

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS

**CARACTERIZACION FENOTIPICA Y MOLECULAR DE CEPAS
Escherichia coli β -LACTAMASAS Y COLISTINA PROVENIENTES DE
MUESTRAS NOSOCOMIALES DE LIMA Y CALLAO**

PRESENTADO POR:

Br. ENRIQUE ALBERTO CANAL ESQUIVEL

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO**

ASESORA:

Dra. MARÍA ANTONIETA QUISPE RICALDE

CO-ASESORA:

Mg Sc. NILDA DORIS GADEA CASTILLO

**CUSCO – PERÚ
2025**



Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

INFORME DE SIMILITUD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-321-2025-UNSAAC)

El que suscribe, el **Asesor** María Antonieta Quispe Ricalde
..... quien aplica el software de detección de similitud al
trabajo de investigación/tesis titulada: CARACTERIZACION FENOTIPICA Y MOLECULAR DE CEPAS
Escherichia coli β -LACTAMASAS Y COLISTINA PROVENIENTES DE MUESTRAS NOSOCOMIALES
DE LIMA Y CALLAO

Presentado por: ENRIQUE ALBERTO CANAL ESQUIVEL DNI N° 23863351;
presentado por: DNI N°:
Para optar el título Profesional/Grado Académico de BIOLOGO

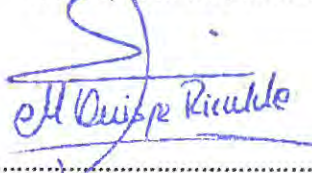
Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 4 veces, mediante el
Software de Similitud, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso del Sistema Detección de**
Similitud en la UNSAAC y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 8 %.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No sobrepasa el porcentaje aceptado de similitud.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las subsanaciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, conforme al reglamento, quien a su vez eleva el informe al Vicerrectorado de Investigación para que tome las acciones correspondientes; Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de Asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto**
las primeras páginas del reporte del Sistema de Detección de Similitud.

Cusco, 17 de DICIEMBRE de 2025

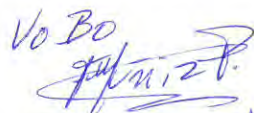


Firma

Post firma María Antonieta Quispe Ricalde

Nro. de DNI 23932572

ORCID del Asesor 0000-0001-6349-1095


Vo Bo
Directora de la Unidad
de Investigación de C.B.

Se adjunta:

- Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
- Enlace del Reporte Generado por el Sistema de Detección de Similitud: oid: 27259:541726042

Enrique Alberto Canal Esquivel

Caracterización fenotípica y molecular de cepas E. coli.pdf

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:541726042

Fecha de entrega

17 dic 2025, 6:36 p.m. GMT-5

Fecha de descarga

17 dic 2025, 7:05 p.m. GMT-5

Nombre del archivo

Caracterización fenotípica y molecular de cepas E. coli.pdf

Tamaño del archivo

9.0 MB

194 páginas

36.176 palabras

191.335 caracteres

8% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 11 palabras)

Fuentes principales

- 6%  Fuentes de Internet
- 2%  Publicaciones
- 5%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
44 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

DEDICATORIA

A Dios, por darme la fuerza y sabiduría.

A mis padres Dora y David, por su amor y apoyo constantes.

A mi esposa, Sandra, por su comprensión y fe inquebrantables.

A mis hijos, Bryan y Viviana, por su alegría y motivación diaria.

A mis asesoras de tesis, la Dra. María A. Quispe Ricalde y la MSc. Nilda Gadea Castillo, por su inestimable guía y apoyo.

Al personal del laboratorio de bacteriología del NAMRU-SOUTH, por sus valiosos consejos.

AGRADECIMIENTOS

Primero, quiero agradecer a Dios por haberme dado la fuerza, sabiduría y salud necesarias para llevar a cabo este proyecto.

A mis padres, Dora y David, les agradezco de todo corazón por su amor incondicional, su paciencia infinita y apoyo constante. Ustedes me han brindado los valores y la inspiración necesarios para alcanzar este logro

A mi esposa Sandra, mi más sincero agradecimiento por tu amor incondicional, tu paciencia incansable y tu apoyo inquebrantable. No tengo palabras para expresar cuan vital ha sido tu presencia en este viaje. Tu confianza en mí ha sido una fuente de fortaleza.

A mis hijos Bryan y Viviana, gracias por su comprensión, su apoyo y por ser una fuente constante de alegría y motivación en mi vida. Su amor y energía han iluminado mis días y me han dado el impulso necesario para seguir adelante

Todos ustedes han sido los pilares sobre los cuales se sostiene este logro. Su apoyo ha sido fundamental para la culminación exitosa de este trabajo, y este logro es tanto suyo como mío.

Con profunda estima y reconocimiento extiendo mi más sincero agradecimiento a mis asesoras de tesis, la Dra. María A. Quispe Ricalde y MSc. Nilda Gadea Castillo por su constante guía y apoyo. Sus valiosos conocimientos y dedicación han sido cruciales en la realización de este trabajo de investigación.

También agradezco al NAMRU-SOUTH y a sus jefes por permitir el uso de los datos empleados en el presente trabajo. Su colaboración ha sido fundamental para contribuir al avance de la ciencia.

A mi hermana Carmen Rosa, por su inquebrantable y constante apoyo.

Finalmente, quiero expresar mi agradecimiento a las Biólogas Manuela M. Bernal Castro y Rina A. Meza Chávez por sus valiosos consejos. Su apoyo ha sido esencial para la culminación exitosa de este trabajo.

INDICE GENERAL

RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN.....	II
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	IV
JUSTIFICACIÓN.....	VII
OBJETIVO GENERAL.....	IX
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	IX
HIPÓTESIS.....	X
CAPÍTULO I:	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. ANTECEDENTES DEL TEMA DE ESTUDIO	1
1.1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES	1
1.1.2. ANTECEDENTES NACIONALES	3
1.2. BASES TEÓRICAS.....	5
1.2.1. <i>Escherichia coli</i> : GENES DE VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD.	5
1.2.2. β -LACTAMASAS.	7
CAPÍTULO II.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.	13
2.2. MATERIALES DE LABORATORIO	14
2.2.1. MATERIAL DE VIDRIO	14
2.2.2. MATERIAL DE PLASTICO.....	14
2.3. REACTIVOS	14
2.4. MEDIOS DE CULTIVO	15
2.5. PROGRAMAS INFORMÁTICOS	15
2.6. EQUIPOS.....	15
2.7. OTROS MATERIALES	16
2.7. MÉTODOS	18
2.7.1. LUGAR DE EJECUCION	18
2.7.2. TIPO DE ESTUDIO.	18

2.7.3. MUESTREO	18
2.7.4. REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS CRIOCONSERVADAS	21
2.7.5. IDENTIFICACIÓN PROTEINICA DE LAS MUESTRAS.....	22
2.7.5.1. IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.	22
2.7.6. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	25
2.7.6.1. SUSCEPTIBILIDAD EN PLACA	25
2.7.6.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO	25
2.7.6.3. INOCULACIÓN DE LA PLACA	26
2.7.6.4. APLICACIÓN DE LOS DISCOS ANTIMICROBIANOS.....	26
2.7.6.5. INCUBACIÓN.....	29
2.7.6.6. LECTURA DE LA ZONA DE INHIBICIÓN	29
2.7.6.7. INTERPRETACIÓN	29
2.7.6.8. CONTROL DE CALIDAD	35
2.7.7. PROTOCOLO DE MICRODILUCIÓN EN PLACA.....	35
2.7.7.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO	36
2.7.7.2. INOCULACIÓN DE LA PLACA	36
2.7.7.3. INCUBACIÓN.....	36
2.7.7.4. LECTURA DE LOS RESULTADOS	37
2.7.7.5. INTERPRETACIÓN	37
2.7.7.6. CONTROL DE CALIDAD	37
2.8. ANÁLISIS DEL MATERIAL GENÉTICO	38
2.8.1. EXTRACCIÓN DE ADN DE <i>E. coli</i>	38
2.8.2. CUANTIFICACIÓN DEL ADN.	39
2.8.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA MÚLTIPLE	39
2.8.4. PROTOCOLOS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y CICLAJES	39

2.8.5. AMPLIFICACIÓN DE GENES DE <i>E. coli</i> ENTEROTOXIGÉNICA, PATOGENICA Y DIFUSAMENTE ADHERENTE (MULTI – 1).....	40
2.8.6. CICLAJE PARA MULTI - 1:	41
2.8.7. AMPLIFICACIÓN DE GENES DE <i>E. coli</i> ENTEROINVASIVA, ENTEROAGREGATIVA Y SHIGA-TOXINA (MULTI – 2):	43
2.8.8. CICLAJE PARA MULTI-2:	45
2.8.9. AMPLIFICACIÓN DE GENES RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS Y AL GEN DE RESISTENCIA A LA COLISTINA <i>mcr-1</i> :	46
2.8.10. CICLAJES PARA GENES CARBAPENÉMICOS Y EL GEN <i>mcr-1</i>	48
2.8.11. AMPLIFICACIÓN DE GENES RESISTENTES A LOS β -LACTÁMICOS.....	50
2.8.12. CICLAJE PARA β -LACTÁMICOS:.....	52
2.8.13. CORRELACIÓN DE CEBADORES, PATOTIPOS Y GENES EN <i>E. coli</i> DIARREAGÉNICA	53
2.9. DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN.....	54
2.9.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	54
2.9.1.1. PREPARACIÓN DEL GEL	54
2.9.1.2. CARGADO DE LAS MUESTRAS.....	55
2.9.1.3. ELECTROFORESIS.....	55
2.9.1.4. FOTODOCUMENTACION DE LOS RESULTADOS	56
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
3.1. REIDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Escherichia coli</i>	58
3.2. ORIGEN DEMOGRÁFICO Y CLÍNICO DE LAS CEPAS DE <i>Escherichia coli</i>	59
3.3. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN PLACA	61
3.4. ANALISIS DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA CON LA TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN EN PLACA.	67
3.5. ANÁLISIS DE LA AMPLIFICACIÓN DE GENES	69
3.6. DISCUSIÓN	90

CONCLUSIONES 94
SUGERENCIAS 97
BIBLIOGRAFÍA 98
ANEXOS 104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Categorización empleada en la determinación de la especie.....	24
Tabla 2. Agentes antimicrobianos usados en la placa de antibiograma N°1.	27
Tabla 3. Agentes antimicrobianos usados en la placa de antibiograma N°2	28
Tabla 4. Puntos de corte usados en la calificación	32
Tabla 5. Mezcla de reacción para la PCR MULTI-1, para los patotipos de <i>E. coli</i> enterotoxigénica, enteropatogénica y difusamente adherente.	41
Tabla 6. Ciclaje de amplificación de MULTI-1	43
Tabla 7. Mezcla de reacción para la PCR para los patotipos de <i>E. coli</i> enteroinvasiva, enteroagregativa y enterohemorrágica (MULTI-2).....	44
Tabla 8. Ciclaje de amplificación de MULTI-2	46
Tabla 9. Mezcla de reacción para PCR amplificar genes resistentes a Carbapenémicos y al gen de resistencia a la colistina mcr-1.	47
Tabla 10. Ciclaje de amplificación para genes Carbapenémicos y el gen de la colistina mcr-1.	49
Tabla 11. Mezcla de reacción para PCR de β -Lactamasa grupo A	51
Tabla 12. Ciclaje de amplificación para β -lactámicos grupo A	53
Tabla 13. Genes de <i>E. coli</i> diarreagénicos relacionados con el patotipo:.....	53
Tabla 14. Procedencia hospitalaria y tipo de muestra del cual se aisló las cepas de <i>E. coli</i>	61
Tabla 15. Frecuencia de las cepas de <i>E. coli</i> no susceptibles (R e I) a diferentes clases de antibióticos según criterios del CLSI.	67
Tabla 16. Presencia del gen mcr-1 de resistencia a la colistina.	68
Tabla 17. Distribución de genes por tipo de muestra en cepas de <i>E. coli</i> provenientes del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).	71

Tabla 18. Distribución de genes por tipo de muestra en cepas de <i>E. coli</i> provenientes de la Fuerza Aérea del Perú (FAP).....	73
Tabla 19. Distribución de genes por tipo de muestra en cepas de <i>E. coli</i> provenientes de Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins (HNERM).....	74
Tabla 20. Distribución de genes por tipo de muestra en cepas de <i>E. coli</i> provenientes de Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión (HNDAC).	75
Tabla 21. Distribución de genes por tipo de muestra en cepas de <i>E. coli</i> provenientes del Centro Médico Naval (CEMENA).	76
Tabla 22. Distribución de la simultaneidad de genes hallados por tipo de aislamiento y hospital	77
Tabla 23. Presencia de genes diarreagénicos y genes de resistencia antimicrobiana.	84
Tabla 24. Distribución del genotipo de <i>E. coli</i> simples y combinados relacionados a la resistencia hallados en el presente estudio.	87
Tabla 25. Muestras positivas al gen <i>daaD</i> de la <i>E. coli</i> difusamente adherente.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros.....	8
Figura 2. Clasificación Molecular de Ambler.	11
Figura 3. Flujograma de trabajo.	20
Figura 4. Identificación bacteriana mediante Maldi-ToF MS.	24
Figura 5. Disposición de la placa de antibiograma 1.....	27
Figura 6. Disposición de la placa de antibiograma 2.....	28
Figura 7. Lectura e interpretación de halos, expresado en milímetros (mm).	30
Figura 8. Diámetros críticos de tamizaje para la detección de BLEE para la familia Enterobacteriaceae.....	31
Figura 9. Prueba de sinergia de doble disco	35
Figura 10. Microdilución en placa.....	38
Figura 11. Disposición del cargado en el gel de agarosa	56
Figura 12. Procedencia hospitalaria de las cepas de <i>E. coli</i> en relación con el sexo.	59
Figura 13. Resistencia a los combinados β -lactámicos.	62
Figura 14. Resistencia a las Cefalosporinas.	63
Figura 15. Resistencia a los Monobactámico y Carbapenémicos.	64
Figura 16. Resistencia a las Tetraciclinas.....	64
Figura 17. Resistencia a los aminoglucósidos.....	65
Figura 18. Resistencia a las Quinolonas y Antagonista del Folato.	66
Figura 19. Presencia de genes β -lactámicos de la Clase A, según la clasificación de Ambler, en muestras de <i>E. coli</i> en estudio.....	85
Figura 20. Presencia de genes β -lactámicos de la Clase B, según la clasificación de Ambler, en muestras de <i>E. coli</i> en estudio.....	86

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Convenio cooperativo de investigación y desarrollo (Cooperative Research and Development Agreement -CRADA).	104
Anexo 2. Resultado de la evaluación a aspectos bioéticos y metodológicos por parte del Comité de Bioética Institucional en Investigación de la UNSAAC.....	112
Anexo 3. Secuencias de Oligonucleótidos que se usó en el estudio.	114
Anexo 4. Genes Betalactámicos de la clase molecular A detectados y amplificados por cebadores usados en este estudio, comparados con secuencias disponibles en el GenBank.	115
Anexo 5. Genes Betalactámicos de la clase molecular B detectados y amplificados por cebadores usados en este estudio, comparados con secuencias disponibles en el GenBank.	117
Anexo 6. Información General por muestra y resultado de cultivo y MALDI – ToF.	119
Anexo 7. Hojas de resultados obtenidos del MALDI ToF.....	124
Anexo 8.	140
Anexo 9. Lecturas del antibiograma expresada en milímetros (mm) para 100 cepas analizadas, además del resultado de BLEE.LFP=Lactosa fermentadora positiva, LFN=Lactosa fermentadora negativa, BLEE= Betalactamasa de espectro extendido.	142
Anexo 10.	147
Anexo 11. Resultados de los geles de agarosa.	148
Gel 1. Amplificación de genes resistentes en <i>E. coli</i> a los carbapenémicos ya al gen de resistencia a la colistina mcr-1.....	148
Gel 2. Amplificación de genes resistentes en <i>E. coli</i> a los carbapenémicos y al gen de resistencia a la colistina mcr-1.....	149

Gel 3. Amplificacion de genes resistentes en <i>E. coli</i> a los carbapenémicos y al gen de resistencia a la colistina mcr-1.....	150
Gel 4. Amplificacion de genes resistentes en <i>E. coli</i> a los carbapenémicos y al gen de resistencia a la colistina mcr-1.....	151
Gel 5. Amplificacion de genes resistentes en <i>E. coli</i> a los carbapenémicos y al gen de resistencia a la colistina mcr-1.....	152
Gel 6. Amplificacion de genes en <i>E. coli</i> resistentes a los β -Lactámicos.	153
Gel 7. Amplificacion de genes en <i>E. coli</i> resistentes a los β -Lactámicos.	153
Gel 8. Amplificacion de genes en <i>E. coli</i> resistentes a los β -Lactámicos.	153
Gel 9. Amplificacion de genes en <i>E. coli</i> resistentes a los β -Lactámicos.	153
Gel 10. Amplificacion de genes en <i>E. coli</i> resistentes a los β -Lactámicos.	153
Gel 11. Amplificacion de genes de <i>E. coli</i> : enterotoxigénica, enteropatogénica y difusamente adherente (MULTI-1).	153
Gel 12. Amplificacion de genes de <i>E. coli</i> : enterotoxigénica, enteropatogénica y difusamente adherente (MULTI-1).	153
Gel 13. Amplificacion de genes de <i>E. coli</i> : enterotoxigénica, enteropatogénica y difusamente adherente (MULTI-1).	153
Gel 14. Amplificacion de genes de <i>E. coli</i> : enterotoxigénica, enteropatogénica y difusamente adherente (MULTI-1).	153
Gel 15. Amplificacion de genes de <i>E. coli</i> : enteroinvasiva, enteroagregativa y shiga-toxina (MULTI-2).	153
Gel 16. Amplificacion de genes de <i>E. coli</i> : enteroinvasiva, enteroagregativa y shiga-toxina (MULTI-2).	153
Gel 17. Amplificacion de genes de <i>E. coli</i> : enteroinvasiva, enteroagregativa y shiga-toxina (MULTI-2).	153

Gel 18. Amplificacion de genes de *E. coli*: enteroinvasiva, enteroagregativa y shiga-toxina
(MULTI-2). 153

GLOSARIO

NAMRU-SOUTH: Naval Medical Research Unit SOUTH, La Unidad de Investigación Médica Naval de los Estados Unidos de Norteamérica se estableció en 1983 mediante un acuerdo entre los gobiernos del Perú y los Estados Unidos y entre las Armadas de ambos países. Este acuerdo estableció un laboratorio de investigación en Callao, Perú, en el campus del Centro Médico Naval (CEMENA) para realizar investigaciones científicas en medicina tropical en beneficio de ambos países.

BLEE (β -Lactamasa de Espectro Extendido): Enzimas producidas por algunas bacterias que les confieren resistencia a una amplia gama de antibióticos β -lactámicos, incluyendo penicilinas y cefalosporinas.

Sinergia: Es la interacción de dos o más elementos que, al combinarse, producen un efecto mayor que la suma de sus efectos individuales, es decir potencian su efecto.

blaTEM, blaCTX-M, blaSHV, blaKPC, blaNDM, blaIMP, blaVIM: Genes que codifican para diferentes tipos de β -lactamasas, enzimas que descomponen antibióticos β -lactámicos y confieren resistencia a las bacterias.

Lactosa Fermentadora Positiva (LFP): Cepas de *E. coli* que pueden fermentar la lactosa, lo que se observa en un cambio de color en el medio de cultivo.

Lactosa Fermentadora Negativa (LFN): Cepas de *E. coli* que no pueden fermentar la lactosa, lo que se evidencia en la ausencia de cambio de color en el medio de cultivo.

Secreción HOT (Herida, Órgano o Tejido): Muestras de fluidos o tejidos de heridas, órganos o tejidos que se analizan para detectar infecciones.

MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry): Técnica de espectrometría de masas utilizada para identificar microorganismos basándose en el perfil de proteínas de sus células.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Técnica de biología molecular utilizada para amplificar segmentos específicos de ADN, permitiendo su detección e identificación.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Organización que establece estándares para pruebas de laboratorio clínico, incluidas las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

ATCC (American Type Culture Collection): Es una colección de cepas microbianas mantenida en los Estados Unidos de Norteamérica que proporciona cultivos de referencia para investigación científica y aplicaciones industriales.

NCTC (National Collection of Type Cultures): Es una colección de cepas bacterianas mantenida en el Reino Unido por el National Collection of Type Cultures, que es parte del Public Health England. Al igual que las ATCC, las cepas NCTC sirven como estándares para la investigación y el desarrollo, y para asegurar la calidad y consistencia en los laboratorios.

daaD: Está asociado con *Escherichia coli* difusamente adherente (ECDA). Este gen codifica para una de las subunidades de la adhesina *AIDA-I* (Adhesin Iniciadora de la Adhesión), una proteína que facilita la adherencia de la bacteria a las células del huésped, especialmente a las células epiteliales del tracto urinario.

eaeA: Codifica la proteína intimina, un factor de virulencia clave en *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) y *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH). La intimina es una adhesina que permite la unión estrecha de la bacteria a las células epiteliales del hospedero. Implicado en la formación de lesiones A/E (adherencia y eliminación), la interacción de la intimina con su receptor Tir (translocado por la bacteria en la célula hospedadora) provoca la reorganización del citoesqueleto celular, formando pedestales característicos. ECEH pueden causar diarrea severa.

st y lt: Codifican enterotoxinas producidas por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET), una de las principales causas de diarrea del viajero y diarrea infantil en países en desarrollo. La toxina termoestable (st) Resiste temperaturas de hasta 100 °C, aumenta los niveles de GMP cíclico (GMPc), lo que inhibe la absorción de sodio y aumenta la secreción de cloro y agua, produciendo la diarrea acuosa. La toxina termolábil (lt). Es similar a la toxina del cólera y se une a GM1 gangliósidos en el epitelio intestinal y activa el adenilato ciclase, aumentando los niveles de AMP cíclico (AMPc) provocando secreción masiva de agua y electrolitos, con diarrea acuosa.

IpaH: Es un marcador característico de *Shigella sp.* y *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI). Codifica una proteína efectora que ayuda en la invasión y diseminación intracelular dentro del epitelio intestinal. Su presencia en muestras clínicas indica potencial invasivo y sugiere cuadros de disentería.

stx1 y stx2: Codifican las toxinas Shiga (*Stx*), que son los principales factores de virulencia de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (*STEC*), incluyendo *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), como la cepa O157:H7. La stx1 es una toxina casi idéntica a la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1. Se une a Gb3 (globotriaosilceramida) en las células endoteliales, bloqueando la síntesis de proteínas y causando citotoxicidad. La stx2 es tóxica que stx1 y está fuertemente asociada con el síndrome urémico hemolítico (SUH). El mecanismo de acción es similar a Stx1, pero con mayor afinidad por los receptores en riñón y cerebro.

aggR: Es un regulador maestro de virulencia en *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA). Su patogenicidad agregativa, que está asociada con diarrea persistente en niños y viajeros.

RESUMEN

Este estudio analizó la caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* aisladas de muestras nosocomiales en Lima y Callao (2014–2017), evaluando la presencia de genes que codifican β -lactamasas, del gen *mcr-1* asociado a resistencia a colistina y diversos genes diarreagénicos. Se estudiaron 100 cepas, mayoritariamente provenientes del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. La detección de genes de resistencia y virulencia se realizó mediante PCR múltiple, incluyendo β -lactamasas de clase A y B, el gen *mcr-1* y genes vinculados a patotipos diarreagénicos.

Los resultados evidenciaron una alta proporción de cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (98%), confirmadas mediante pruebas fenotípicas. Aunque no se observó resistencia relevante a carbapenémicos, se identificó el gen *mcr-1* en 11 cepas, principalmente procedentes de urocultivos, lo que señala un riesgo clínico importante. El gen *daaD*, asociado a *E. coli* difusamente adherente, apareció en el 12% de las muestras. Entre los genes β -lactamasa, predominaron *blaCTX-M* (79%) y *blaTEM* (40%), mientras que *blaSHV*, *blaKPC* y *blaNDM* fueron poco frecuentes (1%). Además, el 57% de las cepas presentó simultáneamente genes de resistencia y virulencia, lo que incrementa su potencial impacto clínico.

La ausencia de resistencia a carbapenémicos resulta alentadora; sin embargo, la elevada prevalencia de BLEE y la presencia de *mcr-1* subrayan la necesidad de mantener una vigilancia epidemiológica continua.

Palabras clave: *Escherichia coli*, BLEE, *Mcr-1*, Diarreagénicos.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli (*E. coli*) es un microorganismo versátil que desempeña un papel dual en la salud humana: por un lado, como parte de la microbiota intestinal normal de mamíferos y aves (Wang, D. *et al.*, 2024), y por otro, como un agente patógeno capaz de causar infecciones severas en la comunidad y en entornos hospitalarios. Este microorganismo representa un desafío crítico para la salud pública, debido a su notable capacidad para adquirir resistencia a múltiples clases de antibióticos de uso clínico, incluidos β -lactámicos, cefalosporinas de tercera generación y polimixina E (colistina) (Mueller *et al.*, 2024). Las cepas multidrogoresistentes (*MDR*) de *E. coli* no solo limitan las opciones terapéuticas disponibles, sino que también incrementan significativamente la morbilidad y mortalidad en los pacientes afectados.

La resistencia antimicrobiana en *E. coli* se debe, en gran medida, a la adquisición de genes específicos que pueden localizarse tanto en el cromosoma bacteriano como en plásmidos extra cromosómicos (Nasrollahian *et al.*, 2024).

Simultáneamente, las infecciones diarreicas causadas por cepas patógenas de *E. coli* son responsables de una alta carga de morbilidad, especialmente en regiones en desarrollo donde la infraestructura sanitaria es limitada. Estas cepas, clasificadas en seis patotipos diarreagénicos principales (enterotoxigénica, enteropatogénica, enteroinvasiva, enteroagregativa, enterohemorrágica y difusamente adherente), producen toxinas como las enterotoxinas y las toxinas shiga, que son responsables de episodios diarreicos severos. Estas infecciones afectan principalmente a poblaciones vulnerables, como niños, ancianos y personas inmunocomprometidas, y pueden conducir a complicaciones graves, incluida la deshidratación severa y un pronóstico desfavorable (Nataro, J. P., & Kaper, J. B., 1998; Ochoa TJ *et al.*, 2008; Nasrollahian *et al.*, 2024).

Un aspecto particularmente preocupante es la simultaneidad de genes de resistencia antimicrobiana con genes de virulencia en una misma cepa bacteriana. Este fenómeno, mediado principalmente por plásmidos bacterianos, favorece la rápida transmisión horizontal de estos determinantes genéticos, no solo entre cepas de *E. coli*, sino también hacia otras especies dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. Esta combinación de factores genéticos intensifica la gravedad de las infecciones y dificulta su manejo clínico, especialmente en entornos hospitalarios donde la presión selectiva de los antibióticos es elevada (Gupta SK, *et al.*, 2014; Nasrollahian, *et al.*, 2024)

Dado este panorama, resulta esencial comprender los mecanismos moleculares y epidemiológicos que permiten la coexistencia de genes de resistencia y virulencia en *E. coli*. En este contexto, el presente estudio busca detectar y caracterizar genes de resistencia β -lactámicos de clase A y B, así como el gen *mcr-I*, en cepas de *E. coli* aisladas de muestras nosocomiales recolectadas en Lima y Callao. Además, se investigará la simultaneidad de estos genes con genes diarreagénicos, proporcionando evidencia científica clave para entender las implicancias clínicas y epidemiológicas de estas cepas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Escherichia coli (*E. coli*) es un microorganismo ubicuo que forma parte del microbiota intestinal normal de mamíferos y aves. Sin embargo, también es un importante agente patógeno en humanos, responsable de infecciones adquiridas tanto en la comunidad como en entornos hospitalarios. Este patógeno plantea un desafío crítico debido a su capacidad para desarrollar resistencia a diversos antibióticos empleados en medicina humana y veterinaria, incluidos β -lactámicos, cefalosporinas de tercera generación y polimixina E (colistina), (Mueller *et al.*, 2024). Las cepas multidrogoresistentes (MDR) de *E. coli* representan una amenaza significativa para la salud pública a nivel global, complicando las opciones terapéuticas y contribuyendo a una mayor morbilidad y mortalidad.

La resistencia antimicrobiana en *E. coli* se debe en gran medida a la adquisición de genes ubicados tanto en el cromosoma bacteriano como en plásmidos extra cromosómicos. Estos últimos desempeñan un papel central en la transferencia horizontal de genes de resistencia dentro de la familia Enterobacteriaceae, facilitando su diseminación rápida en diversos entornos hospitalarios y comunitarios. Entre los genes de mayor relevancia clínica se encuentran los que codifican β -lactamasas de clase A (*blaKPC*, *blaCTX-M*, *blaTEM* y *blaSHV*), β -lactamasas de clase B (*blaIMP*, *blaVIM* y *blaNDM*), (Bilal, H. *et al.*, 2021). así como el gen *mcr-1*, relacionado con la resistencia a la colistina, un antibiótico de último recurso

Aunque la detección de estas resistencias puede realizarse mediante métodos fenotípicos tradicionales como Kirby-Bauer y la sinergia del doble disco, estas pruebas no permiten identificar de manera específica los genes implicados. Por ello, el uso de técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es fundamental para caracterizar los determinantes genéticos de resistencia y comprender mejor la dinámica de diseminación de estas cepas.

Además, la coexistencia de genes de resistencia antimicrobiana con genes de virulencia, particularmente aquellos asociados a los seis patotipos diarreagénicos de *E. coli* (enterotoxigénica, enteropatogénica, enteroinvasiva, enteroagregativa, enterohemorrágica y difusamente adherente), representa un riesgo mayor para la salud pública. Esta combinación puede aumentar la severidad de las infecciones, prolongar las hospitalizaciones y elevar los costos de atención médica, especialmente en entornos hospitalarios donde la presión selectiva favorece la selección de estas cepas.

En este estudio se investigaron, mediante técnicas moleculares, los genes de resistencia β -lactámicos de clase A y B, así como el gen *mcr-1*, en cepas de *E. coli* provenientes de muestras nosocomiales recolectadas en Lima y Callao, las cuales forman parte del banco de cepas del NAMRU-SOUTH. Adicionalmente, se evaluará la simultaneidad de estos genes de resistencia con genes diarreagénicos, proporcionando evidencia científica clave para entender el impacto clínico de estas cepas y orientar estrategias de control y tratamiento.

La generación de evidencia científica que relacione perfiles fenotípicos de resistencia con la presencia de genes específicos no solo contribuye al entendimiento de la dinámica de diseminación de estas cepas, sino que también podría ser útil para desarrollar estrategias de vigilancia molecular más precisas, mejorar los protocolos de manejo clínico, y orientar políticas públicas para el uso racional de antibióticos.

La pregunta central del estudio es:

¿Existe correlación fenotípica y genotípica de genes de resistencia β -lactámicos de la clase A y clase B, junto con el gen *mcr-1* que confiere resistencia a la colistina, además de genes diarreagénicos?

Las preguntas específicas del estudio son:

¿Es posible caracterizar genes de resistencia a β -lactámicos de la clase A y clase B, junto con los genes diarreagénicos y gen mcr-1 que confiere resistencia a la colistina?

¿Cómo se relacionan los perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana con la presencia de genes específicos de resistencia en estas cepas bacterianas?

JUSTIFICACIÓN

La creciente resistencia de *E. coli* a múltiples clases de antibióticos ha complicado de manera sustancial el tratamiento de estas infecciones, disminuyendo la eficacia de los antibióticos de primera línea y dificultando el manejo clínico de los pacientes. Este fenómeno se debe a la capacidad de *E. coli* para adquirir y transmitir genes de resistencia antimicrobiana, un proceso facilitado por la transferencia horizontal de material genético, que permite que las bacterias sobrevivan en ambientes hospitalarios, donde el uso indiscriminado de antibióticos es común.

Además, las infecciones diarreicas causadas por cepas patógenas de *E. coli*, particularmente en regiones en desarrollo con infraestructura sanitaria limitada, representan un desafío adicional para la salud pública. Las cepas de *E. coli* productoras de toxinas, como las enterotoxinas y las toxinas Shiga, son responsables de episodios diarreicos que pueden ser graves, especialmente en niños, ancianos y personas con sistemas inmunitarios comprometidos. Estos episodios pueden dar lugar a complicaciones como la deshidratación severa, que agrava aún más la situación clínica en estas poblaciones vulnerables.

Uno de los aspectos más preocupantes es la simultaneidad o coexistencia de genes de resistencia antimicrobiana y genes de virulencia diarreagénica en la misma cepa de *E. coli*. Los plásmidos bacterianos, que son estructuras extra cromosómicas, juegan un papel clave en la transferencia horizontal de estos genes, permitiendo su diseminación rápida no solo dentro de una misma especie bacteriana, sino también entre diferentes especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Este proceso de transmisión horizontal amplifica la diseminación de la resistencia antimicrobiana, lo que agrava la situación de control y tratamiento de las infecciones en entornos hospitalarios (Carattoli A, 2013; Nasrollahian *et al.*, 2024)

La presencia simultánea de genes que confieren resistencia y genes diarreagénicos en *E. coli* representa un reto significativo para el pronóstico de los pacientes infectados, especialmente aquellos en estado crítico. El tratamiento de estas infecciones se ve dificultado por la escasez de opciones terapéuticas efectivas y por los efectos secundarios de los tratamientos agresivos necesarios para controlar tanto la infección urinaria como los episodios diarreicos. La interacción entre los mecanismos de virulencia y resistencia no solo aumenta la gravedad de las infecciones, sino que también plantea un desafío aún mayor para los sistemas de salud, que ya enfrentan limitaciones en recursos y personal.

Por lo tanto, es esencial realizar investigaciones que profundicen la caracterización tanto fenotípica como genotípica en *E. coli*. Comprender cómo interactúan estos factores genéticos, tanto a nivel molecular como en su contexto epidemiológico, es crucial para desarrollar nuevas estrategias de tratamiento y prevención. Estos estudios no solo contribuyen a mejorar el manejo de infecciones nosocomiales y diarreicas en regiones en desarrollo, sino que también permiten una aproximación más efectiva a la resistencia antimicrobiana, un problema crítico en la medicina moderna.

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar fenotípica y molecularmente en cepas de *Escherichia coli* los genes que codifican β -lactamasas y con el gen de la resistencia a la colistina aisladas de muestras nosocomiales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Re-identificación de las cepas de *E. coli* mediante la espectrometría de masas (MALDI ToF).
- Determinar la susceptibilidad antimicrobiana mediante la difusión en disco.
- Detectar genes que codifican β -lactamasas de la Clase A (como *blaKPC*, *blaCTX-M*, *blaTEM* y *blaSHV*), mediante la reacción en cadena de la polimerasa múltiple, en cepas de *E. coli* que provienen de muestras nosocomiales.
- Detectar genes que codifican β -Lactamasas de la Clase B (como *blaIMP*, *blaVIM*, *blaNDM*) mediante la reacción en cadena de la polimerasa múltiple, en cepas de *E. coli* que provienen de muestras nosocomiales.
- Detectar la presencia de genes diarreagénicos en cepas de *E. coli* aisladas de muestras nosocomiales mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Detectar el gen *mcr-1*, asociado con la resistencia a la colistina en cepas de *E. coli* aisladas de muestras nosocomiales mediante la reacción en cadena de la polimerasa múltiple.
- Asociar los perfiles de resistencia antimicrobiana obtenidos por métodos fenotípicos y la presencia de genes de resistencia específicos en cepas bacterianas de *E. coli* provenientes de muestras nosocomiales.

HIPÓTESIS

Existe concomitancia entre los genes que codifican β -Lactamasas y el gen resistente de la colistina con genes diarreagénicos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras nosocomiales.

VARIABLES

- Tipo de muestras (orina, sangre, secreción)
- Genes de resistencia a β -lactámicos (blaTEM, blaSHV, blaCTX-M, blaKPC, blaNDM, blaVIM, y blaIMP).
- Gen de resistencia a la colistina (*mcr-1*).
- Genes diarreagénicos (stIIa, stIIb, lt, eaeA, ipaH, aggR, stx1, stx2 y daaD).

CAPÍTULO I:

MARCO TEÓRICO.

1.1. ANTECEDENTES DEL TEMA DE ESTUDIO

1.1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES

El-Hariri, *et al.* (2023), en su estudio titulado "Phenotypic and molecular characterization of ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among Lebanese patients ", obtuvo 152 aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE del Hospital Geitaoui en Beirut entre septiembre de 2019 y octubre de 2020. La producción de BLEE se confirmó mediante la prueba de sinergia con discos dobles, y la susceptibilidad antibiótica se determinó mediante el método de difusión en disco. Además, usó PCR multiplex para detectar los genes de BLEE (**blaTEM**, **blaCTX-M**, y **blaSHV**). Todos los aislados fueron productores de BLEE. Todos los aislados mostraron resistencia a cefotaxima, cefuroxima, ampicilina y piperacilina, pero una baja susceptibilidad a trimetoprima/sulfametoxazol y ciprofloxacina, contrariamente la mayor parte de las muestras evaluadas fueron susceptibles a ertapenem, imipenem y amikacina. Los genes de BLEE fueron detectados en el 39.67% de los aislados de *E. coli* y el 58.06% de *K. pneumoniae*. El gen más prevalente fue **blaTEM** (25%), seguido de **blaCTX-M** (19.08%) y **blaSHV** (16.45%). Concluye que el imipenem y ertapenem son los medicamentos más efectivos para tratar a los productores de ESBL, pero se deben implementar programas de control de antibióticos para combatir la resistencia antimicrobiana.

Nasrollahian *et al.* (2024), en el análisis que hace en la publicación titulada "A review of the mechanisms that confer antibiotic resistance in pathotypes of *Escherichia coli*", menciona que, aunque *E. coli* es una bacteria ampliamente reconocida que vive en armonía con su huésped, existen numerosas cepas peligrosas de *E. coli*. Ciertas cepas se han adaptado a su entorno y han desarrollado factores de virulencia particulares que mejoran su capacidad

para adaptarse a nuevos ambientes, lo que les permite causar una variedad de enfermedades, incluidas infecciones intestinales y extraintestinales. La clasificación de las *E. coli* patógenas incluye: *E. coli* productoras de toxinas Shiga (ECST), enterohemorrágicas (ECEH), enteropatógenos (ECEP), enteroagregativa (ECEA), de adherencia difusa (ECDA), *Shigella/E. coli* enteroinvasiva (ECEI), enterotoxigénicas (ECET) y adherente-invasiva (ECAI). La diarrea infecciosa, aunque se asocia con una mortalidad moderada y suele ser menos grave en países industrializados, afecta a muchas personas y representa una carga significativa para la salud pública. Concluye que las cepas multirresistentes (MDR) de *E. coli* surgieron gracias a la capacidad innata de esta bacteria para absorber material genético de otras especies bacterianas al inicio de la era de los antibióticos. A medida que se utilizaron más antibióticos, las cepas resistentes principales continuaron bajo presión selectiva, y se seleccionaron nuevas cepas resistentes que habían adquirido resistencia a través de la transferencia horizontal de genes o mutaciones espontáneas.

Fraccalvieri *et al.* (2025), en la publicación “Isolation and Characterization of Colistin-Resistant Enterobacteriaceae from Foods in Two Italian Regions in the South of Italy” evaluó la prevalencia y características de la familia Enterobacteriaceae resistentes a colistina en alimentos crudos y listos para el consumo en dos regiones de Italia (Apulia y Basilicata). De 1000 muestras analizadas, el 4,4% presentó bacterias resistentes a colistina, principalmente del género *Enterobacter* (60%), seguido por *Moellerella wisconsensis*, *Atlantibacter hermannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. Los análisis genómicos llevados a cabo y de susceptibilidad antimicrobiana mostraron altos niveles de resistencia a β -lactámicos y un perfil multirresistente (MDR) en la mayoría de los aislados. Siete portaban genes *mcr* (**mcr-1**, **mcr-9** y **mcr-10**), este estudio resalta la presencia de múltiples mecanismos de resistencia, incluidos los genes *mcr*, y subraya el riesgo potencial que representan estas bacterias para la salud humana. La presencia de los genes **mcr-1** en *E. coli*

y **mcr-9** y **mcr-10** en especies de *Enterobacter* sugiere un trasvase horizontal de resistencia, facilitado frecuentemente por plásmidos.

1.1.2. ANTECEDENTES NACIONALES

Quino *et al.* (2020), en su estudio "Resistoma y genómica comparativa de aislados clínicos de *Escherichia coli* diarreagénica en Lima, Perú", secuenciaron el genoma de catorce aislamientos de *Escherichia coli* diarreagénica (ECD) del banco de cepas del Instituto Nacional de Salud (INS). El objetivo fue explorar sus características genómicas relacionadas con la resistencia antimicrobiana y realizar análisis comparativos. Identificaron varios determinantes de resistencia antimicrobiana, destacando la presencia de genes que codifican β -lactamasas y mutaciones asociadas con la resistencia a quinolonas. Además, los aislamientos de este patotipo estaban agrupados en diferentes filogrupos genéticos. El análisis de genómica comparativa reveló una mayor similitud genética entre aislamientos de este patotipo y filogrupo. Estos aislamientos de ECD exhiben resistencia a múltiples fármacos y muestran una diversidad molecular y filogenética significativa entre diferentes patotipos y filogrupos.

Loyola *et al.* (2021), en la publicación "Antimicrobial Resistance Patterns and Dynamics of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Uropathogenic *Escherichia coli* in Cusco, Perú" analiza la prevalencia y patrones de resistencia antimicrobiana de *E. coli* uropatógena productora de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) en el Hospital Antonio Lorena. Destaca que las cepas de *E. coli* productoras de BLEE en infecciones del tracto urinario muestran una resistencia elevada a los antibióticos de uso común, como cefalosporinas y fluoroquinolonas. Esto limita las opciones de tratamiento y representa un desafío para el control de infecciones en la región. El análisis dinámico revela una creciente diseminación de genes de resistencia, lo que sugiere que las estrategias locales de manejo de

antibióticos deben revisarse. El trabajo enfatiza la necesidad de una vigilancia continua y medidas preventivas para controlar la propagación de estas cepas resistentes en Cusco y otras áreas con recursos limitados.

Marcos-Carbajal *et al.*, (2021) en la publicación “Caracterización microbiológica y molecular de la resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* uropatógenas de hospitales públicos peruanos”, basa su estudio en 70 aislamientos de *E. coli* obtenidos de pacientes ambulatorios de ocho hospitales públicos del Perú (Cusco, Huancavelica, La Libertad, Loreto, Madre de Dios, Puno, San Martín y Tumbes.). El 65,7% de los aislamientos presentó un perfil multidrogorresistente (MDR) y el 55,7% fue productor de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Se observaron altos niveles de resistencia frente a ampicilina (77,1%), ciprofloxacina (74,3%) y trimetoprim/sulfametoxazol (62,9%). Además, se detectaron cepas resistentes a colistina, aunque no se halló resistencia a carbapenémicos. Los genes más frecuentes fueron **blaTEM** (31,4%), seguido de **blaCTX-M** (18,6%) y **blaSHV** (2,9%). Se identificaron discrepancias entre los resultados fenotípicos y genotípicos, evidenciando limitaciones en la sensibilidad de los métodos fenotípicos empleados para detectar BLEE. Algunos aislamientos clasificados como no BLEE presentaron genes asociados a esta resistencia, lo cual subraya la necesidad de incorporar métodos moleculares más sensibles, e incluso secuenciamiento, para una caracterización precisa. Aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas por sexo, los aislados de pacientes masculinos mostraron mayores niveles de resistencia a múltiples antimicrobianos.

Boolchandani *et al.*, (2022) en el estudio “Impact of international travel and diarrhea on gut microbiome and resistome”, el estudio evaluó el impacto del viaje internacional y la diarrea del viajero sobre el microbioma intestinal y el resistoma en una cohorte de 159 estudiantes internacionales que visitaron Cusco, Perú. Se recolectaron 718 muestras fecales longitudinales y se analizaron mediante secuenciación de nueva generación (NGS). Se

observó que, aunque la composición del microbioma intestinal cambió durante el viaje, la diversidad taxonómica se mantuvo estable. Sin embargo, los episodios de diarrea alteraron esta estabilidad y se asociaron con un aumento sostenido en la abundancia de genes de resistencia antimicrobiana. Se identificaron taxones diferenciales entre muestras con y sin diarrea, los cuales permitieron desarrollar un modelo de clasificación para distinguir ambos estados. Además, el análisis genómico de 212 cepas de *E. coli* diarreagénicos mostró una mayor carga de genes de resistencia antimicrobiana en aislados de viajeros que presentaron diarrea, en comparación con aquellos sin síntomas. En conjunto, los hallazgos indican que, aunque el microbioma intestinal de los viajeros muestra una capacidad para volver a su estado original (resiliencia) frente a un desequilibrio en la composición del microbioma (disbiosis), la diarrea incrementa el riesgo de colonización por bacterias multirresistentes, lo que representa una amenaza para la diseminación global de la resistencia antimicrobiana.

Campo (2024), en el trabajo de tesis “Identificación fenotípica y molecular (PCR) de β -lactamasas tipo BLEE y Carbapenemasas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aislados de pacientes intrahospitalarios en la ciudad de Cusco”, identifica a través de técnicas bioquímicas y técnicas de biología molecular la presencia de β -lactamasas tipo BLEE y Carbapenemasas en 50 cepas de *Klebsiella pneumoniae* aislados de sangre, orina y secreciones de pacientes de tres hospitales del Departamento de Cusco. Así mismo identifican la presencia de los genes β -lactamasas tipo BLEE: **blaTEM**, **blaSHV**, **blaCTX-M**. También identifican genes para Carbapenemasas: **blaKPC**, **blaNDM**.

1.2. BASES TEÓRICAS

1.2.1. *Escherichia coli*: GENES DE VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD.

Escherichia coli (*E. coli*) descrita inicialmente como *Bacterium coli commune*, por el Pediatra alemán Theodor Escherich en 1885 (Foster-Nyarko E., *et al.*, 2022), es uno de

los organismos mejor caracterizados en el mundo y ha sido estudiado extensivamente por más de un siglo. Este microorganismo fascinante y diverso está adaptado a diferentes condiciones ambientales, con más de 15,000 genes hasta 75, 000 genes que conforman el pangenoma de *E. coli*, otorgándole la capacidad de proliferar y sobrevivir en diversos entornos (Hufnagel *et al.*, 2015; Denamur *et al.*, 2021).

Existen diferentes factores de resistencia que han conferido a *E. coli* varios clones altamente adaptados, los cuales han adquirido atributos específicos de virulencia, permitiéndoles adaptarse a nuevos nichos y causar un amplio espectro de enfermedades. Estos atributos de virulencia suelen codificarse en elementos genéticos móviles que pueden transferirse entre diferentes cepas, creando nuevas combinaciones de factores de virulencia. Solo las combinaciones más exitosas de estos factores han persistido, dando lugar a los específicos 'patotipos' de *E. coli* (Blount, 2015; Nasrollahian *et al.*, 2024), que pueden causar enfermedades en individuos sanos, como enfermedad diarreica, infecciones del tracto urinario (ITU), sepsis y meningitis (Kaper *et al.*, 2004; Nasrollahian *et al.*, 2024).

Según el grupo de determinantes de virulencia adquiridos, se han formado combinaciones específicas que determinan los patotipos de *E. coli* conocidos colectivamente como *E. coli* diarreagénicos (ECD). Los patotipos de ECD difieren en sus sitios de colonización preferencial del huésped, mecanismos de virulencia, síntomas y consecuencias clínicas resultantes, y se clasifican como: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterohemorrágica (productora de toxina Shiga) (ECEH/ECST), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* enterotoxigénica (ECET) y *E. coli* enteroinvasiva (ECEI). Cada uno de estos patotipos representa un grupo de clones que comparten factores de virulencia específicos (Gomes *et al.*, 2016; Nataro & Kaper, 1998; Nasrollahian *et al.*, 2024). Además, ciertas cepas de *E. coli* clasificadas como patotipo *E. coli* adherente invasiva (ECAI) son potenciales agentes causantes de la enfermedad de Crohn (Gomes *et al.*, 2016; Nasrollahian *et al.*, 2024).

La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria intestinal (EII) causada por una combinación de factores genéticos, microbiota intestinal, factores ambientales y patógenos entéricos (Gomes *et al.*, 2016)

La versatilidad del genoma de *E. coli* se debe principalmente a dos configuraciones genéticas: plásmidos relacionados con la virulencia e islas de patogenicidad cromosómica. Se ha demostrado que los seis patotipos de *E. coli* diarreagénicos descritos, poseen al menos una propiedad relacionada con la virulencia en un plásmido (Nataro & Kaper, 1998; Nasrollahian *et al.*, 2024).

Las cepas ECET, ECEP, ECEA y ECEH suelen presentar familias de plásmidos altamente conservadas, cada una de las cuales codifica múltiples factores de virulencia. Los genes de la virulencia cromosómica de EPEC y ECEH se organizan en islas de patogenicidad, mientras que la colonización y supervivencia de ECEI en la barrera gastrointestinal depende de un plásmido muy similar al de *Shigella*. En este proceso, están involucrados múltiples genes bacterianos, tanto cromosómicos como plasmídicos (Nataro & Kaper, 1998; Gomes *et al.*, 2016; Denamur *et al.*, 2021). En la cepa ECDA, estos genes se pueden encontrar en el cromosoma bacteriano o en un plásmido (Nataro & Kaper, 1998; Denamur *et al.*, 2021).

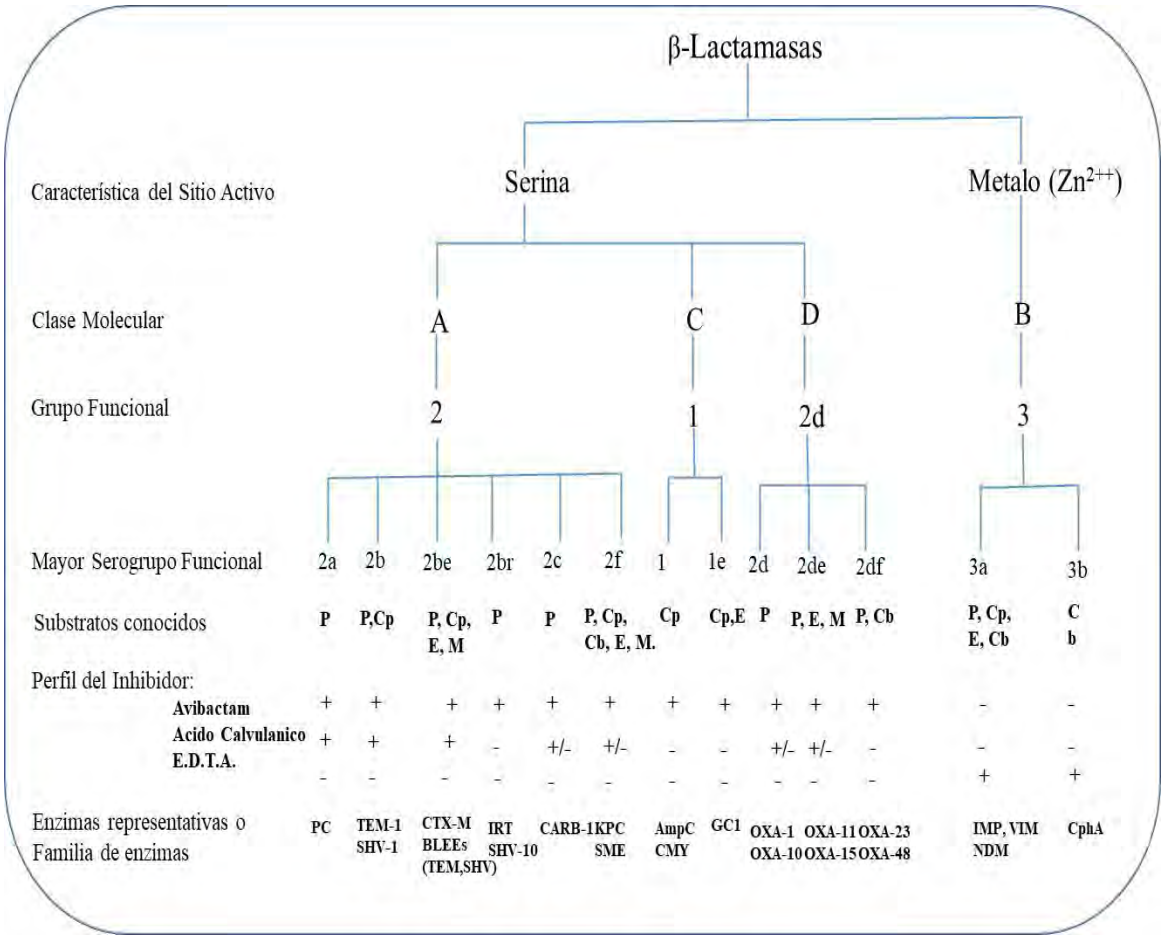
Algunas cepas de *E. coli* también pueden causar enfermedades extraintestinales, agrupadas como *E. coli* Patogénica Extraintestinal (ECPEX), que incluye cepas uropatogénicas (UPEC), asociadas a meningitis neonatal y causantes de sepsis (Hufnagel *et al.*, 2015; Nasrollahian *et al.*, 2024).

1.2.2. β -LACTAMASAS.

Las β -lactamasas son enzimas producidas por bacterias como algunas cepas de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y otros patógenos, que pueden hidrolizar el anillo β -lactámico, desactivando el antibiótico y haciéndolo ineficaz.

La nomenclatura de las β -lactamasas se basa en dos sistemas principales: la clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medieros (Paterson *et al.*, 2005; Bush, 2018) y la clasificación molecular de Ambler, que clasifica las β -lactamasas según las secuencias de aminoácidos, resultando en enzimas de clase A, B, C y D (Paterson *et al.*, 2005; Diene *et al.*, 2014) (Figura 1).

Figura 1.
Clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros.



Fuente (Bush, 2018).

E.D.T.A= ácido etilen diamino tetra acético, P= Penicilina, Cp= Cephalosporina, E= Cefalosporina de Expectro Extendido, M= Monobactam, Cb= Carbapenem, PC-1= hidrólisis de la penicilina, blaTEM= Temoneira, blaSHV= sulfhydryl variable, blaCTX-M= cefotaxima-Concentración Mínima inhibitoria, CARB= carbenicilina-hidrolizante, AmpC= serina-betalactamasa, SME= hidroxilación de carbapenem, blaOXA= Oxacilina, KPC= Klebsiella pneumoniae carbapenemasa, blaIMP= Imipenem metallo- β -lactamasa, blaNDM= Nueva Delhi Metallo- β -lactamasa, blaVIM= Verona integron-codificada metallo- β -lactamas.

La actividad de las β -lactamasas constituye el principal mecanismo de resistencia de las bacterias a los antibióticos β -lactámicos, dirigiéndose específicamente a la hidrólisis de la unión β -lactama del anillo β -lactámico, produciendo un compuesto ácido sin actividad antibacteriana. Una proporción importante de las β -lactamasas descritas hasta el momento está codificada por genes ubicados en plásmidos (Zemelman *et al.*, 2002; Nasrollahian *et al.*, 2024).

En bacilos Gram negativos, las β -lactamasas de los grupos Temoneira (TEM) (especialmente en *Escherichia coli*) y sulfhydryl variable (SHV) (especialmente en *Klebsiella pneumoniae*) son las más frecuentes. Las β -lactamasas TEM-1, TEM-2 (grupo TEM) y SHV-1 (grupo SHV) pueden hidrolizar bencilpenicilina, aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina y ticarcilina) y ureidopenicilinas (piperacilina), pero no tienen acción hidrolítica significativa sobre cefalosporinas. Sin embargo, el uso desmedido de estos antibióticos ha favorecido el desarrollo de cepas bacterianas que producen nuevas variedades de β -lactamasas de los grupos cefotaxima-Munich (**blaCTX-M**) así como **blaTEM** y **blaSHV**, que pueden hidrolizar cefalosporinas de tercera generación (CF3G), denominadas “ β -lactamasas de espectro extendido” (BLEE) (Zemelman *et al.*, 2002; El-Hariri *et al.*, 2023).

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), como enzimas plasmídicas, son eficientemente inhibidas por el ácido clavulánico. Esta propiedad ha permitido el diseño de métodos para detectarlas mediante la producción de un fenómeno sinérgico entre una cefalosporina de tercera generación (CF3G), como ceftazidima o cefotaxima, y ácido clavulánico en ensayos de difusión en agar utilizando discos impregnados con estos compuestos (Zemelman *et al.*, 2002).

La *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC), es una enzima y según la clasificación de Ambler pertenece a clase A (Diene & Rolain, 2014). Es la carbapenemasa

más común producida por *E coli* y las especies de la familia enterobacteriaceae. El gen **blaKPC** se transporta en un elemento genético móvil y confiere resistencia a los carbapenems (Figura 2).

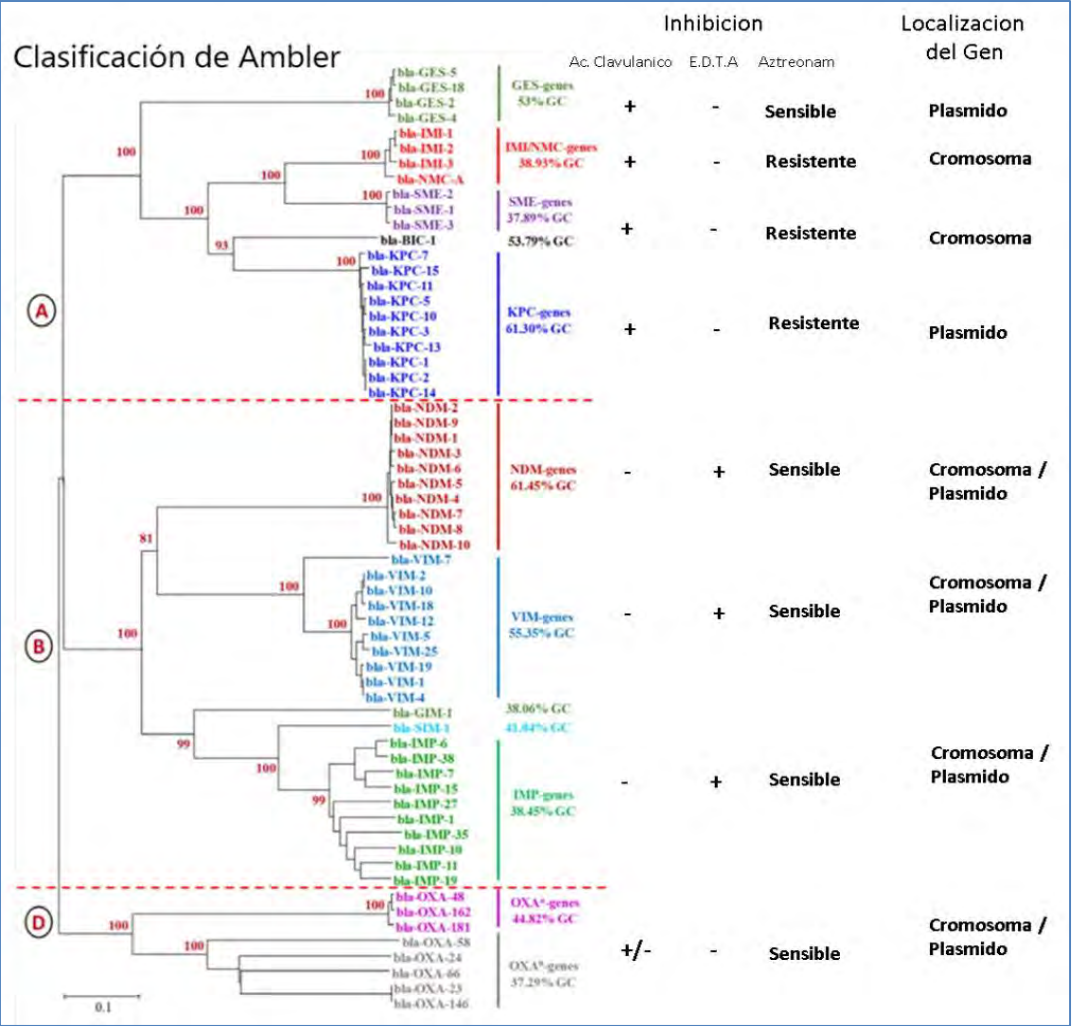
Desde que se informó por primera vez en 2001 se ha documentado varias Enterobacteriaceae, incluidas *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* y *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Salmonella sp.* (Limbago *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2022), otro grupo de carbapenemasas, son las metalo- β -lactamasas (MBL) de clase B según la clasificación de Ambler, tienen gran importancia clínica en todo el mundo. Los MBL pueden conferir resistencia a los carbapenems y a todos los agentes β -lactámicos, excepto el aztreonam, aunque muchas cepas productoras de MBL tienen mecanismos de resistencia adicionales (por ejemplo, B-lactamasas de espectro extendido - BLEE) que las hacen resistentes al Aztreonam, a diferencia de **blaKPC**, los MBL no se habían reconocido previamente como mecanismos de resistencia a los carbapenems entre Enterobacteriaceae, aunque se han encontrado en *Pseudomonas aeruginosa*. Recientemente, dos enzimas MBL diferentes: Imipenem metallo- β -lactamasa (**blaIMP**), Nueva Delhi Metallo- β -lactamasa (**blaNDM**) y Verona integron-codificada metalo- β -lactamasa (**blaVIM**), han sido reportadas entre Enterobacteriaceae (Limbago *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2022).

La colistina, también conocida como polimixina E, es un polipéptido que fue aislado de *Paenibacillus polymixa sbsp colistinus*. Las polimixinas tienen actividad contra la mayoría de las bacterias Gramnegativas, actúa desestabilizando los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa bacteriana, aumentando la permeabilidad de la membrana bacteriana, conduciendo a una fuga del contenido citoplasmático y finalmente causa la muerte celular. Otro mecanismo antibacteriano de las polimixinas es la neutralización de la endotoxina, que corresponde a la porción de lípido A del LPS; las polimixinas pueden unirse

y neutralizar esta molécula liberada durante la lisis celular (Poirel *et al.*, 2017; Mondal *et al.*, 2024).

Debido a su actividad antimicrobiana, la colistina, ha sido utilizada tanto en medicina humana como veterinaria, por más de 50 años, aunque su uso parenteral en humanos ha sido limitado por su nefrotoxicidad y neurotoxicidad. En los últimos años, el uso de este antibiótico en humanos ha resurgido como una opción de tratamiento de última línea para los organismos resistentes a múltiples antimicrobianos, sobre todo debido a la aparición y

Figura 2.
Clasificación Molecular de Ambler.



Fuente: Árbol filogenético de los genes de metalocarbapenemasas y serina carbapenemasas con su porcentaje medio de contenido de Guanina y Citosina (GC), según grupos y propiedades fenotípicas (Diene, 2014).

propagación de la resistencia a los carbapenems, habiéndose denominado "un antimicrobiano de último recurso" (Mondal *et al.*, 2024).

El aumento del uso de colistina para tratar bacterias resistentes a carbapenems en humanos ha llevado a un incremento en la resistencia a la colistina debido a mutaciones puntuales cromosómicas que causan cambios en el lípido A de los lipopolisacáridos. Además, la colistina ha sido utilizada globalmente en la producción ganadera, especialmente en la producción de cerdos, para prevenir o tratar infecciones asociadas con Enterobacteriaceae, así como en promotores de crecimiento en países como China, India y Vietnam. Este uso extensivo en la producción animal ha contribuido al desarrollo de la resistencia (Maciuca *et al.*, 2019; Mondal *et al.*, 2024). La resistencia mediada por plásmidos a la colistina mediante el transporte del gen **mcr-1** tanto en *E. coli* como en *Klebsiella pneumoniae* puede ser transferida horizontalmente (Shafiq *et al.*, 2019; Mondal *et al.*, 2024).

Poco después del descubrimiento de **mcr-1**, se identificaron otras variantes como **mcr-2** y **mcr-3** en aislados de *E. coli* bovinos y porcinos de Bélgica y China, seguidos por **mcr-4** en *E. coli* y *Salmonella sp.* de cerdos en Italia, Bélgica y España, y **mcr-5** en *Salmonella paratyphi B* de aves de corral en Alemania. Además, se identificaron **mcr-6** en *Moraxella sp.* de cerdos sanos y **mcr-7** en aislados de *K. pneumoniae* recuperados de pollos en China, lo que indica que los animales de granja son un reservorio potencial de resistencia a la colistina mediada por plásmidos (Maciuca *et al.*, 2019; Mondal *et al.*, 2024).

CAPÍTULO II.

MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Las cepas de *E. coli* utilizadas en la presente investigación fueron proporcionadas por el banco de cepas del NAMRU-SOUTH, a través de un convenio cooperativo de investigación y desarrollo (CRADA) (Anexo 1), firmado el 06 de octubre del 2023. Las cepas cedidas son las siguientes:

- 74 cepas del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).
- 12 cepas del Hospital Central de la Fuerza Aérea Peruana (FAP).
- 6 cepas del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins (HNERM)
- 7 cepas de Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión (HNDAC)
- 1 cepa del Centro Médico Naval Cirujano Mayor Santiago Távara (CEMENA)
- ATCC 25922 *Escherichia coli*, cepa de referencia sin resistencia a genes específicos.
- ATCC 35401: *Escherichia coli* enterotoxigénica cepa portadora de los genes *lt*, *st*
- ATCC 43887: *Escherichia coli* enteropatógena cepa portadora del gen *eaeA*
- ECDA *Escherichia coli* difusamente adherente cepa portadora del gen *daaD*
- ATCC 29552: *Escherichia coli* enteroagregativa cepa portadora del gen *aggR*
- ATCC 43894: *Escherichia coli* enterohemorrágica cepa portadora de los genes *stx1*, *stx2* y *eaeA*
- ATCC 43893: *Escherichia coli* enteroinvasiva cepa portadora del gen *ipaH*
- NCTC 13476 *Escherichia coli*: cepa portadora del gen **blaIMP**
- ATCC 13437 *Pseudomonas aeruginosa*: cepa portadora del gen **blaVIM**
- ATCC BAA 2146 *Klebsiella pneumoniae*: cepa portadora del gen **blaNDM**
- ATCC BAA 1705 *Klebsiella pneumoniae*: cepa portadora del gen **blaKPC**
- NCTC 13846 *Escherichia coli*: cepa portadora del gen **mcr-1** (resistencia a colistina).

- ATCC 35218 *Escherichia coli*: cepa portadora del gen **blaTEM** (β -lactamasa).
- ATCC 700603 *Klebsiella pneumoniae*: cepa portadora del gen **blaSHV** (β -lactamasa).
- NSH 0298 *Escherichia coli*: cepa portadora de los genes **blaCTX-M** y **blaTEM** (β -lactamasas).

2.2. MATERIALES DE LABORATORIO

2.2.1. MATERIAL DE VIDRIO

- Matraces Erlenmeyer, de 1000 ml.
- Probetas graduadas, de 100 ml. y 500ml.
- Frascos de vidrio de 1 litro.

2.2.2. MATERIAL DE PLASTICO

- Asas y agujas de siembra estériles descartables.
- Gradillas para microtubos
- Gradillas para tubos de ensayo
- Placas Petri de 100 mm x 15 mm
- Placas Petri de 150 mm x 15 mm
- Reservorios para ensayos de ELISA.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml
- Tubos de PCR de 0,2 ml
- Puntas para micropipetas de 0.5-10 μ L, 1-20 μ L, 10-100 μ L, 10-200 μ L, 100-1000 μ L.
- Bolsa de descarte

2.3. REACTIVOS

- AmpliTaq Gold 360 Master Mix 2X (Incluye PCR tampón: 25 mM MgCl₂, dNTPs, Tris–HCl y KCl) (Applied BioSystems)
- BTS (Estándar Bacteriano de la prueba), Bruker
- Marcador de peso molecular conocido 100pb (BioRad)

- Marcador de peso molecular conocido 123pb (BioRad)
- Matrix (Bruker matrix HCCA, portioned)
- Solución de hipoclorito 10%
- Solución Salina 0.85%
- SYBR Safe (Invitrogen)
- Tampón de cargado de muestra (Loading Buffer) (BioRad)
- Tampón Tris Borato EDTA 1X (1 M Tris, 0.9 M boric acid, and 0.01 M EDTA) (Invitrogen)
- Agarosa

2.4. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar MacConkey, (Becton-Dickinson)
- Agar Mueller Hinton (Becton-Dickinson)
- ComASP Colistin Kit (Liofilchem)

2.5. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

- BioRender (<https://biorender.com/>)
- MALDI Biotyper 2.0
- Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)
- Software Image Lab 6.0.1 (BioRad)

2.6. EQUIPOS

- Agitador (Vortex Genie 2, Thermo Fisher Scientific)
- Autoclave (SterilElite 40 L, Thermo Fisher Scientific)
- Cabina de flujo laminar (BSL2, Labconco)
- Cabina para PCR (UVC/T-M-AR, Thermo Fisher Scientific)
- Cámara Electroforética horizontal y accesorios (OWL D2, Thermo Fisher Scientific)
- Centrífuga (5804R, Eppendorf)
- Congelador (TSX, Thermo Scientific)

- Densitómetro (DEN1, Liofilmchem)
- Espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific)
- Espectrómetro de masas MALDI-ToF MS (Microflex, Bruker)
- Fuente de poder (power pack basic, BioRad)
- Fotodocumentador de imágenes (Gel Doc EZ, BioRad)
- Incubadora (MaxyQ, Thermo Fisher Scientific)
- Micropipetas de 0.5-10 µl, 10–200 µl y 100–1000 µl (AxyPET, Axygen)
- Micropipeta Multicanal 30-300 µL (AxyPET, Axygen)
- Refrigeradora (FBG, Thermo Fisher Scientific)
- Termociclador (Veriti, Applied Biosystems)
- Bloque de calor seco (KF APEX 96, Thermo Fisher Scientific)

2.7. OTROS MATERIALES

- Alcohol 70%
- Bioplaaca (MBT Biotarget 96)
- Cebadores específicos (Biosearch):
 - stIa-F: 5'TTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAA3' (ECET)
 - stIa-R: 5'GCAGGATTACAACACAATTCACAGCAG3' (ECET)
 - stIb-F: 5'TGCTAAACCAGTAGAGTCTTCAAAA3' ECET)
 - StIb-R: 5'GCAGGATTACAACACAATTCACAGCAG3' (ECET)
 - Lt-F: 5'TCTCTATGTGCATACGGAGC3' (ECET)
 - Lt-R: 5'CCATACTGATTGCCGCAAT3' (ECET)
 - eaeA-F: 5'ATGCTTAGTGCTGGTTTAGG3' (ECEP)
 - eaeA-R: 5'GCCTTCATCATTTTCGCTTTC3' (ECEP)
 - daaD-F: 5'TGAACGGGAGTATAAGGAAGATG3' (ECDA)
 - daaD-R: 5'GTCCGCCATCACATCAAAA3' (ECDA)
 - IpaH-F: 5'GTTCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC3' (ECEI)
 - IpaH-R: 5'GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC3' (ECEI)
 - AggR-F: 5'CGAAAAAGAGATTATAAAAATTAAC3' (ECEA)

- AggR-R: 5'GCTTCCTTCTTTTGTGTAT3' (ECEA)
 - stx1-F: 5'CTGGATTTAATGTCGCATAGTG3' (ECEH)
 - stx1-R: 5'AGAACGCCCACTGAGATCATC3' (ECEH)
 - stx2-F: 5'GGCACTGTCTGAAACTGCTCC3' (ECEH)
 - stx2-R: 5'TCGCCAGTTATCTGACATTCTG3' (ECEH)
 - blaCTX-M-F: 5'TCTTCCAGAATAAGGAATCCC3' (βL-GrupoA)
 - blaCTX-M-R: 5'CCGTTTCCGCTATTACAAAC3' (βL-GrupoA)
 - blaTEM-F: 5'TCCGCTCATGAGACAATAACC3' (βL-GrupoA)
 - blaTEM-R: 5'ATAATACCGCACCACATAGCAG3' (βL-GrupoA)
 - blaSHV-F: 5'TACCATGAGCGATAACAGCG3' (βL-GrupoA)
 - blaSHV-R: 5'GATTTGCTGATTTGCTCGG3' (βL-GrupoA)
 - blaIMP-F: 5'GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC3' (βL-GrupoB)
 - blaIMP-R: 5'GGTTTAAYAAAACAACCACC3' (βL-GrupoB)
 - blaVIM-F: 5'GATGGTGTGTTGGTTCGCATA3' (βL-GrupoB)
 - blaVIM-R: 5'CGAATGCGCAGCACCAG3' (βL-GrupoB)
 - blaNDM-F: 5'GGTTTGGCGATCTGGTTTTC3' (βL-GrupoB)
 - blaNDM-R: 5'CGGAATGGCTCATCACGATC3' (βL-GrupoB)
 - blaKPC-F: 5'CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG3' (βL-GrupoA)
 - blaKPC-R: 5'CTTGTCATCCTTGTTAGGCG3' (βL-GrupoA)
 - mcr-1 CLR-F: 5'CGGTCAGTCCGTTTGTTC3' (Colistina)
 - mcr-1 CLR-R: 5'CTTGGTCGGTCTGTAGGG3' (Colistina)
- Discos de sensibilidad (BD BBL Sensi Disc)
- Amoxicilina-clavulanato 20/10μg (AMC)
 - Ceftazidima-avibactam 30/20μg (CZA)
 - Imipenem-relebactam 10/25μg (IMR)
 - Meropenem- vaborbactam 20/10μg (MEV)
 - Piperacilina- tazobactam 100/10μg (TZP)
 - Ticarcilina-clavulanato 75/10μg (TIM)
 - Cefotaxima-clavulanato (CTX/CLA)
 - Ceftazidima-clavulanato (CAZ/CLA)
 - Amikacina 30μg (AN)
 - Aztreonam 30μg (ATM)
 - Cefepima 30μg (FEP)

- Cefotaxima 30µg (CTX)
 - Ceftriaxona 30µg (CRO)
 - Ceftazidima 30µg (CAZ)
 - Ciprofloxacina 5µg (CIP)
 - Ertapenem 10µg (ETP)
 - Gentamicina 10µg (GM)
 - Imipenem 10µg (IPM)
 - Minocyclina 30µg (MI)
 - Tetracyclina 30µg (TE)
 - Tobramicina 10µg (NN)
 - Trimethoprima- sulfamethoxazol 1.25/23.75µg (SXT)
- Guantes
 - Hisopos de algodón estériles
 - Mandil de laboratorio
 - Mechero Bunsen
 - Papel toalla
 - Pinzas

2.7. MÉTODOS

2.7.1. LUGAR DE EJECUCION

El desarrollo del presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Bacteriología del Naval Medical Research Unit SOUTH (NAMRU-S), ubicado en la Av. Venezuela S/N cuadra 36, dentro del Centro Médico Naval Cirujano Mayor Santiago Távara (CEMENA).

2.7.2. TIPO DE ESTUDIO.

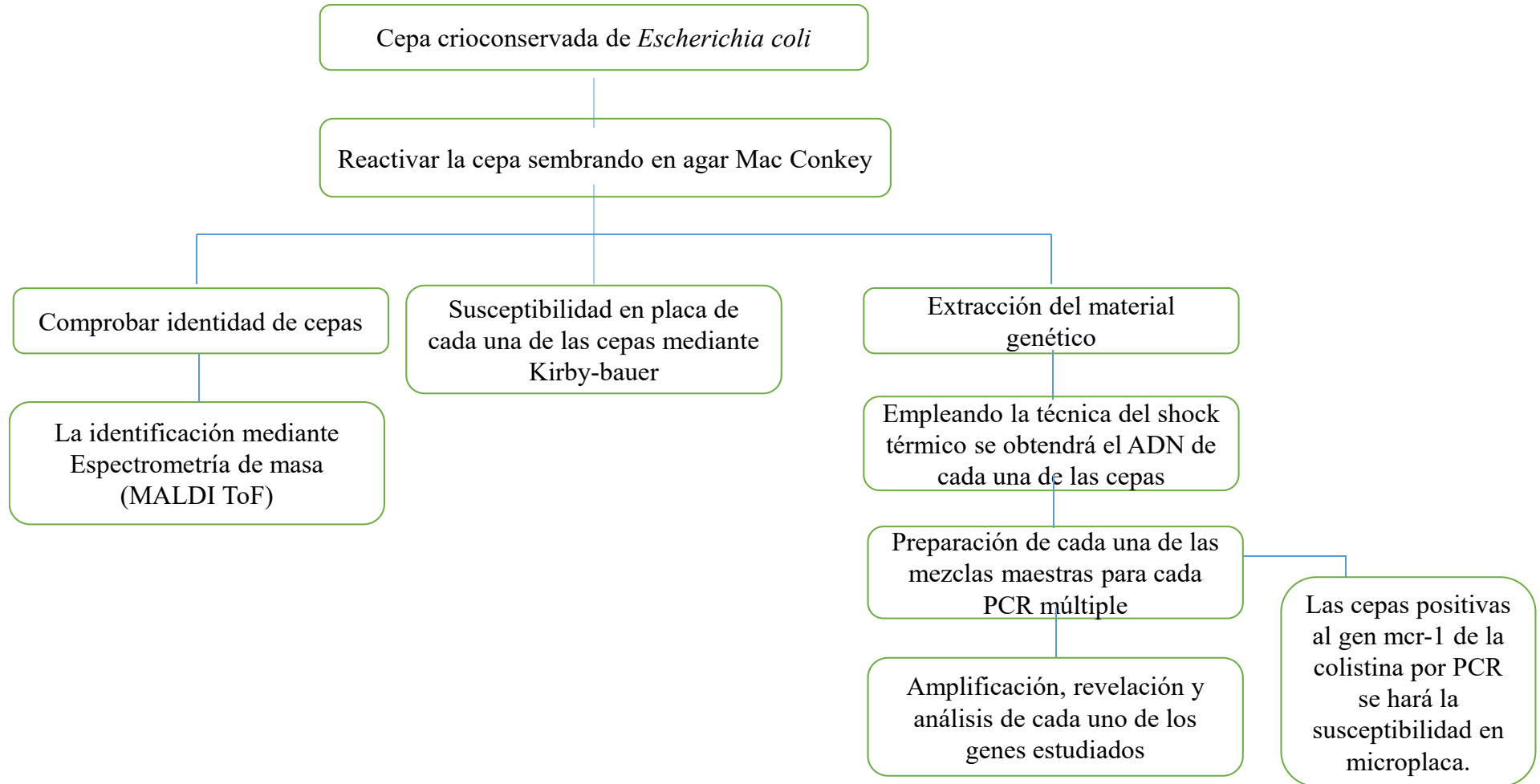
Este trabajo de investigación es del tipo descriptivo.

2.7.3. MUESTREO

El muestreo es no probabilístico de tipo por conveniencia, en el cual se utilizaron 100 cepas de *E. coli*, que deben cumplir con los siguientes criterios de inclusión: tener el

código NSC, estar identificadas como *E. coli*, no proceder de heces y ser seleccionadas entre marzo de 2014 y junio de 2017, debido a las autorizaciones otorgadas del protocolo de investigación "Vigilancia y caracterización de los factores moleculares de resistencia de patógenos bacterianos en US SOUTHCOM AOR" con número de protocolo NAMRU6.2017.0012, y mediante el cual, se lleva a cabo la vigilancia de la resistencia a diferentes antibióticos, principalmente en muestras del grupo ESKAPE-E (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*), todas ellas provenientes de entornos nosocomiales. El presente trabajo de investigación sigue el flujo de trabajo descrito en la Figura 3.

Figura 3.
Flujograma de trabajo.



2.7.4. REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS CRIOCONSERVADAS

Las cepas seleccionadas de *Escherichia coli* se conservaron individualmente a -80°C en criotubos de 2 ml, utilizando caldo Trypticase Soya suplementado con un 10% de glicerol como crioprotector. Para su reactivación, se toma una alícuota de 10 µl con un asa de siembra y se inocula en un medio selectivo de MacConkey. La siembra se realiza por agotamiento, distribuyendo el inóculo sobre la superficie del medio de cultivo para obtener colonias aisladas.

El agar MacConkey es un medio selectivo que permite diferenciar los organismos Gramnegativos en función de su capacidad para fermentar lactosa. La fermentación de lactosa produce ácidos orgánicos, como el ácido láctico, que disminuye el pH del medio. El agar MacConkey contiene rojo neutro (indicador de pH) que se vuelve rosado en condiciones ácidas. Por lo tanto, las bacterias gramnegativas que fermentan lactosa formarán colonias rosadas, mientras que aquellas que no fermentan lactosa formarán colonias opacas y blanquecinas. Este medio es una herramienta eficaz para diferenciar y aislar especies bacterianas Gramnegativas fermentadoras de lactosa a partir de las muestras.

Los componentes clave del medio MacConkey incluyen colorante cristal violeta, sales biliares, lactosa y rojo neutro. El cristal violeta y las sales biliares inhiben el crecimiento de bacterias Grampositivas, mientras que la lactosa actúa como fuente de fermentación. El agar también contiene nutrientes esenciales para el crecimiento de microorganismos. En el caso de *E. coli*, las colonias aparecerán de color rojo o rosa, no mucoides, redondas, con borde regular y acompañadas de un precipitado opaco de sales biliares (indicando una fermentación positiva de lactosa). Por el contrario, si las colonias no fermentan lactosa, serán de color opaco, no mucoides, redondas, con borde regular y sin precipitado de sales biliares (indicando una fermentación negativa de lactosa). (Jung & Hoilat, 2023).

2.7.5. IDENTIFICACIÓN PROTEINICA DE LAS MUESTRAS

2.7.5.1. IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.

La espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización asistida por matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption and ionization time of flight Mass spectrometry: MALDI-TOF MS) (Dingle & Butler-Wu, 2013), es una metodología rápida y potente que se está adoptando en los laboratorios de microbiología clínica para la identificación de microorganismos.

El procedimiento detallado que sigue esta técnica es el siguiente:

- A. **Preparación de los reactivos:** Se realizó de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemania), utilizando la matriz denominada Bruker HCCA, que se compone de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico. Se le debe agregar 250 μ L de solvente orgánico (acetonitrilo 50%, agua 47.5% y ácido trifluoroacético 2.5%). Con la tapa del tubo bien asegurada, la mezcla se lleva a la mezcladora o vortex hasta disolver completamente todos los cristales. Para el estándar de prueba bacteriano (BTS, por sus siglas en inglés), que sirve para la calibración de masa, se reconstituye con 50 μ L del solvente orgánico. El BTS contiene un perfil proteico alfa típico de *Escherichia coli* DH5 y dos proteínas adicionales.
- B. **Preparación de la muestra:** A partir de una colonia fresca en agar MacConkey y con la ayuda de una aguja de siembra, se toma una pequeña cantidad de la colonia y se deposita directamente sobre la placa de acero de análisis (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemania) por duplicado, formando una delgada película. Sobre esta se aplica 1 μ L de la solución matriz HCCA y se deja secar a temperatura ambiente.

La matriz cumple dos roles fundamentales: expone las proteínas intracelulares mediante la ruptura de la membrana celular y facilita la vaporización y la ionización de las

proteínas mediante un haz de láser pulsante. Los espectros se calibraron utilizando el BTS (Bruker Daltonics®), aplicando 1 µL por duplicado sobre la placa, y una vez secos, se añade 1 µL de la matriz HCCA. El registro de cada muestra por duplicado se anota en la hoja de trabajo.

- C. **Identificación mediante la huella espectral:** La placa se coloca en el equipo y el láser se dispara hacia la muestra, ionizándola y acelerando las partículas cargadas a través de un campo eléctrico. Esto permite obtener una relación masa/carga (m/z) para cada proteína ionizada de entre 2000 y 20,000 Daltons. Se mide cada punto usando 1000 disparos de láser a 60 Hz en grupos de 40 disparos por área de muestra. El tiempo de vuelo (ToF) de cada partícula, que depende de su masa y carga, se mide con un detector. Se genera una huella espectral específica del organismo que se compara con miles de perfiles espectrales en una base de datos para identificar el organismo.
- D. **Análisis de los espectros:** Finalmente, el registro de las muestras se introduce en el software MBT Compass-2 y el análisis se realizó utilizando el software flexControl (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemania). Este software permite visualizar el espectro para la identificación del microorganismo evaluado, y los picos obtenidos se comparan con la biblioteca de referencia del MALDI y se les asigna un score. Se consideran válidas las identificaciones con $\text{score} \geq 1.700$ para género y especie, según los criterios aceptados por la literatura internacional. El tiempo aproximado de lectura e interpretación es de 1 minuto por pocillo.
- E. **Evaluación de resultados:** El sistema se clasifica en tres niveles, que se encuentran en la Tabla 1, y son los siguientes:
- Fiable a nivel de especie (relación comparativa entre el perfil del microorganismo y la base de datos ≥ 2)
 - Fiable a nivel de género (puntuación ≥ 1.7 y < 2)

- No fiable (puntuación <1.7). Las identificaciones en esta última categoría se considerarán fallidas.

Tabla 1.

Categorización empleada en la determinación de la especie

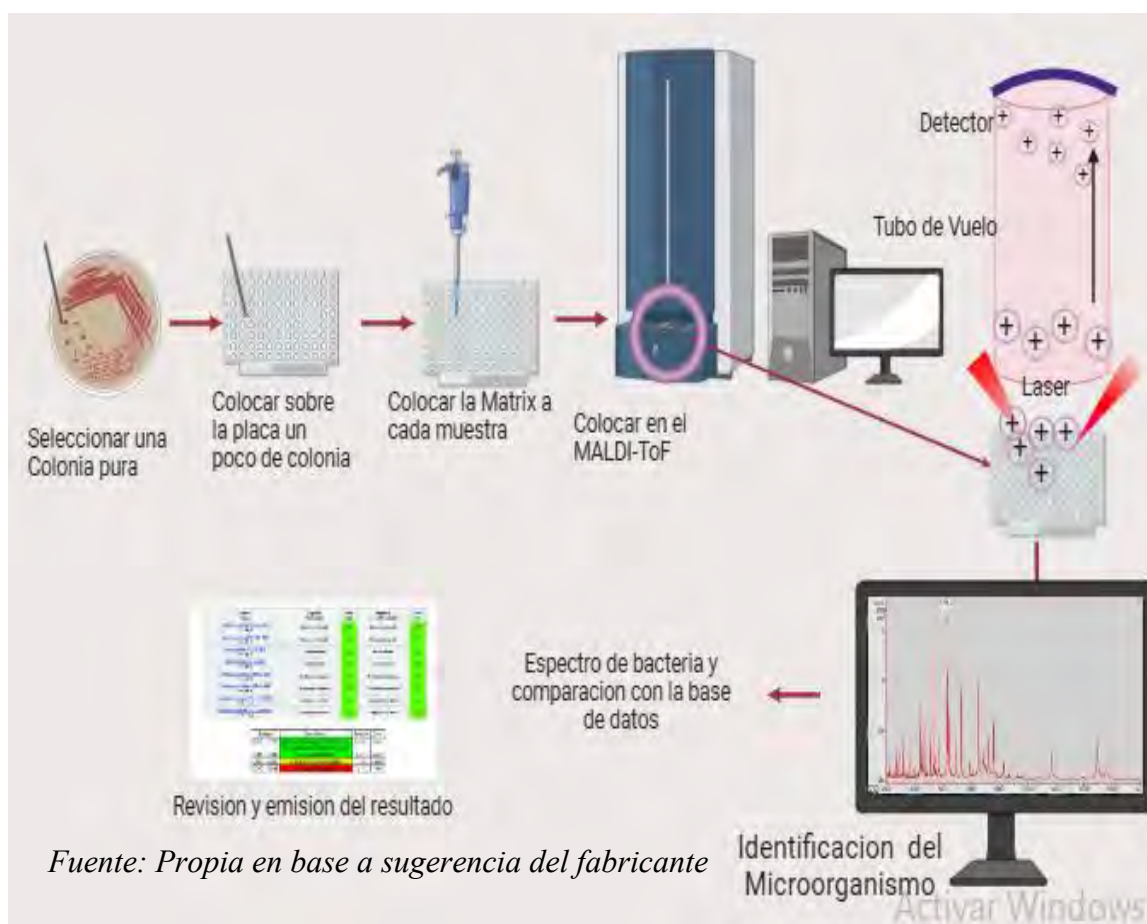
Rango	Interpretación	Símbolo	Color
2.00 – 3.00	Alta confiabilidad en la identificación	(+++)	Verde
1.70 – 1.99	Baja confiabilidad en la identificación	(+)	Amarillo
0.00 – 1.69	Identificación del organismo no posible	(-)	Rojo

Fuente: Propia

El flujo de trabajo se muestra en la Figura 4.

Figura 4.

Identificación bacteriana mediante Maldi-ToF MS.



2.7.6. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

2.7.6.1. SUSCEPTIBILIDAD EN PLACA

La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana se realizó mediante el método de disco difusión o de Kirby-Bauer. Se usó un total de 22 agentes antimicrobianos, agrupados en las siguientes categorías:

- **Antibióticos combinados β -lactámicos:** Amoxicilina-clavulanato, Cefotaxima-clavulanato, Ceftazidima-clavulanato, Ticarcilina-clavulanato, Imipenem-relebactam, Piperacilina-tazobactam, Ceftazidima-avibactam, Meropenem-vaborbactam.
- **Cefalosporinas:** Cefotaxima, Ceftazidima, Cefepima, Ceftriaxona.
- **Monobactámico:** Aztreonam.
- **Carbapenémicos:** Ertapenem, Imipenem.
- **Aminoglucósidos:** Tobramicina, Amikacina, Gentamicina.
- **Tetraciclinas:** Tetraciclina, Minociclina.
- **Fluoroquinolona:** Ciprofloxacina.
- **Antagonista del folato:** Trimetoprima-sulfametoxazol.

El procedimiento para determinar la susceptibilidad por la difusión en disco se describe de acuerdo con el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) M100 (CLSI,2025), y a la norma técnica N°30 del Instituto Nacional de Salud del Perú (INS, 2002).

El método que se empleó es de suspensión directa de la colonia y se describe a continuación:

2.7.6.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se utilizaron cultivos frescos en agar Mac Conkey de las cepas de *E. coli* en estudio, y con la ayuda de un hisopo de algodón estéril, se toman entre 5 a 7 colonias y se hace una suspensión en tubo que contiene 5 ml de 0.85% (peso/volumen) de solución salina y se ajusta la turbidez con ayuda de un densitómetro a 0.5 (± 0.01) de la escala de McFarland.

2.7.6.3. INOCULACIÓN DE LA PLACA

Se utilizaron placas de 150 x 100 mm con Agar Mueller Hinton, como sigue:

Dentro de los 15 minutos después de ajustar la turbidez del inóculo, un hisopo estéril fue sumergido en la suspensión; se gira el hisopo varias veces presionando firmemente en la pared interna del tubo por encima del nivel del líquido para eliminar el exceso de inóculo.

Sobre la superficie de la placa de agar Mueller Hinton, se desliza el hisopo en la superficie en tres direcciones, y asegurar una distribución uniforme del inóculo.

Antes de colocar los discos, se dejó que la placa se seque a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que se absorba el exceso de humedad.

2.7.6.4. APLICACIÓN DE LOS DISCOS ANTIMICROBIANOS

Se emplearon dos plantillas para organizar la disposición de los discos de antibiograma: la **placa de antibiograma N°1** (Figura 5, Tabla 2) y la **placa de antibiograma N°2** (Figura 6, Tabla 3). Estas plantillas se diseñaron para garantizar una distribución homogénea y equitativa de los discos (Figuras 5 y 6). Para cada muestra, se utilizaron dos placas de 150 mm x 100 mm preparadas con agar Mueller Hinton. Los discos se colocaron cuidadosamente sobre la superficie del agar utilizando pinzas estériles y presionándolos suavemente para asegurar un contacto adecuado.

La distribución de los discos fue uniforme, manteniendo una distancia mínima de 25 mm entre ellos para prevenir la superposición de las zonas de inhibición. En el caso de la prueba de sinergia, se siguió el esquema correspondiente a la plantilla de la placa de antibiograma N°1 (Figura 5 y Tabla 2). Este procedimiento permitió evaluar la actividad antimicrobiana y las interacciones entre los discos de forma precisa.

Figura 5.

Disposición de la placa de antibiograma 1.

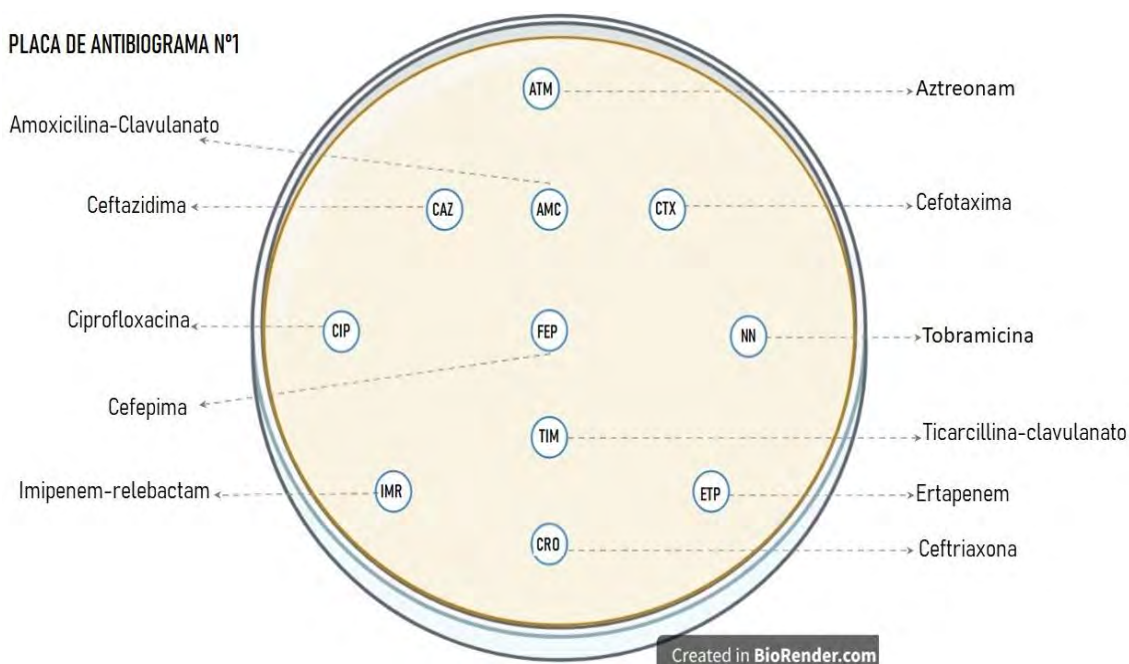


Tabla 2.

Agentes antimicrobianos usados en la placa de antibiograma N°1.

N°	Agente antimicrobiano	Contenido del disco (µg)	Puntos de corte (mm)				Abreviación CLSI
			S	SDD	I	R	
01	Amoxicilina-clavulanato	20/10	≥ 18	–	14–17 [^]	≤ 13	AMC
02	Imipenem-relebactam	10/25	≥ 25	–	21–24 [^]	≤ 20	IMR
03	Ticarcilina-clavulanato	75/10	≥ 20	–	15–19 [^]	≤ 14	TIM
04	Cefepima	30	≥ 25	19–24	–	≤ 18	FEP
05	Cefotaxima	30	≥ 26	–	23–25 [^]	≤ 22	CTX
06	Ceftriaxona	30	≥ 23	–	20–22 [^]	≤ 19	CRO
07	Ceftazidima	30	≥ 21	–	18–20 [^]	≤ 17	CAZ
08	Aztreonam	30	≥ 21	–	18–20 [^]	≤ 17	ATM
09	Ertapenem	10	≥ 22	–	19–21 [^]	≤ 18	ETP
10	Tobramicina	10	≥ 17	–	13–16 [^]	≤ 12	NN
11	Ciprofloxacina	5	≥ 26	–	22–25 [^]	≤ 21	CIP

Figura 6.

Disposición de la placa de antibiograma 2.

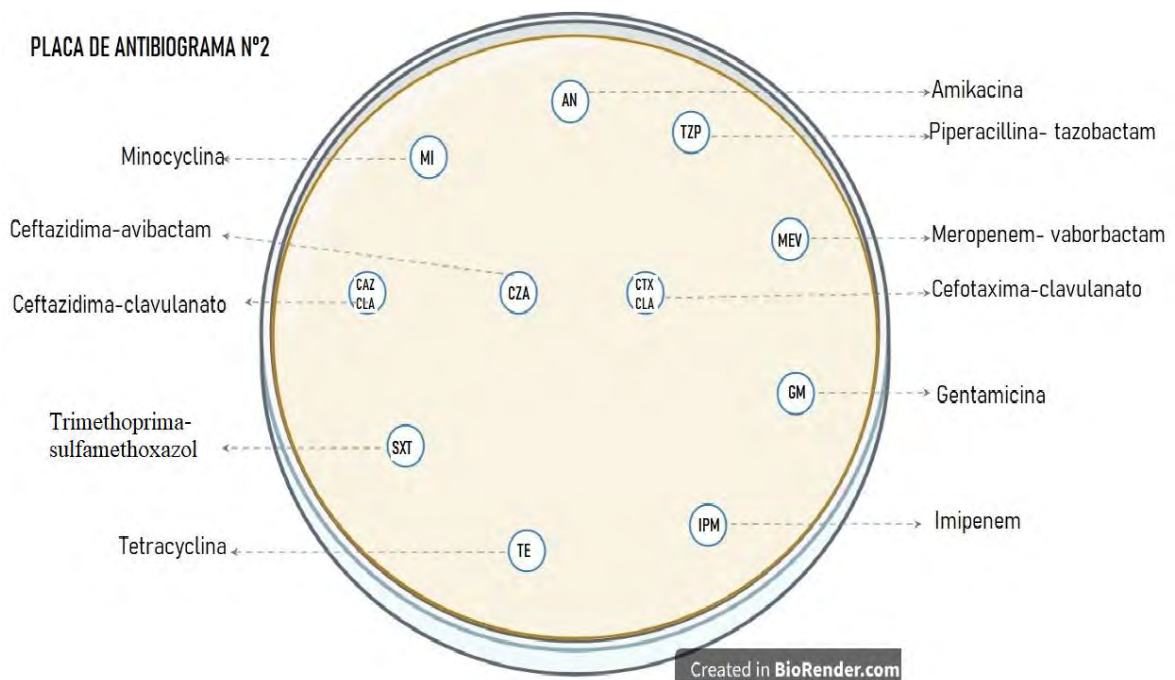


Tabla 3.

Agentes antimicrobianos usados en la placa de antibiograma N°2.

N°	Agente antimicrobiano	Contenido del disco (µg)	Puntos de corte (mm)			Abreviación CLSI
			S	I	R	
01	Ceftazidima-avibactam	30/20	≥ 21	—	≤ 20	CZA
02	Meropenem- vaborbactam	20/10	≥ 18	15–17^	≤ 14	MEV
03	Piperacillina- tazobactam	100/10	≥ 25	21–24^	≤ 20	TZP
04	Cefotaxima-clavulanato	30/10	—	—	—	CTX/CLA
05	Ceftazidima-clavulanato	30/10	—	—	—	CAZ/CLA
06	Imipenem	10	≥ 23	20–22^	≤ 19	IPM
07	Gentamicina	10	≥ 18	15–17^	≤ 14	GM
08	Amikacina	30	≥ 20	17–19^	≤ 16	AN
09	Tetracyclina	30	≥ 15	12–14	≤ 11	TE
10	Minocyclina	30	≥ 16	13–15	≤ 12	MI
11	Trimethoprima- sulfamethoxazol	1.25/23.75	≥ 16	11–15	≤ 10	SXT

2.7.6.5. INCUBACIÓN.

Las placas fueron incubadas de forma invertida y llevadas a la incubadora a 37 °C, de 18 a 24 horas.

2.7.6.6. LECTURA DE LA ZONA DE INHIBICIÓN

Con la ayuda de un vernier se midió los diámetros de las zonas de inhibición completas (incluido el diámetro del disco).

El punto final se consideró el área sin crecimiento visible, sin incluir colonias muy pequeñas que solo pueden detectarse con mucha dificultad en el borde de la zona.

Los diámetros de las inhibiciones se interpretan de acuerdo con las tablas insertadas en los discos de susceptibilidad. Esta información se basa en CLSI, pautas M100-S24.

Sin inhibición, se considera el diámetro del disco

Se anotaron los resultados.

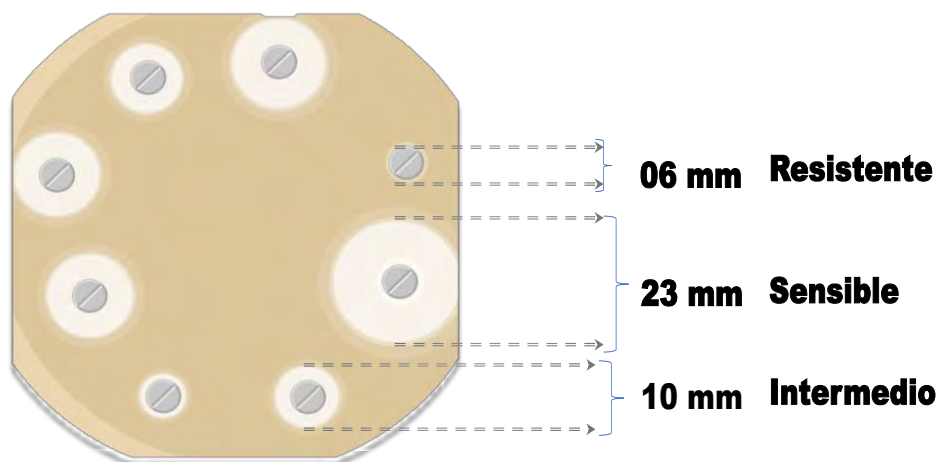
2.7.6.7. INTERPRETACIÓN

La susceptibilidad de cada cepa bacteriana usada en este estudio se informa como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R).

Cuando no hay inhibición, se mide el diámetro del disco (6 mm) y el aislamiento se considera resistente (R) (Figura 7).

Figura 7.

Lectura e interpretación de halos, expresado en milímetros (mm).



La interpretación es específica para cada antibiótico y microorganismo

Algunas cepas de *E. coli* son productoras de estas enzimas (BLEE), pueden presentar halos de inhibición lo suficientemente grandes como para ser clasificadas erróneamente como sensibles a las Cefalosporinas de tercera generación y a Aztreonam. Con el objeto de superar esta dificultad, los diámetros para Ceftazidima, Cefotaxima, Ceftriaxona y Aztreonam que serán utilizados como test de tamizaje y que permiten sospechar la presencia de estas enzimas: Si *E. coli* presenta halos de inhibición, para al menos uno de estos antibióticos, iguales o inferiores a los diámetros referidos en la Figura 8 deberá realizarse una prueba confirmatoria de la presencia de “betalactamasas de espectro extendido”. (INS, 2002).

El cálculo de los puntos de corte o diámetros críticos de cada antibiótico se hizo de acuerdo con la tabla 2A-1 para Enterobacterales del CLSI 2025 (Tabla 4).

Figura 8.

*Diámetros críticos de tamizaje para la detección de BLEE para la familia
Enterobacteriaceae.*

Antibiótico / Concentración	Halo de Inhibición	Acrónimo
Aztreonam 30 mg	≤ 27 mm	ATM
Ceftazidima 30 mg	≤ 22 mm	CAZ
Cefotaxima 30 mg	≤ 27 mm	CTX
Ceftriaxona 30 mg	≤ 25 mm	CRO

Tabla 4.*Puntos de corte usados en la calificación.*

AGENTE ANTIMICROBIANO	Contenido del disco	Puntos de corte de diámetro de zona (mm)				Acrónimo/ Abreviación CLSI	Clase o subclase de droga
		S	SDD	I	R		
AGENTES COMBINADOS β-LACTAMICOS							
Amoxicilina-clavulanato	20/10 µg	≥ 18	–	14–17	≤ 13	AMC	Agente de combinación β-lactámico
Ceftolozano-tazobactam	30/10 µg	≥ 22	–	19–21	≤ 18	C/T	Agente de combinación β-lactámico
Ceftazidima-avibactam	30/20 µg	≥ 21	–	–	≤ 20	CZA	Agente de combinación β-lactámico
Imipenem-relebactam	10/25 µg	≥ 25	–	21–24	≤ 20	IMR	Agente de combinación β-lactámico
Meropenem- vaborbactam	20/10 µg	≥ 18	–	15–17	≤ 14	MEV	Agente de combinación β-lactámico
Piperacilina- tazobactam	100/10 µg	≥ 25	–	21–24	≤ 20	TZP	Agente de combinación β-lactámico
Ticarcillina-clavulanato	75/10 µg	≥ 20	–	15–19	≤ 14	TIM	Agente de combinación β-lactámico
Cefotaxima-clavulanato	30/10 µg	–	–	–	–	CTX/CLA	Agente de combinación β-lactámico
Ceftazidima-clavulanato	30/10 µg	–	–	–	–	CAZ/CLA	Agente de combinación β-lactámico
CEFALOSPORINAS							
Cefepima	30 µg	≥ 25	19–24	–	≤ 18	FEP	Cefalosporina
Cefotaxima	30 µg	≥ 26	–	23–25	≤ 22	CTX	Cefalosporina
Ceftriaxona	30 µg	≥ 23	-	20–22	≤ 19	CRO	Cefalosporina

Ceftazidima	30 µg	≥ 21	–	18–20	≤ 17	CAZ	Cefalosporina
MONOBACTAMICO							
Aztreonam	30 µg	≥ 21	–	18–20	≤ 17	ATM	Monobactámico
CARBAPENÉMICOS							
Ertapenem	10 µg	≥ 22		19–21	≤ 18	ETP	Carbapenémicos
Imipenem	10 µg	≥ 23	–	20–22	≤ 19	IPM	Carbapenémicos
Meropenem	10 µg	≥ 23	–	20–22	≤ 19		
AMINOGLUCÓSIDOS							
Gentamicina	10 µg	≥ 18	–	15–17	≤ 14	GM	Aminoglucósido
Tobramicina	10 µg	≥ 17	–	13–16	≤ 12	NN	Aminoglucósido
Amikacina	30 µg	≥ 20	–	17–19	≤ 16	AN	Aminoglucósido
TETRACICLINAS							
Tetracyclina	30 µg	≥ 15	–	12–14	≤ 11	TE	Tetraciclinas
Minocyclina	30 µg	≥ 16	–	13–15	≤ 12	MI	Tetraciclinas
QUINOLONAS Y FLUOROQUINOLONAS							
Ciprofloxacina	5 µg	≥ 26	–	22–25^	≤ 21	CIP	Fluoroquinolona
ANTAGONISTAS DE LA VÍA DEL FOLATO							
Trimethoprima-sulfamethoxazol	1.25/23.75 µg	≥ 16	–	11–15	≤ 10	SXT	Antagonista de la vía del folato
LIPOPEPTIDOS							
Colistina		–	–	≤ 2	4	CL	

Fuente: CLSI 2025, 35^{va} Edición, M100 Normas de rendimiento para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Tabla 2A-1 Enterobacterales (excluyendo a Salmonella y Shigella spp).

S = Sensible

SDD = Sensible Dosis Dependiente

I = Intermedio

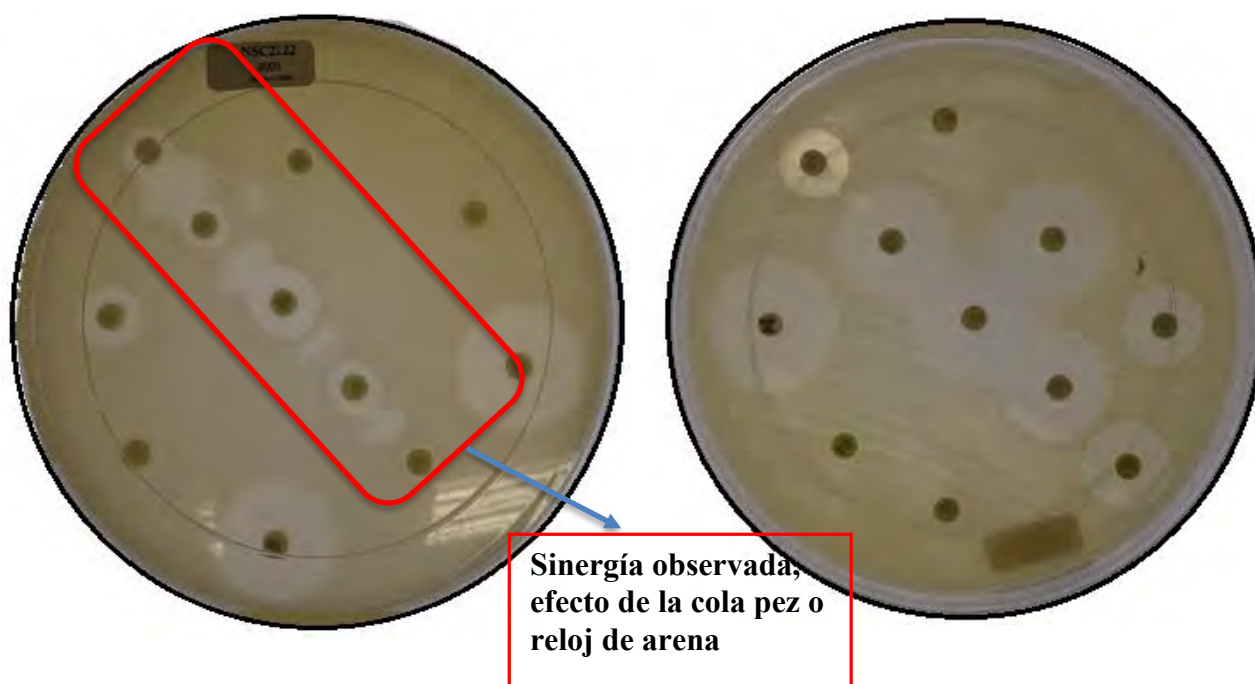
R = Resistente

La prueba que confirma la presencia de “betalactamasas de espectro extendido” (según el CLSI – Estados Unidos de Norteamérica), requiere el uso de discos habituales de Ceftazidima (30 mg), Cefotaxima (30 mg), así como de Ceftazidima/Ácido Clavulánico (30/10 mg) y Cefotaxima/Ácido Clavulánico (30/10 mg), con los que se realiza la prueba de sinergia de doble disco (PSDD) (Figura 9) una prueba de disco difusión sin ninguna variante. Si los discos de Ceftazidima/Ácido Clavulánico y Cefotaxima/Ácido Clavulánico presentan zonas de inhibición superiores 5 mm a aquellos producidos por los discos de Ceftazidima y Cefotaxima, respectivamente, se considera la prueba como positivo. (INS, 2002).

La prueba que confirma la presencia de “betalactamasas de espectro extendido” (según el Comité de Antibiógrama de la Sociedad Francesa de Microbiología), requiere el uso de discos habituales de Amoxicilina/Ácido Clavulánico (20/10 mg), Ceftazidima (30 mg) y/o Cefotaxima (30 mg) y/o Aztreonam (30 mg) y/o Ceftriaxona, con los que se realiza un test de disco difusión sin ninguna variante, los discos de Ceftazidima, Aztreonam, Cefotaxima y Ceftriaxona se disponen a 30 mm del disco de Amoxicilina/Ácido Clavulánico (distancia de centro a centro de los discos). Si una imagen de sinergia aparece entre el disco Amoxicilina/Ácido Clavulánico y los discos de Ceftazidima y/o Aztreonam y/o Cefotaxima y/o Ceftriaxona, esta prueba se considera como positivo. Deben ser reportadas como resistentes a todas las penicilinas, las cefalosporinas de todas las generaciones (incluyendo los de cuarta generación) y al Aztreonam, cualquiera que sea el diámetro de los discos de estos antibióticos (INS, 2002).

Figura 9.

Prueba de sinergia de doble disco.



Fuente: En base a lo establecido en el NAMRU-S.

2.7.6.8. CONTROL DE CALIDAD

Se hizo usando la cepa control: *Escherichia coli* ATCC 25922.

Esta cepa es susceptible a todos los antibióticos y negativa para BLEE, pasando así el control de calidad interno.

2.7.7. PROTOCOLO DE MICRODILUCIÓN EN PLACA

Para evaluar la susceptibilidad a la colistina, el método de microdilución en caldo (MDC) es actualmente el más recomendado según los estándares internacionales del CLSI. Este método permite una evaluación precisa de la actividad del antibiótico mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (CLSI, 2025).

En el caso del kit comercial ComASP Colistin de Liofilchem, que incluye un panel para cuatro pruebas con 7 diluciones del antibiótico seco (rango de 0,25 a 16 µg/ml), es

fundamental seguir cuidadosamente el protocolo proporcionado por el fabricante para garantizar resultados precisos.

Este protocolo es como sigue:

2.7.7.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

La preparación de la suspensión Bacteriana se hizo utilizando un cultivo fresco en agar Mac Conkey de las cepas de *E. coli*, se tomó entre 5 a 7 colonias aisladas utilizando un hisopo estéril. Estas colonias fueron inoculadas en un tubo contiene 5 mL de solución salina al 0.85% (p/v). haciendo una suspensión al 0.5 ± 0.01 en la escala de McFarland, este procedimiento se hizo utilizando un densitómetro.

La preparación de la dilución 1:20 (Solución A), se hizo tomando 150 μ L de la suspensión preparada previamente y se diluyó en 2850 μ L de solución salina, esta solución se homogenizó utilizando un vortex.

La solución B se hizo tomando 400 μ L de la Solución A y se agregó al tubo que contiene 3.6 mL de caldo Mueller Hinton II (provisto en el kit ComASP Colistin), luego es homogeneizado en el vortex.

2.7.7.2. INOCULACIÓN DE LA PLACA

Toda la solución B es vertida dentro de recipiente estéril y con la ayuda de una micropipeta multicanal, 100 μ L de solución B es dispensada en cada pocillo del panel ComASP Colistin.

2.7.7.3. INCUBACIÓN

La placa de microdilucion ComASP Colistin son colocados en una estufa a 36°C (± 2) e incubadas durante 16 a 20 horas.

2.7.7.4. LECTURA DE LOS RESULTADOS

Al término del tiempo de incubación de los paneles ComASP colistin, los resultados fueron leídos a simple vista, con la ayuda de una iluminación brillante e indirecta, para luego los resultados fueron anotados.

2.7.7.5. INTERPRETACIÓN

La presencia de crecimiento en el primer pozo que corresponde al pozo de control de crecimiento es observada en cada panel permitiendo que la prueba se considere válida.

Luego cada pozo es observado considerando la presencia de turbidez o un botón en el fondo del pozo como el de crecimiento bacteriano, y se determina la MCI registrando el pozo en el cual se inhibe completamente el crecimiento de *E. coli*. (Figura 10).

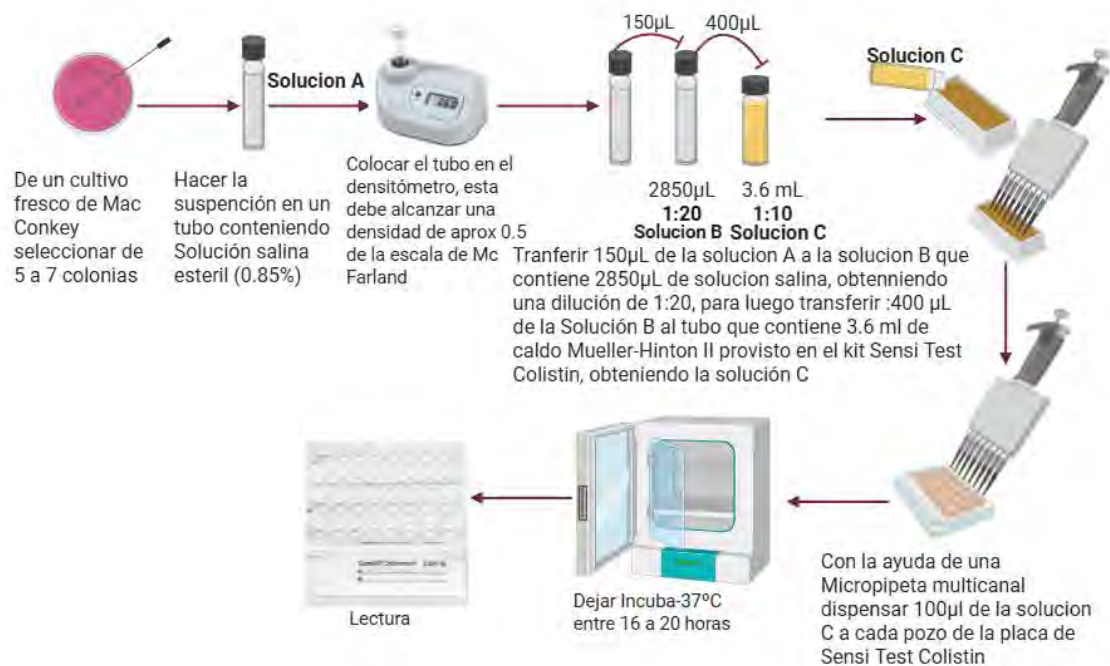
2.7.7.6. CONTROL DE CALIDAD

Para realizar el control de calidad para el kit de ComASP Colistin, se utilizaron dos cepas de referencia.

Escherichia coli ATCC 25922, que es susceptible a la colistina y el rango aceptable de MIC es 0.25–2 µg / mL.

Escherichia coli NCTC 13846 (mcr-1 positiva), es resistente a la colistina, el valor de MCI ≤ 2 µg/mL es considerado intermedio y ≥ 4 µg/mL es considerado resistente. Estas dos cepas fueron colocadas durante el desarrollo de la prueba, obteniendo los valores dentro del control de calidad interno.

Figura 10.
Microdilución en placa.



Fuente: Propia en base a sugerencia de fabricante

2.8. ANÁLISIS DEL MATERIAL GENÉTICO

2.8.1. EXTRACCIÓN DE ADN DE *E. coli*.

La extracción del ADN de cada una de las cepas de *E. coli* se realizó usando la técnica del shock térmico, el cual se realiza de la siguiente manera:

Se dispensó 500µL de agua libre de nucleasas en microtubos de 1.5 ml de capacidad, previamente etiquetadas.

Con la ayuda de un hisopo de drakón, se seleccionaron entre 5 a 7 colonias de cada cepa, a razón de 1:5 por muestra y se colocó dentro de cada microtubo, haciendo una suspensión homogénea.

Esta suspensión de células es sometida a un bloque de calor seco (previamente calentado) a 100°C por 10 minutos.

Inmediatamente transcurrido este tiempo, es colocada dentro de un recipiente que contenga la suficiente cantidad de hielo, y se dejó por 10 minutos.

Los microtubos fueron centrifugados a 10.000 rpm por 2 minutos.

El sobrenadante es trasvasado a un nuevo tubo previamente rotulado y se conservó a -20°C, hasta su uso.

Este método de extracción, basado en el shock térmico, ayuda a liberar el ADN de las células bacterianas y facilita su análisis en aplicaciones de biología molecular. Además, destaca por su bajo costo.

2.8.2. CUANTIFICACIÓN DEL ADN.

El proceso de cuantificación del ADN se llevó a cabo mediante espectrofotometría utilizando el NanoDrop 2000. Para cada una de las 100 muestras evaluadas, se realizó la medición por duplicado y se calculó el valor promedio de la concentración de ADN en ng/μL. Los valores obtenidos variaron entre 50 y 70 ng/μL, obteniéndose una A260/A280 de entre 1.8 a 2.0, lo que sugiere la pureza del ADN.

2.8.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA MÚLTIPLE

Para la detección de genes diarreagénicos, genes β-lactámicos y genes de resistencia a la colistina, se utilizarán cebadores específicos que se detallan en el Anexo 3. Estos cebadores son esenciales para la amplificación y detección de las secuencias de ADN de interés relacionadas con cada uno de estos grupos de genes.

2.8.4. PROTOCOLOS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y CICLAJES

La polimerasa utilizada para las reacciones de PCR es la AmpliTaq Gold 360 Master Mix. La composición de este producto incluye: AmpliTaq Gold DNA Polymerase a 250 U (0.05 U/μL), GeneAmp PCR Gold Buffer (30 mM Tris / HCl, pH 8.05; 100 mM KCl); 400 μM de dNTPs; 5mM de MgCl₂ .

Cada reacción de PCR se realiza en un volumen final de 25 µL, utilizando cebadores específicos (Anexo 3). Los cebadores están designados como sigue:

- **Cebador F (Sentido):** 5' → 3'
- **Cebador R (Antisentido):** 3' → 5'

Estos cebadores son cruciales para la amplificación de las secuencias de ADN que codifican para genes diarreagénicos, genes β-lactámicos y genes de resistencia a la colistina.

2.8.5. AMPLIFICACIÓN DE GENES DE *E. coli* ENTEROTOXIGÉNICA, PATOGENICA Y DIFUSAMENTE ADHERENTE (MULTI – 1).

La Tabla 5 describe la de mezcla de reacción para PCR dirigida a detectar genes específicos en tres patotipos de *Escherichia coli*: enterotoxigénica (ECET), enteropatogénica (ECEP) y difusamente adherente (ECDA), utilizando una estrategia de PCR múltiplex (MULTI-1). Este tipo de PCR permite amplificar simultáneamente varios genes en una misma reacción, aumentando la eficiencia y reduciendo el tiempo necesario para la detección de múltiples objetivos genéticos. Los componentes y sus funciones en la reacción son:

- AmpliTaq Gold 360 Master Mix 2X (12,5 µL): Este es el reactivo base de la mezcla de PCR, que contiene la enzima Taq polimerasa, dNTPs y buffer o tampón necesario para la amplificación. Se usa en una concentración 1X en la mezcla final.
- Agua PCR (4,5 µL): Aporta el volumen necesario para ajustar la mezcla a 25 µL.
- Cebadores específicos: Estos son fragmentos de ADN específicos que permiten identificar genes característicos de cada patotipo. La reacción múltiple amplifica para cinco genes: **stIa**, **stIb**, **It**, **eaeA** y **daaD**. Para la detección de los genes **stIa** y **stIb** asociados a *E. coli* enterotoxigénica (ECET), se usan el par de cebadores: **stIa** y **stIb** (0,5 µL cada uno) y el cebador **stREV** (1 µL), el cual actúa como reverso para ambos genes **stIa** y **stIb**, contribuyendo a la amplificación de estos en una sola reacción. El gen **It** (otro marcador de ECET) es amplificado con los cebadores **It F** y **It R** (0,5 µL cada uno). Para amplificar el

gen **eaeA**, se usan los cebadores **eaeA F** y **eaeA R** (0,5 µL cada uno), este gen es característico de *E. coli* enteropatogénica (ECEP). Para el gen **daaD**, asociado con *E. coli* difusamente adherente (ECDA) se incluyen a la reacción los cebadores **daaD F** y **daaD R** (0,5 µL cada uno).

- Muestra (3 µL): Es el ADN extraído de la muestra en estudio.
- Volumen final de reacción: La mezcla total es de 25 µL.

Tabla 5.

Mezcla de reacción para la PCR MULTI-1, para los patotipos de E. coli enterotoxigénica, enteropatogénica y difusamente adherente.

REACTIVOS	CANTIDAD (µL)	CONCENTRACIÓN FINAL (µM)
AmpliTaq Gold 360 Master Mix 2X	12,5	1X
Agua para PCR	4,5	-
stIa [10µM]	0,5	0,2
stIb [10µM]	0,5	0,2
stREV [10µM]*	1	0,4
It F [10µM]	0,5	0,2
It R [10µM]	0,5	0,2
eaeA F [10µM]	0,5	0,2
eaeA R [10µM]	0,5	0,2
daaD F [10µM]	0,5	0,2
daaD R [10µM]	0,5	0,2
TOTAL	22	
Muestra	3	-
FINAL	25	

**El cebador st-REV es un cebador múltiple, ya que actúa amplificando tanto el stIa como el stIb*

2.8.6. CICLAJE PARA MULTI - 1:

El protocolo de ciclaje MULTI-1 que se muestra en la Tabla 6 para amplificación de genes relacionados con patotipos de *E. coli* (enterotoxigénica, patogénica y difusamente adherente), se organiza en varias etapas que permiten una amplificación eficiente y específica para los genes de interés.

Detalle del Protocolo de Ciclaje MULTI-1:

Pre-Denaturación (95°C, 5 minutos): este paso inicial tiene como objetivo desnaturalizar completamente el ADN de la muestra, separando las hebras y activando la Taq polimerasa.

Ciclo de Amplificación (40 ciclos): Etapa 1 (10 ciclos): denaturación (95°C, 1 minuto): desnaturalización del ADN, separando las hebras para permitir que los cebadores se unan a las secuencias objetivo. Hibridación (65°C, 1 minuto): los cebadores se unen a sus secuencias complementarias en el ADN. Extensión (72°C, 1 minuto): la Taq polimerasa extiende los cebadores, sintetizando nuevas cadenas de ADN. Etapa 2 (20 ciclos): denaturación (95°C, 30 segundos): desnaturalización breve para mantener la reacción eficiente. Hibridación (59°C, 30 segundos): temperatura de hibridación más baja para aumentar la especificidad en la unión de los cebadores. Extensión (72°C, 30 segundos): la polimerasa sintetiza los productos de ADN. Etapa 3 (10 ciclos): denaturación (95°C, 30 segundos): breve desnaturalización para asegurar la amplificación continua. Hibridación (55°C, 30 segundos): temperatura aún más baja para aumentar la especificidad. Extensión (72°C, 30 segundos): la Taq polimerasa termina de sintetizar los productos deseados.

Extensión Final (72°C, 5 minutos): este paso final asegura que todas las cadenas de ADN sintetizadas se completen por completo, y los fragmentos generados sean de longitud completa.

Mantenimiento (4°C, ∞): después de la amplificación, el ADN se mantiene a 4°C hasta su posterior análisis o almacenamiento.

Para la detección de genes en las pruebas de la PCR, se emplearon los siguientes controles:

Controles Positivos:

- **ATCC 35401:** *E. coli* (ECET)

- **ATCC 43887:** *E. coli* (ECEP)
- **Cepa Referencial ECDA:** Cepa con genes específicos para comparación

Controles Negativos:

- **ATCC 25922:** *E. coli* (sin resistencia a los genes específicos)
- **Agua libre de nucleasas:** Control de reactivo para verificar la ausencia de contaminación en los reactivos.

Estos controles son esenciales para confirmar la precisión y fiabilidad de los resultados obtenidos en las pruebas para la PCR (Anexo 11).

Tabla 6.
Ciclaje de amplificación de MULTI-1.

Pre Denaturación		95°C	5 minutos
AMPLIFICACIÓN			
Denaturación	10 ciclos	95°C	1 minuto
Hibridación		65°C	1 minuto
Extensión		72°C	1 minuto
Denaturación	20 ciclos	95°C	30 segundos
Hibridación		59°C	30 segundos
Extensión		72°C	30 segundos
Denaturación	10 ciclos	95°C	30 segundos
Hibridación		55°C	30 segundos
Extensión		72°C	30 segundos
EXTENSIÓN FINAL		72°C	5 minutos
Mantener		4°C	∞

2.8.7. AMPLIFICACIÓN DE GENES DE *E. coli* ENTEROINVASIVA, ENTEROAGREGATIVA Y SHIGA-TOXINA (MULTI – 2):

La Tabla 7 proporciona la mezcla de reacción para PCR dirigida a identificar genes específicos de tres patotipos de *Escherichia coli*: enteroinvasiva (ECEI), enteroagregativa (ECEA) y productora de toxina Shiga (ECEH). Esta PCR múltiplex (MULTI-2) permite detectar genes característicos de cada patotipo en una sola reacción, haciendo eficiente la identificación de estos patógenos.

Componentes de la Mezcla para MULTI-2:

- AmpliTaq Gold 360 Master Mix 2X (12,5 μ L): Base de la mezcla de PCR, que incluye Taq polimerasa, dNTPs, y buffer para la reacción, en una concentración final de 1X.
- Agua para PCR (5,5 μ L): Añadida para ajustar el volumen de la mezcla de reacción a un total de 25 μ L.
- Cebadores específicos: aggR F y aggR R (0,5 μ L cada uno, a 20 μ M): dirigidos al gen *aggR*, un marcador característico de *E. coli* enteroagregativa (ECEA), cebadores ipaH F y ipaH R (0,5 μ L cada uno, a 10 μ M) dirigidos al gen *ipaH*, específico de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC). Cebadores stx1 F y stx1 R (0,5 μ L cada uno, a 10 μ M): para el gen *stx1*, asociado con *E. coli* productora de toxina Shiga (ECEH). Cebadores stx2 F y stx2 R (0,5 μ L cada uno, a 10 μ M): dirigidos al gen *stx2*, otro marcador importante en la identificación de ECEH.
- Muestra (3 μ L): ADN de la muestra en estudio para detectar la presencia de los genes objetivo.
- Volumen Final de Reacción: La mezcla total es de 25 μ L, incluyendo 22 μ L de mezcla de reacción y 3 μ L de la muestra de ADN.

Tabla 7.

Mezcla de reacción para la PCR para los patotipos de E. coli enteroinvasiva, enteroagregativa y enterohemorrágica (MULTI-2).

REACTIVOS	CANTIDAD (μ L)	CONCENTRACIÓN FINAL (μ M)
AmpliTaq Gold 360 Master Mix 2X	12,5	1X
Agua para PCR	5,5	-
aggR F [20 μ M]	0,5	0,4
aggR R [20 μ M]	0,5	0,4
ipaH F [10 μ M]	0,5	0,2
ipaH R [10 μ M]	0,5	0,2
stx1 F [10 μ M]	0,5	0,2
stx1 R [10 μ M]	0,5	0,2
stx 2 F [10 μ M]	0,5	0,2
stx 2 R [10 μ M]	0,5	0,2
TOTAL	22	
Muestra	3	-
FINAL	25	

2.8.8. CICLAJE PARA MULTI-2:

El protocolo de ciclaje de la PCR MULTI-2 (Tabla 8) está diseñado para amplificar genes específicos de *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), enteroagregativa (ECEA) y productora de toxina Shiga (ECEH). En este caso, el programa de ciclaje es menos complejo que el de MULTI-1, ya que utiliza un único conjunto de condiciones de hibridación y extensión para todos los ciclos.

Detalles del Programa de Ciclaje MULTI-2

- Pre-Denaturación (95°C, 5 minutos): Se inicia el programa elevando la temperatura para desnaturalizar el ADN de la muestra y activar la Taq polimerasa.
- Ciclo de Amplificación (30 ciclos): Desnaturalización (95°C, 1 minuto): Separa las hebras de ADN en cada ciclo, permitiendo el acceso de los cebadores a sus sitios específicos. Hibridación (55°C, 1 minuto): Permite que los cebadores específicos de los genes aggR, ipaH, stx1 y stx2 se unan a las secuencias objetivo. Extensión (72°C, 1 minuto): La Taq polimerasa extiende la nueva cadena de ADN, replicando el fragmento de interés.
- Extensión Final (72°C, 5 minutos): Una extensión final asegura que todos los productos de PCR se completen totalmente.
- Mantenimiento (4°C, ∞): La reacción se mantiene a 4°C hasta que los productos de PCR puedan ser analizados o almacenados.

Para la detección de genes en las pruebas de PCR, se utilizaron los siguientes controles:

Controles Positivos:

- ATCC 29552: *E. coli* (ECEA)
- ATCC 43894: *E. coli* (ECEH)
- ATCC 43893: *E. coli* (ECEI)
-

Controles Negativos:

- **ATCC 25922:** *E. coli* (sin resistencia a los genes específicos)
- **Agua libre de nucleasas:** Control de reactivo para asegurar la ausencia de contaminación en los reactivos.

Estos controles aseguran la validez de las pruebas PCR y la precisión en la detección de los genes de interés (Anexo 11).

Tabla 8.

Ciclaje de amplificación de MULTI-2.

Pre Denaturación		95°C	5 minutos
AMPLIFICACIÓN:			
Denaturación	30 ciclos	95°C	1 minuto
Hibridación		55°C	1 minuto
Extensión		72°C	1 minuto
EXTENSIÓN FINAL		72°C	5 minutos
Mantener		4°C	∞

2.8.9. AMPLIFICACIÓN DE GENES RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS Y AL GEN DE RESISTENCIA A LA COLISTINA *mcr-1*:

La Tabla 9 detalla la mezcla de PCR para la detección de genes de resistencia a carbapenémicos (como los genes de β -lactamasas de tipo **blaIMP**, **blaVIM**, **blaNDM** y **blaKPC**) y el gen de resistencia a colistina *mcr-1*. Cabe indicar que los genes **blaIMP**, **blaVIM** y **blaNDM** pertenecen al grupo molecular B de las β -lactamasas. La mezcla de PCR está formulada para detectar múltiples genes de resistencia en una sola reacción múltiple, lo cual es esencial para el análisis rápido de patógenos resistentes.

Componentes de la mezcla para PCR:

AmpliTaq Gold 360 Master Mix 2X (12,5 μ L): Base de la mezcla, que contiene Taq polimerasa, dNTPs y buffer o tampón necesarios para la reacción en una concentración final de 1X.

Agua para PCR (4,5 μ L): Agregada para ajustar el volumen total de la mezcla de reacción a 25 μ L.

Cebadores específicos para genes de resistencia: blaIMP-F y blaIMP-R (1 µL cada uno a 10 µM), son los cebadores para amplificar el gen **blaIMP**, asociado con la resistencia a carbapenémicos. Los cebadores blaVIM-F y blaVIM-R (0,5 µL cada uno a 3 µM): para el gen **blaVIM**, también relacionado con la resistencia a carbapenémicos. Los cebadores blaNDM-F y blaNDM-R (0,5 µL cada uno a 4 µM): dirigidos al gen **blaNDM**, otro marcador de resistencia a carbapenémicos. Los cebadores blaKPC-F y blaKPC-R (0,5 µL cada uno a 3 µM), para el gen **blaKPC**, ampliamente conocido por su asociación con resistencia a carbapenémicos. Los cebadores mcr-1-F y mcr-1-R (0,5 µL cada uno a 2 µM) para el gen *mcr-1*, que confiere resistencia a colistina, un antibiótico de última línea, el gen amplificado es de resistencia a la colistina movilizadora-1 (**mcr-1**).

Muestra (3 µL): ADN de la muestra en estudio para analizar la presencia de estos genes de resistencia.

Volumen final de reacción: La mezcla total es de 25 µL, con 22 µL de mezcla de reacción y 3 µL de muestra de ADN.

Tabla 9.

Mezcla de reacción para PCR amplificar genes resistentes a Carbapenémicos y al gen de resistencia a la colistina mcr-1.

REACTIVOS	CANTIDAD (µL)	CONCENTRACIÓN FINAL (µM)
AmpliTaq Gold 360 Master Mix 2X	12,5	1X
Agua de PCR	4,5	-
Primer blaIMP F [10µM]*	1	0,4
Primer blaIMP R [10µM]*	1	0,4
Primer blaVIM F [3µM]*	0,5	0,06
Primer blaVIM R [3µM]*	0,5	0,06
Primer blaNDM F [4µM]*	0,5	0,08
Primer blaNDM R [4µM]*	0,5	0,08
Primer blaKPC F [3µM]	0,5	0,06
Primer blaKPC R [3µM]	0,5	0,06
mcr-1 F [2µM]	0,5	0,04
mcr-1 R [2µM]	0,5	0,04
TOTAL	22	

Muestra	3	-
FINAL	25	

**: cebadores que amplifican genes pertenecientes al grupo molecular B de las β -lactamasas.*

2.8.10. CICLAJES PARA GENES CARBAPENÉMICOS Y EL GEN **mcr-1**.

El protocolo de ciclaje de PCR para la detección de genes de resistencia a carbapenémicos (**blaIMP**, **blaVIM**, **blaNDM**, **blaKPC**) y colistina (**mcr-1**) que se muestra en la Tabla 10 está diseñado para amplificar estos genes específicos en una única reacción múltiplex. Este programa de ciclaje incluye ajustes de temperatura y número de ciclos específicos para mejorar la eficiencia de amplificación de los distintos genes de resistencia.

Destalles del programa de ciclaje:

- Pre-Denaturación (95°C, 5 minutos): este paso inicial desnatura el ADN y activa la Taq polimerasa para prepararla para los ciclos de amplificación.
- Ciclo de Amplificación en Dos Etapas: Etapa 1 (10 ciclos): desnaturalización (95°C, 1 minuto): separa las hebras de ADN. Hibridación (60°C, 1 minuto): permite que los cebadores se unan a las secuencias objetivo. Extensión (72°C, 1 minuto): la Taq polimerasa sintetiza las nuevas hebras de ADN. Etapa 2 (25 ciclos): Desnaturalización (95°C, 1 minuto): continúa separando las hebras de ADN en cada ciclo. Hibridación (57,5°C, 1 minuto): Una temperatura de hibridación ligeramente menor facilita la unión de todos los cebadores a sus secuencias objetivo. Extensión (72°C, 1 minuto): Completa la extensión de cada fragmento de ADN en cada ciclo.
- Extensión Final (72°C, 10 minutos): asegura que todas las cadenas de ADN recién sintetizadas se completan.
- Mantenimiento (4°C, ∞): la reacción se mantiene a 4°C hasta su uso.

Para asegurar la validez y precisión de la prueba, se usaron los siguientes controles:

Controles Positivos:

- **NCTC 13476 *Escherichia coli***: Cepa con el gen IMP (metalo-beta-lactamasa).
- **ATCC 13437 *Pseudomonas aeruginosa***: Cepa con el gen VIM (metalo-beta-lactamasa).
- **ATCC BAA 2146 *Klebsiella pneumoniae***: Cepa con el gen NDM (metalo-beta-lactamasa).
- **ATCC BAA 1705 *Klebsiella pneumoniae***: Cepa con el gen KPC (carbapenemasa de tipo KPC).
- **NCTC 13846 *Escherichia coli***: Cepa con el gen mcr-1 (resistencia a colistina).

Control Negativo:

- **ATCC 25922 *Escherichia coli***: Cepa de referencia sin resistencia a los genes específicos.
- **Agua libre de nucleasas**: Usada como control de reactivo para asegurar que no haya contaminación en los reactivos utilizados.

Estos controles son esenciales para verificar la correcta ejecución del protocolo y la fiabilidad de los resultados obtenidos en las pruebas de PCR (Anexo 11).

Tabla 10.

Ciclaje de amplificación para genes Carbapenémicos y el gen de la colistina mcr-1.

Pre Denaturación		95°C	5 minutos
AMPLIFICACIÓN			
Denaturación		95°C	1 minuto
Hibridación	10 ciclos	60°C	1 minuto
Extensión		72°C	1 minuto
Denaturación		95°C	1 minuto
Hibridación	25 ciclos	57,5°C	1 minuto
Extensión		72°C	1 minuto
EXTENSIÓN FINAL		72°C	10 minutos
Mantener		4°C	∞

2.8.11. AMPLIFICACIÓN DE GENES RESISTENTES A LOS β -LACTÁMICOS

La mezcla de reacción para la PCR de genes de resistencia a β -lactámicos (Tabla 11) está diseñada para amplificar genes específicos de β -lactamasas del grupo A, como **blaTEM**, **blaSHV**, y **blaCTX-M**, que están asociados con la resistencia a antibióticos β -lactámicos. Este protocolo permite la detección rápida de estos genes en una sola reacción de PCR.

Componentes de la Mezcla para la PCR de β -Lactamasas Grupo A:

- AmpliTaq Gold 360 Master Mix 2X (12,5 μ L): Proporciona Taq polimerasa, dNTPs y buffer en una concentración final de 1X, necesarios para llevar a cabo la PCR.
- Agua para PCR (5,5 μ L): Usada para ajustar el volumen total de la mezcla a 22 μ L.
- Cebadores específicos para genes de β -lactamasa: Cebadores que amplifican el gen **blaTEM**: TEM-F y TEM-R (0,5 μ L cada uno, a 5 μ M), responsable de la resistencia a ciertos β -lactámicos. Cebadores SHV-F y SHV-R (0,5 μ L cada uno, a 5 μ M), dirigidos al gen **blaSHV**, otro gen que confiere resistencia a β -lactámicos. Cebadores para el gen **blaCTX-M**: CTX-M-F y CTX-M-R (1 μ L cada uno, a 10 μ M), gen que es relevante en cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación.
- Muestra (3 μ L): ADN de la muestra a analizar para la detección de estos genes de resistencia.
- Volumen Final de Reacción: La mezcla completa es de 25 μ L, incluyendo 22 μ L de mezcla de reacción y 3 μ L de ADN de muestra.

Tabla 11.*Mezcla de reacción para PCR de β -Lactamasa grupo A*

REACTIVOS	CANTIDAD (μ L)	CONCENTRACIÓN FINAL (μ M)
AmpliTaq Gold 360 Master Mix 2X	12,5	1X
Agua de PCR	5,5	-
TEM F [5 μ M]	0,5	0,1
TEM R [5 μ M]	0,5	0,1
SHV F [5 μ M]	0,5	0,1
SHV R [5 μ M]	0,5	0,1
CTX-M F [10 μ M]	1	0,4
CTX-M R [10 μ M]	1	0,4
TOTAL	22	
Muestra	3	-
FINAL	25	

Para la detección de genes en las pruebas de PCR, se utilizaron los siguientes controles:

Controles Positivos:

- **ATCC 35218 *Escherichia coli*:** Cepa con el gen **blaTEM** (β -lactamasa).
- **ATCC 700603 *Klebsiella pneumoniae*:** Cepa con el gen **blaSHV** (β -lactamasa).
- **NSH 0298 *Escherichia coli*:** Cepa referencial con genes **blaCTX-M** y **blaTEM** (β -lactamasas).

Controles Negativos:

- **ATCC 25922 *Escherichia coli*:** Cepa de referencia sin resistencia a los genes específicos.
- **Agua libre de nucleasas:** Usada como control de reactivo para asegurar la ausencia de contaminación en los reactivos.

Estos controles aseguran que las pruebas PCR estén funcionando correctamente y que los resultados obtenidos sean fiables (Anexo 11).

2.8.12. CICLAJE PARA β -LACTÁMICOS:

El protocolo de ciclaje para la PCR de genes de resistencia a β -lactámicos del grupo A (incluyendo genes como **blaTEM**, **blaSHV**, y **blaCTX-M**) sigue un programa sencillo con una única temperatura de hibridación y extensión, lo que facilita la amplificación de estos genes en una reacción múltiplex tal como se muestra en la Tabla 12.

Detalles del programa de ciclaje:

- Pre-Denaturación (95°C, 5 minutos): este paso inicial desnatura completamente el ADN de la muestra y activa la Taq polimerasa para la reacción de amplificación.
- Ciclo de Amplificación (30 ciclos): desnaturación (95°C, 1 minuto): separa las hebras de ADN. Hibridación (57°C, 1 minuto): los cebadores específicos para **blaTEM**, **blaSHV**, y **blaCTX-M** se unen a las secuencias objetivo a esta temperatura, optimizada para todos los genes de interés.
- Extensión (72°C, 1 minuto): La Taq polimerasa sintetiza las nuevas hebras de ADN, replicando los fragmentos correspondientes a los genes de resistencia.
- Extensión Final (72°C, 10 minutos): asegura que todas las moléculas de ADN sintetizadas se completen en su totalidad, proporcionando productos de PCR de longitud completa.
- Mantenimiento (4°C, ∞): la reacción se mantiene a baja temperatura hasta su análisis.

Tabla 12.*Ciclaje de amplificación para β -lactámicos grupo A.*

Pre Denaturación		95°C	5 minutos
AMPLIFICACIÓN			
Denaturación		95°C	1 minuto
Hibridación	30 ciclos	57°C	1 minuto
Extensión		72°C	1 minuto
EXTENSIÓN FINAL		72°C	10 minutos
Mantener		4°C	∞

2.8.13. CORRELACIÓN DE CEBADORES, PATOTIPOS Y GENES EN *E. coli* DIARREAGÉNICA

La Tabla 13 permite una identificación rápida de los diferentes patotipos de *E. coli* diarrogénica mediante la detección de sus genes característicos en ensayos de PCR.

Tabla 13.*Genes de *E. coli* diarreagénicos relacionados con el patotipo.*

GEN ANALIZADO	PATOTIPO	ABREVIACIÓN
stla, stlb, lt,	<i>E. coli</i> Enterotoxigénica	ECET
eaeA	<i>E. coli</i> Enteropatógena	ECEP
daaD	<i>E. coli</i> Difusamente Adherente	ECDA
IpaH	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva	ECEI
aggR	<i>E. coli</i> Enteroagregativa	ECEA
stx1, stx2	<i>E. coli</i> Shiga Toxina	ECST
eaeA, stx1, stx2	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica	ECEH

En el presente estudio, las secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de genes β -lactámicos de la clase molecular A fueron correlacionadas con las secuencias disponibles en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) y la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos

(Reference Gene Catalog - Pathogen Detection - NCBI). La alineación de estos cebadores con las secuencias se realizó utilizando PRIMER3 (Primer3Plus) (Anexo 4).

De manera similar, para los genes β -lactámicos de la clase molecular B, se llevó a cabo el mismo proceso de correlación y alineación con las secuencias de la base de datos (Anexo 5). Esto permitió determinar qué alelos reportados en la base de datos del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) son susceptibles de ser amplificados con los cebadores empleados en el estudio.

Este análisis asegura que los cebadores usados en el presente estudio son adecuados para la amplificación de los genes de interés y maximiza la eficacia de la detección.

2.9. DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

La detección de los amplicones obtenidos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. Después de la corrida electroforética, los resultados se visualizan y se fotografian utilizando el digitalizador de imágenes Gel Doc EZ (Biorad).

2.9.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

2.9.1.1. PREPARACIÓN DEL GEL

La detección de los amplicones se hizo como sigue:

Previamente se diluyo el tampón Tris Borato Ácido Etilendiaminotetraacético (TBE) que está concentrado al 10X al 1X, tomando 100 ml de TBE en 900 ml de agua destilada

En un frasco resistente al calor y de capacidad de 100 ml se mezclaron 1.5 gr de agarosa y se completó a 100ml con el tampón TBE 1X, haciendo una concentración final de 1.5% (peso/volumen).

Esta mezcla fue calentada en un horno microondas a máxima potencia por 90 segundos, asegurando que la agarosa esté completamente disuelta, para luego cuidadosamente retirar con la ayuda de guantes termorresistentes y se agregó 15 μ L del colorante intercalante SYBR safe.

Todo el contenido fue vertido sobre la bandeja, previamente nivelada y asegurada con los topes para que no se derrame la agarosa líquida.

Dos peines fueron colocados sobre la agarosa, al inicio y en el centro de la bandeja.

Se dejó que solidifique por aproximadamente 30 a 45 minutos

2.9.1.2. CARGADO DE LAS MUESTRAS

El cargado de las muestras es como sigue:

Con la ayuda de una micropipeta de 1-10 μ L de capacidad, se dispensó 2 μ L del tampón de cargado de muestra, tantos como muestras se tengan dará color y peso al ADN amplificado.

La disposición de los controles positivos, marcador de peso conocido, muestras y controles negativo y de reactivo se hizo de acuerdo con un diagrama establecido (Figura 11)

Para las muestras y controles: con la ayuda de una micropipeta de 1-10 μ L de capacidad, se tomó 8 μ L de la muestra y es mezclado por pipeteo suave por tres veces con los 2 μ L del tampón de carga, para luego bajar al tope el émbolo de la micropipeta y absorber todo lo que pueda succionar, y cuidadosamente se dispensó en el pozo designado.

Para el marcador de peso conocido: con la ayuda de una micropipeta de 1-10 μ L, se ajustó el volumen a 5 μ L y se dispensó dentro de los pozos designados. Este marcador viene listo para usar.

2.9.1.3. ELECTROFORESIS

Previamente se instaló la cámara con la bandeja electroforética conteniendo la agarosa sólida, y se encendió la fuente de poder.

Sobre el gel de agarosa se dispensó aproximadamente 1 litro de tampón Tris borato EDTA (TBE) 1X hasta que cubra este gel (electroforesis en modo submarino).

Se colocó la tapa haciendo que coincidan los polos positivo y negativo.

Luego los electrodos de la cámara son conectados a la fuente de poder.

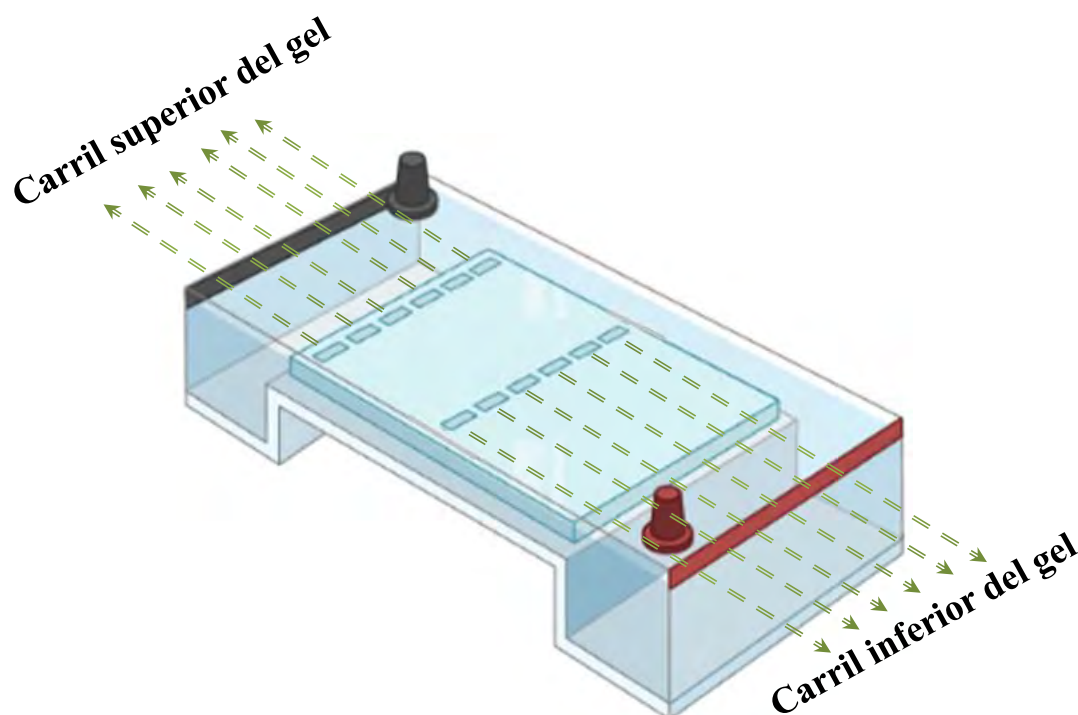
Se programó el equipo a 110 voltios y se dejó que las muestras migrarán a través del gel por aproximadamente 1 hora y media.

Al finalizar el tiempo la bandeja es retirada de la cámara electroforética, y se elimina el exceso de líquido.

Luego el gel se colocado en el interior del documentador de imágenes Gel Doc EZ.

Figura 11.

Disposición del cargado en el gel de agarosa.



CARRIL SUPERIOR: Carriles de 1 al 5 controles positivos, carriles 6 y 19 marcador de peso molecular conocido, carriles 7 al 18 muestras, carril 20 sugetes control positivo (mezcla).

CARRIL INFERIOR: Carriles del 1 al 5 controles positivo, carril 6 y 19 marcador de peso molecular conocido, carriles 7 al 17 muestras, carril 18 control negativo, carril 20 control positivo(mezcla).

2.9.1.4. FOTODOCUMENTACION DE LOS RESULTADOS

La fotodocumentación se hizo mediante el uso del Gel Doc EZ y para la lectura de los resultados se usa el software Image Lab 6.0.1 del equipo. El SYBR safe es tinte de cianina, el cual absorbe la luz azul ($\lambda_{\text{max}} = 509 \text{ nm}$) y emite luz verde ($\lambda_{\text{max}} = 524 \text{ nm}$),

Para la visualización de los geles en el transiluminador, se utilizó el filtro azul, conforme al protocolo del fabricante del equipo. Este filtro ayuda a visualizar el ADN marcado con SYBR Safe, proporcionando una imagen clara de los fragmentos de ADN separados en el gel.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. REIDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *Escherichia coli*

La identificación de *Escherichia coli* se realizó utilizando criterios fenotípicos, considerando tanto características metabólicas y bioquímicas como la morfología macroscópica de las colonias. Se evaluaron aspectos como tamaño, forma, superficie, color y cambios de color en el agar. De manera general, las colonias en agar MacConkey presentaron un tamaño de 2 a 4 mm, forma circular, bordes regulares, superficie convexa y brillante (Anexos 6 y 8). En cuanto a las características metabólicas, el 84% fueron lactosa fermentadora positiva (LFP) y 16% fueron lactosa fermentadora negativa (LFN).

En el presente estudio se analizaron 102 muestras. Como parte del flujograma de trabajo, se realizó un proceso de reidentificación de las cepas mediante espectrometría de masas (MALDI-ToF MS). Cada muestra fue analizada por duplicado, obteniéndose valores de score (score value) superiores a 2,00, lo cual corresponde a una identificación segura a nivel de género y especie (valores entre 2,00 - 2,29).

Este análisis determinó que dos muestras enviadas inicialmente como *E. coli* correspondían en realidad a *Klebsiella pneumoniae* (NSC1245 y NSC2245) por lo que fueron excluidas del estudio. Así mismo, la muestra NSC2226, proveniente del INEN y enviada como *Enterobacter aerogenes* y la cepa NSC2387, proveniente del CEMENA enviada como *Klebsiella pneumoniae*, fueron sometidas al mismo procedimiento de identificación. Tanto las características fenotípicas de sus colonias, similares a las de *E. coli*, como los resultados obtenidos mediante el MALDI ToF confirmaron que ambas correspondían efectivamente a *E. coli* (Anexo 7).

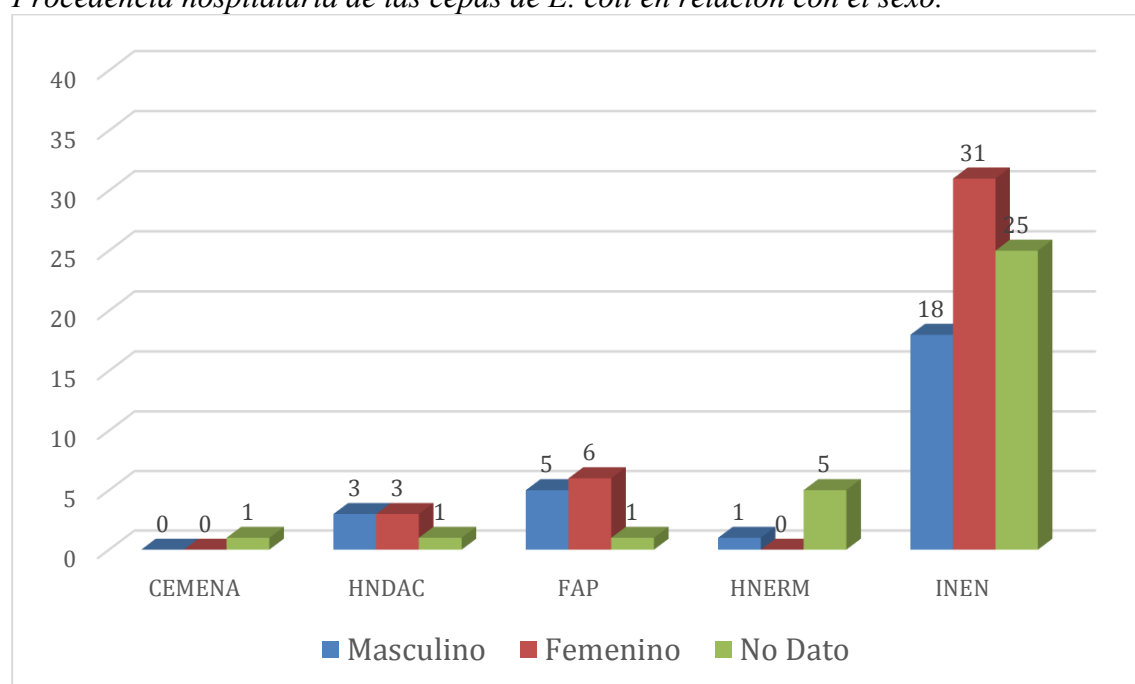
3.2. ORIGEN DEMOGRÁFICO Y CLÍNICO DE LAS CEPAS DE *Escherichia coli*

Las 100 cepas utilizadas en este estudio fueron colectadas entre los años 2014 al 2017. De estas, el 74% provenían del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), que incluía a 18 cepas de varones, 31 de mujeres y 25 muestras sin especificar el género. El 6% de las cepas provinieron del Hospital Nacional Edgardo Rebagliatti Martins (HNERM) de las cuales solo una muestra especificaba que pertenecía a un varón; el 12% cepas se obtuvieron del Hospital Central Fuerza Aérea Peruana (FAP), 5 cepas pertenecían a varones, 6 cepas a mujeres y una muestra sin especificar. Estas cepas fueron todas de la ciudad de Lima.

En cuanto a las muestras de la provincia constitucional del Callao, el 7% de cepas se obtuvieron del Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión (HNDAC) 3 cepas pertenecían a varones, 3 cepas pertenecían a sexo femenino y una cepa sin especificar el genero; y 1% cepa se obtuvo del Centro Médico Naval Cirujano Mayor Santiago Távara (CEMENA), esta muestra no especificaba el género (Figura 12).

Figura 12.

Procedencia hospitalaria de las cepas de E. coli en relación con el sexo.



Leyenda: INEN: Instituto Nacional de enfermedades neoplásicas, HNERM: Hospital Nacional Eduardo Rebagliatti Martins, FAP: Hospital Central Fuerza Aérea Peruana,

HNDAC: Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión, CEMENA: Centro médico Naval Cirujano Mayor Santiano Távara.

Tomando en cuenta el centro hospitalario de donde provienen las muestras, así como la procedencia biológica de las cepas del cual fueron obtenidas (urocultivo, hemocultivo y secreciones de heridas, órganos o tejidos), se detalla a continuación el número de cepas aisladas y la representación gráfica se encuentra en la Tabla 14.

Del **Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN)**, fue el centro hospitalario con mayor número de aislamientos, con un total de 74 cepas obtenidas. Estas se clasificaron en 64 cepas lactosa fermentadoras positivas (LFP) y 10 cepas lactosa fermentadoras negativas (LFN).

Del grupo de cepas LFP, 48 (48/64) se aislaron de muestras de urocultivo, seguidas por 12 cepas (12/64) provenientes de hemocultivo y 4 cepas (4/64) de secreciones de heridas, órganos o tejidos (HOT). En cuanto a las cepas LFN, 8 cepas (8/10) fueron aisladas de urocultivo, mientras que 1 cepa (1/10) correspondió a hemocultivo y 1 cepa (1/10) a secreción HOT.

De la **Fuerza Aérea del Perú (FAP)**, se obtuvieron un total de 12 cepas, las cuales se clasificaron en 8 cepas lactosa fermentadoras positivas (LFP) y 4 cepas lactosa fermentadoras negativas (LFN).

Dentro del grupo de cepas LFP, 3 cepas (3/8) fueron aisladas de muestras de urocultivo y 5 cepas (5/8) de secreciones de heridas, órganos o tejidos (HOT). Por otro lado, todas las cepas LFN (4/4) se aislaron a partir de secreciones HOT.

Del **Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins (HNERM)**, se obtuvieron un total de 6 cepas, todas clasificadas como lactosa fermentadoras positivas (LFP). De estas, 1 cepa (1/6) fue aislada de urocultivo, 2 cepas (2/6) de hemocultivo y 3 cepas (3/6) de secreciones de heridas, órganos o tejidos (HOT).

Del **Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión (HNDAC)**, se aislaron 7 cepas, de las cuales 5 fueron lactosa fermentadoras positivas (LFP) y 2 lactosa fermentadoras negativas (LFN).

Dentro del grupo LFP, 4 cepas (4/5) se obtuvieron de urocultivo y 1 cepa (1/5) de secreción HOT. Las 2 cepas LFN (2/2) se aislaron de muestras de urocultivo.

Del **Centro Médico Naval (CEMENA)** se obtuvo 1 cepa, clasificada como lactosa fermentadora positiva (LFP), la cual fue aislada de secreción HOT.

Tabla 14.

Procedencia hospitalaria y tipo de muestra del cual se aisló las cepas de E. coli.

Nosocomio	Total Cepas	LFP	LFN	Urocultivo (LFP)	Hemocultivo (LFP)	Secreción HOT (LFP)	Urocultivo (LFN)	Hemocultivo (LFN)	Secreción HOT (LFN)
INEN	74	64	10	48	12	4	8	1	1
FAP	12	8	4	3	0	5	0	0	4
HNERM	6	6	0	1	2	3	0	0	0
HNDAC	7	5	2	4	0	1	2	0	0
CEMENA	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Total	100	84	16	56	14	14	10	1	5

INEN: Instituto Nacional de enfermedades neoplásicas, HNERM: Hospital Nacional Eduardo Rebagliati Martins, FAP: Hospital Central Fuerza Aérea Peruana, HNDAC: Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión, CEMENA: Centro médico Naval Cirujano Mayor Santiano Távara. LFP: Fermentación de lactosa positiva, LFN: Fermentación de lactosa negativa.

3.3. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN PLACA

El 98% de las cepas de *E. coli* fueron identificadas como productoras de BLEE. Esta identificación se realizó siguiendo los diámetros críticos sugeridos por el Instituto Nacional de salud de Perú en la serie de normas técnicas N°30 (INS, 2002), y la presencia de la betalactamasa fue confirmada por ambos métodos (norteamericano y francés). Dos cepas (NSC1453 y NSC2426) ambas provenientes de urocultivo, fueron negativas para BLEE. (Anexo 9).

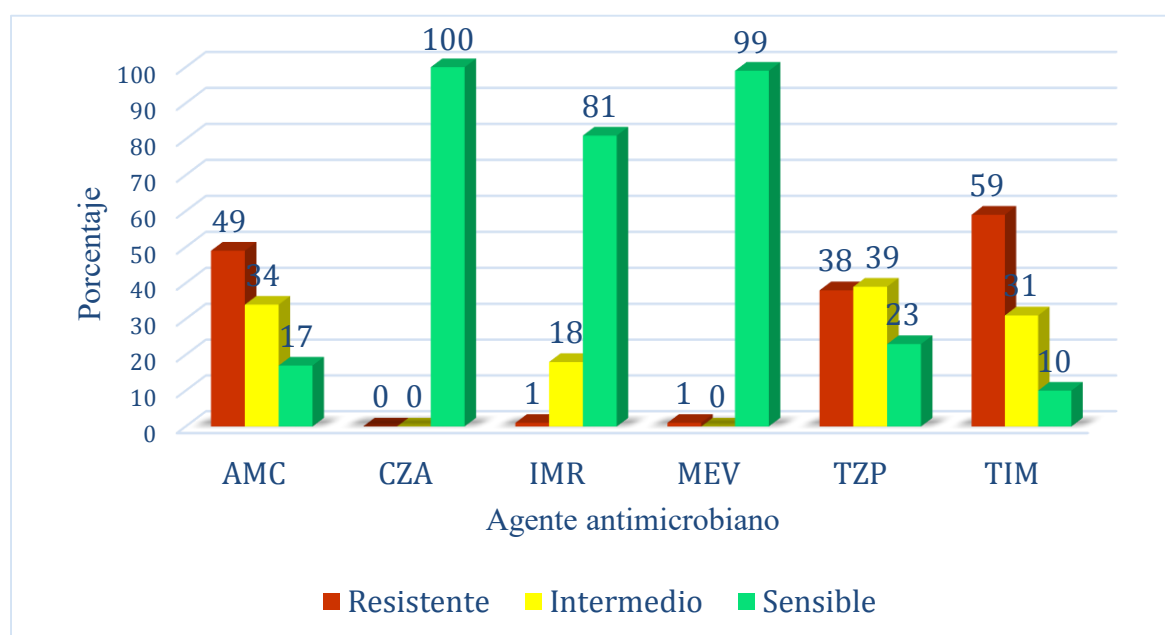
En la prueba de detección de BLEE basada en disco, la resistencia a los combinados betalactámicos fue observado en Amoxicilina-acido clavulánico (AMC) y Ticarcillina-acido

clavulánico (TIM) en 49 y 59% respectivamente, de igual modo el 38% presenta resistencia Piperacillina-tazobactam (TZP).

Las cepas estudiadas muestran 100% de sensibilidad a Ceftazidima-avibactam (CZA), 99% a Meropenem-varbobaactam (MEV) y 81% de sensibilidad a Imipenem-relebactam (IMR) (Figura 13).

El comportamiento de las cepas en estudio para AMC, TZP y TIM fue diverso, como se dijo anteriormente tienen cepas resistentes, pero también las hay susceptibles y sensibles. Únicamente el 18% de las cepas tienen sensibilidad intermedia a IMR.

Figura 13.
Resistencia a los combinados β -lactámicos.

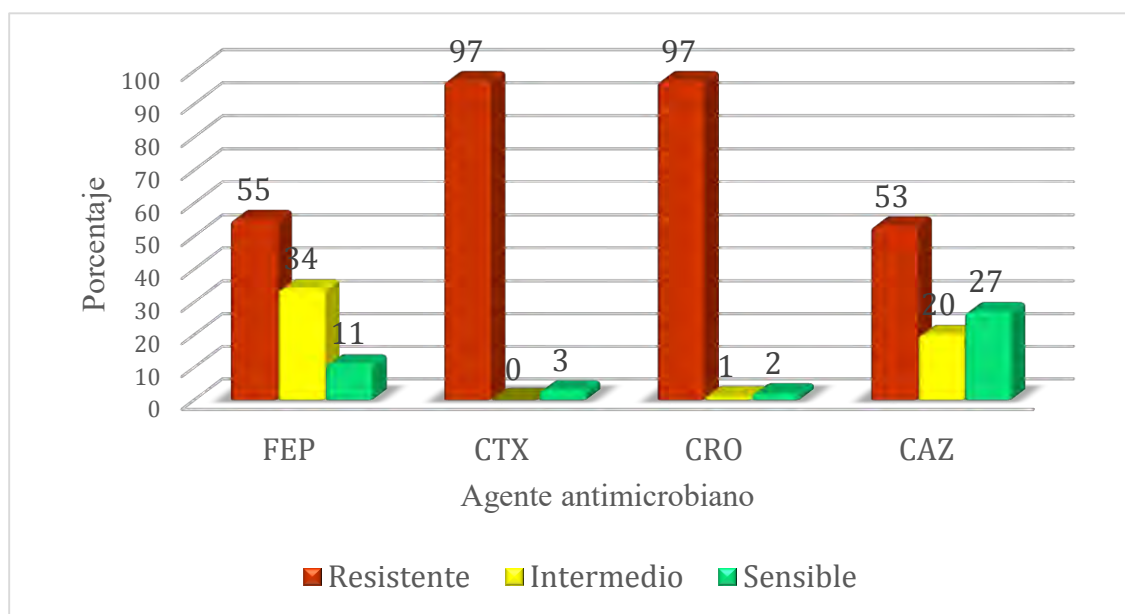


Leyenda: Amoxicilina-Clavulanato (AMC), Ceftazidima-Avibactam (CZA), Imipenem-Relebactam (IMR), Meropenem-Varbobaactam (MEV), Piperacillina-Tazobactam (TZP), Ticarcillina-Clavulanato (TIM).

Del estudio realizado sobre la resistencia a cefalosporinas, el 97% de cepas mostraron resistencia significativa a Cefotaxima (CTX) y ceftriaxona (CRO), indicadores de los diámetros críticos de tamizaje (Figura 14). El 55% y 53% de cepas fueron resistentes a Cefepima (FEP) y Ceftazidima (CAZ) respectivamente; para estas dos cefalosporinas

también hubo cepas que mostraron resistencia intermedia, así mismo hay más cepas susceptibles a CAZ, si comparamos con las otras tres cefaloporinas (FEP, CTX y CRO).

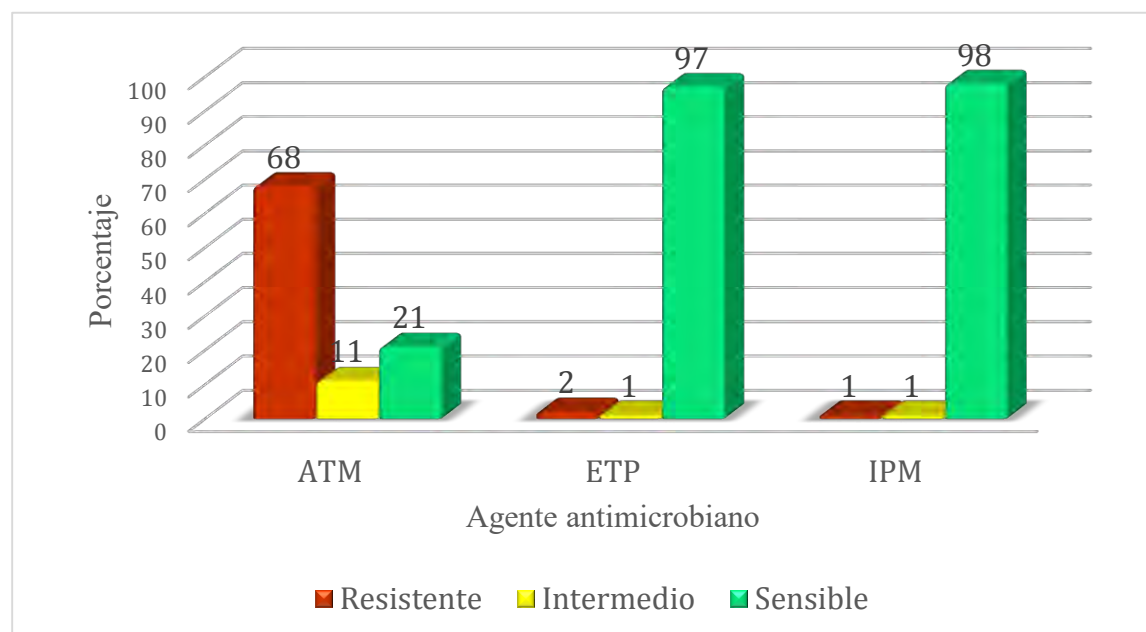
Figura 14.
Resistencia a las Cefalosporinas.



Leyenda: Cefepima (FEP), Cefotaxima (CTX), Ceftriaxona (CRO), y Ceftazidima (CAZ).

La resistencia al monobactámico Aztreonam (ATM) se observó en un 68% de las cepas de *E. coli* y a los carbapenémicos Ertapenem (ETP) e Imipenem (IMP), no se detectó resistencia en las cepas estudiadas, todo lo contrario, el 97 y 98% respectivamente fueron susceptibles, a excepción de 2 cepas que mostraron resistencia a ETP y 1 a IMP. Resistencias intermedias en ambos (ETP e IMP) mostró solo una cepa. Al monobactámico ATM el 21% de las cepas fueron susceptibles y solo una cepa tuvo respuesta intermedia. (Figura 15).

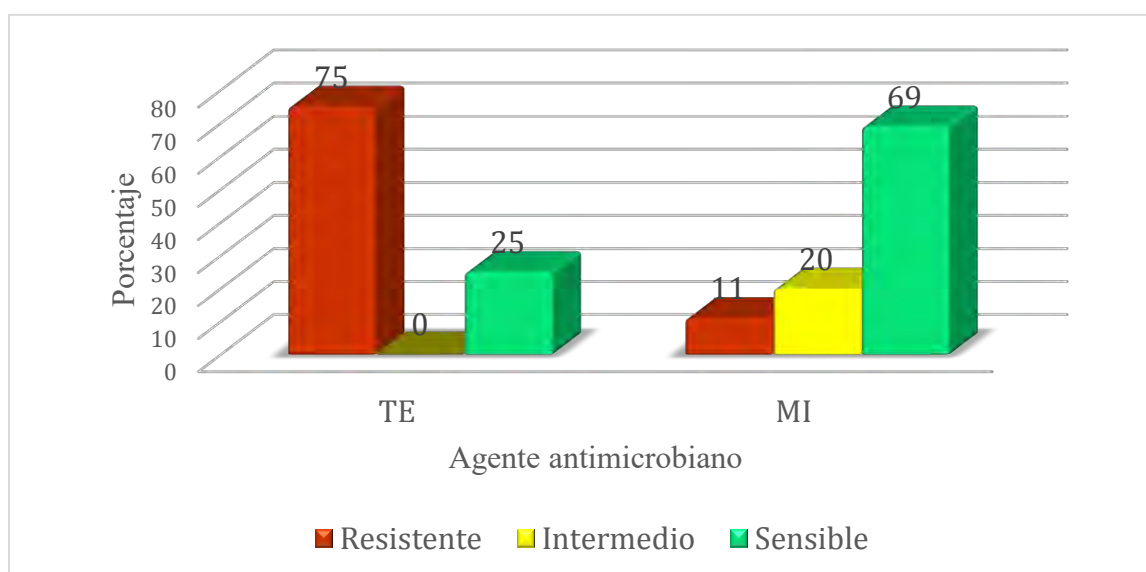
Figura 15.
Resistencia a los Monobactámico y Carbapenémicos.



Leyenda: Aztreonam (ATM), Ertapenem (ETP), Imipenem (IPM).

En el caso de las tetraciclinas, la tetraciclina (TE), las cepas en estudio mostraron una resistencia del 75%. En cuanto a la resistencia a minociclina (MI) presentó un porcentaje bajo que correspondió al 11% de las cepas, y un 69% corresponde a las cepas susceptibles. (Figura 16).

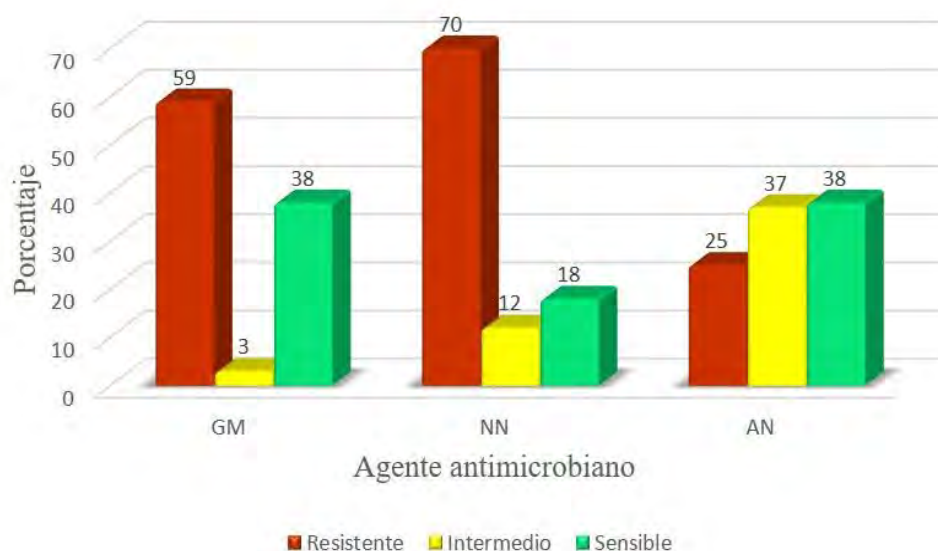
Figura 16.
Resistencia a las Tetraciclinas.



Leyenda: Tetraciclina (TE), Minociclina (MI)

Los aminoglucósidos usados fueron gentamicina (GM), tobramicina (NN) y amikacina (AN). Las cepas de *E. coli* evaluadas presentaron mayor resistencia a tobramicina (NN) en un 70%, seguido de GM con 59% y finalmente a AN con un 25%. Se observó también casos de resistencia intermedia a los tres antimicrobianos GM 3%, NN 12% y AN 37%. La susceptibilidad a los aminoglucósidos fue relativamente alta, así a GM 38%, NN 18% y AN 38%. (Figura 17).

Figura 17.
Resistencia a los aminoglucósidos.

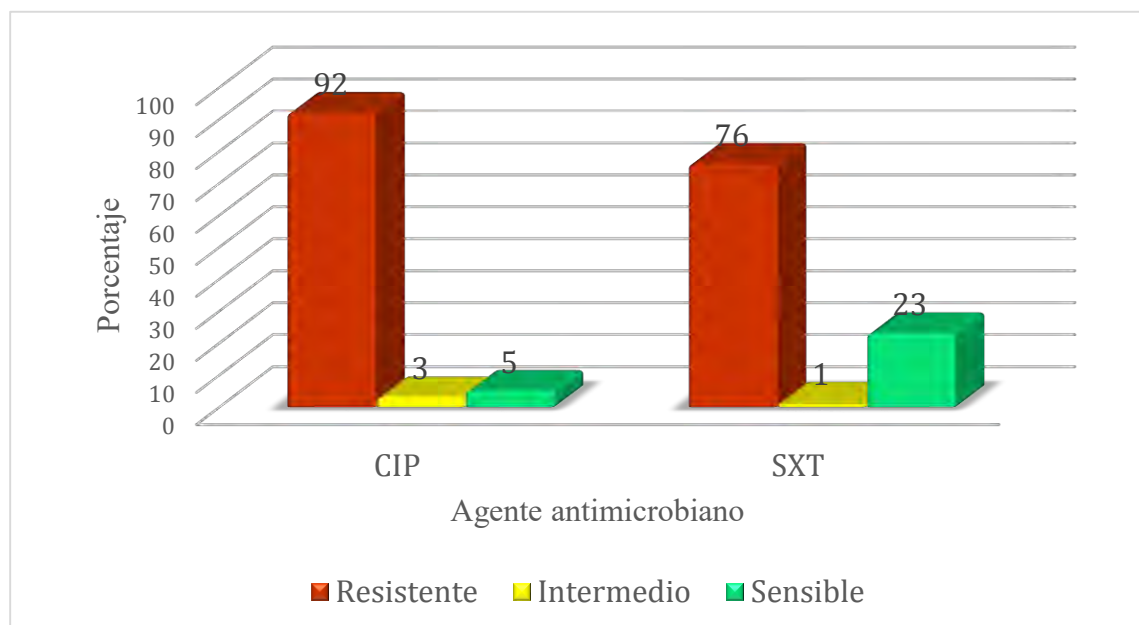


Leyenda: Gentamicina (GM), Tobramicina (NN) y Amikacina (AN).

Sobre la resistencia a las quinolonas y antagonistas del folato, únicamente se evaluaron a dos representantes de cada grupo, y los resultados indican que a la ciprofloxacina (CIP) la resistencia se presentó en un 92%, mientras que la resistencia intermedia y susceptibilidad fue de un 3 y 5% respectivamente. En cuanto al antagonista del folato, trimethoprima-sulfamethoxazol (SXT), la susceptibilidad de las cepas en estudio fue de un 76% y lo resaltante también es la sensibilidad del 23% presentada y solo un caso de resistencia intermedia. (Figura 18).

Figura 18.

Resistencia a las Quinolonas y Antagonista del Folato.



Leyenda: Ciprofloxacina (CIP), Trimethoprima- sulfametoxazol (SXT).

La Tabla 15 muestra el conteo de cepas de *E. coli* no susceptibles (resistentes e intermedias) a diferentes clases de antibióticos. Se evaluó la susceptibilidad de las cepas bacterianas frente a diversos grupos antimicrobianos. Los valores representan el número de aislamientos clasificados como resistentes o con sensibilidad intermedia por grupo farmacológico, según puntos de corte establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Las clases con mayor proporción de no susceptibilidad fueron los carbapenémicos (3%) y la polimixina (11%), mientras que las cefalosporinas (97%) y quinolonas (95%) mostraron los niveles más altos de resistencia.

Tabla 15.

Frecuencia de las cepas de E. coli no susceptibles (R e I) a diferentes clases de antibióticos según criterios del CLSI.

Agentes combinados β -lactámicos	96
Cefalosporinas	97
Monobactámico	79
Carbapenémicos	3
Aminoglucósidos	85
Tetraciclinas	75
Quinolonas	95
Antagonista del folato	76
Polimixina	11

Agentes combinados β -lactámicos (AMC, CZA, IMR, MEV, TZP, TIM); Cefalosporinas (FEP, CTX, CRO, CAZ); Monobactámico (ATM); Carbapenémicos (ETP, IPM); Aminoglucósidos (GM, NN, AN); Tetraciclinas (TE, MI); Quinolona (CIP); Antagonista del folato (SXT) y Polimixina (CL).

3.4. ANALISIS DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA CON LA TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN EN PLACA.

Se llevó a cabo la prueba de microdilución en caldo con el fin de confirmar fenotípicamente la resistencia asociada al gen **mcr-1**, un determinante plasmídico de resistencia a colistina, en 11 cepas que previamente resultaron positivas para dicho gen. En 8 de estas cepas, se determinó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 4 μ g/ml, valor que, de acuerdo con los puntos de corte establecidos por el CLSI, corresponde a un perfil resistente. En las 3 cepas restantes, se observó una CMI de 2 μ g/ml, lo cual se clasifica como resistencia intermedia según el mismo criterio (Tabla 16) (Anexo 10). Estos hallazgos confirman la resistencia a colistina tanto a nivel genotípico como fenotípico, evidenciando la concordancia entre ambos métodos de detección.

Tabla 16.*Presencia del gen mcr-1 de resistencia a la colistina.*

Nº	Código NAMRU- S	Hospital de Procedencia	Tipo de Cultivo	Resultado Placa Mc Conkey	BLEE	Resultado MCI Colistina	Categorías interpretativas y puntos de corte de MCI (CLSI) µg/ml			Gen de Resistencia a la Colistina Gen mcr-1
							I	R	Resultado	
6	NSC1080	HNERM	Secreción HOT	LFP	Positivo	4	≤ 2	≥ 4	Resistente	Positivo
10	NSC1178	HNERM	Secreción HOT	LFP	Positivo	4	≤ 2	≥ 4	Resistente	Positivo
11	NSC1196	FAP	Urocultivo	LFP	Positivo	2	≤ 2	≥ 4	Intermedio	Positivo
12	NSC1346	HNDAC	Secreción HOT	LFP	Positivo	2	≤ 2	≥ 4	Intermedio	Positivo
22	NSC2008	FAP	Secreción HOT	LFP	Positivo	4	≤ 2	≥ 4	Resistente	Positivo
30	NSC2120	INEN	Hemocultivo	LFP	Positivo	4	≤ 2	≥ 4	Resistente	Positivo
58	NSC2220	INEN	Urocultivo	LFP	Positivo	4	≤ 2	≥ 4	Resistente	Positivo
65	NSC2242	INEN	Urocultivo	LFP	Positivo	4	≤ 2	≥ 4	Resistente	Positivo
87	NSC2420	INEN	Urocultivo	LFP	Positivo	2	≤ 2	≥ 4	Intermedio	Positivo
88	NSC2421	INEN	Urocultivo	LFP	Positivo	4	≤ 2	≥ 4	Resistente	Positivo
100	NSC2475	FAP	Secreción HOT	LFP	Positivo	4	≤ 2	≥ 4	Resistente	Positivo

*Leyenda:**Sec. HOT: Secreción de herida, órgano o tejido.**LFP: Lactosa fermentadora positiva**R: Resistencia**I: Resistencia intermedia*

3.5. ANÁLISIS DE LA AMPLIFICACIÓN DE GENES

Todas las cepas fueron sometidas cuatro (4) tipos de reacción en cadena de la polimerasa múltiplex, que se establecieron para el presente estudio, los geles de agarosa fueron realizados de acuerdo con la plantilla preestablecida tanto para controles, para los marcadores de peso conocido y las muestras (Figura 11).

La distribución de la simultaneidad de genes se muestra en la Tabla 15 por tipo de aislamiento y hospital, basada en 100 cepas de *E. coli* estudiadas.

Del **Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN)**, en cuanto a los resultados obtenidos en las 48 cepas lactosa fermentadoras positivas proveniente de urocultivo como gen único se amplificó el gen **daaD** que corresponde a la *E. coli* difusamente adherente en dos cepas, así como el gen β -lactámico **blaCTX-M**, que fue el más frecuente, este último como gen único fue observado en 22 cepas.

La simultaneidad de dos genes en estas muestras se presentó con el β -lactámico **blaTEM**, que también fue el más común en 9 cepas, seguido del diarreagénico **daaD**, en 4 cepas y con el gen de resistencia a la colistina (**mcr-1**) en 2 cepas.

La simultaneidad de tres genes fue observada en 4 cepas, siendo el **blaTEM** el más común, presente en todas ellas. De estas, dos cepas además portaban el gen de resistencia a la colistina (**mcr-1**), 1 con el gen **daaD** y 1 con el gen de resistencia a carbapenémicos de la clase B, **blaNDM**.

Adicionalmente, se detectó 1 cepa con la combinación de dos genes β -lactámicos **blaTEM** + **blaSHV**. En 4 cepas no se obtuvo amplificación de ninguno de los genes evaluados.

En cuanto a los resultados obtenidos en las 8 cepas lactosa no fermentadoras proveniente de urocultivo, el gen β -lactámico **blaCTX-M**, que fue el más frecuente, detectado como único en 2 cepas. La presencia simultánea de dos genes se observó en 5

cepas, todas con **blaTEM**. En 1 cepa no se obtuvo amplificación de ninguno de los genes evaluados.

Respecto a 12 cepas lactosa fermentadoras positivas proveniente de hemocultivo, el gen **blaCTX-M** fue también el más frecuente, observado como único en 6 cepas. La codirección de dos genes se presentó 3 cepas con **blaTEM**, y en 1 cepa con el gen diarreagénico **daaD**. Asimismo, se identificó 1 cepa con la combinación del gen β -lactámico **blaTEM** con el gen carbapenemasa de clase A **blaKPC**. La presencia simultánea de tres genes (**blaCTX-M+blaTEM+mcr-1**) se observó en 1 cepa.

La única cepa no fermentadora proveniente de hemocultivo presentó la combinación de genes β -lactámicos **blaCTX-M+blaTEM**.

En cuanto a las 5 cepas provenientes de secreciones de heridas, órganos o tejidos (HOT), 4 correspondieron a cepas lactosa fermentadora positiva. De estas, 1 cepa presentó el gen **blaTEM** como único. En 2 cepas se observó la presencia simultánea de dos genes: **blaCTX-M+blaTEM** en una y **CTX-M+daaD** en la otra. En 1 cepa no se detectó amplificación de ninguno de los genes evaluados.

La única cepa no fermentadora presento como gen único al β -lactámico **blaCTX-M** (Tabla 17).

Tabla 17.

Distribución de genes por tipo de muestra en cepas de E. coli provenientes del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).

Tipo de muestra	Fermentación lactosa	Genes únicos			Cepas con 2 genes					Cepas con 3 genes			Sin amplificación	N° de cepas
		blaCTX	blaTEM	daaD	blaCTX-M+blaTEM	blaCTX-M+daaD	blaCTX-M+mcr-1	blaTEM+blaKPC	blaTEM+blaSHV	blaCTX-M+blaTEM+daaD	blaCTX-M+blaTEM+mcr-1	blaCTX-M+blaTEM+blaNDM		
Urocultivo	Positiva	22	0	2	9	4	2	0	1	1	2	1	4	48
	Negativa	2	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	1	8
Hemocultivo	Positiva	6	0	0	3	1	0	1	0	0	1	0	0	12
	Negativa	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Herida/Órgano/Tejido	Positiva	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	4
	Negativa	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total		31	1	2	19	6	2	1	1	1	3	1	6	74

Genes β -lactámicos de la clase molecular A (blaCTX-M, blaTEM, blaSHV, blaKPC), genes de la clase molecular B (blaNDM), gen mcr-1 de resistencia a la colistina y el gen diarreagénico difusamente adherente(daaD).

De las 12 cepas obtenidas del centro hospitalario de la **Fuerza Aérea del Perú (FAP)**, 3 cepas fueron identificadas como fermentadoras positivas y provenían de urocultivos. Todas presentaron simultaneidad de dos genes: 2 cepas portaban **blaCTX-M+blaTEM**, y 1 cepa mostró la combinación **blaTEM+mcr-1**.

En cuanto a las cepas provenientes de secreción HOT, se observó variabilidad. 5 de ellas fueron lactosa positivas. Entre estas, se detectaron genes únicos en dos cepas: uno presentó el gen diarreagénico **daaD** y la otra el gen β -lactámico **CTX-M**. Otra cepa presentó simultaneidad de los genes β -lactámicos **blaCTX-M** y **blaTEM**, mientras que 2 cepas mostraron presencia simultánea de tres genes **blaCTX-M+blaTEM+mcr-1**.

Respecto a las cepas no fermentadoras, en una se detectó únicamente el gen **blaCTX-M**, y en la otra la combinación **blaTEM+daaD**. En 2 cepas no se obtuvo amplificación de ninguno de los genes evaluados (Tabla 18).

Tabla 18.

Distribución de genes por tipo de muestra en cepas de E. coli provenientes de la Fuerza Aérea del Perú (FAP).

		Genes únicos		Cepas con 2 genes			Cepas con 3 genes		
		blaCTX	daaD	blaCTX-M+blaTEM	blaTEM+mcr-1	blaTEM+daaD	blaCTX-M+blaTEM+mcr-1	Sin amplificación	Nº de cepas
Tipo de muestra	Fermentación lactosa								
Urocultivo	Positiva	0	0	2	1	0	0	0	3
Herida/Órgano/Tejido	Positiva	1	1	1	0	0	2	0	5
	Negativa	1	0	0	0	1	0	2	4
Total		2	1	3	1	1	2	2	12

Genes β -lactámicos de la clase molecular A (blaCTX-M, blaTEM), gen mcr-1 de resistencia a la colistina y el gen diarreagénico difusamente adherente(daaD).

Del **Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins (HNERM)**, se obtuvieron un total de 6 cepas, todas identificadas como lactosa fermentadora positiva. La cepa aislada de urocultivo presento como gen único al **blaTEM**. Las 2 cepas provenientes de hemocultivo también mostraron como gen único al β -lactámico **blaCTX-M**. De las tres cepas aisladas de secreción HOT, una presentó únicamente el gen **blaTEM**, mientras que las otras dos mostraron combinaciones de genes: una con **CTX-M+mcr-1**, y la otra **blaTEM+mcr-1** (Tabla 19).

Tabla 19.

Distribución de genes por tipo de muestra en cepas de E. coli provenientes de Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins (HNERM).

Tipo de muestra	Fermentación lactosa	Genes únicos		Cepas con 2 genes		Nº de cepas
		blaCTX-M	blaTEM	blaCTX-M+mcr-1	blaTEM+mcr-1	
Urocultivo	Positiva	0	1	0	0	1
Hemocultivo	Positiva	2	0	0	0	2
Herida/Órgano/Tejido	Positiva	0	1	1	1	3
Total		2	2	1	1	6

Genes β -lactámicos de la clase molecular A (blaCTX-M, blaTEM), gen mcr-1 de resistencia a la colistina y el gen diarreagénico difusamente adherente(daaD).

En el **Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión (HNDAC)**, se obtuvieron 5 cepas fermentadoras de lactosa, todas ella aisladas de urocultivos. En una de estas cepas detectó la presencia del gen β -lactámico **blaCTX-M** como único gen amplificado. En tres cepas se identificó la coexistencia de dos genes: **blaCTX-M+blaTEM** en dos de ellos y **blaCTX-M+daaD** en una cepa.

Adicionalmente, una cepa proveniente de la secreción HOT presento simultaneidad de tres genes de resistencia: **blaCTX-M+blaTEM+mcr-1**.

Respecto a las dos cepas lactosa negativas, ambas también procedentes de urocultivo, no presentaron amplificación de ninguno de los genes evaluados (Tabla 20).

Tabla 20.

Distribución de genes por tipo de muestra en cepas de E. coli provenientes de Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión (HNDAC).

Tipo de muestra	Fermentación lactosa	Genes únicos	Cepas con 2 genes		Cepas con 3 genes	Sin amplificación	Nº de cepas
		blaCTX-M	blaCTX-M+blaTEM	blaTEM+daaD	blaCTX-M+blaTEM+mcr-1		
Urocultivo	Positiva	1	2	1	0	0	4
Herida/Órgano/Tejido	Positiva	0	0	0	1	0	1
Herida/Órgano/Tejido	Negativa	0	0	0	0	2	2
Total		1	2	1	1	2	7

Genes β -lactámicos de la clase molecular A (blaCTX-M, blaTEM), gen mcr-1 de resistencia a la colistina y el gen diarreagénico difusamente adherente(daaD).

En el **Centro Médico Naval (CEMENA)**, se analizó una única muestra, proveniente de urocultivo. Esta correspondió a una cepa fermentadora de lactosa, en la cual se detectó exclusivamente el gen β -Lactámico **blaCTX-M** (Tabla 21).

Tabla 21.

Distribución de genes por tipo de muestra en cepas de E. coli provenientes del Centro Médico Naval (CEMENA).

Tipo de muestra	Fermentación lactosa	Gen único	
		blaCTX-M	Nº de cepas
Urocultivo	Positiva	1	1
Total		1	1

Gen β -lactámicos de la clase molecular A (blaCTX-M).

La Tabla 22 detalla la presencia de diferentes genes en distintas muestras y tipos de cultivo, con una predominancia del gen **blaCTX-M**, este gen codifica para una β -lactamasa de espectro extendido (ESBL), que confiere resistencia a los antibióticos β -lactámicos, como las penicilinas y cefalosporinas (Mazumder *et al.*, 2022). El gen diarreagénico **daaD** generalmente está asociado con la adhesión bacteriana en infecciones urinarias y ha estado presente en 12 de las 100 cepas en estudio. El gen **blaKPC** al igual que **blaNDM** son menos frecuentes, estos genes aparecen en una muestra cada uno y es conocido por su capacidad de conferir resistencia a los carbapenémicos (Bush & Jacoby 2010), una clase de antibióticos de amplio espectro usados para tratar infecciones graves.

Tabla 22.*Distribución de la simultaneidad de genes hallados por tipo de aislamiento y hospital.*

Nº	Código NAMRU- S	Hospital Procedencia	Sexo	Tipo de Cultivo	Resultad o Placa Mc Conkey	daaD	mcr-1	blaTEM	blaSHV	blaCTX- M	blaKPC	blaNDM	Negativo	Total
36	NSC2147	INEN	Femenino	Urocultivo	LFN	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
37	NSC2157	INEN	Femenino	Urocultivo	LFN	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
46	NSC2188	INEN	Femenino	Urocultivo	LFN	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
48	NSC2200	INEN	Masculino	Urocultivo	LFN	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
74	NSC2355	INEN	No Dato	Urocultivo	LFN	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
75	NSC2358	INEN	No Dato	Urocultivo	LFN	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
85	NSC2418	INEN	No Dato	Urocultivo	LFN	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
93	NSC2430	INEN	No Dato	Urocultivo	LFN	0	0	0	0	0	0	0	1	Negativo
79	NSC2379	INEN	No Dato	Sec. HOT	LFN	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
26	NSC2110	INEN	Femenino	Hemocultivo	LFN	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
28	NSC2116	INEN	Femenino	Hemocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
40	NSC2172	INEN	Femenino	Hemocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
41	NSC2182	INEN	Femenino	Hemocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
23	NSC2104	INEN	Masculino	Hemocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
31	NSC2121	INEN	Masculino	Hemocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
45	NSC2186	INEN	Masculino	Hemocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
71	NSC2330	INEN	No Dato	Hemocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
27	NSC2115	INEN	Masculino	Hemocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM

Nº	Código NAMRU- S	Hospital Procedencia	Sexo	Tipo de Cultivo	Resultad o Placa Mc Conkey	daaD	mcr-1	blaTEM	blaSHV	blaCTX- M	blaKPC	blaNDM	Negativo	Total
29	NSC2118	INEN	Femenino	Hemocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
25	NSC2110	INEN	Femenino	Hemocultivo	LFP	0	0	1	0	0	1	0	0	TEM, KPC
24	NSC2109	INEN	Masculino	Hemocultivo	LFP	1	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M, daaD
30	NSC2120	INEN	Masculino	Hemocultivo	LFP	0	1	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM, mcr-1
80	NSC2384	INEN	Masculino	Sec. HOT.	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
81	NSC2385	INEN	No Dato	Sec. HOT.	LFP	0	0	1	0	0	0	0	0	TEM
99	NSC2453	INEN	No Dato	Sec. HOT.	LFP	1	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M, daaD
78	NSC2374	INEN	No Dato	Sec. HOT.	LFP	0	0	0	0	0	0	0	1	Negativo
32	NSC2136	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
33	NSC2142	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
35	NSC2145	INEN	Masculino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
39	NSC2167	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
42	NSC2183	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
43	NSC2184	INEN	Masculino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
44	NSC2185	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
47	NSC2194	INEN	Masculino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
49	NSC2202	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
50	NSC2204	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
53	NSC2211	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
54	NSC2214	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
55	NSC2216	INEN	Masculino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M

Nº	Código NAMRU- S	Hospital Procedencia	Sexo	Tipo de Cultivo	Resultad o Placa Mc Conkey	daaD	mcr-1	blaTEM	blaSHV	blaCTX- M	blaKPC	blaNDM	Negativo	Total
62	NSC2224	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
67	NSC2247	INEN	Masculino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
68	NSC2248	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
72	NSC2333	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
73	NSC2355	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
91	NSC2426	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
94	NSC2432	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
95	NSC2435	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
97	NSC2438	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
34	NSC2143	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	1	0	0	0	0	0	0	0	daaD
92	NSC2427	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP	1	0	0	0	0	0	0	0	daaD
87	NSC2420	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP	0	1	0	0	1	0	0	0	CTX-M, mcr-1
88	NSC2421	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP	0	1	0	0	1	0	0	0	CTX-M, mcr-1
57	NSC2219	INEN	Masculino	Urocultivo	LFP	1	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M, daaD
59	NSC2221	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	1	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M, daaD
66	NSC2244	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	1	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M, daaD
98	NSC2439	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP	1	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M, daaD

Nº	Código NAMRU- S	Hospital Procedencia	Sexo	Tipo de Cultivo	Resultad o Placa Mc Conkey	daaD	mcr-1	blaTEM	blaSHV	blaCTX- M	blaKPC	blaNDM	Negativo	Total
69	NSC2249	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	1	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM, daaD
38	NSC2158	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
51	NSC2205	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
52	NSC2206	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
60	NSC2222	INEN	Masculino	Urocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
61	NSC2223	INEN	Masculino	Urocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
63	NSC2225	INEN	Masculino	Urocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
70	NSC2255	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
89	NSC2424	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
96	NSC2437	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
58	NSC2220	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	1	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM, mcr-1
65	NSC2242	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	1	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM, mcr-1
77	NSC2368	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	1	0	CTX-M, TEM, NDM
56	NSC2217	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	1	1	0	0	0	0	TEM, SHV
64	NSC2226	INEN	Masculino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	0	0	0	1	Negativo

Nº	Código NAMRU- S	Hospital Procedencia	Sexo	Tipo de Cultivo	Resultad o Placa Mc Conkey	daaD	mcr-1	blaTEM	blaSHV	blaCTX-M	blaKPC	blaNDM	Negativo	Total
76	NSC2367	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	0	0	0	1	Negativo
86	NSC2419	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	0	0	0	1	Negativo
90	NSC2425	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	0	0	0	1	Negativo
01	NSC0945	HNERM	No Dato	Hemocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
02	NSC0948	HNERM	No Dato	Hemocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
04	NSC0989	HNERM	No Dato	Sec. HOT.	LFP	0	0	1	0	0	0	0	0	TEM
06	NSC1080	HNERM	No Dato	Sec. HOT.	LFP	0	1	0	0	1	0	0	0	CTX-M, mcr-1
10	NSC1178	HNERM	Masculino	Sec. HOT	LFP	0	1	1	0	0	0	0	0	TEM, mcr-1
07	NSC1095	HNERM	No Dato	Urocultivo	LFP	0	0	1	0	0	0	0	0	TEM
83	NSC2397	FAP	Femenino	Sec. HOT.	LFN	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
14	NSC1387	FAP	Femenino	Sec. HOT.	LFN	1	0	1	0	0	0	0	0	TEM, daaD
19	NSC1726	FAP	Femenino	Sec. HOT.	LFN	0	0	0	0	0	0	0	1	Negativo
20	NSC1782	FAP	Masculino	Sec. HOT	LFN	0	0	0	0	0	0	0	1	Negativo
84	NSC2412	FAP	Masculino	Sec. HOT	LFP	1	0	0	0	0	0	0	0	daaD
17	NSC1440	FAP	Masculino	Sec. HOT	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
22	NSC2008	FAP	Masculino	Sec. HOT	LFP	0	1	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM, mcr-1
13	NSC1363	FAP	Femenino	Sec. HOT	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM

Nº	Código NAMRU- S	Hospital Procedencia	Sexo	Tipo de Cultivo	Resultad o Placa Mc Conkey	daaD	mcr-1	blaTEM	blaSHV	blaCTX- M	blaKPC	blaNDM	Negativo	Total
100	NSC2475	FAP	No Dato	Sec. HOT	LFP	0	1	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM, mcr-1
11	NSC1196	FAP	Masculino	Urocultivo	LFP	0	1	1	0	0	0	0	0	TEM, mcr-1
15	NSC1428	FAP	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
16	NSC1438	FAP	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	CTX-M, TEM
18	NSC1453	HNDAC	Femenino	Urocultivo	LFN	0	0	0	0	0	0	0	1	Negativo
21	NSC1818	HNDAC	No Dato	Urocultivo	LFN	0	0	0	0	0	0	0	1	Negativo
03	NSC0983	HNDAC	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	TEM, CTX-M
05	NSC1030	HNDAC	Femenino	Urocultivo	LFP	0	0	1	0	1	0	0	0	TEM, CTX-M
08	NSC1167	HNDAC	Masculino	Urocultivo	LFP	0	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M
09	NSC1174	HNDAC	Masculino	Urocultivo	LFP	1	0	0	0	1	0	0	0	CTX-M, daaD
Total						12	11	40	1	79	1	1	10	

INEN: Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.
 FAP: Hospital Central Fuerza Aérea Peruana.
 HNDAC: Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión.
 HNERM: Hospital Nacional Edgardo Rebagliatti Martins.
 CEMENA: Centro Médico Naval.

Sec. HOT: secreción herida, órgano o tejido.
 LFP: Lactosa fermentadora positiva.
 LFN: Lactosa fermentadora negativa.
 0: Ausencia del gen.
 1: Presencia del gen.

La Tabla 23 presenta un resumen de la detección de genes diarreagénicos y genes de resistencia antimicrobiana en muestras provenientes de cinco hospitales: INEN (74 muestras), Hospital FAP (12 muestras), HNERM (6 muestras), HNDAC (7 muestras) y CEMENA (1 muestra). Entre los genes diarreagénicos evaluados, únicamente se detectó la amplificación del gen **daaD**, asociado a *Escherichia coli* difusamente adherente, en 12 muestras. Los demás genes diarreagénicos no fueron detectados.

En cuanto a los genes de resistencia pertenecientes a las clases moleculares A y B, implicados en la resistencia a β -lactámicos, se identificaron los siguientes: **blaTEM** en 40 muestras, **blaSHV** en 1 muestra, **blaCTX-M** en 79 muestras, **blaKPC** en 1 muestra y **blaNDM** en 1 muestra. Los genes **blaIMP** y **blaVIM** no fueron detectados en ninguna de las muestras analizadas. Respecto a los genes de resistencia a colistina, **mcr-1** fue identificado en 11 muestras.

Cabe destacar la alta prevalencia del gen **blaCTX-M**, presente en 79 muestras, lo cual evidencia una notable resistencia a cefalosporinas de tercera generación. El segundo gen más frecuente fue **blaTEM** (40 muestras), otro determinante perteneciente a la clase molecular A, también asociado a resistencia a β -lactámicos.

Tabla 23.

Presencia de genes diarregénicos y genes de resistencia antimicrobiana.

	Total		Genes diarregénicos								Genes Clase Molecular A				Genes Clase Molecular B			Gen de la colistina
	Conteo	%	st	lt	eaeA	daaD	stx1	stx2	ipaH	aggR	TEM	SHV	CTX-M	KPC	IMP	VIM	NDM	mcr-1
Total	100	100%	0	0	0	12	0	0	0	0	40	1	79	1	0	0	1	11
<u>INEN</u>	74	74%																
Hemocultivo	13	13%	0	0	0	1	0	0	0	0	6	0	12	1	0	0	0	1
Sec. HOT	5	5%	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	3	0	0	0	0	0
Urocultivo	56	56%	0	0	0	7	0	0	0	0	19	1	48	0	0	0	1	4
<u>Hospital FAP</u>	12	12%																
Sec. HOT	9	9%	0	0	0	2	0	0	0	0	4	0	5	0	0	0	0	2
Urocultivo	3	3%	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	0	0	1
<u>HNERM</u>	6	6%																
Hemocultivo	2	2%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Sec. HOT	3	3%	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	2
Urocultivo	1	1%	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<u>HNDAC</u>	7	7%																
Sec. HOT	1	1%	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Urocultivo	6	6%	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	4	0	0	0	0	0
<u>CEMENA</u>	1	1%																
Urocultivo	1	1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Sec. HOT *Secreción de Herida u Órgano o Tejido*

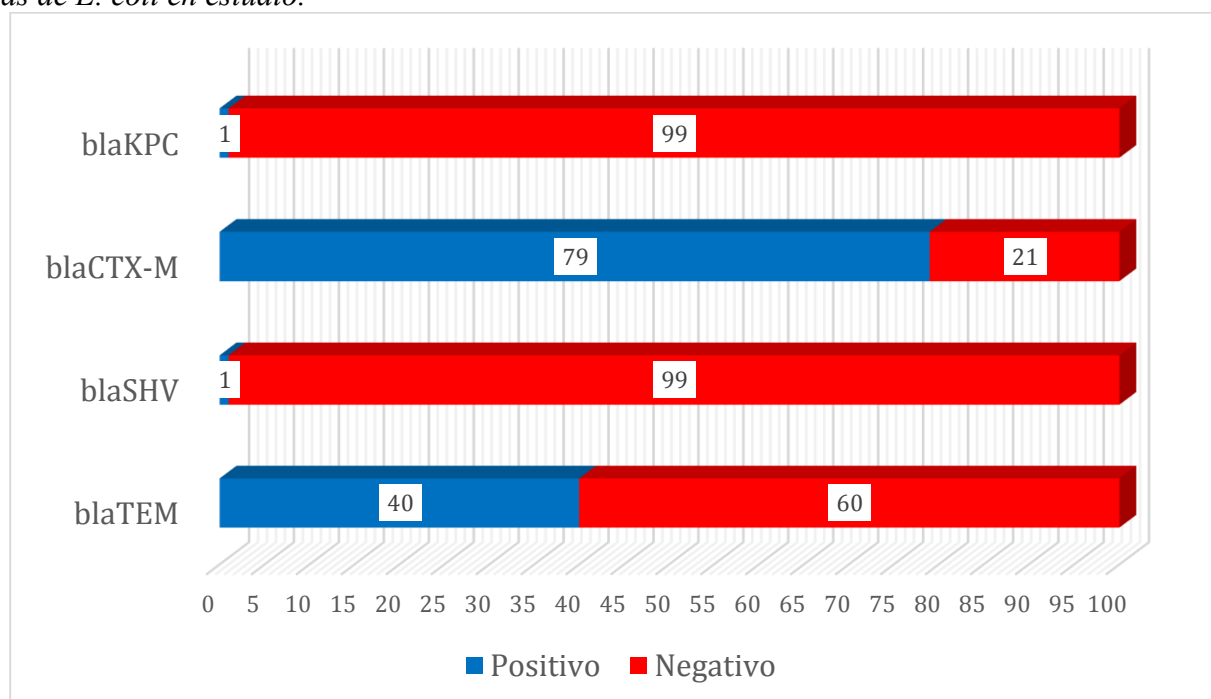
1: *Presencia*

0: *Ausencia*

En el caso de la clasificación de Ambler para la clase molecular A que incluye los genes **blaTEM**, **blaSHV**, **blaCTX-M** y **blaKPC**, se detectó la presencia de los cuatro genes, que como se dijo anteriormente, los que se presentan en mayor cantidad son **blaCTX-M** y **blaTEM**, con 79 y 40 cepas respectivamente, y los otros dos genes **blaSHV** y **blaKPC** sólo tuvieron 1 cepa cada uno (Figura 19).

Figura 19.

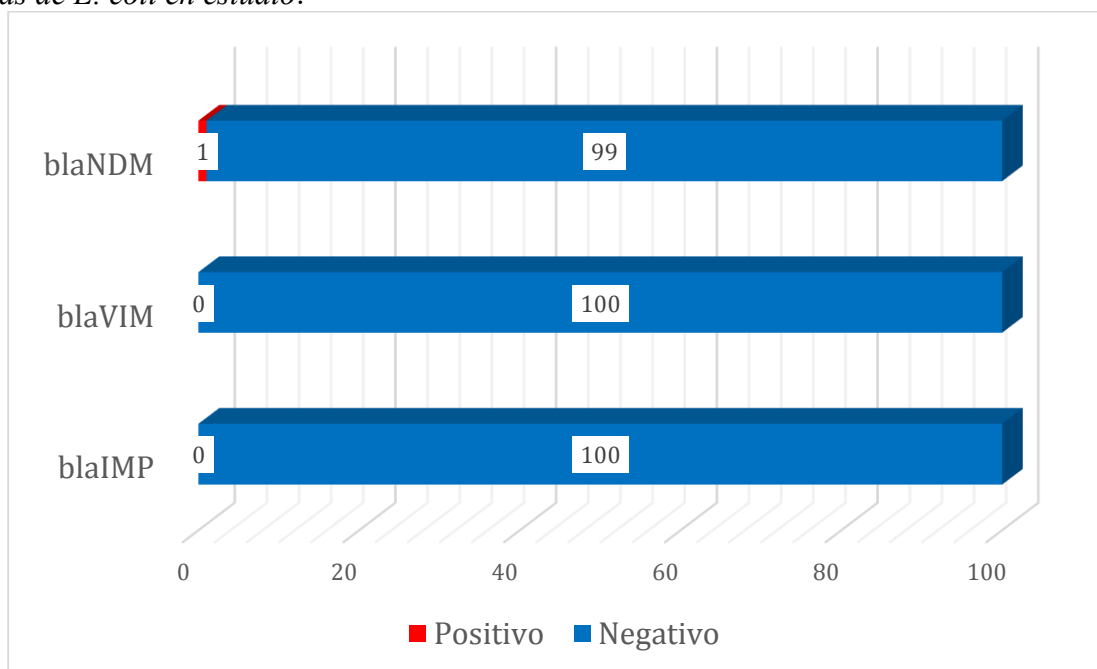
*Presencia de genes β -lactámicos de la Clase A, según la clasificación de Ambler, en muestras de *E. coli* en estudio.*



En el caso de la clasificación de Ambler para la clase molecular B que incluye los genes **blaIMP**, **blaVIM**, y **blaNDM**, solo se detectó la amplificación del gen **blaNDM** en una cepa (NSC2368). Esta cepa LFP, provenía de un urocultivo, los otros genes (**blaIMP** y **blaVIM**) no fueron detectados (Figura 20).

Figura 20.

*Presencia de genes β -lactámicos de la Clase B, según la clasificación de Ambler, en muestras de *E. coli* en estudio.*



Sobre la amplificación de genes de *E. coli*: enterotoxigénica, patogénica y difusamente adherente (MULTI-1), los hallazgos de la amplificación de genes diarreagénicos pertenecientes a las 100 cepas de *E. coli*, dieron positivo únicamente al gen difusamente adherente (**daaD**) en 12 muestras.

En cuanto a la amplificación de genes de *E. coli*: enteroinvasiva, enteroagregativa y shiga-toxina (MULTI – 2), la presencia de estos genes diarreagénicos (stx1, stx2, ipaH y aagR) dieron negativo en las 100 cepas evaluadas.

La coexistencia de genotipos relacionados con la resistencia a los antibióticos en *E. coli*, analizados en tres hospitales de la ciudad de Lima y dos en la provincia del Callao, mostró que un 87% (87/100) de las cepas presentaban genotipos relacionados con resistencia (se excluye el gen diarreagénico **daaD** y las 10 cepas negativas). Estos genotipos se clasificaron en tres categorías: únicos 55.2% (48/87) (**blaCTX-M** o **blaTEM**), combinados con dos genes (**blaCTX+blaTEM**, **blaCTX-M+mcr-1**, **blaTEM+mcr-1**,

blaTEM+blaKPC y **blaTEM+blaSHV**) 36.8% (32/87) y con tres genes (**blaCTX-blaTEM+mcr-1** y **blaCTX-M+blaTEM+blaNDM**) 8.0% (7/87). Un 10% (10/100) de las cepas no mostraron amplificación de genes de resistencia, y 3 cepas (3/100) amplificaron únicamente el gen diarregénico **daaD** (Tabla 24).

Tabla 24.

Distribución del genotipo de E. coli simples y combinados relacionados a la resistencia hallados en el presente estudio.

Gene simple o combinado	Hemocultivo	Sec.HOT	Urocultivo	Total
blaCTX-M	8	3	26	37
blaTEM	0	2	1	3
daaD	0	1	2	3
daaD/blaTEM	0	1	0	1
daaD, blaCTX-M	1	1	5	7
blaTEM/blaCTX-M	4	2	18	24
blaTEM/blaSHV	0	0	1	1
blaTEM/blaKPC	1	0	0	1
blaTEM/mcr-1	0	1	1	2
blaCTX-M/mcr-1	0	1	2	3
daaD/TEM/CTX-M	0	0	1	1
blaTEM/blaCTX-M/mcr-1	1	3	2	6
TEM/blaCTX-M/blaNDM	0	0	1	1
Negativo	0	3	7	10

Leyenda:

Sec. HOT = Secreción de herida u órgano o tejido.

Un análisis detallado, merecen las 12 cepas que amplificó al gen diarregénico **daaD**: 9 cepas provenían del INEN, 7 de las cuales fueron aisladas de urocultivo, 1 de secreción HOT y 1 de hemocultivo; 2 provenían de la FAP ambas de secreción HOT; y 1 provenía del HNDAC del Callao, proveniente de urocultivo. En cuanto a la fermentación de lactosa, 11 cepas en placa de Mac McConkey se presentan como LFP y 1 cepa dio como LFN (Tabla 25).

Tabla 25.

Muestras positivas al gen daaD de la E. coli difusamente adherente.

Nº	Código NAMRU-S	Hospital de Procedencia	Sexo	Tipo de Cultivo	Resultado Placa Mc Conkey
9	NSC1174	HNDAC	Masculino	Urocultivo	LFP
14	NSC1387	FAP	Femenino	Secreción HOT	LFN
24	NSC2109	INEN	Masculino	Hemocultivo	LFP
34	NSC2143	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP
57	NSC2219	INEN	Masculino	Urocultivo	LFP
59	NSC2221	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP
66	NSC2244	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP
69	NSC2249	INEN	Femenino	Urocultivo	LFP
84	NSC2412	FAP	Masculino	Secreción HOT	LFP
92	NSC2427	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP
98	NSC2439	INEN	No Dato	Urocultivo	LFP
99	NSC2453	INEN	No Dato	Secreción HOT	LFP

Leyenda:

Sec. HOT = Secreción de Herida u Órgano o Tejido, LFP= Lactosa fermentadora positiva, LFN = Lactosa fermentadora negativa.

En la ciudad de Lima, la resistencia a los diferentes grupos de antibióticos fue observada en muestras provenientes del INEN, de las 74 muestras, 66 genes estuvieron relacionados con la resistencia, 8 fueron negativas; 12 muestras provenían de la FAP de las cuales 9 presentaron genes relacionados con la resistencia y 3 fueron negativas; las 6 muestras provenientes del HNERM todas mostraron resistencia al grupo de los antimicrobianos evaluados. En la provincia constitucional del Callao, la resistencia a los diferentes grupos de antibióticos se observó en 7 muestras del HNDAC, 5 tuvieron resistencia y dos fueron negativos y en el CEMENA la única muestra presentó resistencia a alguno de los grupos antimicrobianos. El gen diarreagénico **daaD** fue aislados en 10 cepas del INEN, 1 de la FAP y 1 en el HNDAC del Callao.

Con relación a la identificación de los aislamientos de acuerdo al tipo de procedencia de la muestra, 15 *E. coli* fueron aisladas de hemocultivo, todas tuvieron genes de resistencia a los diferentes grupos de antimicrobianos, dos de las cuales pertenecían al mismo paciente, una identificada como LFP y la otra como LFN; 12 cepas fueron aisladas de secreción de herida, órganos y tejidos (Secreción HOT), 10 tuvieron genes de resistencia y dos fueron negativas; en las cepas aisladas de la secreción HOT de las 6 cepas, 4 tuvieron genes de resistencia y 2 fueron negativos; de las 67 cepas aisladas de urocultivo, 58 cepas manifestaron genes de resistencia a alguno de los grupos antimicrobianos, 9 dieron como negativos. Cabe mencionar que el gen diarreagénico **daaD** de la *E. coli* difusamente adherente fue encontrado en 1 hemocultivo, 1 en secreciones HOT y 10 en urocultivos.

3.6. DISCUSIÓN

El estudio de genes de resistencia presente en cepas de *E. coli* aisladas en diversas áreas geográficas es continuo, sin embargo, la asociación de genes de resistencia con genes diarreagénicos han sido poco estudiados y en el presente trabajo se ha planteado realizar esta observación en 100 cepas de *Escherichia coli* provenientes cinco nosocomios en Lima y Callao durante los años 2014 al 2017. Se realizaron pruebas fenotípicas y de susceptibilidad antimicrobiana, así como la identificación molecular para la presencia de genes de resistencia y virulencia.

De todas las cepas analizadas 84 cepas fueron lactosas fermentadoras positivas (LFP), y 16 fueron lactosas fermentadoras negativas (LFN). Esto sugiere variabilidad en el metabolismo bacteriano, lo que podría estar relacionado con cambios adaptativos ante la presión selectiva de los antibióticos (Mazumder *et al.* 2022).

Las categorías de resistencia adquirida se basan en el número de clases de antimicrobianos frente a las cuales una bacteria presenta resistencia. Así, una cepa se considera multirresistente (MDR) cuando es no susceptible al menos a una clase en tres o más grupos de antimicrobianos. Se clasifica como extensamente resistente (XDR) cuando es no susceptible a todas las clases antimicrobianas excepto una o dos. Finalmente, se define como pan-resistente (PDR) cuando la cepa es no susceptible a todos los agentes en todas las clases antimicrobianas probadas (Magiorakos, AP., *et al.*, 2012; Rastmanesh S., *et al.*, 2024).

Estas definiciones permiten una estandarización global en la categorización de la resistencia bacteriana y facilitan la comparación entre estudios. En base a esta categorización internacional de expertos para definiciones estándar provisionales a resistencia adquirida, se evaluó el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las 100 cepas analizadas. Del total, se identificó 1 cepa no multirresistente (No-MDR) (NSC2226), 2 cepas multirresistentes (MDR) (NSC0945, NSC2426) y 97 cepas extensamente resistente a los fármacos (XDR).

El 98% de las cepas fueron productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), lo que refleja una alta prevalencia de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, específicamente cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima (CTX) y ceftriaxona (CRO), lo que difiere de lo observado previamente por Marcos-Carbajal, P. *et al* (2021) el cual obtuvo 55.7%. Además, se observó resistencia significativa (“R”+“I”) a las tetraciclinas (75%), antagonista del folato (76%), monobactámico (79%), aminoglucósidos (85%), fluoroquinolona (95%), agentes combinados β -lactámicos (96%) y cefalosporinas (97%), corroborando lo hallado por Marcos-Carbajal, P. *et al* (2021) y Loyola, S., *et al.* (2021).

En cuanto a los resultados de la microdilución en placa para la colistina, se obtuvo una positividad del 11% y todas estas cepas fueron positivas para β -lactamasa de espectro extendido (BLEE).

El análisis molecular reveló que el gen **blaCTX-M**, asociado con la producción de BLEE, fue el más prevalente, presente en 79 cepas, seguido de **blaTEM** en 40 cepas, corroborando lo hallado con Loyola, S., *et al.* (2021).

La coexistencia de genes de resistencia, como *mcr-1* (resistencia a colistina) y **blaCTX-M**, es particularmente preocupante, ya que indica la presencia de cepas multirresistentes que son difíciles de tratar con los antibióticos convencionales.

En dos muestras ambas del INEN (NSC2110 y NSC2355) se pudieron aislar dos tipos de *E. coli* (LFP y LFN) provenientes de hemocultivo y la otra de urocultivo respectivamente. En las cepas que provenían de hemocultivo se pudo identificar que poseían un gen común el gen **blaTEM**, identificado como codificante para las β -lactamasas de clase A, que son enzimas capaces de degradar antibióticos β -lactámicos, como penicilinas y algunas cefalosporinas pero difieren en el segundo gen asociado, uno presentó el gen **blaCTX-M** (LFN) y el otro el gen **blaKPC** (LFP) es una carbapenemasa, una enzima que

degrada los antibióticos carbapenémicos (como Imipenem y Meropenem), que son generalmente considerados como últimos recursos para tratar infecciones multirresistentes.

Las dos cepas provenientes de urocultivo presentaron el gen **blaCTX-M** que es una de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) más comunes a nivel mundial (Marcos-Carbajal, P. *et al.*, 2021), lo que representa un problema clínico significativo, ya que las infecciones por bacterias portadoras de este gen a menudo son difíciles de tratar debido a la resistencia a múltiples antibióticos. En ningún caso presentaron genes diarregénicos asociados.

En el caso de los genes β -lactámicos pertenecientes a la clase molecular A, se observó que la mayor parte de las asociaciones génicas simultáneas involucraron al gen **CTX-M**, reconocido por conferir resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, tales como la Cefotaxima (CTX), Ceftriaxona (CRO) y Ceftazidima (CAZ) (Zhao, W. H., *et al.*, 2013; Shafiq, M., *et al.*, 2019; Marcos-Carbajal, P. *et al.*, 2021).

La presencia del gen **daaD** correspondiente a la *E. coli* difusamente adherente, mayormente en muestras procedentes de urocultivo (8/12), con predominancia en el sexo femenino (4/12), puede atribuirse a factores anatómicos y fisiológicos que aumentan la susceptibilidad a infecciones urinarias en este grupo (Baimakhanova, B., *et al.*, 2025).

La ausencia de amplificación de genes de resistencia en las ocho cepas (NSC1726, NSC1782, NSC1818, NSC2367, NSC2374, NSC2419, NSC2425 y NSC2430), que mostraron resistencia fenotípica a β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y según los diámetros críticos de tamizaje para BLEE, se confirmó la presencia de resistencia, ya que la Cefotaxima (CTX) y Ceftriaxona (CRO) resultaron resistentes, demostrando utilidad de este enfoque en la detección de BLEE (Figura 8) se podría deberse a que los mecanismos de resistencia de estas cepas no estén relacionados con genes comunes de BLEE. Es posible que estas cepas utilicen otros mecanismos de resistencia distintos de los genes típicamente

asociados con BLEE (como **blaCTX-M**, **blaTEM**, **blaSHV**), podrían estar empleando mecanismos de resistencia mediados por bombas de eflujo o cambios en la permeabilidad de la membrana. Otra causa podría ser mutaciones en los genes de resistencia que pueden haber afectado la región de unión de los cebadores usados en la PCR, impidiendo la amplificación. También es posible que los alelos no estuvieran incluidos en la lista de cebadores utilizados.

En el caso particular de la cepa aislada de hemocultivo (NSC2109), así como las dos cepas de obtenidas de urocultivo en pacientes masculinos (NSC1174, NSC2219) y las tres cepas provenientes de secreción HOT (NSC1387, NSC2412 y NSC2453), todas ellas presentaron el gen diarreagénico **daaD**. Esta coincidencia sugiere la posibilidad de una infección sistémica, la cual se caracteriza por afectar todo el organismo en lugar de limitarse a un solo órgano o región. En estos casos, el patógeno puede diseminarse a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático (Daga, AP. *et al.*, 2019), provocando síntomas generalizados, de este último grupo de cepas, se destaca la presencia de una *E. coli* LFN.

Por último, la detección de cepas aisladas de muestras no fecales que presentan resistencia a múltiples grupos de antibióticos y que además portan genes asociados con la producción de diarrea, representa un serio riesgo para la salud pública. Este riesgo se incrementa significativamente si estas cepas son multidrogo-resistentes y también contienen el gen de la resistencia a la colistina. En este estudio de 100 cepas analizadas, no se encontró resistencia a los carbapenémicos, antibióticos utilizados principalmente para tratar *Pseudomonas sp* y *Acinetobacter sp*, y recomendados por el CLSI para organismos del orden Enterobacterales (CLSI, 2025), así mismo tampoco los genes **blaVIM** ni **blaIMP** pertenecientes a la clase molecular B.

CONCLUSIONES

1. Del total de 102 cepas analizadas, todas fueron reidentificadas mediante espectrometría de masas (MALDI ToF MS), técnica que resultó fundamental para la correcta identificación. Gracias a este análisis, se detectó que dos muestras inicialmente enviadas desde el hospital de origen como *Escherichia coli* correspondían en realidad a *Klebsiella pneumoniae*, por lo que ambas fueron reemplazadas por otras dos cepas. Así mismo, una cepa proveniente del INEN enviada como *Enterobacter aerogenes* y otra proveniente del CEMENA enviada como *Klebsiella pneumoniae*, en ambos casos la identificación fue corroborada como *E. coli*.
2. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó en las 100 cepas mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para este tipo de microorganismo. Se emplearon 22 antimicrobianos, lo que permitió establecer su caracterización fenotípica. Observándose una resistencia del 97% para las cefalosporinas de tercera generación, 96% a los agentes combinados β -lactámicos, 95 % para las quinolonas, 85% para los aminoglucósidos, 79% para el monobactámico, 76% para antagonista del folato, 75% para las tetraciclinas, 11% para la polimixina y 3% para los carbapenémicos.
3. Mediante la técnica de PCR, se detectaron genes β -lactámicos de la clase A en las cepas analizadas. El gen blaCTX-M fue el más prevalente, con una positividad del 79%, seguido de blaTEM con 40%. Los genes blaSHV y blaKPC fueron detectados ambas en 1% de las cepas.
4. Mediante la técnica de PCR, se detectaron genes β -lactámicos de la clase B en las cepas analizadas. El gen blaNDM fue identificado en el 1% de las cepas, mientras que no se detectaron los genes blaIMP y blaVIM.
5. La amplificación del gen diarreagénico daaD, correspondiente a la *E. coli* difusamente adherente (ECDA), se realizó mediante la técnica de PCR. Este gen fue detectado en un total

de 12 cepas: en tres de ellas como gen único, en siete en combinación con el gen **blaCTX-M**, en una con **blaTEM** y en una más con ambos genes (**blaCTX-M+blaTEM**). Una de las cepas portadoras de **daaD** fue lactosa no fermentadora. El gen **mcr-1**, asociado a la resistencia a la colistina no fue detectado en ninguna de las cepas portadoras de **daaD**.

6. El gen **mcr-1** de resistencia a la colistina detectado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estuvo presente en 4 de los 5 nosocomios evaluados, en su mayoría provenientes del INEN (5/11), la cual mostro una asociación con los genes β -lactámicos **blaCTX-M**, y **blaTEM** lo que sugiere la presencia de mecanismos de resistencia múltiples. Tres cepas provenían de la FAP (3/11), dos del Hospital nacional Edgardo Rebagliatti (2/11) y una del Hospital nacional Daniel A. Carrión (1/11), todas ellas con la misma asociación de genes β -lactámicos. Esta co-expresión podría facilitar la diseminación horizontal de genes de resistencia a través de elementos genéticos móviles, representando un riesgo significativo para el tratamiento clínico y la salud pública.
7. La asociación entre los perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana y la detección de genes de resistencia reveló que el 87 % (87/100) de las cepas de *E. coli* portaban genes β -lactámicos, con mayor frecuencia aquellos pertenecientes a la clase molecular A (**blaCTX-M** y **blaTEM**), relacionados con resistencia a cefalosporinas de tercera generación, combinaciones con inhibidores de β -lactamasas y monobactámico, en concordancia con los resultados fenotípicos.
8. La presencia de genes de la clase molecular B (**blaNDM**, **blaIMP** y **blaVIM**) se identificó en una cepa, la cual fue sensible a Ertapenem e Imipenem. Este resultado se obtuvo en el marco del panel de antimicrobianos evaluados en el estudio.
9. Dos cepas presentaron fenotipo de resistencia a los carbapenémicos sin amplificación de **blaNDM**, **blaIMP** o **blaVIM**. En este estudio no se incluyeron cebadores específicos para la detección de genes asociados a resistencias a quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas y

antagonistas del folato. El 13 % (13/100) de las cepas no presentó amplificación de genes β -lactámicos; de estas, 11 fueron fenotípicamente positivas para BLEE, y en tres se detectó además el gen diarreagénico daaD. En las 2 cepas negativas para BLEE, no se detectó la presencia de ningún gen β -lactámico, en concordancia con su perfil fenotípico.

SUGERENCIAS

Para detectar posibles productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), se recomienda usar los diámetros críticos de tamizaje y corroborar o confirmar los resultados con métodos adicionales disponibles para confirmar la presencia de estos genes de resistencia.

En el presente estudio se ha observado coexistencia entre genes diarreagénicos y genes β -lactámicos, por lo que se sugiere continuar con la vigilancia.

No se debe ignorar la presencia de *E. coli* lactosa negativa, que en los resultados también portan genes de resistencia y de producción de diarrea.

BIBLIOGRAFÍA

- Adrianzén, D., Arbizu, Á., Ortiz, J., & Samalvides, F. (2013). Mortalidad por bacteriemia causada por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. productoras de beta lactamasas de espectro extendido: cohorte retrospectiva en un hospital de Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 30, 18-25.
- Ahmed, Z. S., Elshafiee, E. A., Khalefa, H. S., Kadry, M., & Hamza, D. A. (2019). Evidence of colistin resistance genes (*mcr-1* and *mcr-2*) in wild birds and its public health implication in Egypt. *Antimicrob Resist Infect Control*, 8, 197. doi:10.1186/s13756-019-0657-5
- Al-Hadidi, S. H., Alhussain, H., Abdel Hadi, H., Johar, A., Yassine, H. M., Al Thani, A. A., & Eltai, N. O. (2021). The Spectrum of Antibiotic Prescribing During COVID-19 Pandemic: A Systematic Literature Review. *Microb Drug Resist*, 27(12), 1705-1725. doi:10.1089/mdr.2020.0619.
- Baimakhanova, B., Sadanov, A., Trenozhnikova, L., Balgimbaeva, A., Baimakhanova, G., Orasymbet, S., Tleubekova, D., Amangeldi, A., Turlybaeva, Z., Nurgaliyeva, Z., Seisebayeva, R., Kozhekenova, Z., Sairankyzy, S., Shynykul, Z., Yerkenova, S., & Turgumbayeva, A. (2025). Understanding the Burden and Management of Urinary Tract Infections in Women. *Diseases*, 13(2), 59. <https://doi.org/10.3390/diseases13020059>.
- Boolchandani M, Blake KS, Tilley DH, Cabada MM, Schwartz DJ, Patel S, Morales ML, Meza R, Soto G, Isidean SD, Porter CK, Simons MP, Dantas G. Impact of international travel and diarrhea on gut microbiome and resistome dynamics. *Nat Commun*. 2022 Dec 5;13(1):7485. doi: 10.1038/s41467-022-34862-w. PMID: 36470885; PMCID: PMC9722912.
- Bora, A., Sanjana, R., Jha, B. K., Mahaseth, S. N., & Pokharel, K. (2014). Incidence of metallo-beta-lactamase producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in central Nepal. *BMC Res Notes*, 7, 557. doi:10.1186/1756-0500-7-557
- Bilal H, Rehman TU, Khan MA, Hameed F, Jian ZG, Han J, Yang X. Molecular Epidemiology of *mcr-1*, *bla_{KPC-2}*, and *bla_{NDM-1}* Harboring Clinically Isolated *Escherichia coli* from Pakistan. *Infect Drug Resist*. 2021 Apr 16;14:1467-1479. doi: 10.2147/IDR.S302687. PMID: 33888998; PMCID: PMC8057800.
- Bush, Km. (2018). Past and Present Perspectives on beta-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(10). doi:10.1128/AAC.01076-18

- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(3), 969-976. Boolchandani doi:10.1128/AAC.01009-09
- Campo Pfuyo, L. I. (2024). "Identificación fenotípica y molecular (PCR) DE β -Lactamasas tipo BLEE y carbapenemasas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aislados de pacientes intrahospitalarios en la ciudad de Cusco". *Tesis Para optar al título profesional de Biólogo*.
- Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*. 2013 Aug;303(6-7):298-304. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.001. Epub 2013 Mar 14. PMID: 23499304.
- CLSI. (2025). M100-Ed33 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Edition N°35*.
- Daga Ana Paula, Lumi Koga Vanessa, Material Soncini João Gabriel, Martins de Matos Caroline, Eches Perugini Marcia Regina, Pelisson Marsileni, Katsuko T. Kobayashi Renata and Vespero Eliana Carolina. “*Escherichia coli* Bloodstream Infections in Patients at a University Hospital: Virulence Factors and Clinical Characteristics” (2019). *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 05 June 2019 Sec. Clinical Microbiology Volume 9 - 2019 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00191>.
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S. *et al.* The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 19, 37–54 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>
- Diene, S. M., & Rolain, J. M. (2014). Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species. *Clin Microbiol Infect*, 20(9), 831-838. doi:10.1111/1469-0691.12655
- Dingle, T. C., & Butler-Wu, S. M. (2013). Maldi-tof mass spectrometry for microorganism identification. *Clin Lab Med*, 33(3), 589-609. doi: 10.1016/j.cll.2013.03.001
- El-Hariri SA, Saleh F, Moghnieh W, Sokhn ES. Phenotypic and molecular characterization of ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among Lebanese patients. *JAC Antimicrob Resist*. 2023 Jun 9;5(3): dlad074. doi: 10.1093/jacamr/dlad074. PMID: 37305848; PMCID: PMC10251202.
- Foster-Nyarko E, Pallen MJ. The microbial ecology of *Escherichia coli* in the vertebrate gut. *FEMS Microbiol Rev*. 2022 May 6;46(3):fuac008. doi: 10.1093/femsre/fuac008. PMID: 35134909; PMCID: PMC9075585.
- Fracalvieri R, Bianco A, Difato LM, Capozzi L, Del Sambro L, Castellana S, Donatiello A, Serrecchia L, Pace L, Farina D, Galante D, Caruso M, Tempesta M, Parisi A.

- Isolation and Characterization of Colistin-Resistant Enterobacteriaceae from Foods in Two Italian Regions in the South of Italy. *Microorganisms*. 2025 Jan 14;13(1):163. doi: 10.3390/microorganisms13010163. PMID: 39858930; PMCID: PMC11767609.
- Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, Rolain J. 2014. ARG-ANNOT, a New Bioinformatic Tool to Discover Antibiotic Resistance Genes in Bacterial Genomes. *Antimicrob Agents Chemother* 58. <https://doi.org/10.1128/aac.01310-13>
- Ghorbani-Dalini, S., Kargar, M., Doosti, A., Abbasi, P., & Sarshar, M. (2015). Molecular Epidemiology of ESBL Genes and Multi-Drug Resistance in Diarrheagenic *Escherichia Coli* Strains Isolated from Adults in Iran. *Iran J Pharm Res*, 14(4), 1257-1262.
- González Mesa, L., Ramos Morí, A., Nadal Becerra, L., Morffi Figueroa, J., Hernández Robledo, E., Álvarez, A. B., . . . Vallin Plous, C. (2007). Identificación fenotípica y molecular de b-lactamasas de espectro extendido TEM y SHV producidas por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. aislados clínicos de hospitales. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 59, 0-0.
- Gomes, T. A., Elias, W. P., Scaletsky, I. C., Guth, B. E., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M., . . . Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol*, 47 Suppl 1, 3-30. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.015
- Guion, C. E., Ochoa, T. J., Walker, C. M., Barletta, F., & Cleary, T. G. (2008). Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 46(5), 1752-1757. doi:10.1128/JCM.02341-07
- Hufnagel, D. A., Depas, W. H., & Chapman, M. R. (2015). The Biology of the *Escherichia coli* Extracellular Matrix. *Microbiol Spectr*, 3(3). doi:10.1128/microbiolspec. MB-0014-2014
- INS, I. N. D. P. (2002). "Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión". *Serie de Normas Técnicas*, N° 30.
- Jang, J., Suh, Y. S., Di, D. Y., Unno, T., Sadowsky, M. J., & Hur, H. G. (2013). Pathogenic *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in the Yeongsan River basin of South Korea. *Environ Sci Technol*, 47(2), 1128-1136. doi:10.1021/es303577u
- Jung, B., & Hoilat, G. J. (2023). MacConkey Medium. In *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 123-140. doi:10.1038/nrmicro818.

- Lee YL, Chen HM, Hii IM, Hsueh PR. Carbapenemase-producing Enterobacterales infections: recent advances in diagnosis and treatment. *Int J Antimicrob Agents*. 2022 Feb;59(2):106528. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2022.106528. Epub 2022 Jan 19. PMID: 35063651.
- Limbago, B. M., Rasheed, J. K., Anderson, K. F., Zhu, W., Kitchel, B., Watz, N., . . . Kallen, A. J. (2011). IMP-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States. *J Clin Microbiol*, 49(12), 4239-4245. doi:10.1128/JCM.05297-11
- Loyola, S., Concha-Velasco, F., Pino-Dueñas, J., Vasquez-Luna, N., Juarez, P., Llanos, C., Salvatierra, G., Tamariz, J., & Lescano, A. G. (2021). Antimicrobial Resistance Patterns and Dynamics of Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing Uropathogenic *Escherichia coli* in Cusco, Peru. *Antibiotics*, 10(5), 485. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050485>
- Maciucă, I. E., Cummins, M. L., Cozma, A. P., Rimbu, C. M., Guguianu, E., Panzaru, C., Licker, M., Szekely, E., Flonta, M., Djordjervic, S., Timofte, D. (2019). Genetic Features of mcr-1 Mediated Colistin Resistance in CMY-2-Producing *Escherichia coli* From Romanian Poultry. *Front Microbiol*, 10, 2267. doi:10.3389/fmicb.2019.02267.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Epub 2011 Jul 27. PMID: 21793988.
- Marcos-Carbajal P, Salvatierra G, Yareta J, Pino J, Vásquez N, Díaz P, Martínez I, Asmat P, Peralta C, Huamani C, Briones A, Ruiz M, Laura N, Luque Á, Arapa L, Tsukayama P. Microbiological and molecular characterization of antimicrobial resistance in uropathogenic *Escherichia coli* from peruvian public hospitals. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2021 Jan-Mar;38(1):119-123. Spanish, English. doi: 10.17843/rpmesp.2021.381.6182. Epub 2021 Jun 25. PMID: 34190903.
- Mazumder, R., Hussain, A., Phelan, J. E., Campino, S., Haider, S. M. A., Mahmud, A., Ahmed D., Asadulghani, Md, Clark, T., Mondal, D. (2022). Non-lactose fermenting *Escherichia coli*: Following in the footsteps of lactose fermenting *E. coli* high-risk clones. *Front Microbiol*, 13, 1027494. doi:10.3389/fmicb.2022.1027494

- Mondal AH, Khare K, Saxena P, Debnath P, Mukhopadhyay K, Yadav D. A Review on Colistin Resistance: An Antibiotic of Last Resort. *Microorganisms*. 2024 Apr 11;12(4):772. doi: 10.3390/microorganisms12040772. PMID: 38674716; PMCID: PMC11051878.
- Mueller M, Tainter CR. *Escherichia coli* Infection. 2023 Jul 13. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 33231968.
- Nasrollahian S, Graham JP, Halaji M. A review of the mechanisms that confer antibiotic resistance in pathotypes of *E. coli*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024 Apr 4;14:1387497. doi: 10.3389/fcimb.2024.1387497. PMID: 38638826; PMCID: PMC11024256.
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11(1), 142-201.
- Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, Mercado E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008 Sep;102(9):852-6. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.03.017. Epub 2008 May 2. PMID: 18455741; PMCID: PMC2575077.
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, 18(4), 657-686. doi:10.1128/CMR.18.4.657-686.2005
- Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev*, 30(2), 557-596. doi:10.1128/CMR.00064-16
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 70(1), 119-123. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002
- Quino, W., Mestanza, O., Caro-Castro, J., Hurtado, C. V., & Gavilan, R. G. (2020). Resistome and comparative genomics of clinical isolates of diarrheagenic *Escherichia coli* from Lima, Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 37(4), 705-710. doi:10.17843/rpmesp.2020.374.5240.
- Rastmanesh S, Zeinaly I, Alivirdiloo V, Mobed A, Darvishi M. Biosensing for rapid detection of MDR, XDR and PDR bacteria. *Clin Chim Acta*. 2025 Feb 1;567:120121. doi: 10.1016/j.cca.2024.120121. Epub 2024 Dec 31. PMID: 39746435.
- Shafiq, M., Huang, J., Ur Rahman, S., Shah, J. M., Chen, L., Gao, Y., . . . Wang, L. (2019). High incidence of multidrug-resistant *Escherichia coli* coharboring mcr-1 and bla

- CTX-M-15 recovered from pigs. *Infect Drug Resist*, 12, 2135-2149.
doi:10.2147/IDR.S209473
- Shi, H., Sun, F., Chen, J., Ou, Q., Feng, W., Yong, X., & Xia, P. (2015). Epidemiology of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing nosocomial - *Escherichia coli* infection in China. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 14, 4.
doi:10.1186/s12941-015-0063-7
- Wang, D., Ji, X., Jiang, B., Yuan, Y., Liang, B., Sun, S., Zhu, L., Liu, J., Guo, X., Yin, Y., & Sun, Y. (2024). Prevalence of Antibiotic Resistance and Virulence Genes in *Escherichia coli* Carried by Migratory Birds on the Inner Mongolia Plateau of Northern China from 2018 to 2023. *Microorganisms*, 12(6), 1076.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12061076>
- Zemelman Z, R., Valenzuela G., L., Domínguez Y, M., Bello T, H., González R, G., & Zemelman M, C. (2002). Detección de β -lactamasas de espectro extendido en el laboratorio de microbiología. *Revista chilena de infectología*, 19, 92-95.
- Zhao, W. H., & Hu, Z. Q. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol*, 39(1), 79-101.
doi:10.3109/1040841X.2012.691460.

ANEXOS

Anexo 1. Convenio cooperativo de investigación y desarrollo (Cooperative Research and Development Agreement -CRADA).

A LIMITED PURPOSE
COOPERATIVE RESEARCH AND DEVELOPMENT AGREEMENT
(LP-CRADA)
FOR EQUIPMENT, DATA OR MATERIAL TRANSFER
(FROM NAVY PROVIDER TO NON-NAVY RECIPIENT)

FROM

U.S NAVAL MEDICAL RESEARCH UNIT SOUTH (NAMRU SOUTH)

TO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO (UNSAAC)

AGREEMENT TITLE: "Transfer of data for thesis of Mr. Enrique A. Canal."

AGREEMENT NUMBER: LP-CRADA-NAMRU-6-23-11583



AGREEMENT ADMINISTRATORS:

NAMRU SOUTH

Technology Transfer Office: Leslie Gunn Jordan, 301-319-6460,
leslie.s.gunnjordan.civ@health.mil

Office of the ORTA: Donaldson Santos, +1(240) 595-3907,
donaldson.g.santos.civ@health.mil

Intellectual Property Counsel: Dr. Ning Yang, JD, 301 319-9433,
ning.yang.civ@health.mil

Principal Investigator: LT Tyler D. Moeller, PhD, +511-6144141x 196,
tyler.d.moeller.mil@health.mil

UNSAAC

Preferred Contact: Luciano Julian Cruz Miranda, +51 987969767
facultad.csbiologicas@unsaac.edu.pe

Principal Investigator: Dr. Maria A. Quispe Ricalde, +51 973512698,
antonieta.quispe@unsaac.edu.pe

TABLE OF CONTENTS

<u>PREAMBLE</u>	3
<u>Article 1. DEFINITIONS</u>	3
1.1 "Classified Information (CI)"	3
1.2 "Controlled Unclassified Information (CUI)"	3
1.3 "Data"	3
1.4 "Government"	3
1.5 "Information"	4
1.6 "Invention"	4
1.7 "Patent Application"	4
1.8 "Proprietary Information"	4
1.9 "Technical Information"	4
<u>Article 2. DATA TO BE TRANSFERRED</u>	4
<u>Article 3. PURPOSE FOR TRANSFER (PURPOSE)</u>	4
<u>Article 4. PROTECTION OF INFORMATION</u>	5
<u>Article 5. PUBLICATIONS</u>	5
<u>Article 6. WARRANTY</u>	5
<u>Article 7. LIABILITY</u>	5
<u>Article 8. RETURN OF DATA</u>	6
<u>Article 9. PRE-EXISTING INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS</u>	6
<u>Article 10. INVENTION LICENSE</u>	6
<u>Article 11. DELIVERY</u>	6
<u>Article 12. DURATION</u>	6
<u>Article 13. AMENDMENT</u>	6
<u>Article 14. ENTIRE AGREEMENT</u>	7
<u>Article 15. GOVERNING LAW</u>	7
<u>Article 16. FUNDS</u>	7
<u>Article 17. TITLE</u>	7



<u>Article 18.</u>	<u>USE OF NAME OR ENDORSEMENTS</u>	<u>7</u>
<u>Article 19.</u>	<u>PUBLIC RELEASE OF THIS AGREEMENT</u>	<u>7</u>
<u>Article 20.</u>	<u>EFFECTIVE DATE.....</u>	<u>7</u>
<u>Article 21.</u>	<u>NOTICES.....</u>	<u>7</u>
<u>Article 22.</u>	<u>SURVIVING PROVISIONS.....</u>	<u>8</u>
<u>Article 23.</u>	<u>SIGNATURES.....</u>	<u>8</u>



- 1.5 "Information" means all Data, trade secrets, and commercial and financial information.
- 1.6 "Invention" means any invention or discovery which is or may be patentable under Title 35 of the United States Code.
- 1.7 "Patent Application" means U.S. or foreign patent application, continuation, continuation-in-part, divisional, reissue and/or reexamination on any Invention.
- 1.8 "Proprietary Information" means information that:
- (i) embodies trade secrets developed at private expense or business, commercial, or financial information that is privileged or confidential provided that such information: (a) is not known or available from other sources without obligations concerning its confidentiality; (b) has not been made available by the owners to others without obligation concerning its confidentiality; (c) is not already available to the Government without obligation concerning its confidentiality; and (d) has not been developed independently by persons who have had no access to the information; or
 - (ii) has been generated by the Navy Collaborator during the performance of this Agreement, and would have qualified as Proprietary Information under 1.8 (i) above if it had been generated by the Non-Navy Collaborator, and that the Collaborators have agreed to treat as Proprietary Information for a term of up to five years from generation.
- 1.9 "Technical Information" means Information relating to research, development, engineering, test, evaluation, production, operation use, and maintenance of munitions and other military supplies and equipment.



Article 2. DATA TO BE TRANSFERRED

PROVIDER owns, controls, or otherwise has all rights in the DATA being transferred, hereafter DATA. PROVIDER has the right to and will transfer Data from 100 strains of *Escherichia coli* from research conducted at NAMRU SOUTH under protocol 2017.0012. This research work will be retrospective using previously obtained data from 100 strains of *E. coli*, selected between March 2014 and June 2017, including the identification, susceptibility, and molecular biology (PCR) results from genes involved in producing diarrhea and resistance to carbapenems and colistin. The data will be compiled and sent to RECIPIENT for the conduct of the research, tests, evaluation, development, or engineering efforts and purposes stated below.

Article 3. PURPOSE FOR TRANSFER (PURPOSE)

(a) RECIPIENT agrees that it will use the DATA solely for analysis and to complete thesis work (PURPOSE) under the direction and control of RECIPIENT's Principal Investigator (PI), Dr. Maria A. Quispe Ricalde, and will follow the United States Federal statutes, rules and regulations controlling the handling and use of research equipment and/or materials of the type described as the DATA, as applicable. RECIPIENT agrees that it will not use the DATA for any commercial or production purposes. This Agreement does not constitute or create a joint venture, partnership or

formal business entity of any kind.

(b) This Agreement is not a license in Government Intellectual Property including patents or patent applications except for the limited PURPOSE stated. This Agreement shall not be interpreted to alter any pre-existing rights to the DATA. PROVIDER reserves the right to provide the DATA to others. RECIPIENT agrees not to produce, modify or duplicate the DATA for any purpose unless that intention is stated as part of the research PURPOSE, subparagraph 2(a) supra.

(c) If RECIPIENT desires to use the DATA for purposes other than the PURPOSE, RECIPIENT agrees, before beginning any such use, to negotiate a full CRADA and/or a license for any patent or other intellectual property, specific for that use, in good faith with PROVIDER as provided by Federal law. It is understood by RECIPIENT that PROVIDER shall have no obligation to grant such a license or enter into a CRADA with RECIPIENT, and may grant exclusive or non-exclusive commercial licenses to others as provided by law.

Article 4. PROTECTION OF INFORMATION

The Parties shall confer and agree what information created by the Navy PROVIDER shall be designated GOVERNMENT PROPRIETARY INFORMATION. RECIPIENT will treat GOVERNMENT PROPRIETARY INFORMATION in a manner equivalent to the manner the Government treats NON-GOVERNMENT PROPRIETARY INFORMATION. It is RECIPIENT's responsibility to properly identify its PROPRIETARY INFORMATION.



CI, CUI or otherwise restricted information shall be protected in accordance with the security laws of the U.S.

Article 5. PUBLICATIONS

RECIPIENT agrees to provide appropriate acknowledgement of the source of the DATA in all publications. PROVIDER and RECIPIENT agree to confer and consult to provide a reasonable review period 30 days prior to the publication or presentation of DATA regarding the DATA to assure that no Proprietary or otherwise protected information is released and that patent rights are protected. Publication and/or presentation will be delayed for a reasonable time to afford needed protection. The RECIPIENT shall provide a report of the research results to the PROVIDER within 180 One hundred and eighty days from the testing of the DATA.

Article 6. WARRANTY

RECIPIENT agrees that PROVIDER makes no representations and extends no warranty of any kind, either expressed or implied regarding the DATA. There are no expressed or implied warranties of merchantability or fitness for a particular purpose, or that the use of DATA will not infringe any patent, copyright, trademark, or other rights.

Article 7. LIABILITY

RECIPIENT agrees to assume all risks, direct or consequential, from their use, storage and/or



RETURN OF DATA

Agrees that any and all DATA and information regarding this DATA received from including copies of information, shall remain the property of PROVIDER. These items will be returned or destroyed at the termination of this Agreement in accordance with the terms of the PROVIDER. All requests and responses must be in writing. The DATA and information shall be returned at no expense to the PROVIDER.

PRE-EXISTING INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

esss provided in this Agreement, no rights are provided to RECIPIENT under any patents, patent applications, protected information or other intellectual property of

INVENTION LICENSE

PROVIDER shall retain title to any Invention of its employees made in the performance of the RECIPIENT shall notify PROVIDER of the receipt of any Invention disclosure or modification of the DATA. RECIPIENT grants the Government a nonexclusive, paid-up license to practice the Invention, or have the Invention practiced throughout the United States on behalf of the Government. Upon request, RECIPIENT shall give the Government a written statement, prepared in a form satisfactory to the Government confirming such rights as

DELIVERY

the PROVIDER will deliver the DATA upon execution of this Agreement to the within 30 days from the effective date of this Agreement.

DURATION

it will terminate on the earliest of the following dates:

- months or 3 years from the effective date of this Agreement.

AMENDMENT

This Agreement can be amended only by a written amendment mutually agreed to and signed by the Agreement signatories or their successors.

Article 14. ENTIRE AGREEMENT

This Agreement is the entire Agreement between the Collaborators concerning the PURPOSE and supersedes any prior understanding or written or oral agreement relative to the PURPOSE.

Article 15. GOVERNING LAW

United States Federal Law shall govern this Agreement for all purposes.

Article 16. FUNDS

It is agreed and understood that the DATA is furnished and the Agreement is entered into at no cost to the PROVIDER.

No funds are transferred under this Agreement from the Navy PROVIDER to the Non-Navy RECIPIENT.

Article 17. TITLE

Each Collaborator shall retain title to all tangible property to which it had title prior to the effective date of this Agreement.



Article 18. USE OF NAME OR ENDORSEMENTS

RECIPIENT shall not use the name of the PROVIDER or any other Government entity on any product or service that is directly or indirectly related to this Agreement without the prior approval of PROVIDER.

Article 19. PUBLIC RELEASE OF THIS AGREEMENT

This Agreement document is releasable to the public.

Article 20. EFFECTIVE DATE

The effective date of this Agreement is the date of execution by the last to sign for the DURATION set in Article 11.

Article 21. NOTICES

All notices will be sent to the Agreement administrators or their successors at the addresses shown in the PREAMBLE.

Article 22. SURVIVING PROVISIONS

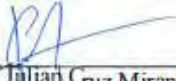
All the Articles of this Agreement shall survive its termination.

Article 23. SIGNATURES

Accepted for RECIPIENT:

I, the undersigned, am duly authorized to bind **UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO (UNSAAC)** to this Agreement and do so by affixing my signature hereto.

Entered into this 31 day of August 2023.
(month)

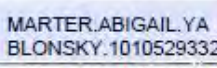
By: 
Name: Luciano Julian Cruz Miranda
Title: Dean of Faculty of Biological Science. UNSAAC




DR. LUCIANO JULIAN CRUZ MIRANDA
DECANO

Accepted for PROVIDER: the undersigned, am duly authorized to bind **U.S. NAVAL MEDICAL RESEARCH UNIT SOUTH** to this Agreement and do so by affixing my signature hereto.

Entered into this 6th day of October 2023.
(month)

By: 
Name: A.Y. MARTER, CAPT, USN
Title: Commanding Officer, NAMRU SOUTH

Digitally signed by
MARTER, ABIGAIL YABLONSKY, 101
0529332
Date: 2023.10.06 10:49:35 -05'00'

Anexo 2. Resultado de la evaluación a aspectos bioéticos y metodológicos por parte del Comité de Bioética Institucional en Investigación de la UNSAAC.



Comité de Bioética Institucional y Sub Comités de Bioética de la UNSAAC

**“Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra
Independencia, y de la conmemoración de las heroicas batallas
de Junín y Ayacucho”**

Cusco, 04 de octubre del 2024

Oficio virtual N° 004-2024-CBI-UNSAAC

Sr. Bach. ENRIQUE ALBERTO CANAL ESQUTVEL

Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

ASUNTO : Informe final sobre aspectos bioéticos del proyecto de investigación.

Ref : Exp. 659465

De mi mayor consideración:

Previo un cordial y atento saludo, el presente es para remitir a usted el informe CBI-UNSAAC2024-004 de la revisión final de los aspectos bioéticos al trabajo de investigación “Concomitancia de los genes diarreagénicos con los genes que codifican β -lactamasas y con el gen de la resistencia a la colistina, en cepas de *Escherichia. coli* provenientes de muestras nosocomiales”.

En la revisión del trabajo de investigación han participado los miembros del CBI-UNSAAC y los miembros del Subcomité de bioética en ensayos clínicos, estudios clínicos epidemiológicos en seres humanos.

A su vez, hacer de su conocimiento que una vez concluida la ejecución del trabajo de investigación antes indicado, debe de remitir al CBI-UNSAAC una copia del informe final y/o publicación.

Sin otro particular, uso de la ocasión para expresar las consideraciones de nuestra estima personal.

Atentamente,

Fdo. Dra. Tatiana Del Castillo de Loayza.
Presidente del Comité de Bioética Institucional de la UNSAAC
comite.bioetica@unsaac.edu.pe

C.C. VRIN
/Archivo
/JLCY



Código: CBI-UNSAAC2024-004

INFORME FINAL DE ASPECTOS BIOÉTICOS DEL PROYECTO

Datos del Investigador que solicita la opinión del CBI-UNSAAC

Nombre: Bach. Enrique Alberto Canal Esquivel.

Facultad: Ciencias Biológicas.

Departamento académico: Biología

Universidad: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

Correo electrónico: 880380@unsaac.edu.pe

Teléfono: 942427453

Datos del Proyecto de investigación

Título: "Concomitancia de los genes diarreagénicos con los genes que codifican b-lactamasas y con el gen de la resistencia a la colistina, en cepas de *Escherichia coli* provenientes de muestras nosocomiales"

Fecha de ingreso: 15-07-2024

Fecha de emisión de informe final: 04-10-2024

Resultado de la evaluación a aspectos bioéticos y metodológicos: APROBADO.

Observaciones: El proyecto presentado a consideración del Comité de Bioética Institucional en Investigación de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (CBI-UNSAAC), ha sido evaluado por el CBI-UNSAAC y el Subcomité de Bioética de Estudios con Animales, Vegetales y/o material Genético no Humano, quienes no encontraron observaciones.

Atentamente,



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABADEL CUSCO
COMITÉ DE BIOÉTICA
Tatiana Del Castillo de Loayza
DRA. TATIANA DEL CASTILLO DE LOAYZA
PRESIDENTE

Mg. Tatiana Del Castillo de Loayza.
Presidente del Comité de Bioética Institucional de la UNSAAC
comite.bioetica@unsaac.edu.pe

Anexo 3. Secuencias de Oligonucleótidos que se usó en el estudio.

Cebador	Patotipo o Genotipo de resistencia	Secuencia (5'→3')	Amplición (pb)	Referencia	
stIa-F	ECET	TTTCCCCCTCTTTTAGTCAGTCAA	159	Guión, C. E., <i>et al.</i> (2008).	
stIa-R	ECET	GCAGGATTACAACACAATTCACAGCAG			
stIb-F	ECET	TGCTAAACCAGTAGAGTCTTCAAAA	138		
StIb-R	ECET	GCAGGATTACAACACAATTCACAGCAG			
Lt-F	ECET	TCTCTATGTGCATACGGAGC	322		
Lt-R	ECET	CCATACTGATTGCCGCAAT			
eaeA-F	ECEP	ATGCTTAGTGCTGGTTTAGG	248		
eaeA-R	ECEP	GCCTTCATCATTTTCGCTTTC			
daaD-F	ECDA	TGAACGGGAGTATAAGGAAGATG	371		
daaD-R	ECDA	GTCCGCCATCACATCAAAA			
IpaH-F	ECEI	GTTCTTGACCGCCTTTCGATACCGTC	619		
IpaH-R	ECEI	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC			
AggR-F	ECEA	CGAAAAAGAGATTATAAAAATTAAC	100		
AggR-R	ECEA	GCTTCCTTCTTTTGTGTAT			
stx1-F	ECEH	CTGGATTTAATGTCGCATAGTG	150		
stx1-R	ECEH	AGAACGCCCACTGAGATCATC			
stx2-F	ECEH	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255		
stx2-R	ECEH	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG			
blaCTX-M-F	BL-GrupoA	TCTTCCAGAATAAGGAATCCC	909	Ghorbani-Dalini, Kargar <i>et al.</i> 2015	
blaCTX-M-R	BL-GrupoA	CCGTTTCCGCTATTACAAAC			
blaTEM-F	BL-GrupoA	TCCGCTCATGAGACAATAACC	296		
blaTEM-R	BL-GrupoA	ATAATACCGCACCACATAGCAG			
blaSHV-F	BL-GrupoA	TACCATGAGCGATAACAGCG	450		
blaSHV-R	BL-GrupoA	GATTTGCTGATTTTCGCTCGG			
blaIMP-F	BL-GrupoB	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232	Poirel, Walsh <i>et al.</i> 2011.	
blaIMP-R	BL-GrupoB	GGTTTAAAYAAAACAACCACC			
blaVIM-F	BL-GrupoB	GATGGTGTTTGGTCGCATA	390		
blaVIM-R	BL-GrupoB	CGAATGCGCAGCACCAG			
blaNDM-F	BL-GrupoB	GGTTTGCGCATCTGGTTTTTC	621		
blaNDM-R	BL-GrupoB	CGGAATGGCTCATCACGATC			
blaKPC-F	BL-GrupoA	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798		
blaKPC-R	BL-GrupoA	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG			
mcr-1 CLR-F	Colistina	CGGTCAGTCCGTTTGTTC	309	Ahmed, Elshafiee <i>et al.</i> 2019	
mcr-1 CLR-R	Colistina	CTTGGTCGGTCTGTAGGG			

Fuente: Propia

E. coli enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* difusamente adherente (ECDA), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), β-Lactamasa del grupo A (BL grupoA), β-Lactamasa del grupo B. Pares de bases (bp)

Anexo 4. Genes Betalactámicos de la clase molecular A detectados y amplificados por cebadores usados en este estudio, comparados con secuencias disponibles en el GenBank.

Cebadores (F & R)	Genes Betalactámicos que amplifica los Cebadores de la Clase Molecular A	Total	Alelos Reportados hasta abril 2024
blaCTX-M	blaCTX-M-1, blaCTX-M-10, blaCTX-M-101, blaCTX-M-103, blaCTX-M-117, blaCTX-M-144, blaCTX-M-146, blaCTX-M-169, blaCTX-M-207, blaCTX-M-224, blaCTX-M-23, blaCTX-M-62, blaCTX-M-66, blaCTX-M-71.	14	239
blaTEM	blaTEM-1, blaTEM-10, blaTEM-104, blaTEM-105, blaTEM-106, blaTEM-107, blaTEM-109, blaTEM-11, blaTEM-113, blaTEM-114, blaTEM-115, blaTEM-120, blaTEM-126, blaTEM-131, blaTEM-138, blaTEM-143, blaTEM-148, blaTEM-155, blaTEM-158, blaTEM-16, blaTEM-164, blaTEM-167, blaTEM-176, blaTEM-178, blaTEM-186, blaTEM-187, blaTEM-188, blaTEM-198, blaTEM-2, blaTEM-20, blaTEM-208, blaTEM-21, blaTEM-22, blaTEM-24, blaTEM-28, blaTEM-32, blaTEM-4, blaTEM-5, blaTEM-53, blaTEM-60, blaTEM-63, blaTEM-67, blaTEM-7, blaTEM-70, blaTEM-76, blaTEM-77, blaTEM-8, blaTEM-88, blaTEM-95.	49	200
blaSHV	SHV-1, SHV-2, SHV-5, SHV-7, SHV-8, SHV-11, SHV-12, SHV-13, SHV-14, SHV-18, SHV-24, SHV-26, SHV-30, SHV-31, SHV-32, SHV-34, SHV-35, SHV-36, SHV-38, SHV-40, SHV-41, SHV-43, SHV-44, SHV-45, SHV-48, SHV-49, SHV-50, SHV-51, SHV-52, SHV-55, SHV-56, SHV-57, SHV-59, SHV-60, SHV-61, SHV-62, SHV-63, SHV-64, SHV-65, SHV-66, SHV-67, SHV-69, SHV-70, SHV-71, SHV-72, SHV-73, SHV-74, SHV-75, SHV-76, SHV-77, SHV-78, SHV-79, SHV-80, SHV-81, SHV-82,	125	186

	SHV-83, SHV-85, SHV-86, SHV-93, SHV-94, SHV-95, SHV-96, SHV-97, SHV-98, SHV-99, SHV-100, SHV-101, SHV-102, SHV-103, SHV-104, SHV-105, SHV-106, SHV-107, SHV-108, SHV-109, SHV-110, SHV-119, SHV-120, SHV-128, SHV-133, SHV-134, SHV-135, SHV-137, SHV-140, SHV-141, SHV-142, SHV-144, SHV-145, SHV-147, SHV-148, SHV-149, SHV-150, SHV-151, SHV-152, SHV-154, SHV-155, SHV-156, SHV-157, SHV-158, SHV-159, SHV-160, SHV-161, SHV-162, SHV-163, SHV-164, SHV-165, SHV-167, SHV-168, SHV-172, SHV-173, SHV-178, SHV-179, SHV-180, SHV-181, SHV-182, SHV-183, SHV-185, SHV-186, SHV-187, SHV-188, SHV-189, SHV-190, SHV-191, SHV-193.		
blaKPC	blaKPC-10, blaKPC-101, blaKPC-102, blaKPC-103, blaKPC-104, blaKPC-106, blaKPC-107, blaKPC-109, blaKPC-11, blaKPC-112, blaKPC-113, blaKPC-114, blaKPC-115, blaKPC-12, blaKPC-120, blaKPC-121, blaKPC-123, blaKPC-128, blaKPC-13, blaKPC-130, blaKPC-138, blaKPC-139, blaKPC-14, blaKPC-141, blaKPC-142, blaKPC-143, blaKPC-144, blaKPC-145, blaKPC-146, blaKPC-15, blaKPC-153, blaKPC-155, blaKPC-156, blaKPC-157, blaKPC-16, blaKPC-17, blaKPC-19, blaKPC-2, blaKPC-21, blaKPC-22, blaKPC-23, blaKPC-25, blaKPC-26, blaKPC-27, blaKPC-28, blaKPC-29, blaKPC-3, blaKPC-31, blaKPC-32, blaKPC-34, blaKPC-35, blaKPC-36, blaKPC-37, blaKPC-38, blaKPC-39, blaKPC-4, blaKPC-40, blaKPC-42, blaKPC-43, blaKPC-45, blaKPC-46, blaKPC-47, blaKPC-48, blaKPC-49, blaKPC-5, blaKPC-50, blaKPC-51, blaKPC-52, blaKPC-54, blaKPC-56, blaKPC-57, blaKPC-59, blaKPC-6, blaKPC-60, blaKPC-61, blaKPC-62, blaKPC-63, blaKPC-64, blaKPC-65, blaKPC-66, blaKPC-68, blaKPC-7,	110	146

blaKPC-71, blaKPC-72, blaKPC-73, blaKPC-74, blaKPC-75, blaKPC-76, blaKPC-77,
 blaKPC-79, blaKPC-8,blaKPC-81, blaKPC-82, blaKPC-83, blaKPC-84 ,blaKPC-85,
 blaKPC-86, blaKPC-87, blaKPC-88blaKPC-89, blaKPC-90, blaKPC-91, blaKPC-92,
 blaKPC-93, blaKPC-94, blaKPC-95, blaKPC-96,blaKPC-97, blaKPC-98, blaKPC-99

Anexo 5. Genes Betalactámicos de la clase molecular B detectados y amplificados por cebadores usados en este estudio, comparados con secuencias disponibles en el GenBank.

Cebadores (F & R)	Genes Betalactámicos que amplifica los Cebadores de la Clase Molecular B	Total	Alelos Reportados hasta abril 2024
blaIMP	blaIMP-1, blaIMP-10, blaIMP-11, blaIMP-12, blaIMP-15, blaIMP-19, blaIMP-2, blaIMP-20, blaIMP-21, blaIMP-23, blaIMP-24, blaIMP-25, blaIMP-26, blaIMP-28, blaIMP-29, blaIMP-30, blaIMP-38, blaIMP-4, blaIMP-40, blaIMP-41, blaIMP-42, blaIMP-43, blaIMP-44, blaIMP-45, blaIMP-5, blaIMP-53, blaIMP-55, blaIMP-59, blaIMP-6, blaIMP-60, blaIMP-62, blaIMP-63, blaIMP-66, blaIMP-7, blaIMP-73, blaIMP-76, blaIMP-77, blaIMP-78, blaIMP-79, blaIMP-8, blaIMP-80, blaIMP-81, blaIMP-82, blaIMP-88, blaIMP-9, blaIMP-90, blaIMP-94, blaIMP-96, blaIMP-97, blaIMP-98.	50	93

blaVIM	blaVIM-1, blaVIM-10, blaVIM-11, blaVIM-12, blaVIM-13, blaVIM-14, blaVIM-15, blaVIM-17, blaVIM-18, blaVIM-19, blaVIM-2, blaVIM-20, blaVIM-23, blaVIM-24, blaVIM-26, blaVIM-27, blaVIM-28, blaVIM-29, blaVIM-3, blaVIM-30, blaVIM-31, blaVIM-32, blaVIM-33, blaVIM-34, blaVIM-35, blaVIM-36, blaVIM-37, blaVIM- 39, blaVIM-4, blaVIM-40, blaVIM-41, blaVIM-42, blaVIM-43, blaVIM-44, blaVIM-45,,blaVIM-46, blaVIM-47, blaVIM-48, blaVIM-50, blaVIM-51, blaVIM- 52, blaVIM-53, blaVIM-54, blaVIM-55, blaVIM-56, blaVIM-57, blaVIM-58, blaVIM-59, blaVIM-6, blaVIM-60, blaVIM-62, blaVIM-63, blaVIM-64, blaVIM-65, blaVIM-66, blaVIM-67, blaVIM-68, blaVIM-70, blaVIM-72, blaVIM-73, blaVIM- 74, blaVIM-75, blaVIM-76, blaVIM-77, blaVIM-78, blaVIM-79, blaVIM-8, blaVIM-83, blaVIM-86, blaVIM-9.	70	81
blaNDM	blaNDM-10, blaNDM-11, blaNDM-12, blaNDM-13, blaNDM-14, blaNDM-15, blaNDM-16a, blaNDM-17, blaNDM-18, blaNDM-19, blaNDM-2, blaNDM-20, blaNDM-21, blaNDM-23, blaNDM-24, blaNDM-25, blaNDM-26, blaNDM-27, blaNDM-28, blaNDM-29, blaNDM-3, blaNDM-30, blaNDM-31, blaNDM-35, blaNDM-36, blaNDM-37, blaNDM-38, blaNDM-39, blaNDM-4, blaNDM-40, blaNDM-41, blaNDM-42, blaNDM-43, blaNDM-44, blaNDM-45, blaNDM-46, blaNDM-47, blaNDM-48, blaNDM-49, blaNDM-5, blaNDM-50, blaNDM-6, blaNDM-7, blaNDM-8, blaNDM-9.	45	50

Anexo 6. Información General por muestra y resultado de cultivo y MALDI – ToF.

Nº	Código NAMRU-S	Hospital de Procedencia	Resultado Hospital	Edad	Sexo	Día Toma de Muestra	Tipo de Cultivo	Fecha Resultado	Placa Mc Conkey	Resultados Maldi-ToF
1	NSC0945	HNERM	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	19-mar-14	Hemocultivo	31-mar-14	LFP	<i>E. coli</i>
2	NSC0948	HNERM	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	19-mar-14	Hemocultivo	01-abr-14	LFP	<i>E. coli</i>
3	NSC0983	HNDAC	<i>E. coli</i>	20	Femenino	25-mar-14	Urocultivo	21-abr-14	LFP	<i>E. coli</i>
4	NSC0989	HNERM	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	25-mar-14	Secreción HOT	21-may-14	LFP	<i>E. coli</i>
5	NSC1030	HNDAC	<i>E. coli</i>	20	Femenino	08-abr-14	Urocultivo	13-jun-14	LFP	<i>E. coli</i>
6	NSC1080	HNERM	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	08-abr-14	Secreción HOT	13-ago-14	LFP	<i>E. coli</i>
7	NSC1095	HNERM	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	08-abr-14	Urocultivo	13-ago-14	LFP	<i>E. coli</i>
8	NSC1167	HNDAC	<i>E. coli</i>	No Dato	Masculino	18-ago-14	Urocultivo	14-nov-14	LFP	<i>E. coli</i>
9	NSC1174	HNDAC	<i>E. coli</i>	No Dato	Masculino	16-oct-14	Urocultivo	19-nov-14	LFP	<i>E. coli</i>
10	NSC1178	HNERM	<i>E. coli</i>	0,3	Masculino	16-oct-14	Secreción HOT	10-dic-14	LFP	<i>E. coli</i>
11	NSC1196	FAP	<i>E. coli</i>	75	Masculino	18-nov-14	Urocultivo	07-ene-15	LFP	<i>E. coli</i>
12	NSC1346	HNDAC	<i>E. coli</i>	42	Masculino	31-ene-15	Secreción HOT	08-jul-15	LFP	<i>E. coli</i>
13	NSC1363	FAP	<i>E. coli</i>	64	Femenino	21-may-15	Secreción HOT	21-jul-15	LFP	<i>E. coli</i>
14	NSC1387	FAP	<i>E. coli</i>	26	Femenino	31-may-15	Secreción HOT	30-sep-15	LFN	<i>E. coli</i>
15	NSC1428	FAP	<i>E. coli</i>	50	Femenino	24-jul-15	Urocultivo	22-dic-15	LFP	<i>E. coli</i>
16	NSC1438	FAP	<i>E. coli</i>	50	Femenino	26-oct-15	Urocultivo	22-dic-15	LFP	<i>E. coli</i>
17	NSC1440	FAP	<i>E. coli</i>	82	Masculino	26-nov-15	secreción HOT	22-dic-15	LFP	<i>E. coli</i>
18	NSC1453	HNDAC	<i>E. coli</i>	65	Femenino	27-oct-15	Urocultivo	08-mar-16	LFN	<i>E. coli</i>
19	NSC1726	FAP	<i>E. coli</i>	21	Femenino	22-sep-16	Secreción HOT	22-nov-16	LFN	<i>E. coli</i>
20	NSC1782	FAP	<i>E. coli</i>	84	Masculino	14-oct-16	Secreción HOT	13-dic-16	LFN	<i>E. coli</i>
Continúa...										

Nº	Código NAMRU-S	Hospital de Procedencia	Resultado Hospital	Edad	Sexo	Día Toma de Muestra	Tipo de Cultivo	Fecha Resultado	Placa Mc Conkey	Resultados Maldi-ToF
21	NSC1818	HNDAC	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	18-ene-17	Urocultivo	13-feb-17	LFN	<i>E. coli</i>
22	NSC2008	FAP	<i>E. coli</i>	88	Masculino	19-may-17	Secreción HOT	07-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
23	NSC2104	INEN	<i>E. coli</i>	1	Masculino	05-jun-17	Hemocultivo	20-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
24	NSC2109	INEN	<i>E. coli</i>	24	Masculino	05-jun-17	Hemocultivo	20-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
25	NSC2110	INEN	<i>E. coli</i>	82	Femenino	05-jun-17	Hemocultivo	20-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
26	NSC2110	INEN	<i>E. coli</i>	82	Femenino	05-jun-17	Hemocultivo	20-jun-17	LFN	<i>E. coli</i>
27	NSC2115	INEN	<i>E. coli</i>	64	Masculino	05-jun-17	Hemocultivo	20-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
28	NSC2116	INEN	<i>E. coli</i>	47	Femenino	05-jun-17	Hemocultivo	20-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
29	NSC2118	INEN	<i>E. coli</i>	0	Femenino	05-jun-17	Hemocultivo	20-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
30	NSC2120	INEN	<i>E. coli</i>	50	Masculino	05-jun-17	Hemocultivo	20-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
31	NSC2121	INEN	<i>E. coli</i>	50	Masculino	05-jun-17	Hemocultivo	20-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
32	NSC2136	INEN	<i>E. coli</i>	70	Femenino	05-jun-17	Urocultivo	20-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
33	NSC2142	INEN	<i>E. coli</i>	55	Femenino	05-jun-17	Urocultivo	20-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
34	NSC2143	INEN	<i>E. coli</i>	78	Femenino	05-jun-17	Urocultivo	20-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
35	NSC2145	INEN	<i>E. coli</i>	66	Masculino	05-jun-17	Urocultivo	20-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
36	NSC2147	INEN	<i>E. coli</i>	28	Femenino	05-jun-17	Urocultivo	20-jun-17	LFN	<i>E. coli</i>
37	NSC2157	INEN	<i>E. coli</i>	75	Femenino	05-jun-17	Urocultivo	27-jun-17	LFN	<i>E. coli</i>
38	NSC2158	INEN	<i>E. coli</i>	32	Femenino	05-jun-17	Urocultivo	27-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
39	NSC2167	INEN	<i>E. coli</i>	65	Femenino	12-jun-17	Urocultivo	27-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
40	NSC2172	INEN	<i>E. coli</i>	7	Femenino	12-jun-17	Hemocultivo	27-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
41	NSC2182	INEN	<i>E. coli</i>	57	Femenino	12-jun-17	Hemocultivo	27-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
42	NSC2183	INEN	<i>E. coli</i>	50	Femenino	12-jun-17	Urocultivo	27-sep-17	LFP	<i>E. coli</i>
43	NSC2184	INEN	<i>E. coli</i>	26	Masculino	12-jun-17	Urocultivo	27-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
44	NSC2185	INEN	<i>E. coli</i>	45	Femenino	12-jun-17	Urocultivo	27-sep-17	LFP	<i>E. coli</i>
Continúa...										

Nº	Código NAMRU-S	Hospital de Procedencia	Resultado Hospital	Edad	Sexo	Día Toma de Muestra	Tipo de Cultivo	Fecha Resultado	Placa Mc Conkey	Resultados Maldi-ToF
45	NSC2186	INEN	<i>E. coli</i>	26	Masculino	12-jun-17	Hemocultivo	27-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
46	NSC2188	INEN	<i>E. coli</i>	75	Femenino	12-jun-17	Urocultivo	27-jun-17	LFN	<i>E. coli</i>
47	NSC2194	INEN	<i>E. coli</i>	76	Masculino	12-jun-17	Urocultivo	27-jun-17	LFP	<i>E. coli</i>
48	NSC2200	INEN	<i>E. coli</i>	88	Masculino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFN	<i>E. coli</i>
49	NSC2202	INEN	<i>E. coli</i>	70	Femenino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
50	NSC2204	INEN	<i>E. coli</i>	54	Femenino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
51	NSC2205	INEN	<i>E. coli</i>	70	Femenino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
52	NSC2206	INEN	<i>E. coli</i>	73	Femenino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
53	NSC2211	INEN	<i>E. coli</i>	60	Femenino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
54	NSC2214	INEN	<i>E. coli</i>	51	Femenino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
55	NSC2216	INEN	<i>E. coli</i>	63	Masculino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
56	NSC2217	INEN	<i>E. coli</i>	64	Femenino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
57	NSC2219	INEN	<i>E. coli</i>	79	Masculino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
58	NSC2220	INEN	<i>E. coli</i>	25	Femenino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
59	NSC2221	INEN	<i>E. coli</i>	41	Femenino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
60	NSC2222	INEN	<i>E. coli</i>	79	Masculino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
61	NSC2223	INEN	<i>E. coli</i>	54	Masculino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
62	NSC2224	INEN	<i>E. coli</i>	37	Femenino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
63	NSC2225	INEN	<i>E. coli</i>	79	Masculino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
64	NSC2226	INEN	<i>E. aerogenes</i>	24	Masculino	12-jun-17	Urocultivo	05-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
65	NSC2242	INEN	<i>E. coli</i>	79	Femenino	19-jun-17	Urocultivo	11-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
66	NSC2244	INEN	<i>E. coli</i>	46	Femenino	19-jun-17	Urocultivo	11-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
67	NSC2247	INEN	<i>E. coli</i>	70	Masculino	19-jun-17	Urocultivo	07-nov-17	LFP	<i>E. coli</i>
68	NSC2248	INEN	<i>E. coli</i>	51	Femenino	19-jun-17	Urocultivo	11-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
69	NSC2249	INEN	<i>E. coli</i>	49	Femenino	19-jun-17	Urocultivo	11-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
70	NSC2255	INEN	<i>E. coli</i>	52	Femenino	19-jun-17	Urocultivo	11-jul-17	LFP	<i>E. coli</i>
Continúa...										

Nº	Código NAMRU-S	Hospital de Procedencia	Resultado Hospital	Edad	Sexo	Día Toma de Muestra	Tipo de Cultivo	Fecha Resultado	Placa Mc Conkey	Resultados MalDI-ToF
71	NSC2330	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	26-jun-17	Hemocultivo	01-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>
72	NSC2333	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	26-jun-17	Urocultivo	01-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>
73	NSC2355	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	26-jun-17	Urocultivo	No Dato	LFP	<i>E. coli</i>
74	NSC2355	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	26-jun-17	Urocultivo	No Dato	LFN	<i>E. coli</i>
75	NSC2358	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	26-jun-17	Urocultivo	No Dato	LFN	<i>E. coli</i>
76	NSC2367	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	26-jun-17	Urocultivo	No Dato	LFP	<i>E. coli</i>
77	NSC2368	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	26-jun-17	Urocultivo	No Dato	LFP	<i>E. coli</i>
78	NSC2374	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	26-jun-17	Secreción HOT	No Dato	LFP	<i>E. coli</i>
79	NSC2379	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	26-jun-17	Secreción HOT	No Dato	LFN	<i>E. coli</i>
80	NSC2384	INEN	<i>E. coli</i>	60	Masculino	26-jun-17	Secreción HOT	No Dato	LFP	<i>E. coli</i>
81	NSC2385	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	26-jun-17	Secreción HOT	22-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>
82	NSC2387	CEMENA	<i>K.pneumoniae</i>	No Dato	No Dato	27-jun-17	Urocultivo	No Dato	LFP	<i>E. coli</i>
83	NSC2397	FAP	<i>E. coli</i>	54	Femenino	28-abr-17	Secreción HOT	22-ago-17	LFN	<i>E. coli</i>
84	NSC2412	FAP	<i>E. coli</i>	52	Masculino	28-jun-17	Secreción HOT	22-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>
85	NSC2418	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	03-jul-17	Urocultivo	22-ago-17	LFN	<i>E. coli</i>
86	NSC2419	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	03-jul-17	Urocultivo	22-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>
87	NSC2420	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	03-jul-17	Urocultivo	22-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>
88	NSC2421	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	03-jul-17	Urocultivo	22-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>
89	NSC2424	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	03-jul-17	Urocultivo	22-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>
90	NSC2425	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	03-jul-17	Urocultivo	22-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>
91	NSC2426	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	03-jul-17	Urocultivo	22-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>
92	NSC2427	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	03-jul-17	Urocultivo	22-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>
93	NSC2430	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	03-jul-17	Urocultivo	22-ago-17	LFN	<i>E. coli</i>
94	NSC2432	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	03-jul-17	Urocultivo	22-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>
95	NSC2435	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	03-jul-17	Urocultivo	29-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>

Continúa...

Nº	Código NAMRU-S	Hospital de Procedencia	Resultado Hospital	Edad	Sexo	Día Toma de Muestra	Tipo de Cultivo	Fecha Resultado	Placa Mc Conkey	Resultados Maldi-ToF
96	NSC2437	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	03-jul-17	Urocultivo	29-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>
97	NSC2438	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	03-jul-17	Urocultivo	29-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>
98	NSC2439	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	03-jul-17	Urocultivo	29-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>
99	NSC2453	INEN	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	03-jul-17	Secreción HOT	29-ago-17	LFP	<i>E. coli</i>
100	NSC2475	FAP	<i>E. coli</i>	No Dato	No Dato	17-jun-17	Secreción HOT	27-sep-17	LFP	<i>E. coli</i>

LEYENDA:

<i>INEN:</i>	<i>Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas</i>
<i>FAP:</i>	<i>Hospital Central Fuerza Aérea Peruana</i>
<i>HNDAC:</i>	<i>Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión</i>
<i>HNERM:</i>	<i>Hospital Nacional Edgardo Rebagliatti Martins</i>
<i>CEMENA:</i>	<i>Centro Médico Naval</i>
<i>LFP:</i>	<i>Lactosa fermentadora positiva</i>
<i>LFN:</i>	<i>Lactosa fermentadora negativa</i>
<i>Sec. HOT:</i>	<i>Secreción de Herida u Órgano o Tejido</i>

Anexo 7. Hojas de resultados obtenidos del MALDI ToF.

**Bruker MALDI Biotyper
Identification Results**



Run Info:

Run Identifier: 220930-1644-1011025852
 Comment:
 Operator: Admin@MBT-WIN10
 Run Creation Date/Time: 2022-09-30T16:54:42.758
 Number of Tests: 96
 Type: Standard
 BTS-QC: not present
 BTS-QC Position:
 Instrument ID: 604674.01035
 Server Version: 4.1.100 (PYTH) 174 2019-06-158_01-16-09

Result Overview

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<u>A1</u> (+++)(A)	BTS1 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.03</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.02</u>
<u>A2</u> (+++)(A)	BTS1 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.14</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.08</u>
<u>A3</u> (+++)(A)	NSC0945 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.36</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.17</u>
<u>A4</u> (+++)(A)	NSC0945 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.33</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.32</u>
<u>A5</u> (+++)(A)	NSC0948 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.29</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.17</u>
<u>A6</u> (+++)(A)	NSC0948 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.35</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.23</u>
<u>A7</u> (+++)(A)	NSC0983 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.19</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.11</u>

Result overview table--continued on next page

Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<u>A8</u> (+++)(A)	NSC0983 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.20</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.14</u>
<u>A9</u> (+++)(A)	NSC0989 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.14</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.13</u>
<u>A10</u> (+++)(A)	NSC0989 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.14</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.11</u>
<u>A11</u> (+++)(A)	NSC1030 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.18</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.17</u>
<u>A12</u> (+++)(A)	NSC1030 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.17</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.11</u>
<u>B1</u> (+++)(A)	NSC1080 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.11</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.87</u>
<u>B2</u> (-)(A)	NSC1080 (Standard)	No Organism Identification Possible	<u>1.69</u>	No Organism Identification Possible	<u>1.66</u>
<u>B3</u> (+)(A)	NSC1095 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.95</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.92</u>
<u>B4</u> (+++)(A)	NSC1095 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.01</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.85</u>
<u>B5</u> (+++)(A)	NSC1167 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.27</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.17</u>
<u>B6</u> (+++)(A)	NSC1167 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.33</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.20</u>
<u>B7</u> (+++)(A)	NSC1174 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.09</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.08</u>
<u>B8</u> (+++)(A)	NSC1174 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.10</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.07</u>
<u>B9</u> (+++)(A)	NSC1178 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.17</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.00</u>
<u>B10</u> (+++)(A)	NSC1178 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.22</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.07</u>
<u>B11</u> (+++)(A)	NSC1196 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.26</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.19</u>
Result overview table--continued on next page					

Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
B12 (+++)(A)	NSC1196 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.19	<u>Escherichia coli</u>	2.12
C1 (+++)(A)	NSC1245 (Standard)	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	2.01	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	1.92
C2 (+++)(A)	NSC1245 (Standard)	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	2.37	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	2.24
C3 (+++)(A)	NSC1346 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.32	<u>Escherichia coli</u>	2.12
C4 (+++)(A)	NSC1346 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.17	<u>Escherichia coli</u>	2.11
C5 (+++)(A)	NSC1363 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.14	<u>Escherichia coli</u>	2.11
C6 (+++)(A)	NSC1363 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.29	<u>Escherichia coli</u>	2.24
C7 (+++)(A)	NSC1387 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.38	<u>Escherichia coli</u>	2.34
C8 (+++)(A)	NSC1387 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.42	<u>Escherichia coli</u>	2.41
C9 (+++)(A)	NSC1428 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.04	<u>Escherichia coli</u>	1.80
C10 (+++)(A)	NSC1428 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.32	<u>Escherichia coli</u>	2.14
C11 (+++)(A)	NSC1440 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.11	<u>Escherichia coli</u>	1.84
C12 (+++)(A)	NSC1440 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.03	<u>Escherichia coli</u>	1.86
D1 (+++)(A)	NSC1453 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.16	<u>Escherichia coli</u>	2.14
D2 (+++)(A)	NSC1453 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.10	<u>Escherichia coli</u>	2.03
D3 (+++)(A)	NSC1726 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.18	<u>Escherichia coli</u>	2.18
Result overview table--continued on next page					

Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<u>D4</u> (+++)(A)	NSC1726 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.29</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.23</u>
<u>D5</u> (+++)(A)	NSC1782 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.22</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.18</u>
<u>D6</u> (+++)(A)	NSC1782 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.35</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.29</u>
<u>D7</u> (+++)(A)	NSC1818 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.29</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.26</u>
<u>D8</u> (+++)(A)	NSC1818 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.22</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.22</u>
<u>D9</u> (+++)(A)	NSC2008 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.26</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.12</u>
<u>D10</u> (+++)(A)	NSC2008 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.24</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.20</u>
<u>D11</u> (+++)(A)	NSC2104 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.10</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.08</u>
<u>D12</u> (+++)(A)	NSC2104 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.08</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.08</u>
<u>E1</u> (+++)(A)	NSC2109 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.25</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.09</u>
<u>E2</u> (+++)(A)	NSC2109 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.19</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.98</u>
<u>E3</u> (+++)(A)	NSC2110 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.24</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.11</u>
<u>E4</u> (+++)(A)	NSC2110 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.30</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.02</u>
<u>E5</u> (+++)(A)	NSC2110 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.45</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.39</u>
<u>E6</u> (+++)(A)	NSC2110 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.39</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.33</u>
<u>E7</u> (+++)(A)	NSC2115 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.02</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.97</u>
Result overview table--continued on next page					

Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<u>E8</u> (+++)(A)	NSC2115 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.19</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.04</u>
<u>E9</u> (+++)(A)	NSC2116 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.15</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.14</u>
<u>E10</u> (+++)(A)	NSC2116 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.23</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.21</u>
<u>E11</u> (+++)(A)	NSC2118 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.21</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.05</u>
<u>E12</u> (+++)(A)	NSC2118 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.26</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.13</u>
<u>F1</u> (+++)(A)	NSC2121 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.13</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.11</u>
<u>F2</u> (+++)(A)	NSC2121 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.27</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.27</u>
<u>F3</u> (+)(A)	NSC2136 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.97</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.93</u>
<u>F4</u> (+++)(A)	NSC2136 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.29</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.25</u>
<u>F5</u> (+++)(A)	NSC2142 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.02</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.99</u>
<u>F6</u> (+++)(A)	NSC2142 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.25</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.24</u>
<u>F7</u> (+++)(A)	NSC2143 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.23</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.21</u>
<u>F8</u> (+++)(A)	NSC2143 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.16</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.01</u>
<u>F9</u> (+++)(A)	NSC2145 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.28</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.17</u>
<u>F10</u> (+++)(A)	NSC2145 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.30</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.26</u>
<u>F11</u> (+++)(A)	NSC2147 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.23</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.21</u>
Result overview table--continued on next page					

Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<u>F12</u> (+++)(A)	NSC2147 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.33</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.30</u>
<u>G1</u> (+++)(A)	NSC2157 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.32</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.31</u>
<u>G2</u> (+++)(A)	NSC2157 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.22</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.20</u>
<u>G3</u> (+)(A)	NSC2158 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.99</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.96</u>
<u>G4</u> (+++)(A)	NSC2158 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.27</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.22</u>
<u>G5</u> (+++)(A)	NSC2167 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.10</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.02</u>
<u>G6</u> (+++)(A)	NSC2167 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.37</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.34</u>
<u>G7</u> (+++)(A)	NSC2172 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.31</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.27</u>
<u>G8</u> (+++)(A)	NSC2172 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.26</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.22</u>
<u>G9</u> (+++)(A)	NSC2182 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.27</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.21</u>
<u>G10</u> (+++)(A)	NSC2182 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.33</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.26</u>
<u>G11</u> (+++)(A)	NSC2183 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.29</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.25</u>
<u>G12</u> (+++)(A)	NSC2183 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.19</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.19</u>
<u>H1</u> (+++)(A)	NSC2184 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.21</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.17</u>
<u>H2</u> (+++)(A)	NSC2184 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.20</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.20</u>
<u>H3</u> (+++)(A)	NSC2185 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.20</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.20</u>
Result overview table--continued on next page					

Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<u>H4</u> (+++)(A)	NSC2185 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.34</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.28</u>
<u>H5</u> (+++)(A)	NSC2186 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.15</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.05</u>
<u>H6</u> (+++)(A)	NSC2186 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.25</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.17</u>
<u>H7</u> (+++)(A)	NSC2188 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.40</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.32</u>
<u>H8</u> (+++)(A)	NSC2188 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.38</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.36</u>
<u>H9</u> (+++)(A)	NSC2194 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.29</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.27</u>
<u>H10</u> (+++)(A)	NSC2194 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.10</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.04</u>
<u>H11</u> (+++)(A)	NSC2200 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.37</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.36</u>
<u>H12</u> (+++)(A)	NSC2200 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.37</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.22</u>

Bruker MALDI Biotyper Identification Results



Run Info:

Run Identifier: 220930-1720-10105155
 Comment:
 Operator: Admin@MBT-WIN10
 Run Creation Date/Time: 2022-09-30T17:26:52.181
 Number of Tests: 96
 Type: Standard
 BTS-QC: not present
 BTS-QC Position:
 Instrument ID: 604674.01035
 Server Version: 4.1.100 (PYTH) 174 2019-06-158_01-16-09

Result Overview

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
A1 (+++)(A)	NSC2202 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.26</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.13</u>
A2 (+++)(A)	NSC2202 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.05</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.00</u>
A3 (+++)(A)	NSC2204 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.06</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.98</u>
A4 (+++)(A)	NSC2204 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.25</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.22</u>
A5 (+++)(A)	NSC2205 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.42</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.29</u>
A6 (+++)(A)	NSC2205 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.26</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.21</u>
A7 (+++)(A)	NSC2206 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.14</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.07</u>

Result overview table--continued on next page

Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<u>A8</u> (+++)(A)	NSC2206 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.25</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.16</u>
<u>A9</u> (+)(A)	NSC2211 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.86</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.75</u>
<u>A10</u> (+++)(A)	NSC2211 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.20</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.18</u>
<u>A11</u> (+++)(A)	NSC2214 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.21</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.14</u>
<u>A12</u> (+++)(A)	NSC2214 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.12</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.06</u>
<u>B1</u> (+++)(A)	NSC2216 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.16</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.11</u>
<u>B2</u> (+++)(A)	NSC2216 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.21</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.16</u>
<u>B3</u> (+++)(A)	NSC2217 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.14</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.13</u>
<u>B4</u> (+++)(A)	NSC2217 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.14</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.90</u>
<u>B5</u> (+++)(A)	NSC2219 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.19</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.18</u>
<u>B6</u> (+++)(A)	NSC2219 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.31</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.25</u>
<u>B7</u> (+++)(A)	NSC2220 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.22</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.22</u>
<u>B8</u> (+++)(A)	NSC2220 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.15</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.95</u>
<u>B9</u> (+)(A)	NSC2221 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.98</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.82</u>
<u>B10</u> (+++)(A)	NSC2221 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.34</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.27</u>
<u>B11</u> (+++)(A)	NSC2222 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.05</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.02</u>
Result overview table--continued on next page					

Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
B12 (+++)(A)	NSC2222 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.24	<u>Escherichia coli</u>	2.18
C1 (+++)(A)	NSC2223 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.26	<u>Escherichia coli</u>	2.09
C2 (+++)(A)	NSC2223 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.16	<u>Escherichia coli</u>	2.11
C3 (+++)(A)	NSC2224 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.22	<u>Escherichia coli</u>	2.22
C4 (+++)(A)	NSC2224 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.34	<u>Escherichia coli</u>	2.18
C5 (+++)(A)	NSC2225 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.26	<u>Escherichia coli</u>	1.97
C6 (+++)(A)	NSC2225 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.09	<u>Escherichia coli</u>	1.87
C7 (+++)(A)	NSC2226 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.05	<u>Escherichia coli</u>	1.87
C8 (+++)(A)	NSC2226 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.21	<u>Escherichia coli</u>	2.07
C9 (+++)(A)	NSC2242 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.15	<u>Escherichia coli</u>	2.03
C10 (+++)(A)	NSC2242 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.25	<u>Escherichia coli</u>	2.04
C11 (+++)(A)	NSC2244 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.21	<u>Escherichia coli</u>	2.19
C12 (+++)(A)	NSC2244 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.17	<u>Escherichia coli</u>	2.16
D1 (+++)(A)	NSC2245 (Standard)	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	2.11	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	2.07
D2 (+)(A)	NSC2245 (Standard)	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	1.88	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	1.78
D3 (+++)(A)	NSC2247 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.21	<u>Escherichia coli</u>	2.12
Result overview table--continued on next page					

Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
D4 (+++)(A)	NSC2247 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.22	<u>Escherichia coli</u>	2.19
D5 (+++)(A)	NSC2248 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.31	<u>Escherichia coli</u>	2.18
D6 (+++)(A)	NSC2248 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.10	<u>Escherichia coli</u>	1.98
D7 (+++)(A)	NSC2249 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.15	<u>Escherichia coli</u>	2.06
D8 (+++)(A)	NSC2249 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.19	<u>Escherichia coli</u>	2.11
D9 (+++)(A)	NSC2255 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.42	<u>Escherichia coli</u>	2.32
D10 (+++)(A)	NSC2255 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.24	<u>Escherichia coli</u>	2.23
D11 (+++)(A)	NSC2330 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.33	<u>Escherichia coli</u>	2.23
D12 (+++)(A)	NSC2330 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.24	<u>Escherichia coli</u>	2.16
E1 (+++)(A)	NSC2333 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.24	<u>Escherichia coli</u>	2.19
E2 (+++)(A)	NSC2333 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.29	<u>Escherichia coli</u>	2.18
E3 (+++)(A)	NSC2355 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.11	<u>Escherichia coli</u>	2.11
E4 (+++)(A)	NSC2355 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.26	<u>Escherichia coli</u>	2.16
E5 (+++)(A)	NSC2355 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.32	<u>Escherichia coli</u>	2.26
E6 (+++)(A)	NSC2355 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.23	<u>Escherichia coli</u>	2.16
E7 (+++)(A)	NSC2358 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.23	<u>Escherichia coli</u>	2.16
Result overview table--continued on next page					

Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
E8 (+++)(A)	NSC2358 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.28</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.14</u>
E9 (+)(A)	NSC2367 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.89</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.83</u>
E10 (+++)(A)	NSC2367 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.03</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.80</u>
E11 (+++)(A)	NSC2368 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.18</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.17</u>
E12 (+++)(A)	NSC2368 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.01</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.00</u>
F1 (+++)(A)	NSC2374 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.20</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.07</u>
F2 (+++)(A)	NSC2374 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.26</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.19</u>
F3 (+++)(A)	NSC2379 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.27</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.13</u>
F4 (+++)(A)	NSC2379 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.28</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.27</u>
F5 (+++)(A)	NSC2384 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.04</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.97</u>
F6 (+++)(A)	NSC2384 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.11</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.97</u>
F7 (+++)(A)	NSC2385 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.20</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.20</u>
F8 (+++)(A)	NSC2385 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.13</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.05</u>
F9 (+++)(A)	NSC2387 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.06</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.94</u>
F10 (+++)(A)	NSC2387 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.28</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.09</u>
F11 (+++)(A)	NSC2397 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.29</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.16</u>
Result overview table--continued on next page					

Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
F12 (+++)(A)	NSC2397 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.36	<u>Escherichia coli</u>	2.32
G1 (+++)(A)	NSC2412 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.35	<u>Escherichia coli</u>	2.09
G2 (+++)(A)	NSC2412 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.25	<u>Escherichia coli</u>	2.13
G3 (+++)(A)	NSC2418 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.11	<u>Escherichia coli</u>	2.11
G4 (+++)(A)	NSC2418 LN (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.33	<u>Escherichia coli</u>	2.29
G5 (+++)(A)	NSC2419 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.12	<u>Escherichia coli</u>	2.09
G6 (+)(A)	NSC2419 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	1.90	<u>Escherichia coli</u>	1.78
G7 (+++)(A)	NSC2420 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.18	<u>Escherichia coli</u>	2.10
G8 (+++)(A)	NSC2420 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.29	<u>Escherichia coli</u>	2.09
G9 (+++)(A)	NSC2421 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.27	<u>Escherichia coli</u>	2.19
G10 (+++)(A)	NSC2421 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.16	<u>Escherichia coli</u>	1.94
G11 (+++)(A)	NSC2424 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.18	<u>Escherichia coli</u>	2.14
G12 (+++)(A)	NSC2424 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.35	<u>Escherichia coli</u>	2.21
H1 (+++)(A)	NSC2425 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.06	<u>Escherichia coli</u>	2.06
H2 (+++)(A)	NSC2425 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.14	<u>Escherichia coli</u>	2.08
H3 (+++)(A)	NSC2426 mucoide (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	2.10	<u>Escherichia coli</u>	2.09
Result overview table--continued on next page					

Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
H4 (+++)(A)	NSC2426 mucoide (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.18</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.15</u>
H5 (+++)(A)	NSC2427 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.23</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.18</u>
H6 (+++)(A)	NSC2427 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.24</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.23</u>
H7 (+++)(A)	NSC2430 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.42</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.30</u>
H8 (+++)(A)	NSC2430 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.34</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.31</u>
H9 (+++)(A)	NSC2432 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.26</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.16</u>
H10 (+++)(A)	NSC2432 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.33</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.30</u>
H11 (+++)(A)	NSC2453 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.10</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.04</u>
H12 (+++)(A)	NSC2453 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.02</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.01</u>

Bruker MALDI Biotyper Identification Results



Run Info:

Run Identifier: 221004-1239-1011005130
 Comment:
 Operator: Admin@MBT-WIN10
 Run Creation Date/Time: 2022-10-04T12:45:25.156
 Number of Tests: 12
 Type: Standard
 BTS-QC: not present
 BTS-QC Position:
 Instrument ID: 604674.01035
 Server Version: 4.1.100 (PYTH) 174 2019-06-158_01-16-09

Result Overview

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
H1 (+++)(A)	NSC2435 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.27</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.12</u>
H2 (+++)(A)	NSC2435 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.31</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.26</u>
H3 (+++)(A)	NSC2437 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.13</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.12</u>
H4 (+++)(A)	NSC2437 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.35</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.21</u>
H5 (+++)(A)	NSC2438 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.24</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.15</u>
H6 (+++)(A)	NSC2438 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.24</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.18</u>
H7 (+++)(A)	NSC2439 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.36</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.33</u>

Result overview table--continued on next page

Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
H8 (+++)(A)	NSC2439 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.23</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.05</u>
H9 (+++)(A)	NSC2457 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.20</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.19</u>
H10 (+++)(A)	NSC2457 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.10</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.10</u>
H11 (+)(A)	NSC2475 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.95</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.91</u>
H12 (+++)(A)	NSC2475 (Standard)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.15</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.02</u>

Anexo 8.

Imágenes de las placas que mostraron doble tipo de lactosa.

Imagen 1.

NSC2355 en placas de Mac conkey, se puede apreciar ambos tipos de colonias para Escherichia coli, lactosa fermentadora positiva (LFP) y lactosa fermentadora negativa (LFN).

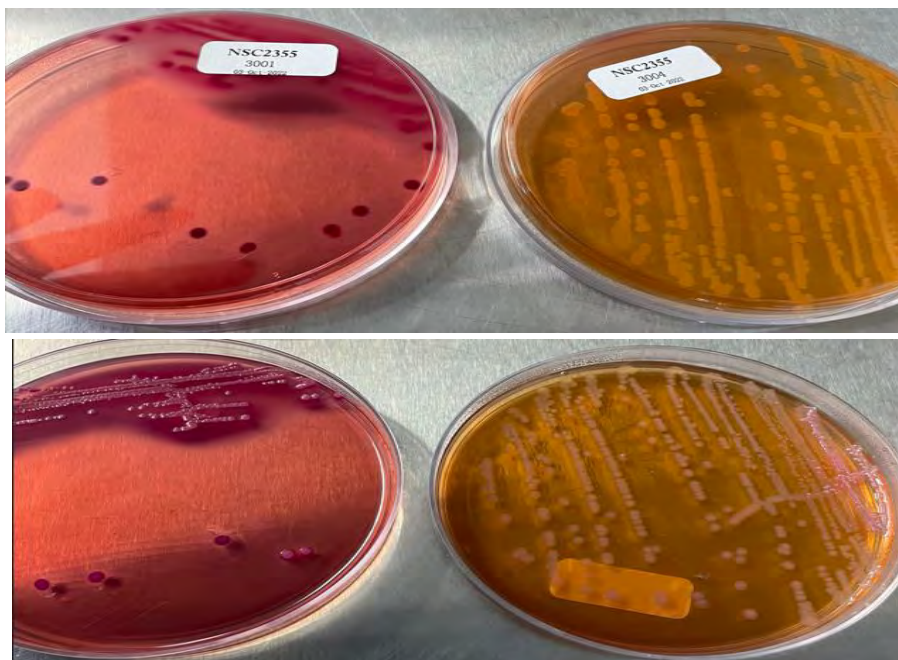


Imagen 2.

NSC2110 en placa de Mac conkey, se puede apreciar ambos tipos de colonias para Escherichia coli, lactosa fermentadora positiva (LFP) y lactosa fermentadora negativa (LFN).



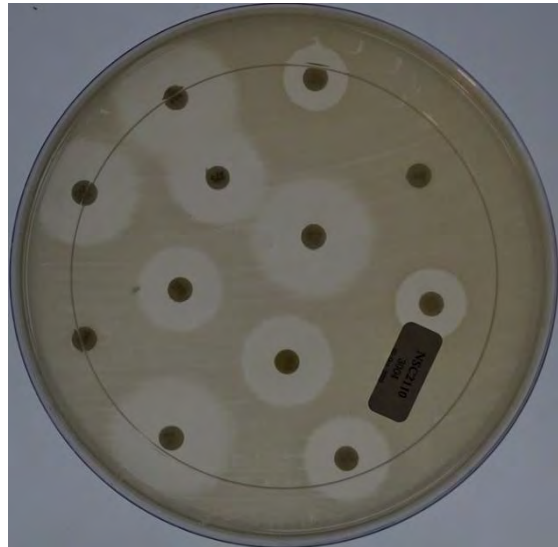
Imagen 3.

NSC2110 antibiograma de la lactosa fermentadora positiva (LFP) Placa 1.



Imagen 4.

NSC2110 antibiograma de la lactosa fermentadora positiva (LFP) Placa 2.



Anexo 9.

Lecturas del antibiograma expresada en milímetros (mm) para 100 cepas analizadas, además del resultado de BLEE. LFP=Lactosa fermentadora positiva, LFN= Lactosa fermentadora negativa, BLEE= Betalactamasa de espectro extendido.

Nº	Código	Nosocomio	Tipo_cpa	ATM	AMC	CTX	CTX/CLA	CAZ	CAZ/CLA	FEP	TIM	CRO	NN	CIP	IMR	ETP	TZP	IPM	SXT	TE	CZA	AN	MEV	MI	GM	BLEE
1	NSC0945	HNERM	LFP	21	19	16	22	21	26	25	15	15	23	26	24	29	26	28	06	22	27	26	28	23	21	Positivo
2	NSC0948	HNERM	LFP	20	26	16	23	21	26	25	15	15	23	25	26	31	24	28	06	23	27	23	28	25	22	Positivo
3	NSC0983	HNDAC	LFP	21	12	17	20	21	26	23	06	14	16	06	26	29	24	29	06	06	27	22	29	13	17	Positivo
4	NSC0989	HNERM	LFP	20	11	11	17	20	26	18	06	08	12	06	25	28	24	27	06	06	27	22	29	14	13	Positivo
5	NSC1030	HNDAC	LFP	24	16	16	23	22	29	22	06	15	22	10	28	32	26	30	06	06	29	22	31	06	22	Positivo
6	NSC1080	HNERM	LFP	15	11	10	18	19	28	18	06	09	12	17	24	28	29	28	06	06	28	17	27	12	20	Positivo
7	NSC1095	HNERM	LFP	18	12	12	15	22	28	17	06	10	22	30	26	28	26	29	06	06	30	23	27	15	22	Positivo
8	NSC1167	HNDAC	LFP	13	10	11	19	15	26	17	06	09	10	06	24	27	21	28	06	06	27	21	28	18	22	Positivo
9	NSC1174	HNDAC	LFP	15	12	13	20	19	27	17	09	10	09	06	25	28	23	29	06	06	29	21	29	21	06	Positivo
10	NSC1178	HNERM	LFP	24	11	14	16	23	28	19	06	12	15	11	26	29	25	27	06	06	30	22	27	17	13	Positivo
11	NSC1196	FAP	LFP	15	06	10	15	16	18	17	06	09	15	25	26	28	23	28	06	06	28	23	28	14	06	Positivo
12	NSC1346	HNDAC	LFP	13	15	10	19	16	24	18	09	09	15	11	26	28	26	29	06	06	28	21	29	14	08	Positivo
13	NSC1363	FAP	LFP	13	14	09	16	14	26	18	06	09	22	06	28	27	24	28	06	20	27	21	28	20	22	Positivo
14	NSC1387	FAP	LFN	26	16	19	21	23	28	24	10	15	12	06	25	30	26	27	06	21	27	21	29	23	06	Positivo
15	NSC1428	FAP	LFP	15	13	13	21	18	26	20	06	10	14	06	27	30	26	29	06	06	30	23	31	14	06	Positivo
16	NSC1438	FAP	LFP	10	06	06	16	18	25	11	06	06	06	06	24	25	16	27	06	06	26	16	27	17	06	Positivo
17	NSC1440	FAP	LFP	06	06	06	10	06	23	06	06	06	06	06	25	24	13	26	06	23	23	17	24	22	06	Positivo
18	NSC1453	HNDAC	LFN	27	20	26	20	26	28	26	12	27	22	08	24	29	28	30	06	09	30	21	29	23	23	Negativo
19	NSC1726	FAP	LFN	20	17	15	22	22	27	24	14	11	22	06	24	29	25	26	06	06	28	21	28	22	20	Positivo
20	NSC1782	FAP	LFN	25	19	14	23	25	30	23	10	09	22	06	24	28	27	28	06	08	30	20	30	18	22	Positivo
21	NSC1818	HNDAC	LFN	25	19	15	22	25	29	26	13	13	20	06	25	28	25	26	06	08	31	22	29	17	21	Positivo

LFP=Lactosa fermentadora positiva, LFN= Lactosa fermentadora negativa, BLEE= Betalactamasa de espectro extendido.

ATM= Aztreonam, AMC = Amoxicilina-clavulanato, CTX= Cefotaxima, CTX/CLA= Cefotaxima-clavulanato, CAZ= Ceftazidima, CAZ/CLA= Ceftazidima-clavulanato, FEP= Cefepima, TIM= Ticarcillina-clavulanato, CRO= Ceftriaxona, NN= Tobramicina, CIP= Ciprofloxacina, IMR= Imipenem-relebactam, ETP= Ertapenem, TZP= Piperacillina- tazobactam, IPM= Imipenem, SXT= Trimethoprima- sulfametoxazol, TE= Tetracyclina, CZA= Ceftazidima-avibactam, AN= Amikacina, MEV= Meropenem- vaborbactam MI= Minocyclina, GM= Gentamicina.

Nº	Código	Nosocomio	Tipo cepa	ATM	AMC	CTX	CTX/CLA	CAZ	CAZ/CLA	FEP	TIM	CRO	NN	CIP	IMR	ETP	TZP	IPM	SXT	TE	CZA	AN	MEV	MI	GM	BLEE
22	NSC2008	FAP	LFP	22	14	16	16	21	26	21	06	09	15	10	24	27	24	27	06	06	28	21	27	13	09	Positivo
23	NSC2104	INEN	LFP	16	12	12	18	18	28	19	09	10	09	06	24	28	23	28	06	22	28	18	28	22	06	Positivo
24	NSC2109	INEN	LFP	14	06	11	17	15	27	19	06	11	06	06	26	27	13	28	11	20	27	12	28	22	20	Positivo
25	NSC2110	INEN	LFP	21	06	26	26	21	26	27	06	22	06	06	25	21	19	22	06	06	29	18	28	13	06	Positivo
26	NSC2110	INEN	LFN	14	06	06	28	16	26	16	06	06	06	06	24	26	22	28	06	21	29	16	27	23	06	Positivo
27	NSC2115	INEN	LFP	12	06	06	15	14	26	14	06	06	06	06	23	16	18	26	21	06	28	14	26	21	10	Positivo
28	NSC2116	INEN	LFP	18	17	11	22	19	27	18	09	09	14	06	26	29	26	28	06	06	29	19	28	20	06	Positivo
29	NSC2118	INEN	LFP	18	14	12	19	21	27	21	09	11	13	26	24	29	24	26	06	06	28	20	28	14	06	Positivo
30	NSC2120	INEN	LFP	17	18	11	34	18	33	19	20	09	22	13	29	33	33	33	06	06	36	24	37	13	24	Positivo
31	NSC2121	INEN	LFP	15	12	10	20	17	27	17	08	10	10	06	24	27	23	27	06	06	29	18	28	21	06	Positivo
32	NSC2136	INEN	LFP	14	15	09	27	17	26	18	08	08	06	06	25	28	20	25	06	23	27	16	31	23	06	Positivo
33	NSC2142	INEN	LFP	14	16	10	27	17	26	18	06	08	08	06	26	28	21	25	06	06	28	18	30	21	06	Positivo
34	NSC2143	INEN	LFP	23	14	17	23	26	27	25	06	14	06	06	26	31	19	30	06	23	30	16	31	23	10	Positivo
35	NSC2145	INEN	LFP	12	15	06	24	14	24	18	13	06	08	06	25	25	19	26	23	18	25	16	27	21	20	Positivo
36	NSC2147	INEN	LFN	14	14	06	18	15	26	18	06	06	09	06	26	28	22	27	27	06	28	18	31	15	21	Positivo
37	NSC2157	INEN	LFN	11	06	06	24	14	25	16	17	06	06	06	26	29	20	28	22	06	25	17	32	20	06	Positivo
38	NSC2158	INEN	LFP	11	13	06	25	13	26	17	16	06	06	06	28	31	20	29	22	06	26	16	31	20	06	Positivo
39	NSC2167	INEN	LFP	15	14	09	26	20	26	20	18	10	08	06	28	30	22	28	06	22	28	16	30	23	20	Positivo
40	NSC2172	INEN	LFP	09	13	06	24	13	24	16	16	06	06	06	28	29	19	28	06	06	26	16	29	21	06	Positivo
41	NSC2182	INEN	LFP	13	15	09	26	16	24	18	20	09	06	06	26	27	20	27	06	06	26	17	31	20	06	Positivo
42	NSC2183	INEN	LFP	12	12	06	25	13	26	15	17	06	06	06	25	27	17	26	21	06	27	16	30	19	11	Positivo

LFP=Lactosa fermentadora positiva, LFN= Lactosa fermentadora negativa, BLEE= Betalactamasa de espectro extendido.

ATM= Aztreonam, AMC = Amoxicilina-clavulanato, CTX= Cefotaxima, CTX/CLA= Cefotaxima-clavulanato, CAZ= Ceftazidima, CAZ/CLA= Ceftazidima-clavulanato, FEP= Cefepima, TIM= Ticarcillina-clavulanato, CRO= Ceftriaxona, NN= Tobramicina, CIP= Ciprofloxacina, IMR= Imipenem-relebactam, ETP= Ertapenem, TZP= Piperacillina- tazobactam, IPM= Imipenem, SXT= Trimethoprima- sulfametoxazol, TE= Tetracyclina, CZA= Ceftazidima-avibactam, AN= Amikacina, MEV= Meropenem- vaborbactam MI= Minocyclina, GM= Gentamicina.

Nº	Código	Nosocomio	Tipo_ cepa	ATM	AMC	CTX	CTX/CLA	CAZ	CAZ/CLA	FEP	TIM	CRO	NN	CIP	IMR	ETP	TZP	IPM	SXT	TE	CZA	AN	MEV	MI	GM	BLEE
43	NSC2184	INEN	LFP	06	10	06	19	09	22	10	10	06	10	06	25	26	13	24	06	06	23	18	28	18	06	Positivo
44	NSC2185	INEN	LFP	15	17	06	25	16	25	15	19	06	06	06	26	28	19	26	06	06	25	13	25	17	06	Positivo
45	NSC2186	INEN	LFP	06	10	06	19	09	21	11	10	06	08	06	27	27	12	27	06	06	23	18	29	17	06	Positivo
46	NSC2188	INEN	LFN	12	14	06	26	14	28	14	17	06	06	06	29	27	18	29	24	06	28	16	32	20	06	Positivo
47	NSC2194	INEN	LFP	12	10	09	21	14	25	19	18	09	08	06	28	26	22	31	06	06	26	20	32	14	06	Positivo
48	NSC2200	INEN	LFN	16	06	10	20	17	25	13	19	09	09	06	25	28	23	27	24	21	27	18	26	19	20	Positivo
49	NSC2202	INEN	LFP	12	12	06	25	15	24	18	11	06	06	06	25	25	19	25	06	21	25	18	29	21	06	Positivo
50	NSC2204	INEN	LFP	09	15	06	22	10	24	12	11	06	06	06	25	26	19	25	06	06	24	14	27	23	06	Positivo
51	NSC2205	INEN	LFP	21	13	10	24	23	27	19	11	09	09	06	24	28	17	27	06	06	29	17	30	20	18	Positivo
52	NSC2206	INEN	LFP	12	11	06	25	14	26	15	11	06	06	06	24	25	17	26	21	06	26	17	30	19	06	Positivo
53	NSC2211	INEN	LFP	15	13	10	25	16	23	18	12	09	08	06	26	25	20	27	24	06	25	17	29	15	20	Positivo
54	NSC2214	INEN	LFP	14	14	10	25	17	25	18	13	08	09	06	24	28	22	26	06	22	26	18	29	22	06	Positivo
55	NSC2216	INEN	LFP	15	14	10	25	16	26	17	14	06	07	06	24	27	22	28	06	06	26	18	31	20	06	Positivo
56	NSC2217	INEN	LFP	12	16	20	26	14	24	27	12	17	12	06	26	27	22	27	06	06	25	20	29	11	17	Positivo
57	NSC2219	INEN	LFP	16	14	10	26	16	27	18	15	09	06	06	26	29	21	28	06	22	26	17	31	20	19	Positivo
58	NSC2220	INEN	LFP	14	18	10	25	18	26	16	13	10	12	06	25	27	23	27	06	06	27	21	30	12	17	Positivo
59	NSC2221	INEN	LFP	19	12	11	28	21	27	23	16	11	06	06	27	29	19	27	06	23	28	16	29	23	19	Positivo
60	NSC2222	INEN	LFP	11	10	06	26	13	27	15	11	06	06	06	26	28	19	27	06	06	29	17	32	21	06	Positivo
61	NSC2223	INEN	LFP	13	16	09	27	17	28	18	15	09	10	20	26	27	25	28	06	06	30	20	32	21	06	Positivo
62	NSC2224	INEN	LFP	06	12	06	25	18	25	18	13	10	06	06	25	29	21	28	06	06	26	19	32	20	06	Positivo
63	NSC2225	INEN	LFP	17	16	10	27	18	27	20	17	10	20	33	26	30	24	27	06	06	28	19	30	18	20	Positivo

LFP=Lactosa fermentadora positiva, LFN= Lactosa fermentadora negativa, BLEE= Betalactamasa de espectro extendido.

ATM= Aztreonam, AMC = Amoxicilina-clavulanato, CTX= Cefotaxima, CTX/CLA= Cefotaxima-clavulanato, CAZ= Ceftazidima, CAZ/CLA= Ceftazidima-clavulanato, FEP= Cefepima, TIM= Ticarcillina-clavulanato, CRO= Ceftriaxona, NN= Tobramicina, CIP= Ciprofloxacina, IMR= Imipenem-relebactam, ETP= Ertapenem, TZP= Piperacillina- tazobactam, IPM= Imipenem, SXT= Trimethoprima- sulfametoxazol, TE= Tetracyclina, CZA= Ceftazidima-avibactam, AN= Amikacina, MEV= Meropenem- vaborbactam MI= Minocyclina, GM= Gentamicina.

, TE= Tetracyclina, CZA= Ceftazidima-avibactam, AN= Amikacina, MEV= Meropenem- vaborbactam MI= Minocyclina, GM= Gentamicina.

Nº	Código	Nosocomio	Tipo cepa	ATM	AMC	CTX	CTX/CLA	CAZ	CAZ/CLA	FEP	TIM	CRO	NN	CIP	IMR	ETP	TZP	IPM	SXT	TE	CZA	AN	MEV	MI	GM	BLEE
64	NSC2226	INEN	LFP	27	19	26	25	26	25	29	22	27	20	06	23	30	24	26	19	19	23	21	30	31	21	Negativo
65	NSC2242	INEN	LFP	18	19	15	26	20	25	22	18	10	14	10	26	28	25	27	06	06	26	20	32	14	06	Positivo
66	NSC2244	INEN	LFP	16	15	10	26	18	26	18	18	10	08	06	26	29	19	26	06	06	26	17	30	24	06	Positivo
67	NSC2247	INEN	LFP	13	11	06	28	14	24	17	11	06	06	06	26	27	20	27	06	06	30	17	31	20	11	Positivo
68	NSC2248	INEN	LFP	17	12	15	26	17	26	19	15	09	10	06	27	30	24	28	20	20	25	18	29	23	06	Positivo
69	NSC2249	INEN	LFP	24	13	19	29	24	28	27	15	19	19	06	29	30	22	28	06	06	27	13	30	19	19	Positivo
70	NSC2255	INEN	LFP	13	18	06	25	17	28	18	15	06	11	06	29	29	23	29	22	22	29	21	30	22	06	Positivo
71	NSC2330	INEN	LFP	13	12	06	24	13	26	15	11	06	06	06	25	27	20	27	06	06	27	16	31	21	09	Positivo
72	NSC2333	INEN	LFP	12	06	06	06	06	11	12	06	06	09	06	14	10	06	13	06	06	22	17	14	15	19	Positivo
73	NSC2355	INEN	LFP	11	13	06	25	06	28	17	13	06	06	06	28	29	19	27	23	06	28	17	32	19	10	Positivo
74	NSC2355	INEN	LFN	13	11	06	23	06	26	14	06	06	06	06	28	28	19	26	21	06	25	16	31	20	10	Positivo
75	NSC2358	INEN	LFN	22	12	17	25	25	27	25	13	14	15	06	26	30	21	28	06	20	27	18	33	23	20	Positivo
76	NSC2367	INEN	LFP	15	13	13	25	16	26	19	11	10	15	06	25	27	20	26	27	06	25	17	31	15	19	Positivo
77	NSC2368	INEN	LFP	06	12	06	24	10	27	09	14	10	06	06	26	26	17	27	23	06	26	15	30	22	06	Positivo
78	NSC2374	INEN	LFP	21	20	14	28	20	28	21	19	06	12	06	28	31	28	27	06	06	29	21	31	22	19	Positivo
79	NSC2379	INEN	LFN	18	17	12	27	20	28	21	17	10	12	10	26	30	25	28	06	06	28	21	32	10	19	Positivo
80	NSC2384	INEN	LFP	12	11	06	23	14	26	14	13	06	06	06	26	26	21	27	06	21	27	17	32	22	06	Positivo
81	NSC2385	INEN	LFP	16	17	10	25	21	24	22	13	08	06	22	26	27	24	24	06	06	26	20	28	12	06	Positivo
82	NSC2387	CEMENA	LFP	14	14	10	24	16	23	18	12	09	10	06	26	27	18	25	06	06	25	16	27	12	18	Positivo
83	NSC2397	FAP	LFN	22	20	12	30	20	29	19	18	08	22	06	27	30	27	30	21	06	28	23	33	18	23	Positivo

LFP=Lactosa fermentadora positiva, LFN= Lactosa fermentadora negativa, BLEE= Betalactamasa de espectro extendido.

ATM= Aztreonam, AMC = Amoxicilina-clavulanato, CTX= Cefotaxima, CTX/CLA= Cefotaxima-clavulanato, CAZ= Ceftazidima, CAZ/CLA= Ceftazidima-clavulanato, FEP= Cefepima, TIM= Ticarcillina-clavulanato, CRO= Ceftriaxona, NN= Tobramicina, CIP= Ciprofloxacina, IMR= Imipenem-relebactam, ETP= Ertapenem, TZP= Piperacillina- tazobactam, IPM= Imipenem, SXT= Trimethoprima- sulfametoxazol, TE= Tetracyclina, CZA= Ceftazidima-avibactam, AN= Amikacina, MEV= Meropenem- vaborbactam MI= Minocyclina, GM= Gentamicina.

Nº	Código	Nosocomio	Tipo_cepa	ATM	AMC	CTX	CTX/CLA	CAZ	CAZ/CLA	FEP	TIM	CRO	NN	CIP	IMR	ETP	TZP	IPM	SXT	TE	CZA	AN	MEV	MI	GM	BLEE
84	NSC2412	FAP	LFP	25	12	16	24	27	27	23	11	12	06	06	27	30	21	28	17	06	29	16	32	13	20	Positivo
85	NSC2418	INEN	LFN	10	13	06	25	13	25	14	16	06	06	06	28	26	20	26	22	06	27	17	29	16	06	Positivo
86	NSC2419	INEN	LFP	20	18	14	27	19	26	22	16	12	20	06	27	29	25	27	06	06	26	20	32	22	22	Positivo
87	NSC2420	INEN	LFP	15	17	10	26	19	25	21	23	09	11	06	27	28	24	26	06	06	27	18	30	12	06	Positivo
88	NSC2421	INEN	LFP	14	19	10	28	17	26	19	20	10	10	06	27	29	22	28	06	06	27	20	33	13	06	Positivo
89	NSC2424	INEN	LFP	14	14	10	26	16	27	18	18	09	08	06	26	26	20	29	06	06	26	17	30	17	21	Positivo
90	NSC2425	INEN	LFP	16	17	11	26	18	27	19	22	10	20	06	28	28	24	26	06	06	29	18	29	21	20	Positivo
91	NSC2426	INEN	LFP	17	21	11	30	22	30	22	23	11	23	06	31	32	27	32	28	23	30	27	35	26	23	Positivo
92	NSC2427	INEN	LFP	25	12	16	28	26	28	24	17	14	08	06	29	32	20	29	06	06	30	19	33	10	13	Positivo
93	NSC2430	INEN	LFN	20	18	15	28	23	28	21	21	13	10	06	28	29	26	29	06	06	28	20	34	20	06	Positivo
94	NSC2432	INEN	LFP	12	14	08	27	13	27	17	20	09	06	06	28	28	20	27	24	06	27	18	32	19	06	Positivo
95	NSC2435	INEN	LFP	13	13	10	28	15	26	18	18	09	06	06	25	30	22	29	06	06	26	16	32	09	06	Positivo
96	NSC2437	INEN	LFP	11	16	06	26	14	25	15	17	06	06	06	27	26	21	27	20	18	26	16	30	22	06	Positivo
97	NSC2438	INEN	LFP	14	21	10	29	17	27	18	19	06	14	29	29	30	27	29	06	06	29	20	32	13	06	Positivo
98	NSC2439	INEN	LFP	24	12	16	26	27	27	24	11	13	06	06	27	29	19	29	06	06	30	16	31	10	12	Positivo
99	NSC2453	INEN	LFP	25	13	20	28	26	28	27	15	18	06	06	28	31	21	29	06	21	28	15	32	24	19	Positivo
100	NSC2475	FAP	LFP	14	15	13	21	17	25	20	22	11	20	06	25	30	24	28	06	06	28	21	28	15	20	Positivo

LFP=Lactosa fermentadora positiva, LFN= Lactosa fermentadora negativa, BLEE= Betalactamasa de espectro extendido.

ATM= Aztreonam, AMC = Amoxicilina-clavulanato, CTX= Cefotaxima, CTX/CLA= Cefotaxima-clavulanato, CAZ= Ceftazidima, CAZ/CLA= Ceftazidima-clavulanato, FEP= Cefepima, TIM= Ticarcillina-clavulanato, CRO= Ceftriaxona, NN= Tobramicina, CIP= Ciprofloxacina, IMR= Imipenem-relebactam, ETP= Ertapenem, TZP= Piperacillina- tazobactam, IPM= Imipenem, SXT= Trimethoprima- sulfametoxazol, TE= Tetracyclina, CZA= Ceftazidima-avibactam, AN= Amikacina, MEV= Meropenem- vaborbactam MI= Minociclina, GM= Gentamicina.

Anexo 10.

Resultados de la mínima concentración inhibitoria (CMI) en placa para la susceptibilidad a la colistina.



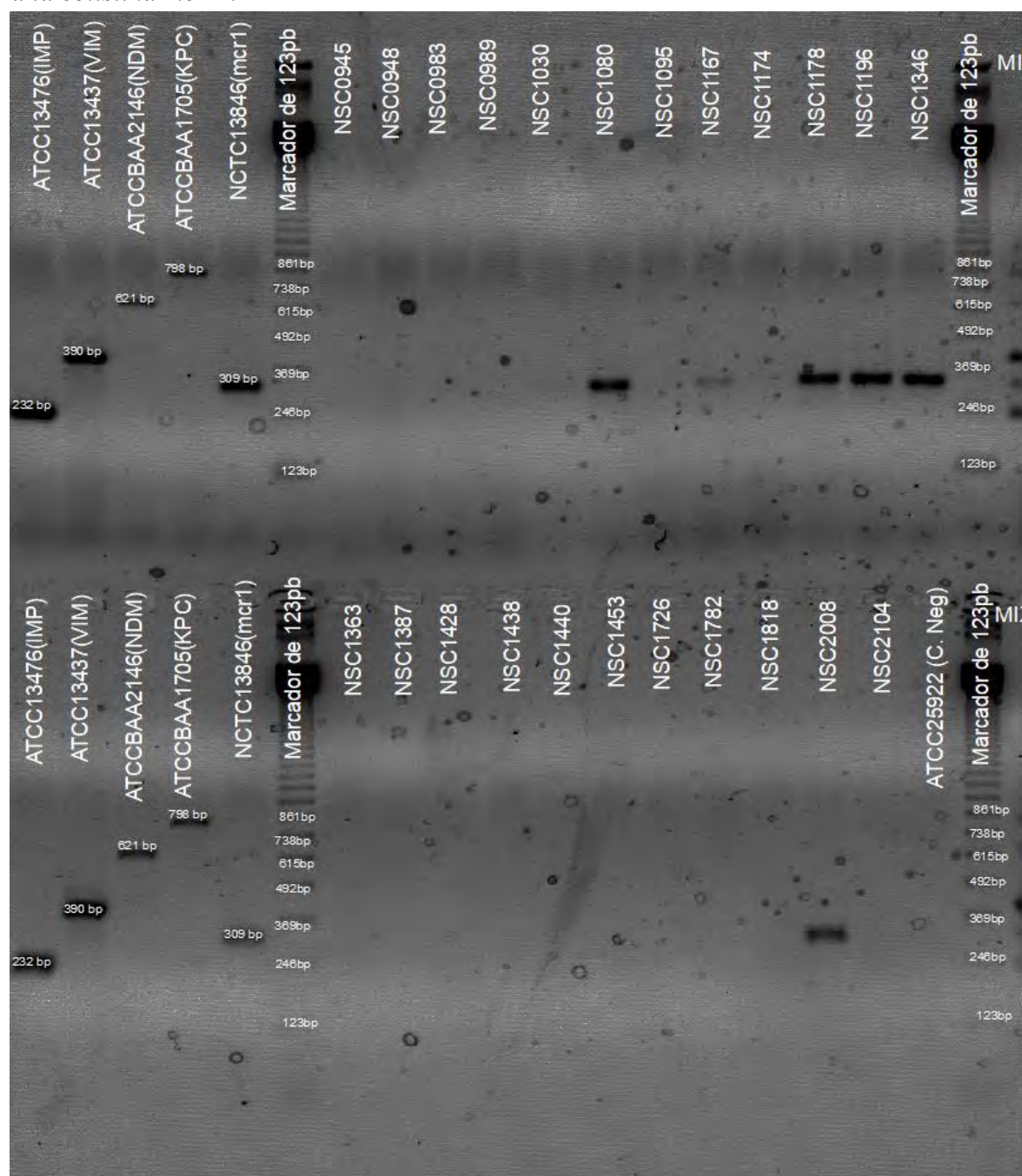
Resultados de la mínima concentración inhibitoria (CMI) en placa para evaluar la susceptibilidad a la colistina. Se realizaron pruebas específicas con los controles correspondientes:

- **Control positivo:** *Escherichia coli* NCTC13846, portador del gen *mcr-1*.
- **Control negativo:** *Escherichia coli* ATCC25922, susceptible a colistina y sin genes de resistencia asociados.

Anexo 11. Resultados de los geles de agarosa.

Gel 1.

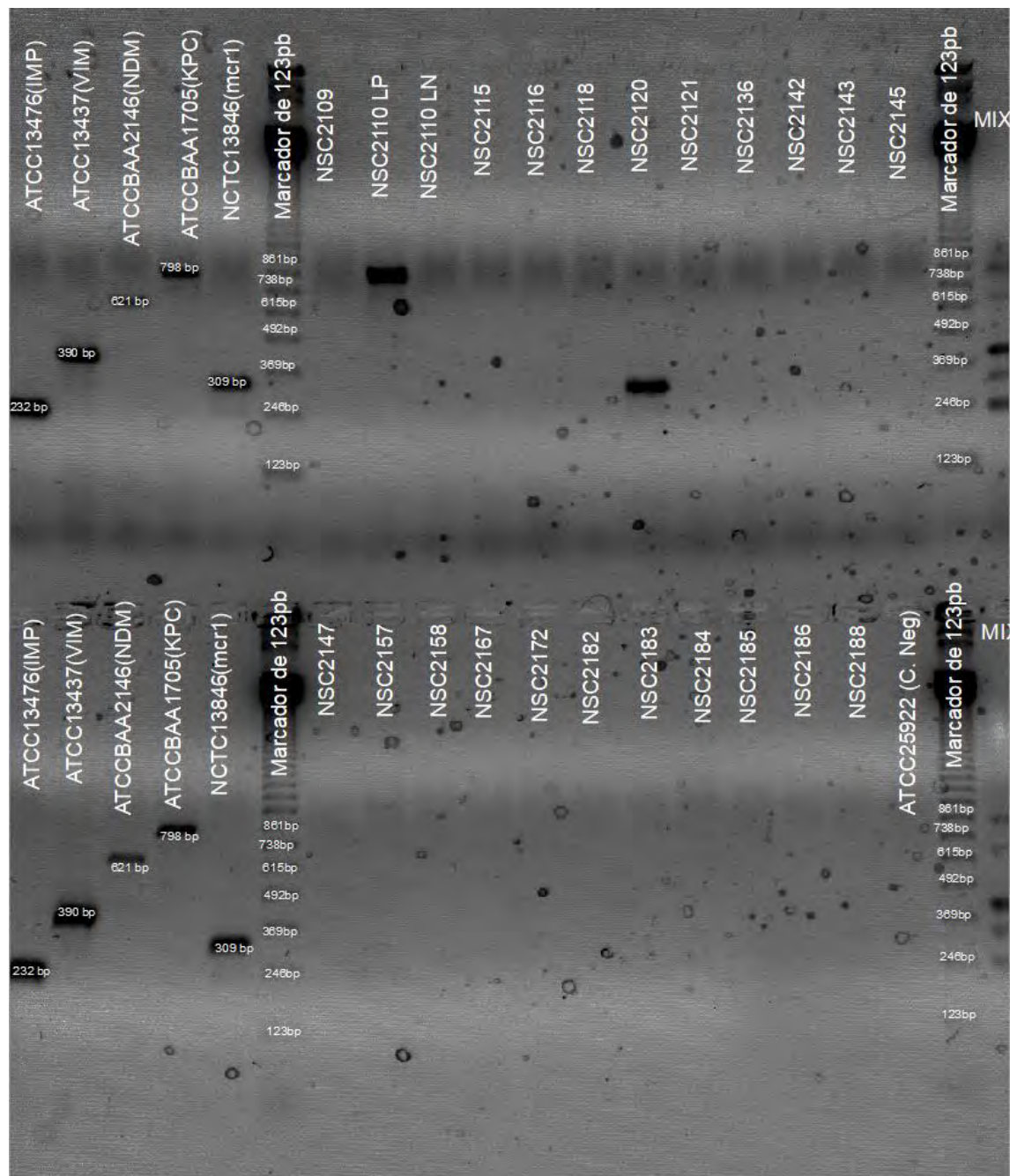
Amplificación de genes resistentes en E. coli a los carbapenémicos ya al gen de resistencia a la colistina mcr-1.



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.

Gel 2.

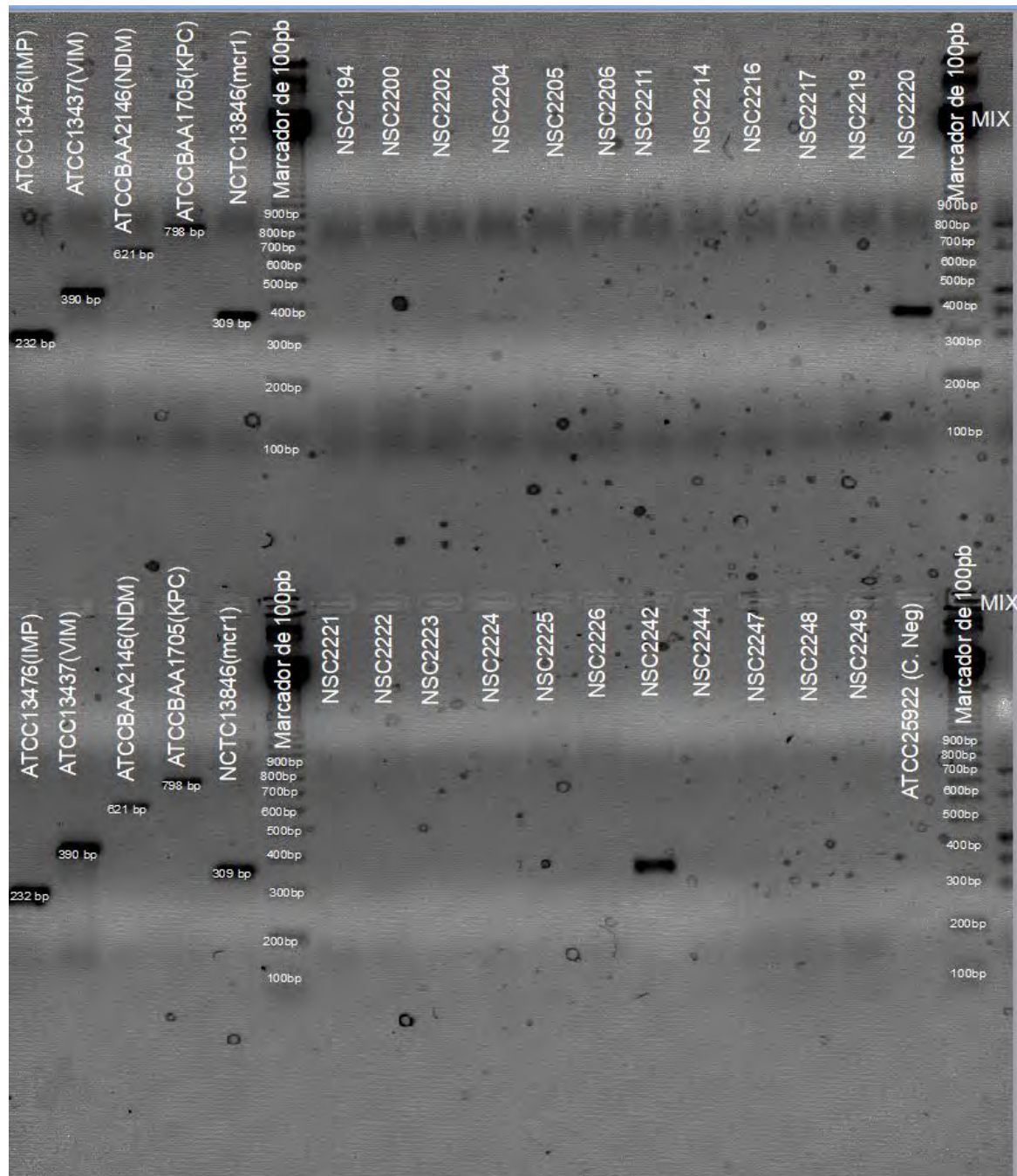
Amplificación de genes resistentes en E. coli a los carbapenémicos y al gen de resistencia a la colistina mcr-1.



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.

Gel 3.

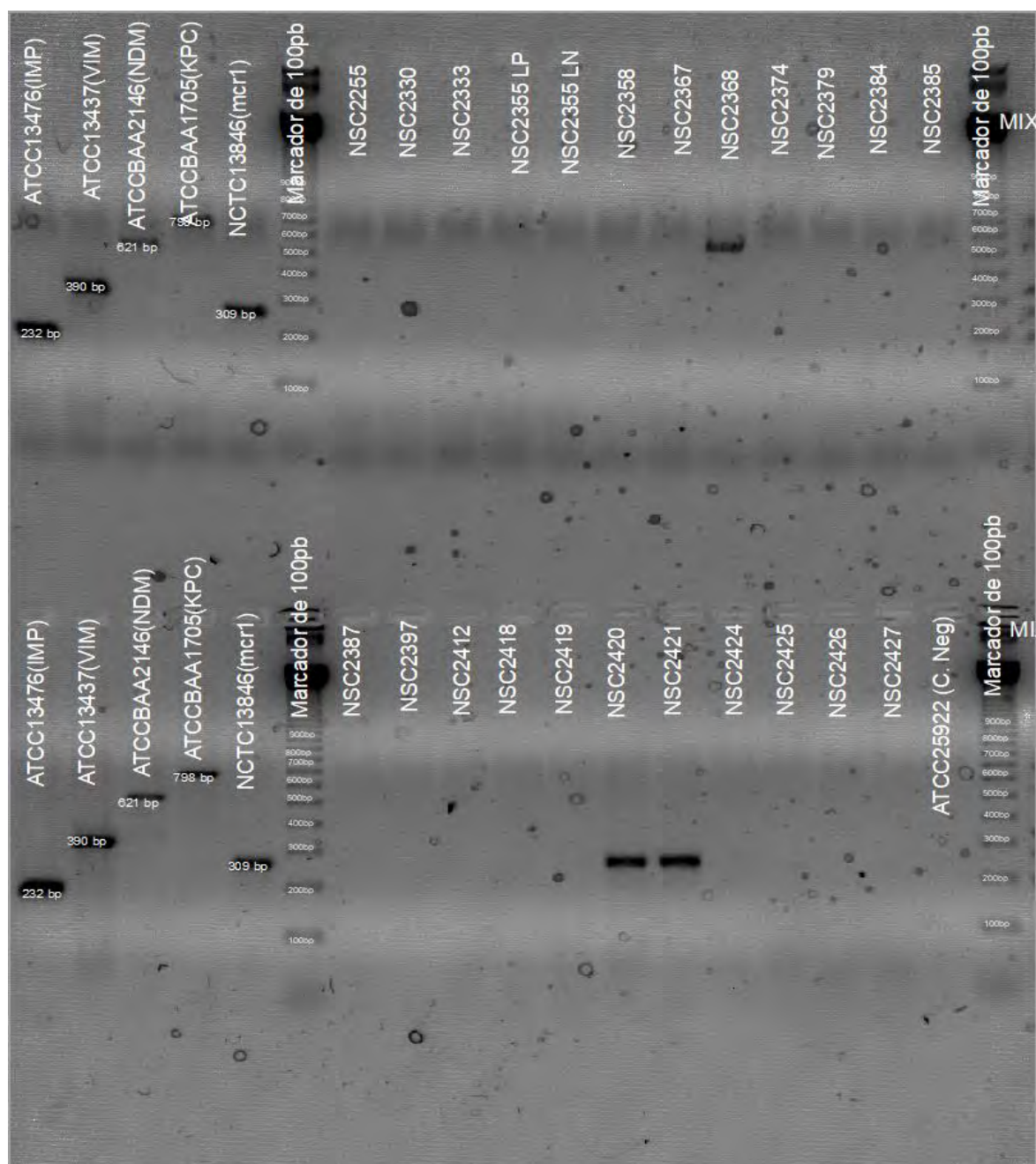
Amplificación de genes resistentes en E. coli a los carbapenémicos y al gen de resistencia a la colistina mcr-1.



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.

Gel 4.

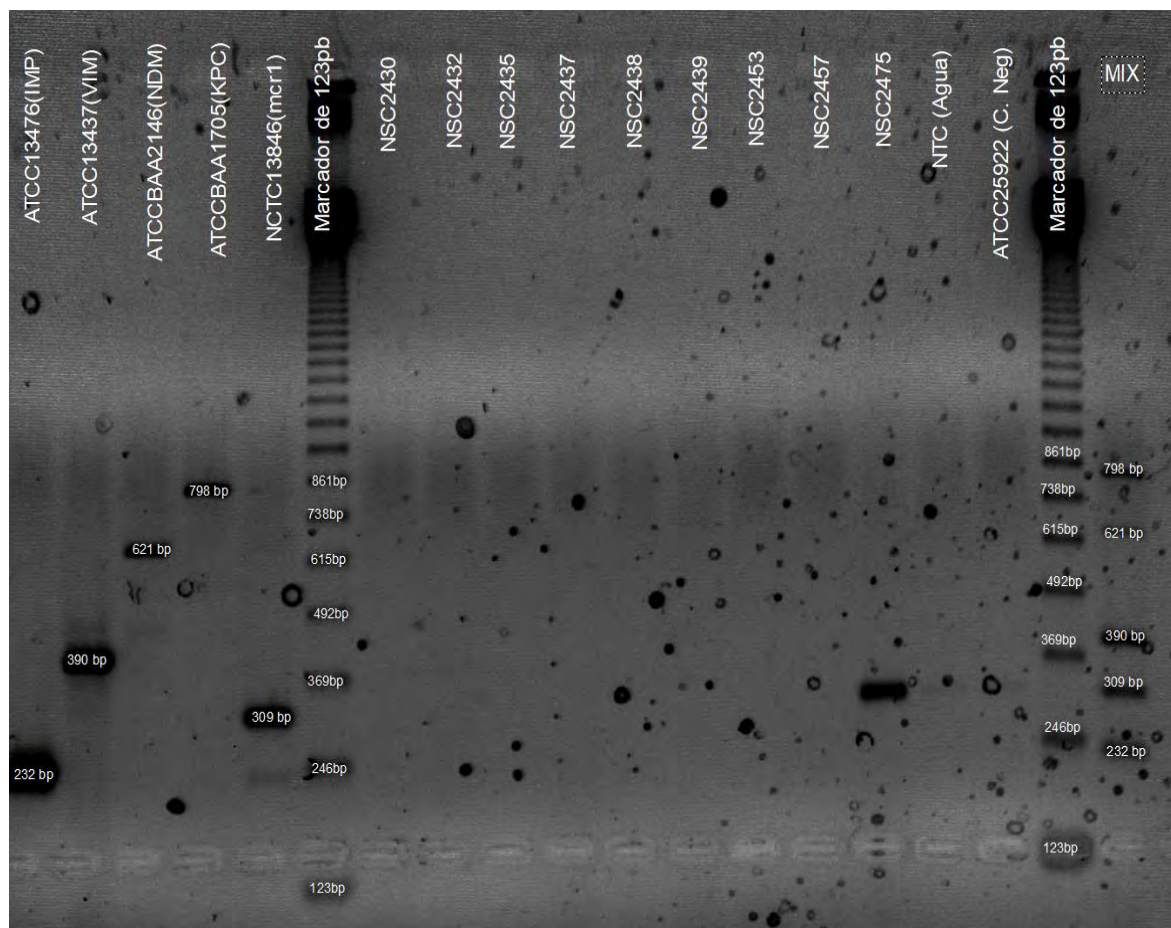
Amplificación de genes resistentes en E. coli a los carbapenémicos y al gen de resistencia a la colistina mcr-1.



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.

Gel 5.

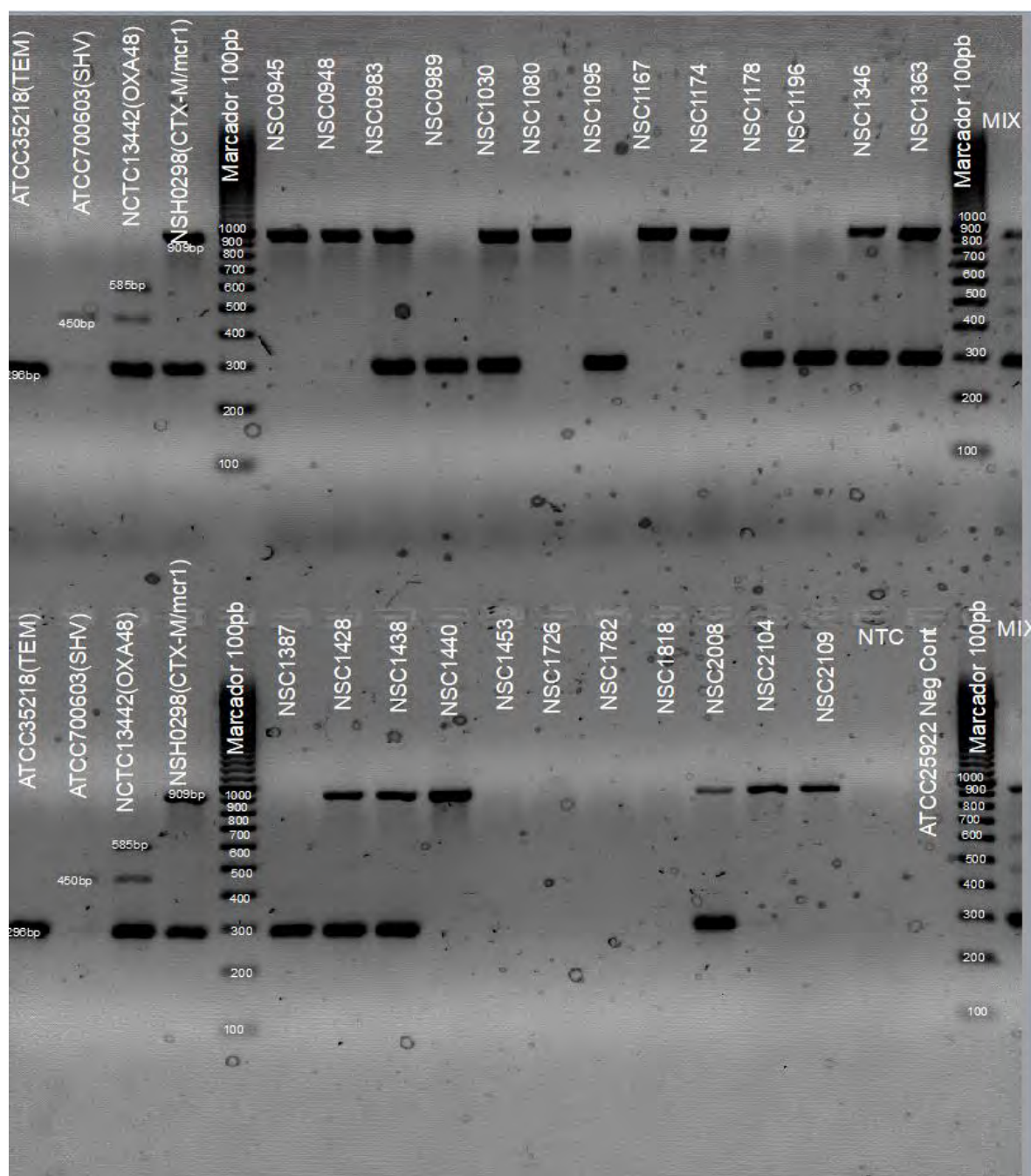
Amplificación de genes resistentes en *E. coli* a los carbapenémicos y al gen de resistencia a la colistina *mcr-1*.



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.

Gel 6.

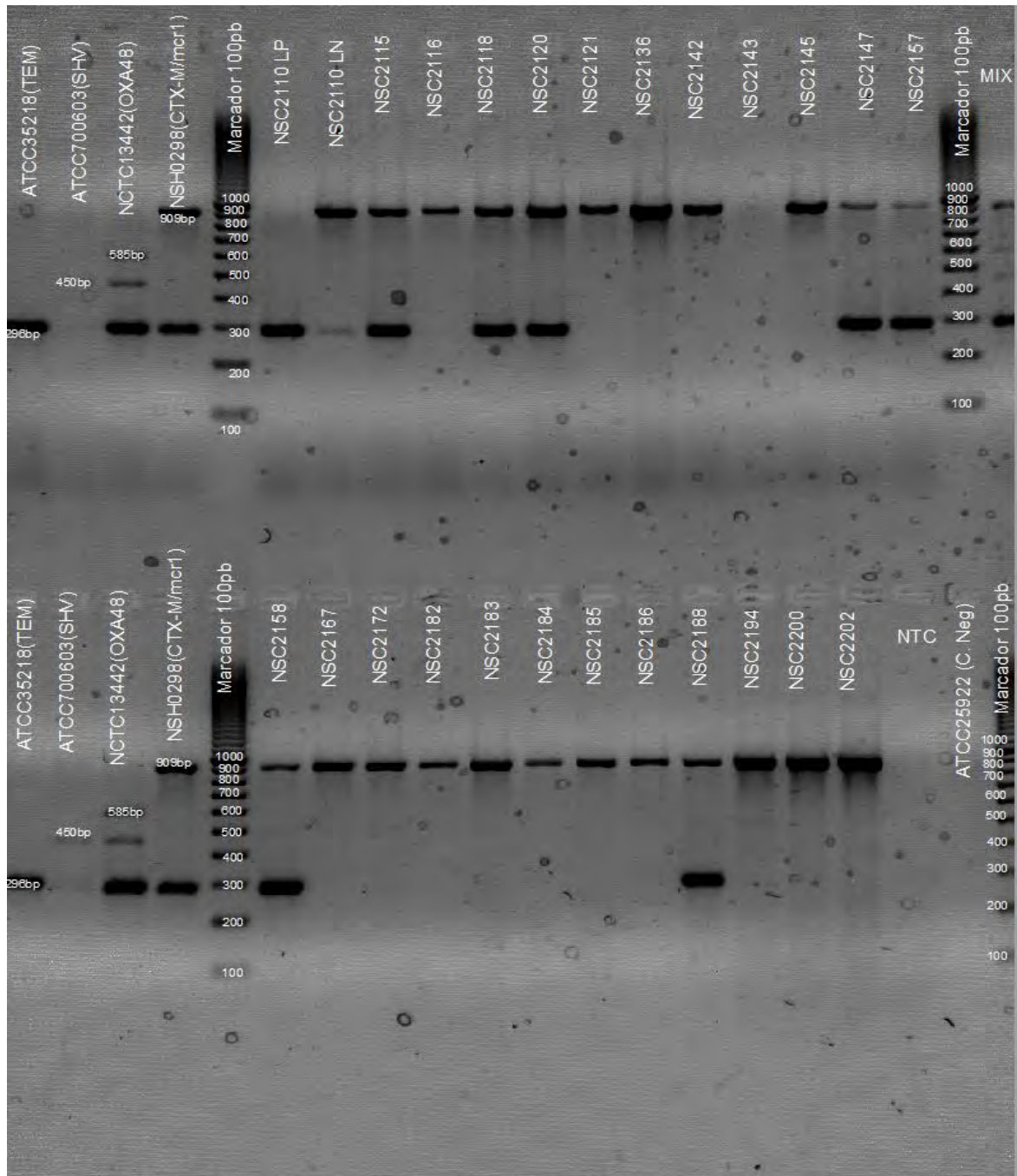
Amplificación de genes en E. coli resistentes a los β -Lactámicos.



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.

Gel 7.

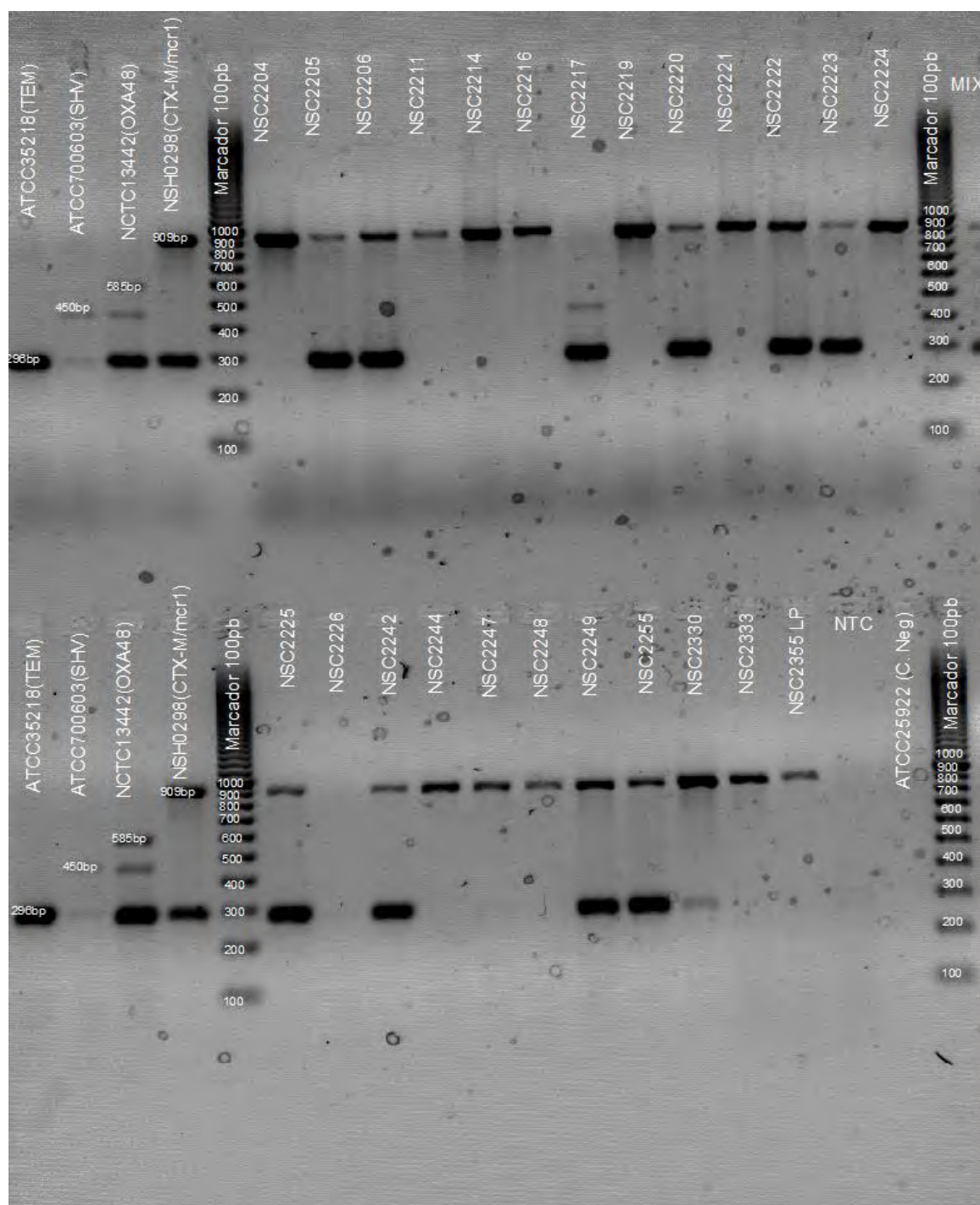
Amplificación de genes en E. coli resistentes a los β -Lactámicos.



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.

Gel 8.

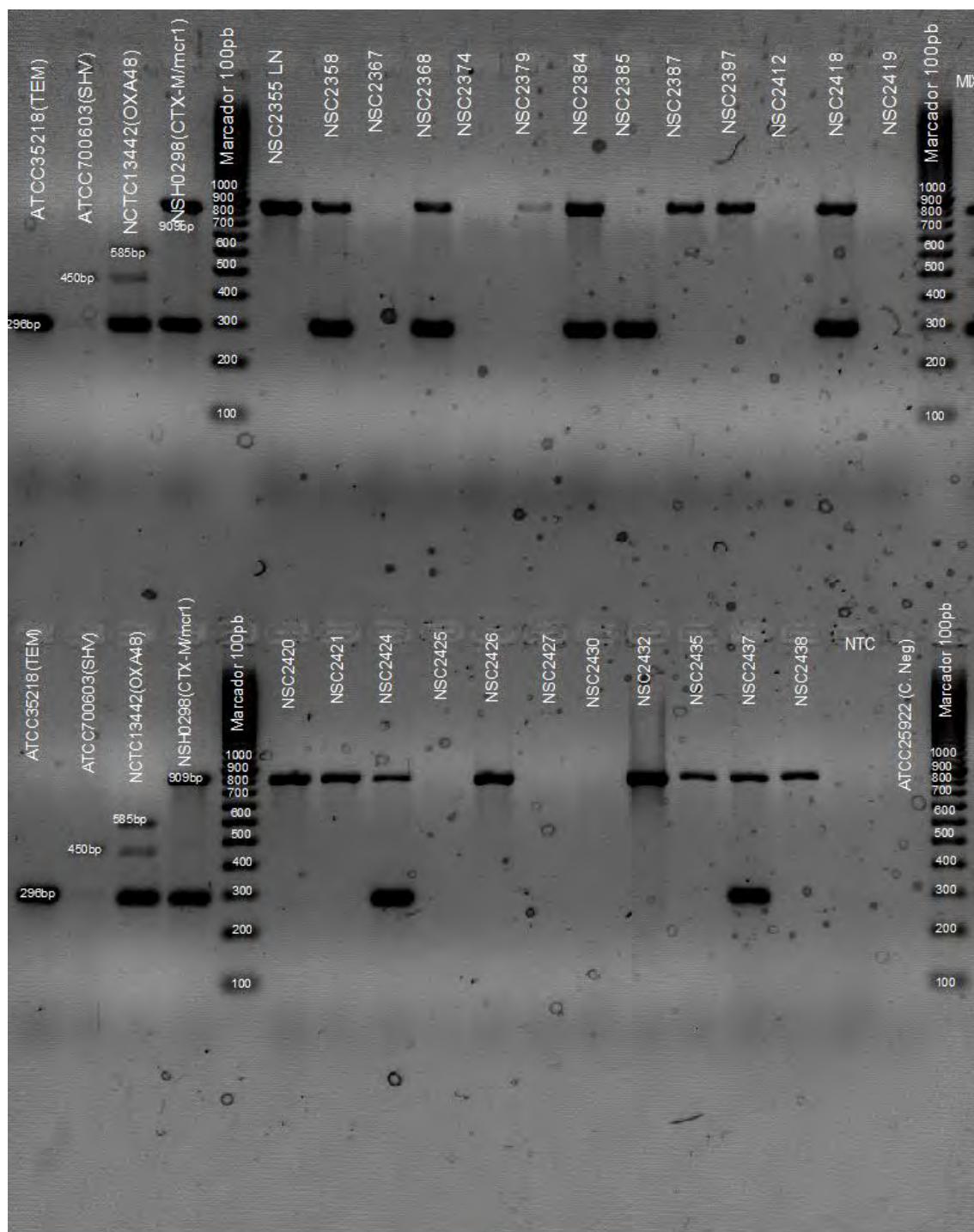
Amplificación de genes en E. coli resistentes a los β -Lactámicos.



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.

Gel 9.

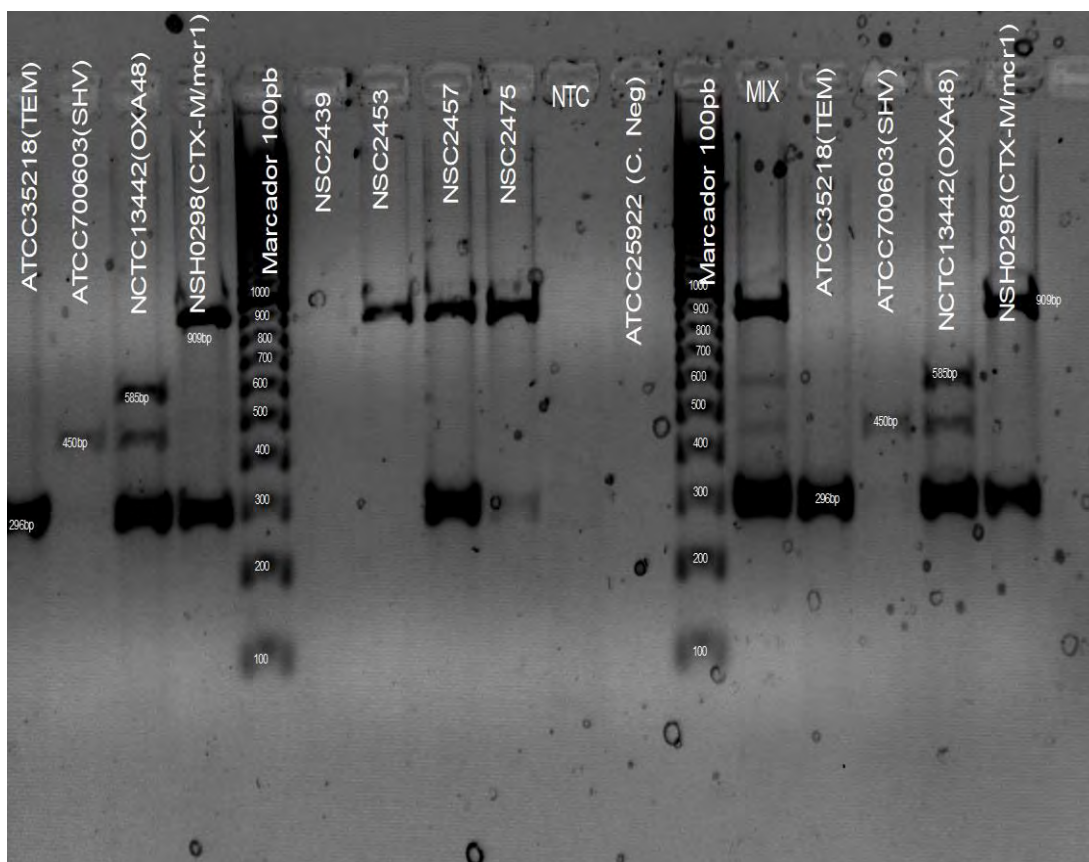
Amplificación de genes en *E. coli* resistentes a los β -Lactámicos.



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.

Gel 10.

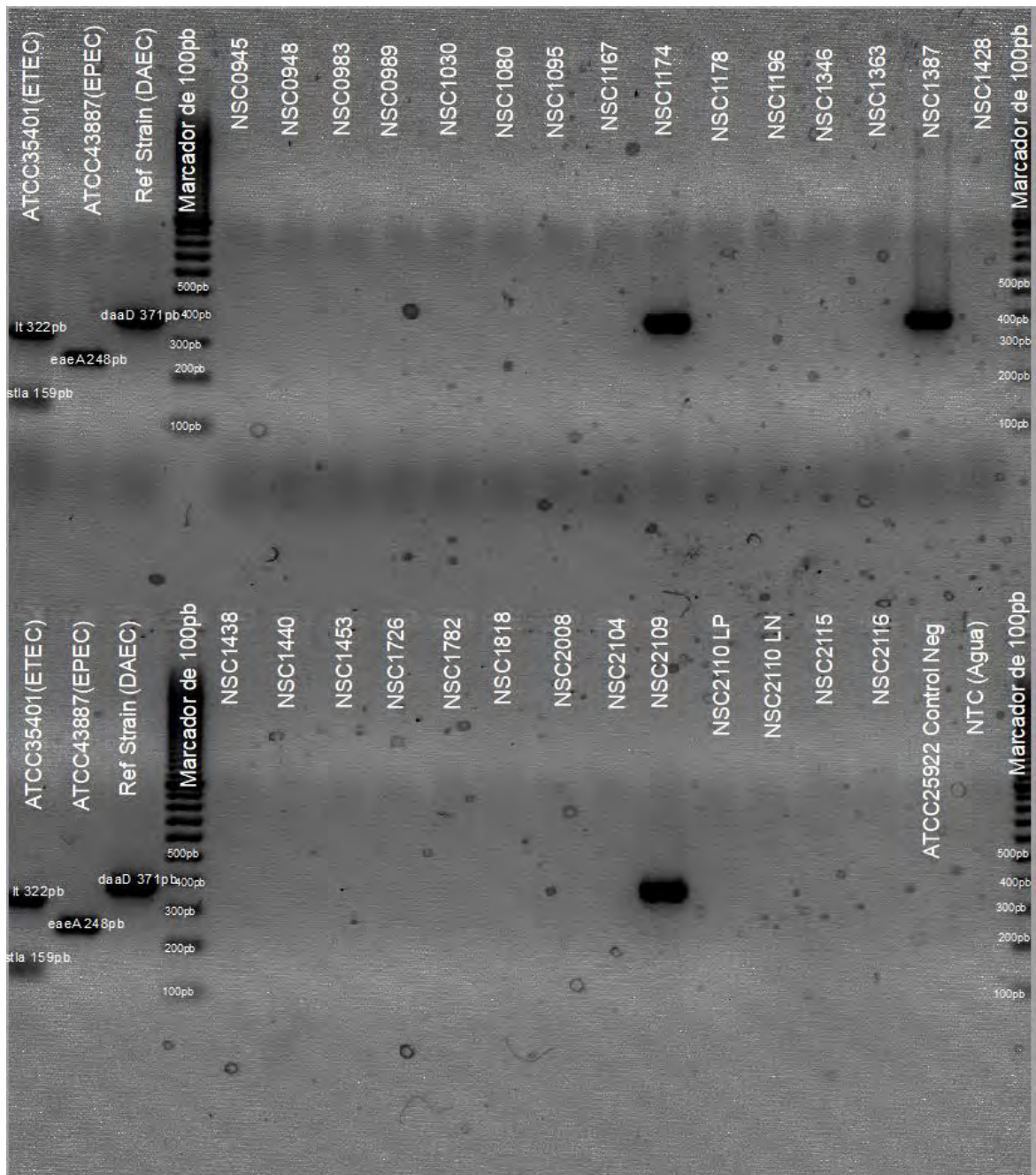
Amplificación de genes en E. coli resistentes a los β -Lactámicos.



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.

Gel 11.

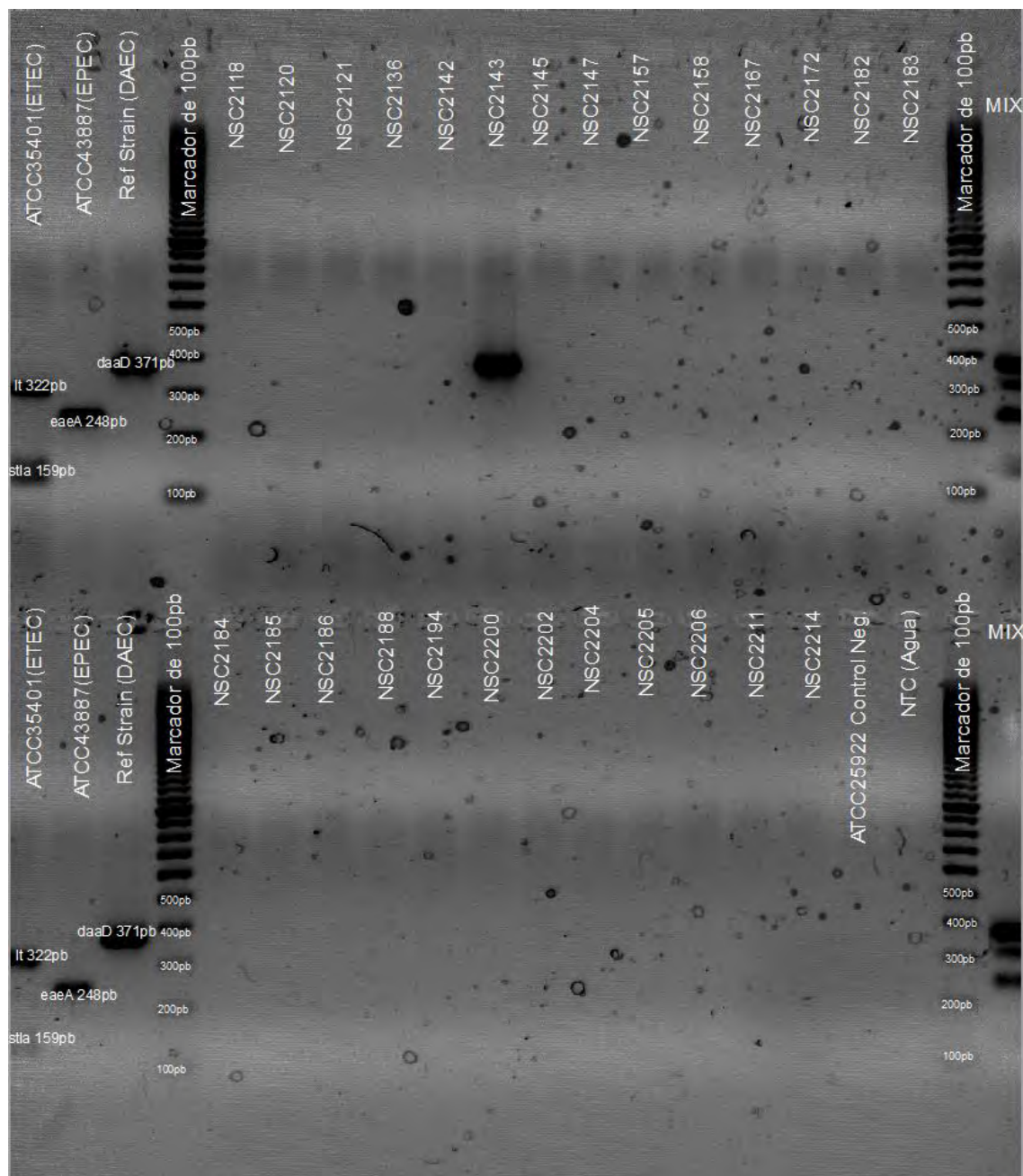
Amplificación de genes de E. coli: enterotoxigénica, enteropatógena y difusamente adherente (MULTI-1).



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios

Gel 12.

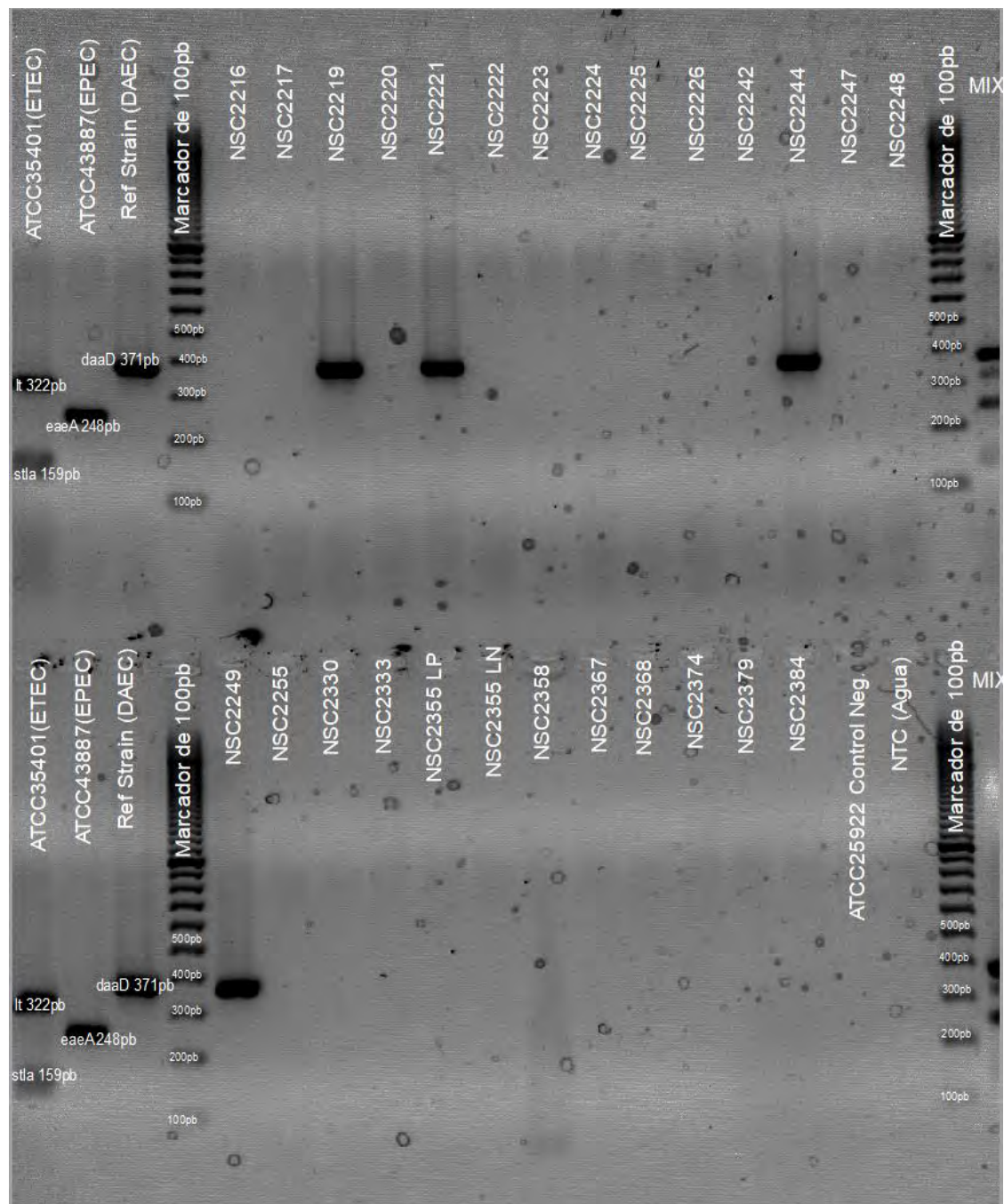
Amplificación de genes de E. coli: enterotoxigénica, enteropatógena y difusamente adherente (MULTI-1).



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.

Gel 13.

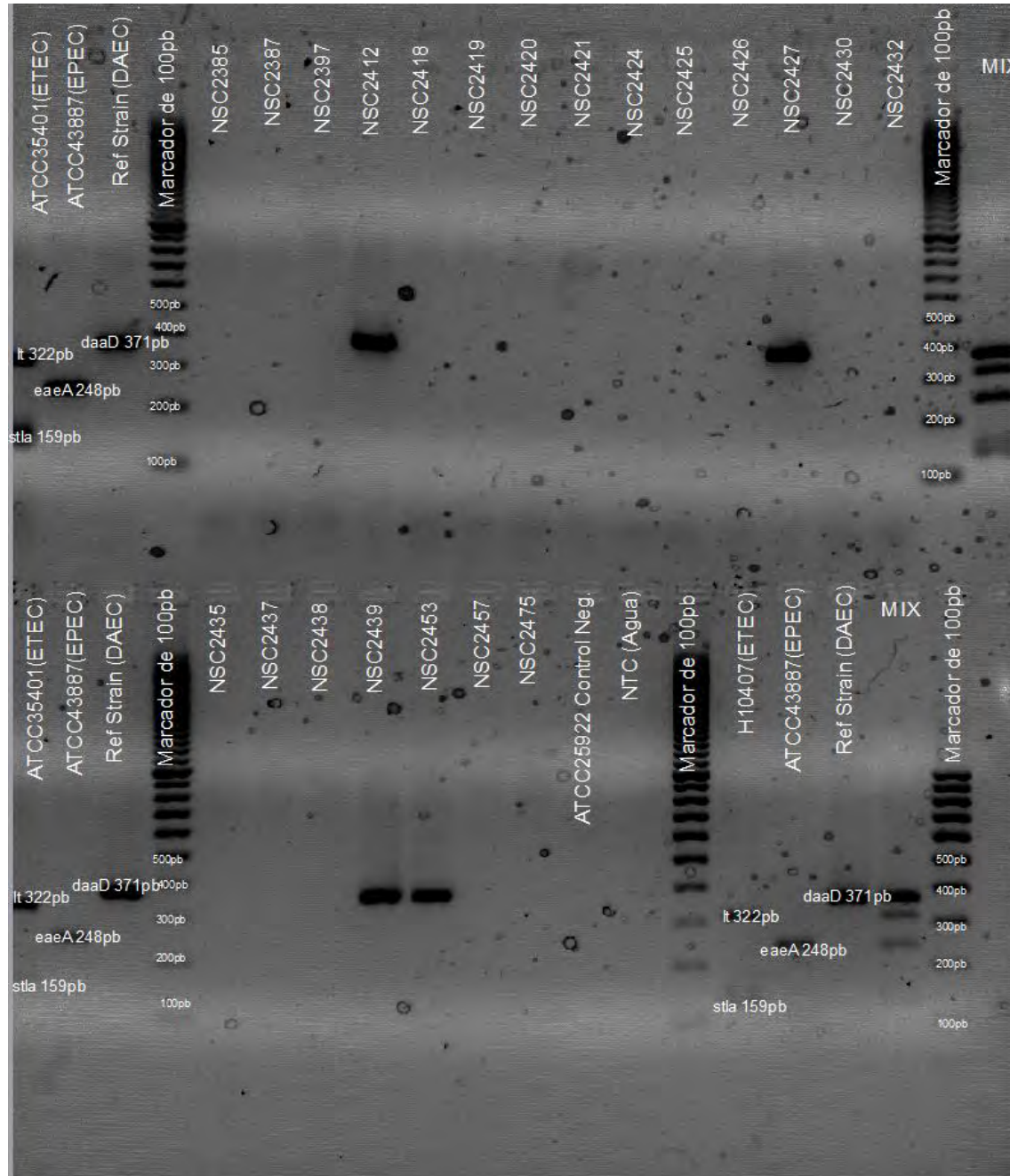
Amplificación de genes de E. coli: enterotoxigénica, enteropatógena y difusamente adherente (MULTI-1).



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.

Gel 14.

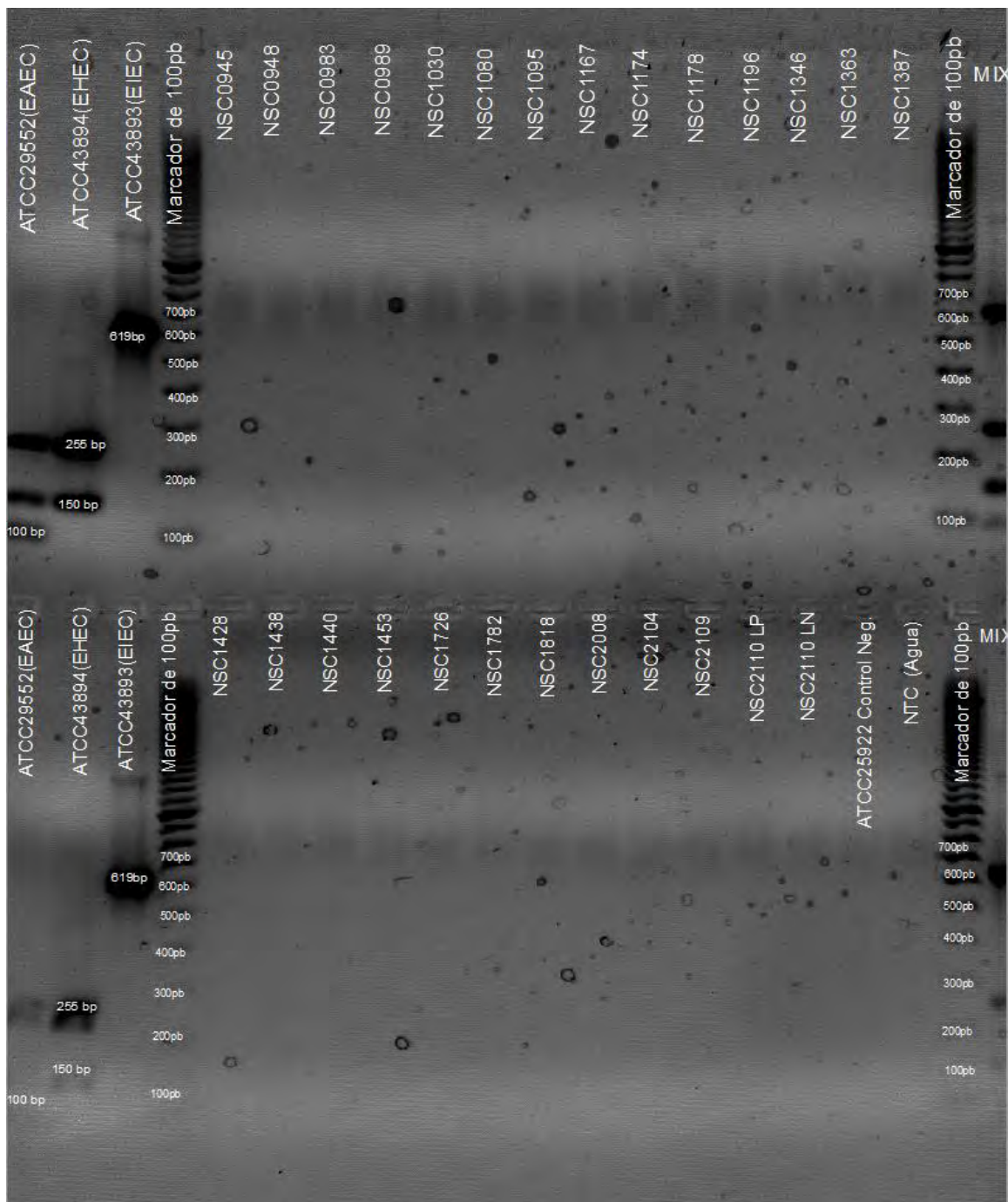
Amplificación de genes de E. coli: enterotoxigénica, enteropatógena y difusamente adherente (MULTI-1).



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.

Gel 15.

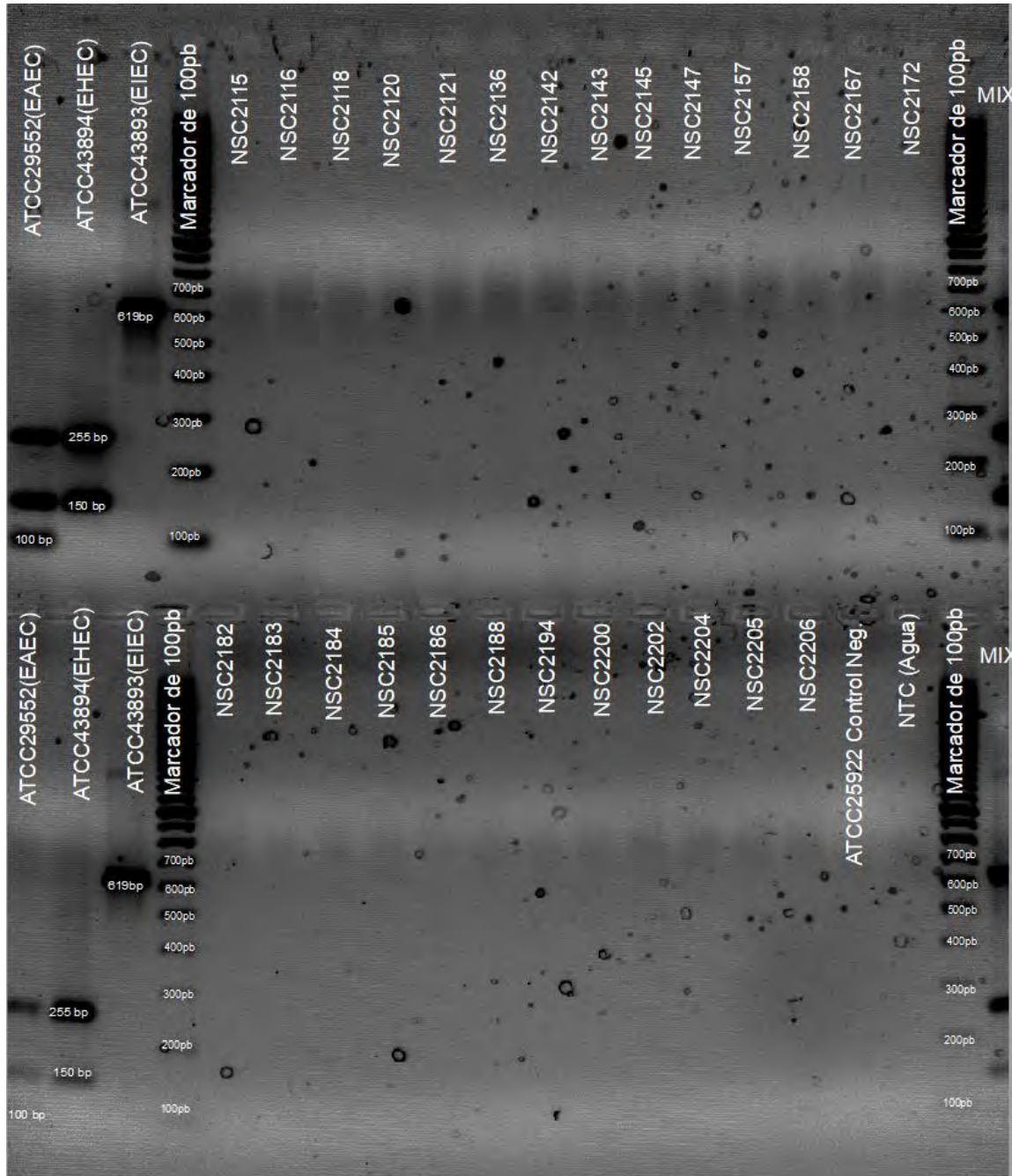
Amplificación de genes de E. coli: enteroinvasiva, enteroagregativa y shiga-toxina (MULTI-2).



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.

Gel 16.

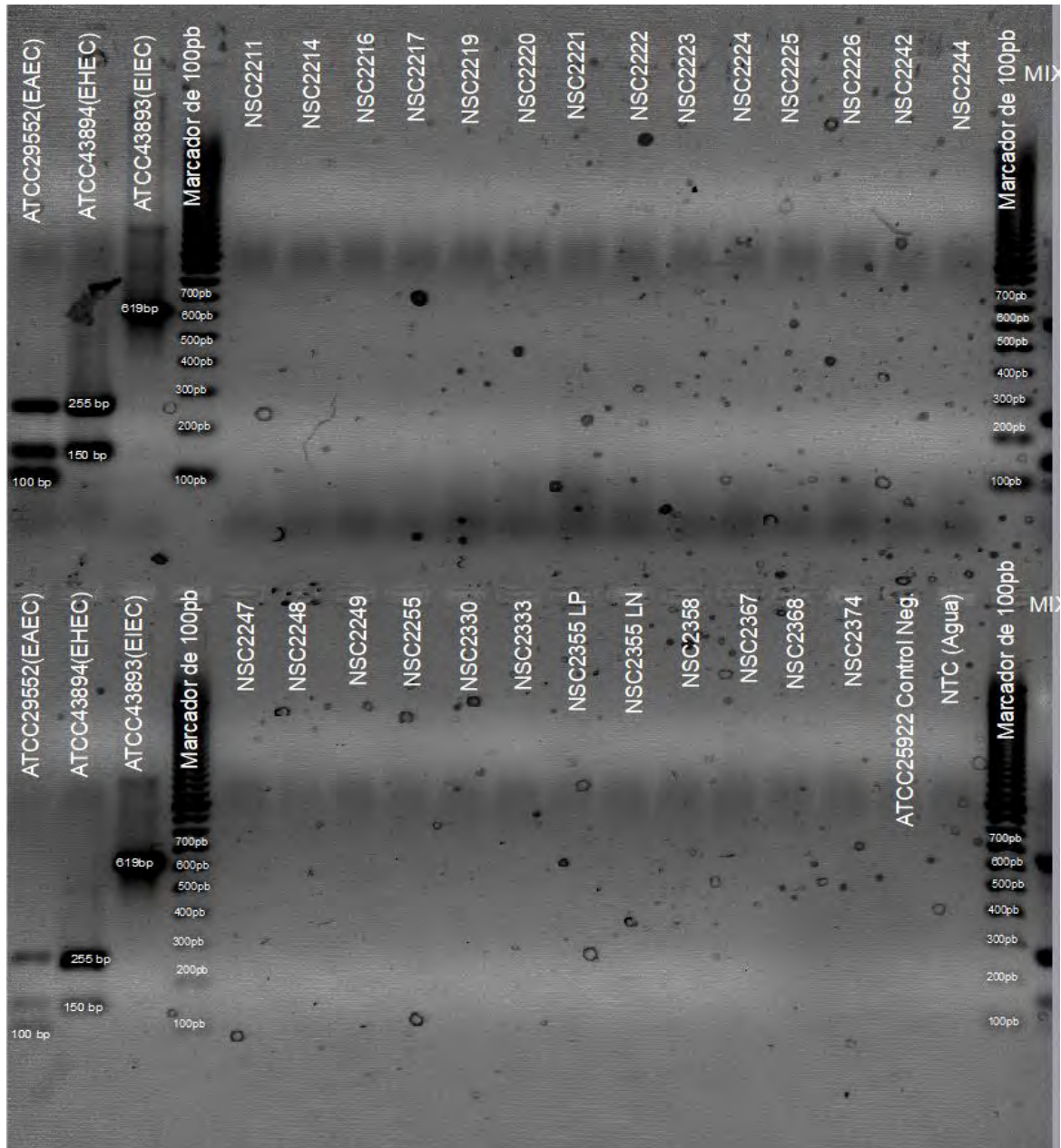
Amplificación de genes de E. coli: enteroinvasiva, enteroagregativa y shiga-toxina (MULTI-2).



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.

Gel 17.

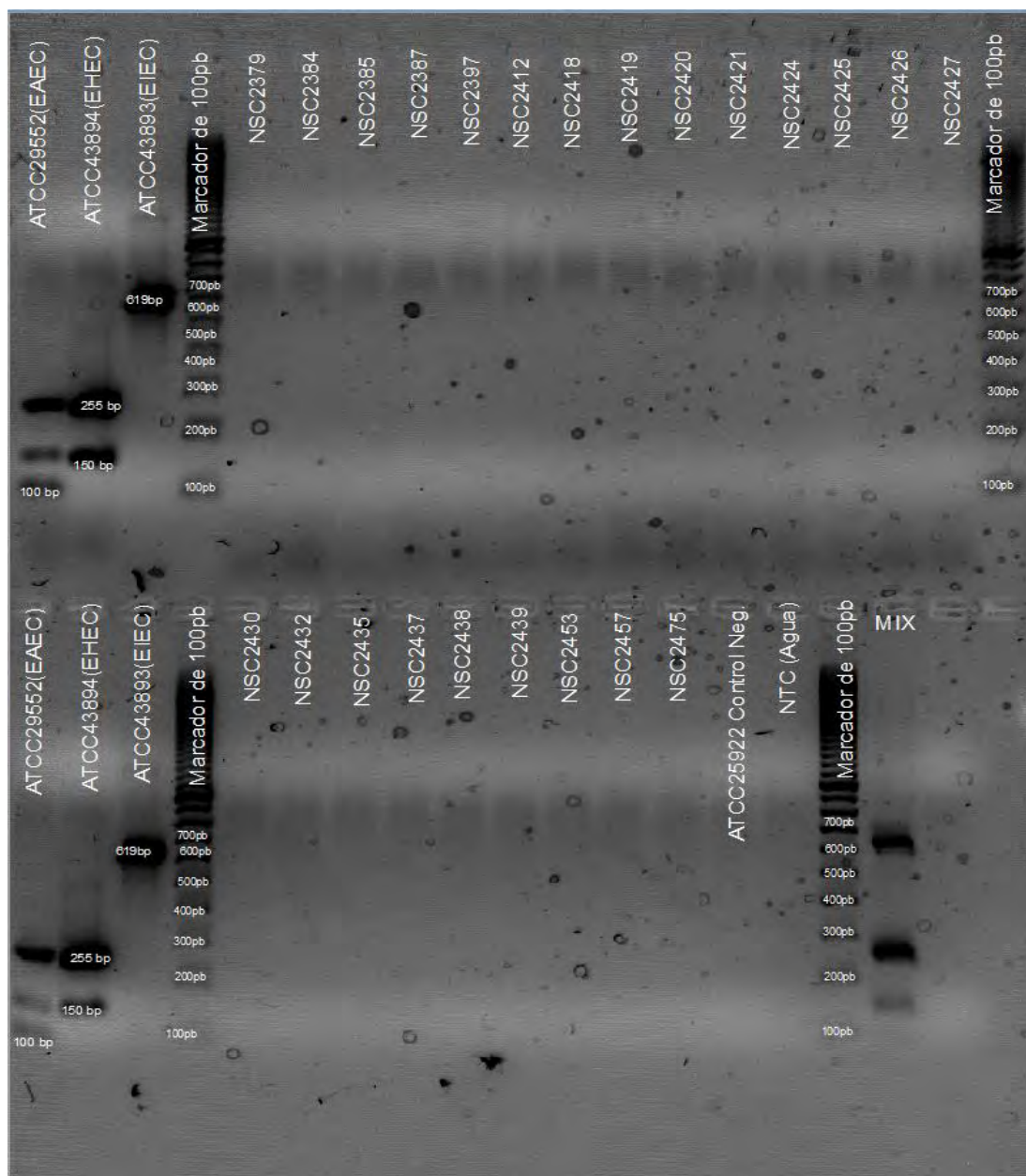
Amplificación de genes de E. coli: enteroinvasiva, enteroagregativa y shiga-toxina (MULTI-2).



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.

Gel 18.

Amplificación de genes de E. coli: enteroinvasiva, enteroagregativa y shiga-toxina (MULTI-2).



Gel de agarosa al 1.5% teñido con 15 μ L de SYBR Safe. Se cargaron 8 μ L de ADN amplificado junto con 2 μ L de tampón de carga. Electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, a 110 voltios.