



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



Facultad de Medicina  
Licenciatura en Biomedicina  
Eje de Microbiología

**Relación clonal y caracterización molecular de la resistencia de *Leclercia*  
*adecarboxylata* aislada de hospitales de Guadalajara, Jalisco.**

Tesis para obtener el grado de:

Licenciada en Biomedicina

Presenta:

**Brenda Pacheco Flores**

Director experto:

D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia

Director metodológico:

D.C. Patricia Lozano Zaráin

Co-Director:

D.C. Edwin Barrios Villa

Lugar de realización:

Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas

Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Puebla, Pue., noviembre 2021

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, por ser la casa de estudios que me acogió durante estos años, en sus aulas, en sus laboratorios, en sus instalaciones, y de no haber sido por una pandemia, habría gozado de más tiempo en tan maravilloso Campus.

A la **Facultad de Medicina y a la Licenciatura en Biomedicina**, por el apoyo brindado durante estos cinco años de mi formación como profesional, por las soluciones a los diversos problemas en el ámbito estudiantil, y por brindarme el espacio para desarrollarme y crecer en muchos ámbitos.

Al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas** por permitirme conocer a tan maravillosos doctores/as que forman parte la plantilla de docentes investigadores, por brindarme un cálido ambiente en sus laboratorios y aulas, por el conocimiento obtenido dentro de sus instalaciones y por permitirme desarrollar como alumna.

Al **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad** del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por 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**, **Hospital General de Zona 21** y al **Hospital General Regional 180 de Tlajomulco**.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la **D. en C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, por recibirme como tesista en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, por estos años en los que me brindo las herramientas necesarias para culminar esta tesis, por su atención, apoyo y valioso tiempo prestado para las revisiones de este proyecto, por las vivencias en el laboratorio, por crear un grupo muy bonito de profesionistas en formación y por permitirme trabajar con las cepas de *Leclercia* de las que tanto me he enamorado. Muchas gracias.

A la **D. en C. Patricia Lozano Zarain**, por todo el apoyo y la atención prestada dentro del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, y por su valioso tiempo dedicado en las revisiones de esta tesis, por los comentarios y sugerencias que me sirvieron de mucho para poder culminarla, de verdad, le agradezco mucho.

Al **D. en C. Edwin Barrios Villa**, por el tiempo, la atención, asesoría y el apoyo brindado dentro del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, en el Programa Delfín edición 26 y en línea, gracias por el aprendizaje de todas las técnicas utilizadas y por todo el conocimiento que me brindo a cerca de estas cepas, por su valioso aporte en las revisiones del presente trabajo, le agradezco mucho.

Al **D. en C. Gerardo Cortés Cortés**, por su tiempo, por su apoyo y por el gran aporte que me brindo en la determinación de la relación clonal, así como por las asesorías que enriquecieron esta tesis, muchas gracias.

A la **D. en C. Margarita María De La Paz Arenas Hernández**, por su valioso tiempo dedicado en las revisiones de este trabajo, por sus comentarios y sugerencias para mejorar este proyecto, además de sus valiosos conocimientos compartidos en el salón de clases, gracias.

A todos los **profesores** de la Facultad de Medicina y del Instituto de Ciencias Microbiológicas, les agradezco infinitamente todas sus enseñanzas, experiencias,

aportaciones y motivaciones, que le sirvieron de mucho a mi persona, a la estudiante que fui y a la profesionista que seré.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

- **A mi madre**

### **Isabel**

Gracias por acompañarme en cada etapa de mi vida, especialmente en esta, que fue tan importante, tan confusa y tan difícil al principio para mí; por todo el esfuerzo que hiciste para que yo tuviera una educación y así, herramientas para salir al mundo. Por creer en mí, por no dejarme nunca, por tu apoyo ilimitado, por tu confianza, por ser el más grande impulso que tengo en la vida, por ser mi motor.

Te agradezco a ti más que a nadie este logro, sin duda, si no hubieras creído en mí, apoyado, alentado, soportado, guiado y amado como lo haces, yo no estaría escribiendo esto. Gracias por no soltarme, por todo lo que hiciste y haces por mí, este y todos mis logros son y serán tuyos. Te amo infinitamente.

- **A Geovanny**

Gracias amor, por tus palabras de aliento, por tu comprensión, por soportar todo el estrés por el que pasé, por desvelarte conmigo en las noches de estudio, gracias por ver por mí, por cuidarme, por alimentarme, por entenderme, por ayudarme en mis tramites, por tu enorme paciencia y principalmente por todo tu amor, porque en los días mas difíciles has sabido comprenderme y amarme; le agradezco a la vida crecer junto a ti, que me comprendas y apoyes en todos mis sueños, esto también es tuyo, Te amo siempre.

- **A mis amigos biomédicos**

Sin duda, aprendí a quererlos, gracias por estos años compartiendo aulas, por todos los desayunos, por todos los conocimientos compartidos, por todas las risas o las lágrimas, por aguantarme, por alimentarme, bríndame su compañía y amistad, por ser parte de esta etapa. A **Araceli**, amiga, hoy puedo decir que, si se logró, siempre te voy

a agradecer el apoyo, cariño, confianza, la comprensión y el amor que me brindaste en los primeros años, nos costó, pero al final valió la pena todo lo que vivimos, espero que al igual que yo ahora recuerdes el inicio de todo esto con cariño y muchas risas. Siempre serás una persona muy importante en esta etapa. A **Diana**, sinceramente agradezco tu compañía, fuiste clave en mi vida universitaria, gracias por ayudarme, por ser mi hermana de laboratorio, por cada palabra de aliento, por tu complicidad, por entenderme, por escucharme, por apoyarme, por todas las convivencias juntas, por alimentarme y por recibirme siempre en tu casa, aprecio mucho tu amistad. A **David Eduardo**, a **Gaona** y a **Alejandro**, por ser grandes amigos, por hacerme reír, por aguantarme, por su amistad sincera, por las porras, por dejarse quitar la comida, por las fiestas, locuras y por todo lo que vivimos estos años de universidad.

A mis **compañeros del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad**, por el compañerismo, por guiarme, enseñarme y resolver dudas acerca de la microbiología, a **Elenita**, por ser clave en el laboratorio y ayudarme con las preguntas que tenía. A **Edwin, Eder, Gerardo, Deisy, Cristi, Flor, Pato, Marco, René, Miranda, Midory, Mariela** y **Dianita**, por todo lo que me enseñaron en el laboratorio, por explicarme muchas cosas, muchas técnicas, por los consejos, la convivencia y la ayuda que me brindaron en este proceso.

A mis **compañeros de microbiología**, porque hicieron muy divertida la convivencia en el eje de microbiología a pesar de que éramos pocas personas, siempre sentí su amistad, su apoyo y cariño; por los desayunos mensuales que realizábamos y en general, por todos los momentos compartidos.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>12</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
2.1. LECLERCIA ADECARBOXYLATA .....	13
2.2. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN LECLERCIA ADECARBOXYLATA.....	16
2.2.1. Resistencia a fosfomicina .....	16
2.3. Clasificación de los Antibióticos.....	18
2.4. Mecanismos de resistencia a los antibióticos.....	20
2.4.1. Betalactamasas.....	20
2.4.2. Carbapenemasas.....	22
<b>3. ANTECEDENTES .....</b>	<b>23</b>
3.1. ANTECEDENTES GENERALES.....	23
3.1.1. Caracterización de Leclercia adecarboxylata en otros países.....	23
3.2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS .....	26
3.2.1. Trabajos realizados con Leclercia adecarboxylata en México .....	26
3.2.2. Leclercia adecarboxylata en Jalisco.....	27
<b>4. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>28</b>
<b>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>28</b>
<b>6. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
6.1. OBJETIVO GENERAL:.....	29
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	29
6.2.1. Estrategia de trabajo.....	30
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
7.1. DISEÑO DEL ESTUDIO .....	30
7.2. UBICACIÓN ESPACIO TEMPORAL.....	30
7.3. MUESTREO.....	31
7.3.1. Definición de Unidad de Población.....	31
7.3.2. Selección de la muestra.....	31
7.3.3. Criterios de Selección de las unidades de Muestreo.....	31
7.3.4. Diseño y tipo de muestreo .....	31
7.3.5. Tamaño de la muestra.....	32
7.4. DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICIÓN .....	32
7.5. MÉTODO DE RECOLECCIÓN DE DATOS .....	33
7.6. RECURSOS HUMANOS.....	33
7.7. RECURSOS MATERIALES.....	33
7.8. RECURSOS FINANCIEROS.....	33
7.9. BIOÉTICA.....	34
7.10. MATERIAL BIOLÓGICO .....	34
7.11. EXTRACCIÓN DE ADN POR TÉCNICA DE HERVIDO.....	35
7.12. CUANTIFICACIÓN Y PUREZA DE ADN .....	35
7.13. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA .....	36
7.13.1. Confirmación de género por pruebas bioquímicas .....	36
7.13.2. Identificación molecular.....	36
7.13.3. Identificación bioinformática del gen fosA .....	38

7.14.	SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	38
7.15.	PRODUCCIÓN FENOTÍPICA DE BLEE .....	40
7.16.	BÚSQUEDA DE GENES DE RESISTENCIA.....	41
7.16.1.	<i>Amplificación de genes de resistencia por PCR.....</i>	41
7.16.2.	<i>Detección bioinformática de genes de resistencia.....</i>	42
7.17.	RELACIÓN CLONAL.....	42
7.17.1.	<i>Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE).....</i>	42
7.17.2.	<i>Análisis estadístico.....</i>	44
7.17.3.	<i>Árbol filogenético.....</i>	45
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
8.1.	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA, MOLECULAR Y BIOINFORMÁTICA DE LAS CEPAS DE <i>L. ADECARBOXYLATA</i> .....	45
8.1.1.	<i>Identificación bioquímica.....</i>	45
8.1.2.	<i>Identificación molecular.....</i>	49
8.1.3.	<i>Identificación mediante bioinformática del gen fosA.....</i>	50
8.2.	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y FENOTIPO DE LA PRODUCCIÓN DE B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE).....	54
8.2.1.	<i>Perfil de susceptibilidad antimicrobiana.....</i>	54
8.2.2.	<i>Producción fenotípica de BLEE.....</i>	55
8.3.	IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA.....	58
8.3.1.	<i>Detección molecular de genes de resistencia a carbapenemasas.....</i>	58
8.3.2.	<i>Detección bioinformática de genes de resistencia de tipo serin-β-lactamasas y carbapenemasas.....</i>	62
8.4.	RELACIÓN CLONAL.....	64
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>64</b>
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>11.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>70</b>
<b>12.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>71</b>
<b>13.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>76</b>
	<i>ANEXO 1. ESTRUCTURAS DE ANTIBIÓTICOS B-LACTÁMICOS.....</i>	76
	<i>ANEXO 2. IMAGEN DE LA PRUEBA BIOQUÍMICA LIA EN CEPAS DE L. ADECARBOXYLATA.....</i>	76
	<i>ANEXO 3. DISTRIBUCIÓN DE LOS SENSIDISCOS DE ANTIBIÓTICOS EN PLACA DE LA TÉCNICA KIRBY-BAÜER.....</i>	77
	<i>ANEXO 4. MATRIZ DE DATOS EMPLEADA PARA REALIZA ÁRBOL FILOGENÉTICO DE L. ADECARBOXYLATA CON BASE A F. J. ROHLF 1998, EN NTSYSpc 2.21s.....</i>	78
	<i>ANEXO 5: PERFIL DE RESULTADOS PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS CONVENCIONALES UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE E. COLI Y L. ADECARBOXYLATA.....</i>	79
	<i>ANEXO 6. GELES DE PFGE PARA RELACIONAR LAS CLONAS DE L. ADECARBOXYLATA.....</i>	80
	<i>ANEXO 7. LISTA PUBLICADA POR LA OMS, 2017 DE PATÓGENOS PRIORITARIOS PARA LA CREACIÓN DE NUEVOS ANTIBIÓTICOS.....</i>	81

## INDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
<b>1</b>	Resultados de los estudios microbiológicos de los viales de heparina	14
<b>2</b>	Cepas controles	34
<b>3</b>	Oligonucleótidos y condiciones de amplificación del gen <i>uidA</i> mediante PCR, para la identificación de <i>E. coli</i> .	37
<b>4</b>	Oligonucleótidos y condiciones de amplificación del gen <i>ybbW</i> mediante PCR, para la identificación de <i>E. coli</i> .	37
<b>5</b>	Componentes para una reacción de PCR	37
<b>6</b>	Puntos de corte para la determinación del fenotipo de resistencia establecidos en el CLSI 2019	39
<b>7</b>	Oligonucleótidos utilizados en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad para la amplificación de genes de resistencia a carbapenemasas (de tipo metalo- $\beta$ -lactamasas).	41
<b>8</b>	Sitios de corte de la enzima <i>XbaI</i>	44
<b>9</b>	Datos de las cepas de <i>L. adecarboxylata</i> aisladas de cinco hospitales en Guadalajara, Jalisco.	46
<b>10</b>	Resultados de las pruebas bioquímicas de las 28 cepas de <i>L. adecarboxylata</i>	48
<b>11</b>	Fenotipo de resistencia y fenotipo BLEE de las cepas de <i>L. adecarboxylata</i>	58
<b>12</b>	Resultados del análisis bioinformático para el genotipo de resistencia en 16 cepas de <i>L. adecarboxylata</i> .	62



## INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Árbol filogenético de las proteínas FosA identificadas por el método de distancia utilizando el algoritmo de unión de vecinos.	17
2	Gen <i>fosA<sup>LA</sup></i> y <i>fos<sup>A8</sup></i> (A) Gen <i>fosA<sup>LA</sup></i> en el cromosoma de <i>L. adecarboxylata</i> . B) Gen <i>fosA8</i> en el plásmido p376 de <i>E. coli</i> 376.	18
3	Relaciones moleculares y funcionales entre $\beta$ -lactamasas que confieren resistencia a cefalosporinas o carbapenémicos.	21
4	Plásmido pLec-476cz, portador de un elemento conjugativo integrativo (ICE) similar a Tn 4371, una secuencia de profago similar a CP4 y una región MDR.	24
5	Esquema de la estrategia de trabajo.	30
6	Determinación de BLEE, mediante el método de difusión de doble disco.	40
7	Crecimiento bacteriano de <i>L. adecarboxylata</i> . <b>A)</b> Crecimiento bacteriano de <i>L. adecarboxylata</i> en agar MacConkey <b>B)</b> Crecimiento bacteriano de cepas de <i>L. adecarboxylata</i> y de la cepa control de <i>E. coli</i> C7223, en medio EMB-Levine.	47
8	Resultados de pruebas bioquímicas para la identificación de <i>L. adecarboxylata</i> .	48
9	Amplificación del gen <i>uidA</i> , mediante PCR.	49
10	Amplificación del gen <i>ybbW</i> , mediante PCR.	50
11	Imagen representativa de la identificación mediante bioinformática del gen <i>fosA</i> , utilizando las plataformas BLAST, RAST y curado manual.	51
12	Alineamiento de nucleótidos para el análisis bioinformático del gen <i>fosA</i> en 16 cepas de <i>L. adecarboxylata</i> (326 pb, 142 aa) comparado con el gen <i>fosA8</i> reportado en la cepa USDA-ARS-USMARC -60222.	53
13	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína <i>fosA</i> de la cepa control de <i>Leclercia</i> USDA-ARS-USMARC -60222 y de la cepa Lac-34 representativa de este estudio	53
14	Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de 28 cepas de <i>L. adecarboxylata</i> .	55
15	A) Determinación del perfil de resistencia por la técnica Kirby-Baüer en una cepa de <i>L. adecarboxylata</i> . B) Determinación del fenotipo BLEE con el método de doble disco propuesto por EUCAST.	56

<b>16</b>	Grafica de resultados de fenotipo BLEE en las 28 cepas de <i>L. adecarboxylata</i>	56
<b>17</b>	Detección del gen <i>bla</i> <sub>VIM1-2</sub> de resistencia en cepas de <i>L. adecarboxylata</i> .	59
<b>18</b>	Detección del gen <i>bla</i> <sub>NDM</sub> de resistencia en cepas de <i>L. adecarboxylata</i> .	60
<b>19, 20</b>	Detección del gen <i>bla</i> <sub>NDM</sub> de resistencia en cepas de <i>L. adecarboxylata</i> .	60, 61
<b>21</b>	Imagen representativa de la amplificación del gen <i>bla</i> <sub>IMP</sub> en cepas de <i>L. adecarboxylata</i> .	61
<b>22</b>	Amplificación mediante PCR de los genes codificantes a carbapenemasas	62
<b>23</b>	Presencia de los genes encontrados mediante plataformas bioinformáticas	63
<b>24</b>	Dendograma UPGMA y PFGE de los patrones de restricción obtenidos de la digestión enzimática con la enzima <i>Xba</i> 1.	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grados centígrados	<b>HGR-180</b>	Hospital Regional 180 de Tlajomulco
<b>µL</b>	Microlitro	<b>IMP</b>	Imipenem
<b>µM</b>	Micro molar	<b>ITS</b>	Infección de Torrente sanguíneo
<b>ACC</b>	Acetiltransferasa	<b>ITU</b>	Infección de Tracto Urinario
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico	<b>Kb</b>	Kilo bases
<b>AMC</b>	Aamoxicilina con ácido clavulánico	<b>L</b>	Litro
<b>AMP</b>	Ampicilina	<b>Lac</b>	Lactosa
<b>AN</b>	Amikacina	<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>ATM</b>	aztreonam	<b>LMHyC</b>	Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad
<b>BET</b>	Bromuro de Etidio	<b>MDR</b>	Multidrogoresistente
<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion (Infusión cerebro-corazón)	<b>MEM</b>	Meropenem
<b>BLEE</b>	β-lactamasa de Espectro Extendido	<b>mg</b>	Miligramo
<b>C</b>	Cloranfenicol	<b>min</b>	Minutos
<b>CAZ</b>	Ceftazidima	<b>mL</b>	Mililitro
<b>CIP</b>	Ciprofloxacino	<b>mM</b>	Milimolar
<b>CIT</b>	Citrato	<b>NA</b>	Ácido nalidíxico
<b>CL</b>	Colistina	<b>ng</b>	Nanogramos
<b>CLSI</b>	Clinical & Laboratory Standards Institute	<b>nm</b>	Nanómetro
<b>cm</b>	Centímetro	<b>NPT</b>	Nutrición Parenteral Total
<b>CMNO</b>	Centro Médico Nacional de Occidente	<b>pb</b>	Pares de bases
<b>CTX</b>	Cefotaxima	<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
<b>dNTP</b>	Deoxi-nucleótido trifosfato	<b>PFGE</b>	Pulsed Field Gel Electrophoresis (Electroforesis en Gel de Campos Pulsados)
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético	<b>RAM</b>	Resistencia a los antimicrobianos
<b>EMB</b>	Eosin Methylene Blue (Eosina-azul de metileno)	<b>RM</b>	Rojo de Metilo
<b>EPC</b>	Enterobacterias Productoras de Carbapenemasas	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>ETP</b>	Ertapenem	<b>SSI</b>	Solución salina isotónica
<b>FEP</b>	Cefepime	<b>STX</b>	Trimetoprima/Sulfametoxazol;
<b>FOS</b>	Fosfomicina	<b>TE</b>	Tetraciclina
<b>gr</b>	Gramos	<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>GM</b>	Gentamicina	<b>TSA</b>	Tryptone Soya Agar (oya Trypticaseína)
<b>h</b>	Hora	<b>VP</b>	Voges Proskauer
<b>HP-CMNO</b>	Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente	<b>UCIN</b>	Unidad de Cuidados Intensivos
<b>CMNO-HG-O</b>	Centro Médico Nacional de Occidente Hospital Ginecología y Obstetricia	<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>HGZ-21</b>	Hospital General de zona 21	<b>UPGMA</b>	Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages

## 1. RESUMEN

*Leclercia adecarboxylata* es un bacilo Gram-negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. En las últimas décadas se ha catalogado como patógeno oportunista, reportado principalmente en pacientes inmunodeprimidos, causando infecciones graves. En este estudio se trabajó con 28 cepas provenientes de 5 hospitales de Guadalajara, Jalisco (HP-CMNO, CMNO Especialidades, CMNO HG-O, HGZ-21 y HGR-180), con el objetivo de caracterizar las cepas bacterianas y determinar si entre ellas existía una relación clonal que las asociara a un brote epidemiológico. En este estudio se caracterizaron 28 cepas de *L. adecarboxylata* a través de pruebas bioquímicas, de biología molecular y análisis bioinformático; se determinó el perfil de susceptibilidad antimicrobiana a 18 antibióticos de diferentes familias (Kirby-Baüer), se determinó el perfil de BLEEs (difusión de doble disco), así como la presencia de genes de resistencia (por PCR y ResFinder); por último, se determinó la relación clonal de las cepas (mediante PFGE y análisis bioinformático NTSYSpc version 2.21s).

Todas las cepas (n=28) se identificaron como *L. adecarboxylata*, fueron resistentes a amoxicilina con ácido clavulánico, ampicilina, ceftazidima, cefotaxima, cefepime ( $\beta$ -lactámicos), meropenem, imipenem y ertapenem (carbapenémicos), trimetoprima/sulfametoxazol (inhibidor de la vía de folato), y ciprofloxacino (quinolona). Se observó un 96.4% (27/28) de resistencia al cloranfenicol, un 92.9% (26/28) de resistencia a la fosfomicina, un 89.8% (25/28) de resistencia a aztreonam, y 14.3% (4/28) de resistencia al ácido nalidíxico (quinolona) y únicamente el 7.1% (2/28) de las cepas fue resistente a amikacina (aminoglucósidos). También se presentó en el 89.3% de los aislados un fenotipo BLEE positivo.

El 100% de las cepas fue sensible a la colistina, el 85.7% (24/28) sensible a tetraciclina y el 75% (21/28) a gentamicina. De las 28 cepas, 21 cepas (75%) presentaron el gen *bla*<sub>NDM</sub>, amplificado por PCR, mientras que por herramientas bioinformáticas se evaluaron 16 genomas y se identificaron los genes *bla*<sub>NDM-1</sub> y *bla*<sub>TEM-1B</sub> en todas las cepas, mientras que en el 93.75% (15/16) se localizó el gen *bla*<sub>SHV12</sub>. Por último, los 17 aislados que se sometieron a la técnica de PFGE para determinar la relación clonal, presentaron coeficientes de Dice por arriba de 0.8, lo que indica que se encuentran estrechamente relacionadas, hallazgo de especial interés, ya que son cepas que pertenecen al primer brote en México causado por *L. adecarboxylata* resistente a carbapenémicos en población principalmente pediátrica.

**Palabras clave:** *Leclercia adecarboxylata*, Resistencia antibiótica, Carbapenemasas, Brote, Jalisco.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. *Leclercia adecarboxylata*

*Leclercia adecarboxylata* es una bacteria que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo Gram negativo, móvil, anaerobio facultativo, aislado por primera vez de una fuente de agua potable por el bacteriólogo francés H. Leclerc en 1962, quien la describió como “bacteria coliforme pigmentada de amarillo”, que era similar a *Escherichia coli* en las pruebas IMViC, con la pequeña variación de su capacidad de fermentar varios azúcares y la producción de un pigmento amarillento, por ello se introdujo en el género *Escherichia* como una nueva especie: *adecarboxylata* (González-Arenas *et al.*, 2011; Correa *et al.*, 2012; Keren *et al.*, 2014; Mayfield *et al.*, 2019). Posteriormente, en 1986 Tamura *et al.*, con un estudio del RNA ribosomal 16S la clasifica en un nuevo género: *Leclercia* con una única especie: *adecarboxylata*.

Se distribuye ampliamente en alimentos y agua, forma parte de la microbiota en animales y en heces de los humanos, se ha descrito como poco virulento y actualmente se cataloga como un microorganismo oportunista, ya que principalmente se asocia con factores como la inmunosupresión, heridas contaminadas y catéteres (Keren *et al.*, 2014; Mayfield *et al.*, 2019) causando bacteriemia, sepsis, peritonitis, celulitis, foliculitis, infección de tejidos blandos, endocarditis y colecistitis (Shin *et al.*, 2012; Spiegelhauer *et al.*, 2018; Keyes *et al.*, 2020).

Es un microorganismo que rara vez se notifica en infecciones hospitalarias y de la comunidad, lo que se refleja en las escasas publicaciones relacionadas con esta bacteria, probablemente porque existe una identificación errónea. Mayoritariamente se ha reportado en infecciones polimicrobianas y raramente en infecciones monomicrobianas, principalmente en pacientes inmunocomprometidos, pero también existen casos de pacientes inmunocompetentes afectados por esta enterobacteria (García-Fulgueiras *et al.*, 2014; Grantham *et al.*, 2015; Mayfield *et al.*, 2019; Merza *et al.*, 2019).

El primer caso clínico se tiene documentado en Medline-Pubmed en el año de 1993; en un hombre de 45 años que presentó cirrosis alcohólica, debido a su gravedad le fue practicada una paracentesis evacuante, después de ser sometido a una cirugía se identificó en hemocultivo a *L. adecarboxylata* y recibió un tratamiento con múltiples antibióticos; sin embargo, el paciente falleció debido al desarrollo de una insuficiencia renal aguda (Correa *et al.*, 2012).

La vía de entrada aún no se tiene clara, aunque se ha asociado a la destrucción de la barrera cutánea, así como a traumatismos, heridas por quemaduras, cambio de la microbiota por tratamiento con antibióticos y diálisis peritoneal (Shin *et al.*, 2012; Grantham *et al.*, 2015; Adapa *et al.*, 2019).

En 2012 se reportó en Colombia un brote de casos de bacteriemia en cinco pacientes de población pediátrica y adultos. Los hemocultivos a partir de catéter de cámara implantable y de inserción periférica dieron positivo al crecimiento de *L. adecarboxylata* en los cinco caso, asociado a viales de heparina premezclados, mismos que fueron analizados posteriormente en dos diferentes laboratorios, evidenciando crecimiento de diversos microorganismos, entre los que destacaba *L. adecarboxylata* (Tabla 1) causante del brote en el Hospital Pablo Tobón Uribe en un periodo del 18 de abril al 18 de mayo (Correa *et al.*, 2012).

**Tabla 1. Resultados de los estudios microbiológicos de los viales de heparina**

Lote/muestra	Laboratorio 1	Laboratorio 2
140311-01	Negativo	Negativo
210111-01	<i>Penicillium spp.</i>	No se envió
010411-01	Negativo	<i>Enterobacter cloacae</i>
050411-01	Negativo	Negativo
060411-01	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Raoultella planticola</i> <i>Leclercia adenocarboxylata</i> <i>Pseudomonas putida</i>	Negativo
87-031-9D	Negativo	Negativo

Tomada de Correa *et al.*, 2012

En el mismo año, se reportó un caso en Estados Unidos de un hombre que desarrolló shock séptico días después de su intervención al área de urgencias, se realizó un hemocultivo y un cultivo de catéter y se identificó a *L. adecarboxylata*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* clasificando ésta, como una infección polimicrobiana por una inmunosupresión subyacente y asociada al catéter (Forrester *et al.*, 2012).

Otro reporte de infección polimicrobiana fue documentado en India 2018, en un frotis nasal de un bovino que padecía de dificultad respiratoria, aislando a los géneros *Leclercia*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, y *Pasteurella multocida*, la importancia de este caso, es que la morfología de *L. adecarboxylata* era de colonias palidas y no fermentadora de lactosa, hallazgos no reportados anteriormente, pero la identificación se confirmó mediante análisis de ADNr 16 y MALDI-TOF.MS (Choudhary *et al.*, 2018).

Recientemente se reportó el caso de una infección por *L. adecarboxylata* en una paciente inmunocompetente, a quién después de múltiples análisis se le diagnosticó colecistitis ocasionando un choque séptico, posteriormente se le realizó un cultivo del líquido biliar, se obtuvo un crecimiento puro de dicha bacteria y la paciente falleció al cuarto día (Merza *et al.*, 2019). También está bien documentado el informe de un paciente, quien luego de la reparación de una fractura cerrada de olécranon presentó una infección causada por *L. adecarboxylata*, lo que la posiciona como un microorganismo patógeno oportunista adquirida en hospitales después de una cirugía (Mayfield *et al.*, 2019).

Una revisión de la literatura de casos publicados mostró 44 casos de infecciones por *L. adecarboxylata* en adultos y solo once infecciones pediátricas. De las infecciones pediátricas documentadas, dos ocurrieron entre 2000 y 2004, cuatro entre 2010 y 2014 y cinco entre 2015 y 2019. Se tienen bien documentadas las infecciones por *L. adecarboxylata* en pacientes inmunocomprometidos; sin embargo, existen casos puntuales de pacientes inmunocompetentes con un crecimiento puro de esta

enterobacteria, por lo que se describe como un microorganismo patógeno oportunista con un potencial invasivo a considerar (Merza *et al.*, 2019).

## **2.2. Resistencia antimicrobiana en *Leclercia adecarboxylata***

La mayoría de las cepas son sensibles a colistina, ácido nalidíxico, sulfadiazina, gentamicina, estreptomina, tetraciclina, cloranfenicol, carbenicilinas y cefalosporinas (por el método de difusión de disco (Kirby-Baüer) en el medio de Müller-Hinton) y resistentes a la penicilina y fosfomicina (Correa *et al.*, 2012).

Shin *et al.*, aislaron una cepa de *L. adecarboxylata* relacionada al catéter en una mujer con cáncer de mama, en el estudio se realizó antibiograma a 27 antibióticos, mostrando múltiple resistencia a 13 antibióticos de tipo  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y sulfonamidas, la cepa albergaba los genes *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> y el integrón de clase 1 que contiene el casete *dfrA12-orfF-aadA2* como determinantes genéticos de la resistencia.

Es importante, ya que hasta 2012 solo había 3 informes de cepas de *L. adecarboxylata* resistentes a penicilina, fosfomicina y solamente se conocía una cepa resistente a algunos antibióticos  $\beta$ -lactámicos, es por ello por lo que *L. adecarboxylata* empezó a tomar mayor importancia clínica.

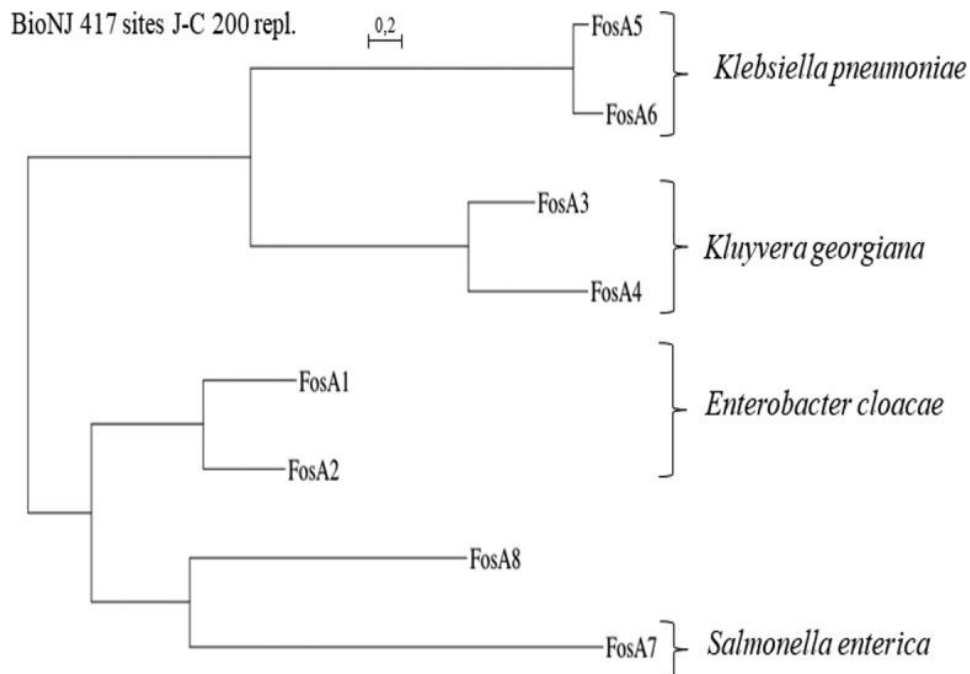
### **2.2.1. Resistencia a fosfomicina**

La fosfomicina es un antibiótico empleado para tratar infecciones sistémicas causadas por bacterias Gram negativas, actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular. Los mecanismos de resistencia a la fosfomicina en *E. coli* codificados cromosómicamente incluyen principalmente una permeabilidad reducida del fármaco gracias a mutaciones en los genes que codifican los transportadores glicerol-3-fosfato (*glpT*) y glucosa-6-fosfato (*uhpT*) o por mutaciones en la enzima MurA, que es el blanco de la fosfomicina y que cataliza el primer paso en la biosíntesis de peptidoglicano. Los mecanismos de resistencia transferibles en *E. coli* son las metaloenzimas FosA, que inactivan a la



fosfomicina ya que catalizan la apertura del anillo oxirano (Viera *et al.*, 2016; Cattoir *et al.*, 2018).

El primer gen *fosA*, fue descrito en *Serratia marcescens*, que se transporta en el transposón Tn2921 ubicado en un plásmido conjugativo con una alta identidad con *fosA* cromosómico de *Enterobacter cloacae*, donde probablemente se originó



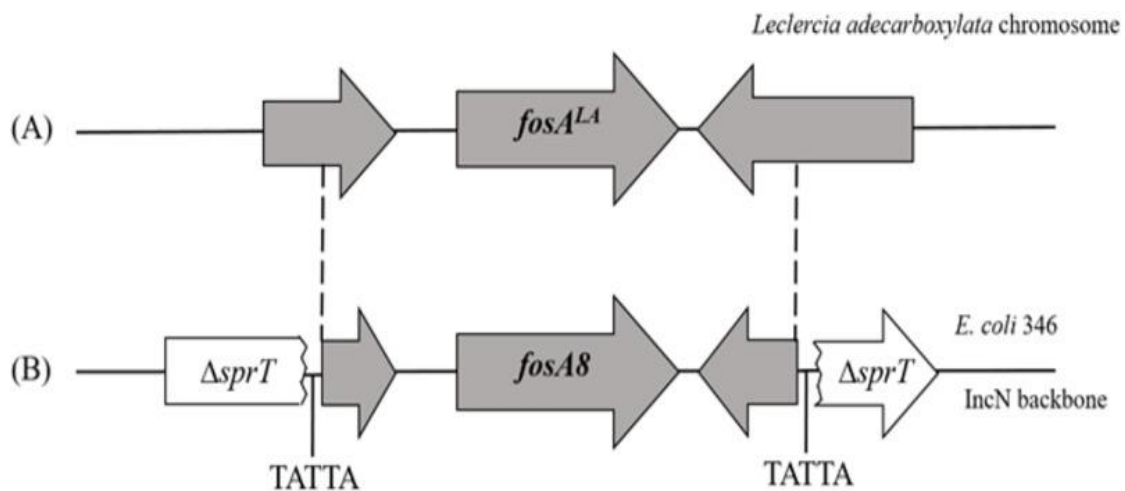
**Figura.1** Árbol filogenético de las proteínas FosA identificadas por el método de distancia utilizando el algoritmo de unión de clados vecinos. Las especies de enterobacterias conocidas como reservorios naturales de estas proteínas FosA se muestran a la derecha. Tomada de Poirel *et al.*, 2019.

(Alrowais *et al.*, 2015). Los genes *fosA* localizados cromosómicamente están distribuidos ampliamente en los genomas de especies como: *Kluyvera georgiana*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Salmonella entérica* (Figura 1) (Alrowais *et al.*, 2015; Poirel *et al.*, 2019).

En 2019 en Suiza se identificó a *E. coli* 376 que albergaba un determinante de resistencia a fosfomicina mediado por plásmido, que no correspondía con ningún gen *fosA* reportado con anterioridad (genes *fosA1* a *fosA7*) (Figura1). Poirel y col., realizaron secuenciación del genoma completo de *E. coli* 376 para identificar el

mecanismo responsable de la resistencia a fosfomicina, identificando un nuevo gen *fosA* denominado: *fosA8* que compartía una identidad del 98% con la enzima FosA<sup>LA</sup>, codificada por un gen en el cromosoma de *L. adecarboxylata* (Figura 2) (Poirel *et al.*, 2019).

*L. adecarboxylata* es una enterobacteria que rara vez se identifica como una fuente de infecciones humanas y que se suma a la lista de especies de enterobacterias que poseen de forma natural un gen similar a *fosA* y a partir de las cuales los genes se traslocan a plásmidos y se diseminan por distintas especies bacterianas (Poirel *et al.*, 2019).



**Figura 2. Gen *fosA*<sup>LA</sup> y *fosA*<sup>8</sup>.** (A) Gen *fosA*<sup>LA</sup> en el cromosoma de *L. adecarboxylata*. B) Gen *fosA*<sup>8</sup> en el plásmido p376 de *E. coli* 376. Tomada de Poirel *et al.*, 2019.

### 2.3. Clasificación de los Antibióticos

El descubrimiento de los antibióticos trajo consigo una nueva era para el tratamiento a diversas enfermedades y han cambiado drásticamente la medicina moderna. La introducción de antibióticos fue posiblemente el mayor avance médico del siglo XX; sin embargo, el uso inadecuado de estos ha dado lugar a un aumento de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) (Hutchings *et al.*, 2019).

Los antibióticos se clasifican:

- Por su origen en: biológicos o naturales (aquellos antimicrobianos producidos por microorganismos); o sintéticos/semisintéticos.
- Por su espectro de acción: englobando aquellos de amplio espectro, que interfieren con el crecimiento de numerosas especies de bacterias, de espectro intermedio, es decir, que actúan frente a un número más limitado de especies y de espectro reducido: que solamente tienen comportamiento eficaz frente a un número limitado de bacterias.
- Por su forma de actuar: Se dividen en bacteriostáticos, que bloquean el desarrollo y multiplicación de las bacterias, y bactericidas, que provocan la lisis bacteriana.
- Por su mecanismo de acción:
  - Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana: penicilina, cefalosporina, ampicilina, vancomicina.
  - Distorsión de la función de la membrana celular: polimixinas.
  - Inhibición de la síntesis de proteínas: aminoglucósidos, cloranfenicol, macrólidos, estreptograminas, lincosamidas, oxazolidinonas.
  - Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos: quinolonas, fluoroquinolonas, fenicoles, rifampicina y nitrofuranos.
  - Inhibición de la síntesis de ácido fólico: sulfamidas, trimetoprima.
- Por su estructura química: en  $\beta$ -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos, inhibidores de  $\beta$ -lactamasas), macrólidos, aminoglucósidos, glicopéptidos, sulfonamidas, diaminopiridinas, quinolonas, tetraciclinas, peptídicos (polipeptídicos, glucopeptídicos, lipopéptidos, polimixinas), fosfonatos, lincosaminas, anfenicoles, oxazolidinonas, nitroderivados, fusidanos (Arco, 2014).

El tratamiento de elección en infecciones por bacterias Gram negativas sigue siendo mediante antibióticos  $\beta$ -lactámicos; sin embargo, la frecuencia de aparición de cepas MDR ha ido en aumento y, las cepas de *L. adedecarboxylata* no son la excepción.

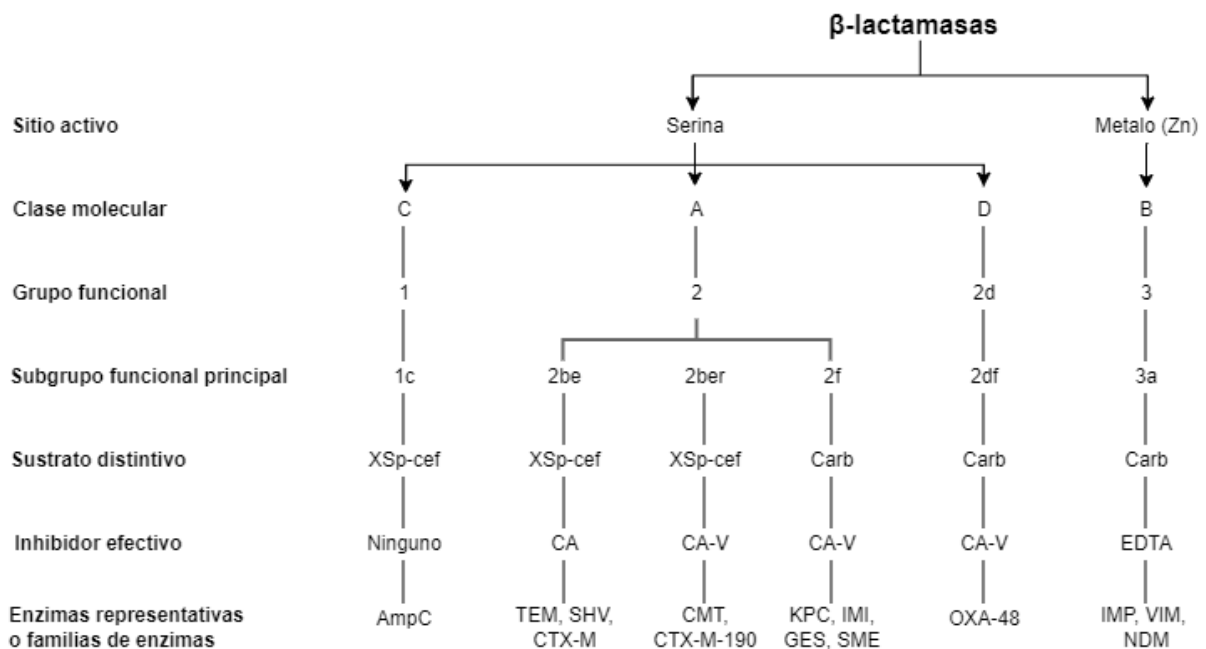
## **2.4. Mecanismos de resistencia a los antibióticos**

En las bacterias Gram negativas la resistencia a los antibióticos está dada por múltiples mecanismos, como la producción de enzimas, la expresión de bombas de eflujo y la modificación de las porinas (modificación de la permeabilidad); sin embargo, la más importante, por su frecuencia y eficacia es la producción de  $\beta$ -lactamasas, y los genes que codifican para estas enzimas se encuentran en los cromosomas bacterianos o en plásmidos. De todas las  $\beta$ -lactamasas descritas, destacan las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas ya que confieren patrones de resistencia a múltiples fármacos que comprometen seriamente las opciones terapéuticas (Castellanos *et al.*, 2014; De Angelis *et al.*, 2020).

### **2.4.1. Betalactamasas**

Los betalactámicos son antimicrobianos que se emplean en el tratamiento habitual de infecciones causadas por bacterias Gram negativas, poseen en su estructura un anillo betalactámico. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis del peptidoglicano; la resistencia a estos antibióticos está dada principalmente por la producción de  $\beta$ -lactamasas, enzimas que rompen el enlace amídico del anillo betalactámico, otorgando resistencia a penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (Anexo 1), y su producción puede ser constitutiva o inducible (Castellanos *et al.*, 2014).

Las  $\beta$ -lactamasas fueron clasificadas en 1980 por Ambler de acuerdo con su estructura molecular y su secuencia de aminoácidos, reconociendo cuatro grupos: A, B, C y D. Estas enzimas cuentan con un residuo de serina en su sitio activo o aquellas que utilizan al  $Zn^{+2}$  como cofactor. En la Figura 3, las  $\beta$ -lactamasas aparecen según los diferentes subgrupos funcionales, perfiles de hidrólisis e inhibidores del sustrato.



**Figura 3. Relaciones moleculares y funcionales entre β-lactamasas que confieren resistencia a cefalosporinas o carbapenémicos.** XSp-ceph: cefalosporinas de espectro extendido; Carb: carbapenémicos; CA: ácido clavulánico; CA-V: respuesta variable al ácido clavulánico; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético. Tomada de De Angelis *et al.*, 2020.

#### 2.4.1.1 *Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).*

Las BLEE han emergido como el principal problema de resistencia bacteriana en pacientes hospitalizados, así como en pacientes en la comunidad; las cepas productoras de estas enzimas son responsables de una variedad de infecciones tales como infecciones del tracto urinario (ITU), sepsis, neumonía adquirida en el hospital, abscesos intra-abdominales, abscesos del cerebro e infecciones relacionadas con dispositivos médicos; en los últimos 5 años, han aumentado los aislamientos de enterobacterias productoras de BLEE (López-Velandia *et al.*, 2015).

Las BLEE inactivan a las aminopenicilinas, carboxipenicilinas y cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, también al aztreonam, pero no inactivan a las cefamicinas y a los carbapenémicos (Castellanos *et al.*, 2014).

Las BLEE surgen debido a mutaciones en β-lactamasas codificadas por los genes *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>CTX-M</sub>*. Se han identificado cerca de 300 variantes naturales de genes

BLEE: de tipo *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> y de otros tipos de BLEE, las cuales son transmitidas por plásmidos y a menudo se encuentran en transposones e integrones, facilitando su movilización con otros genes de resistencia a otros antibióticos. Los plásmidos que portan las BLEE contienen frecuentemente genes que inducen resistencia a otras familias de agentes antimicrobianos, como aminoglucósidos, cloranfenicol, sulfonamidas y tetraciclinas (López-Velandia *et al.*, 2015).

### 2.4.2. Carbapenemasas

Los carbapenémicos son antibióticos  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro con actividad bactericida ante bacterias Gram positivas y Gram negativas, aeróbicas y anaeróbicas, son empleados solo frente a casos especiales; imipenem fue el primer carbapenémico desarrollado para uso clínico, otros compuestos más modernos son meropenem, ertapenem y doripenem, estos son inhibidos por enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) que producen un grupo específico de enzimas betalactamasas de tipo metalo- $\beta$ -lactamasas y algunas serin- $\beta$ -lactamasas con actividad carbapenemasas (Seija & Vignoli 2006). El mecanismo principal de resistencia a los carbapenémicos es la producción de enzimas carbapenemasas.

Las carbapenemasas se encuentran clasificadas en las clases A, B y D de Ambler.

Las enzimas de la clase A y D son de tipo serin- $\beta$ -lactamasas porque 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 enzimas de clase B, definidas por estructuras de metalo- $\beta$ -lactamasas dependen de la presencia de zinc para su actividad hidrolítica, tienen mayor actividad que las carbapenemasas de clase A y D, y mayor relevancia clínica porque hidrolizan a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, excepto aztreonam y son inhibidas por quelantes del zinc como el EDTA y el ácido dipicolínico (Cercenado 2015; De Angelis *et al.*, 2020).

Actualmente las enzimas serin- $\beta$ -lactamasas con actividad carbapenemasas (subgrupos 2f y 2df) más importantes son: KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa), IMI (beta-lactamasa hidrolizante de imipenem), OXA (carbapenemasas hidrolizantes de oxacilina) y SME (enzima de *Serratia marcescens*);

mientras que las carbapenemasas tipo metalo- $\beta$ -lactamasa (subgrupos 3a y 3b) mayormente estudiadas son: IMP (pseudomonas resistentes al imipenem), VIM (codificada por integrón de Verona) y NDM (metalo- $\beta$ -lactamasa de Nueva Delhi); estas carbapenemasas se encuentran generalmente en plásmidos y otros elementos transponibles, permitiendo una diseminación mayor entre bacterias. Estas enzimas difícilmente se detectan con pruebas fenotípicas por lo que generalmente se recurre a pruebas moleculares, a pesar de que muestran una alta variabilidad de secuencia del 15% al 70%, lo que ralentiza las investigaciones para comprender mejor su prevalencia (Cercenado 2015; De Angelis *et al.*, 2020).

### 3. ANTECEDENTES

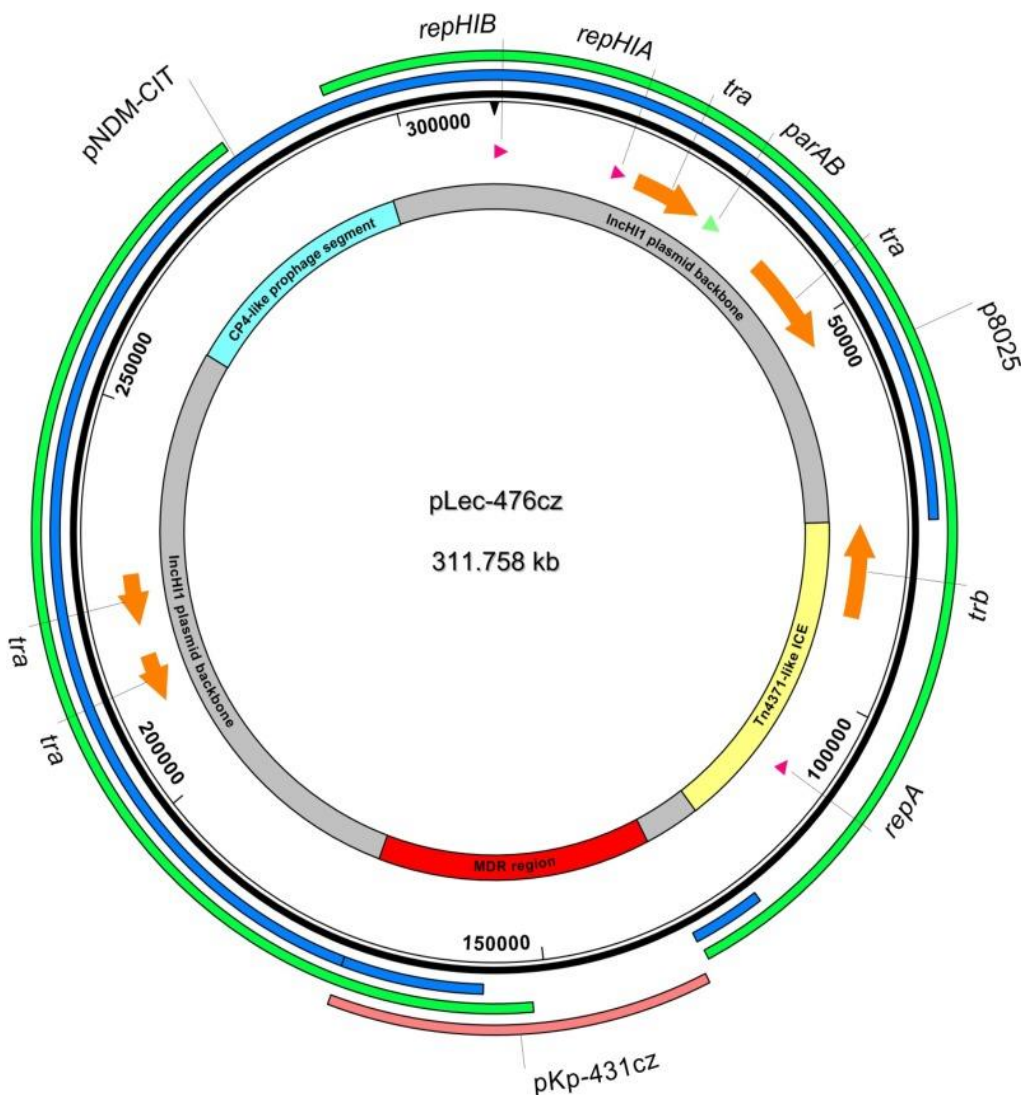
#### 3.1. Antecedentes generales

##### 3.1.1. Caracterización de *Leclercia adecarboxylata* en otros países

El primer informe de una cepa de *L. adecarboxylata* productora de BLEE fue en Italia en 2003 por Mazzariol *et al.*, el aislado presentaba resistencia a ceftazidima, cefotaxima, aztreonam y cefepima, era productora de la  $\beta$ -lactamasa SHV-12, una de las variantes más comunes encontradas en cepas nosocomiales italianas. No fue hasta 2014 que se encontró nuevamente un aislado de *L. adecarboxylata* portadora del gen *bla*<sub>SHV-12</sub> esta vez en Uruguay, portaba también los genes *bla*<sub>TEM-1</sub> y *qnrB4*, además de estos, albergaba múltiples genes de resistencia en un plásmido conjugativo con grupo de incompatibilidad IncHI1/HI2 que portaba un integrón de clase 1 con: *aac*(60)-*lb-cr*, *bla*<sub>OXA1</sub>, *catB3*, *arr-3*, *qacED1* y *sul1*; fue el primer informe de *L. adecarboxylata* que albergaba genes de resistencia transferibles a quinolonas, cloranfenicol y rifampicina.

En 2012 se hablaba de apenas 4 cepas MDR de *L. adecarboxylata*, que albergaban genes de resistencia a antibióticos betalactámicos de tipo serin- $\beta$ -lactamasas *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> (Mazzariol *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2012), pero fue hasta el año siguiente que se reportó la presencia de la primera carbapenemasa de tipo metalo- $\beta$ -

lactamasa codificada por el gen *bla<sub>VIM-1</sub>* presente en un integrón que le otorgaba resistencia a meropenem y que fue aislada de una muestra no clínica de un hospital en República Checa (Papagiannitsis *et al.*, 2013); el trabajo fue retomado en 2017 por Papousek *et al.*, con la finalidad de caracterizar a pLec-476cz, una molécula de 311,758 pb, que portaba un elemento conjugativo integrativo (ICE) similar a Tn 4371, una secuencia de profago similar a CP4 y una región MDR (Figura 4).



**Figura 4.** Plásmido pLec-476cz, del grupo de Incompatibilidad HI 1, portador de un elemento conjugativo integrativo (ICE) similar a Tn 4371 (amarillo), una secuencia de profago similar a CP4 (azul) y una región MDR (rojo). Tomada de Papousek *et al.*, 2017



Geffen *et al.*, en 2013 describieron tres cepas de enterobacterias poco comunes (*L. adecarboxylata*, *Kluyvera cryocrescens* y *Kluyvera ascorbata*) aisladas de cultivos de vigilancia rectal en Israel, que contenían el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> localizado en el transposón *Tn4401*; los aislados mostraron una resistencia a ertapenem, imipenem y doripenem, antibióticos carbapenémicos, empleados como último recurso en la terapéutica, fue esta cepa la primera del género *Leclercia* que mostró una resistencia a tres antibióticos carbapenémicos.

El primer gen *bla*<sub>NDM-1</sub> (resistencia a carbapenémicos) en *L. adecarboxylata* fue descrito en 2015 de un paciente con neumonía en China; la cepa mostró un perfil de resistencia a penicilina, inhibidores de  $\beta$ -lactámicos, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Sun *et al.*, 2015). El aislado contaba con un plásmido conjugativo pP10164-NDM que albergaba los genes *bla*<sub>NDM-1</sub> y *ble*<sub>MBL</sub> (resistencia a bleomicina); este plásmido era muy similar a pKOX\_NDM1, recuperado de una cepa nosocomial de *Klebsiella oxytoca* en 2013 (Huang *et al.*, 2013). La investigación se continuó en 2016 informando que contaba con dos plásmidos más: pP10164-2 y pP10164-3, que portaban genes de resistencia para al menos 10 clases de antibióticos ( $\beta$ -lactámicos, macrólidos, quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas, anfenícoles, compuestos de amonio cuaternario, sulfonamidas, trimetoprim y rifampicina) y a 7 tipos de metales pesados (mercurio, plata, cobre, níquel, cromo, arsénico y telurio), este fue el primer aislado con la coexistencia de tres plásmidos de MDR y con la secuenciación completa de los mismos (Sun *et al.*, 2016). El segundo caso de *L. adecarboxylata* productora de NDM-1 fue reportado en España en 2017, la cepa portaba los genes *bla*<sub>NDM-1</sub> y *bla*<sub>SHV-12</sub> en un plásmido conjugativo perteneciente al subgrupo Inc-X3 (Riazzo *et al.*, 2017).

Una cepa de *L. adecarboxylata* Z96-1 resistente a carbapenémicos, fue analizada por Sun *et al.*, en 2019 a partir de un cribado rectal para detectar enterobacterias resistentes a carbapenémicos debido a una intervención quirúrgica de un meningioma benigno; el aislado, parte de la microbiota intestinal mostró resistencia a carbapenémicos, cefalosporinas y cefoperazona-sulbactam y albergaba genes que codificaban la resistencia a los carbapenémicos (*bla*<sub>IMP-4</sub>), aminoglucósidos [*aac*(3)-Ib],

fluoroquinolonas (*qnrS1*), fenicol (*catB4*) y un gen de resistencia a la colistina (*mcr-4,3*) inactivo. El aislado portaba siete plásmidos: el plásmido pIMP-Z96-1 contenía cuatro genes de resistencia [*bla*<sub>IMP-4</sub>, *qnrS1*, *catB4* y *aac (3) -Ib*], pMCR-Z96-1 con el gen *mcr-4.3*; un plásmido pZ96-1\_1, un plásmido pZ96-1\_2 que codifica la replicasa RepB y la familia RelE/ParE, la toxina de la familia PemK / MazF; un plásmido pZ96-1\_3, un plásmido pZ96-1\_4 y un plásmido pZ96-1\_6. A excepción de pIMP-Z96-1 y pMCR-Z96-1, se encontró que ninguno de los otros plásmidos portaba genes de resistencia a los antimicrobianos.

Por último, los estudios de cepas de heces fecales de animales son dos, y se tienen documentadas en 2018: siete cepas de *L. adecarboxylata* recuperadas de 2 granjas en Nigeria a partir de heces fecales de aves de corral, todos los aislados tenían el gen *bla*<sub>TEM</sub>, dos cepas además el gen *bla*<sub>SHV</sub> y *oqxB*, una cepa el gen *qnrA*, otra cepa el gen *bla*<sub>CTX-M</sub>, otra el gen *qnrA* y solo un aislado el gen *qep1* (Akinbami *et al.*, 2018); Y finalmente, en 2020 un aislado de *L. adecarboxylata* a partir de heces de un conejo en una granja en China mostró altos niveles de resistencia al Florfenicol, Floranfenicol, tetraciclina y Linezolid, cuya cepa alojaba dos plásmidos: pLA64 y pLA109; por otro lado, la anotación del genoma completo mostró 9 genes de resistencia a distintos fármacos [*mdfA*, *floR*, *aac (6') -Ib - cr*, *arr-3*, *dfrA27*, *aadA16*, *qacE Δ 1*, *sul1* y *floR*] y se identificaron reguladores de los sistemas RND: *ramA*, *baeSR*, *ttgR* y *acrR*, de los cuales solo dos (*ramA* y *baeSR*) eran reguladores positivos (activando la transcripción de las bombas de eflujo tipo RND) (Cheng *et al.*, 2020).

## **3.2. Antecedentes específicos**

### **3.2.1. Trabajos realizados con *Leclercia adecarboxylata* en México**

En México el primer estudio de aislamiento de *L. adecarboxylata* se publicó el 28 de febrero de 2021 por Garza-González *et al.*, trabajo que funge como antecedente directo, en el cual presentan evidencia epidemiológica, microbiológica y molecular de un brote de *L. adecarboxylata* resistente a carbapenémicos en tres hospitales del Occidente de México (Hospital Civil Fray Antonio Alcalde, Hospital General de Zona

21 y, Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente) asociado con el uso de nutrición parenteral total (NPT) contaminada, del cual 31 aislados obtenidos en 2019 de *L. adecarboxylata* mostraron resistencia a aztreonam, cefepima, cefotaxima, cefoxitima, ceftazidima, ceftriaxona, ertapenem, imipenem, meropenem y trimetoprima/sulfametoxazol.

Las 31 cepas albergaban genes *bla*<sub>N<sub>DM</sub>-1</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> y tres plásmidos. La secuenciación genómica de 2 cepas presentaba genes que codifican resistencia a los aminoglucósidos [*aac* (6') - *Ib*3, *aadA2b*, *aph* (3'')-*Ib*, *aph* (3')-*Ia* y *aph* (6)-*Ia*], β-lactámicos (*bla*<sub>N<sub>DM</sub>-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*). Las relaciones genéticas de las 31 cepas indican un linaje principal altamente relacionado con tres patrones de restricción detectados: A, (83,9%, 26/31), A1 (12,9%, 4/31) y A2 (2,2%, 1 / 31), con un porcentaje de similitud de entre el 90 y el 100% (Garza-González *et al.*, 2021)

### **3.2.2. *Leclercia adecarboxylata* en Jalisco**

El 20 mayo de 2019, se informó la ocurrencia de infecciones por una enterobacteria oportunista llamada *L. adecarboxylata*, en trece hospitales de la Zona Metropolitana de Guadalajara y 2 de Tepatlán.

Los cuatro casos iniciales fueron de bacteriemias en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente (HP-CMNO), posteriormente la Secretaría de Salud del estado de Jalisco (SSJ) informó la incidencia de infecciones del torrente sanguíneo (ITS) con cultivo puro de *L. adecarboxylata* en 14 hospitales más. En todos los casos se documentó la administración de NPT.

Al 31 de mayo, se contabilizaron 69 pacientes afectados, de los cuales 51 pacientes se dieron de alta, pero siguieron hospitalizados por su enfermedad base, 16 dados de alta y enviados a su domicilio; se presentaron dos defunciones, una asociada a la infección por *L. adecarboxylata* (COFEPRIS 2019).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Existen pocos estudios de *L. adecarboxylata* aislada de casos clínicos a nivel mundial, en nuestro país este informe de casos de infecciones presentados en múltiples hospitales de la zona metropolitana en Guadalajara y Tepatitlán, Jalisco ocurrido en el año 2019, que representa el primer aislamiento de *L. adecarboxylata* reportado en México (Garza-González *et al.*, 2021) y nuestro trabajo el segundo informe de *Leclercia* en el país. De ahí la importancia de su análisis, relación clonal y la detección del genotipo de resistencia que muestran estas cepas.

El conocer los mecanismos moleculares de resistencia que presentan estas cepas, permitirá obtener información epidemiológica y molecular de las cepas que circulan en algunos hospitales, a fin de establecer estrategias y políticas para su control y poder diseñar guías de seguimiento epidemiológico de cepas bacterianas infrecuentes en pacientes hospitalizados inmunocomprometidos, ya que, por la presión selectiva que se ejerce con el uso de antibacterianos, existe la probabilidad de cambio en el comportamiento de su susceptibilidad y, que al igual que otras enterobacterias se conviertan en el futuro en un reto terapéutico.

#### 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar del descubrimiento de *L. adecarboxylata* hace casi cinco décadas, no había sido reportada como bacteria causante de IAAS; sin embargo, en los últimos años se habla de ella como un patógeno oportunista, en el mayor número casos se ve asociada a infecciones polimicrobianas y raramente es responsable de infecciones monomicrobianas.

Los casos publicados son principalmente en población inmunodeficiente, en algunos pocos casos, provocando brotes, aunque infrecuentes, de importancia clínica y epidemiológica.

A partir de 28 cepas obtenidas de 5 hospitales de Guadalajara, se desea conocer si existe alguna relación clonal entre las cepas, así como identificar su fenotipo y genotipo de resistencia.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo general:

Identificar el genotipo y fenotipo de resistencia a antibióticos, expresión e identificación de BLEEs y la posible relación clonal de cepas de *L. adecarboxylata* aisladas de cinco hospitales en Guadalajara, Jalisco.

### 6.2. Objetivos específicos:

- 1) Identificar bioquímica, molecularmente y bioinformáticamente las cepas de *L. adecarboxylata*.
- 2) Determinar su perfil de susceptibilidad.
- 3) Realizar pruebas fenotípicas para determinar  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).
- 4) Identificar molecularmente genes de resistencia a carbapenemasas (de tipo metalo- $\beta$ -lactamasas: *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> y *bla*<sub>IMP</sub>).
- 5) Identificar bioinformáticamente genes de resistencia de tipo serin- $\beta$ -lactamasas (BLEE: *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>) y carbapenemasas (serín  $\beta$ -lactamasas: *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>).
- 6) Determinar la relación clonal entre las cepas.

### 6.2.1. Estrategia de trabajo

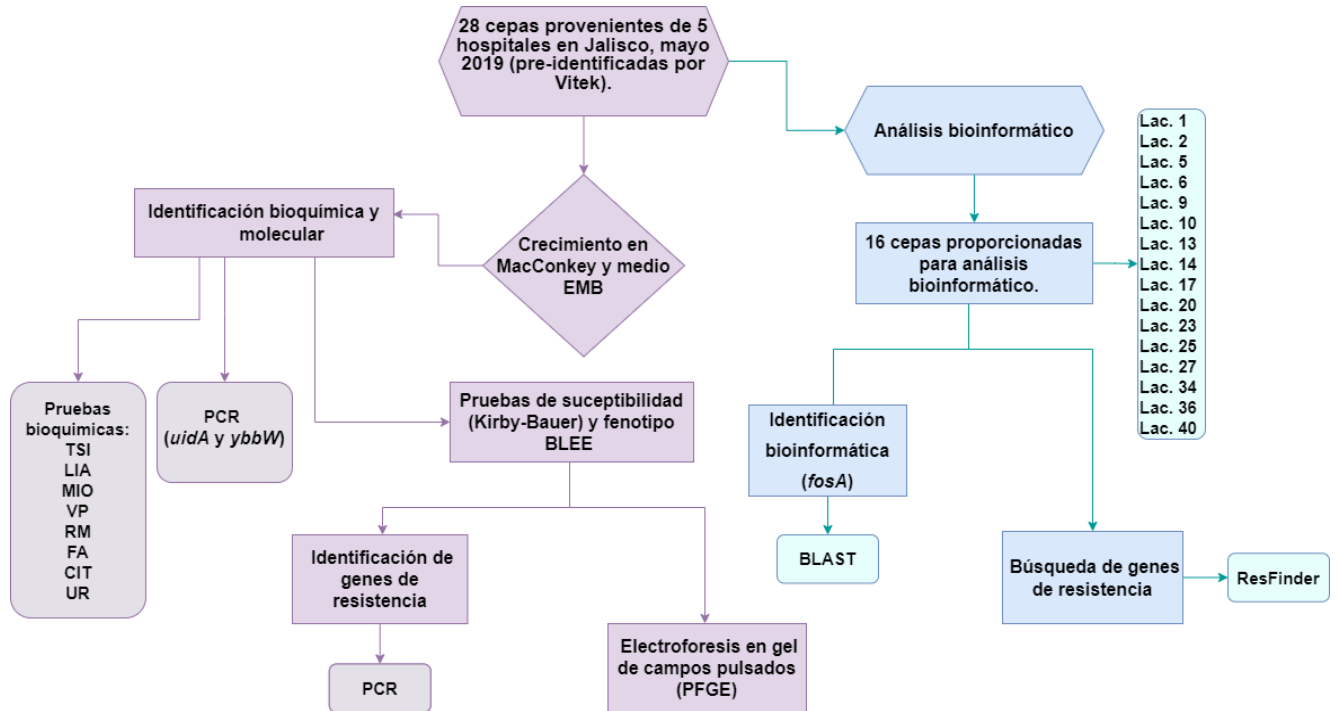


Figura 5. Esquema de la estrategia de trabajo

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1. Diseño del estudio

Estudio de tipo observacional con un enfoque cualitativo, descriptivo-retrospectivo, multicéntrico y transversal.

### 7.2. Ubicación espacio temporal

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad perteneciente al área de Microbiología Médica del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla dentro del periodo agosto 2019 a noviembre 2021.

### **7.3. Muestreo**

#### **7.3.1. Definición de Unidad de Población**

Las 28 cepas de *L. adecarboxylata* fueron aisladas de pacientes que cursaban con ITS en la Unidad de Cuidados Intensivos, de 5 hospitales de la zona metropolitana y Tepatitlán en Guadalajara, Jalisco: HP-CMNO, CMNO Especialidades, CMNO HG-O, Hospital General de Zona 21 (HGZ-21) y Hospital General Regional 180 de Tlajomulco (HGR-180), en mayo de 2019, todos con el antecedente de recibir nutrición parenteral total.

#### **7.3.2. Selección de la muestra**

Se trabajó con 28 cepas seleccionadas por conveniencia de cinco hospitales en la ciudad de Guadalajara, en el mes de mayo 2019 de casos positivos por *L. adecarboxylata* en pacientes expuestos a NPT y con ITS.

#### **7.3.3. Criterios de Selección de las unidades de Muestreo**

**Criterios de inclusión:** Se incluyeron las cepas que fueron identificadas como *L. adecarboxylata* mediante una pre-identificación automatizada en Vitek2 (bioMérieux, Inc.®) por los cinco hospitales de procedencia.

**Criterios de exclusión:** Cepas que al ser cultivadas en nuestro laboratorio presentaron características no relacionadas con *L. adecarboxylata*.

**Criterios de eliminación:** Muestras que se encontraron contaminadas.

#### **7.3.4. Diseño y tipo de muestreo**

Las muestras clínicas fueron tomadas de rutina, no consecutivas (exceptuando dos casos en los cuales se obtuvieron dos muestras del mismo paciente; sin embargo, se desconoce el periodo entre tomas) y las cepas a analizar fueron elegidas por conveniencia por los diferentes hospitales.

### 7.3.5. Tamaño de la muestra

Para este estudio se analizaron 28 cepas de *L. adecarboxylata* donadas por los hospitales: HP-CMNO, CMNO Especialidades, CMNO HG-O, HGZ-21 y HGR-180, mismas que fueron seleccionadas por conveniencia a partir de 26 pacientes.

### 7.4. Definición de las Variables y Escalas de medición

#### **Clínicas:**

Sexo: Masculino o Femenino.

Número de muestras por paciente: 1 muestra o 2 muestras.

Hospitales: HP-CMNO, CMNO Especialidades, CMNO HG-O, HGZ-21 y HGR-180.

#### **Microbiológicas:**

Perfiles de sensibilidad: halo de inhibición basados en los criterios del CLSI 2019, clasificándolas en sensibles, de resistencia intermedia y resistentes.

Pruebas bioquímicas: positivas o negativas a fermentación, producción de H<sub>2</sub>S, gas, viraje de color, alcalinidad, acidez, turbidez y movilidad.

Pruebas fenotípicas: presencia o ausencia de sinergismo a antibióticos.

#### **Moleculares:**

Detección de genes: Presencia del amplificado o ausencia.

Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE): presencia o ausencia de un patrón de bandas y para la relación clonal, la escala de medición se usó el coeficiente de Dice.

#### **Bioinformáticas:**

Identificación de genes: Presencia o ausencia del gen.

Análisis bioinformático: Determinar la relación filogenética entre las cepas.



### **7.5. Método de recolección de datos**

El nombre del paciente y la pre-identificación por el sistema Vitek2 (bioMérieux, Inc.®) fue proporcionada por los laboratorios clínicos de los cinco hospitales de la ciudad de Guadalajara.

La recolección de datos de las pruebas bioquímicas, fenotípicas, de identificación, moleculares y bioinformáticas fueron transferidos e interpretados en tablas de Excel, en gráficas de barras, de pastel o esquematizados en gráficas de estadística descriptiva de manera estructurada y controlada.

### **7.6. Recursos Humanos**

La presente investigación la realizó la estudiante de la licenciatura en biomedicina Brenda Pacheco Flores bajo la supervisión de la asesora experta: D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia y del codirector: D.C. Edwin Barrios Villa, junto con la asesoría metodológica de: D.C. Patricia Lozano Zarain

### **7.7. Recursos Materiales**

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, perteneciente al Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP.

Cada experimento fue realizado con los materiales y reactivos que especifican las referencias usadas para establecer la metodología dentro de las instalaciones y con el equipo del LMHyC junto con el material biológico donado por parte de los hospitales: HP-CMNO, CMNO Especialidades, CMNO HG-O, HGZ-21 y HGR-180.

### **7.8. Recursos Financieros**

El proyecto fue apoyado por el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del CICM-ICUAP y por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado.

## 7.9. Bioética

No fue necesario el consentimiento informado, ya que las cepas se aislaron de muestras clínicas obtenidas de manera rutinaria, no se trabajó directamente con ninguna muestra; de igual forma, los nombres de los pacientes se mantuvieron en todo momento en anonimato.

## 7.10. Material Biológico

Se estudiaron 28 cepas de *L. adecarboxylata* de pacientes que cursaron con infecciones asociadas a la atención sanitaria, de las cuales, 2 cepas se tienen por duplicado, tomadas de dos pacientes diferentes y de las que se desconoce el tiempo de toma de muestra entre cada cepa.

**Tabla 2. Cepas controles**

Cepa	Microorganismo	Características	Donado por:
ATCC25922	<i>E. coli</i>	<i>uidA</i> , <i>ybbW</i> y control de susceptibilidad en antibiogramas	Dra. Margarita María de la Paz Arenas Hernández del Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos, BUAP
C7223	<i>E. coli</i>	Control positivo de crecimiento en pruebas bioquímicas, en medio EMB y MacConkey	LMHyC-CICM, BUAP
PE21	<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>	LMHyC-CICM, BUAP
AN54	<i>A. baumannii</i>	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	LMHyC-CICM, BUAP
PE21	<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	LMHyC-CICM, BUAP

### **7.11. Extracción de ADN por técnica de hervido**

La extracción del templado de ADN se realizó mediante la metodología de hervido para la posterior caracterización molecular de los genes. Se provocó la ruptura de células bacterianas en cultivo líquido por ebullición, ocasionando la liberación del ADN bacteriano.

A partir de un cultivo puro en placa de agar MacConkey (Bioxon ®) con 24 horas de crecimiento se realizó la siguiente metodología.

- ❖ Se sembraron colonias puras por 24 horas en 3 ml de medio BHI (® Bioxon).
- ❖ Se colocaron 1.5 ml de cultivo en caldo de BHI en un tubo nuevo de Eppendorf y se centrifugó por 3 minutos a 13000 rpm.
- ❖ Se decantó el sobrenadante con cuidado de no perder la pastilla en recipiente de desecho, se colocó 1.5 ml de caldo restante y se centrifugó por 3 minutos a 1300 rpm.
- ❖ Se decantó el sobrenadante y se agregó 500 µL de agua inyectable estéril (PISA ®), se homogeneizó con ayuda de la micropipeta.
- ❖ Se sometió a ebullición durante 15 minutos a baño maría para lisar las células. Se dejó enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- ❖ Se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 minutos para separar los restos celulares del ADN.
- ❖ Se recuperó el sobrenadante (que contenía el ADN) en tubos Eppendorf estériles y posteriormente se midió la concentración de DNA.

### **7.12. Cuantificación y pureza de ADN**

La concentración de ADN fue ajustada a 200 ng/µL con la ayuda del equipo NanoDrop 2000c; la pureza del ADN se midió con el mismo equipo mediante el coeficiente de absorbancia 260/280 nm, considerando una buena pureza del ADN si se obtiene un

valor de 1.7 a 2.0. Por último, se almacenó el DNA ya ajustado a la concentración necesaria en tubos de Eppendorf a -20°C.

### **7.13. Identificación bacteriana**

Las cepas de *L. adecarboxylata* provenientes de cinco hospitales de Guadalajara, Jal., fueron identificadas previamente por el sistema automatizado Vitek2 (bioMérieux, Inc.®), pero también fueron sometidas a proceso de confirmación de la identificación en el LMHyC mediante diferentes metodologías, dado que no se tiene un protocolo no automatizado de identificación para dicho genero bacteriano. Se realizaron pruebas bioquímicas, pruebas moleculares y una identificación bioinformática del gen *fosA* para corroborar el género y especie.

#### **7.13.1. Confirmación de género por pruebas bioquímicas**

Las cepas se sembraron en Agar MacConkey (Bioxon ®) como primer filtro, se incubaron a 37°C por 24 horas y se realizó una identificación de la morfología colonial. Después se resembraron en agar EMB-Levine (BD BBL®) buscando conocer la morfología en este medio y compararla con la cepa control C7223 de *E. coli*.

La identificación bioquímica de las cepas son *L. adecarboxylata* se realizó de acuerdo a 8 pruebas bioquímicas específicas del género *Leclercia* (Campos *et al.*, 2000; Stock *et al.*, 2004): agar hierro triple azúcar (TSI), urea (UR), fenilalanina (FA), lisina hierro agar (LIA), movilidad indol ornitina (MIO), rojo de metilo (RM), Voges Proskauer (VP) y citrato (CIT), esperando que la movilidad, el indol y RM fueran positivos y para las demás pruebas resultados negativos, poniendo énfasis en la prueba LIA que comúnmente en *E. coli* es positiva (Anexo 2).

#### **7.13.2. Identificación molecular**

La técnica de PCR se utilizó para determinar molecularmente si las cepas de estudio pertenecían al género *Escherichia*, y no al de *Leclercia*, para lo cual, se emplearon los templados de ADN para realizar una PCR de las 28 cepas amplificando los genes *uidA* y *ybbW* (Tabla 3 y 4) que codifican para la enzima  $\beta$ -glucoronidasa y para un

transportador de alantoína altamente específicos de *E. coli* (Kibbee *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2017) para asegurarnos que las cepas identificadas bioquímicamente no fueran *E. coli*.

**Tabla 3. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación del gen *uidA*, mediante PCR, para la identificación de *E. coli*.**

Secuencias de iniciadores y condiciones de PCR del gen <i>uidA</i>			
Oligonucleótidos (Secuencia 5' – 3')	Condiciones de reacción	Tamaño de amplificado	Referencia
<i>uidA</i>	94°C 5 min. 1 ciclo	486 pb	Cortés-Cortés, 2016
<i>uidA</i> -F: ATCACCGTGGTGACGCATGTCGC	94°C 30 seg.		
<i>uidA</i> -R: CACCACGATGCCATGTTCATCTGC	50°C 1 min. 35 ciclos		
	72°C 1 min.		
	72°C 5 min. 1 ciclo		

**Tabla 4. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación del gen *ybbW*, mediante PCR, para la identificación de *E. coli*.**

Secuencias de iniciadores y condiciones de PCR del gen <i>ybbW</i>			
Oligonucleótidos (Secuencia 5' – 3')	Condiciones de reacción	Tamaño de amplificado	Referencia
<i>ybbW</i>	94°C 4 min. 1 ciclo	667 pb	Carreón-León, 2019
<i>ybbW</i> -F: TGATTGGCAAATCTGGCCG	94°C 30 seg.		
<i>ybbW</i> -R: ATACTGGCAATCAGTACGCC	63°C 30 seg. 35 ciclos		
	72°C 45 seg.		
	72°C 5 min. 1 ciclo		
	10°C pausa		

**Tabla 5. Componentes para una reacción de PCR.**

Componentes	Concentración stock	Volumen (µL)	Concentración final de reacción
Agua	-	6.1	-
Buffer	10X	1	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1	2.5 mM
dNTP's	10 mM	0.2	0.2 mM
Iniciador Forward	25 mM	0.3	0.75 µM
Iniciador Reverse	25 mM	0.3	0.75 µM
Taq polimerasa	5 U/µL	0.1	0.5 U
ADN	200 ng/µL	1	20 ng/µL
Volumen final de la reacción		10 µL	

### 7.13.3. Identificación bioinformática del gen *fosA*

A partir de 16 genomas de *L. adecarboxylata* previamente secuenciados y proporcionados por los hospitales, se realizó un análisis bioinformático con ayuda de diferentes softwares de acceso libre, entre los que se encuentran: BLAST, NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para el análisis de las secuencias y RAST (<https://rast.nmpdr.org/>) para realizar el curado manual del entorno genético del gen *fosA* y Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para el alineamiento de las múltiples secuencias de nucleótidos con la cepa USDA-ARS-USMARC -60222 (número de registro de GenBank *CP013990.1*) que sirvió como referencia del gen *fosA8* (Madeira *et al.*, 2019).

### 7.14. Susceptibilidad antimicrobiana

A las 28 cepas de estudio se les determinó la susceptibilidad a 18 antimicrobianos pertenecientes a 9 familias de antibióticos, mediante el método de difusión en disco de Kirby-Baüer:

De un cultivo puro de 24 horas, sembrado en agar TSA, se tomaron de 2 a 4 colonias y se suspendieron en un tubo con 3 ml de solución salina isotónica (SSI) al 0.85% (masa/volumen) de NaCl, hasta alcanzar una turbidez igual a 0.5 de la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). De esta suspensión se impregnaron hisopos de algodón estéril y se inocularon 4 placas de agar Müeller-Hinton (Bioxon ®) por cepa, estriando toda la placa masivamente, empezando en la parte superior de la placa deslizando el hisopo sobre la superficie del agar tres veces, rotando la placa 45° en cada cambio, pasando por último el hisopo en la periferia de la placa para conseguir un crecimiento uniforme. Posteriormente, se colocaron los discos de antimicrobianos (Bio-Rad ®) con ayuda de unas pinzas estériles en una distribución estricta (Anexo 3), para no provocar efectos sinérgicos o antagónicos entre los antimicrobianos. Las placas se incubaron de 16 a 18 hrs a 37°C. Al mismo tiempo se usó la cepa control de *E. coli* ATCC25922 para comparar los halos de inhibición. Por último, se midieron los halos de inhibición de las placas y los resultados se interpretaron de acuerdo con los valores establecidos

por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019), clasificando así las cepas como resistente (R), de resistencia intermedia (I) o sensible (S) (Tabla 6).

**Tabla 6. Puntos de corte para la determinación del fenotipo de resistencia establecidos en el CLSI 2019**

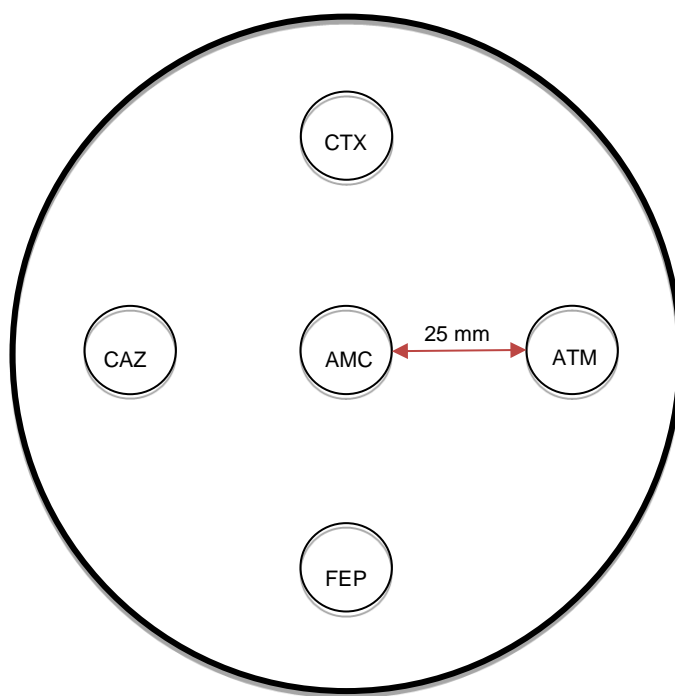
Grupo o familia	Antimicrobiano	Concentración (µg)	Interpretación de la medida del halo (mm)				
			S	SDD	I	R	
<b>Penicilinas</b>	ampicilina	AMP	10 µg	≥ 17	-	14-16	≤ 13
<b>Inhibidor de β-lactamasas</b>	amoxicilina con ácido clavulánico	AMC	20/10 µg	≥ 18	-	14-17	≤ 13
	ceftazidima	CAZ	30 µg	≥ 21	-	18-20	≤ 17
<b>Cefalosporinas</b>	cefotaxima	CTX	30 µg	≥ 26	-	23-25	≤ 22
	cefepime	FEP	30 µg	≥ 25	19-24	-	≤ 18
<b>Monobactámicos</b>	aztreonam	ATM	30 µg	≥ 21	-	18-20	≤ 17
<b>Carbapenémicos</b>	imipenem	IMP	10 µg	≥ 23	-	20-22	≤ 19
	meropenem	MEM	10 µg	≥ 23	-	20-22	≤ 19
	ertapenem	ETP	10 µg	≥ 22	-	19-21	≤ 18
<b>Quinolonas</b>	ácido nalidixico	NA	30 µg	≥ 19	-	14-18	≤ 13
<b>Fluoroquinolonas</b>	ciprofloxacino	CIP	5 µg	≥ 31	-	21-31	≤ 20
<b>Aminoglucósidos</b>	gentamicina	GM	10 µg	≥ 15	-	13-14	≤ 12
	amikacina	AN	30 µg	≥ 17	-	15-16	≤ 14
<b>Tetraciclinas</b>	tetraciclina	TE	30 µg	≥ 15	-	12-14	≤ 11
<b>Inhibidores de la vía de folato</b>	trimetoprima con sulfametoxazol	STX	1.25/23.7 5 µg	≥ 16	-	11-15	≤ 10
<b>Fenicoles</b>	cloranfenicol	C	30 µg	≥ 18	-	13-17	≤ 12
<b>Polimixinas</b>	colistina	CL	-	-	-	-	-
<b>Fosfonatos</b>	fosfomicina	FOS	200 µg	≥ 16	-	13-15	≤ 12

Tomado de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2019. S: sensible; SDD: Sensible Dependiente de Dosis I: intermedio; R: resistente.

### 7.15. Producción fenotípica de BLEE

A todas las cepas se les determinó la producción fenotípica de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) mediante la técnica de difusión con doble disco (EUCAST), usando sensidiscos de CTX, CAZ, ATM y FEP, colocándolos en la periferia de un disco central de AMC, respetando una distancia de 25 mm (Figura 6). El procedimiento para esta técnica es similar al de Kirby-Baüer, diferenciándose únicamente en la distribución de los discos.

La aparición de sinergismo (prolongación del halo de inhibición, cola de pescado u ojo de cerradura) entre alguno de los antibióticos CTX, CAZ, ATM y FEP con el disco central que contiene al inhibidor de  $\beta$ -lactamasas (ácido clavulánico) se interpretó como positivo para la producción de BLEE.



**Figura 6. Determinación de BLEE, mediante el método de difusión de doble disco.** En la figura se esquematiza la distribución de los discos de antibióticos para la determinación fenotípica de BLEE.



## 7.16. Búsqueda de genes de resistencia

### 7.16.1. Amplificación de genes de resistencia por PCR

Teniendo en cuenta el perfil de susceptibilidad a los antibióticos y utilizando los templados obtenidos con anterioridad, se realizó la búsqueda de genes de resistencia mediante PCR, amplificando los genes: *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* y *bla<sub>IMP</sub>* mediante los cebadores específicos de cada gen, siguiendo los protocolos estandarizados dentro del LMHyC, como se describe en la Tabla 7.

**Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad para la amplificación de genes de resistencia a carbapenemasas (de tipo metalo-β-lactamasas).**

<b>METALOBETALACTAMASAS</b>					
<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5' - 3')</b>	<b>Tamaño del amplificado (pb)</b>	<b>Condiciones de reacción</b>	<b>Referencia</b>
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	Vimd1- F	GATGGYGTTTGGTCGCATATC	Usando 1-2:400 Usando 1-3: 600	94°C 5 min. 1c 94°C 1 min X°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min 1 c X1-2:54°C X1-3:50°C	Bello-Lopez, 2015
	Vimd2-R	GAATGCGCAGCACCRGGA			
<i>bla<sub>imp</sub></i> (variantes)	IMPd-F	CTRCCGCAGWAGMGKCTTTG	515	94°C 5 min. 1c 94°C 1 min 56°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min 10°C/	Bello-Lopez, 2015
	IMPd-R	GCCADGCTACDANATTTGCGTC			
<i>bla<sub>ndm</sub></i> (variantes)	NDMv-F	AATATTATGCACCCGGTCGCG	732	94°C 5 min. 1c 94°C 1 min 54°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min 10°C/	Bello-Lopez, 2015
	NDMv-R	CATCACGATCATGCTGGCCTT			

Se utilizaron cepas que sirvieron como control positivo y blancos (mezcla de reacción sin DNA) que sirvieron para corroborar la ejecución de la técnica y tener como referencia la visualización de los fragmentos que se obtendrían. Las reacciones de

PCR se llevaron a cabo a un volumen de 10  $\mu$ L, con los componentes y a las concentraciones descritas en la Tabla 5.

Se obtuvo una visualización de los productos de PCR gracias a un corrimiento en una cámara de electroforesis, en un gel de agarosa al 1%, utilizando buffer TAE 1X a 100 voltios. Posteriormente, se tiñeron los gels con BET (sigma®) (4  $\mu$ g/ml) durante 10-30 segundos, para luego retirar el exceso en agua destilada durante 15 a 30 min. Por último, se obtuvo una fotografía mediante el fotodocumentador MiniBIS Pro DNR Bio-Imaging Systems.

#### **7.16.2. Detección bioinformática de genes de resistencia**

Mediante el software de libre acceso ResFinder 4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) se buscó e identificó la presencia de genes adquiridos que median la resistencia a antimicrobianos, con enfoque en los genes: *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, y *bla*<sub>GES</sub>.

#### **7.17. Relación clonal**

Se determinó la relación poblacional de las cepas a partir del ensayo de Electroforesis de Gel en Campos Pulsados (PFGE). Se realizó también un análisis de los patrones de restricción de manera visual y automatizado. La determinación de similitudes de los patrones de digestión se analizó por el software NTSYSpc versión 2.21s, por un análisis de agrupación haciendo uso del coeficiente de Dice.

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

Técnica empleada para determinar la relación clonal de las cepas con base a un patrón de restricción generado por la endonucleasa *Xba*I. Se siguió el protocolo propuesto por Cortés-Cortés, para *E. coli* en 2016.

#### **7.17.1.1. Preparación de los insertos:**

A partir de un cultivo puro de *L. adecarboxylata* crecido en agar BHI, durante 24 horas, se recolectó en un tubo Eppendorf suficiente cantidad de la cepa y se realizó una suspensión en 1 ml de Buffer SE (75mM NaCl y 25mM EDTA, pH 8) hasta alcanzar una absorbancia de 1.35-1.5 a 610 nm.

Se preparó agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad®) al 1.5% en tampón TE (10mM Tris y 1mM EDTA) y se mantuvo a 54°C. Se preparó una mezcla con 0.5 ml de la suspensión bacteriana y 0.5 ml de agarosa, se distribuyó en moldes para formar los insertos y se dejaron solidificar durante 10 minutos en refrigeración.

#### **7.17.1.2. Lisis bacteriana:**

Se prepararon 3 insertos por cepa, a los que se les agregaron 3 ml de Buffer de lisis [50 mM Tris; 50 mM EDTA pH 8; 1% sarcosil; 0.3 mg/ml proteinasa K (Thermo Fisher Scientific®)] y se dejó incubar durante 24 h en baño María a 54°C.

#### **7.17.1.3. Lavado de los insertos:**

Se retiró el Buffer de lisis y se realizaron lavados a 54°C en baño María, como se describe a continuación:

- Se agregó 3 ml de agua destilada estéril cada 10 min a 54°C (3 veces).
- Se agregó 3 ml de Buffer TE cada 10 min a 54°C (2 veces).
- Se agregó 3 ml de Buffer TE por 10 min a temperatura ambiente (1 vez).

Posteriormente los insertos se conservaron en 3 ml de Buffer TE a 4°C hasta su próxima utilización.

#### **7.17.1.4. Digestión enzimática:**

Para realizar la digestión con la enzima *XbaI* (Thermo Fisher Scientific®) se utilizó medio inserto de cada cepa, con lo que se obtuvieron fragmentos, de acuerdo con el corte específico generado por la enzima (Tabla 8). El volumen final del tampón de digestión fue de 100 µl por tubo, a los que se les añadió 40 U de enzima *XbaI*, 10 µl

de Buffer 10X de la enzima y agua estéril. La mezcla y el inserto se dejó incubar a 37°C durante 6 horas.

**Tabla 8. Sitios de corte de la enzima *Xba*l (Cortés-Cortes, 2016)**

Enzima	Secuencias palindrómicas
<i>Xba</i> l	5' ... T <sup>^</sup> C T A G A ... 3'
	3' ... A G A T C <sup>^</sup> T ... 5'

#### **7.17.1.5. Preparación del gel de agarosa:**

Se preparó agarosa al 1.2% disuelta en TBE 0.5X, la mezcla se vertió en el molde, se dejó polimerizar a temperatura ambiente, posteriormente, en los pozos del molde se colocaron los insertos, se cargaron en el primer y último pozo el marcador de peso molecular y para finalizar, los pozos se sellaron con agarosa.

#### **7.17.1.6. Electroforesis:**

La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de campos pulsados CHEF-DR II (BioRad ®) con 2 L de TBE 0.5X suplementado con tiourea (0.5g/L, Merck®). El gradiente de voltaje era de 6 V/cm y se empleó una rampa lineal pulsada de 1 a 30 seg durante 23 horas a 14°C.

#### **7.17.1.7. Tinción del gel y visualización:**

La tinción del gel fue en una solución de 200 ml de BET (sigma ®) (10 µl/ 200 ml) durante 1 min, posteriormente se destiñó en agua destilada de 10 a 15 minutos y se visualizó en un sistema generador de imágenes MiniBIS Pro-DNR Bio-Imaging Systems. El gel se destiñó varias veces en agua destilada, fotografiándose periódicamente hasta obtener una correcta visualización de las bandas.

### **7.17.2. Análisis estadístico**

Las cepas se compararon mediante el coeficiente de Dice para determinar la relación que pudiera existir entre ellas; las cepas obtenidas con un valor  $\geq 0.8$  se consideraron

significativas para relacionar una similitud o hablar de que son cepas estrechamente similares y utilizando los criterios de Tenover (Tenover *et al.*, 1995). Se utilizó el software NTSYSpc 2.21q para el análisis estadístico y el resultado se representó con un árbol filogenético.

### **7.17.3. Árbol filogenético**

Para obtener el dendograma de los patrones de restricción por la metodología de PFGE, se realizó una matriz básica de datos en Excel (tipo de matriz, número de filas, número de columnas y nombre de las cepas a analizar) se realizó un análisis y curado manual de las imágenes de los geles mediante el programa Gel Quant Express para generar la matriz de datos (Anexo 4). Los patrones generados por la digestión enzimática fueron agrupados a través del software NTSYSpc 2.21q, utilizando el coeficiente de Dice y el método “Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages” (UPGMA) para realizar dendogramas a partir de los datos analizados

## **8. RESULTADOS**

### **8.1. Identificación bioquímica, molecular y bioinformática de las cepas de *L. adecarboxylata***

#### **8.1.1. Identificación bioquímica**

Se trabajó con un total de 28 cepas provenientes en su mayoría de neonatos internados en cinco hospitales de la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco. Se tiene un duplicado de dos cepas que fueron aisladas de dos pacientes diferentes, los datos se encuentran a continuación (Tabla 9). Las 28 cepas se sembraron en agar MacConkey (Bioxon®) y el medio EMB-Levine (BD BBL®), junto con el control de *E. coli* C7223 para observar el crecimiento y las diferencias fenotípicas en ambos medios para la especie *Leclercia* ya que son los medios de cultivo que se emplean comúnmente en la identificación de *E. coli*.

En agar MacConkey (Bioxon®) las colonias de *E. coli* crecen circularmente, de color rosado o morado, mientras que las 28 cepas estudiadas presentaron bordes completos, circulares, de color rosado con una umbilicación marrón en el centro (Figura 7-A).

En el medio EMB-Levine (BD BBL®) las cepas de ambas especies crecieron con un brillo metálico, la diferencia fue que para *E. coli* el color es negro azulado y en *L. adecarboxylata* era negro amarillo verdoso (Figura 7-B).

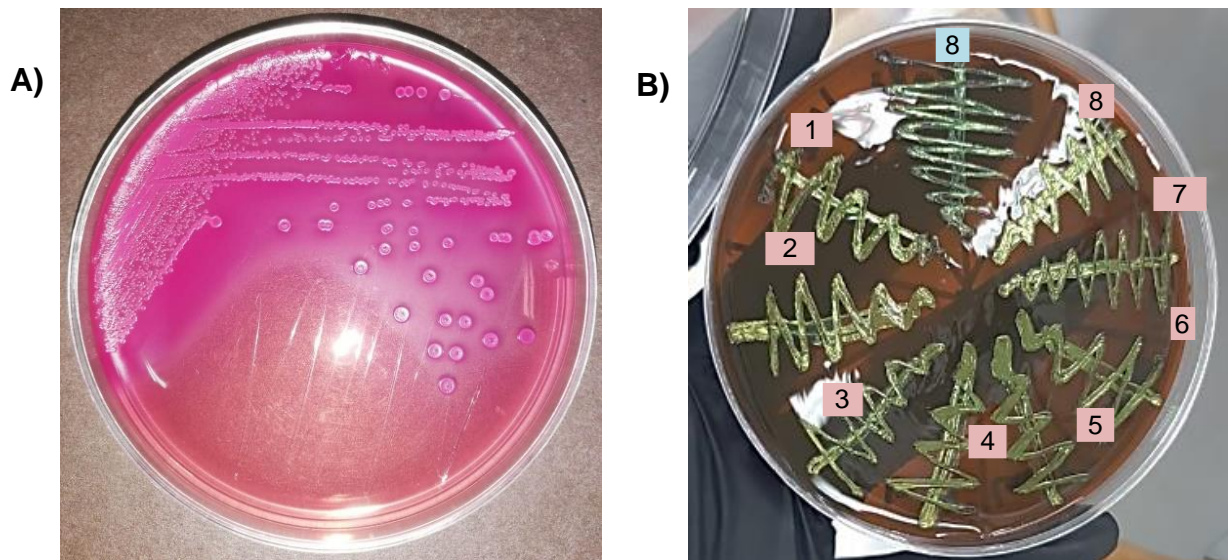
De la misma forma, a las 28 cepas se les realizaron pruebas de metabolismo bioquímico para confirmar el género y la especie, dentro de las 8 pruebas bioquímicas realizadas, la única prueba de identificación que diferencia a *L. adecarboxylata* de *E. coli* es la prueba LIA (Anexo 5). Como resultado se obtuvieron 28 cepas identificadas como *L. adecarboxylata* (Tabla 10 y Figura 8).

**Tabla 9. Datos de las cepas aisladas de cinco hospitales en Guadalajara, Jalisco.**

Número de cepa	Nombre de la cepa	Sexo del paciente
1	Lac-1	M
2	Lac-2	M
3	Lac-3	RN
4	Lac-4	RN
5	Lac-5	M
6	Lac-6	RN
7	Lac-7	F
8	Lac-8	RN
9	Lac-9	RN
10	Lac-10	RN
11	Lac-11	F/ RN
12	Lac-12	RN
13	Lac-13	RN
14	Lac-14	M
15	Lac-15	M
16	Lac-16	RN
17	Lac-17	RN
18	Lac-18	M
19	Lac-20	M

20	Lac-21	RN
21	Lac-23	M
22	Lac-25	M
23	Lac-27	M
24	Lac-29	M
25	Lac-32	M
26	Lac-34	M
27	Lac-36	F
28	Lac-40	RN
Cepas duplicadas		

Lac: *Leclercia adecarboxylata*; M: Masculino; F: Femenino; RN: Recién Nacido (Se desconoce el sexo).

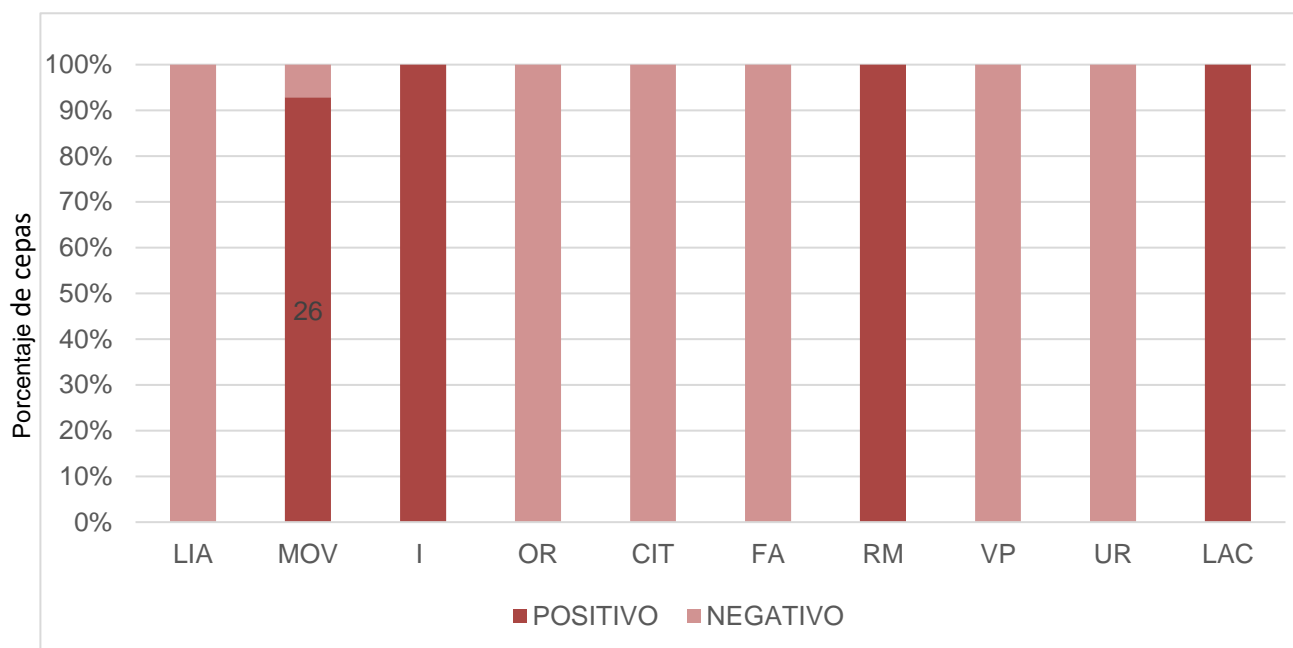


**Figura 7. Crecimiento bacteriano de *L. adecarboxylata*.** **A)** Crecimiento bacteriano de *L. adecarboxylata* en agar MacConkey (Bioxon ®). **B)** Crecimiento bacteriano de cepas de *L. adecarboxylata* (1: Lac-1; 2: Lac-2; 3: Lac-3; 4: Lac-4; 5: La-5; 6: Lac-6; 7: Lac-7) y de la cepa control de *E. coli* C7223 (8) en medio EMB-Levine (BD BBL®).

**Tabla 10. Resultados representativos de las pruebas bioquímicas en cepas de *L. adecarboxylata*.**

Cepa	Medio MacConkey	Medio EMB-Levine	LIA	TSI	M	I	O	CIT	FA	RM	VP	UR	Bacteria identificada
C7223	Lac (+)	+	K/K	A/A	+	+	-	-	-	+	-	-	<i>Escherichia coli</i>
Lac-1	Lac (+)	+	K/A	A/A	+	+	-	-	-	+	-	-	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
Lac-2	Lac (+)	+	K/A, Gas	A/A	+	+	-	-	-	+	-	-	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
Lac-3	Lac (+)	+	K/A, Gas	A/A, Gas	-	+	-	-	-	+	-	-	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
Lac-4	Lac (+)	+	K/A, Gas	A/A, Gas	+	+	-	-	-	+	-	-	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
Lac-6	Lac (+)	+	K/A, Gas	A/A, Gas	-	+	-	-	-	+	-	-	<i>Leclercia adecarboxylata</i>

+: Positivo; -: Negativo; Lac (+): Lactosa positiva; A/A= Ácido/Ácido, K/K= Básico/Básico; Gas: Producción de gas; LIA: Lisina hierro agar; TSI: Agar Hierro Triple azúcar; M: Movilidad; I: indol; O: Ornitina; CIT: citrato; FA: Fenilalanina; RM: rojo de metilo; VP: Voges Proskauer; UR: urea.



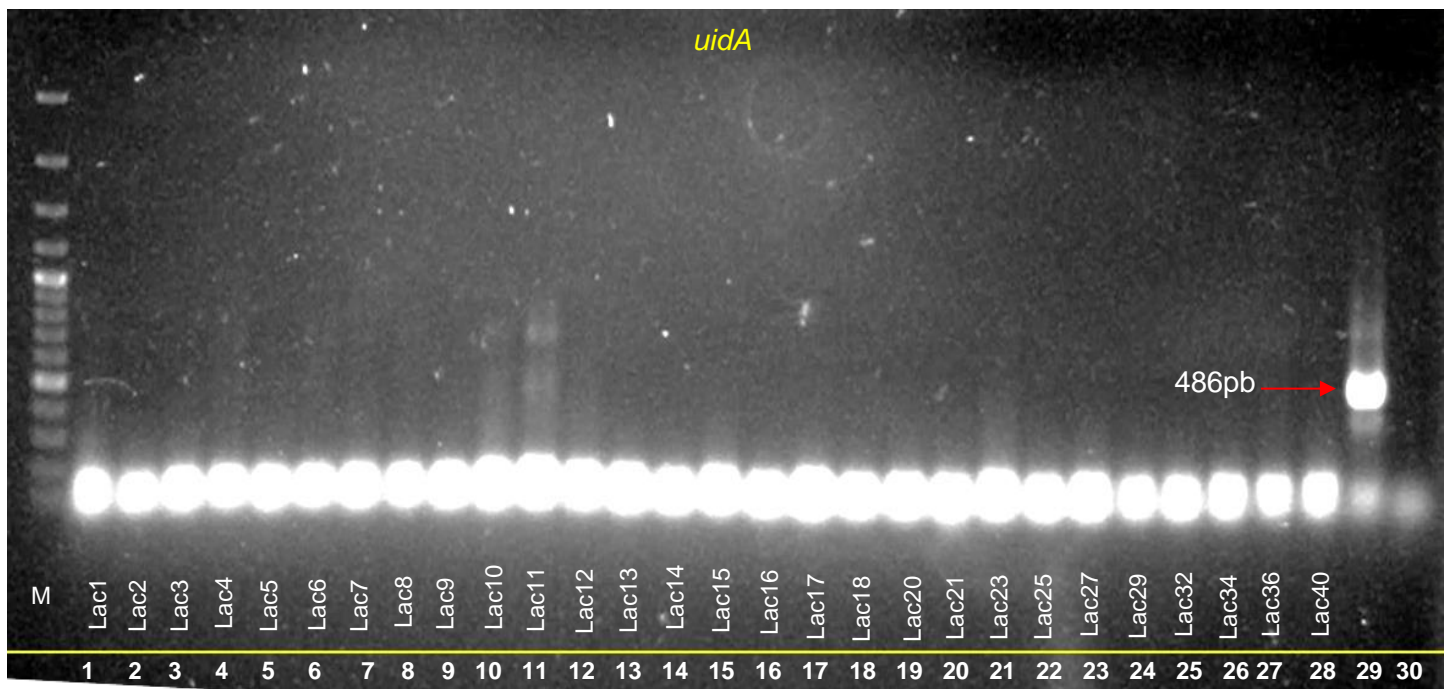
**Figura 8. Resultados de pruebas bioquímicas para la identificación de *L. adecarboxylata***

I: indol, RM: rojo de metilo, VP: Voges Proskauer, CIT: citrato, TSI: agar hierro triple azúcar, UR: urea, FA: fenilalanina, LIA: lisina hierro agar, OR: ornitina, MOV: movilidad, LAC: lactosa.



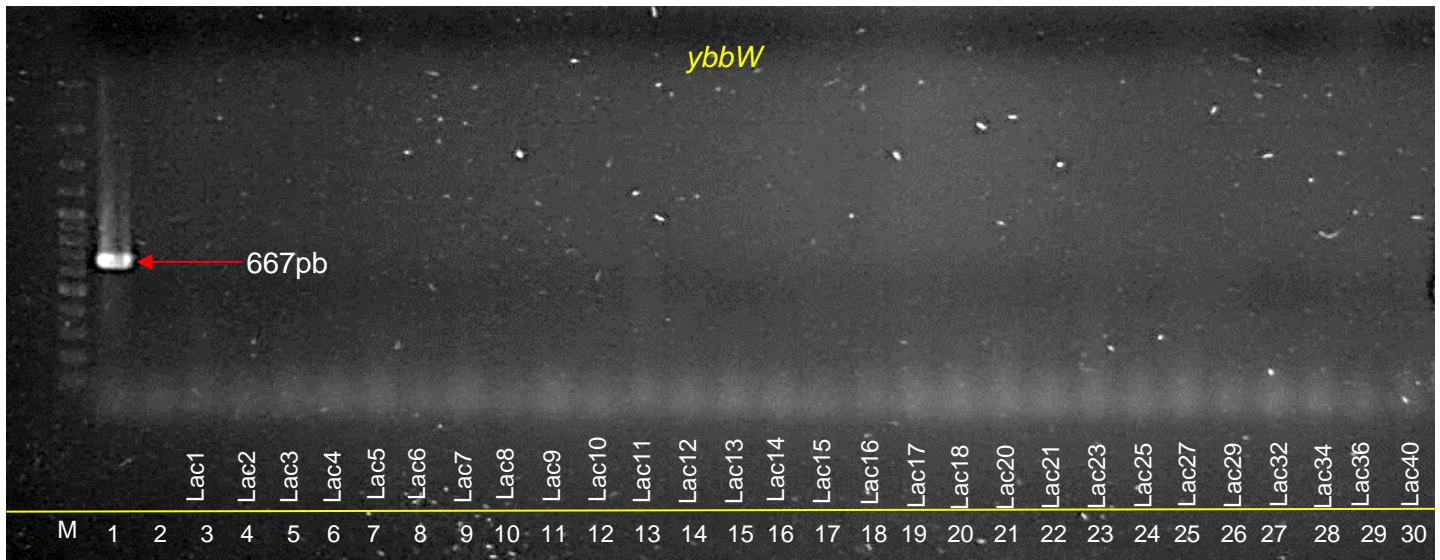
### 8.1.2. Identificación molecular

Posteriormente a las pruebas bioquímicas se realizó una confirmación mediante biología molecular para confirmar que las cepas con las que se estaba trabajando no fueran *E. coli*, esto mediante una amplificación de PCR de los genes *uidA* y *ybbW* que codifican para una  $\beta$ -glucoronidasa y una permeasa de alantoína respectivamente, que son utilizados comúnmente como marcadores en la identificación del género *Escherichia* (Kibbee *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2017). No se obtuvo ningún amplificado del gen *uidA* o *ybbW* para ninguna de las 28 cepas de *L. adecarboxylata* por lo que descartamos que alguna cepa sea del género *Escherichia* (Figura 9 y 10).



**Figura 9. Amplificación del gen *uidA*, mediante PCR.**

M: Marcador, Carril 1: Lac-1, 2: Lac-2, 3: Lac-3 4: Lac-4, 5: Lac-5, 6: Lac-6, 7: Lac-7, 8: Lac-8, 9: Lac-9, 10: Lac-10, 11: Lac-11, 12: Lac-12, 13: Lac-13, 14: Lac-14, 15: Lac-15, 16: Lac-16, 17: Lac-17, 18: Lac-18, 19: Lac-20, 20: Lac-21, 21: Lac-23, 22: Lac-25, 23: Lac-27, 24: Lac-29, 25: Lac-32, 26: Lac-34, 27: Lac-36, 28: Lac-40, 29: Control Positivo (*E. coli* ATCC25922), 30: Blanco.



**Figura 10. Amplificación del gen *ybbW*, mediante PCR.**

M: Marcador, Carril 1: Control Positivo (*E. coli* ATCC25922), 2: Blanco, 3: Lac-1, 4: Lac-2, 5: Lac-3, 6: Lac-4, 7: Lac-5, 8: Lac-6, 9: Lac-7, 10: Lac-8, 11: Lac-9, 12: Lac-10, 13: Lac-11, 14: Lac-12, 15: Lac-13, 16: Lac-14, 17: Lac-15, 18: Lac-16, 19: Lac-17, 20: Lac-18, 21: Lac-20, 22: Lac-21, 23: Lac-23, 24: Lac-25, 25: Lac-27, 26: Lac-29, 27: Lac-32, 28: Lac-34, 29: Lac-36, 30: Lac-40.

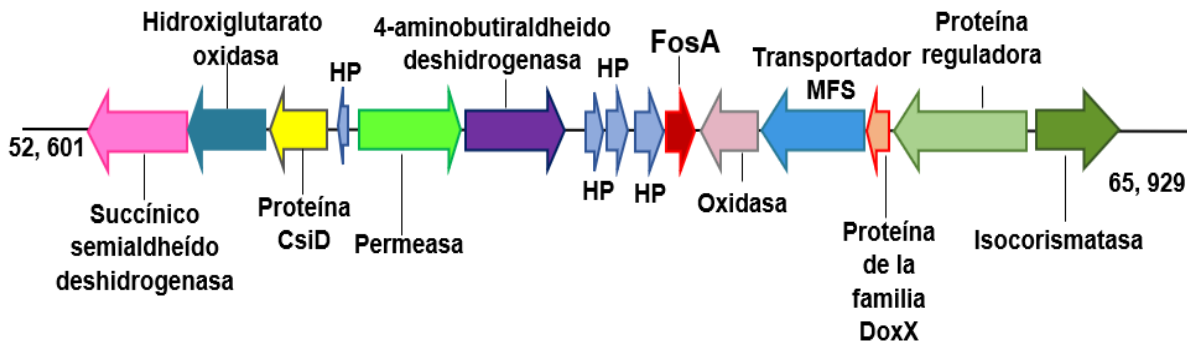
### 8.1.3. Identificación mediante bioinformática del gen *fosA*

La identificación del gen *fosA*, se realizó mediante análisis bioinformático a partir de 16 ensamblados de secuenciaciones de genomas completos proporcionados por el Dr. Barrios-Villa. El entorno genético del gen *fosA* se identificó mediante las plataformas BLAST y RAST. En la Figura 11 se muestra una imagen representativa de los resultados obtenidos en el análisis. También se alinearon las secuencias de nucleótidos de los genes *fosA* (Figura 12) que codifica para el gen de resistencia a

fosfomicina en nuestras cepas de estudio con la cepa USDA-ARS-USMARC -60222 (número de registro de GenBank *CP013990.1*) que contiene el gen de referencia *fosA8* observando una identidad del 93.90% con respecto a la cepa control; en cuanto al análisis de la secuencias de aminoácidos (Figura 13) se encontró una identidad del 96.5%, con una diferencia de 5 aa en todas las cepas, lo que indicó que el 100% (16/16) de los genomas analizados por bioinformática para su identificación cuenta con la presencia del gen *fosA*.

Lac-34

13, 328pb



**Figura 11.** Imagen representativa de la identificación y el entorno genético del gen *fosa* mediante bioinformática, utilizando la plataforma BLAST, RAST y curado manual. Se ejemplifica el entorno genético de la cepa Lac-34, debido a que era el mismo para las 16 cepas, se muestra en rojo el gen *fosa* iniciando en 59 758pb y terminando en 60183pb, con un tamaño de 426pb (142 a.a.). HP: proteínas hipotéticas; MFS: transportados de la superfamilia facilitadora principal; DoxX: proteína conservada no caracterizada; CsiD: Proteína D inducida por la falta de carbono.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
lcl|NZ_CP013990.1_cds_WP_059308838.1_3906      ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACCTTGCTGTGTCAGCAACTGCCTGCCAGCATCACT      60
Lac.1      ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACTCTTGCTGTGTCAGCAACCTGCCTGCCAGCATCGCA      60
Lac.2      ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACTCTTGCTGTGTCAGCAACCTGCCTGCCAGCATCGCA      60
Lac.5      ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACTCTTGCTGTGTCAGCAACCTGCCTGCCAGCATCGCA      60
Lac.6      ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACTCTTGCTGTGTCAGCAACCTGCCTGCCAGCATCGCA      60
Lac.9      ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACTCTTGCTGTGTCAGCAACCTGCCTGCCAGCATCGCA      60
Lac.10     ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACTCTTGCTGTGTCAGCAACCTGCCTGCCAGCATCGCA      60
Lac.13     ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACTCTTGCTGTGTCAGCAACCTGCCTGCCAGCATCGCA      60
Lac.14     ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACTCTTGCTGTGTCAGCAACCTGCCTGCCAGCATCGCA      60
Lac.17     ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACTCTTGCTGTGTCAGCAACCTGCCTGCCAGCATCGCA      60
Lac.20     ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACTCTTGCTGTGTCAGCAACCTGCCTGCCAGCATCGCA      60
Lac.23     ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACTCTTGCTGTGTCAGCAACCTGCCTGCCAGCATCGCA      60
Lac.25     ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACTCTTGCTGTGTCAGCAACCTGCCTGCCAGCATCGCA      60
Lac.27     ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACTCTTGCTGTGTCAGCAACCTGCCTGCCAGCATCGCA      60
Lac.34     ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACTCTTGCTGTGTCAGCAACCTGCCTGCCAGCATCGCA      60
Lac.36     ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACTCTTGCTGTGTCAGCAACCTGCCTGCCAGCATCGCA      60
Lac.40     ATGCTTAACGCCCTTAACCATCTGACTCTTGCTGTGTCAGCAACCTGCCTGCCAGCATCGCA      60
*****

lcl|NZ_CP013990.1_cds_WP_059308838.1_3906      TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
Lac.1      TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
Lac.2      TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
Lac.5      TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
Lac.6      TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
Lac.9      TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
Lac.10     TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
Lac.13     TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
Lac.14     TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
Lac.17     TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
Lac.20     TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
Lac.23     TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
Lac.25     TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
Lac.27     TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
Lac.34     TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
Lac.36     TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
Lac.40     TTCTGGCGCGATCTTCTCGGTCTGCGCTGACGCGCAATGGCACACCGGAGCTTATCTC      120
*****
```



```

lc1|NZ_CP013990.1_cds_WP_059308838.1_3906      GCGCGTCTGGCGGCCTATCGGGAGAACCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGAGGAA      420
Lac.1      GCGCGTCTGGCGGCCTGTCTGGGAGAAGCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGATGAA      420
Lac.2      GCGCGTCTGGCGGCCTGTCTGGGAGAAGCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGATGAA      420
Lac.5      GCGCGTCTGGCGGCCTGTCTGGGAGAAGCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGATGAA      420
Lac.6      GCGCGTCTGGCGGCCTGTCTGGGAGAAGCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGATGAA      420
Lac.9      GCGCGTCTGGCGGCCTGTCTGGGAGAAGCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGATGAA      420
Lac.10     GCGCGTCTGGCGGCCTGTCTGGGAGAAGCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGATGAA      420
Lac.13     GCGCGTCTGGCGGCCTGTCTGGGAGAAGCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGATGAA      420
Lac.14     GCGCGTCTGGCGGCCTGTCTGGGAGAAGCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGATGAA      420
Lac.17     GCGCGTCTGGCGGCCTGTCTGGGAGAAGCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGATGAA      420
Lac.20     GCGCGTCTGGCGGCCTGTCTGGGAGAAGCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGATGAA      420
Lac.23     GCGCGTCTGGCGGCCTGTCTGGGAGAAGCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGATGAA      420
Lac.25     GCGCGTCTGGCGGCCTGTCTGGGAGAAGCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGATGAA      420
Lac.27     GCGCGTCTGGCGGCCTGTCTGGGAGAAGCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGATGAA      420
Lac.34     GCGCGTCTGGCGGCCTGTCTGGGAGAAGCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGATGAA      420
Lac.36     GCGCGTCTGGCGGCCTGTCTGGGAGAAGCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGATGAA      420
Lac.40     GCGCGTCTGGCGGCCTGTCTGGGAGAAGCCTTACGCGGGAATGGTTTTTACGTCAGATGAA      420
***** * ***** *****

lc1|NZ_CP013990.1_cds_WP_059308838.1_3906      GCGTAA      426
Lac.1      GCGTAA      426
Lac.2      GCGTAA      426
Lac.5      GCGTAA      426
Lac.6      GCGTAA      426
Lac.9      GCGTAA      426
Lac.10     GCGTAA      426
Lac.13     GCGTAA      426
Lac.14     GCGTAA      426
Lac.17     GCGTAA      426
Lac.20     GCGTAA      426
Lac.23     GCGTAA      426
Lac.25     GCGTAA      426
Lac.27     GCGTAA      426
Lac.34     GCGTAA      426
Lac.36     GCGTAA      426
Lac.40     GCGTAA      426
*****

```

**Figura 12. Alineamiento de nucleótidos para el análisis bioinformático del gen *fosA* de 16 cepas de *L. adecarboxylata* (326 pb, 142 aa) comparado con el gen *fosA8* reportado en la cepa USDA-ARS-USMARC -60222. (Primera línea).**

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

FosA      MLNALNHLTLAVSNLPASITFWRDLLGLRLHAEWHTGAYLTCGDLWLCLSYDETRTFIPP      60
Lac-34    MLNALNHLTLAVSNLPASIAFWRDLLGLRLHAEWHTGAYLTCGDLWLCLSYDETRQFIPP      60
*****

FosA      QNSDYTHYAFSVEPEHFDVAQKLDAGVTVWKENKSEGASFYFLDPDGHKLELHVGDLA      120
Lac-34    QNSDYTHYAFSVEPEHFDVAQKLQDAGVTVWKENKSEGASFYFLDPDGHKLELHVGDLA      120
*****

FosA      ARLAAYREKPYAGMVFTSEEA      141
Lac-34    ARLAACREKPYAGMVFTSDEA      141
*****

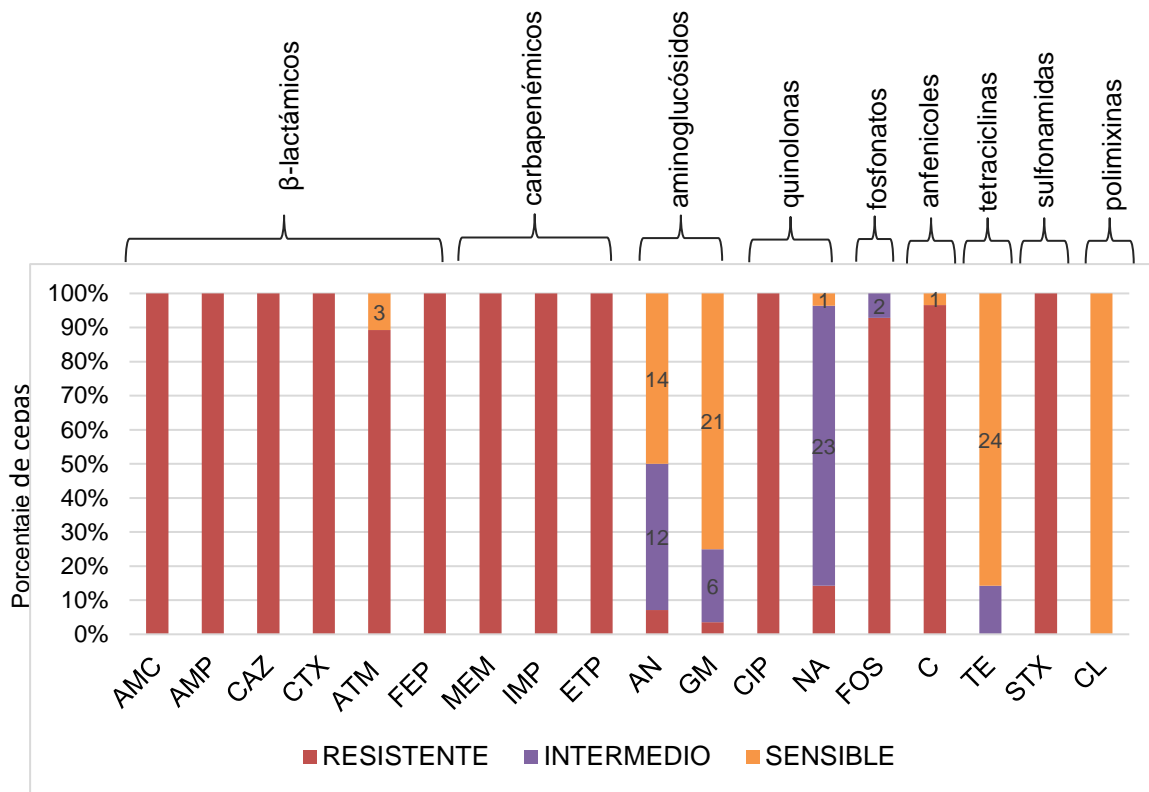
```

**Figura 13. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína *fosA* de la cepa control de *Leclercia* USDA-ARS-USMARC -60222 y de la cepa Lac-34 representativa de este estudio.**

## **8.2. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana y fenotipo de la producción de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)**

### **8.2.1. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana**

A las 28 cepas de estudio se les identificó el perfil de resistencia utilizando el método de Kirby-Baüer (Tabla 11 y Figura 15-A) atendiendo las recomendaciones por el CLSI 2019, como se explica en el apartado de material y métodos; la susceptibilidad fue probada con 18 antibióticos pertenecientes a 9 familias. Los resultados indicaron que las 28 cepas (100%) presentaron multidrogoresistencia (resistencia por lo menos a un antibiótico de 3 o más diferentes grupos de antibióticos). Todas las cepas fueron resistentes a amoxicilina con ácido clavulánico, ampicilina, ceftazidima, cefotaxima, cefepime ( $\beta$ -lactámicos), meropenem, imipenem y ertapenem (carbapenémicos), trimetoprima/sulfametoxazol (sulfonamidas), y ciprofloxacino (quinolonas). Se observó un 96.4% (27/28) de resistencia al cloranfenicol, un 92.9% (26/28) de las cepas fue resistente a la fosfomicina, el 89.8% (25/28) resistente a aztreonam, el 14.3% (4/28) de las cepas fue resistente a el ácido nalidíxico (quinolonas) y únicamente el 7.1% (2/28) de las cepas fue resistente a amikacina (aminoglucósidos). El 100% (28/28) de las cepas fue sensible a la colistina, el 85.7% (24/28) sensible a tetraciclina y el 75% (21/28) a gentamicina (Figura 14).



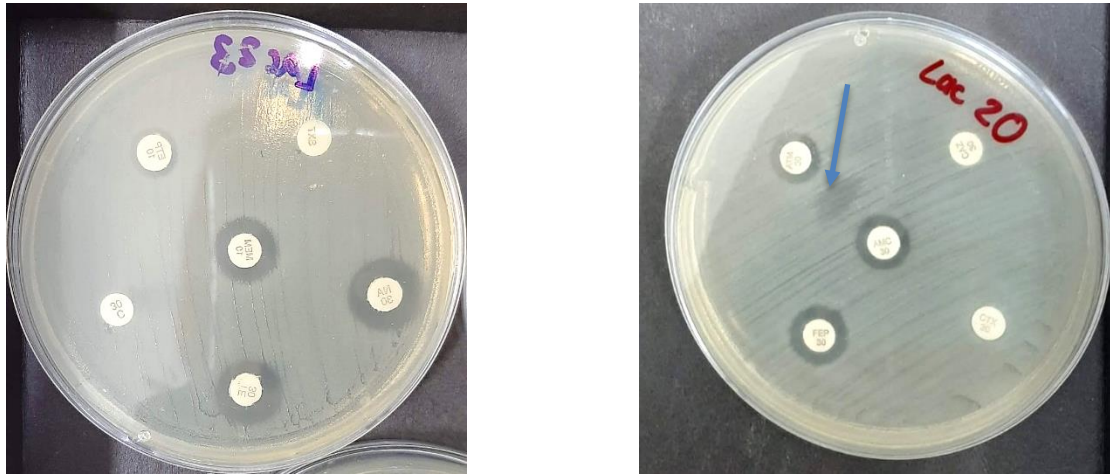
**Figura 14.** Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de 28 cepas de *L. adedecarboxylata*.

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; CL: colistina.

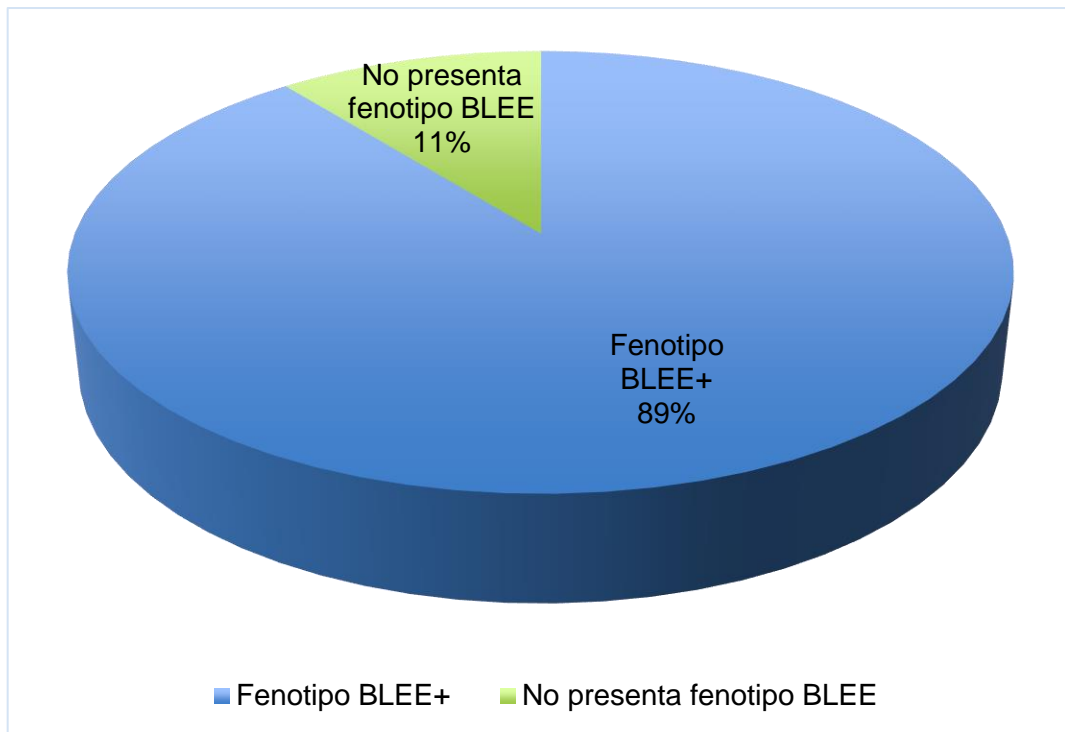
### 8.2.2. Producción fenotípica de BLEE

A la par de la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, se realizó la caracterización fenotípica de BLEE's en las 28 cepas de *L. adedecarboxylata*, por el método de difusión de doble disco, con los antibióticos AMC, CTX, CAZ, FEP y ATM (Figura 15-B).

Los resultados de la producción fenotípica de BLEE mostraron que 25 de las 28 cepas (89.3%) de *L. adedecarboxylata* presentan fenotipo BLEE (Tabla 9), mientras que las cepas Lac-4, Lac-21 y Lac-34 (10.7%) no presentaron este perfil (Figura 16).



**Figura 15. A)** Determinación del perfil de resistencia por la técnica Kirby-Baüer en una cepa de *L. adedecarboxylata*. **B)** Determinación del fenotipo BLEE con el método de doble disco propuesto por EUCAST. La flecha señala la formación de un halo de inhibición.



**Figura 16.** Grafica de resultados de fenotipo BLEE de 28 cepas de *L. adedecarboxylata*



**Tabla 11. Fenotipo de resistencia y fenotipo BLEE de las cepas de *L. adecarboxylata***

Cepa	Fenotipo de resistencia																Fenotipo BLEE								
	β-lactámicos										aminoglucósidos		quinolonas		fosfonatos	anfenicoles	tetraciclinas	sulfonamidas	polimixinas	Total Resistentes (n)	CTX	CAZ	ATM	FEP	BLEE
	AMC	AMP	CAZ	CTX	ATM	FEP	MEM	IMP	ETP	AN	GM	CIP	NA	FOS	C	TE	STX	CL							
Lac-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	S	R	S	14	-	-	+	-	+	
Lac-2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	+	-	+	
Lac-3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S	14	-	-	+	-	+	
Lac-4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	-	-	-	
Lac-5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	+	-	+	
Lac-6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	+	-	+	
Lac-7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	S	R	S	14	-	-	+	-	+	
Lac-8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	+	-	+	
Lac-9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	+	-	+	
Lac-10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	+	-	+	
Lac-11	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	+	-	+	
Lac-12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	+	-	+	
Lac-13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	+	-	+	
Lac-14	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	+	-	+	
Lac-15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	+	-	+	
Lac-16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	+	-	+	
Lac-17	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	R	I	R	S	13	-	-	+	-	+	
Lac-18	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	R	I	R	S	13	-	-	+	-	+	
Lac-20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	+	-	+	

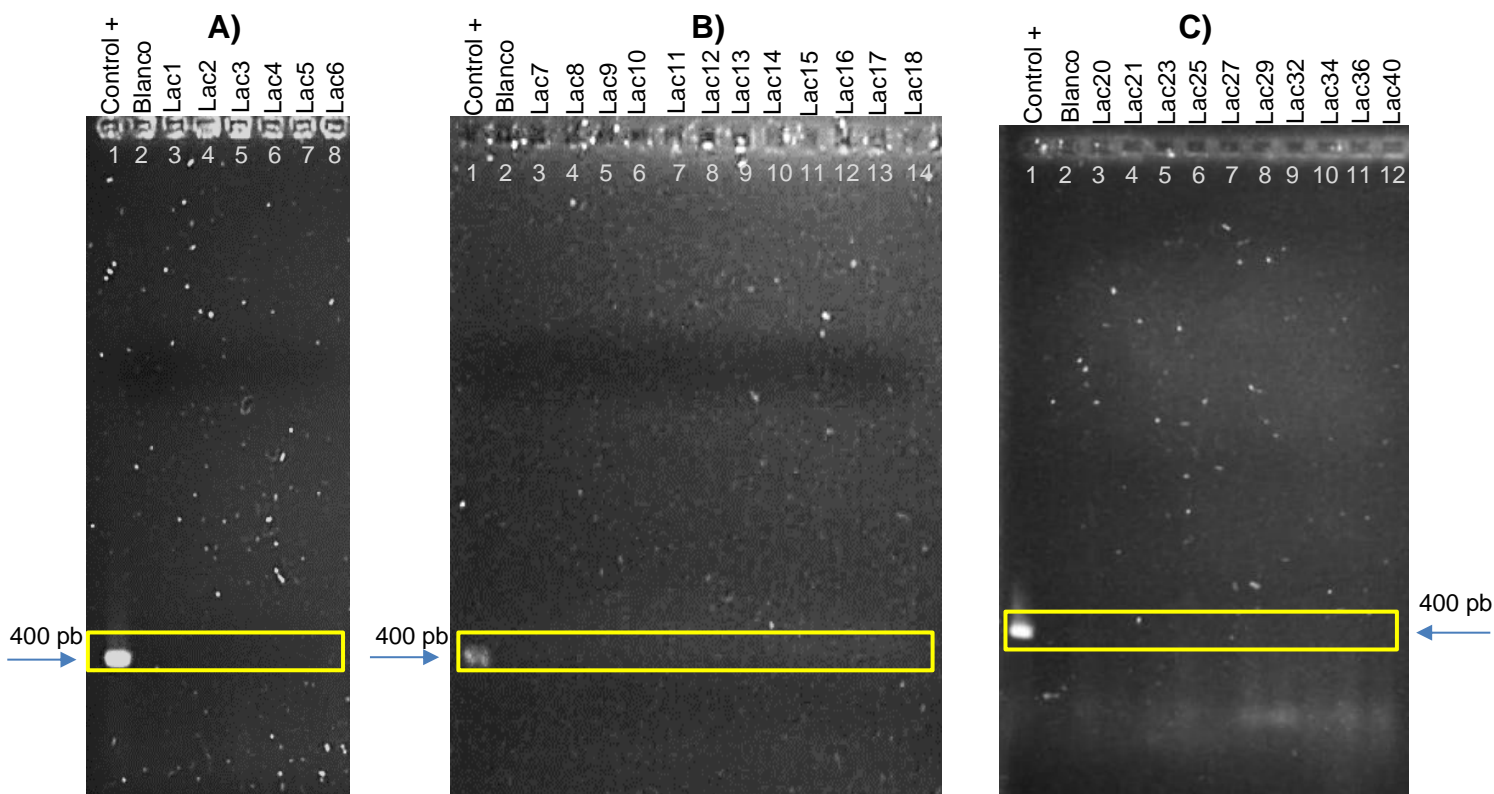
Lac-21	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	I	R	S	S	R	S	11	-	-	-	-	-
Lac-23	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I	R	I	R	S	13	-	-	+	-	+
Lac-25	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	I	R	S	14	-	-	+	-	+
Lac-27	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	14	-	-	+	-	+
Lac-29	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	I	I	R	S	R	S	12	-	-	+	-	+
Lac-32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	+	-	+
Lac-34	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	I	R	R	S	R	S	12	-	-	-	-	-
Lac-36	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	+	-	+
Lac-40	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	I	R	R	S	R	S	13	-	-	+	-	+
S: Sensible; I: Intermedio; R: Resistente; AMC: amoxicilina con ácido clavulánico; AMP: ampicilina; CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; ATM: aztreonam; FEP: cefepime; MEM: meropenem; IPM: imipenem; ETP: ertapenem; AN: amikacina; GM: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; NA: ácido nalidíxico; FOS: fosfomicina; C: cloranfenicol; TE: tetraciclina; SXT: trimetoprima/sulfametoxazol; CL: colistina.																								
RESISTENTE																								
INTERMEDIO																								
SENSIBLE																								

### 8.3. Identificación de genes de resistencia

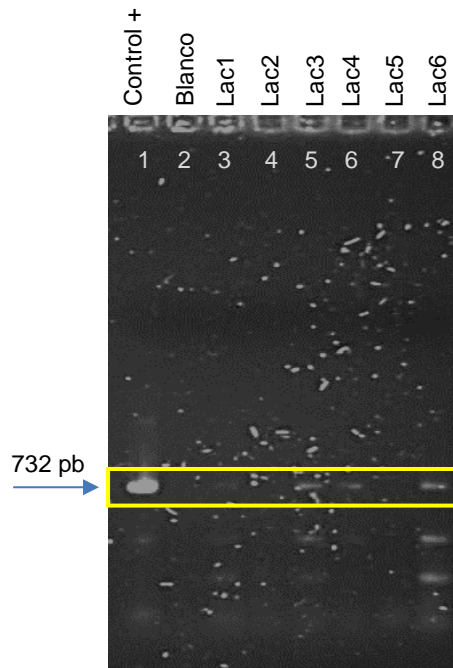
#### 8.3.1. Detección molecular de genes de resistencia a carbapenemasas

Mediante la técnica de PCR se buscaron los genes que codifican para BLEEs en *Leclecia adecarboxylata*: *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* y *bla<sub>IMP</sub>*, debido a la resistencia a carbapenemicos presente en el 100% de las cepas (28/28). Se obtuvo un amplificado del gen *bla<sub>NDM</sub>* en el 75% de las cepas (21/28), mientras que para los genes *bla<sub>VIM</sub>* y *bla<sub>IMP</sub>* no se tuvo ningún amplificado,

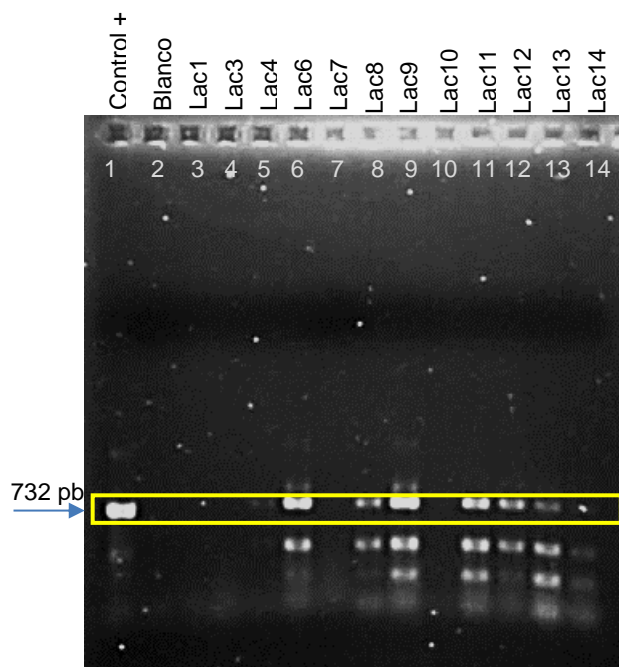
En las Figuras 17-A,17-B, 17-C, 18, 19, 20 y 21, se muestran las imágenes de los corrimientos electroforéticos en geles de agarosa de las muestras que fueron sometidas a la amplificación de genes BLEE; mientras que en la Figura 22 está representado el porcentaje de cepas en el que se amplificó el gen de resistencia a carbapenemasas *bla<sub>NDM</sub>*.



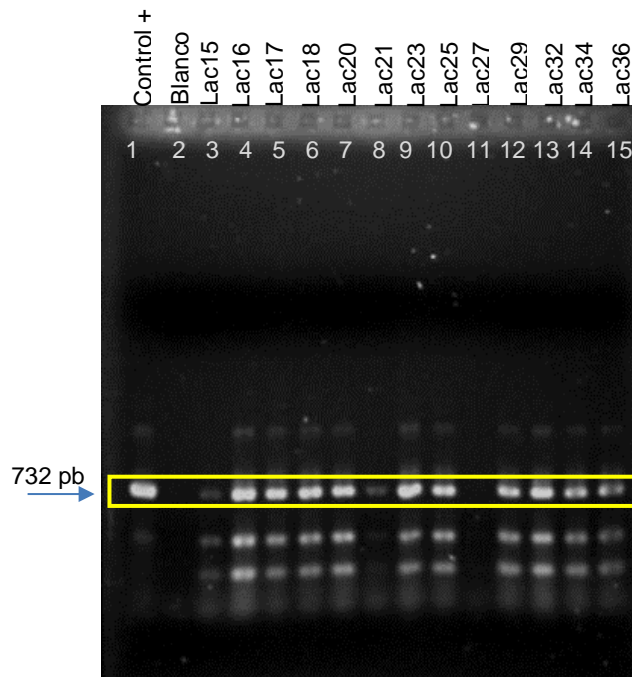
**Figura 17. Detección del gen  $bla_{VIM1-2}$  de resistencia en cepas de *L. adedecarboxylata*.** **A)** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. **Carril 1:** Control positivo PE21 (*P. aeruginosa*) **2:** Blanco **3:** Lac-1, **4:** Lac-2, **5:** Lac-3, **6:** Lac-4, **7:** Lac-5, **8:** Lac-6. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. **Carril 1:** Control positivo PE21 (*P. aeruginosa*) **2:** Blanco, **3:** Lac-7, **4:** Lac-8, **5:** Lac-9, **6:** Lac-10, **7:** Lac-11, **8:** Lac-12, **9:** Lac-13, **10:** Lac-14, **11:** Lac-15, **12:** Lac-16, **13:** Lac-17, **14:** Lac-18. **C)** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. **Carril 1:** Control positivo PE21 (*P. aeruginosa*) **2:** Blanco, **3:** Lac-20, **4:** Lac-21, **5:** Lac-23, **6:** Lac-25, **7:** Lac-27, **8:** Lac-29, **9:** Lac-32, **10:** Lac-34, **11:** Lac-36, **12:** Lac-40. No se tuvo algún producto en la amplificación del gen  $bla_{VIM1-2}$  en ninguna de las cepas de *L. adedecarboxylata*.



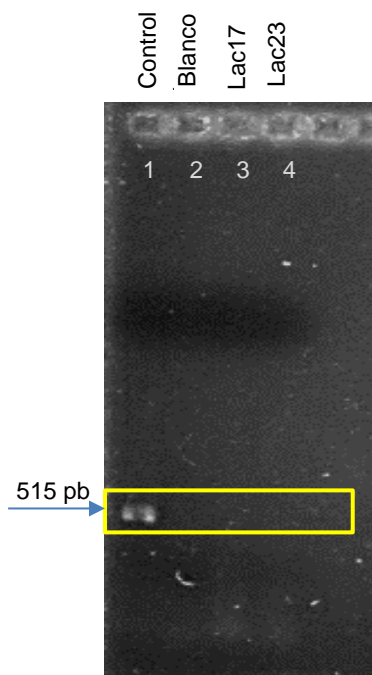
**Figura 18. Detección del gen *bla*<sub>NDM</sub> de resistencia en cepas de *L. adedecarboxylata*.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. **Carril 1:** Control positivo AN54 (*A. baumannii*) **2:** Blanco **3:** Lac-1, **4:** Lac-2, **5:** Lac-3 **6:** Lac-4, **7:** Lac-5, **8:** Lac-6. Las cepas Lac-1, Lac-3, Lac-4 y Lac-6 se volvieron a correr en otro gel de acrilamida para corroborar la presencia del gen *bla*<sub>NDM</sub>.



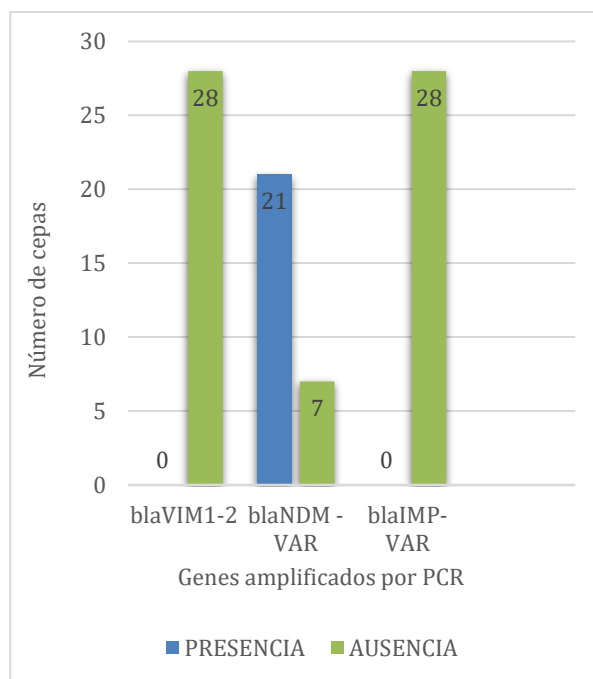
**Figura 19. Detección del gen *bla*<sub>NDM</sub> de resistencia en cepas de *L. adedecarboxylata*.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. **Carril 1:** Control positivo AN54 (*A. baumannii*) **2:** Blanco **3:** Lac-1, **4:** Lac-3, **5:** Lac-4 **6:** Lac-6, **7:** Lac-7, **8:** Lac-8, **9:** Lac-9, **10:** Lac-10, **11:** Lac-11, **12:** Lac-12, **13:** Lac-13, **14:** Lac-14.



**Figura 20.** Detección del gen *bla<sub>NDM</sub>* de resistencia en cepas de *L. adecarboxylata*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. **Carril 1:** Control positivo AN54 (*A. baumannii*) **2:** Blanco **3:** Lac-15, **4:** Lac-16, **5:** Lac-17 **6:** Lac-18, **7:** Lac-20, **8:** Lac-21, **9:** Lac-23, **10:** Lac-25, **11:** Lac-27, **12:** Lac-29, **13:** Lac-32, **14:** Lac-34, **15:** Lac-36.



**Figura 21.** Imagen representativa de la amplificación del gen *bla<sub>IMP</sub>* en cepas de *L. adecarboxylata*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. **Carril 1:** Control positivo PE21 (*P. aeruginosa*) **2:** Blanco **3:** Lac-17, **4:** Lac-23.



**Figura 22.** Resultados de amplificación mediante PCR de los genes codificantes a carbapenemasas

### 8.3.2. Detección bioinformática de genes de resistencia de tipo serin- $\beta$ -lactamasas y carbapenemasas

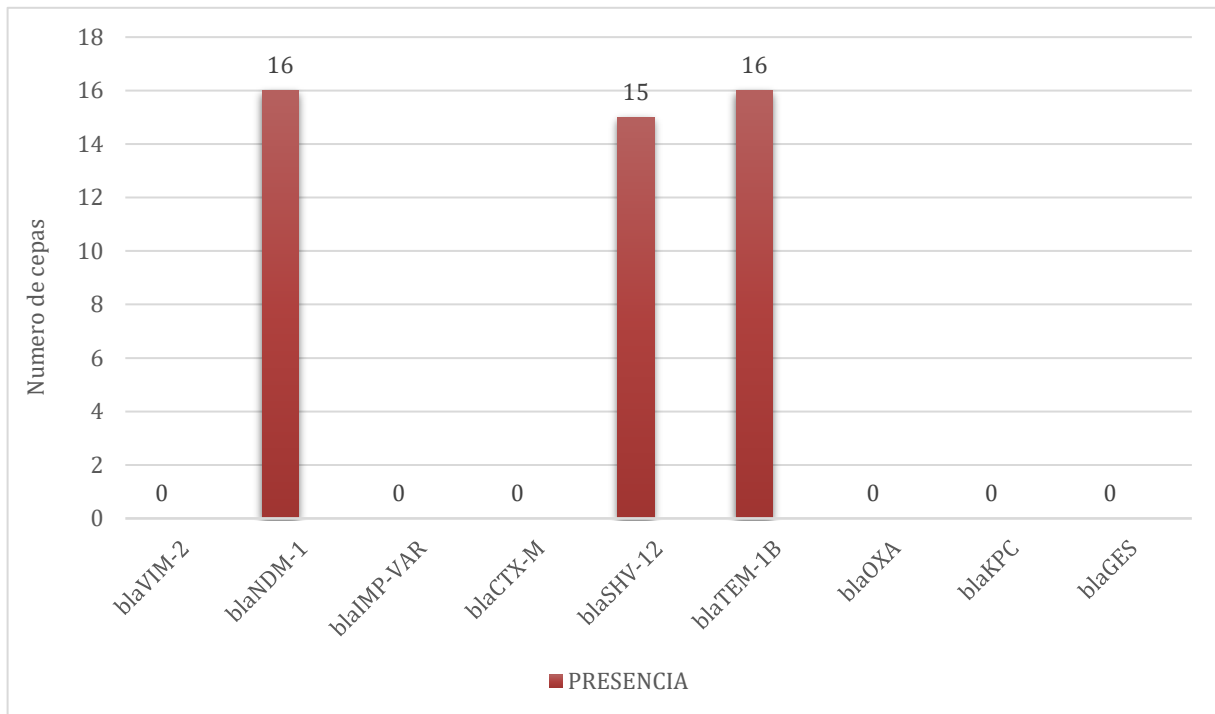
A partir de los ensamblados de 16 cepas proporcionados para continuar con el análisis de la búsqueda de genes de resistencia, se utilizó la plataforma bioinformática de libre acceso ResFinder para determinar la presencia o ausencia de los genes *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> y *bla*<sub>IMP</sub>, resultados presentados en la Tabla 12 y la Figura 23.

**Tabla 12.** Resultados del análisis bioinformático para el genotipo de resistencia en 16 cepas de *L. adecarboxylata*

Nombre de cepa	Genotipo de resistencia genética								
	betalactámicos								
	NDM-1	SHV-12	TEM-1B	OXA	KPC	GES	CTX-M	VIM	IMP
Lac-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-

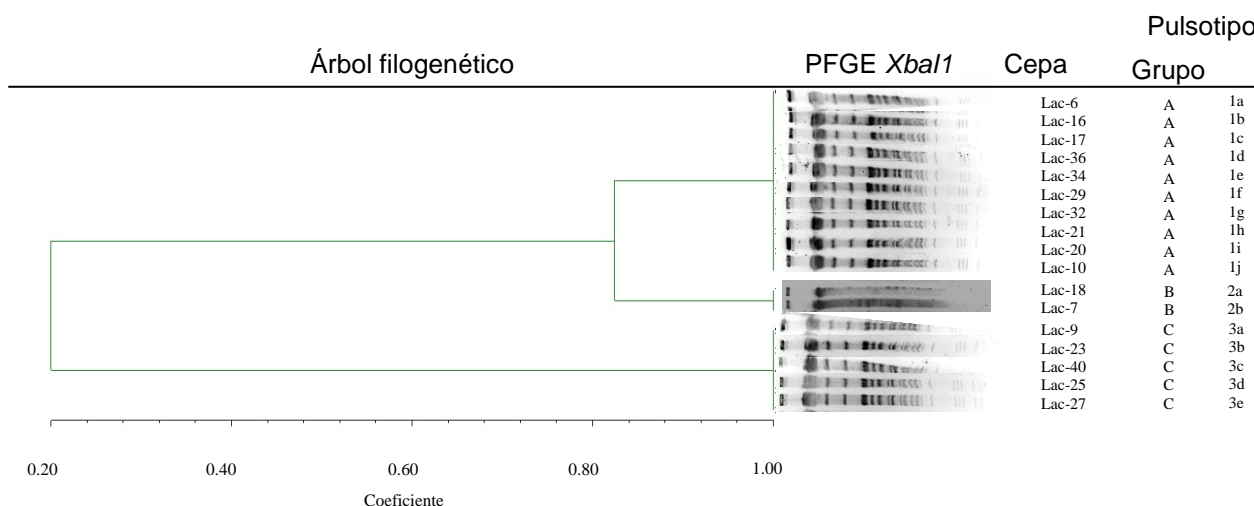
Lac-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lac-5	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lac-6	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lac-9	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lac-10	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lac-13	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lac-14	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lac-17	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lac-20	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lac-23	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lac-25	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lac-27	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lac-34	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Lac-36	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lac-40	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+ : Presencia del gen    - : Ausencia del gen



**Figura 23. Presencia de los genes encontrados por bioinformática**

## 8.4. Relación clonal



**Figura 24.** Dendrograma UPGMA y PFGE de los patrones de restricción obtenidos de la digestión enzimática con la enzima *XbaI1*, 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

Se realizó un análisis de las 28 cepas de *L. adedecarboxylata* por PFGE-*XbaI1* (Anexo 6) para determinar la relación clonal entre las cepas y se decidió realizar el análisis únicamente a 17 cepas (11 que coinciden con los genomas analizados y 6 por aleatorización). El árbol filogenético, resultado del análisis del programa NTSYS de los patrones de restricción generados y analizados por el coeficiente de Dice se muestra en la Figura 24. Se encontraron 3 grupos (A, B y C) estrechamente relacionados, por arriba de 0.8 (coeficiente de Dice), por lo que se puede decir que las cepas son similares o están estrechamente relacionadas.

## 9. DISCUSIÓN

La resistencia a antibióticos es un fenómeno que va en aumento a nivel mundial y pone en riesgo la salud humana, si bien, la resistencia bacteriana se presenta de forma natural por las condiciones de su entorno, la principal causa de la aparición de las



bacterias resistentes es reportada por el uso indiscriminado de los fármacos, debido a que ejerce una selección de cepas bacterianas farmacorresistentes, aumentando los índices de mortalidad por infecciones bacterianas (OMS, 2020).

Un gran problema son las bacterias resistentes a antibióticos carbapenémicos que representan una categoría de prioridad crítica para la OMS (Anexo 7), en la que comúnmente se encuentra a: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacterias como, *Klebsiella*, *E. coli* y *Proteus*. Estas son bacterias que llegan a provocar infecciones de graves a letales por su resistencia a múltiples antibióticos, principalmente a cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos, antibióticos usados para tratar bacterias MDR (OMS, 2017).

En el presente estudio se incluyeron un total de 28 cepas de *L. adecarboxylata* provenientes de 5 hospitales de Guadalajara, Jalisco, en su mayoría de pacientes pediátricos diagnosticados con ITS asociado a una NPT, similar y complementario a lo reportado en el primer estudio de aislados de cepas de *L. adecarboxylata* en México (Garza-González *et al.*, 2021).

Este estudio para caracterizar las cepas y analizar aspectos fenotípicos, moleculares y bioinformáticos, comenzó en agosto del 2019. Se inició con la identificación para corroborar el género y la especie bacteriana ya que, *L. adecarboxylata* es un patógeno oportunista humano cuya importancia clínica se encuentra documentada a partir de 1997, cuando se comenzaron a describir casos clínicos de infecciones (Tamura *et al.*, 1986; Temesgen *et al.*, 1997). Probablemente no se hayan notificado casos varias décadas atrás debido a la identificación errónea, ya que al describirla fenotípicamente se parece o se llega a confundir con *E. coli* o *Pantoea agglomerans* (Campos *et al.*, 2000; Stock *et al.*, 2004; Adapa *et al.*, 2019; Courtois *et al.*, 2020). En el presente informe se identificaron mediante pruebas de metabolismo bacteriano el 100% (28/28) de las cepas como *L. adecarboxylata*. Además, se corroboró molecularmente que las cepas de *Leclercia* en estudio no amplificaran los genes *uidA* y *ybbW*, específicos para identificar *E. coli*, debido a que en el LMHyC no contamos con cepas controles de *Leclercia*.

Al genoma de las cepas de *Leclercia adecarboxylata* se les identificó bioinformáticamente la presencia del gen *fosA*, debido a su resistencia natural a fosfomicina (Stock *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2017; Poirel *et al.*, 2019). Además, en 2019 Poirel y col., reportan una nueva variante del gen *fosA*, denominada *fosA8* encontrada en un plásmido de la cepa de *E. coli* 376, cuyo origen se remonta a el cromosoma de la enterobacteria *L. adecarboxylata* cepa USDA-ARS-USMARC-60222 compartiendo un 98% de identidad, con una diferencia de 3 aminoácidos (Poirel *et al.*, 2019). En el presente estudio se identificaron y compararon 16 genes *fosA* con el gen *fosA8* de la cepa USDA-ARS-USMARC -60222 (número de registro de GenBank CP013990.1) encontrando una similitud del 93.90% en el análisis de nucleótidos, y una identidad en el alineamiento de aminoácidos del 96.5%, con una diferencia únicamente de 5 a.a., lo que indica que el 100% (16/16) de las cepas poseen el gen *fosA*, sumado a las pruebas moleculares para descartar cepas de *E. coli* y a las pruebas bioquímicas, podemos decir que las cepas estudiadas pertenecen al género *Leclercia*.

Por otra parte, los 28 aislamientos fueron MDR, ya que presentaron resistencia a al menos un agente antimicrobiano de tres o más categorías/ familias de antibióticos pertenecientes a  $\beta$ -lactámicos (carbapenémicos), quinolonas, fosfonatos y anfenicoles. Antibióticos que se utilizan como parte del esquema básico para el tratamiento de esta bacteria en hospitales mexicanos (exceptuando los carbapenémicos).

Al igual que lo reportado por Garza-Gonzales y col. en 2021, en donde 31 cepas eran susceptibles a gentamicina, tetraciclina y colistina, en este estudio se reportó que las 28 cepas fueron sensibles a colistina, 24 a tetraciclina y 21 a gentamicina; además se probó ácido nalidíxico y amikacina, de los cuales 24 y 26 cepas fueron susceptibles a estos antibióticos respectivamente. Estos resultados indican que las polimixinas (colistina), las tetraciclinas y gentamicina, se deben usar para tratar las infecciones por *L. adecarboxylata*, con la posibilidad de probar un tratamiento con ácido nalidixico y amikacina.

Aunado a esto, se reportó que 25 de las 28 cepas (89.3%) son fenotipo BLEE positivo, lo cual no se había reportado en otros estudios. Este el primer trabajo en el que se describe el fenotipo BLEE en cepas de *L. adecarboxylata*.

Para confirmar los resultados obtenidos del perfil de resistencia enfocado en los carbapenémicos, se hizo la detección genotípica de metalo- $\beta$ -lactamasas. Se encontró un 75% (n=21 cepas) del gen *bla*<sub>NDM-1</sub>, mientras que los genes *bla*<sub>VIM</sub> y *bla*<sub>IMP</sub> no amplificaron en ninguna cepa. Adicionalmente, mediante bioinformática se identificó la presencia de los genes *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub> y *bla*<sub>SHV-12</sub> en el 100% de las cepas analizadas (16/16), a excepción de la cepa Lac-34, la cual no presentó el gen *bla*<sub>SHV-12</sub>. Si lo comparamos con los datos del único artículo publicado en México, es evidente que las cepas de este estudio comparten la presencia de los genes *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> reportados en 31 cepas analizadas por Garza-Gonzales y col. No obstante, en otros estudios internacionales, ya se había reportado cepas de *L. adecarboxylata* productoras de NDM. La primera cepa fue descrita en 2015 en China y el segundo caso fue publicado en España, 2017 (Sun *et al.*, 2015; Riazzi *et al.*, 2017), se ha descrito además la presencia de genes *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>SHV</sub>, en Italia, Uruguay, Israel, España y Corea, lo cual demuestra su diseminación probablemente mediante transferencia genética horizontal entre bacterias de la misma especie y de diferentes géneros como el *Klebsiella spp.*, *Escherichia spp.* y *Kluyvera spp.* (Mazzariol *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2012; Geffen *et al.*, 2013).

Por último, en nuestro estudio se encontraron 3 grupos estrechamente relacionados (A, B y C), resultado que concuerda con el estudio de Garza-Gonzales y col. quienes identifican 3 patrones de restricción, detectados como A, A1 y A2, con similitud de entre el 90 y el 100% utilizando la técnica de PFGE, con *SpeI*. En nuestro estudio la determinación de la relación clonal fue usando la misma metodología, pero con *XbaI*, y con análisis de los patrones de restricción por el coeficiente de relación de Dice, obteniendo valores por arriba de 0.8, por lo que se puede sugerir que las cepas son similares o están estrechamente relacionadas. De esta manera, las cepas de *L. adecarboxylata* analizadas en este estudio, pertenecen al primer brote en México provocado por este “patógeno emergente” (Grantham *et al.*, 2015; Spiegelhauer *et al.*, 2018; Adapa *et al.*, 2019; Keyes *et al.*, 2020). Esta denominación se debe a la gran

importancia clínica que han tomado el género *Leclercia* en las últimas décadas, debido a las nuevas infecciones reportadas, a su morbi-mortalidad en pacientes inmunocompetentes, a la aparición de esta bacteria a nivel mundial y a la resistencia bacteriana significativa, ya que hace apenas dos décadas se empezó a reportar como un microorganismo patógeno (Jiménez-Jiménez *et al.*, 2018).

## 10. CONCLUSIONES

- 1) Se identificaron y caracterizaron 28 cepas de *L. adecarboxylata* MDR causantes de infección de torrente sanguíneo en una población principalmente pediátrica, en Guadalajara, Jalisco. México
- 2) El fenotipo de susceptibilidad fue similar en todas las cepas, las cuales fueron sensibles a quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas y polimixinas.
- 3) La mayoría de las cepas son portadoras de los genes de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> y *bla*<sub>TEM-1B</sub>; el 100% de los genomas secuenciados (16/16) presentaron los genes *bla*<sub>NDM-1</sub> y *bla*<sub>TEM-1B</sub>, el 93,75% (15/16) el gen *bla*<sub>SHV-12</sub>, mientras que por PCR se encontró la presencia del gen *bla*<sub>NDM</sub> en el 75% (21/28) de los aislados. Estas cepas requieren de vigilancia epidemiológica al poseer carbapenemasas y por lo tanto ser resistentes a estos antibióticos empleados como último recurso en la terapéutica contra enterobacterias. Existe una alta probabilidad de la presencia de algún elemento genético móvil (plásmido, integrón) responsable de la MDR.
- 4) Se encontraron dos grupos clonales estrechamente relacionados, por lo que las cepas de *L. adecarboxylata* analizadas son responsables del primer brote reportado en México.

## 11. PERSPECTIVAS

- ❖ Estandarizar un protocolo molecular de identificación para el género *Leclercia*.
- ❖ Analizar todos los genes de resistencia a antibióticos obtenidos por plataformas bioinformáticas.
- ❖ Investigar si la presencia de los genes *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> y *bla*<sub>TEM-1B</sub> esta mediada por plásmidos.
- ❖ Identificar molecularmente en las cepas faltantes genes de resistencia a otras familias de antimicrobianos.
- ❖ Identificar la presencia de otros mecanismos de resistencia antimicrobiana como la presencia de bombas de eflujo; así como plásmidos, integrones e islas genómicas.
- ❖ Determinar el entorno genético de los genes *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> y *bla*<sub>TEM-1B</sub> para identificar si son genes encontrados en integrones y plásmidos, que podría estar facilitando su diseminación.
- ❖ Identificar las proteínas hipotéticas encontradas en el entorno genético del gen *fosA*.
- ❖ Identificar genes implicados en patogenicidad y virulencia.
- ❖ Continuar y enfocar estudios futuros en estas cepas multidrogoresistentes de *L. adcarboxylata* por su facilidad de provocar brotes en personas con algún tipo de inmunodepresión.

## 12. BIBLIOGRAFIA

- Adapa, S., Konala, V. M., Nawaz, F., Javed, T., Dhingra, H., Gutierrez, I. A., & Ramirez, M. L. (2019). Peritonitis from *Leclercia adecarboxylata*: An emerging pathogen. *Clinical case reports*, 7(4), 829–831. <https://doi.org/10.1002/ccr3.2094>
- 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.
- Akinbami, O. R., Olofinsae, S., & Ayeni, F. A. (2018). Prevalence of extended spectrum beta lactamase 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. *PeerJ*, 6, e5053. doi:10.7717/peerj.5053.
- Arco, C. (2014). Antibióticos: situación actual. *Farmacia Profesional*. 28(5):29-33.
- Bortolaia V, Kaas RF, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, Philippon A, Allesoe RL, Rebelo AR, Florensa AR, Fagelhauer L, Chakraborty T, Neumann B, Werner G, Bender JK, Stingl K, Nguyen M, Coppens J, Xavier BB, Malhotra-Kumar S, Westh H, Pinholt M, Anjum MF, Duggett NA, Kempf I, Nykäsenoja S, Olkkola S, Wiczorek K, Amaro A, Clemente L, Mossong J, Losch S, Ragimbeau C, Lund O, Aarestrup FM. (2020). ResFinder 4.0 para predicciones de fenotipos a partir de genotipos. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75 (12), 3491-3500
- Campos, Marlen, Amuy, Ernesto, Vargas, Alvaro y Herrera, Marco L. (2000). *Leclercia adecarboxylata*: primer aislamiento reportado en Costa Rica. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 35 (1-2), 41-43. Obtenido el 8 de octubre de 2021 de [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1017-85462000000100005&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462000000100005&lng=en&tlng=es).
- 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.
- Carreón, L.E., (2019). Tesis de Maestría. Estudio molecular de la resistencia y virulencia de Cepas de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido aisladas de vegetales crudos. Posgrado en Microbiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- 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. *Quimioter*. 28(1):8-11.
- CLSI. (2019). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. (29th ed.): Clinical and Laboratory Standards Institute.

- 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.
- Choudhary, M., Choudhary, B. K., Bhojar, S., Kale, S. B., Chaudhari, S. P., Bera, B. C., Jain, A., & Barbuddhe, S. B. (2018). Isolation and characterization of multidrug-resistant *Leclercia* species from animal clinical case. *Letters in applied microbiology*, 66(1), 44–48. <https://doi.org/10.1111/lam.12811>
- 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, C.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.
- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). (2019). Aviso Preventivo por brote de IAAS relacionado a *Leclercia adecarboxylata*, posiblemente asociado a contaminación de nutrición parenteral. Sitio web: <https://www.gob.mx/cofepris/articulos/aviso-preventivo-por-brote-de-iaas-relacionado-a-leclercia-adecarboxylata-posiblemente-asociado-a-contaminacion-de-nutricion-parenteral>.
- 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>
- Forrester, J. D., Adams, J., & Sawyer, R. G. (2012). *Leclercia adecarboxylata* bacteremia in a trauma patient: case report and review of the literature. *Surgical infections*, 13(1), 63–66. <https://doi.org/10.1089/sur.2010.093>
- 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>.
- Geffen, Y., Adler, A., Paikin, S., Khabra, E., Gorenshtein, S., Aronov, R., & Carmeli, Y. (2012). *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.
- 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>


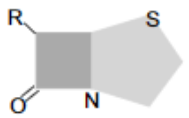
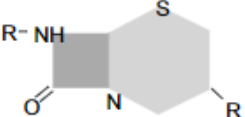
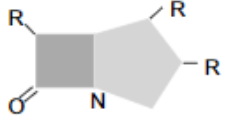
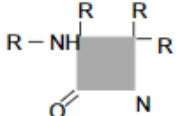
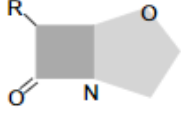
- Huang, T.-W., Wang, J.-T., Lauderdale, T.-L., Liao, T.-L., Lai, J.-F., Tan, M.-C., ... Chang, S.-C. (2013). Complete Sequences of Two Plasmids in *bla*NDM-1-Positive *Klebsiella oxytoca* Isolate from Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), 4072–4076. doi:10.1128/aac.02266-12.
- Hutchings, M., Truman, A. y Wilkinson, B. (2019). Antibióticos: pasado, presente y futuro. *Opinión actual en microbiología*, 51, 72–80. doi: 10.1016 / j.mib.2019.10.008.
- Ito R., Mustapha M., Tomich A., Callaghan J., McElheny C., Mettus R., Shanks R., Sluis-Cremer N. & Doi Y. (2017). Widespread Fosfomycin Resistance in Gram-Negative Bacteria Attributable to the Chromosomal *fosA* Gene. 8(4). doi: 10.1128 / mBio.00749-17.
- Jiménez Jiménez, Geiner. (2018). *Helicobacter pylori* como patógeno emergente en el ser humano. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 27(1), 65-78. Retrieved November 20, 2021, from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-14292018000100065&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292018000100065&lng=en&tlng=es).
- Keren, Y., Keshet, D., Eidelman M., Geffen Y., Raz-Pasteur A & Hussein K. (2014). *Leclercia adecarboxylata* a New and Unfamiliar Marine Pathogen?. *Journal of Clinical Microbiology*. 52(5):1775-1776.
- Keyes, 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>
- Kibbee R, Linklater N, Ormeci B. Eliminating false positives in a qPCR assay for the detection of the *uidA* gene in *Escherichia coli*. *J Water Health*. 2013 Sep;11(3):382-6. doi: 10.2166/wh.2013.201. PMID: 23981867.
- López-Velandia D., Torres-Caycedo I. & Prada-Quiroga C. (2015). Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Universidad y salud*. 18(1):190-202.
- López-Bello E., (2015). Tesis de Maestría. Estudio molecular de la resistencia a los antibióticos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infecciones nosocomiales. Posgrado en Microbiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Madeira F, Park YM, Lee J, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in (2019). *Nucleic Acids Research*; 47(W1):W636-W641. DOI: 10.1093/nar/gkz268. PMID: 30976793; PMCID: PMC6602479.
- 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.

- 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>.
- Morejon M. (2012) Carbapenemasas, una amenaza actual. *Rev Cub Med Int Emerg*. 11(4):2613-2618.
- 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.
- Papousek I, Papagiannitsis CC, Medvecký M, Hrabak J, Dolejska M. Complete Nucleotide Sequences of Two VIM-1-Encoding Plasmids from *Klebsiella pneumoniae* and *Leclercia adecarboxylata* Isolates of Czech Origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Apr 24;61(5):e02648-16. doi: 10.1128/AAC.02648-16. PMID: 28264839; PMCID: PMC5404563.
- Poirel L., Vuillemin X., Kieffer N., Mueller L., Descombes M., & Nordmann P. (2019). Identification of FosA8, a Plasmid-Encoded Fosfomycin 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-Ruiz, 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.
- Rohlf. (1998). NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0 User Guide. Applied Biostatistics Inc.
- Seija V & Vignoli R. (2006). Principales grupos de antibióticos. *Temas de bacteriología y virología médica*. 631-647.
- 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.
- Spiegelhauer, M. R., Andersen, P. F., Frandsen, T. H., Nordestgaard, R. L. M., & Andersen, L. P. (2018). *Leclercia adecarboxylata: a case report and literature review of 74 cases demonstrating its pathogenicity in immunocompromised patients. Infectious Diseases*, 1–10. doi:10.1080/23744235.2018.153683
- Stock, I., Burak, S., & Wiedemann, B. (2004). Natural antimicrobial susceptibility patterns and biochemical profiles of *Leclercia adecarboxylata* strains. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10(8), 724–733. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00892.x>
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). *Antibióticos betalactámicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. doi:10.1016/j.eimc.2008.12.001
- 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.

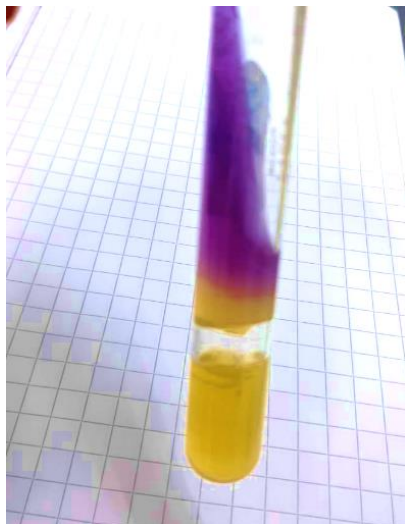
- Sun, F., Zhou, D., Sun, Q., Luo, W., Tong, Y., Zhang, D., ... Xia, P. (2016). *Genetic characterization of two fully sequenced multi-drug resistant plasmids pP10164-2 and pP10164-3 from Leclercia adecarboxylata*. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep33982.
- Sun, Q., Wang, H., Shu, L., Dong, 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>.
- Temesgen, Z., Toal, D. R., & Cockerill, F. R., 3rd (1997). *Leclercia adecarboxylata* infections: case report and review. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 25(1), 79–81. <https://doi.org/10.1086/514514>
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*, 33(9), 2233–2239. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995>
- Vieira, C. & Gales, A. (2016). *Manual de mecanismos de resistencia a antibióticos*. Curso online “Interpretación del Antibiograma en la práctica clínica diaria”. Recuperado de: <https://redemc.net/campus/wp-content/uploads/2016/08/M2-ampicilina-ES.pdf?x18977>
- Virginia G-F., Seija V., Aguerrebere P., Cordeiro N. & Vignoli R. (2014). First report of a clinical isolate of *Leclercia adecarboxylata* harbouring multiple resistance genes in Uruguay and review of the literatura. *Elsevier*. 2(2):77-81.
- Walker, D. I., McQuillan, J., Taiwo, M., Parks, R., Stenton, C. A., Morgan, H., Mowlem, M. C., & Lees, D. N. (2017). A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. *Water research*, 126, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.032>
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2020). Resistencia a los antimicrobianos. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Yin, Z., Hu, L., Cheng, Q., Jiang, X., Xu, Y., Yang, W., ... Zhou, D. (2019). *First Report of Coexistence of Three Different MDR Plasmids, and That of Occurrence of IMP-Encoding Plasmid in Leclercia adecarboxylata*. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.02468

## 13. ANEXOS

### Anexo 1. Estructuras de antibióticos $\beta$ -lactámicos.

	Anillo betalactámico + Anillo secundario = Núcleo del betalactámico → GRUPO ANTIBIÓTICO		
	Anillo tiazolidínico	Ácido 6-aminopenicilánico	PENICILINAS
	Anillo dihidrotiacínico	Ácido 7 $\alpha$ -cefalosporínico	CEFALOSPORINAS
	Anillo pirrolínico	Carbapenemo	CARBAPENEMAS
	Ninguno	Monobactamo	MONOBACTÁMICOS
	Anillo oxazolidínico	Clavamo/oxapenamo	ÁCIDO CLAVULÁNICO <sup>a</sup>

Estructura química de betalactámicos (Tomada de Suárez & Gudiol, 2009)

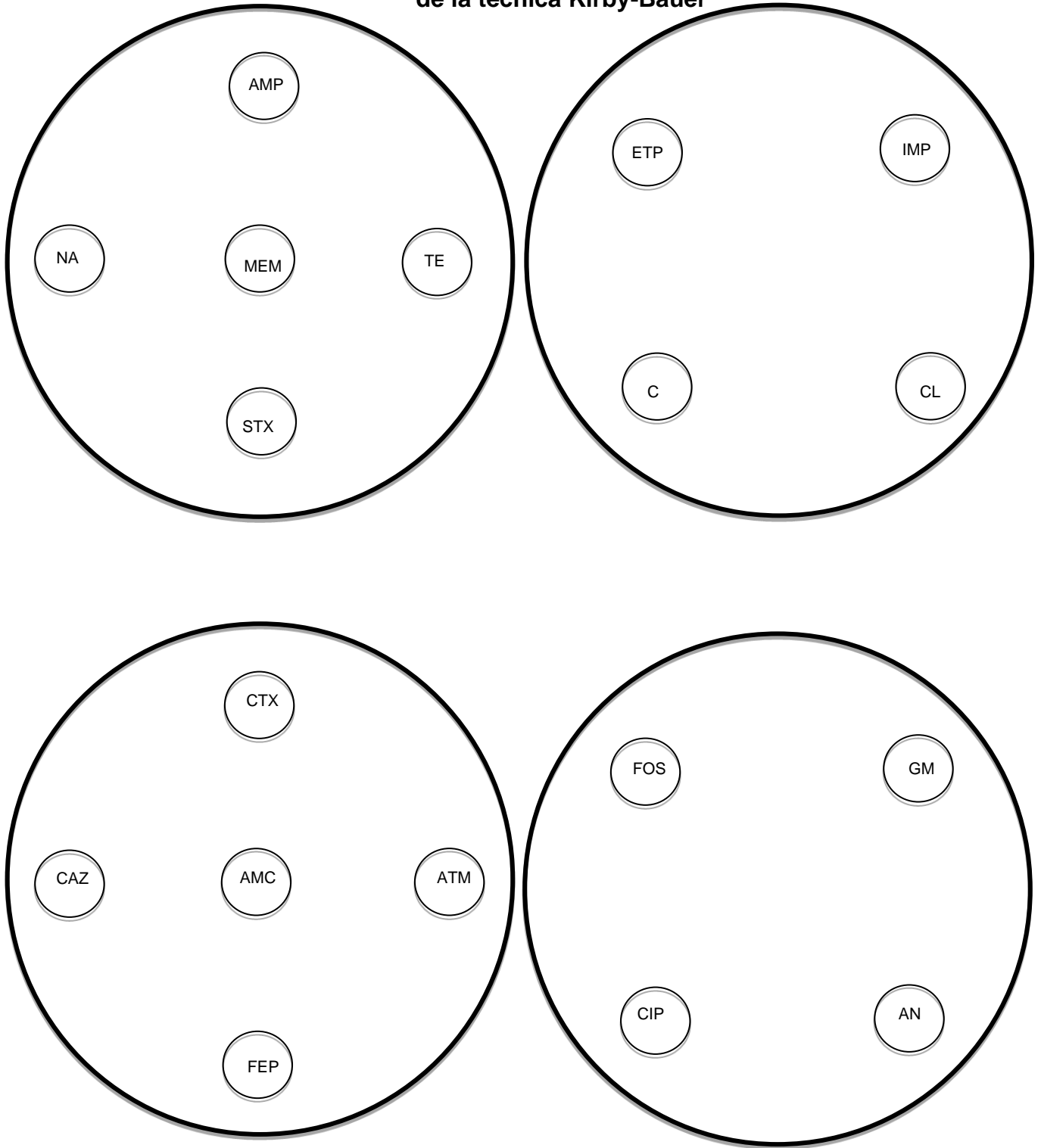


### Anexo 2. Imagen de la prueba bioquímica LIA en cepas de *L. adedecarboxylata*

En *E. coli* la prueba es positiva a la descarboxilación de la lisina si el pico de flauta es púrpura y el extremo inferior también es púrpura (K/K) con H<sub>2</sub>S o sin él; el resultado es negativo cuando se produce un color amarillo (K/A) es decir, solo hubo un cambio del medio por la fermentación de glucosa y no por la presencia de la enzima descarboxilasa o desaminasa.

Si se presenta ruptura del medio es por producción de gas.

**Anexo 3. Distribución de los sensidiscos de antibióticos en placa  
de la técnica Kirby-Baüer**



**Anexo 4. Matriz de datos empleada para realiza árbol filogenético de *L. adecfarboxylata* con base a F. J. Rohlf 1998, en NTSYSpc 2.21s**

1	52	17	0														
	6	7	9	10	16	17	18	20	21	23	25	27	29	32	34	36	40
0.19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
0.21	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
0.22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.28	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
0.29	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.37	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
0.38	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.39	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.41	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
0.42	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
0.43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.44	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
0.45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.46	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
0.47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.48	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
0.49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0.51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.52	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
0.53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.54	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
0.55	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
0.56	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
0.57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.58	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
0.59	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.61	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
0.62	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1

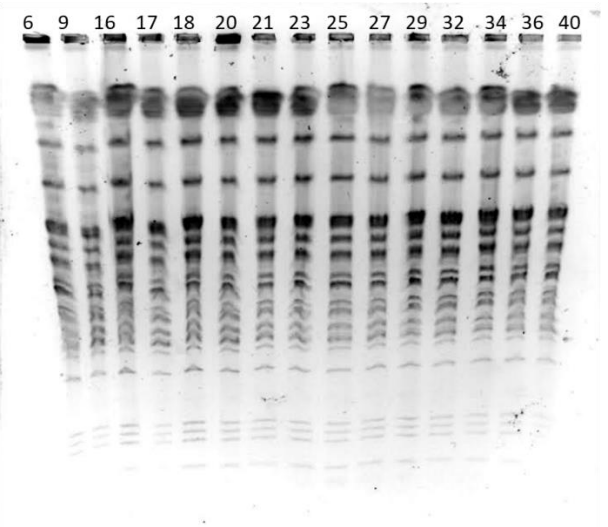
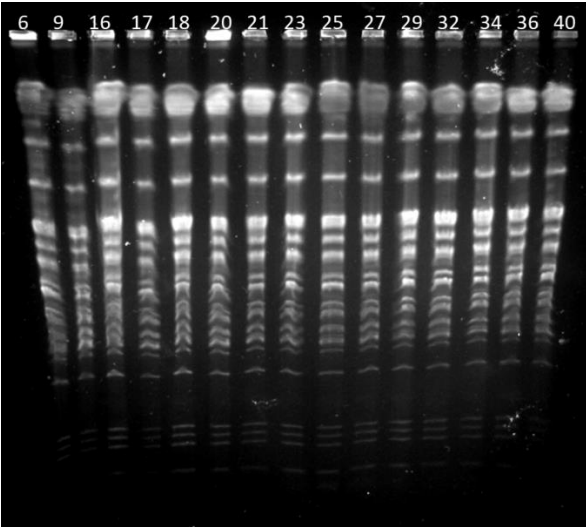
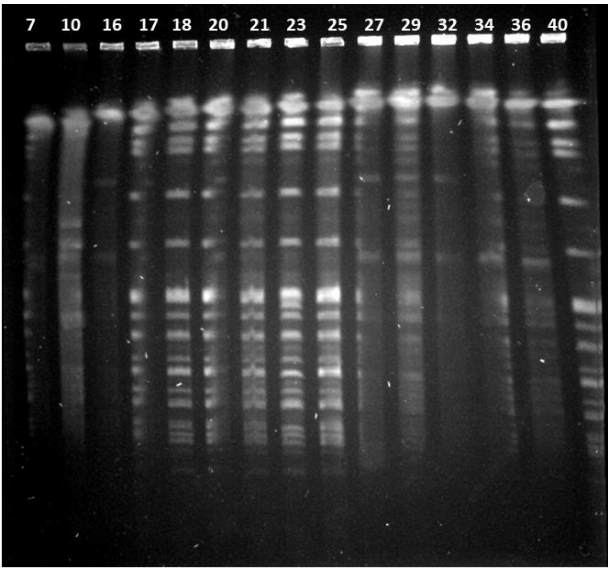
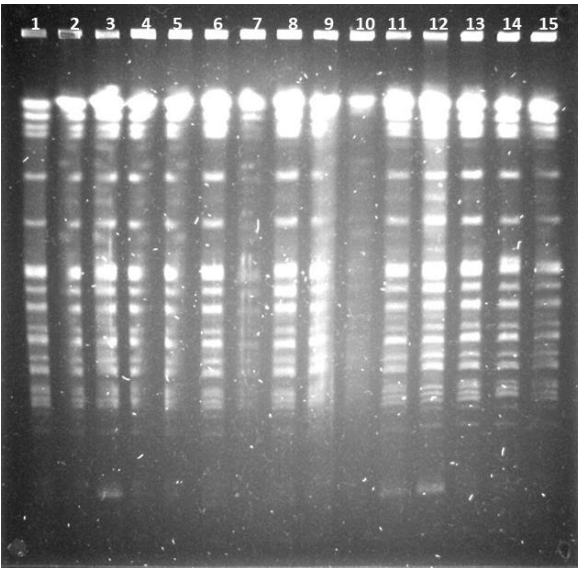
0.63	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
0.64	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
0.65	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
0.66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.68	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
0.69	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
0.78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0.81	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
0.82	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
0.83	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
0.84	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
0.88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.89	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**Anexo 5: Perfil de resultados para pruebas bioquímicas convencionales utilizadas para la identificación de *E. coli* y *L. adecarboxylata*.**

ENTEROBACTERIA	I	RM	VP	CIT	TSI	UR	FA	LIA	OR	MOV	LAC
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	v	+	+
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	+	+	-	-	-	v	-	-	-	+	+

+: Positivo, -: Negativo, V: Variable. I: indol, RM: rojo de metilo, VP: Voges Proskauer, CIT: citrato, TSI: Triple Sugar Iron, UR: urea, FA: fenilalanina, LIA: lisina hierro agar, OR: ornitina, MOV: movilidad, LAC: lactosa.

Anexo 6. Geles de PFGE para relacionar las clonas de *L. adecarboxylata*





**Anexo 7. Lista publicada por la OMS, 2017 de patógenos prioritarios para la creación de nuevos antibióticos.**

**Prioridad 1: CRÍTICA**

- *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos
- *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos
- Enterobacteriaceae, resistentes a los carbapenémicos, productoras de ESBL

**Prioridad 2: ELEVADA**

- *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina
- *Staphylococcus aureus*, resistente a la Meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
- *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina
- *Campylobacter* spp., resistente a las fluoroquinolonas
- *Salmonellae*, resistentes a las fluoroquinolonas
- *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas

**Prioridad 3: MEDIA**

- *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina
- *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina
- *Shigella* spp., resistente a las fluoroquinolonas