

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE  
LA SALUD  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU  
AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL  
POR ACTIVIDADES RELACIONADAS CON LA PROFESIÓN  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA

**“Tipificación de cepas *Escherichia coli* asociadas a  
meningitis (NMEC) de niños en el Hospital Infantil de  
México Federico Gómez.”**

ESTE PROYECTO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE  
INVESTIGACIÓN EN BACTERIOLOGÍA INTESTINAL EN EL  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.

PRESENTA EL ALUMNO

**Carmen Jitzury Yoselin Santiago  
Quijano Matrícula: 2173062856**

**ASESORES**

Asesor externo

**Director: Dr. Juan Xicohtencatl Cortes**

**Cedula Profesional 5626819**

Vo. Bo.



**Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez**

**No. Económico 8758**

Vo. Bo.



# Índice

|  |    |
|--|----|
| 1.-Marco Institucional.....  | 5  |
| 2.-Introducción.....   | 5  |
| 3.-Ubicación geográfica.....   | 8  |
| 4.-Objetivo general del proyecto.....  | 8  |
| 5.-Especificacion y fundamento de las actividades.....                                 | 8  |
| 5.1 Antecedentes.....  | 8  |
| 5.1.2 Generalidades.....   | 8  |
| 5.1.3 Filogenia de la especie NMEC .....   | 9  |
| 5.1.4 Importancia de la susceptibilidad antibiótica.....                               | 10 |
| 6.-Materiales y métodos.....   | 14 |
| 6.1 Cepas <i>E. coli</i> neonatal meningitis (NMEC) propagación y conservación.....    | 14 |
| 6.2 Susceptibilidad antibiótica por método Difusión de discos en cepas NMEC.....       | 14 |
| 6.3 Determinación fenotípicas de cepas NMEC productoras de BLEE .....                  | 15 |
| 6.4 Extracción de DNA.....   | 16 |
| 6.5Amplificación por PCR múltiple.....   | 19 |
| 7.- Resultados.....  | 21 |
| 7.1 Cepas bacterianas.....   | 21 |
| 7.2 Susceptibilidad antibiótica .....  | 23 |
| 7.3 Identificación fenotípica de cepas productoras de betalactamasas.....              | 28 |
| 7.4 Cuantificación de DNA genómico .....   | 33 |
| 8.-Discusion.....  | 43 |
| 9.- Conclusiones.....  | 46 |
| 10.-Impacto de las Actividades del Servicio Social.....                                | 46 |
| 11.-Aprendizaje y habilidades obtenidas durante el desarrollo del servicio social..... | 46 |
| 12.-Fundamento de las actividades.....   | 47 |
| 13.-Referencias.....   | 49 |
| 14.-Anexos.....  | 52 |

## Índice figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Mecanismos de patogenicidad de NMEC.....  | 7  |
| Figura 2. Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos .....  | 12 |
| Figura 3. Esquema utilizado para la extracción de DNA .....   | 17 |
| Figura 4. Gráfico de resultados totales de las cepas clínicas de NMEC en R, I y S.....  | 24 |
| Figura 5. Cepa clínica de NMEC con antibióticos F/M, SXT, LVX, NOR y OFX .....  | 27 |
| Figura 6. Cepa clínica de NMEC con antibióticos ATM, Te, GM, IPM y MEM .....  | 27 |
| Figura 7. Cepa control E. coli ATCC 25922 con antibióticos ATM, Te, GM, IPM y MEM.....  | 27 |
| Figura 8. Cepas clínicas de NMEC que se utilizaron para realizar el ensayo de sinergismo de doble disco.....                  | 29 |
| Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para extracción de DNA .....   | 37 |
| Figura 10. Gel de agarosa al 1.8% con muestras amplificadas en las regiones <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y <i>TspE4.C2</i> ..... | 41 |
| Figura 11. Gel de agarosa al 1.8% con muestras amplificadas en las regiones <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y <i>TspE4.C2</i> ..... | 41 |
| Figura 12. Gel de agarosa al 1.8% con muestras amplificadas en las regiones <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y <i>TspE4.C2</i> ..... | 42 |
| Figura 13. Gel de agarosa al 1.8% con muestras amplificadas en las regiones <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y <i>TspE4.C2</i> ..... | 42 |

## Índice tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Criterios para determinar la pureza del DNA .....                                      | 18 |
| Tabla 2. Cebadores y condiciones de PCR múltiple en la identificación genotípica de genes ..... | 20 |
| Tabla 3. Condiciones de reacción para la PCR múltiple de grupos filogenéticos .....             | 21 |
| Tabla 4. Lista de cepas .....   | 22 |
| Tabla 5. Porcentaje de resultados para la prueba de susceptibilidad antibiótica .....           | 52 |
| Tabla 6. Porcentaje de estatus de resistencia .....   | 25 |
| Tabla 7. Resultados de la producción fenotípica de BLEE .....                                   | 29 |
| Tabla 8. Concentración, Integridad y porcentaje de Pureza de DNA .....                          | 33 |
| Tabla 9. Determinación y porcentaje de Grupo filogenético .....                                 | 38 |

## 1. Marco institucional.

El Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), nace como Institución Pública, en el campo de la medicina pediátrica, el 30 de abril de 1943. Fue creado mediante Ley expedida por el Congreso de la Unión el 23 de junio del mismo año. Desde su comienzo, el objetivo del HIMFG fue mantener a la Institución como un centro de conocimientos mediante la investigación biomédica para impulsar el avance de la pediatría, así como la formación de recursos humanos de alta calidad capaces de desarrollar investigaciones. Además, de proporcionar atención médica de alta especialidad en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades de la población infantil sin seguridad social y, por lo tanto, con los más bajos recursos socioeconómicos. El HIMFG tiene la misión de proporcionar atención médica de alta especialidad con seguridad y calidad a los niños, formar recursos humanos y llevar a cabo investigación científica de excelencia. Y la visión de ser, a mediano plazo, un referente internacional en la asistencia, enseñanza e investigación pediátrica (HIMFG, 2018).

El Dr. Federico Gómez Santos, en su discurso inaugural afirmó que el Hospital Infantil de México desempeñaría” funciones de enseñanza e investigación encaminadas a preparar pediatras que conozcan a fondo los problemas patológicos que afectan a la niñez mexicana” a través de las 28 Unidades y Laboratorios de Investigación, los cuales han contribuido al cumplimiento de este visionario compromiso en los campos de la investigación biomédica, clínicas socio médicas y epidemiológicas. Es por ello, que surge el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal cuya misión es el estudio de patógenos reconocidos y oportunistas de gran relevancia a nivel hospitalario por su importancia en infecciones nosocomiales severas y complicadas.

## 2. Introducción

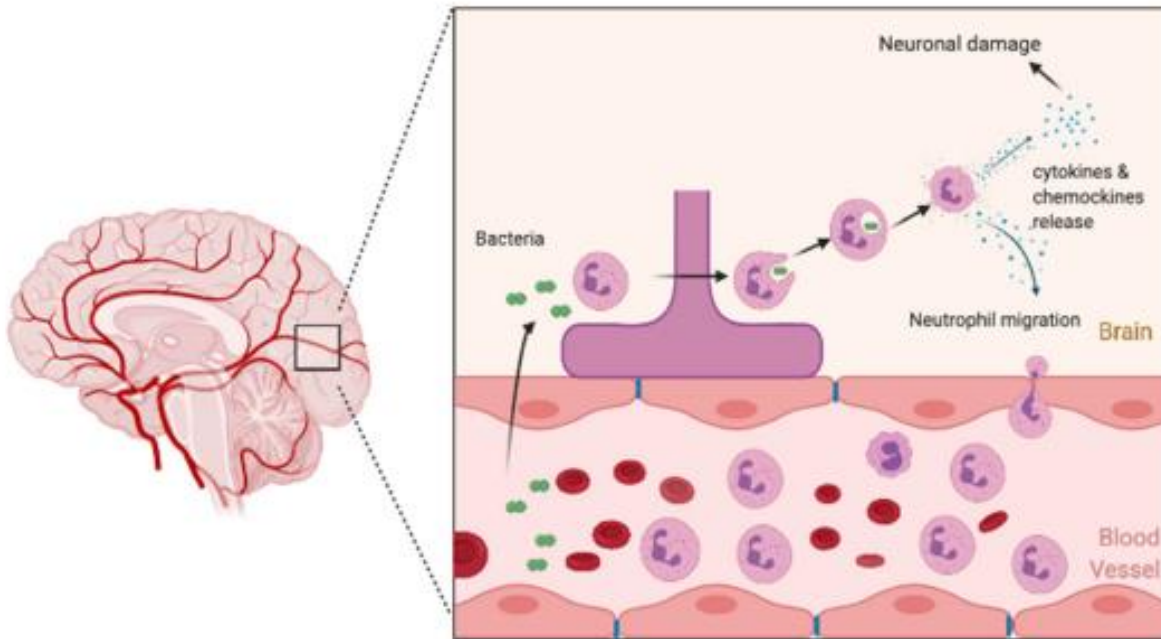
La meningitis bacteriana, es una manifestación postnatal de un proceso patológico, iniciado antes del parto. La meningitis neonatal ocurre en un 0.3 por 1.000 nacidos vivos y está estrechamente asociada a sepsis que es una complicación que tiene lugar cuando el organismo produce una respuesta inmunitaria desbalanceada anómala, frente a una infección (OMS, 2020) y se considera hasta cinco veces más frecuente (Cercenado & Cantón, 2010). Los principales patógenos asociados con meningitis bacteriana en niños entre los 3 meses y los 5 años de edad son el *Streptococo pneumoniae* (neumococo) y *Neisseria meningitidis* (meningococo) (Gustin, 2005).

*Escherichia coli* es una especie bacteriana versátil que existe como un comensal en el tracto gastrointestinal inferior de los humanos y animales, así como un patógeno que causa una variedad de enfermedades. *E. coli* patógena de humanos se ha dividido en 2 grupos, considerando sus factores de virulencia y sitio de colonización. Los patotipos diarrogénicos de *E. coli* que incluyen: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) *E. coli* productora de adherencia difusa (DAEC) y los patotipos de *E. coli* extraintestinales (ExPEC).

*Escherichia coli* causante de meningitis neonatal (NMEC) es el patógeno bacteriano Gram-negativo principalmente, asociado con la meningitis en los recién nacidos. Las cepas de NMEC presentan altos niveles de heterogeneidad y diversidad genética, relacionadas con sus características de virulencia que dificultan definir el patotipo de NMEC con exactitud (Wijetungen et al. 2015).

Las tasas de mortalidad asociadas con infecciones por NMEC pueden acercarse al 40%, y los supervivientes suelen sufrir secuelas neurológicas graves. La meningitis bacteriana representa entre el 10 y 15% de las enfermedades en la población infantil, especialmente en el periodo neonatal. La *E. coli* patógena extraintestinal sigue siendo uno de los patógenos bacterianos más comunes que causan infecciones extraintestinales, incluidas la meningitis neonatal (NM), la septicemia y las infecciones del tracto urinario. La meningitis de inicio temprano (EOM) se define como el desarrollo de meningitis bacteriana dentro de los 3 días posteriores al nacimiento, mientras que la meningitis de inicio tardío (LOM) se define como el desarrollo de meningitis bacteriana más de 3 días después del nacimiento. La EOM generalmente se adquiere a través de la transmisión vertical, mientras que la LOM generalmente se contrae como una infección nosocomial o comunitaria. En comparación con LOM, los bebés con ruptura prolongada de membranas (PROM) son más propensos a desarrollar EOM con peores resultados debido a la corioamnionitis y la contaminación del líquido amniótico. *E. coli* es el segundo patógeno más común y representa el 30% de todos los casos de EOM en los países en desarrollo (Liu et al. 2021). Las complicaciones más habituales causadas por NMEC son Cardiovasculares: sepsis, shock séptico, coagulación intravascular diseminada; Neurológicas: convulsiones o parálisis de pares craneales y fiebre persistente o recurrente, la fiebre suele persistir durante 4-5 días (Sánchez et al. 2021).

La patogenia de NMEC es compleja, ya que las bacterias deben ingresar al torrente sanguíneo a través del intestino y finalmente cruzar la barrera hematoencefálica hacia el sistema nervioso central, que conduce a la inflamación meníngea y pleocitosis del líquido cefalorraquídeo (LCR) (Bonacorsi & Bingen, 2005). La colonización inicial, después de que las bacterias hayan sido adquiridas perinatalmente de la madre, es seguida por la transcitosis a través de los enterocitos hacia el torrente sanguíneo (Wijetungen et al. 2015; Corex and Brett, 2010).



**Figura 1.** Mecanismo de patogenicidad de NMEC.

La presencia de bacterias en el espacio subaracnoideo conduce a la activación de la respuesta inmune, lo que resulta en la lisis bacteriana. La presencia de partículas bacterianas desencadena una respuesta inflamatoria adicional con la migración en curso de neutrófilos a través de la barrera hematoencefálica y continua de citoquinas y quimiocinas en liberación (incluyendo IL-1B o CXCL1,2,5). Tomado de Sánchez et al. 2021.

No se han identificado rasgos distintos de virulencia para definir el patotipo NMEC. Varios estudios han intentado caracterizar las cepas de NMEC utilizando métodos fenotípicos y de genotipificación, como serotipificación, tipificación de secuencias multilocus (MLST), grupos filogenéticos, electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), perfil de genes de resistencia a antibióticos y genotipificación de virulencia (Corex and Brett, 2010).

La confirmación de un caso de meningitis bacteriana neonatal se realiza mediante la demostración de la presencia del microorganismo en el LCR, y suele realizarse mediante cultivo o detección del DNA bacteriano. El cultivo del LCR es el método óptimo de confirmación y hoy en día continúa siendo el método de referencia (Zhu et al. 2015). El aislamiento de la bacteria, además del diagnóstico

etiológico, permite la realización de pruebas complementarias, como pruebas de sensibilidad. La detección de DNA mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real ha supuesto el mayor avance diagnóstico durante los últimos años. Las técnicas genómicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real no pueden sustituir de momento, al cultivo tradicional como método diagnóstico de referencia de las infecciones bacterianas (Cercenado & Cantón, 2010).

### 3. Ubicación geográfica

El Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), lugar donde se realizó el Servicio Social, se localiza en la calle Dr. Márquez No. 162, Colonia Doctores, Alcaldía Cuauhtémoc, C.P 06720, Ciudad de México, México.

### 4. Objetivo general del proyecto o programa

Identificar el grupo filogenético y determinar la resistencia antibiótica de cepas de *Escherichia coli* asociadas a meningitis (NMEC) de niños en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) para conocer el grado de virulencia.

## 5. ESPECIFICACIÓN Y FUNDAMENTO DE LAS ACTIVIDADES DESARROLLADAS

### 5.1.1 ANTECEDENTES

#### 5.1.2 Generalidades

*E. coli* es una de las principales causas de mortalidad neonatal (40 %), lo que representa alrededor del 1% de todas las causas de mortalidad neonatal (Stoll, 1997) *E. coli* alberga varios genes de virulencia que proporcionan la base para su categorización en diferentes patovares, cada uno de los cuales tiene la capacidad de establecer diferentes infecciones. Un patovar se define como un grupo intraespecífico de cepas similares dentro de una misma especie que son clasificadas dependiendo de la especificidad en el tejido que ataca (Ortiz, 2021). Estos rasgos de virulencia incluyen adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, toxinas y componentes de la pared celular resistentes al suero que están codificados por el cromosoma bacteriano y los plásmidos. La patogenicidad de las cepas NMEC es probablemente el resultado de diferentes combinaciones de diferentes determinantes genéticos, de los cuales varios aún se desconocen. De hecho, se ha encontrado que casi la mitad de las cepas carecen de adhesinas específicas (como SfaS) e invasinas (como IbeA) (Bonacorsi & Bingen, 2005); NMEC alberga genes que codifican sistemas de adquisición de hierro (iuta, iuC, y sentarse A) y hemolisinas



(hlyAyhlyD), además de proporcionar una fuente de hierro para el crecimiento bacteriano a través de la lisis celular, se sabe que las hemolisinas bacterianas también desempeñan otras funciones mecánicas. Por ejemplo, se ha demostrado que la hemolisina aumenta la permeabilidad de las monocapas de células endoteliales de forma dependiente del tiempo y de la dosis en células endoteliales de arteria pulmonar cultivadas de *E. coli*. En el mismo estudio, se encontró que una dosis baja de hemolisina inducía una pérdida de la función de barrera endotelial mediada por toxinas. Sin embargo, no hay evidencia científica que respalde la participación de las hemolisinas de NMEC en el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, lo que ayuda a la patogénesis de la enfermedad. Wijetungen et al. 2015, demostraron que NMEC era capaz de sobrevivir en el suero humano, lo que apoya la especulación de que los comensales de *E. coli* en el intestino de la madre podría ser una fuente de NMEC en el bebé. (Wijetungen et al. 2015).

El patotipo de *E. coli* causante de meningitis neonatal (NMEC), pertenece a los patógenos extraintestinales *E. coli* (ExPEC) (Bonacorsi & Bingen, 2005). A pesar de que se han logrado muchos avances en el diagnóstico, la terapia y la atención de apoyo de las infecciones de NMEC tiene todavía una alta tasa de morbilidad y mortalidad. Aunque se han identificado varios factores bacterianos específicos, la capacidad de *E. coli* para colonizar, diseminar e invadir el espacio subaracnoideo no se entiende aun completamente (Wijetungen et al. 2015).

### 5.1.3 Filogenia de la especie NMEC

*E. coli* tiene una extensa subestructura filogenética que comprende ocho filogrupos (A, B1, B2, C, D, E, F y G) que están vinculados al estilo de vida de las diferentes estirpes que se define como el conjunto de organismo completamente emparentados (Selander et al. 1987; Negre et al. 2004; Clermont et al. 2019). Se reconocen ocho grupos de *E. coli* de sentido estricto, mientras que el octavo es perteneciente al clado I. NMEC está organizada en cuatro grupos filogenéticos principales designados A, B1, B2 y D; y estudios previos identificaron al grupo B2 como el filogrupo más común de ExPEC, lo que sugiere que el filoagrupamiento puede usarse como un método de tipificación rápido para identificar posibles ExPEC, las cepas responsables de la infección extraintestinal tenían muchas más probabilidades de ser miembros de los filogrupos B2 o D que A o B1 (Picardy otros., 1999; Johnson y Stell, 2000). Y un estudio realizado por Ochman & Selander, 1984 sugieren que el filogrupo B2 esta sobrerrepresentado por NMEC con un 68 %. Los estudios epidemiológicos moleculares, incluida la caracterización de los genotipos de virulencia y el análisis filogenético, son importantes para obtener una imagen completa de los orígenes y la propagación de los factores de

virulencia dentro de la población de cepas NMEC. Un análisis sugiere que el grupo B2 fue el primer grupo filogenético en emerger, seguido por el grupo D y, finalmente, por los dos grupos hermanos A y B1 (Lecointre et al. 1998). La importancia clínica de estas observaciones sugirió que sería valioso un método simple de asignación de aislamientos a un filogrupo. Esto condujo al desarrollo y validación de un ensayo de PCR para detectar los genes *ChuA* y *yjaA* y un fragmento de ADN *TspE4.C2* (Gordony otros., 2008). Basado en la presencia/ausencia de estos tres fragmentos, NMEC podría asignarse a uno de los principales filogrupos, A, B1, B2 o D (Clermonty otros., 2000).

#### 5.1.4 Importancia de la susceptibilidad antibiótica

El aumento de la resistencia bacteriana es un hecho evidente, a la vez un problema antiguo, aun con la generación de nuevos antibióticos, que favorecen la presencia de microorganismos multirresistentes. La resistencia a antibióticos en *E. coli* se relaciona con el uso indiscriminado de antibióticos, presión selectiva y favorecer la creación de nuevos antibióticos, la adaptación y diseminación de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (Sánchez et al. 2006).

La resistencia bacteriana continúa en aumento y representa serios desafíos para el tratamiento de infecciones tanto adquiridas en la comunidad como en los hospitales. Se calcula que entre el 50% y el 60% de más de dos millones de infecciones hospitalarias en los Estados Unidos son causadas por bacterias resistentes, y que son responsables de cerca de 77.000 muertes por año (Tafur et al. 2008).

Teniendo en cuenta que las bacterias Gram negativas tienen un arsenal de mecanismos de resistencia a su disposición y que la selección de estos mecanismos puede llevar a una falla terapéutica, es importante conocer los mecanismos de resistencia más prevalentes en las bacterias Gram negativas (Tafur et al. 2008). Estos mecanismos de resistencia podrían resumirse en ocho categorías Figura 2.

1.-Pérdida de porinas: Las porinas son proteínas localizadas en la membrana de la bacteria encargadas de transportar sustancias al interior de la célula. Una forma de resistencia a los carbapenems, un tipo de antibiótico de amplio espectro, consiste en la pérdida por parte de la célula de la porina que permitía su entrada (Tafur et al. 2008).

2.-Beta-lactamasas: Las beta-lactamasas son proteínas con actividad enzimáticas capaces de romper enlaces químicos de compuestos beta-lactámicos, entre los que se incluyen antibióticos similares a la penicilina o las ampicilinas. Las bacterias que poseen estas enzimas son resistentes a este tipo de antibióticos de uso corriente en farmacia (Tafur et al. 2008).

3.- Bombas de extrusión de antibióticos: Algunas bacterias obtienen la resistencia a antibióticos tales como las quinolonas o el cloranfenicol produciendo elevados niveles de bombas de extrusión, que son proteínas transmembranosas que permiten la exportación del antibiótico fuera de la célula con gasto energético (Tafur et al. 2008).

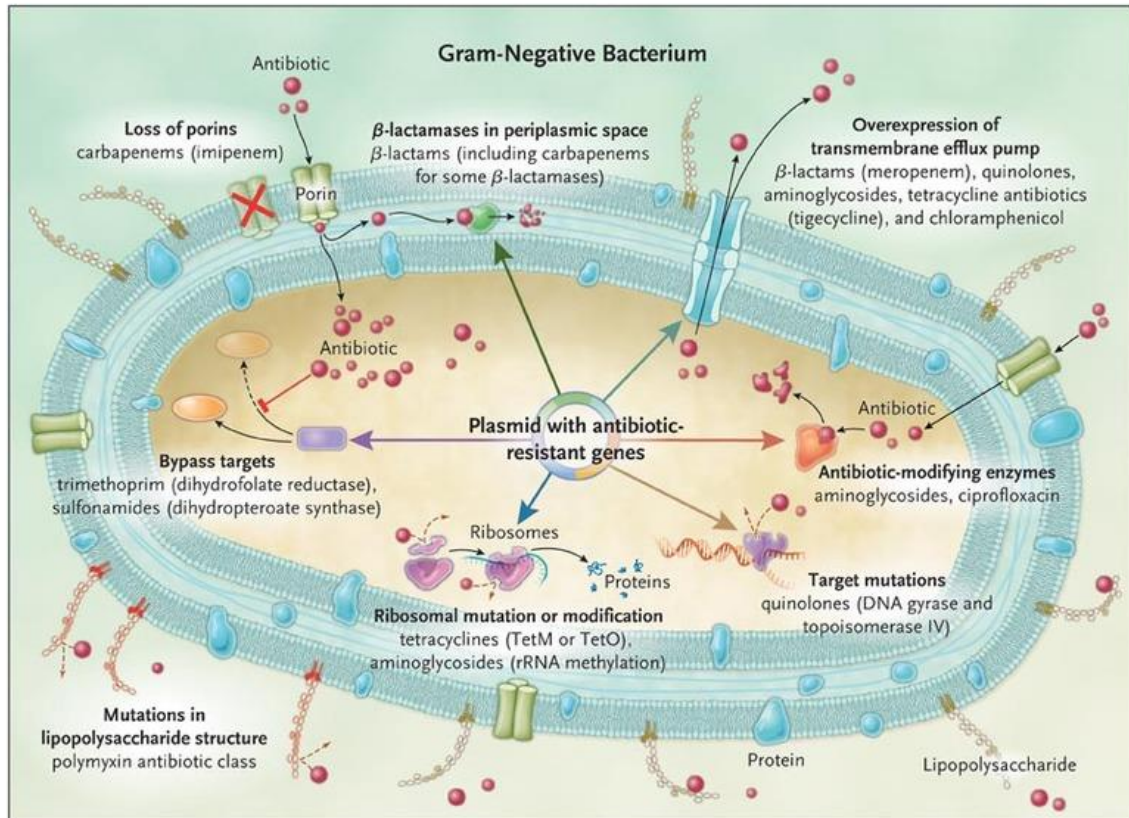
4.- Enzimas que modifican químicamente al enzima y lo inactivan: Algunos antibióticos consiguen entrar en la célula, sin embargo, algunas cepas son capaces de producir determinados enzimas que los modifican químicamente evitando que éstos reconozcan su diana. Ese el caso del ciprofloxacino, un antibiótico muy empleado en las infecciones de las vías urinarias (Tafur et al. 2008).

5.- Mutaciones en la diana específica del antibiótico: Los antibióticos son moléculas capaces de interaccionar con su diana molecular de forma análoga a como lo hace una llave en una cerradura. Mutaciones en la diana (cambios en la cerradura) hacen que el antibiótico (en este caso la llave) ya no sea capaz de reconocerla. Muchas de estas mutaciones implican la inactivación de la diana lo que hace que la célula no sea viable, sin embargo, otras sí que permiten que la diana del antibiótico funcione y no sea reconocida por el antibiótico. Por ejemplo, la diana de las quinolonas son las enzimas encargadas de mantener el correcto plegamiento del ADN; la girasa y la topoisomerasa. Mutaciones en esos enzimas convierte a algunas bacterias en resistentes a las quinolonas (Tafur et al. 2008).

6.-Mutaciones en los ribosomas: Los ribosomas son la maquinaria de síntesis de proteínas. Son estructuras complejas formadas por ARN y proteínas, y son dianas de algunos antibióticos como por ejemplo la tetraciclina que inhiben su correcto funcionamiento, y por tanto perturban o paralizan la síntesis proteica necesaria para la vida de la bacteria. Algunas cepas han desarrollado mutaciones en las regiones de interacción del antibiótico con el ribosoma, lo que los hace invisibles a estos compuestos (Tafur et al. 2008).

7.-Mutaciones en la estructura del liposacárido (LPS): Los lipopolisacáridos son un conjunto de polímeros complejos que forma parte de la membrana externa de las bacterias. Algunos antibióticos, como la polimixina, son capaces de interaccionar con el LPS desestabilizarlo e impedir su correcta síntesis. Mutaciones en la estructura del LPS impide la unión de la polimixina inhibiendo su acción (Tafur et al. 2008).

8.-Desvíos alternativos: Algunos antibióticos son capaces de inhibir específicamente la actividad de algunos enzimas esenciales para la célula. Por ejemplo, la sulfamida inhibe la dihidropteroato sintetasa, un enzima esencial en la síntesis de ácido fólico que las bacterias necesitan para poderse dividir. Sin embargo, algunas enzimas pueden mutar o bien otras son capaces de ganar la actividad enzimática perdida por la acción del antibiótico promoviendo un desvío de la ruta que permitir sobrevivir la célula (Tafur et al. 2008).



**Figura 2.** Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos.

Se ilustran los diferentes mecanismos que poseen las bacterias Gram negativas para resistir a los antibióticos. En ella se esquematizan los ocho mecanismos conocidos hasta la fecha para resistir los antibióticos. Los sistemas de resistencia se basan en evitar que el antibiótico acceda a su diana y lo dañe, y en la evolución han aparecido diversos mecanismos para que eso ocurra. Tomado de Peleg, 2010.

La magnitud global de la resistencia a los antimicrobianos de uso clínico es alarmante adquiriendo una dimensión destacada en países de desarrollo intermedio quienes suelen ser cuantitativamente los más afectados por la emergencia de mecanismos de resistencia dado el acceso a tratamientos con antibióticos. El intercambio de genes de resistencia entre las bacterias permite equipar a un microorganismo sensible a antibióticos con un verdadero arsenal de mecanismos de resistencia, incluso en un único evento de intercambio. La transferencia horizontal de genes de resistencia entre bacilos gram negativos es debida en gran parte a plásmidos (más o menos promiscuos) y a los elementos transponibles e integrones que pueden formar parte del o de los replicones presentes en estos microorganismos. Los integrones son plataformas genéticas que han despertado gran interés desde el punto de vista clínico ya que algunos de ellos vehiculizan genes de resistencia a los antimicrobianos. Están formados por un fragmento que codifica una integrasa (intI) seguido por una secuencia attI, sistema que permite la captura de los genes en casetes (que codifican para diferentes mecanismos de resistencia) (Di Conza et al. 2013).

El aislamiento de cepas *E. coli* con betalactamasas de espectro extendido (BLEE) tanto en la comunidad como en el hospital se ha convertido en un problema creciente (Trupia et al. 2005). Las BLEE también llamadas betalactamasas de espectro ampliado (BLEA), son enzimas producidas por bacilos Gram negativos principalmente de la Familia *Enterobacteriaceae*, con más frecuencia por *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Las BLEE son capaces de inactivar los antibióticos con el anillo betalactámico como las penicilinas (Ampicilina, Amoxicilina, Bacampicilina, etc) las cefalosporinas de primera generación (Cefalotina, Cefazolina, Cefradina, etc), segunda generación (Cefoxitina, Cefaclor, Cefonicid, etc), cefalosporinas de amplio espectro o de tercera generación (Cefotaxima, Cefixima, Cefoperazona) y al aztreonam (Hernández, 2010). *E. coli* puede producir enzimas betalactamasas cromosómicas o extracromosómicas (mediadas por plásmidos). Las cepas productoras de BLEE confieren resistencia a los betalactámicos excepto a las cefamicinas y a los carbapenémicos. Los plásmidos que codifican a las BLEE pueden portar genes (transposones e integrones con genes de resistencia) a otros antimicrobianos como aminoglucósidos, tetraciclinas y cotrimoxazol. El fenómeno de resistencia cruzada es muy frecuente en bacterias gram negativas, así el tratamiento de las infecciones producidas por *E. coli* productora de BLEE tiene una mayor dificultad de erradicación. Además, las cepas productoras de BLEE son más resistentes a fluorquinolonas que las que no lo son, estos antimicrobianos han sido usados con mucha frecuencia en tratamientos empíricos de infecciones del tracto urinario (Galván et al. 2016; Flannery et al. 2021; Trupia et al. 2005). Seral et al. 2012 refirieron que las fluoroquinolonas podrían ser el tratamiento de elección en infecciones complicadas del tracto urinario, sólo en cepas sensibles.

## 6. Materiales y Métodos

### 6.1 Cepas *E coli* neonatal meningitis (NMEC) propagación y conservación

Se recolectaron un total de 63 cepas de NMEC recuperadas de cultivos de LCR (Líquido Ceforraquídeo) de niños hospitalizados en el área de neurología del HIMFG. Las cepas fueron propagadas inicialmente en medio selectivo/diferencial agar MacConkey mediante la técnica de estría cruzada y se incubó a 37°C/18-24 h, posteriormente se tomaron de 3-4 colonias perfectamente asiladas y se realizó una siembra masiva en un medio nutritivo agar BHI (Brain Heart Infusion), se incubó a 37°C/ 18-24 h; y por último, se tomó toda la biomasa del agar BHI y se colocó en un tubo con 2mL de caldo LB (Luria Bertani) con 20% de Glicerol y 10% de suero fetal bovino y se conservaron en ultracongelación a -70°C hasta su uso.

### 6.2 Susceptibilidad antibiótica por método Difusión de discos en cepas NMEC.

Se inició la caracterización fenotípica de las cepas de NMEC, con el ensayo de susceptibilidad antibiótica, por la técnica de difusión en disco Kirby-Bauer (CLSI, 2021). Primero, las cepas de NMEC y la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 se descongelaron y se sembraron por estría cruzada en medio selectivo/diferencial agar MacConkey y se incubó a 37°C/18-24 h. Posteriormente, se seleccionaron 2-3 colonias del Agar MacConkey y se sembraron nuevamente, en el medio rico agar BHI incubando a 37°C/18-24hrs. Trascurrido el tiempo, se revisaron las placas de cultivo para verificar la presencia de un solo morfotipo colonial y se seleccionaron de 4-5 colonias características de las cepas NMEC y la cepa de referencia de ATCC 25922. Se inoculó un tubo con 4 mL de caldo BHI por cepa y se incubó 37°C/18-24 h. El inóculo se ajustó a la turbiedad equivalente al tubo No 0.5 del nefelómetro de MacFarland (equivalente a  $1.5 \times 10^8$  bacterias/mL). Los tubos ajustados se sembraron en placas agar Mueller Hinton (MH), con ayuda de un hisopo estéril distribuyéndolo uniformemente sobre toda la superficie del agar, en tres direcciones, la finalidad fue obtener un crecimiento en césped de la bacteria. Las placas inoculadas se dejaron absorber por 1-2 min, y se colocaron 5-6 sensi-discos (BD BBL™ Sensi-Disc™ Becton Dickinson, México) de papel filtro impregnados con el antibiótico. Se colocaron un total de 17 antibióticos, procedentes de 10 categorías de antibióticos que incluyeron: Penicilinas (ampicilina AM); Beta-lactámico combinada (amoxicilina ácido clavulánico AmC), (piperacilina-tazobactam TZP); Cefalosporinas (cefoperazona CFP), (cefotaxima CTX), (ceftazidime CAZ); Monobactam (aztreonam ATM); Carbapenems (meropenem MEM), imipenem (IPM); Aminogluco-sidos (gentamicina GM); Tetraciclinas

(tetraciclina Te); Fluoroquinolonas (levofloxacina LVX), (norfloxacino NOR), (ofloxacino OFX); Folatos (trimetoprim-sulfametoxazol STX) y Nitrofuranos (nitrofurantoina F/M). Las placas se incubaron a 35-37°C por 24 h. Los halos de inhibición fueron medidos y se comparó en las tablas según criterios de la CLSI. Las cepas se catalogaron como sensible (S), intermedio (I) y resistente(R). La cepa de referencia ATCC 25922 fue utilizada en la visualización de los resultados (CLSI, 2021).

Se empleó el perfil de sensibilidad a antibióticos para clasificar las bacterias como multidrogorresistente (MDR), extremodrogorresistente (XDR) y pandrogorresistente (PDR). Que se define como la no susceptibilidad a al menos un agente en tres o más categorías de antimicrobianos, XDR se define como la no susceptibilidad a al menos un agente en todas las categorías de antimicrobianos excepto dos o menos (es decir, los aislados bacterianos siguen siendo susceptibles a solo una o dos categorías) o PDR que se define como la no susceptibilidad a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos (es decir, ningún agente probado como susceptible para ese organismo). Además de que los ATCC utilizados como controles y según los criterios de la CLSI se reportan como *E. coli* ATCC 25922 como sensible a todos los antibióticos y *K. pneumoniae* ATCC 700603 como MDR, es decir, que presentó multirresistencia a un antibiótico en al menos seis categorías (CLSI, 2021).

### 6.3 Detención fenotípicas de cepas NMEC productoras de BLEE.

La detección fenotípica de BLEE fue realizada por el método de Jarlier basado en la sinergia con doble disco entre los antibióticos betalactámicos (CAZ y CTX) colocados alrededor de un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (AmC), adicionalmente se ha determinado que el uso de cefalosporinas de tercera y cuarta generación facilita la detección de cepas BLEE con poca eficiencia hidrolítica (Galván et al. 2016). Las cepas de NMEC se prepararon, subcultivaron en caldo, se ajustaron y se sembraron en placas de agar MH, como se indicó previamente. Posteriormente se colocó un disco inhibidor competitivo de BLEE (ácido clavulánico) en combinación con un antibiótico, en el centro de la placa. En este ensayo se utilizó el disco ácido clavulánico en combinación con la aminopenicilina amoxicilina (AmC). En los lados del disco central se colocaron los discos de ceftazidima (CAZ) y cefotaxima (CTX) a una distancia de 25mm aproximadamente. La presencia de BLEE fue confirmada según los criterios de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), el cual indica que las distintas BLEE confieren un grado de resistencia muy variable. La intensidad de hidrólisis de un determinado antibiótico difiere según las cepas consideradas, pudiendo incluso no

tener efecto fenotípicamente detectable, en algunos casos únicamente tiene lugar una reducción de los halos de inhibición o aumento de los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI), pero permanece en el intervalo de sensibilidad (Galván et al. 2016). La cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *E. coli* ATCC 25922 se usaron como controles para dar validez a los ensayos de BLEE.

Los aislados que presentaron un ensanchamiento o alargamiento en la zona de inhibición comprendida entre los discos de CTX o CAZ y AMC se consideraron positivos para la presencia de BLEE; mientras que, los que no presentaron ningún ensanchamiento o alargamiento entre los discos se consideraron negativos para la presencia de BLEE (Truppia et al. 2005).

#### 6.4 Extracción de DNA

La extracción de DNA de las cepas de NMEC, se llevó a cabo con el kit de extracción comercial “Wizard® Genomic DNA Purification Kit Promega (2800 Woods Hollow Road Madison, EUA)”. El kit está diseñado para procesar pequeñas cantidades de muestras y proporcionar el aislamiento de DNA genómico de alta calidad. Primeramente, se descongelaron las cepas y se sembraron en agar MacConkey a 37°C por 18-24 h para verificar su pureza, se seleccionaron 5-6 colonias de la cepa NMEC y se colocaron en tubos Falcón con 25mL de caldo LB (Luria Bertani), incubando a 37°C/24 h en agitación/200 rpm IKA® KS 4000 ic control. Posteriormente se centrifugó a 4°C/10 min/4000 rpm en Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16R Centrifuge para obtener la pastilla de biomasa. La extracción de DNA genómico se realizó como sigue:

**Lisis celular:** En este paso, se adicionó a la pastilla 600 µL de “Nuclei Lysis Solution”, con la finalidad de romper las membranas celulares de la bacteria y exponer el DNA junto con el citoplasma y se incubó durante 80°C/5 min en Thermoblock Boekel Scientific Dry Bath Incubator.

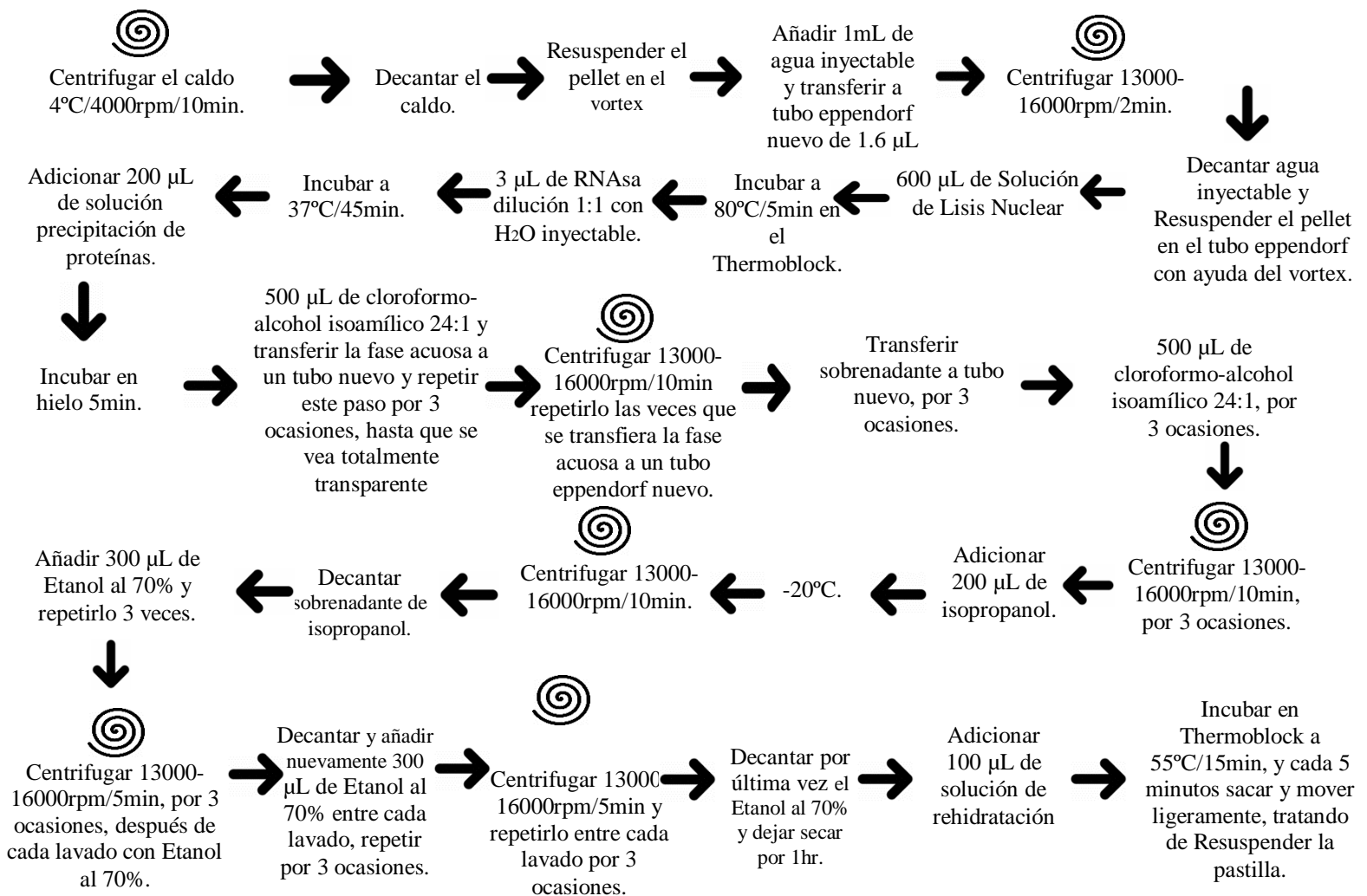
**Eliminación de RNA:** En este paso se rompió el RNA agregando 3µL de una solución RNasa diluida volumen/volumen con agua inyectable estéril, incubándose a 37°C/45 min. Trascurrido el tiempo se añadieron 200 µL de solución de precipitación proteica y se incubó en hielo durante 5 min.

**Purificación de DNA:** La extracción inorgánica implicó una extracción con cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) Esta solución desnatura las proteínas (entre ellas las nucleasas) y mantiene la separación de la fase orgánica y acuosa tras la centrifugación de la muestra. Esto se consiguió cuando se añadió 500 µL de cloroformo y se centrifugó a 13,000-16,000 rpm/10 min en centrifugadora



ependorf Centrifuge 5415 C, posteriormente se tomó la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.6  $\mu$ L y realizando de 3-4 lavados hasta que se vio totalmente transparente.

Precipitación del DNA con isopropanol: El DNA disuelto en la solución acuosa se precipitó añadiendo 200  $\mu$ L de isopropanol y dejándolo a  $-20^{\circ}\text{C}/24$  h, en este paso los ácidos nucleicos son insolubles en soluciones alcohólicas. El botón de DNA obtenido en la precipitación con isopropanol se lavó con etanol al 70% por 3 ocasiones y posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente hasta la evaporación completa del etanol al (70%). En la figura 1. Se muestra un esquema simplificado de los pasos para realizar la extracción de DNA.



**Figura 3.** Esquema utilizado para la extracción de DNA.

La valoración de la pureza del DNA se realizó a partir de una espectrofotometría con NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific®). La mayor absorbancia de una muestra de DNA se realizó a 260nm, mientras, la absorbancia a 280nm fue indicativo de la concentración de proteínas. La concentración de DNA se calculó teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260nm

La relación de las absorbancias 260nm/280nm indicó la contaminación por proteínas. Una muestra de DNA será pura si presenta valores del cociente 260nm/280nm entre 1.6-1.9. Si la relación de absorbancia 260nm/230nm es menor de 1.8, será indicativo de la existencia de contaminación causada probablemente por componentes orgánicos que absorben a 230 nm. En Tabla 1 se indican los criterios para determinar la pureza.

**Tabla 1.** Criterios para determinar la pureza del DNA.

| Técnica de análisis | Análisis      | Parámetros | Criterios de validez   |
|---------------------|---------------|------------|--|
| Espectrofotometría  | A 260nm/280nm | Pureza     | $\geq 1.8$ -2.1 <b>Pureza optima</b>   |
|                     |               |            | $\geq 1.6$ -1.7 <b>Pureza acceptable</b>                                       |
|                     |               |            | $< 1.6$ <b>DNA contaminado</b> con compuestos aromáticos                       |
|                     |               |            | $> 2.1$ <b>DNA contaminado</b> con RNA   |
|                     | A 260nm/230nm | Pureza     | $> 2$ -2.2 <b>Pureza optima*</b>   |
|                     |               |            | $> 1.8$ <b>Pureza acceptable*</b>  |
|                     |               |            | $< 1.8$ <b>DNA contaminado</b> con sales, fenol, hidratos de carbono...        |
|                     |               |            | $< 1.5$ <b>DNA altamente contaminado</b> con sales, fenol, hidratos de carbono |

Tomado de: Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN; (2020).

La determinación de la integridad del DNA, se realizó mediante la visualización de un gel de agarosa al 1%, utilizando buffer TAE al 1x para su corrimiento en una cámara BIORAD Wide Mine-Sub® Cell GT. Se colocaron 5µL de muestra de DNA y 1µL de buffer de carga preparado con azul de

bromofenol (0.25%), Xileno-cianol (0.25%) Sigma Aldrich, Glicerol (30%) Golden Bell y agua destilada al 100% por 90V/500A/30min. Posteriormente, el gel fue visualizado en un fotodocumentador BIOBASE Gel Documentation System.

#### 6.5 Amplificación por PCR múltiple

Las cepas de NMEC se asignaron a cuatro grupos filogenéticos (GF) y sub grupos filogenéticos: (A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub><sub>1</sub>, B<sub>1</sub><sub>2</sub>, B<sub>2</sub><sub>1</sub>, B<sub>2</sub><sub>2</sub>, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>) según el método descrito por Clermont et al. (2000). La clasificación de los GF se basó en la amplificación de dos genes, *chuA*, *yjaA*, y un fragmento anónimo de DNA *TspE4.C2* mediante el uso de un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex. Los cebadores utilizados fueron sugeridos por Clermont et al. 2000 y se enumeran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Cebadores y condiciones de PCR múltiple utilizados en la identificación genotípica de genes

| Gen             | Descripción  | Primers                                    | Cebador<br>(5' – 3')  | Tamaño del<br>fragmento<br>(pb) | Condiciones de PCR   |
|-----------------|--|--|---|---------------------------------|--|
| <i>chuA</i>     | Es un gen que está ubicado en la membrana externa importante en el transporte de hemo de la cepa O157:H7 (Cabrera-Gonzales et al. 2022). | <i>chuA</i> -F<br><i>chuA</i> -R           | GAC GAA CCA ACG<br>GTC AGG AT TGC<br>CGC CAG TAC CAA<br>AGA CA  | 279                             | 1 ciclo a 95 °C/5 min 25<br>ciclos a 95 °C/1 min 55<br>°C/1 min 72 °C/2 min 72<br>°C/5 min 4 °C/∞min |
| <i>yjaA</i>     | Es un gen que codifica una proteína hipotética, en el genoma de <i>E. coli</i> K-12 (Cabrera-Gonzales et al. 2022).                      | <i>yjaA</i> -F<br><i>yjaA</i> -R           | TGA AGT GTC AGG<br>AGA CGC TG ATG<br>GAG AAT GCG TTC<br>CTC AAC | 211                             |  |
| <i>TspE4.C2</i> | Una secuencia de DNA TspE4.C2 ubicada dentro de un gen que codifica lipasa esterasa (Cabrera-Gonzales et al. 2022).                      | <i>TspE4.C2</i> - F<br><i>TspE4.C2</i> - R | GAG TAA TGT CGG<br>GGC ATT CA CGC<br>GCC AAC AAA GTA<br>TTA CG  | 152                             |  |

Abreviaturas:

- F- Forward R- Reverse

Primero se ajustó la concentración de todos los extraídos a 200ng/μL. Se realizó PCR con MasterMix (Promega, Madison, WI, EE. UU.) y 1 μL de DNA's (200 ng/μL) en un volumen final de reacción de 12.5 μL. Las condiciones de reacción de la PCR múltiple se muestran en la Tabla 3. en las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C durante 5 min; 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineación 55 °C por 1 min, y extensión a 72 °C durante 2 min; y extensión final a 72 °C durante 5 min. Los MastersMix para cada uno de los genes se prepararon de acuerdo a la Tabla 3, asimismo se hizo una multiplicación por el número de muestras a realizar en la PCR más una. La PCR se realizó en un termociclador Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific®, USA). Se incluyó un control positivo-CFT y uno negativo por cada reacción. Los productos de la PCR fueron

verificados por electroforesis en geles de agarosa al 1.8% tras tinción con 0,5 mg/mL de bromuro de etidio (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y utilizando un marcado de Peso Molecular (PM) de 100pb, y se visualizó bajo luz ultravioleta usando un ChemiDoc Sistema de imágenes MP (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.).

Una cepa de NMEC fue considerada del filogrupo A<sub>1</sub>, cuando mostro el genotipo: *chuA*<sup>-</sup>, *yjaA*<sup>+</sup>, *TspE4.C2*<sup>-</sup>; para el filogrupo B<sub>1</sub> cuando mostro el genotipo *chuA*<sup>-</sup>, *yjaA*<sup>-</sup>, *TspE4.C2*<sup>+</sup>; mientras que para filogrupo B<sub>2</sub> cuando mostro el genotipo *chuA*<sup>+</sup>, *yjaA*<sup>+</sup>, *TspE4.C2*<sup>+</sup> y para el filogrupo D cuando mostro el genotipo *chuA*<sup>+</sup>, *yjaA*<sup>-</sup>, *TspE4.C2*<sup>-</sup>.

**Tabla 3.** Condiciones de reacción para la PCR múltiple de grupos filogenéticos.

| Mezcla de Reacción | Volumen (µL)           | Stock  |
|--------------------|------------------------|--------|
| MasterMix          | 6.25 µL                | 400 µM |
| <i>chuA</i> -F     | 0.7 µL                 | 1 µM   |
| <i>chuA</i> -R     | 0.7 µL                 | 1 µM   |
| <i>yjuA</i> -F     | 0.7 µL                 | 1 µM   |
| <i>yjuA</i> -R     | 0.7 µL                 | 1 µM   |
| <i>TspE4.C2</i> -F | 0.7 µL                 | 1 µM   |
| <i>TspE4.C2</i> -R | 0.7 µL                 | 1 µM   |
| H2O                | 1.05 µL                | -      |
| Control (+)        | 1µL de DNA UPEC CFT073 | -      |
| Control (-)        | 1µL de H2O             | -      |

Abreviaturas:

- F- Forward R- Reverse

## 7. Resultados

### 7.1 Cepas bacterianas

Se trabajaron 63 cepas de NMEC aisladas de niños hospitalizados en el HIMFG. Las cepas se recuperaron en gelosa MacConkey a 37°C/18-24 h. Las cepas con morfología colonial características se propagaron en agar tripticasa soya para realizar los estudios fenotípicos y genotípicos. En la Tabla 4. se muestra el listado de cepas clínicas de NMEC incluidas en este trabajo y sus características morfológicas en cultivo y su utilización de la lactosa.

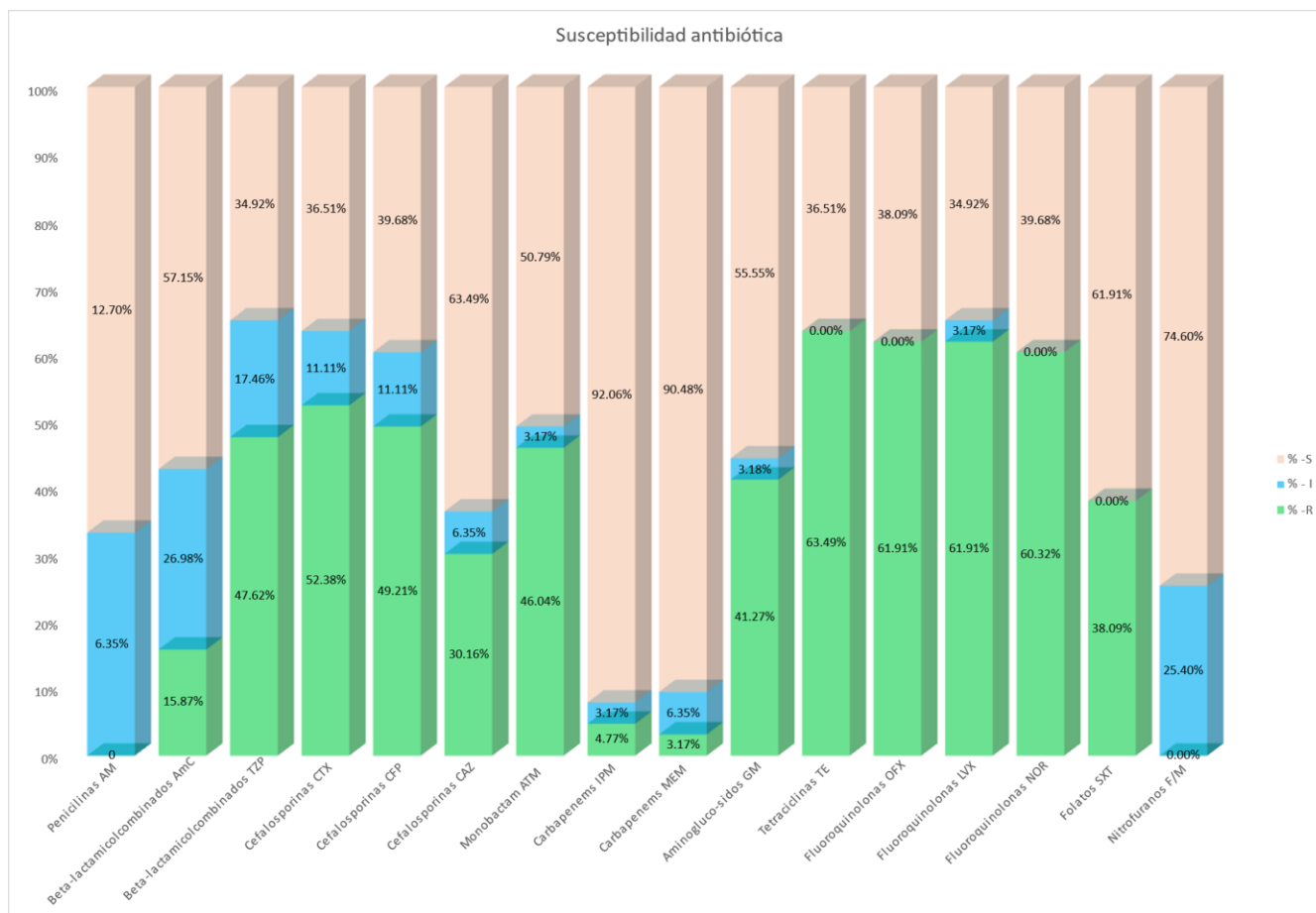
**Tabla 4.** Lista de cepas enumerada del 1 al 63 con homoclave, fecha y caracterización.

|                       |             |                       |             |
|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|
| 1.-428LCR2-030811     | Mucoide     | 46.- 280LCR – 071019  | Lactosa (-) |
| 2.- 438LCR2 – 040811  |             | 47.- 348LCR – 010919  | Mucoide     |
| 3.- 444LCR1 – 080911  |             | 48.- 903LCR – 120619  |             |
| 4.- 444LCR2 – 080911  |             | 49.- 178LCR – 170221  | Mucoide     |
| 5.- 456LCR – 100811   |             | 50.- 180LCR – 180221  |             |
| 6.- 456LCR1 – 100811  |             | 51.- 182LCR – 190221  | Mucoide     |
| 7.- 456LCR2 – 100811  |             | 52.- 188LCR – 230221  | Mucoide     |
| 8.- 466LCR1 – 150811  |             | 53.- 748LCR1 – 190221 |             |
| 9.- 466LCR2 – 150811  | Mucoide     | 54.- 748LCR2 – 100221 |             |
| 10.- 467LCR1 – 100811 | Mucoide     | 55.- 754LCR – 180121  | Lactosa (-) |
| 11.- 467LCR1 – 150811 |             | 56.- 773LCR – 251021  |             |
| 12.- 508LCR2 – 250811 |             | 57.- 774LCR – 250121  |             |
| 13.- 983LCR1 – 041211 |             | 58.- 785LCR – 011121  |             |
| 14.- 983LCR2 – 041211 |             | 59.- 789LCR – 051121  |             |
| 15.- 75LCR – 060812   | Lactosa (-) | 60.- 800LCR – 081121  |             |
| 16.-116LCR – 050112   |             | 61.- 248LCR – 020522  |             |
| 17.- 135LCR – 100112  |             | 62.- 251 LCR – 020522 |             |
| 18.- 480LCR – 030412  |             | 63.- 421LCR – 120722  |             |
| 19.- 588LCR1 – 300412 |             |                       |             |
| 20.- 588LCR2 – 300412 |             |                       |             |
| 21.- 571LCR1 – 250412 |             |                       |             |
| 22.- 571LCR2 – 250412 |             |                       |             |
| 23.- 861LCR – 040712  |             |                       |             |
| 24.- 894LCR – 120712  |             |                       |             |
| 25.- 900LCR – 120712  | Mucoide     |                       |             |
| 26.- 908LCR – 130712  |             |                       |             |
| 27.- 911LCR – 130712  |             |                       |             |
| 28.- 930LCR – 190712  | Mucoide     |                       |             |
| 29.- 949LCR – 190712  |             |                       |             |
| 30.- 957LCR – 190712  |             |                       |             |
| 31.- 47LCR – 180614   |             |                       |             |
| 32.- 318LCR – 280814  |             |                       |             |
| 33.- 350LCR – 040914  | Mucoide     |                       |             |
| 34.- 420LCR – 140114  |             |                       |             |
| 35.- 439LCR – 220114  |             |                       |             |
| 36.- 493LCR – 091014  | Mucoide     |                       |             |
| 37.- 18LCR – 170916   | Lactosa (-) |                       |             |
| 38.- 991LCR – 300816  | Lactosa (-) |                       |             |

|                       |             |  |  |
|-----------------------|-------------|--|--|
| 39.- 455LCR – 250117  |             |  |  |
| 40.- 539LCR – 220217  |             |  |  |
| 41.- 683LCR – 050417  |             |  |  |
| 42.- 879LCR – 010618  |             |  |  |
| 43.- 903LCR – 120618  | Lactosa (-) |  |  |
| 44.- 200LCR1 – 040919 |             |  |  |
| 45.- 200LCR2 – 040919 |             |  |  |

## 7.2 Susceptibilidad antibiótica

Los ensayos de susceptibilidad antibiótica mostraron, en la categoría de Penicilinas, una resistencia del 80.95%/63 para ampicilina (AM) mientras el 12.70%/63 de las cepas de NMEC fueron sensibles (S) a este antibiótico y un 6.35%/63 Intermedias (I). En la categoría de Beta-lactámico combinado con inhibidor de betalactamasas: amoxicilina ácido clavulánico (AmC), mostró el 15.87%/63 de cepas resistentes, 26.98%/63 tuvieron sensibilidad intermedia 57.15%/63 fueron sensibles. En contraste, el antibiótico piperacilina-tazobactam (TZP) fue resistente en el 47.62%/63, intermedio en el 17.46%/63 y sensible en un 34.92%/63. Por otro lado, en la categoría de Cefalosporinas de 2ª y 3ª generación: cefoperazona (CFP) y cefotaxima (CTX) tuvieron los porcentajes más altos en resistencia con un 52.38%/63 y 49.21%/63 respectivamente, mientras que el 36.51%/63 y 39.68%/63 fueron sensibles y en susceptibilidad intermedia ambos antibióticos tuvieron el 11.11%/63. Más aún el antibiótico ceftazidime (CAZ), una cefalosporina de 3ª generación en la misma categoría, obtuvo el porcentaje más elevado de sensible con 63.49%/63 de las cepas de NMEC, un 30.16%/63 fueron resistentes y, el 6.35%/63 con sensibilidad intermedia en la Figura 4, se presentan los resultados totales de las cepas clínicas de NMEC en R, I y S.



**Figura 4.** Gráfico de resultados totales de las cepas clínicas de NMEC en resistentes (R), intermedias (I) y sensibles (S) en los 17 antibióticos ensayados.

En la categoría Monobactámicos: aztreonam (ATM) fue el antibiótico de elección los resultados identificaron el 50.79%/63 de cepas sensibles, el 46.04%/63 resistentes y sólo el 3.17%/63 fueron intermedias. En los antibióticos imipenem (IMP) y meropenem (MEM) procedentes de la categoría Carbapenems, el 92.06%/63 y el 90.48%/63 de las cepas de NMEC de niños del HIMFG fueron sensibles, el 3.17%/63 y 6.35%/63 mostraron sensibilidad intermedia, y el 4.77%/63 y 3.17%/63 fueron resistentes respectivamente. Los antibióticos carbapenémicos fueron los antibióticos de mejor elección para el tratamiento, ya que presentaron el mayor porcentaje de sensibilidad. En la categoría de Aminoglucósidos: gentamicina (GM), los ensayos de susceptibilidad mostraron los siguientes resultados: el 55.55%/63 de las cepas de NMEC fueron sensibles, el 41.27%/63 resistentes y el 3.18%/63 intermedias. Además, la categoría de Tetraciclinas, el antibiótico tetraciclina (Te) obtuvo un 63.49%/63 de cepas resistentes, el 36.51%/63 sensibles, y no se identificaron cepas con sensibilidad intermedia a este antibiótico.



En la categoría de Fluoroquinolonas los antibióticos ofloxacina (OFX) levofloxacina (LVX) y norfloxacina (NOR) obtuvieron porcentajes similares de resistencia, con un 61.92%/63 para OFX y LVX respectivamente, y un 61.92%/63 para NOR mientras que, para cepas sensibles se observó el 38.09%/63, 34.92%/63 y 39.68%/63 respectivamente. Las cepas de NMEC solo representaron sensibilidad intermedia en 3.17%/63 para LVX.

En la categoría de inhibidores de Folatos, el antibiótico de elección fue trimetoprim sulfametoxazol (SXT) con los siguientes resultados de susceptibilidad: el 61.91%/63 de las cepas fueron sensibles, el 38.09%/63 resistente y no se observaron cepa con sensibilidad intermedia. En contraste de la categoría de Nitrofuranos el antibiótico nitrofurantoína (F/M) no mostró cepas resistentes, y el 74.60%/63 fueron sensible y solo el 25.40%/63intermedias. En las figuras 5, 6 y 7 se presentan algunos ejemplos de las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos por el método Kirby-Bauer.

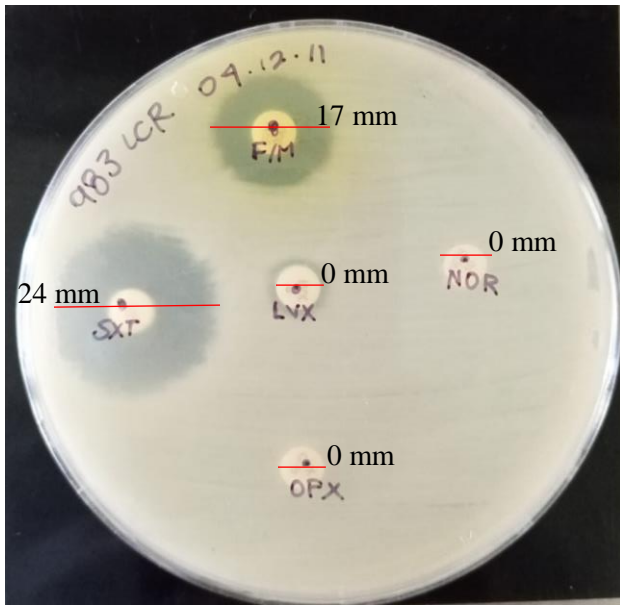
En la Tabla 5 (Añadida en “Anexos”) se presentan los datos obtenidos de las 63 cepas de NMEC, donde se indica, de manera individual (R, I, S), 17 antibióticos procedentes de 10 categorías de antibioticos.

El 26.98%/63 de las cepas clínicas de NMEC fueron MDR-7, el 17.48%/63 fue MDR-4, el 11.11%/63 MDR-3, mientras que el 9.54%/63 MDR-5 y el 4.76% fue MDR-6, esto significa que fueron resistentes a tres, cuatro, cinco, seis y siete categorías de las diez probadas respectivamente. El 12.69%/63 fueron XDR-8 es decir, fueron resistentes a ocho de las diez categorías probadas para el ensayo de susceptibilidad, el 7.96%/63 fueron sensibles a los antibióticos y el 1.58%/63 fue R1, por otra parte, el 6.34%/63 fue R2, es decir, que fueron resistentes a sólo una y dos categorías de las diez probadas para susceptibilidad antibiótica. En la Tabla 6, se observan los porcentajes obtenidos para el estatus de resistencia.

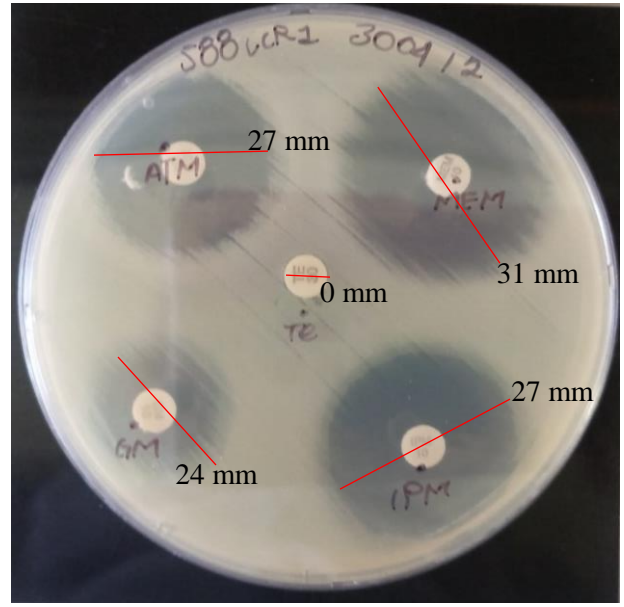
**Tabla 6.** Porcentaje de estatus de resistencia.

| -            | n  | %      |
|--------------|----|--------|
| <b>MDR-3</b> | 7  | 11.11% |
| <b>MDR-4</b> | 11 | 17.48% |

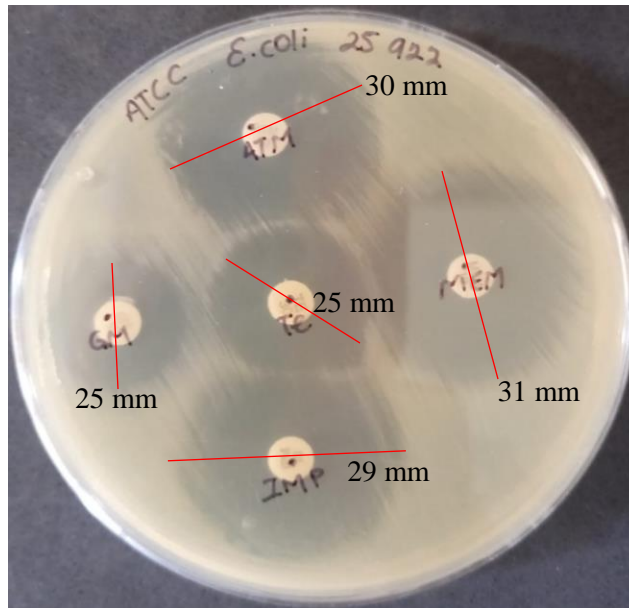
|              |           |               |
|--------------|-----------|---------------|
| <b>MDR-5</b> | <b>6</b>  | <b>9.54%</b>  |
| <b>MDR-6</b> | <b>3</b>  | <b>4.76%</b>  |
| <b>MDR-7</b> | <b>17</b> | <b>26.98%</b> |
| <b>XDR-8</b> | <b>9</b>  | <b>14.28%</b> |
| <b>R1</b>    | <b>1</b>  | <b>1.58%</b>  |
| <b>R2</b>    | <b>4</b>  | <b>6.34%</b>  |
| <b>S</b>     | <b>5</b>  | <b>7.93%</b>  |



**Figura 5.** Cepa clínica de NMEC 983LCR1-041211 con antibióticos F/M, SXT, LVX, NOR y OPX.



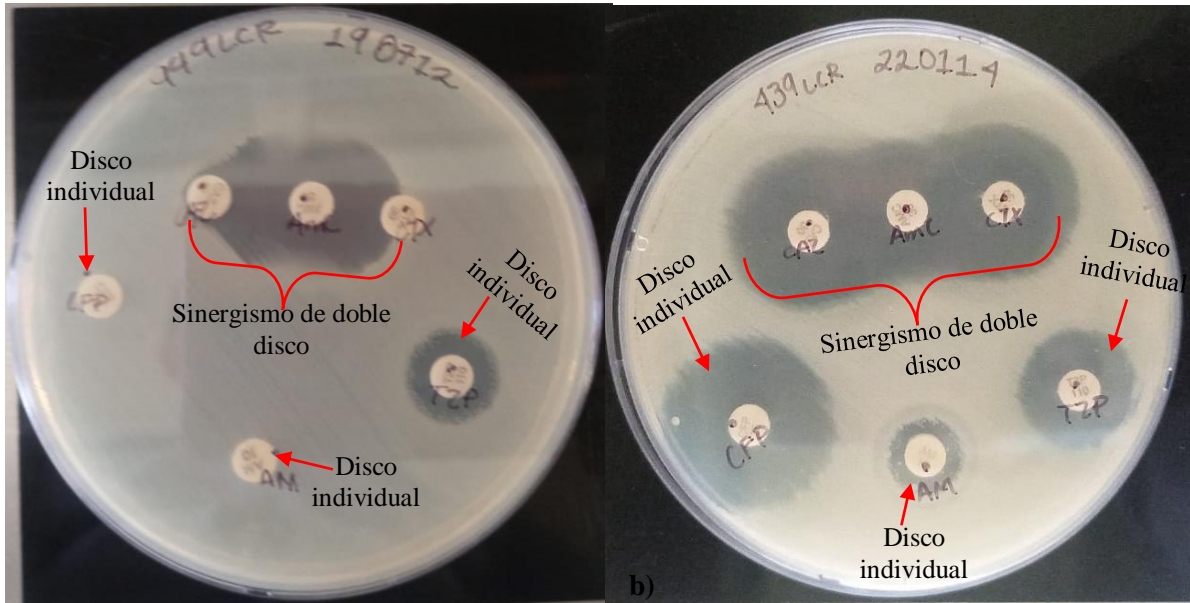
**Figura 6.** Cepa clínica de NMEC 588LCR1-300412 con antibióticos ATM, Te, GM., IPM y MEM.



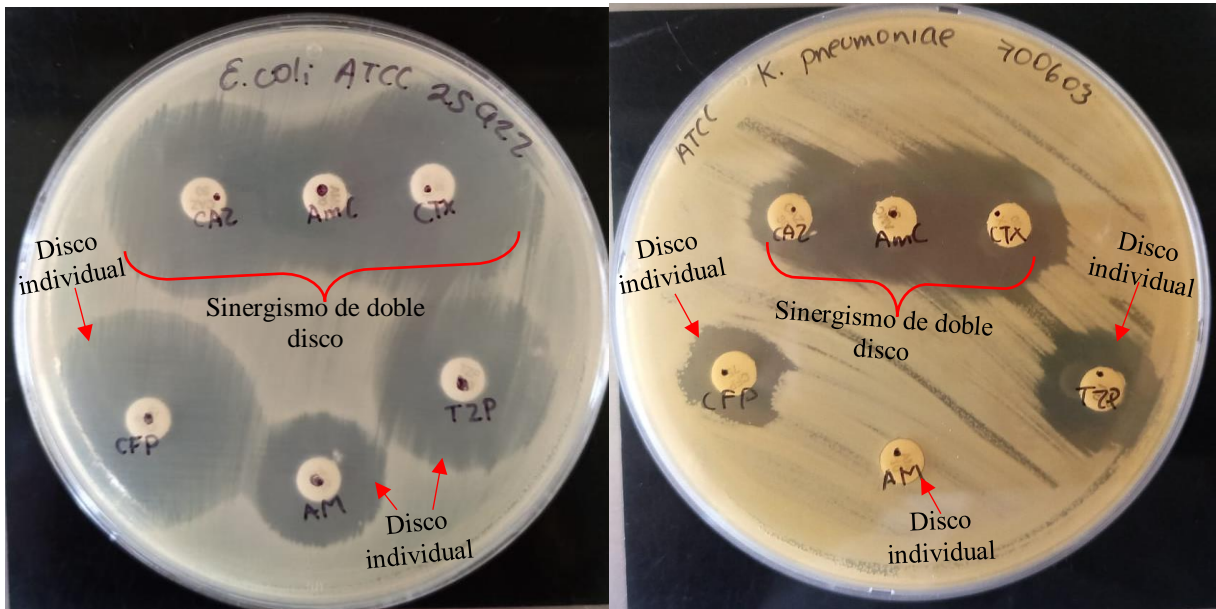
**Figura 7.** Cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922 con los antibióticos ATM, Te, GM, IMP y MEM.

### 7.3 Identificación fenotípica de cepas productoras de betalactamasa

La identificación fenotípica de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se realizó con los ensayos de sinergismo de doble disco (CLSI, 2021). Los resultados obtenidos mostraron el 41.27%/63 de las cepas de NMEC fueron productoras de BLEE. mientras que el 58.73%/63 no fueron productoras de BLEE. Asimismo, la cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922 no fue productor de BLEE, en contraste con la cepa control *K. pneumoniae* ATCC 700603 que fue productora de BLEE, en la Figura 8. Se ilustran las cepas a) 949LCR-190712 la cual dio positivo a productora de BLEE, la cepa b) 439LCR-220114 la cual es negativa para la prueba de BLEE y los controles c) ATCC 2592 no productora de BLEE y d) ATCC 700603 productora de BLEE. En la Tabla 6. Se muestra el porcentaje de producción de BLEE de las cepas clínicas de NMEC.



a)



c)

d)

**Figura 8.** Cepas clínicas de NMEC que se utilizaron para realizar el ensayo de sinergismo de doble disco.

a) Cepa clínica de NMEC 949LCR-100712 productora de BLEE, se colocó disco inhibitor (AmC) al centro, y a los lados se colocaron los discos de (CAZ) y (CTX) con 25 mm de distancia entre ellos. b) Cepa clínica 439LCR-220114 no productora de BLEE, se colocó disco inhibitor (AmC) al centro, y a los lados se colocaron los discos de (CAZ) y (CTX) con 25 mm de distancia entre ellos. c) Cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922 no productora de BLEE, se colocó disco inhibitor (AmC) al centro, y a los lados se colocaron los discos de (CAZ) y (CTX) con 25 mm de distancia entre ellos. d) Cepa control *K. pneumoniae* ATCC 700603 productora de BLEE, se colocó disco inhibitor (AmC) al centro, y a los lados se colocaron los discos de (CAZ) y (CTX) con 25 mm de distancia entre ellos.

**Tabla 7.** Resultados de la producción fenotípica de BLEE en 63 cepas clínicas de NMEC por el método sinergismo con doble disco.

| Homoclave                   |                  |     |     |     |
|-----------------------------|------------------|-----|-----|-----|
|                             |                  | CAZ | AmC | CTX |
| <i>E. coli</i> 25922        |                  | (-) |     |     |
| <i>K. pneumoniae</i> 700603 |                  | (+) |     |     |
| 1                           | 428 LCR2-030811  | (-) |     |     |
| 2                           | 438LCR2 - 040811 | (-) |     |     |
| 3                           | 444LCR1 - 080911 | (+) |     |     |
| 4                           | 444LCR2 - 080911 | (+) |     |     |
| 5                           | 456LCR - 100811  | (-) |     |     |
| 6                           | 456LCR1 - 100811 | (+) |     |     |
| 7                           | 456LCR2 - 100811 | (-) |     |     |
| 8                           | 466LCR1 - 150811 | (-) |     |     |
| 9                           | 466LCR2 - 150811 | (-) |     |     |
| 10                          | 467LCR1 - 100811 | (-) |     |     |
| 11                          | 467LCR1 - 150811 | (-) |     |     |
| 12                          | 508LCR2 - 250811 | (-) |     |     |
| 13                          | 983LCR1 - 041211 | (-) |     |     |
| 14                          | 983LCR2 - 041211 | (-) |     |     |
| 15                          | 75LCR - 060812   | (-) |     |     |
| 16                          | 116LCR - 050112  | (-) |     |     |
| 17                          | 135LCR - 100112  | (-) |     |     |
| 18                          | 480LCR - 030412  | (+) |     |     |
| 19                          | 588LCR1 - 300412 | (-) |     |     |

|    |                     |     |
|----|---------------------|-----|
| 20 | 588LCR2 –<br>300412 | (-) |
| 21 | 571LCR1 –<br>250412 | (-) |
| 22 | 571LCR2 –<br>250412 | (-) |
| 23 | 861LCR–<br>040712   | (-) |
| 24 | 894LCR –<br>120712  | (+) |
| 25 | 900LCR –<br>120712  | (+) |
| 26 | 908LCR –<br>130712  | (+) |
| 27 | 911LCR –<br>130712  | (-) |
| 28 | 930LCR –<br>190712  | (+) |
| 29 | 949LCR –<br>190712  | (+) |
| 30 | 957LCR –<br>190712  | (+) |
| 31 | 47LCR –<br>180614   | (+) |
| 32 | 318LCR –<br>280814  | (-) |
| 33 | 350LCR –<br>040914  | (-) |
| 34 | 420LCR –<br>140114  | (-) |
| 35 | 439LCR –<br>220114  | (-) |
| 36 | 493LCR –<br>091014  | (+) |
| 37 | 18LCR –<br>170916   | (-) |
| 38 | 991LCR –<br>300816  | (-) |
| 39 | 455LCR –<br>250117  | (-) |
| 40 | 539LCR –<br>220217  | (-) |
| 41 | 683LCR –<br>050417  | (+) |

|    |                     |     |
|----|---------------------|-----|
| 42 | 879LCR –<br>010618  | (+) |
| 43 | 903LCR –<br>120618  | (+) |
| 44 | 200LCR1 –<br>040919 | (+) |
| 45 | 200LCR2 –<br>040919 | (+) |
| 46 | 280LCR –<br>071019  | (+) |
| 47 | 348LCR –<br>010919  | (+) |
| 48 | 903LCR –<br>120619  | (+) |
| 49 | 178LCR –<br>170221  | (+) |
| 50 | 180LCR –<br>180221  | (+) |
| 51 | 182LCR –<br>190221  | (+) |
| 52 | 188LCR –<br>230221  | (+) |
| 53 | 748LCR1 –<br>190221 | (-) |
| 54 | 748LCR2 –<br>100221 | (-) |
| 55 | 754LCR –<br>180121  | (-) |
| 56 | 773LCR –<br>251021  | (-) |
| 57 | 774LCR –<br>250121  | (-) |
| 58 | 785LCR –<br>011121  | (-) |
| 59 | 789LCR –<br>051121  | (-) |
| 60 | 800LCR –<br>081121  | (+) |
| 61 | 248LCR –<br>020522  | (+) |
| 62 | 251 LCR –<br>020522 | (-) |
| 63 | 421LCR –<br>120722  | (-) |



| Categoría | n  | %      |
|-----------|----|--------|
| (+)       | 26 | 41.27% |
| (-)       | 37 | 58.73% |

#### 7.4 Cuantificación del DNA genómico.

Se cuantificaron con espectrofotometría en un NanoDrop TM 2000 (Thermo Fisher Scientific®) las 63 cepas de NMEC utilizadas en este estudio. Los resultados de la concentración final de DNA (ng/μL) y los cocientes 260/280 y 260/230 se observan en la Tabla 8.

El 66.67%/63 de las cepas clínicas de NMEC obtuvieron “Pureza optima” ( $\geq 1.8-2.1$ ), el 23.81%/63 “Pureza aceptable” ( $\geq 1.6-1.7$ ) mientras que el “DNA contaminado” y “DNA altamente contaminado” compartieron el mismo porcentaje del 4.76%/63 ( $< 1.6$ ) y ( $< 1.5$ ) respectivamente, en cuanto al control positivo CFT obtuvo “DNA contaminado”.

Como control positivo de extracción de DNA genómico se utilizó la cepa de referencia de UPEC CFT073 que mostro un DNA 1723.9. En la Figura 7, se ilustra un gel de agarosa al 1% de 15 cepas indicadas en la lista de cepas de la Tabla 4, el gel muestra la integridad de algunas de las cepas, lo que indica, es como se observa una banda bien definida sin barridos del DNA, indicativo de una “integridad alta”.

**Tabla 8.** Concentración, Integridad y porcentaje de Pureza de DNA.

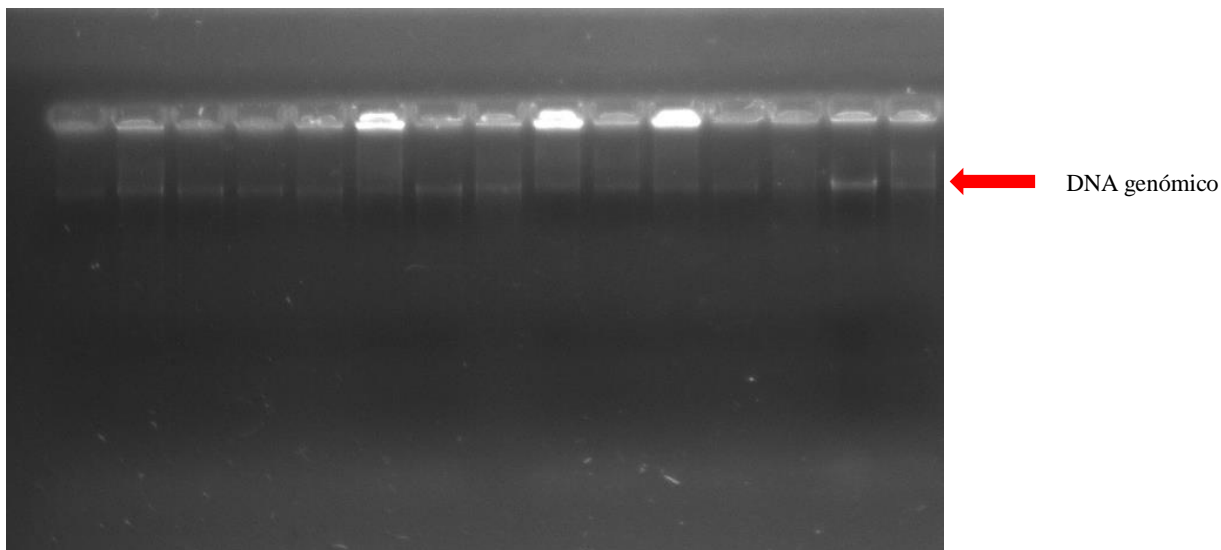
| Integridad de DNA |                  |           |        |        |         |         |                  |
|-------------------|------------------|-----------|--------|--------|---------|---------|------------------|
| No.               | Cepa             | DNA ng/μl | A 260  | A 280  | 260/280 | 260/230 | Pureza           |
| Control (+)       | CFT              | 1723.9    | 34.478 | 21.995 | 1.57    | 0.67    | DNA contaminado  |
| 1                 | 428 LCR2-030811  | 602.3     | 12.046 | 6.41   | 1.88    | 0.82    | Pureza optima    |
| 2                 | 438LCR2 – 040811 | 455.5     | 9.109  | 5.132  | 1.77    | 1.01    | Pureza aceptable |
| 3                 | 444LCR1 – 080911 | 164.7     | 3.294  | 1.898  | 1.74    | 0.75    | Pureza aceptable |
| 4                 | 444LCR2 – 080911 | 562.1     | 11.243 | 6.193  | 1.82    | 1.52    | Pureza optima    |

|    |                  |        |        |        |      |      |                           |
|----|------------------|--------|--------|--------|------|------|---------------------------|
| 5  | 456LCR - 100811  | 746.7  | 14.933 | 10.089 | 1.42 | 0.49 | DNA altamente contaminado |
| 6  | 456LCR1 - 100811 | 187.5  | 3.751  | 2.254  | 1.66 | 0.48 | Pureza aceptable          |
| 7  | 456LCR2 - 100811 | 70.3   | 1.405  | 0.709  | 1.98 | 0.81 | Pureza optima             |
| 8  | 466LCR1 - 150811 | 191.7  | 3.835  | 2.113  | 1.81 | 0.83 | Pureza optima             |
| 9  | 466LCR2 - 150811 | 444.4  | 8.888  | 4.753  | 1.87 | 0.95 | Pureza optima             |
| 10 | 467LCR1 - 100811 | 1308.4 | 26.169 | 19.403 | 1.35 | 0.82 | DNA altamente contaminado |
| 11 | 467LCR1 - 150811 | 91.7   | 1.835  | 1.01   | 1.82 | 0.33 | Pureza optima             |
| 12 | 508LCR2 - 250811 | 74.8   | 1.496  | 0.828  | 1.81 | 0.54 | Pureza optima             |
| 13 | 983LCR1 - 041211 | 236.1  | 4.722  | 2.554  | 1.85 | 1.31 | Pureza optima             |
| 14 | 983LCR2 - 041211 | 118    | 2.36   | 1.369  | 1.72 | 0.8  | Pureza aceptable          |
| 15 | 75LCR - 060812   | 108.1  | 2.162  | 1.205  | 1.79 | 0.8  | Pureza aceptable          |
| 16 | 116LCR - 050112  | 81.4   | 1.629  | 0.875  | 1.86 | 1.26 | Pureza optima             |
| 17 | 135LCR - 100112  | 583.5  | 11.67  | 6.257  | 1.87 | 1.3  | Pureza optima             |
| 18 | 480LCR - 030412  | 513.1  | 10.261 | 5.572  | 1.84 | 1.19 | Pureza optima             |
| 19 | 588LCR1 - 300412 | 804.4  | 16.088 | 8.5    | 1.89 | 1.44 | Pureza optima             |
| 20 | 588LCR2 - 300412 | 119.8  | 2.296  | 1.358  | 1.76 | 0.76 | Pureza aceptable          |
| 21 | 571LCR1 - 250412 | 476.5  | 9.53   | 5.05   | 1.89 | 1.32 | Pureza optima             |
| 22 | 571LCR2 - 250412 | 262.7  | 5.254  | 2.906  | 1.81 | 0.95 | Pureza optima             |
| 23 | 861LCR- 040712   | 58     | 1.16   | 0.58   | 2    | 0.84 | Pureza optima             |
| 24 | 894LCR - 120712  | 186.7  | 3.734  | 2.161  | 1.73 | 0.67 | Pureza aceptable          |
| 25 | 900LCR - 120712  | 1865.6 | 37.311 | 24.683 | 1.51 | 1.1  | DNA contaminado           |
| 26 | 908LCR - 130712  | 112.4  | 2.248  | 1.086  | 2.07 | 1.44 | Pureza optima             |
| 27 | 911LCR - 130712  | 505.7  | 10.115 | 5.24   | 1.93 | 1.82 | Pureza optima             |

|    |                  |       |        |        |      |      |                           |
|----|------------------|-------|--------|--------|------|------|---------------------------|
| 28 | 930LCR – 190712  | 698.7 | 13.973 | 10.082 | 1.39 | 0.5  | DNA altamente contaminado |
| 29 | 949LCR – 190712  | 748.5 | 14.969 | 7.745  | 1.93 | 1.75 | Pureza optima             |
| 30 | 957LCR – 190712  | 168.2 | 3.364  | 1.692  | 1.99 | 1.22 | Pureza optima             |
| 31 | 47LCR – 180614   | 71.3  | 1.426  | 0.686  | 2.08 | 1.2  | Pureza optima             |
| 32 | 318LCR – 280814  | 288.5 | 5.77   | 3.14   | 1.84 | 1.21 | Pureza optima             |
| 33 | 350LCR – 040914  | 197   | 3.94   | 2.151  | 1.83 | 1.07 | Pureza optima             |
| 34 | 420LCR – 140114  | 803.9 | 16.078 | 8.461  | 1.9  | 1.75 | Pureza optima             |
| 35 | 439LCR – 220114  | 222.9 | 4.459  | 2.338  | 1.91 | 1.39 | Pureza optima             |
| 36 | 493LCR – 091014  | 79.6  | 1.593  | 0.874  | 1.82 | 0.9  | Pureza optima             |
| 37 | 18LCR – 170916   | 976.7 | 19.534 | 12.042 | 1.62 | 0.61 | Pureza aceptable          |
| 38 | 991LCR – 300816  | 467.9 | 9.359  | 5.438  | 1.71 | 0.72 | Pureza aceptable          |
| 39 | 455LCR – 250117  | 479.8 | 9.596  | 5.103  | 1.88 | 1.52 | Pureza optima             |
| 40 | 539LCR – 220217  | 600.6 | 12.012 | 6.443  | 1.86 | 1.36 | Pureza optima             |
| 41 | 683LCR – 050417  | 393.3 | 7.865  | 4.234  | 1.86 | 1.28 | Pureza optima             |
| 42 | 879LCR – 010618  | 68.9  | 1.377  | 0.746  | 1.85 | 0.83 | Pureza optima             |
| 43 | 903LCR – 120618  | 644.6 | 12.891 | 7.321  | 1.76 | 1.19 | Pureza aceptable          |
| 44 | 200LCR1 – 040919 | 157.6 | 3.152  | 1.654  | 1.91 | 1.09 | Pureza optima             |
| 45 | 200LCR2 – 040919 | 150.2 | 3.003  | 1.54   | 1.95 | 1.26 | Pureza optima             |
| 46 | 280LCR – 071019  | 118.3 | 2.365  | 1.263  | 1.87 | 1.11 | Pureza optima             |
| 47 | 348LCR – 010919  | 392.5 | 7.85   | 4.402  | 1.78 | 0.86 | Pureza aceptable          |
| 48 | 903LCR – 120619  | 650.5 | 13.01  | 6.909  | 1.88 | 1.34 | Pureza optima             |
| 49 | 178LCR – 170221  | 117.8 | 2.356  | 1.19   | 1.98 | 1.13 | Pureza optima             |
| 50 | 180LCR – 180221  | 489.3 | 9.785  | 5.27   | 1.86 | 1.36 | Pureza optima             |

|    |                  |       |       |       |      |      |                  |
|----|------------------|-------|-------|-------|------|------|------------------|
| 51 | 182LCR – 190221  | 189.1 | 3.783 | 1.989 | 1.9  | 1.2  | Pureza optima    |
| 52 | 188LCR – 230221  | 111.1 | 2.223 | 1.146 | 1.94 | 0.98 | Pureza optima    |
| 53 | 748LCR1 – 190221 | 199.6 | 3.991 | 2.463 | 1.62 | 0.42 | Pureza aceptable |
| 54 | 748LCR2 – 100221 | 342.9 | 6.857 | 4.256 | 1.61 | 0.59 | Pureza aceptable |
| 55 | 754LCR – 180121  | 128.3 | 2.567 | 1.34  | 1.92 | 1    | Pureza optima    |
| 56 | 773LCR – 251021  | 266.4 | 5.327 | 2.952 | 1.8  | 0.6  | Pureza optima    |
| 57 | 774LCR – 250121  | 315.7 | 6.313 | 3.573 | 1.77 | 0.6  | Pureza aceptable |
| 58 | 785LCR – 011121  | 169.4 | 3.388 | 1.855 | 1.83 | 0.88 | Pureza optima    |
| 59 | 789LCR – 051121  | 352.2 | 7.044 | 4.554 | 1.55 | 0.56 | DNA contaminado  |
| 60 | 800LCR – 081121  | 287.2 | 5.743 | 3.197 | 1.8  | 1.07 | Pureza optima    |
| 61 | 248LCR – 020522  | 180   | 3.601 | 1.952 | 1.84 | 1.01 | Pureza optima    |
| 62 | 251 LCR – 020522 | 229   | 4.58  | 2.306 | 1.99 | 1.24 | Pureza optima    |
| 63 | 421LCR – 120722  | 294   | 5.879 | 3.364 | 1.75 | 0.67 | Pureza aceptable |

| <b>Categoría</b>                 | <b>n</b> | <b>%</b> |
|----------------------------------|----------|----------|
| <b>Pureza optima</b>             | 42       | 66.67%   |
| <b>Pureza aceptable</b>          | 15       | 23.81%   |
| <b>DNA contaminado</b>           | 3        | 4.76%    |
| <b>DNA altamente contaminado</b> | 3        | 4.76%    |



**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1x del DNA extraído de algunas cepas.

**Carril 1** cepa clínica NMEC 178LCR-170221, **Carril 2** cepa clínica NMEC 180LCR-180221, **Carril 3** cepa clínica NMEC 182LCR-190221, **Carril 4** cepa clínica NMEC 188LCR-230221, **Carril 5** cepa clínica NMEC 748LCR1-190221, **Carril 6** cepa clínica NMEC 748LCR2-100221, **Carril 7** cepa clínica NMEC 754LCR-180121, **Carril 8** cepa clínica NMEC 773LCR-251021, **Carril 9** cepa clínica NMEC 774LCR-250121, **Carril 10** cepa clínica NMEC 785LCR-011121, **Carril 11** cepa clínica NMEC 789LCR-051121, **Carril 12** cepa clínica NMEC 800LCR-081121, **Carril 13** cepa clínica NMEC 248LCR-020522, **Carril 14** cepa clínica NMEC 251LCR-020522 y **Carril 15** cepa clínica NMEC 421LCR-120722.

#### 7.5 Grupos filogenéticos de cepas clínicas de NMEC por PCR múltiple

La tipificación de grupo filogenético (GF) o también llamados filogrupos, de las cepas clínicas de NMEC, utilizando los iniciadores *chuA*, *yjaA* y *tspE4.C2* permitió clasificar a las NMEC en los linajes filogenéticos y sub grupos filogenéticos (A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub><sub>1</sub>, B<sub>1</sub><sub>2</sub>, B<sub>2</sub><sub>1</sub>, B<sub>2</sub><sub>2</sub>, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>)

Los resultados mostraron que el filogrupo A<sub>1</sub> presentó el mayor porcentaje de cepas de NMEC con el 26.99%/63, el filogrupo B<sub>2</sub><sub>2</sub> con el 23.81%/63, los filogrupos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> con el 20.63%/63 y el 19.05%/63 respectivamente, y con el porcentaje más bajo, el filogrupo B<sub>1</sub><sub>1</sub> con un 3.17%/63. Los filogrupos B<sub>1</sub><sub>2</sub>, B<sub>2</sub><sub>1</sub> no fueron identificados en las cepas de NMEC, sin embargo, 4 de las cepas no presentaron amplificación a ninguno de los iniciadores aún y repitiéndola por dos ocasiones; por lo tanto, el 6.35%/63 fue clasificado como "A<sub>0</sub>". La Tabla 9, muestra los porcentajes que se obtuvieron en cada uno de los linajes. En las figuras 8, 9, 10 y 11, se ilustran los corrimientos electroforéticos de los productos de PCR múltiple de 59 cepas añadidas en la lista de cepas en la Tabla 4. En el gel se visualiza la amplificación de fragmentos *chuA* (279pb), *yjaA* (211 pb) y *TspE4.C2* (159pb).

**Tabla 9.** Determinación y porcentaje de Grupo filogenético.

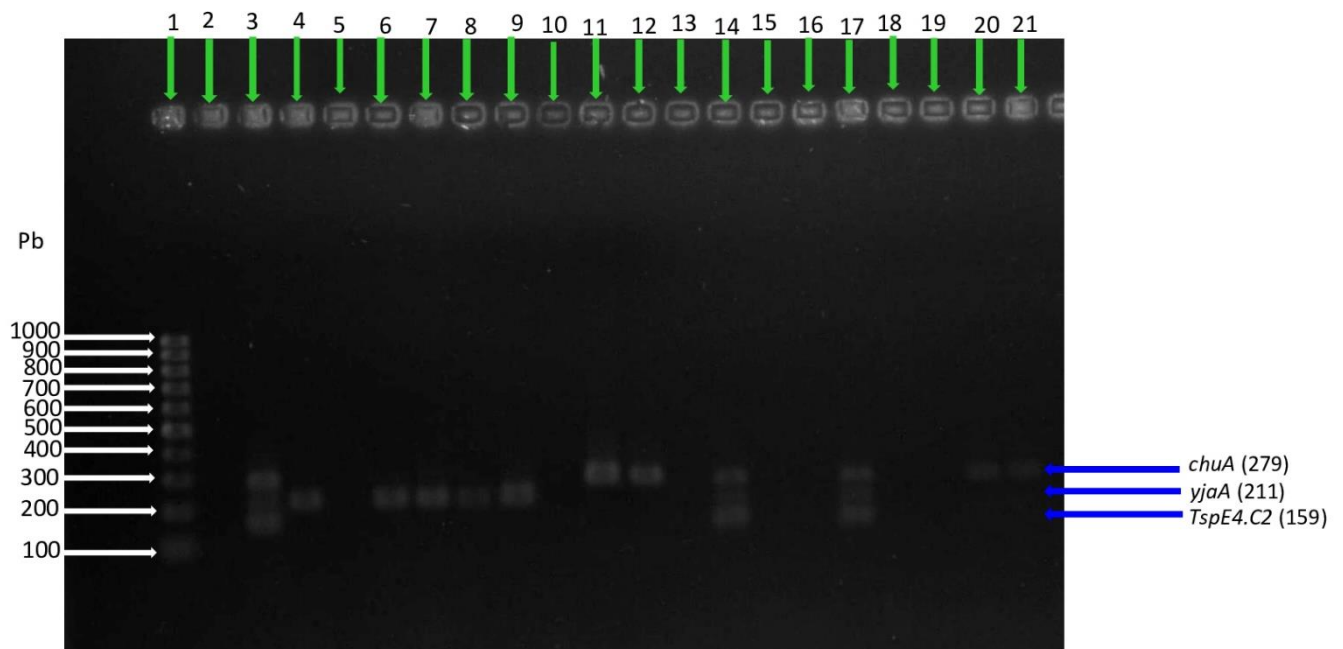
| Grupo Filogenético |                   |                      |                      |                          |                 |
|--------------------|-------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|-----------------|
| No.                | Cepa              | <i>chuA</i> (279 pb) | <i>yjaA</i> (211 pb) | <i>TspE4.C2</i> (159 pb) | Clasificación   |
| 1                  | 428 LCR2 - 030811 | -                    | +                    | -                        | A <sub>1</sub>  |
| 2                  | 438 LCR2 - 040811 | -                    | +                    | -                        | A <sub>1</sub>  |
| 3                  | 444 LCR1 - 080911 | -                    | +                    | -                        | A <sub>1</sub>  |
| 4                  | 444 LCR2 - 080911 | -                    | +                    | -                        | A <sub>1</sub>  |
| 5                  | 456 LCR - 100811  | -                    | +                    | -                        | A <sub>1</sub>  |
| 6                  | 456 LCR1 - 100811 | -                    | +                    | -                        | A <sub>1</sub>  |
| 7                  | 456 LCR2 - 100811 | 0                    | 0                    | 0                        | A <sub>0</sub>  |
| 8                  | 466 LCR1 - 150811 | -                    | +                    | -                        | A <sub>1</sub>  |
| 9                  | 466 LCR2 - 150811 | -                    | +                    | -                        | A <sub>1</sub>  |
| 10                 | 467 LCR1 - 100811 | -                    | +                    | -                        | A <sub>1</sub>  |
| 11                 | 467 LCR1 - 150811 | -                    | +                    | -                        | A <sub>1</sub>  |
| 12                 | 508 LCR2 - 250811 | 0                    | 0                    | 0                        | A <sub>0</sub>  |
| 13                 | 983 LCR1 - 041211 | +                    | -                    | -                        | D <sub>1</sub>  |
| 14                 | 983 LCR2 - 041211 | +                    | -                    | -                        | D <sub>1</sub>  |
| 15                 | 75 LCR - 060812   | +                    | -                    | +                        | D <sub>2</sub>  |
| 16                 | 116 LCR - 050112  | +                    | +                    | +                        | B <sub>22</sub> |
| 17                 | 135 LCR - 100112  | +                    | -                    | +                        | D <sub>2</sub>  |
| 18                 | 480 LCR - 030412  | +                    | +                    | +                        | B <sub>22</sub> |
| 19                 | 588 LCR1 - 300412 | +                    | +                    | +                        | B <sub>22</sub> |
| 20                 | 588 LCR2 - 300412 | +                    | +                    | +                        | B <sub>22</sub> |
| 21                 | 571 LCR1 - 250412 | +                    | +                    | +                        | B <sub>22</sub> |

|    |                     |   |   |   |     |
|----|---------------------|---|---|---|-----|
| 22 | 571LCR2 –<br>250412 | + | + | + | B22 |
| 23 | 861LCR–<br>040712   | + | - | - | D1  |
| 24 | 894LCR –<br>120712  | + | - | - | D1  |
| 25 | 900LCR –<br>120712  | + | - | - | D1  |
| 26 | 908LCR –<br>130712  | + | - | - | D1  |
| 27 | 911LCR –<br>130712  | + | - | - | D1  |
| 28 | 930LCR –<br>190712  | - | + | - | A1  |
| 29 | 949LCR –<br>190712  | + | - | - | D1  |
| 30 | 957LCR –<br>190712  | 0 | 0 | 0 | A0  |
| 31 | 47LCR –<br>180614   | 0 | 0 | 0 | A0  |
| 32 | 318LCR –<br>280814  | + | - | - | D1  |
| 33 | 350LCR –<br>040914  | - | - | + | B11 |
| 34 | 420LCR –<br>140114  | + | + | + | B22 |
| 35 | 439LCR –<br>220114  | + | + | + | B22 |
| 36 | 493LCR –<br>091014  | + | + | + | B22 |
| 37 | 18LCR –<br>170916   | + | + | + | B22 |
| 38 | 991LCR –<br>300816  | + | + | + | B22 |
| 39 | 455LCR –<br>250117  | + | + | + | B22 |
| 40 | 539LCR –<br>220217  | + | - | - | D1  |
| 41 | 683LCR –<br>050417  | + | - | - | D1  |
| 42 | 879LCR –<br>010618  | + | + | + | B22 |
| 43 | 903LCR –<br>120618  | + | + | + | B22 |
| 44 | 200LCR1 –<br>040919 | - | + | - | A1  |

|    |                  |   |   |   |     |
|----|------------------|---|---|---|-----|
| 45 | 200LCR2 – 040919 | - | + | - | A1  |
| 46 | 280LCR – 071019  | + | - | + | D2  |
| 47 | 348LCR – 010919  | - | - | + | B11 |
| 48 | 903LCR – 120619  | + | - | + | D2  |
| 49 | 178LCR – 170221  | - | + | - | A1  |
| 50 | 180LCR – 180221  | - | + | - | A1  |
| 51 | 182LCR – 190221  | - | + | - | A1  |
| 52 | 188LCR – 230221  | - | + | - | A1  |
| 53 | 748LCR1 – 190221 | + | - | + | D2  |
| 54 | 748LCR2 – 100221 | + | - | + | D2  |
| 55 | 754LCR – 180121  | + | - | + | D2  |
| 56 | 773LCR – 251021  | + | - | + | D2  |
| 57 | 774LCR – 250121  | + | - | + | D2  |
| 58 | 785LCR – 011121  | + | - | + | D2  |
| 59 | 789LCR – 051121  | + | - | + | D2  |
| 60 | 800LCR – 081121  | + | - | + | D2  |
| 61 | 248LCR – 020522  | + | - | - | D1  |
| 62 | 251 LCR – 020522 | + | - | - | D1  |
| 63 | 421LCR – 120722  | + | + | + | B22 |

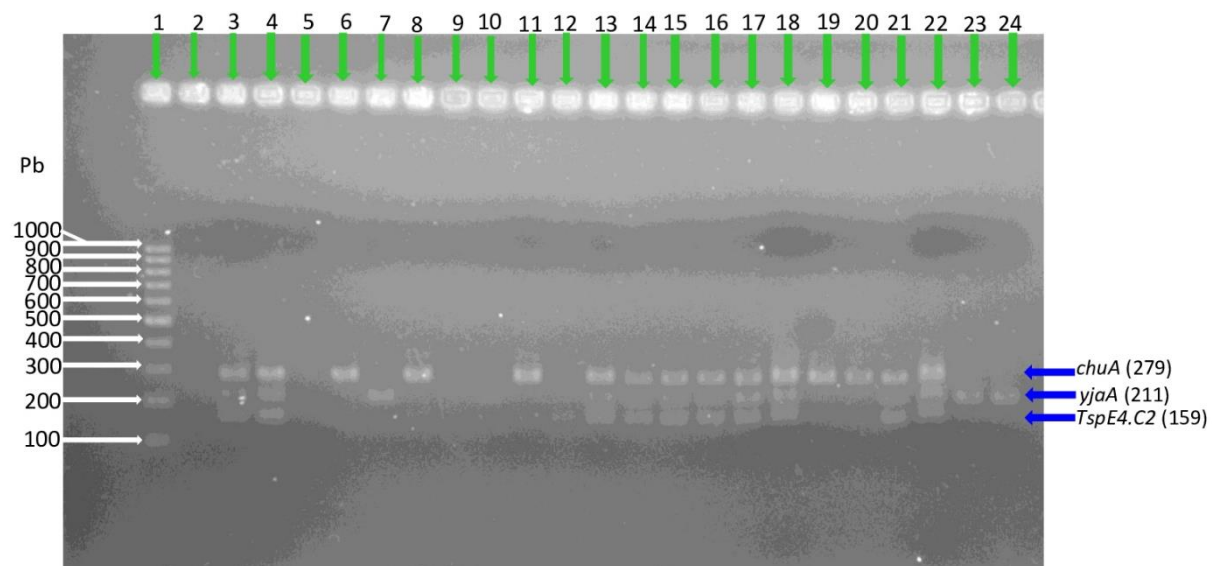
| Categoría | n  | %      |
|-----------|----|--------|
| A0        | 4  | 6.35%  |
| A1        | 17 | 26.99% |
| D1        | 13 | 20.63% |
| D2        | 12 | 19.05% |
| B11       | 2  | 3.17%  |
| B22       | 15 | 23.81% |





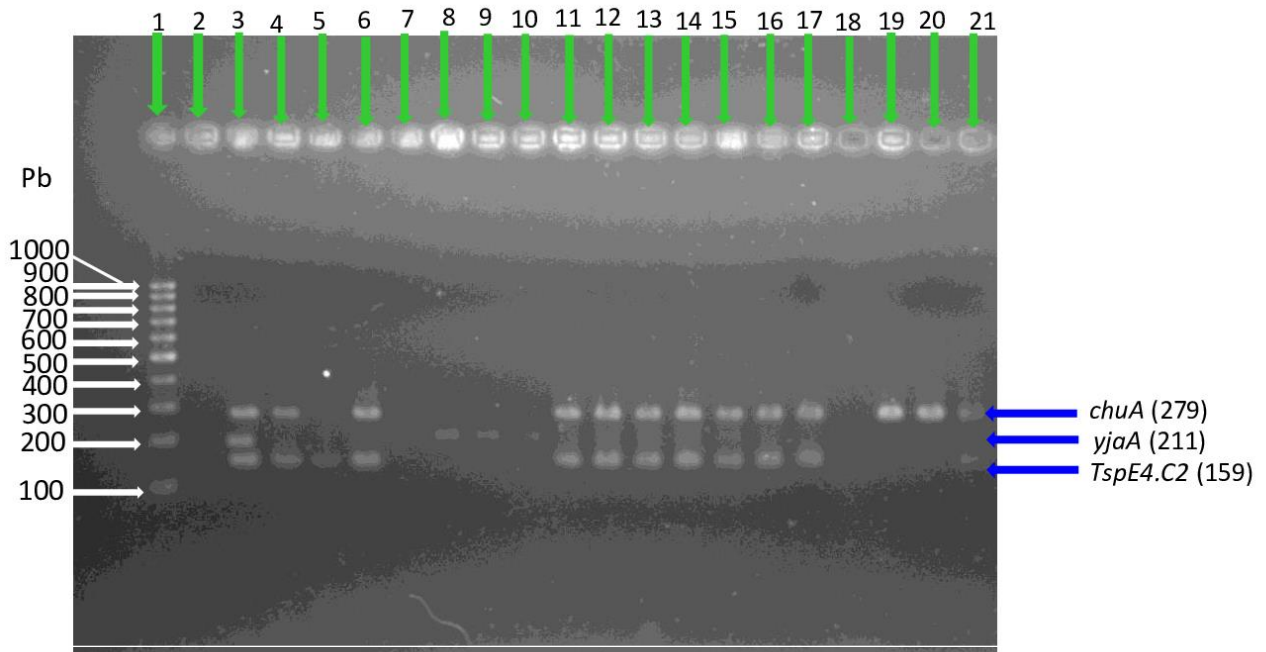
**Figura 10.** Gel de Agarosa al 1.8% con muestras amplificadas en las regiones *chuA* con peso del fragmento de (279pb), *yjaA* (211pb), *TspE4. C2* (159 PB) y un marcador de peso molecular (MP) de 100pb.

**Carril 1.** Marcador MP, **Carril 2.** Control (-), **Carril 3.** Control (+) CFT073, **Carril 4.** Cepa clínica NMEC 456LCR1-100811, **Carril 5.** Vacío, **Carril 6.** Cepa clínica NMEC 466LCR1-159811, **Carril 7.** Cepa clínica NMEC 466LCR2-150811, **Carril 8.** Cepa clínica NMEC 467LCR1-100811, **Carril 9.** Cepa clínica NMEC 467LCR1-150811, **Carril 10.** Vacío, **Carril 11.** Cepa clínica NMEC 983LCR1-041211, **Carril 12.** Cepa clínica NMEC 983LCR2-041211, **Carril 13.** Vacío, **Carril 14.** Cepa clínica NMEC 116LCR-050112, **Carril 15.** Vacío, **Carril 16.** Vacío, **Carril 17.** Cepa clínica NMEC 588LCR1-300412, **Carril 18.** Vacío, **Carril 19.** Vacío, **Carril 20.** Cepa clínica NMEC 861LCR-040712 y **Carril 21.** Cepa clínica NMEC 894LCR-120712.



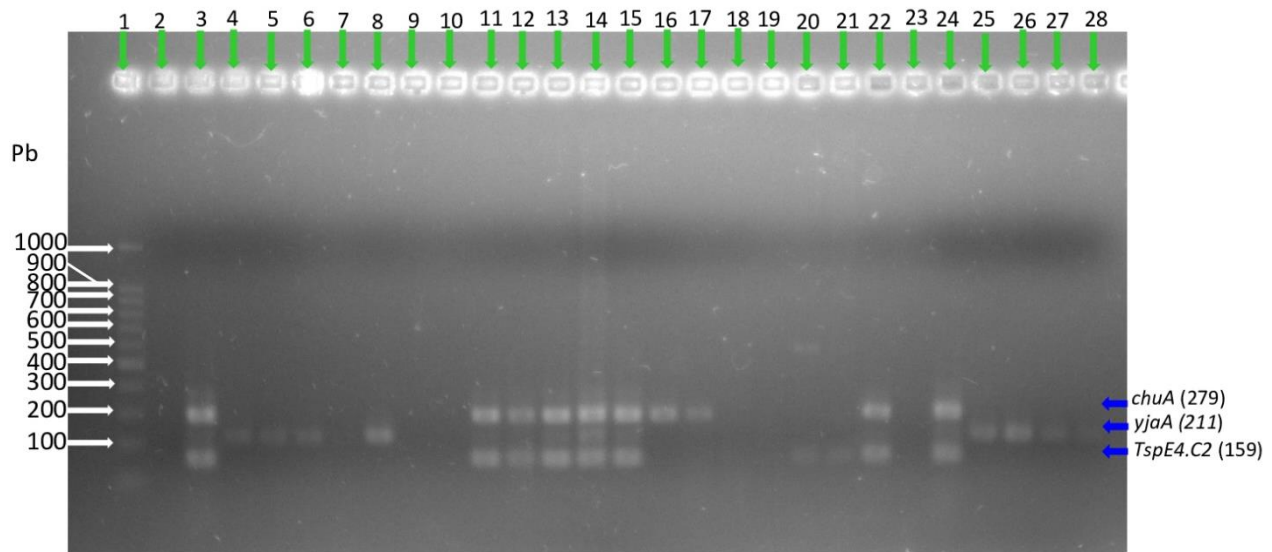
**Figura 11.** Gel de Agarosa al 1.8% con muestras amplificadas en las regiones *chuA* con peso del fragmento de (279pb), *yjaA* (211pb), *TspE4. C2* (159 PB) y un marcador de Peso Molecular (MP) de 100pb.

**Carril 1.** Marcador MP, **Carril 2.** Control (-), **Carril 3.** Control (+) CFT073, **Carril 4.** Cepa clínica NMEC 588LCR2-300412, **Carril 5.** Vacío, **Carril 6.** Cepa clínica NMEC 911LCR-130712, **Carril 7.** Cepa clínica NMEC 930LCR-190712, **Carril 8.** Cepa clínica NMEC 949LCR1-190712, **Carril 9.** Vacío, **Carril 10.** Vacío, **Carril 11.** Cepa clínica NMEC 318LCR-280814, **Carril 12.** Vacío, **Carril 13.** Cepa clínica NMEC 420LCR-140114, **Carril 14.** Cepa clínica NMEC 439LCR-220114, **Carril 15.** Cepa clínica NMEC 493LCR-091014, **Carril 16.** Cepa clínica NMEC 18LCR-170916, **Carril 17.** Cepa clínica NMEC 991LCR-300816, **Carril 18.** Cepa clínica NMEC 455LCR-250117, **Carril 19.** Cepa clínica NMEC 539LCR.220217, **Carril 20.** Cepa clínica NMEC 683LCR-050717 y **Carril 21.** Cepa clínica NMEC 879LCR-010618, **Carril 22.** Cepa clínica NMEC 903LCR-120618, **Carril 23.** Cepa clínica NMEC 200LCR1-040919 y **Carril 24.** Cepa clínica NMEC 200LCR2-040919



**Figura 12.** Gel de Agarosa al 1.8% con muestras amplificadas en las regiones *chuA* con peso del fragmento de (279pb), *yjaA* (211pb), *TspE4. C2* (159 PB) y un marcador de peso molecular (MP) de 100pb.

**Carril 1.** Marcador MP, **Carril 2.** Control (-), **Carril 3.** Control (+) CFT073, **Carril 4.** Cepa clínica NMEC 280LCR1-071019, **Carril 5.** Vacío, **Carril 6.** Cepa clínica NMEC 903LCR1-120619, **Carril 7.** Cepa clínica NMEC 178LCR-170221, **Carril 8.** Cepa clínica NMEC 180LCR-180221, **Carril 9.** Cepa clínica NMEC 182LCR-190221, **Carril 10.** Cepa clínica NMEC 188LCR-230221, **Carril 11.** Cepa clínica NMEC 748LCR1-190221, **Carril 12.** Cepa clínica NMEC 748LCR2-100221, **Carril 13.** Cepa clínica NMEC 754LCR-2180121, **Carril 14.** Cepa clínica NMEC 773LCR-251021, **Carril 15.** Cepa clínica NMEC 774LCR-250121, **Carril 16.** Cepa clínica NMEC 785LCR-011121, **Carril 17.** Cepa clínica NMEC 789LCR1-051121, **Carril 18.** Vacío, **Carril 19.** Cepa clínica NMEC 248LCR-020522, **Carril 20.** Cepa clínica NMEC 251LCR-020522 y **Carril 21.** Cepa clínica NMEC 421LCR-120722.



**Figura 13.** Gel de Agarosa al 1.8% con muestras amplificadas en las regiones *chuA* con peso del fragmento de (279pb), *yjaA* (211pb), *TspE4. C2* (159 PB) y un marcador de peso molecular (MP) de 100pb.

**Carril 1.** Marcador MP, **Carril 2.** Control (-), **Carril 3.** Control (+) CFT073, **Carril 4.** Cepa clínica NMEC 428LCR2-030811, **Carril 5.** Cepa clínica NMEC 428LCR2-040811, **Carril 6.** Cepa clínica NMEC 444LCR1-080911, **Carril 7.** Vacío, **Carril 8.** Cepa clínica NMEC 456LCR-100811, **Carril 9.** Vacío, **Carril 10.** Vacío, **Carril 11.** Cepa clínica NMEC 75LCR-060812, **Carril 12.** Cepa clínica NMEC 135LCR-100112, **Carril 13.** Cepa clínica NMEC 480LCR-030412, **Carril 14.** Cepa clínica NMEC 571LCR1-250412, **Carril 15.** Cepa clínica NMEC 571LCR2-250412, **Carril 16.** Cepa clínica NMEC 900LCR-120712, **Carril 17.** Cepa clínica NMEC 908LCR-130712, **Carril 18.** Vacío, **Carril 19.** Vacío, **Carril 20.** Cepa clínica NMEC 350LCR-040914 y **Carril 21.** Cepa clínica NMEC 348LCR-010919, **Carril 22.** Cepa clínica NMEC 800LCR-081121, **Carril 23.** Control (-), **Carril 24.** Control (+) CFT073, **Carril 25.** Cepa clínica NMEC 428LCR2-030811, **Carril 26.** Cepa clínica NMEC 438LCR2-040811, **Carril 27.** Cepa clínica NMEC 444LCR1-080911 y **Carril 28.** Cepa clínica NMEC 444LCR2-080911.

## 8. Discusión

En el estudio realizado por Flannery et al. 2021 donde examinaron las características epidemiológicas y los patrones de susceptibilidad a los antibióticos de *E. coli* aislada de cultivos de sangre, líquido cefalorraquídeo u orina de entre 117 484 bebés ingresados en unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN) que contribuyeron con datos microbiológicos de 2009 a 2017. Encontraron tasas sustanciales de resistencia a los antibióticos de uso común; el 66.8% de los aislamientos no fue sensible a la ampicilina, el 16.8 % fue sensible a los aminoglucósidos y no observaron resistencia a los carbapenémicos, es decir, que encontraron patrones similares entre los antibióticos de dicha categoría, lo que concuerda ampliamente con este estudio que indica que la ampicilina es resistente en un 80.95%, el 55.55% también fue sensible a aminoglucósidos y los carbapenémicos con un 92.06% y 90.48% de sensibilidad, al igual que el estudio reportado por Flannery et al. 2021, también se encontró patrones similares en los antibióticos imipenem y meropenem con 92% de sensibilidad.

Mientras que un estudio realizado en China por Liu et al. 2021 en un Hospital Afiliado de la Universidad Médica de Wenzhou y el Hospital Infantil de Yuying, la NMEC se diagnosticó de acuerdo con el número de glóbulos blancos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y la presencia de una sola bacteria patógena potencial en el cultivo preparado a partir de la sangre o el LCR de un bebé recién nacido y se identificaron un total de 182 casos de NMEC, los autores sugieren que la *E. coli* de bebés con meningitis entre 2007 y 2012 fueron susceptibles a la ampicilina con 16.7 % y el 50.3 % fueron susceptibles a las cefalosporinas de tercera generación, como la cefotaxima y la ceftazidima. Sin embargo, estas tasas fueron significativamente más bajas que las tasas de susceptibilidad de *E. coli* aisladas entre 2001 y 2006, aunque la susceptibilidad de *E. coli* para cefotaxima y ceftazidima aumentó posteriormente de 2013 a 2020 (Liu et al. 2021). Asimismo, estos datos concuerdan con esta investigación debido a que se dieron resultados similares para cefalosporinas sensibles para el antibiótico ceftazidima con el 63.49%.

Por otra parte, Patel et al. 2017 reportan un estudio de cohorte prospectivo multicéntrico en 4 UCIN de nivel III entre mayo de 2009 y abril de 2012, donde identificaron 6182 *E.coli* aislada de cultivos de sangre en los 4 sitios de estudio que fueron NewYork-Presbyterian Morgan Stanley Children's Hospital en el Centro Médico de la Universidad de Columbia, NewYork-Presbyterian Komansky Center for Children's Health en Weill Cornell Medical Center, Children's Hospital of Philadelphia y Christiana Care Health System. Estos estudios abarcan tasas crecientes de resistencia a fluoroquinolonas de hasta el 54% entre las infecciones neonatales por *E coli* entre 1979 y 2006 en la

Universidad de Columbia, pero no se identificó resistencia a la gentamicina (Patel et al. 2017). Un total del 68% de 258 infecciones neonatales del torrente sanguíneo por *E. coli* en 77 centros de Pediatrix Medical Group en 2012 fueron causadas por aislamientos resistentes a tetraciclinas, el 17.1% de los aislamientos presentaron una baja resistencia a los nitrofuranos y a la combinación de piperacilina-tazobactam (Flannery et al. 2021). Los datos mostraron que aproximadamente un tercio de las cepas de *E. coli* aisladas de bebés con meningitis en UCIN eran multirresistentes (MDR) debido a la producción de BLEE. Aunque no se aislaron cepas de *E. coli* multirresistentes productoras de BLEE entre 2001 y 2006, un número cada vez mayor de cepas de *E. coli* multirresistentes productoras de BLEE aumento un 50%. Este aumento puede deberse al uso rutinario de ceftazidime en infecciones prenatales y neonatales, lo que permite el desarrollo de resistencia antibiótica. Afortunadamente, el número de *E. coli* las cepas disminuyeron significativamente entre 2013 y 2020, lo que representa el 29.4% de las cepas aisladas de recién nacidos con NMEC durante este período. Esto puede ser el resultado del estricto control del uso de antibióticos en China durante los últimos 10 años (Liu et al. 2021). Lezameta et al. 2019 proponen que la detección de bacterias productoras de BLEE, debe ser una prueba de rutina en los laboratorios de microbiología a fin de conocer la verdadera dimensión del problema, adecuar las mejores opciones terapéuticas e implementar medidas pertinentes para limitar su diseminación.

Los datos del Programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY para 2017 mostraron que entre 1831 aislamientos de *E. coli* las tasas sustanciales de resistencia a la fluoroquinolona y la combinación de trimetoprim-sulfametoxazol, pueden reflejar una resistencia sustancial en la ecología de los uropatógenos en adultos; aunque estos medicamentos rara vez se usan para pacientes neonatales, tales hallazgos sugieren la necesidad de una vigilancia continua en la atención pediátrica y de adultos (Flannery et al. 2021). Asimismo, Galván et al. (2016) mencionan que encontraron elevados niveles de resistencia a las fluoroquinolonas, estos antimicrobianos han sido usados con mucha frecuencia en tratamientos empíricos de infecciones del torrente sanguíneo, ello debido a que norfloxacin y levofloxacin alcanzan altas concentraciones en el lugar de infección. De igual forma estos mismos antibióticos fueron reportados en este estudio con una alta resistencia, obteniendo un 60% y 62% respectivamente.

Dhillon and Clark, (2012), explican que los niveles de resistencia a antimicrobianos varían de acuerdo a la región de estudio. Los países en vías de desarrollo presentan niveles de resistencia mayores debido a la situación socioeconómica, venta libre de antimicrobianos, carencia o incumplimiento de políticas de uso racional de antimicrobianos y la falta de recursos para implementar estrategias de contención adecuadas (Galván et al. 2016)

Wijetungen et al. 2015 reportan en su estudio un total de 53 aislamientos de NMEC obtenidos de neonatos con meningitis de la Universidad de Minnesota, St. Paul, MN, EE. UU. y de Northwestern University, Evanston, IL, EE. UU y 48 aislamientos de heces *E. coli* obtenidas de individuos sanos (HFEC) se obtuvieron de la colección del Centro de Referencia de *E. coli* (Universidad Estatal de Pensilvania, Universidad, Park, PA, EE. UU.). Se evaluaron comparativamente usando cinco métodos fenotípicos (serotipado, ensayo bactericida en suero, ensayo de biopelícula, prueba de susceptibilidad antimicrobiana y ensayo de invasión celular in vitro) y tres métodos genotípicos (filoagrupación, genotipado de virulencia y electroforesis en gel de campo pulsado). Los resultados que obtuvieron, en su mayoría, el 67.92 % de NMEC caía en el filogrupo B2 en comparación con los filogrupos A y B1 que tuvieron un porcentaje menor (29.2%). Sin embargo, esto ha sido confirmado por métodos de genotipificación molecular (Johnson y Stell, 2000; Maslow et al. 1995; Picard et al. 1993), y trabajos recientes han mostrado que las cepas de NMEC pertenecen principalmente al grupo B2 y, ocasionalmente, al grupo D (Bingen-Bidois et al. 2002). Johnson et al. 2001 analizaron 70 aislamientos anónimos de líquido cefalorraquídeo (LCR) de lactantes con meningitis bacteriana neonatal (NBM). Los aislamientos representaron un subconjunto seleccionado al azar de los 87 aislamientos referidos al Laboratorio de Referencia de los Países Bajos para la Meningitis Bacteriana (Ámsterdam) desde 1989 hasta 1997. Este laboratorio recibe ~85% de los aislamientos de meningitis de niños en los Países Bajos, fueron evaluados en busca de antecedentes filogenéticos y genotipos de virulencia extendido. Los 70 aislamientos de LCR se clasificaron según el grupo filogenético sobre la base del análisis de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), que proporciona un sustituto conveniente para la electroforesis enzimática multilocus (Johnson et al. 2001). El análisis RAPD compuesto indicó que 57 (81 %) de los 70 aislamientos de NBM correspondían al grupo filogenético B2 de *E. coli*, 7 (10 %) correspondían al grupo B1, 5 (7 %) correspondían al grupo D y 1 (1 %) correspondió con el grupo A (Johnson et al. 2001). Estos estudios demuestran que el grupo filogenético B2 es el que predomina mayormente dentro de las cepas de NMEC, sin embargo, en este estudio el grupo filogenético que tuvo un mayor porcentaje fue el A<sub>1</sub> con el 26.99% seguido del GF B2<sub>2</sub> con el 23.81% y con un menor porcentaje el GF B1<sub>1</sub> con 3.17% lo que da por hecho que la mayoría de las cepas no pertenecen a NMEC.

## 9. Conclusiones

Este estudio propone que *Escherichia coli* es una de las principales causas de meningitis neonatal (NMEC), sin embargo, los porcentajes de MDR son los que predominan mayormente, lo que deja claro que no fueron susceptibles a los antibióticos comúnmente administrados y que la categoría de los Carbapenems puede ayudar con mayor eficacia al tratamiento para la NMEC ya que IPM y MEM fueron los antibióticos con mayores porcentajes en sensibilidad para dichas cepas. Asimismo, el mayor porcentaje para determinar el grupo filogenético fue A<sub>1</sub> lo que sugiere que estas cepas no son en su totalidad NMEC y pudieron haber sido contaminadas por un agente externo.

## 10. Impacto de las Actividades del Servicio Social

Conocer las características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *Escherichia coli* neonatal meningitis (NMEC) fueron de alta importancia para el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), específicamente para el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal (LIBI), debido a que tipificar dichas cepas da una amplia visualización de los problemas que puede causar en los infantes recién nacidos, y así como también saber el tipo de tratamiento que se puede utilizar; este proyecto deja abierta la puerta para futuras investigaciones.

Durante la estancia dentro del HIMFG se adquirieron nuevos conocimientos y se pusieron en práctica los ya adquiridos durante la licenciatura en biología, con ello podemos aportar información actual y precisa sobre la identificación de *Escherichia coli* neonatal meningitis (NMEC).

## 11. Aprendizaje y habilidades obtenidas durante el desarrollo del servicio social.

En cada una de las actividades realizadas durante el servicio social, se tuvo la oportunidad de aprender y obtener habilidades, como por ejemplo la correcta utilización de una pipeta y la preparación de medios con mayor eficacia, además de reforzar conocimientos adquiridos como estudiante, como la identificación de bacterias gram positivas y gram negativas, la realización e interpretación de pruebas bioquímicas y ensayos de PCR.

Uno de los conocimientos adquiridos de gran relevancia profesional, fue la interpretación de resultados, que es una práctica habitual y de suma importancia dentro del laboratorio de microbiología, así como también la esterilización de materiales que se utilizan en el laboratorio, el

uso correcto de microscopios y aparatos de alta gama en tecnología y la correcta seguridad dentro del laboratorio.

## 12. Fundamento de las Actividades Desarrolladas

*Escherichia coli* tiene la característica de ser tanto la principal especie del microbiota comensal intestinal no anaeróbica de la mayoría de los humanos y animales, así como un importante patógeno nosocomial y adquirido en la comunidad que causa diversas infecciones, como diarrea, infecciones del tracto urinario, sepsis y meningitis neonatal. Bajo este contexto surge la necesidad de conocer la inclusión de la caracterización de los genotipos de virulencia y el análisis filogenético que son importantes para generar una imagen completa de los orígenes y la propagación de los factores de virulencia dentro de la población de cepas NMEC. Las pruebas de sensibilidad determinaron la susceptibilidad de las cepas de NMEC frente a los medicamentos antimicrobianos, a partir de la exposición de una concentración estandarizada diferentes fármacos, los resultados obtenidos con un fármaco permitieron deducir que antibióticos puede ayudar para un tratamiento, así como también, las BLEE son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación. La identificación de este tipo de enzima es muy importante porque impone un “plan de acción” para el control de las infecciones que pudieran producirse. Por lo que se hace necesario diferenciar entre la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y otros mecanismos de resistencia para evitar el tratamiento inadecuado de infecciones causadas por este tipo de cepas.

Los conocimientos adquiridos durante la carrera se pusieron en práctica en reconocer el tipo de bacteria que se estaba estudiando, así como también analizar la importancia de la resistencia a antibióticos y los daños perjudiciales a la salud, tal y como lo sugiere el módulo “Procesos celulares fundamentales”.

Además, se integraron nuevos aprendizajes como técnicas de extracción de DNA, PCR múltiple, Susceptibilidad antibiótica por el método difusión de discos, preparación de medios de cultivo y correctas prácticas dentro del laboratorio, bioseguridad personal y eliminación correcta de desechos tipo (RPBI) Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos y (CRETI) corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico, inflamable. Lo anterior, fue fundamental para fortalecer las habilidades y conocimientos relacionados con mi profesión. Igualmente, representa uno de los pilares en la enseñanza-aprendizaje de la UAM-X que tienen como objetivo formar profesionales creativos y críticos capaces de realizar

actividad científica para desarrollar y evaluar, con una perspectiva multidisciplinaria, estrategias de manejo de los recursos naturales bióticos con base en metodologías propias de las Ciencias Biológicas (UAM, 2020).



### 13. Referencias

- Bingen-Bidois, M., Clermont, O., Bonacorsi, S., Terki, M., Brahim, N., Loukil, C., Barraud, D., Bingen, E., 2002. Análisis Tabla filogenético y prevalencia de cepas de urosepsis de *Escherichia coli* con dominios similares a islas de patogenicidad. *Infectar. immune* 70, 3216–3226
- Bingen, E., Picard, B., Brahim, N., Mathy, S., Desjardins, P., Elion, J., Denamur, E., 1998. Análisis filogenético de *Escherichia coli* cepas que causan meningitis neonatal sugiere la transferencia horizontal de genes de un grupo predominante de cepas del grupo B2 altamente virulentas. *J. infectar. Dis.* 177
- Bonacorsi, S., Clermont, O., Houdouin, V., Cordevant, C., Brahim, N., Marecat, A., Tinsley, C., Nassif, X., Lange, M., Bingen, E., 2003. Análisis molecular y virulencia experimental de francés y norteamericano *Escherichia coli* aislados de meningitis neonatal; identificación de un nuevo clon virulento. *J. infectar. Dis.* 187, 1895–1906.
- Bonacorsi, S & Bingen, E., 2005, Epidemiología molecular de *Escherichia coli* causando meningitis neonatal.
- Cercenado, E. & Cantón, R. 2010. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. *Procedimientos en microbiología clínica* (pp 1-67). SEIMC.
- Corex, M. and Brett, B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 26-38.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2019. Caracterización de un marcador molecular anónimo fuertemente ligado a *Escherichia coli* cepas que causan meningitis neonatal. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1770–1772.
- Dhillon R, Clark J. 2012. ESBLs: A Clear and Present Danger *Crit Care Res Pract.* 2012; doi:625170.
- Di Conza, J. A., Power, P., & Gutkind, G. O. 2013. Intercambio de mecanismos de resistencia entre bacterias gram negativas.
- Desjardins, P., Picard, B., Kaltenbock, B., Elion, J., Denamur, E., 1995. *Sexo en Escherichia coli* no interrumpe la estructura clonal de la población: evidencia de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. *J. Mol. Evol.* 41, 440–448
- Flannery DD, Akinboyo IC, Mukhopadhyay S, Tribble AC, Song L, Chen F, Li Y, Gerber JS, Puopolo KM. Antibiotic Susceptibility of *Escherichia coli* Among Infants Admitted to Neonatal Intensive doi: 10.1001
- García, L., Rodrigo, J., Sánchez, P., Ramos, S., & Suarez, C. 2004. Extracción de ADN con

resina Chelex en el análisis de la amplificación oncogénica. *Acta Otorrinolaringológica Española*, 55(3), 139-144.

- Gustin DJ, Sehon CA, Wei J, Cai H, Meduna SP, Khatuya H, Sun S, Gu Y, Jiang W, Thurmond RL, Karlsson L, Edwards JP. 2005. Descubrimiento y estudios SAR de una nueva serie de inhibidores de la cathepsina S no covalentes. 15 (6): 1687-91. doi: 10.1016/j.bmcl.2005.01.045. PMID: 15745822.
- Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG). 2018. Cuenta Pública. México.
- Hernández E. 2010. *Escherichia coli* productores de BLEE aislados de urocultivo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria. Tesis de doctorado. Madrid: Universidad Complutense de Madrid- 172p.
- Johnson, J. & Stell, A. 2000. Genotipos de virulencia extendida de *Escherichia coli* cepas de pacientes con urosepsis en relación con la filogenia y el compromiso del huésped. *J Infecciones Dis*; 181: 261–72.
- Johnson, JR, Delavari, P., O'Bryan, TT, 2001. *Escherichia coli* Los aislamientos de O18:K1:H7 de pacientes con cistitis aguda y meningitis neonatal exhiben orígenes filogenéticos y perfiles de factores de virulencia comunes. *J. infectar. Dis.* 183, 425–434.
- Lecointre, G., Rachdi, L., Darlu, P., Denamur, E., 1998. *Escherichia coli* filogenia molecular utilizando la prueba de diferencia de longitud de incongruencia. *mol. Biol. Evol.* 15, 1685–1695. Martindale, J., Stroud, D., Moxon, ER, Tang, CM, 2000.
- Lezameta L, Gonzáles-Escalante E, Tamariz JH. 2019. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. *Rev Perú Med Exp Salud Publica.* 2010; 27(3):345–51.
- Liu Y, Zhu M, Fu X, Cai J, Chen S, Lin Y, Jiang N, Chen S, Lin Z. *Escherichia coli* Causing Neonatal Meningitis During 2001-2020: A Study in Eastern China. *Int J Gen Med.* 2021 Jun 29;14:3007-3016. doi: 10.2147.
- Maslow, JN, Whittam, TS, Gilks, CF, Wilson, RA, Mulligan, ME, Adams, KS, Arbeit, RD, 1995. Relaciones clonales entre aislamientos del torrente sanguíneo de *Escherichia coli*. *Infectar. inmune* 63, 2409–2417
- Negre, V, Bonacorsi, S., Schubert, S., Bidé, P., Nassif, X., Bingen, E., 2004. El receptor de sideróforo IroN, pero no la isla de alta patogenicidad o el receptor de hemina ChuA, contribuye al paso bacteriémico de *Escherichia coli* meningitis neonatal. *Infectar. inmune* 72, 1216–1220.
- Ochman, H., Selander, RK, 1984. Cepas estándar de referencia de *Escherichia coli* de las poblaciones naturales. *J. Bacteriol.* 157, 690–693.

- Peleg, A. 2010 Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *The New England Journal of Medicine*, Volume 362:1804-1813, May 13 2010
- Picard, B., Journet-Mancy, C., Picard-Pasquier, N., Goullet, P., 1993. Estructuras genéticas de la B2 y B1 *Escherichia coli* cepas responsables de infecciones extraintestinales. *J. Gen. Microbiol.* 139, 3079–3088.
- “Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca). [www.bancoadn.org](http://www.bancoadn.org)”
- Ruiz-Blázquez, J., Vargas, M., Nataro, J., Vila, J., & Brustenga, J. 2005. Validación de la técnica de PCR para la detección de *Escherichia coli*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 23(8), 479-481.
- Sánchez M, Bello H, Domínguez M, Mella S, Zemelman R, González G. Transferencia de de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido desde cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* a otras especies de enterobacterias. *Rev Méd Chile.* 2006; 134(S4):415-420.
- Sánchez-Gómez, J. E., Avellan-Lara, L. F., Veloz-Estrada, L. S., & Plusas-Alvario, A. E. 2021. Meningitis bacteriana cuadro clínico, causas, complicaciones y tratamiento. *Domino de las Ciencias*, 7(6), 1386-1405.
- Seral C, Gude MJ, Castillo FJ. 2012. Emergencia de  $\beta$ -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Rev Esp Quimioter.*
- Selander, RK, Caugant, DA, Whittam, TS, 1987. Genética estructura y variación en las poblaciones naturales de *Escherichia coli*. En: Neidhardt, FC, Ingraham, JL, Low, KB, Magasanik, G., Schaechter, M., Umberger, HE (Eds.), *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*: Biología Celular y Molecular. Sociedad Estadounidense de Microbiología, Washington, DC, págs. 1625–1648.
- Stoll, BJ, 1997. El impacto global de la infección neonatal. *clin. perinatol.* 24, 1–21.
- Tafur J, Mills PJ. Terapia de luz de baja intensidad: explorando el papel de los mecanismos redox. *Cirugía Láser Photomed.* 2008 agosto; 26 (4): 323-8. doi: 10.1089/pho.2007.2184. PMID: 18665762; PMCID: PMC2996814.
- Truppia, L. A., Mollerach, A., Di Conza, J. A., Radice, M., Mugna, V., Méndez, E., & Gutkind, G. O. 2005. Comparación de tres métodos microbiológicos para la detección de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas en Santa Fe (Argentina). *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 23(9), 525-528.
- Wijetunge, D. S. S., Gongati, S., DebRoy, C., Kim, K. S., Couraud, P. O., Romero, I. A., & Kariyawasam, S. 2015. Characterizing the pathotype of neonatal meningitis causing *Escherichia coli* (NMEC). *BMC microbiology*, 15(1), 1-15.
- Zhu M., Hu Q., Mai J. 2015. Análisis de bacterias patógenas y farmacorresistencia en la meningitis purulenta neonatal. *Chin J Pediatra.* 53 :51–56

14. Anexos

**Tabla 5.** Porcentaje de resultados para la prueba de susceptibilidad antibiótica ante 17 antibióticos pertenecientes a 10 categorías y porcentaje del estatus de resistencia.

|                           |                   | Susceptibilidad antibiótica                                    |      |   |      |   |      |   |      |   |      |   |      |   |      |  |      |   |      |  |      |  |      |   |      |   |      |   |      | Estatus de resistencia  |         |   |              |       |
|---------------------------|-------------------|--|------|---|------|---|------|---|------|---|------|---|------|---|------|--|------|---|------|--|------|--|------|---|------|---|------|---|------|---|---------|---|--------------|-------|
|                           |                   | Penicilinas  |      | Beta-lactámico combinados                                       |      |   |      | Cefalosporinas  |      |   |      |   |      | Monobactam  |      | Carbapenems  |      |   |      | Aminoglucosidos  |      | Tetraciclinas  |      | Fluoroquinolonas  |      |   |      |   |      |   | Folatos |   | Nitrofuranos |       |
| Homoclave                 |                   | AM<br><i>S</i> ≥ 17 mm<br><i>I</i> 14-16 mm<br><i>R</i> ≤ 13mm |      | AmC<br><i>S</i> ≥ 18 mm<br><i>I</i> 14-17 mm<br><i>R</i> ≤ 13mm |      | TZP<br><i>S</i> ≥ 21 mm<br><i>I</i> 18-20 mm<br><i>R</i> ≤ 17mm |      | CTX<br><i>S</i> ≥ 26 mm<br><i>I</i> 23-25 mm<br><i>R</i> ≤ 22mm |      | CFP<br><i>S</i> ≥ 21 mm<br><i>I</i> 16-20 mm<br><i>R</i> ≤ 15mm |      | CAZ<br><i>S</i> ≥ 21 mm<br><i>I</i> 18-20 mm<br><i>R</i> ≤ 17mm |      | ATM<br><i>S</i> ≥ 21 mm<br><i>I</i> 18-20 mm<br><i>R</i> ≤ 17mm |      | IPM<br><i>S</i> ≥ 23 mm<br><i>I</i> 20-22 mm<br><i>R</i> ≤ 19 mm |      | MEM<br><i>S</i> ≥ 23 mm<br><i>I</i> 20-22 mm<br><i>R</i> ≤ 19mm |      | GM<br><i>S</i> ≥ 15 mm<br><i>I</i> 13-14 mm<br><i>R</i> ≤ 12mm |      | TE<br><i>S</i> ≥ 15 mm<br><i>I</i> 12-14 mm<br><i>R</i> ≤ 11mm |      | OFX<br><i>S</i> ≥ 16 mm<br><i>I</i> 13-15 mm<br><i>R</i> ≤ 19mm |      | LVX<br><i>S</i> ≥ 21 mm<br><i>I</i> 17-20 mm<br><i>R</i> ≤ 20mm |      | NOR<br><i>S</i> ≥ 17 mm<br><i>I</i> 13-16 mm<br><i>R</i> ≤ 12mm |      | SXT<br><i>S</i> ≥ 16 mm<br><i>I</i> 11-15 mm<br><i>R</i> ≤ 10mm |         | F/M<br><i>S</i> ≥ 17 mm<br><i>I</i> 15-16 mm<br><i>R</i> ≤ 14mm |              |       |
|                           |                   | mm   | CLSI | mm  | CLSI | mm  | CLSI | mm  | CLSI | mm  | CLSI | mm  | CLSI | mm  | CLSI | mm   | CLSI | mm  | CLSI | mm   | CLSI | mm   | CLSI | mm  | CLSI | mm  | CLSI | mm  | CLSI | mm  | CLSI    |   |              |       |
| <i>E. coli</i> 25922      |                   | 20   | S    | 22  | S    | 25  | S    | 30  | S    | 32  | S    | 30  | S    | 30  | S    | 29   | S    | 31  | S    | 25   | S    | 25   | S    | 29  | S    | 33  | S    | 28  | S    | 23  | S       | 20  | S            | S     |
| <i>K.pneumonie</i> 700603 |                   | 0  | R    | 16-18   | I    | 17  | R    | 20  | R    | 14  | R    | 11  | R    | 10  | R    | 25   | S    | 25  | S    | 11   | R    | 22   | S    | 25  | S    | 29  | S    | 28  | S    | 24  | S       | 14  | R            | MDR-6 |
| 1                         | 428 LCR2-030811   | 23   | S    | 26  | S    | 27  | S    | 33  | S    | 34  | S    | 27  | S    | 31  | S    | 27   | S    | 21  | I    | 21   | S    | 0  | R    | 24  | S    | 30  | S    | 31  | S    | 0   | R       | 19  | S            | MDR-3 |
| 2                         | 438 LCR2 – 040811 | 9  | R    | 18  | S    | 16  | R    | 20  | S    | 24  | S    | 22  | S    | 22  | S    | 28   | S    | 25  | S    | 16   | S    | 24   | S    | 0   | R    | 0   | R    | 0   | R    | 16  | S       | 14  | R            | MDR-4 |
| 3                         | 444 LCR1 – 080911 | 0  | R    | 15  | I    | 9   | R    | 0   | R    | 0   | R    | 0   | R    | 0   | R    | 27   | S    | 24  | S    | 0  | R    | 0  | R    | 0   | R    | 0   | R    | 19  | S    | 17  | S       | MDR-7   |              |       |
| 4                         | 444 LCR2 – 080911 | 0  | R    | 12  | R    | 10  | R    | 0   | R    | 0   | R    | 0   | R    | 0   | R    | 23   | S    | 23  | S    | 0  | R    | 0  | R    | 0   | R    | 0   | R    | 18  | S    | 17  | S       | MDR-7   |              |       |
| 5                         | 456 LCR - 100811  | 0  | R    | 14  | I    | 10  | R    | 17  | R    | 20  | I    | 20  | I    | 22  | S    | 24   | S    | 26  | S    | 0  | R    | 0  | R    | 0   | R    | 0   | R    | 23  | S    | 15  | I       | MDR-7   |              |       |
| 6                         | 456 LCR1 – 100811 | 0  | R    | 13  | R    | 13  | R    | 0   | R    | 0   | R    | 0   | R    | 0   | R    | 27   | S    | 25  | S    | 0  | R    | 0  | R    | 0   | R    | 0   | R    | 16  | S    | 15  | I       | XDR-8   |              |       |
| 7                         | 456 LCR2 – 100811 | 16   | I    | 20  | S    | 22  | R    | 29  | S    | 27  | S    | 29  | S    | 30  | S    | 29   | S    | 28  | S    | 17   | S    | 25   | R    | 0   | R    | 0   | R    | 27  | S    | 17  | S       | MDR-4   |              |       |
| 8                         | 466 LCR1 – 150811 | 23   | S    | 25  | S    | 27  | S    | 33  | S    | 30  | S    | 28  | S    | 30  | S    | 29   | S    | 26  | S    | 19   | S    | 26   | S    | 33  | S    | 36  | S    | 36  | S    | 28  | S       | 20  | S            | S     |
| 9                         | 466 LCR2 – 150811 | 9  | R    | 20  | S    | 16  | R    | 23  | I    | 25  | S    | 24  | S    | 20  | I    | 25   | S    | 26  | S    | 14   | I    | 22   | S    | 0   | R    | 0   | R    | 17  | S    | 16  | I       | MDR-7   |              |       |
| 10                        | 467 LCR1 – 100811 | 0  | R    | 15  | I    | 14  | R    | 0   | R    | 0   | R    | 0   | R    | 0   | R    | 27   | S    | 27  | S    | 0  | R    | 0  | R    | 0   | R    | 0   | R    | 24  | S    | 18  | S       | MDR-7   |              |       |
| 11                        | 467 LCR1 – 150811 | 0  | R    | 26  | S    | 10  | R    | 22  | R    | 26  | S    | 24  | S    | 25  | S    | 28   | S    | 28  | S    | 28   | S    | 25   | S    | 0   | R    | 0   | R    | 28  | S    | 18  | S       | MDR-4   |              |       |

|    |                  |    |   |    |   |    |   |    |   |    |   |    |   |    |   |    |   |    |   |    |   |    |   |    |   |    |   |    |   |    |   |       |   |       |
|----|------------------|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|-------|---|-------|
| 12 | 508LCR2 – 250811 | 0  | R | 18 | S | 18 | I | 27 | S | 25 | S | 26 | S | 30 | S | 32 | S | 35 | S | 22 | S | 27 | S | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 25 | S | 23    | S | MDR-3 |
| 13 | 983LCR1 – 041211 | 0  | R | 13 | R | 14 | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 25 | S | 16 | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 24 | S | 17 | S | XDR-8 |   |       |
| 14 | 983LCR2 – 041211 | 23 | S | 23 | S | 27 | S | 32 | S | 31 | S | 30 | S | 32 | S | 30 | S | 32 | S | 17 | S | 25 | S | 32 | S | 33 | S | 31 | S | 20 | S | 18    | S | S     |
| 15 | 75LCR – 060812   | 15 | I | 19 | S | 19 | I | 23 | I | 22 | S | 22 | S | 25 | S | 28 | S | 30 | S | 26 | S | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 18    | S | MDR-6 |
| 16 | 116LCR – 050112  | 0  | R | 17 | I | 14 | R | 20 | R | 8  | R | 18 | I | 10 | R | 22 | S | 24 | S | 0  | R | 0  | R | 23 | S | 25 | S | 24 | S | 0  | R | 18    | S | MDR-7 |
| 17 | 135LCR – 100112  | 0  | R | 20 | S | 14 | R | 19 | R | 11 | R | 15 | R | 15 | R | 26 | S | 28 | S | 0  | R | 0  | R | 26 | S | 28 | S | 28 | S | 0  | R | 20    | S | MDR-7 |
| 18 | 480LCR – 030412  | 0  | R | 16 | I | 13 | R | 0  | R | 0  | R | 14 | R | 13 | R | 28 | S | 30 | S | 0  | R | 11 | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 22 | S | 18    | S | MDR-7 |
| 19 | 588LCR1 – 300412 | 0  | R | 22 | S | 20 | I | 29 | S | 19 | I | 29 | S | 27 | S | 27 | S | 31 | S | 24 | S | 0  | R | 28 | S | 26 | S | 25 | S | 0  | R | 18    | S | MDR-5 |
| 20 | 588LCR2 – 300412 | 0  | R | 19 | S | 23 | S | 33 | S | 18 | I | 32 | S | 32 | S | 30 | S | 30 | S | 20 | S | 0  | R | 28 | S | 31 | S | 30 | S | 0  | R | 22    | S | MDR-4 |
| 21 | 571LCR1 – 250412 | 18 | S | 21 | S | 22 | S | 28 | S | 28 | S | 26 | S | 27 | S | 29 | S | 29 | S | 21 | S | 23 | S | 29 | S | 27 | S | 30 | S | 26 | S | 19    | S | S     |
| 22 | 571LCR2 – 250412 | 0  | R | 21 | S | 23 | S | 31 | S | 16 | I | 30 | S | 29 | S | 30 | S | 31 | S | 25 | S | 0  | R | 30 | S | 30 | S | 27 | S | 0  | R | 20    | S | MDR-4 |
| 23 | 861LCR – 040712  | 0  | R | 15 | I | 13 | R | 21 | R | 23 | S | 25 | S | 26 | S | 28 | S | 31 | S | 0  | R | 24 | S | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 25 | S | 18    | S | MDR-5 |
| 24 | 894LCR – 120712  | 0  | R | 16 | I | 13 | R | 0  | R | 0  | R | 14 | R | 0  | R | 25 | S | 27 | S | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 19    | S | XDR-8 |
| 25 | 900LCR – 120712  | 0  | R | 19 | S | 17 | R | 19 | R | 0  | R | 20 | I | 11 | R | 27 | S | 30 | S | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 20    | S | XDR-8 |
| 26 | 908LCR – 130712  | 0  | R | 19 | S | 15 | R | 0  | R | 0  | R | 14 | R | 0  | R | 24 | S | 24 | S | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 8  | R | 0  | R | 0  | R | 19    | S | XDR-8 |
| 27 | 911LCR – 130712  | 16 | I | 19 | S | 22 | S | 25 | I | 28 | S | 27 | S | 26 | S | 31 | S | 25 | S | 19 | S | 26 | S | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 28 | S | 17    | S | MDR-3 |
| 28 | 930LCR – 190712  | 0  | R | 13 | R | 9  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 25 | S | 25 | S | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 17    | S | XDR-8 |
| 29 | 949LCR – 190712  | 0  | R | 17 | I | 13 | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 26 | S | 25 | S | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 28 | S | 18    | S | MDR-7 |
| 30 | 957LCR – 190712  | 0  | R | 13 | R | 9  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 25 | S | 25 | S | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 23    | S | XDR-8 |
| 31 | 47LCR – 180614   | 0  | R | 19 | S | 23 | S | 12 | R | 0  | R | 14 | R | 13 | R | 28 | S | 30 | S | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 19    | S | MDR-7 |
| 32 | 318LCR – 280814  | 0  | R | 20 | S | 23 | S | 27 | S | 23 | S | 26 | S | 28 | S | 29 | S | 29 | S | 0  | R | 0  | R | 28 | S | 30 | S | 28 | S | 0  | R | 20    | S | MDR-4 |
| 33 | 350LCR – 040914  | 16 | I | 18 | S | 21 | S | 24 | I | 26 | S | 23 | S | 27 | S | 25 | S | 27 | S | 19 | S | 0  | R | 18 | S | 21 | S | 24 | S | 0  | R | 16    | I | MDR-5 |
| 34 | 420LCR – 140114  | 19 | S | 18 | S | 22 | S | 27 | S | 28 | S | 25 | S | 26 | S | 24 | S | 25 | S | 16 | S | 22 | S | 32 | S | 34 | S | 33 | S | 26 | S | 19    | S | S     |
| 35 | 439LCR –         | 11 | R | 21 | S | 18 | I | 23 | I | 26 | S | 23 | S | 22 | S | 29 | S | 28 | S | 27 | S | 24 | S | 0  | R | 0  | R | 0  | R | 21 | S | 18    | S | MDR-4 |



