b>Tukey's multiple comparisons test</b>							
6	P value	>0.9999				6	CFTF073 vs. EAEC	-0.03015	-4.968 to 4.908	No	ns	>0.9999	A-B	
7	P value summary	ns				7	CFTF073 vs. 1	0.07829	-4.859 to 5.016	No	ns	>0.9999	A-C	
8	Significant diff. among means (P < 0.05)?	No				8	CFTF073 vs. 2	0.08698	-4.851 to 5.025	No	ns	>0.9999	A-D	
9	R squared	0.0005440				9	CFTF073 vs. 5	0.07143	-4.866 to 5.009	No	ns	>0.9999	A-E	
10						10	CFTF073 vs. 6	0.08682	-4.851 to 5.024	No	ns	>0.9999	A-F	
11	<b>Brown Forsythe test</b>					11	CFTF073 vs. 7	0.05918	-4.878 to 4.997	No	ns	>0.9999	A-G	
12	F (DFn, DFd)	0.0001581 (20, 42)				12	CFTF073 vs. 8	0.09030	-4.847 to 5.028	No	ns	>0.9999	A-H	
13	P value	>0.9999				13	CFTF073 vs. 9	0.08428	-4.853 to 5.022	No	ns	>0.9999	A-I	
14	P value summary	ns				14	CFTF073 vs. 10	0.02014	-4.918 to 4.958	No	ns	>0.9999	A-J	
15	Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				15	CFTF073 vs. 11	0.06026	-4.877 to 4.998	No	ns	>0.9999	A-K	
16						16	CFTF073 vs. 13	0.06191	-4.876 to 5.000	No	ns	>0.9999	A-L	
17	<b>Bartlett's test</b>					17	CFTF073 vs. 14	0.03287	-4.905 to 4.971	No	ns	>0.9999	A-M	
18	Bartlett's statistic (corrected)					18	CFTF073 vs. 16	0.05890	-4.879 to 4.997	No	ns	>0.9999	A-N	
19	P value					19	CFTF073 vs. 17	0.06260	-4.875 to 5.000	No	ns	>0.9999	A-O	
20	P value summary					20	CFTF073 vs. 23	0.08832	-4.849 to 5.026	No	ns	>0.9999	A-P	
21	Are SDs significantly different (P < 0.05)?					21	CFTF073 vs. 27	0.07196	-4.866 to 5.010	No	ns	>0.9999	A-Q	
22						22	CFTF073 vs. 29	0.03538	-4.902 to 4.973	No	ns	>0.9999	A-R	
23	<b>ANOVA table</b>					23	CFTF073 vs. 32	0.05512	-4.883 to 4.993	No	ns	>0.9999	A-S	
24	Treatment (between columns)	0.06833	20	0.003416	F (20, 42) = 0.001353	24	CFTF073 vs. 34	-0.006952	-4.945 to 4.931	No	ns	>0.9999	A-T	
25	Residual (within columns)	106.0	42	2.525		25	CFTF073 vs. 36	0.04263	-4.895 to 4.980	No	ns	>0.9999	A-U	
26	Total	106.1	62			26	EAEC vs. 1	0.1084	-4.829 to 5.046	No	ns	>0.9999	B-C	
27						27	EAEC vs. 2	0.1171	-4.821 to 5.055	No	ns	>0.9999	B-D	
28	<b>Data summary</b>					28	EAEC vs. 5	0.1016	-4.836 to 5.039	No	ns	>0.9999	B-E	
29	Number of treatments (columns)	21				29	EAEC vs. 6	0.1170	-4.821 to 5.055	No	ns	>0.9999	B-F	
30	Number of values (total)	63				30	EAEC vs. 7	0.08934	-4.848 to 5.027	No	ns	>0.9999	B-G	
31						31	EAEC vs. 8	0.1205	-4.817 to 5.058	No	ns	>0.9999	B-H	
32						32	EAEC vs. 9	0.1111	-4.822 to 5.052	No	ns	>0.9999	B-I	

## ANEXO 6. Actualización de la lista de patógenos prioritarios para la creación de nuevos antibióticos.



Tomada de World Health Organization, 2024.

## ANEXO 7. Actividades desarrolladas durante la maestría

- **Publicaciones**

Barrios-Villa, E., **Pacheco-Flores, B.**, Lozano-Zaraín, P., Del Campo-Ortega, R., de Jesús Ascencio-Montiel, I., González-León, M., Camorlinga-Ponce, M., Gaytán Cervantes, F. J., González Torres, C., Aguilar, E., González Ibarra, J., Torres López, F. J., Rosas-Vargas, H., González-Bonilla, C. R., & del Carmen Rocha-Gracia, R. (2023). Genomic insights of *Leclercia adecarboxylata* strains linked to an outbreak in public hospitals in Mexico. *Genes and Genomics*, 45(5), 569-579. <https://doi.org/10.1007/s13258-022-01348-4>

- **Presentaciones en congresos**

**Brenda Pacheco-Flores**, Rosa del Carmen Rocha-Gracia, Patricia Lozano-Zarain, Edwin Barrios-Villa. **Estudio del resistoma de cepas de *Leclercia adecraboxylata* resistentes a carbapenémicos, aisladas de un brote hospitalario.** Primer Simposio de Farmacología: “Combatiendo la resistencia a los antimicrobianos”. 22 y 23 de noviembre de 2023. Cartel. Facultad de Medicina. BUAP. Puebla

**Brenda Pacheco-Flores**, Rosa del Carmen Rocha-Gracia, Edwin Barrios-Villa, Patricia Lozano-Zaraín, Cesar Raúl Gonzales-Bonilla. **Estudio del resistoma y plasmidoma de cepas de *Leclercia adecraboxylata* resistentes a carbapenémicos, aisladas de un brote hospitalario.** XLI Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica “Dr. José Luis Castañeda Narváez”. 30 de noviembre al 02 de diciembre 2023. Oral. Obtención del primer lugar, Trabajos libres. Categoría Investigación Básica. San Luis Potosí.

**Brenda Pacheco-Flores**, Rosa del Carmen Rocha-Gracia, Edwin Barrios-Villa, Patricia Lozano-Zaraín, Cesar Raúl Gonzales-Bonilla. **Análisis del plasmidoma de cepas de *Leclercia adecarboxylata* productoras de biopelícula, aisladas de un brote hospitalario.** XLVIII Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica. 22 al 25 de mayo 2024. Cartel. Categoría Investigación Básica. Puebla.

- **Cursos y talleres**

Asistencia al 3er Congreso Nacional de Bacteriología y Virología Clínico-Molecular. 12 al 13 de noviembre de 2022. Asociación Poblana de Ciencias Microbiológicas. Veracruz.

Asistencia al Coloquio Internacional entre Grupos de Investigación Microbiológica y Bioquímica. 04 de marzo de 2023. Asociación Poblana de Ciencias Microbiológicas. Puebla.

Participación en Curso teórico-práctico: El uso de los antibióticos y las nuevas estrategias para combatir su resistencia. Agosto 2023. Asociación Poblana de Ciencias Microbiológicas. Puebla

- **Actividades de difusión y divulgación**

Socio Activo Estudiante de la Asociación Poblana de Ciencias Microbiológicas durante el periodo noviembre 2022 a noviembre 2025. Puebla.

Colaborador en el recorrido "El símbolo de la resistencia: las Súperbacterias", durante el Puertas abiertas BUAP 2022. 3 de diciembre del 2022. ICUAP. BUAP. Puebla.

Infografía "¿Qué son las bacterias resistentes?" en el Segundo concurso de infografías y podcast de divulgación del ICUAP. Noviembre 2023. BUAP. Puebla.

Participación como evaluador de carteles del Primer Simposio de Farmacología: Combatiendo la Resistencia a los Antimicrobianos. 22 de noviembre de 2023. Facultad de Medicina. BUAP.

Ponente en el marco del Día Internacional de la Mujer y la Niña en la Ciencia. "¿Super bacterias?". 12 de febrero de 2024. Colegio de Bachilleres del Estado de Puebla.

Presentación y participación del libro "BUAP: postpandemia y perspectivas de futuro, ¿Qué sigue?". FENALI 37. 22 de marzo 2024. Edificio Carolino BUAP. Puebla.

RESEARCH ARTICLE



## Genomic insights of *Leclercia adecarboxylata* strains linked to an outbreak in public hospitals in Mexico

Edwin Barrlos-Villa<sup>1</sup> · Brenda Pacheco-Flores<sup>2</sup> · Patricia Lozano-Zarain<sup>2</sup> · Rodolfo Del Campo-Ortega<sup>3</sup> · Ivan de Jesús Ascencio-Montiel<sup>4</sup> · Margot González-León<sup>5</sup> · Margarita Camorlinga-Ponce<sup>6</sup> · Francisco Javier Gaytán Cervantes<sup>7</sup> · Carolina González Torres<sup>7</sup> · Emmanuel Aguilar<sup>8</sup> · Joaquín González Ibarra<sup>9</sup> · Francisco Javier Torres López<sup>10</sup> · Haydeé Rosas-Vargas<sup>11</sup> · César R. González-Bonilla<sup>11,12</sup> · Rosa del Carmen Rocha-Gracia<sup>2</sup>

Received: 9 June 2022 / Accepted: 24 November 2022 / Published online: 12 January 2023  
© The Author(s) under exclusive licence to The Genetics Society of Korea 2023

### Abstract

**Background** *Leclercia adecarboxylata* is a bacteria closely related to *Escherichia coli* according to its biochemical characteristics and is commonly considered non-pathogenic although a growing number of publications classify it as an emerging pathogen. Fosfomycin resistance is a common trait for *L. adecarboxylata* encoded by *fosA<sup>LA</sup>* gene.

**Objective** To analyze genomic traits of sixteen *L. adecarboxylata* strains isolated from blood culture and a bottle of total parenteral nutrition.

**Methods** Twenty-eight *L. adecarboxylata* strains isolated from blood culture and a bottle of total parenteral nutrition were identified biochemically with a Vitek® automated system. The strains were phenotyped by their growth on Eosin Methylene Blue agar or MacConkey agar plates. Additionally, Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was performed to establish the clonal relationship. The genomic DNA of sixteen strains was obtained using a Qubit® dsDNA HS Assay Kit and sequenced on an Illumina® MiSeq instrument. Draft genomes were assembled using PROKKA and Rast. Assemblies were submitted to Resfinder and PathogenFinder from the Center for Genomic Epidemiology in order to find resistance genes and pathogenic potential. IslandViewer4 was also used to find Pathogenicity and Phage Islands. For identification of the *fosA* gene, manual curation and Clustal analysis was performed. A novel FosA variant was identified. Finally, phylogenetic analysis was performed using VAMPhyRE software and Mega X.

**Results** In this paper, we report the genomes of sixteen strains of *Leclercia adecarboxylata* causing an outbreak associated with parenteral nutrition in public hospitals in Mexico. The genomes were analyzed for genetic determinants of virulence and resistance. A high pathogenic potential (pathogenicity index 0.82) as well as multiple resistance genes including carbapenems, colistin and efflux pumps were determined. Based on sequence analysis, a new variant of the *fosA<sup>LA</sup>* gene was described. Finally, the outbreak was confirmed by establishing the clonal relationship among the sixteen genomes obtained.

**Conclusions** Commensal strains of *L. adecarboxylata* may acquire genetic determinants that provide mechanisms of host damage and go unnoticed in clinical diagnosis. *L. adecarboxylata* can evolve in a variety of ways including the acquisition of resistance and virulence genes representing a therapeutic challenge in patient care.

**Keywords** *Leclercia adecarboxylata* · Antibiotic resistance · Emerging pathogen

### Introduction

*Leclercia adecarboxylata* is a motile Gram-negative rod that belongs to Enterobacterales. It was first described by H. Leclerc as a “coliform bacteria yellow-stained” because

of its ability to ferment several sugar types, highlighting its similar biochemical behavior in IMViC tests to *Escherichia coli*. These characteristics made classify it into *Escherichia* genus (González-Arenas et al. 2011; Correa et al. 2012; Keren et al. 2014; Mayfield et al. 2019).

Later, in 1986, Tamura et al., suggested its re-classification into a brand-new genus based on the ribosomal RNA 16 s, as *Leclercia adecarboxylata* (Tamura et al. 1986).

✉ Rosa del Carmen Rocha-Gracia  
rochagra@yahoo.com

Extended author information available on the last page of the article

*L. adecarboxylata* can be found in food and water, as well as forming part of human and animal gut microbiota; commonly has been described as slightly virulent and it is considered an opportunistic microorganism because has been associated with infections in immunosuppressed patients, catheters, or wounds (Keren et al. 2014; Mayfield et al. 2019) causing bacteremia, sepsis, peritonitis, cellulitis, folliculitis, soft tissue infections, endocarditis and cholecystitis (Shin et al. 2012; Spiegelhauer et al. 2019; Keyes et al. 2020).

It is a microorganism rarely noticed in healthcare-associated infections or community-acquired infections (García-Fulgueiras et al. 2014; Grantham et al. 2015; Mayfield et al. 2019; Merza et al. 2019). *L. adecarboxylata* is usually sensitive to antibiotics, but exhibits natural resistance to Penicillin and Fosfomicin (Correa et al. 2012), that last resistance trait is conferred by the presence of the *fosA* chromosomally-encoded gene that encodes for FosA<sup>LA</sup>, which is a variant of the FosA proteins also reported in *Enterobacteriaceae* members (Poirel et al. 2019).

The close genetic relationship and the similar phenotypic traits between *L. adecarboxylata* and *E. coli* makes it difficult to discriminate between them in clinical practice.

Here we report further genomic analysis and resistance traits of sixteen *L. adecarboxylata* strains isolated from an outbreak associated with contaminated parental nutrition that affected three public hospitals in Mexico and has been described in detail elsewhere (Garza-González et al. 2021). It is important to highlight the multidrug resistance and virulence potential of these microorganisms as well as the need to consider them as emerging pathogens.

## Materials and methods

### Study design and sample collection

A descriptive study was carried out using 28 cultures of *L. adecarboxylata* isolated from the bloodstream infection outbreak cases at the IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social) in Guadalajara, Mexico. The age of the cases ranged from 10 days to 57 years old. Twenty-seven cultures were obtained from bloodstream samples and one culture was isolated from a contaminated parenteral nutrition product. The samples derived from 37 cases from five hospitals with no deaths occurred. (Supplementary Table 1).

### Phenotypic characterization

*L. adecarboxylata* strains were plated on Eosin Methylene Blue (EMB) agar and MacConkey agar plates and incubated for 18 h at 37 °C. Identification was carried out using the broth microdilution technique with the Vitek ®2 automated

system (BioMérieux, Lyon, France). Gram stain was also performed.

### Polymerase chain reaction

In order to ensure the molecular identity of the strains, a conventional PCR with primer pair *ybbW*-F (5'-TGATTG GCAAATCTGGCCG-3') (Walker et al. 2017) and *ybbW*-R (5'-ATACTGGCAATCAGTACGCC-3') (Carreón-León 2019) was performed for identification of *ybbW* gene as a genetic marker for *E. coli*. The resulting amplicons were investigated using gel electrophoresis with 0.7% agarose.

### Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

All the strains were also typed to establish a clonal relationship by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) with XbaI as a low-frequency restriction enzyme, according to previously reported methodology (Vinue et al. 2009). Dice coefficient was calculated using Bionumerics program from digitized images from gels.

### DNA sequencing

DNA sequencing was performed in a subset of 16 strains of *L. adecarboxylata*. Fifteen strains were obtained from bloodstream samples and one strain was isolated from a contaminated parenteral nutrition product. Genomic DNA (gDNA) samples were quantified by fluorometry using Qubit (Life Technologies, Carlsbad, CA) and Qubit dsDNA HS Assay Kit (Cat.No. Q32851). One nanogram of gDNA was used for library preparation using Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA.) according to the manufacturer's instructions. The Library pool was sequenced on the Illumina MiSeq instrument with Miseq chemistry V3 reagent cartridge using 2 × 300 cycles paired-end.

Draft genomes were assembled using the Velvet and SPAdes packages with a 10 × deep and the genomes were annotated using PROKKA utility and using the RAST server (Aziz et al. 2008). Raw data analysis using Sequencing Analysis Viewer of Illumina and fastQC tool resulted in 74.2% PF > Q30 with 55,519,538 reads, the average sequence length distribution of 300 nucleotides, and average G + C content of 54%.

### In silico identification of resistance genes

Resistance genes were determined using the Center for Genomic Epidemiology database (<http://genomicepidemiology.org>) (Bortolaia et al. 2020). Carbapenem efflux pump component genes were determined using alignments with BlastN algorithm. Incompatibility groups were also examined. In silico pathogenic genes were also tested across the

16 sequenced strains. The relationship between pathogenic genes identified in human pathogens and those identified in the *L. adecarboxylata* strains was determined using Pathogen Finder from the Center of Genomic Epidemiology (Cosentino et al. 2013). The correlation figure was generated using Circos Genome Visualization Software ([www.circos.ca](http://www.circos.ca)). Finally, assemblies were submitted to IslandViewer4 looking for Pathogenicity Islands and integron arrangement was determined after manual curation of each Pathogenicity Islands predicted (Bertelli et al. 2017).

### Phylogenetical characterization

Virtual genome fingerprint (VGF) of 144 *Leclercia adecarboxylata* genomes (128 genomes from the National Center for biotechnology Information (NCBI) and the 16 strains assembled in this study), was determined with VAMPhyRE software (<http://biomedbiotec.enb.ipn.mx/VAMPhyRE>), using a collection of 15,264 highly diverse 13-mer probe sequences and allowing only one mismatch in both strands and threshold of 17 nucleotides. The distance matrix calculated with VAMPhyRE was used to build VGF phylogenetic tree using MEGA version X software and the Neighbor-joining method (Kumar et al. 2018). The external 128 genomes were not involved in genomic alignment.

### Ethical statement

All procedures followed were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and national laws and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments. The study protocol was approved by the IMSS Scientific Research National Committee (number R-2020–785-003).

## Results

### Phenotypic and molecular characterization

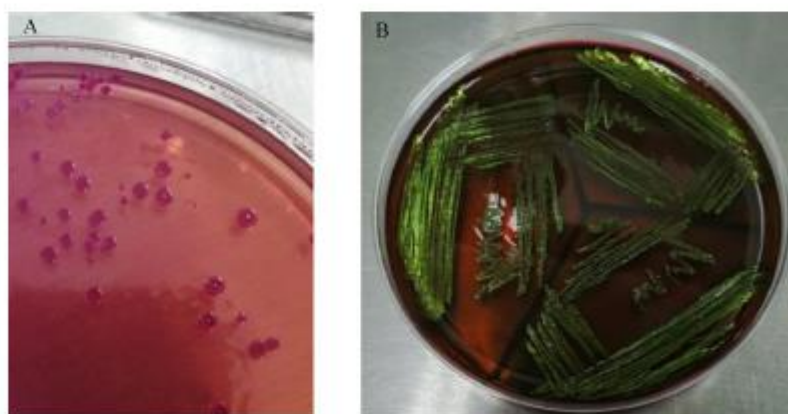
Microscopic observations of Gram-stained *L. adecarboxylata* preparations showed gram-negative rods. Growth on MacConkey agar plates was as umbilicated lactose-positive colonies and on agar EMB agar plates was with greenish metallic sheen because of fast lactose fermentation (Fig. 1). Those biochemical traits are shared with *E. coli*. It has been reported that *ybbW* is a genetic marker specific for *E. coli*, PCR products of that gene were not identified in any of the *Leclercia adecarboxylata* strains, discarding the misidentification of the microorganism.

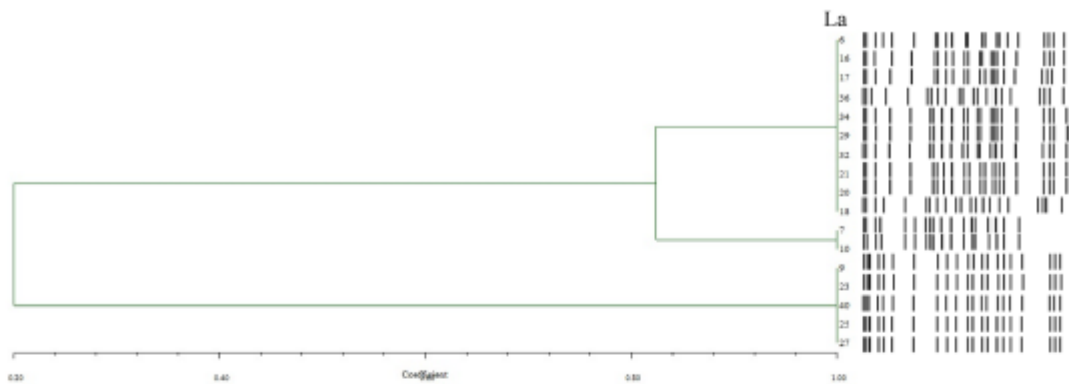
Since the fast appearance of bloodstream infections caused by *L. adecarboxylata* strains in multiple sites in a short lapse time, an epidemic outbreak was suspected. To establish a clonal relationship, Pulsed field gel electrophoresis using XbaI enzyme was performed. The results showed a similar DNA fingerprint in the 16 samples tested suggesting the same clonal origin; a cladogram was also obtained from PFGE, and it showed three well-defined pulsotypes with Dice coefficients greater than 0.8 (Fig. 2).

### Whole genome sequencing

The general features of the subset of 16 sequenced *Leclercia adecarboxylata* genomes are listed in Table 1. All strains shared a genome size of approximately 5.4 Mb and have a similar average G + C%. This G + C% content was slightly higher in the sample from the contaminated parenteral nutrition product (Table 1). The number of contigs generated round 160, with an n50 media of 146,166, these results indicated an acceptable confidence range.

**Fig. 1** Phenotypic traits of *Leclercia adecarboxylata* strains isolated from a bloodstream infection outbreak in Mexico. **A** Lactose positive colonies showing umbilication on MacConkey agar plates after 18 h of 37 °C incubation, **B** EMB agar plate after 18 h of 37 °C incubation





**Fig. 2** Pulsed field gel electrophoresis of *Leclercia adedecarboxylata* strains using *XbaI* as restriction enzyme. Three groups can be identified, two of them with a Dice coefficient greater than 0.8 suggesting a clonal origin

**Table 1** Genomic traits of the assembled genomes of *Leclercia adedecarboxylata* strains

No	Strain genome	Assembly size (Mpbs)	# of Contigs	n50	Longest contig	G + C %
1	La1	5.4	191	128,391	351,899	55.13
2	La2	5.4	127	156,871	393,544	55.12
3	La5	5.4	157	156,871	517,169	55.13
4	La6	5.4	151	164,727	360,791	55.11
5	La9	5.4	151	140,256	160,935	55.11
6	La10	5.3	145	135,630	498,115	55.10
7	La13	5.4	224	135,555	357,264	55.11
8	La14	5.4	229	156,712	388,518	55.15
9	La17	5.4	160	140,516	393,633	55.12
10	La20	5.4	156	190,138	349,414	55.18
11	La23	5.4	149	140,480	393,458	55.16
12	La25	5.4	146	131,360	517,121	55.11
13	La27	5.4	156	156,871	360,047	55.12
14	La34*	5.3	164	140,352	393,536	55.27
15	La36	5.4	151	128,391	388,374	55.12
16	La40	5.4	143	135,539	388,695	55.12

\**Leclercia adedecarboxylata* strains corresponded to bloodstream infection samples except Strain34 which was obtained from a contaminated parenteral nutrition product

### The genomic load of *L. adedecarboxylata* includes resistance genes and virulence determinants

Once the assemblies were generated, resistance genetic determinants were investigated using the Center for Genomic Epidemiology database. We identified 24 resistance genes related to eight antibiotic groups (aminoglycosides, quinolones,  $\beta$ -lactams, chloramphenicol, sulfonamides, folate synthesis inhibitors, colistin and carbapenems). The 16 strains had positive identification of all genes, except for eight of them, which were absent in the strain from the contaminated

parenteral nutrition product. This last strain was not under antimicrobial selection pressure (Table 2).

Using the same online platform, we also identified 2 incompatibility groups from *Serratia marcescens* (IncHI2 and IncHI2A) and one from *Yersinia pestis* (IncPII) indicating the presence of at least one mobilizable plasmid in all 16 strains (Table 3).

When we compared the presence of resistance genes across all genomes, we found that 14 genes were only observed in the 16 strains of this study (Fig. 3). Furthermore, when the 16 genomes of *L. adedecarboxylata* were processed

**Table 2** Resistance genes identified in silico within the *Leclercia adecarboxylata* genomes sequenced in this study

Gene Genome	Coli- <i>B. lactans</i> <sup>a</sup>		Sub- <i>E. coli</i> <sup>b</sup>		Aminoglycoside <sup>c</sup>		Trimethoprim <sup>d</sup>		Chlo- <i>Quinolone</i> <sup>e</sup>		Carbapenem efflux pump component <sup>g</sup>								
	<i>acr-9</i>	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-12</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-13</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-14</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-15</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-16</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-17</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-18</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-19</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-20</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-21</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-22</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-23</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-24</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-25</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-26</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-27</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-28</sub></i>
La1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
La2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
La5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
La6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
La9	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
La10	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
La13	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
La14	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
La17	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
La20	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
La23	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
La25	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
La27	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
La34 <sup>h</sup>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
La36	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
La40	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

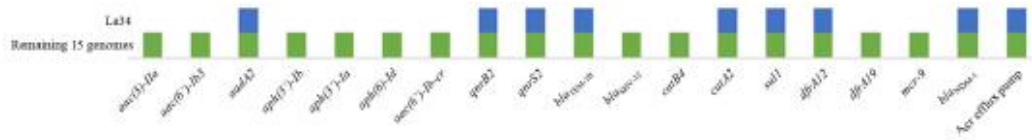
An "x" refers to a positive identification of the gene, a word "N" refers to a not-identified gene  
<sup>a</sup>*Leclercia adecarboxylata* strains corresponded to bloodstream infection samples except La34 who was obtained from a contaminated parenteral nutrition product  
<sup>b</sup>Resistance genes were determined using the Center for Genomic Epidemiology database  
<sup>c</sup>Carbapenem efflux pump component genes were determined using alignments with BlasN algorithm  
<sup>d</sup>*acrD* and *acrZ* were identified in different nodes, the remaining carbapenem efflux pump component genes, where located in a same single node

under the PathogenFinder algorithm, we found a pathogenic index of 0.82 for each one, which suggests a high potential to be considered human pathogens (Fig. 4). This analysis

showed the presence of genetic determinants of virulence associated with infections caused by *E. coli*, *Chronobacter sakazakii*, *Citrobacter koseri*, *Acinetobacter baumannii*,

**Table 3** Incompatibility groups identified in the genomes assembled of *Leclercia adecarboxylata* strains

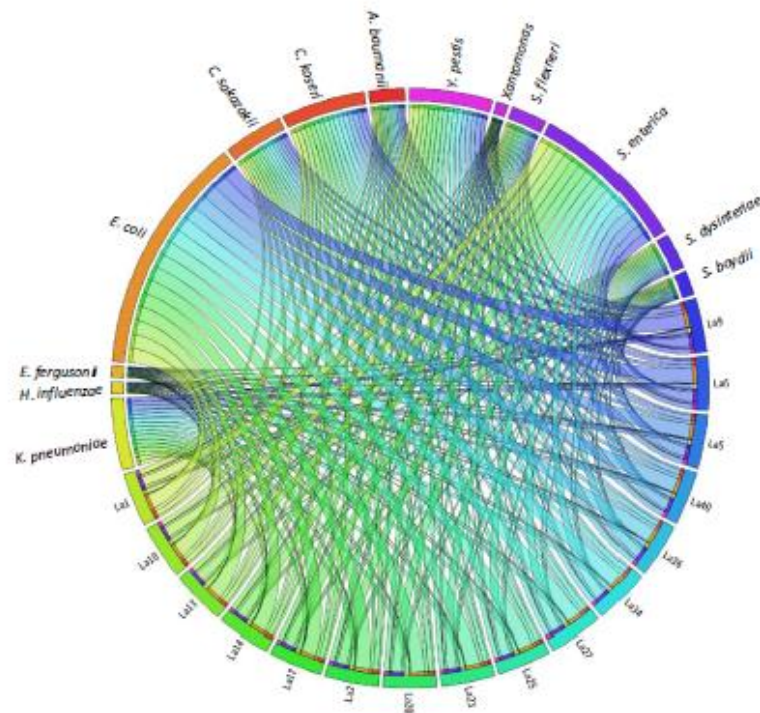
Incompatibility group	Identity (%)	Organism previously reported	Accession number
IncFII	99.13	<i>Yersinia pestis</i>	CP000670
IncHI2	100	<i>Serratia marcescens</i>	BX664015
IncHI2A	100	<i>Serratia marcescens</i>	BX664015



**Fig. 3** Differential presence of resistance genes identified in the 16 *Leclercia adecarboxylata* genomes. The separation of genome La34 (dark blue square) and the remaining 15 genomes (green square) was based on their origin (contaminated parenteral nutrition product and bloodstream infection samples respectively). A colored square represents the presence of the gene. Identified genes confer resist-

ance to aminoglycosides (*aac(3)-Ib*, *aac(6)-Ib3*, *aadA2*, *aph(3)-Ib*, *aph(3)-Ia*, *aph(6)-Ia*), quinolones (*aac(6)-Ib-cr*, *qnrB*, *qnrS*),  $\beta$ -lactams (*bla<sub>TEM-1B</sub>*, *bla<sub>SHV-12</sub>*), chloramphenicol (*catB4*, *cavA2*), sulfonamides (*sulI*), folate synthesis inhibitors (*dfrA12*, *dfrA19*), colistin (*mcr-9*), carbapenems (*bla<sub>NDM-1</sub>*) and the components of the Acr efflux pump (*acrA*, *acrB*, *acrD*, *acrE*, *acrF*, *acrR*, *acrZ*, *tolC*)

**Fig. 4** Correlation between pathogenic genes identified in human pathogens (upper fragments) and those identified within *Leclercia adecarboxylata* genomes (La#). A wider bar in a recognized pathogens indicates a bigger number of genes associated to a human diseases also present in *Leclercia adecarboxylata* genome



*Yersinia pestis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, and *Shigella boydii*.

Pathogenicity Islands were not identified but 36 phage sequences were found suggesting this origin as a source of genetic variability (Supplementary Fig. 1). Three empty integrons were also found in all 16 *L. adedecarboxylata* genomes (Fig. 5).

### The finding of a novel FosA variant

Using the genomic information obtained, an alignment of the previously reported FosA proteins and the one found in our subset of strains was performed. The aminoacidic sequence showed important differences between each variant and the consensus sequence obtained from the 16 genomes from this study. According to it, a phylogenetic Neighbor-joining tree was obtained, it showed close proximity between FosA8 and the FosA protein from the 16 genomes sequenced (Fig. 6); an additional alignment with only those two amino acid sequences, showed 3 changes TxA at position 20, TxQ at position 56 and KxQ at position 85. Additionally, we aligned the amino acid sequence of the FosA<sup>LA</sup> protein with the consensus sequence of the 16 genomes and obtained

the changes of TxA at position 20, TxQ at position 56, KxQ at position 85, YxC at position 126 and ExD at position 139. This finding indicates that all 16 strains harbor a new variant of FosA protein that we name FosA<sup>LA2</sup> (Fig. 7).

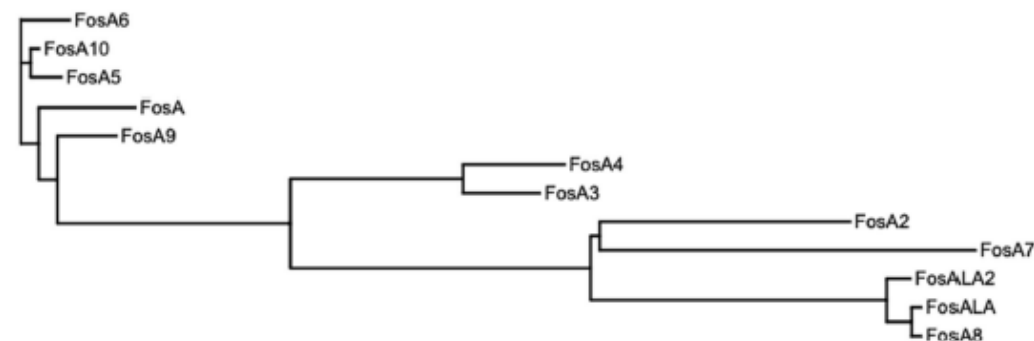
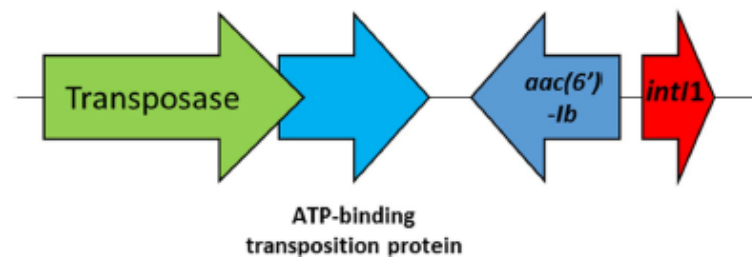
### Phylogenetical characterization

A phylogenomic tree using VAMPhyRE software was constructed comparing 128 *L. adedecarboxylata* genomes publicly available from NCBI with the 16 genomes obtained in this study. Tree confirmed that Mexican strains are clustered in only one group, whereas strains from other regions are distributed throughout the tree (Fig. 8) reinforcing the hypothesis of the clonal origin of the sequenced strains.

### Discussion

*L. adedecarboxylata* is a Gram-negative rod that rarely causes infections particularly affecting immunocompromised hosts. It has been isolated from several sources including animals, humans, and the environment (Yu et al. 2012; Stepien-Pysniak 2010; Schierack et al. 2007). *L.*

**Fig. 5** Genetic arrangement of a non-classic integron found in every single genome assembled, another three empty integrons were also found in all 16 genomes



**Fig. 6** Neighbor-joining tree of the FosA enzymes. Resulting phylogeny showed a close relationship between FosA<sup>LA</sup> and FosA8 proteins, but the amino acid sequence of the FosA<sup>LA2</sup> protein harbored in the strains sequenced appear slightly separated from this clade



natural resistance to Penicillin and Fosfomycin (Correa et al. 2012), that trait is useful for clinical discrimination between *L. adedecarboxylata* and *E. coli* strains. The 28 isolates reported here, showed resistance to several antibiotics used in the clinical practice, opposite to previously reported but consistent with studies performed by Shin et al. 2012, where a multidrug-resistant isolate of *L. adedecarboxylata* was linked to a catheter-related bacteremia (Shin et al. 2012). In that sense, García-Fulgeiras et al. 2014, reported an MDR *L. adedecarboxylata* strain harboring resistance determinants encoded into an IncHI1/HI2 conjugative plasmid (García-Fulgeiras 2014); interestingly, we found at least one IncHI2 plasmid in each sequenced strains, representing a potential conjugative platform that might explain the acquisition of resistant determinants through horizontal gene transfer or act as a donor for another bacterial genus. A slight difference between the genome of the strain isolated from the parenteral nutrition bottle (La34) and those obtained from the blood culture is close to 1%; when we searched for GIs, the algorithms yielded similar predictions for all genomes except for the genome of La34 where a unique area of overlap was identified, that section of the genome consists of several hypothetical proteins, a recombinase and motility genes. This genetic load could have importance depending on the microenvironment where the strains were obtained (Supplementary Fig. 1), however future experiments will be necessary.

Horizontal gene transfer involves the transmission of plasmids that carry resistance determinants but can also harbor virulence determinants; although *L. adedecarboxylata* remains as an opportunistic pathogen, here we report the identification in sequenced genomes of several genetic regions related to virulence factors previously reported in human pathogens including members of *Enterobacteriaceae* and microorganisms such as *Acinetobacter baumannii* and *Haemophilus influenzae* that are considered causative agents of healthcare-associated infections. To our knowledge, this is the first report of *L. adedecarboxylata* strains as a potential pathogen in immunocompetent persons.

Pulsed field gel electrophoresis is a useful molecular tool to establish a clonal relationship, we performed PFGE assays that established a close clonal distribution confirming the outbreak theory, which correlates with the unique origin of parenteral nutrition, which all patients underwent.

Regarding antimicrobial resistance, genes encoding resistance and incompatibility groups, we found results very similar to Garza-González et al. since our study involved the same bloodstream infection outbreak. However, our whole sequencing analysis involved not only two samples, but 16 sequenced *Leclercia adedecarboxylata* genomes obtained from 15 clinical and one sample from a parenteral nutrition product (Garza-González et al. 2021). Interestingly, the

sequenced strain derived from the contaminated parenteral nutrition product, showed that 8 of 24 resistance genes were not present.

Another interesting finding was the presence of a novel FosA variant named FosA<sup>LA2</sup>, which presented several changes with the previously reported FosA proteins (FosA1-FosA10). Poirel et al., showed 66% and 79% amino acid identity between FosA8 and FosA1 or FosA7 enzymes respectively (Poirel et al. 2019). Here, we report a 96.5% of amino acid identity between the FosA8 and FosA<sup>LA2</sup>, and a 96.45% between FosA<sup>LA</sup> and FosA<sup>LA2</sup>. The Neighbor-joining tree of these genes showed the FosA<sup>LA2</sup> in a separated clade from FosA<sup>LA</sup> and FosA8 bearing out it as a new variant. More experimental procedures will be needed to evaluate the effects of the presence of this gene.

## Conclusions

Undoubtedly, the appearance of bacterial genera as emerging pathogens represents an important challenge for correct identification, treatment, and surveillance. Pathogens classically considered as commensals may acquire genetic determinants that provide mechanisms of host damage and go unnoticed in clinical diagnosis. The genomic plasticity of bacteria reiterates the need to expand epidemiological surveillance to emerging bacterial genera. *L. adedecarboxylata* is a harmless microorganism sensitive to most antibiotics, but it can evolve in a variety of ways including the acquisition of resistance and virulence genes representing a therapeutic challenge in patient care.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s13258-022-01348-4>.

**Acknowledgements** We would like to thank Silvia Jiménez Sánchez and Santiago Murguía González from Centro Médico Nacional de Occidente, IMSS for their contribution in identifying the cases and collecting the samples used in this analysis. We would also like to thank the Graduated Program of Microbiology at the Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas-ICUAP BUAP. BPF had a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No. 1169928. This work was supported by the IMSS FIS/IMSS/PROY/LABSEC.

**Author contribution** EBV conceptualization, methodology, software, validation, formal analysis, investigation, data curation, writing-original draft preparation, visualization. BPF methodology, software, investigation, data curation. RCO conceptualization and data curation. IAM conceptualization, writing-review, and editing. MGL conceptualization. MCP methodology. FJGC methodology. CGT methodology. EA methodology. JGI: supervision. FJTL supervision. HRV writing-review and editing, supervision, project administration. CRGB conceptualization, writing-review and editing, supervision, project administration, funding. RdCRG conceptualization, writing-review and editing, supervision, project administration.

**Funding** Instituto Mexicano del Seguro Social, FIS/IMSS/PROY/LABSEC, César R. González-Bonilla.

**Availability of data and materials** All supporting data, code, and protocols have been provided within the article or through supplementary data files. Raw data were submitted to NCBI under BioProject PRJNA831881.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors EBV, BPF, RCO, IJAM, MGL, MCP, FJGC, CGT, EA, JGI, FJTL, HRV, CRGB and RdCRG declare that they have no conflict of interest.

## References


- Anuradha M (2014) *Leclercia adecarboxylata* isolation: case reports and review. *J Clin Diagn Res*. 8:DD03–DD04. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/9763.5260>
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formisano K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O (2008) The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Bertelli C, Laird MR, Williams KP, Lau BY, Hoad G, Winsor G, Brinkman F, Simon Fraser University Research Computing G (2017) IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Res* 45(W1):W30–W5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx343>
- Bortolonia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattor V, Philippon A, Allesoe RL, Rebelo AR, Florensa AF et al (2020) ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother* 75(12):3491–500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
- Carrón-León EA (2019) Estudio molecular de la resistencia y virulencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de vegetales crudos. Master Degree Theses, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/4692>
- Chao CT, Hung PH, Huang JW, Tsai HB (2014) Cycler cassette rupture with *Leclercia adecarboxylata* peritoneal dialysis peritonitis. *Perit Dial Int* 34:131–133. <https://doi.org/10.3747/pdi.2012.00253>
- Correa AL, Mazo LM, Valderrama MP, Restrepo A, Jaimes F (2012) Descripción de un brote de bacteriemia por *Leclercia adecarboxylata* probablemente asociado al uso de viales contaminados de heparina. *Infectio* 16:117–21. <https://doi.org/10.22354/in.v16i2.528>
- Cosentino S, Voldby Larsen M, Møller Aarestrup F, Lund O (2013) PathogenFinder—distinguishing friend from foe using bacterial whole genome sequence data. *PLoS ONE* 8(10):e77302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077302>
- Fattal O, Deville JG (2000) *Leclercia adecarboxylata* peritonitis in a child receiving chronic peritoneal dialysis. *Pediatr Nephrol* 15:186–187. <https://doi.org/10.1007/s004670000436>
- García-Fulgueiras V, Seija V, Aguerrebere P, Cordeiro NF, Vignoli R (2014) First report of a clinical isolate of *Leclercia adecarboxylata* harbouring multiple resistance genes in Uruguay and review of the literature. *J Glob Antimicrob Resist* 2(2):77–81. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.01.002>
- Garza-González E, Bocanegra-Ibarias P, Rodríguez-Noriega E, González-Díaz E, Silva-Sánchez J, Garza-Ramos U, Contreras-Coronado-Tovar IF, Santos-Hernández JE, Gutiérrez-Bañuelos D, Mena-Ramírez JP et al (2021) Molecular investigation of an outbreak associated with total parenteral nutrition contaminated with NDM-producing *Leclercia adecarboxylata*. *BMC Infect Dis* 21:1–8. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-05923-0>
- González-Arenas E, González-Castillo Z, Gómez-Guillermoprieto L, Ordóñez-Gutiérrez E (2011) Sepsis nosocomial por *Leclercia adecarboxylata* en un lactante. *Acta Pediatr Mex* 32(5):1–4. <https://doi.org/10.18233/APM32No5pp273-276>
- Grantham WJ, Funk SS, Schoenecker JG (2015) *Leclercia adecarboxylata* musculoskeletal infection in an immune competent pediatric patient: an emerging pathogen? *Case Rep Orthop*. <https://doi.org/10.1155/2015/160473>
- Keren Y, Keshet D, Eidelman M, Geffen Y, Raz-Pastur A, Hussein S K (2014) *Leclercia adecarboxylata* a new and unfamiliar marine pathogen? *J Clin Microbiol* 52(5):1775–1776. <https://doi.org/10.1128/JCM.03239-13>
- Keyes J, Johnson EP, Epelman M, Cadilla A, Ali S (2020) *Leclercia adecarboxylata*: an emerging pathogen among pediatric infections. *Cureus* 12(5):e8049. <https://doi.org/10.7759/cureus.8049>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35(6):1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Mayfield C, Haglin J, Konda S, Tejwani M, Ego K (2019) Post-operative orthopedic infection with monomicrobial *Leclercia adecarboxylata*. *J Bone Jt Surg* 9(3):1–4. <https://doi.org/10.2106/JBJS.CC.18.00297>
- Merza N, Lung J, Taha A, Qasim A, Frost J, Naguib T (2019) *Leclercia adecarboxylata* cholecystitis with septic shock in immunocompetent patient. *Case Rep Crit Care*. <https://doi.org/10.1155/2019/5057071>
- Poiteil L, Vuillemin X, Kieffer N, Muetler L, Descombes M, Nordmann P (2019) Identification of FosA8, a Plasmid-Encoded Fosfomycin Resistance Determinant from *Escherichia coli*, and Its Origin in *Leclercia adecarboxylata*. *Antimicrob Agents Chemother*. <https://doi.org/10.1128/AAC.01403-19>
- Schierack P, Walk N, Reiter K, Weyrauch KD, Wieler LH (2007) Composition of intestinal *Enterobacteriaceae* populations of healthy domestic pigs. *Microbiology* 153:3830–3837. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010173-0>
- Shin G, You MJ, Lee H, Lee CS (2012) Catheter-Related Bacteremia Caused by Multidrug-Resistant *Leclercia adecarboxylata* in a Patient with Breast Cancer. *J Clin Microbiol* 50(9):3129–3132. <https://doi.org/10.1128/JCM.00948-12>
- Spiegelhauer MR, Andersen PF, Frandsen TH, Nordestgaard RLM, Andersen LP (2019) *Leclercia adecarboxylata*: a case report and literature review of 74 cases demonstrating its pathogenicity in immunocompromised patients. *Infect Dis (Lond)* 51(3):179–188. <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1536830>
- Stepien-Pysniak D (2010) Occurrence of gram-negative bacteria in hens' eggs depending on their source and storage conditions. *Pol J Vet Sci* 13:507–513
- Tamura K, Sakazaki R, Kosako Y, Yoshizaki E (1986) *Leclercia adecarboxylata* Gen. Nov., Comb. Nov., formerly known as *Escherichia adecarboxylata*. *Curr Microbiol* 13(4):179–84. <https://doi.org/10.1007/bf01568943>
- Vinué L, Saenz Y, Martínez S, Somalo S, Moreno MA, Torres C, Zarazaga M (2009) Prevalence and diversity of extended-spectrum beta-lactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humans in Spain. *Clin Microbiol Infect* 15(10):954–957. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02803.x>
- Walker DI, McQuillan J, Taiwo M, Parks R, Stenton CA, Morgan H, Mowlem MC, Lees DN (2017) A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. *Water Res* 126:101–110. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.032>
- Yu C, Hongwei G, Yanming Z, Deng M, Wu Z, Zhu L, Duan Q, Biao Xu, Chengshu L, Yue Z et al (2012) Analysis of the bacterial

diversity existing on animal hide and wool: development of a preliminary PCR-restriction fragment length polymorphism fingerprint database for identifying isolates. *J AOAC Int* 95:1750–1754. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-482>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

## Authors and Affiliations

Edwin Barrios-Villa<sup>1</sup> · Brenda Pacheco-Flores<sup>2</sup> · Patricia Lozano-Zaraín<sup>2</sup> · Rodolfo Del Campo-Ortega<sup>3</sup> · Ivan de Jesús Ascencio-Montiel<sup>4</sup> · Margot González-León<sup>5</sup> · Margarita Camorlinga-Ponce<sup>6</sup> · Francisco Javier Gaytán Cervantes<sup>7</sup> · Carolina González Torres<sup>7</sup> · Emmanuel Aguilar<sup>8</sup> · Joaquín González Ibarra<sup>9</sup> · Francisco Javier Torres López<sup>10</sup> · Haydeé Rosas-Vargas<sup>11</sup> · César R. González-Bonilla<sup>11,12</sup> · Rosa del Carmen Rocha-Gracia<sup>2</sup> 

Edwin Barrios-Villa  
edwin.barrios@unison.mx

Brenda Pacheco-Flores  
pachbren25@gmail.com

Patricia Lozano-Zaraín  
plozano\_zarain@hotmail.com

Rodolfo Del Campo-Ortega  
drdelcampo@gmail.com

Ivan de Jesús Ascencio-Montiel  
ivan-ascencio@hotmail.com

Margot González-León  
margot.gonzalezl@gmail.com

Margarita Camorlinga-Ponce  
margaritacamorlinga@yahoo.com

Francisco Javier Gaytán Cervantes  
unidadsecimss@gmail.com

Carolina González Torres  
unidadsecimss@gmail.com

Emmanuel Aguilar  
emmanuel\_aguilazamora@hotmail.com

Joaquín González Ibarra  
joaquin.gonzalezj@imss.gob.mx

Francisco Javier Torres López  
uimeip@gmail.com

Haydeé Rosas-Vargas  
hayrov@gmail.com

César R. González-Bonilla  
c.gonzalez.bonilla@gmail.com

Irigoyen S/N, col. Eleazar Ortiz, Sonora 83621 H. Caborca, Mexico

<sup>2</sup> Posgrado en Microbiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Av. San Claudio S/N, 72570 Puebla, Mexico

<sup>3</sup> Coordinación de Evaluación de la Calidad Médica, Instituto Mexicano del Seguro Social, 06720 Mexico City, Mexico

<sup>4</sup> Coordinación de Vigilancia Epidemiológica, Instituto Mexicano del Seguro Social, 03100 Mexico City, Mexico

<sup>5</sup> Dirección de Prestaciones Médicas, Instituto Mexicano del Seguro Social, 06600 Mexico City, Mexico

<sup>6</sup> Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Instituto Mexicano del Seguro Social, 06720 Mexico City, Mexico

<sup>7</sup> Laboratorio de Secuenciación, División de Desarrollo de la Investigación, Centro Médico Nacional "Siglo XXI", Instituto Mexicano del Seguro Social, 06720 Mexico City, Mexico

<sup>8</sup> Departamento de Microbiología, Microbiología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN), Mexico City, Mexico

<sup>9</sup> Coordinación de Investigación en Salud, Centro Médico Nacional "Siglo XXI", Instituto Mexicano del Seguro Social, 06720 Mexico City, Mexico

<sup>10</sup> Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Instituto Mexicano del Seguro Social, 06720 Mexico City, Mexico

<sup>11</sup> Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional "Siglo XXI", Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), 06720 Mexico City, Mexico

<sup>12</sup> Present Address: Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City, Mexico

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de Microorganismos de Interés Clínico y Económico, Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Av. Universidad e