



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA EN
Stenotrophomonas maltophilia DE ORIGEN AMBIENTAL**

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
LORENA BELEN SÁNCHEZ MENDIZÁBAL

DIRECTORA: DC. MARÍA LILIA CEDILLO RAMÍREZ
CO-DIRECTOR: DC. JORGE ALBERTO GIRÓN ORTIZ

Enero 2023



Índice

Agradecimientos.....	4
Dedicatoria	5
Resumen	7
Introducción.....	8
Taxonomía	8
Metabolismo y fisiología.....	8
Importancia clínica	10
Epidemiología	11
Factores asociados a la virulencia de <i>S. maltophilia</i>	12
Resistencia a antibióticos.....	12
Enzimas extracelulares	14
Flagelos	14
Fimbrias (pilis o pelos)	15
Fimbrias tipo IV	16
Biopelículas.....	17
Cuórum sensing	17
DSF.....	18
Metales pesados.....	19
Sideróforos.....	20
Marco de Referencia	21
Sistema de secreción tipo IV (T4SS)	21
PilB	22
Fimbria tipo IVb.....	23
Flp.....	23
TadA	24
Fimbria tipo I	24
smf-1.....	24
PapC.....	25
Planteamiento del problema.....	25
Justificación.....	26

Hipótesis.....	27
Objetivo General	27
Objetivos específicos	27
Diseño de la metodología.....	28
Materiales y métodos	29
Pruebas microbiológicas	31
Condiciones de crecimiento.....	31
Aislamiento de Cepas	31
CHROMagar	33
Tinción de Gram	33
Pruebas Bioquímicas	34
Resistencia a metales pesados y prueba de producción de sideróforos	35
Antibiogramas	35
Pruebas moleculares	36
Extracción de ADN genómico.	36
Cuantificación.	37
Reacción en cadena de la polimerasa punto final.	37
Electroforesis	40
Resultados	40
Aislamiento	40
CHROMagar	41
Tinción de Gram.....	41
Pruebas Bioquímicos	42
Movilidad, indol y ornitina (MIO).....	43
Lisina y hierro (LIA)	43
Oxidación y fermentación (OF)	44
Oxidasa y catalasa.....	45
Identificación Molecular.....	45
Detección de pilis.	47
Antibiogramas	48
Producción de sideróforos	51
Resistencia a metales pesados	51

Estadística	52
Discusión de resultados	53
Conclusiones.....	57
Bibliografía	58
Índice de Tablas	65
Índice de Figuras.....	66

Agradecimientos

La vida es una serie de pasos, logros, caídas y aprendizajes en donde somos acompañados y guiados, porque nadie logra las cosas sin ayuda. “Todos somos un collage de quienes nos han amado, quienes han creído en nuestro futuro, quienes nos mostraron empatía y amabilidad o nos dijeron la verdad, aun cuando no era fácil de escuchar. De quienes nos dijeron que podíamos lograrlo, aunque no había absolutamente ninguna prueba de que eso fuera verdad “.

Agradezco de manera especial y sincera a mi Tutora; la doctora en ciencias María Lilia Cedillo Ramírez por ser mi gran ejemplo de constancia y dedicación en la investigación. De primera instancia por creer en mi para realizar este proyecto además por su paciencia y palabras de aliento en los días difíciles. Ser la guía durante este proceso de aprendizaje en donde siempre me motivo y enseñó a trabajar duro y con constancia para culminar este proyecto, todo sin dejar a un lado su entera disposición y amabilidad, pero sobre todo por compartir su experiencia profesional y conocimiento en este proceso. Infinitas gracias y por tener el honor de llamarla mi amiga.

Agradezco al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (ICUAP-BUAP) y al Centro de Detección Molecular por otorgarme una oportunidad única para realizar este proyecto además de proporcionarme un ambiente donde puedo desenvolverme profesionalmente.

Aunque no hay palabras suficientes para expresar mi más grande agradecimiento, que es para mi padre Francisco Sánchez Hiliosa por enseñarme que nada es

imposible si se trabaja duro y con el corazón, siempre con una gran actitud de humildad y autoconfianza. A mi madre Catalina Mendizábal Herrera por su ejemplo de valentía y progreso ante las dificultades de la vida. A mis dos grandes pilares por brindarme el amor y apoyo incondicional e inspirarme todos los días para alimentar mi gran curiosidad por la ciencia, siempre sigo prendiendo de ustedes. Por ser el más grande ejemplo de honestidad, lucha, humanidad, capacidad y superación; por su paciencia y tenacidad, estoy orgullosa de ser su hija.

A mi hermana Maritere Sánchez Mendizábal por instruirme en el arte de la microbiología y resolver mis dudas a cualquier hora del día y evitar fatídicas hazañas en el laboratorio que, gracias a ella, no tengo. Por ser esa dosis de disciplina con rigurosidad que necesita mi vida y enseñarme a ver todo desde un punto de vista más práctico.

A mi gran amiga y compañera de laboratorio Ady con la que pase los mejores momentos de la universidad, gracias por enseñarme a enfocarme en lo importante y balancear mi vida con conocimiento y deporte. Sobre todo, por estar conmigo en los momentos más difíciles.

A Martha Ackerman y Tim Berrier por todas las experiencias únicas que compartí con ustedes desde muy pequeña y toda la ayuda que me brindaron.

A todos mis amigos de carrera por su apoyo y consejos, aunque no tuviéramos la mínima idea de lo que hacíamos con nuestra vida. Gracias por hacer esta experiencia inolvidable.

Para finalizar a mi alma mater la Benemérita Universidad autónoma de Puebla, autoridades y profesores por orientarme para concluir con esta etapa de mi vida.

Dedicatoria

A Frank por su gran sacrificio y ejemplo de superación, eres admirable.

Resumen

Stenotrophomonas maltophilia es un bacilo Gram negativo no fermentador de la glucosa y patógeno oportunista que afecta a pacientes inmunocomprometidos. Al contar con una alta heterogeneidad molecular es difícil su detección a nivel metabólico y molecular (Brooke, 2012). Sin embargo, es una bacteria con alto potencial biotecnológico para procesos de biorremediación del agua ya que tiene la capacidad de almacenar grandes cantidades de metales pesados como Cd, Pb, Co, Zn, Hg, Ag, y uranio en forma de biomasa (Pages, y otros, 2008) . En este estudio se evaluó la relación de resistencia a antibióticos y a metales pesados con el sistema de fimbrias tipo IV, IVb y I que están involucradas en los procesos de infección en cepas de origen ambiental y cepas de origen clínico. El sistema tipo IV (Pil A1, PilA2 y PilB) son filamentos dinámicos que se polimerizan y despolimerizan rápidamente, permitiendo los ciclos de extensión, unión y retracción del pilus que tienen un papel importante en el twitching motility, formación de microcolonias y captación del ADN (Craig, Forest , & Maier, Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences, 2019) , en esta última se encarga de translocar ADN y proteínas a otras bacterias o células eucariontes por medio del contacto célula a célula (conjugación), contribuyendo a la plasticidad genómica, que les permite la adaptación a los cambios del entorno (Wallden, Rivera-Calzada, & Waksman, 2010) . De igual manera la fimbria tipo IVb (Flp y TadA) está involucrada en el proceso de proceso twitching motility en superficies sólidas (Tomich , Planet, & Figurski, 2007) . El sistema tipo I (*smf* y *PapC*) actúa como puente entre células epiteliales y superficies inertes, se puede decir que es un factor adhesivo durante la colonización y la infección de tejidos humanos por lo que su expresión es exclusiva para cepas de origen clínico (De Oliveira-Garcia, y otros, 2003). Aunque no se presentó una relación entre las resistencias a metales pesados y antibióticos, si hay relación con el lugar de aislamiento y la cantidad de cepas encontradas ya que los diferentes ambientes provocan la expresión y supresión de diferentes genes, principalmente afectados por factores como la temperatura y la competencia intraespecies. Haciendo un buen uso de la temperatura (Termómetros de ARN) (Kortmann & Narberhaus , 2012) esta bacteria puede expresar en mayor o menor cantidad estos

factores de virulencia. La fimbria smf se presentó en las cepas provenientes del río Atoyac. Al ser una zona donde desembocan diferentes contaminantes y además se juntan varios cauces, estas deberían tener un origen clínico. De todos los aislados la cepa S11 destaca ya que presenta todos los amplificadores y las 12 resistencias a los antibióticos. Para comprobar si hay una relación se deben hacer ensayos de biopelículas, además de mutantes para tener datos más precisos del papel que cumple cada sistema de secreción en el rol de colonizar e infectar mediante el proceso de adherencia y motilidad.

Introducción

Taxonomía

El nombre *Stenotrophomonas maltophilia* proviene de “(stenos, del griego: adelgazado; trophos: el que alimenta; monas: unidad y malt, inglés antiguo: malta; philos, del griego: amigo; amigo de la malta)” (Denton & Kerr, 1998). En 1943 se describe con el nombre de *Bacterium Bookery*. Posteriormente en 1961 se clasificó como *Pseudomonas maltophilia* (Hugh & Leifson, 1963). Más adelante con el uso de técnicas moleculares, en específico, el análisis de ARNr cistronómico se nombró *Xanthomonas maltophilia* (Swings, De Vos, Van Den Mooter, & De Ley, 1983). Sin embargo, en un estudio posterior se analizaron 295 características fenotípicas, resultando 7 cepas *X. maltophilia*, que fueron sometidas a hibridación de ADN-ARN, secuenciación y mapeo de genes de ARNr 16S amplificados por PCR, dando como resultado en 1993 la clasificación y denominación de *X. maltophilia* como *S. maltophilia* (Palleroni & Bradbury, 1983).

Metabolismo y fisiología

Es un bacilo Gram negativo más pequeño que otros del género *Stenotrophomonas* ($0.7\text{--}1.8 \times 0.4\text{--}0.7 \mu\text{m}$) (Mukherjee & Roy, 2016), aerobio obligado, no obstante, puede crecer usando nitrato como aceptor final de electrones en ausencia de oxígeno (Crossman, y otros, 2008). Algunas de sus características bioquímicas se muestran a continuación (tabla 1), destacándose; no fermentador de la glucosa,

catalasa positiva, oxidasa variable y lisina descarboxilasa positiva (Adegoke, Stenström, & Okoh, 2017). *S. maltophilia* se desarrolla en diversos medios con una temperatura optima de crecimiento de 35 °C, mientras que a 4°C y 41°C no crece (Brooke, 2012). Las características antes mencionadas se usan para su identificación a nivel microbiológico, siendo su morfología diferente en cada medio; son colonias pequeñas y amarillas en agar MacConkey (Adegoke, Stenström, & Okoh, 2017). Mientras que en agar manitol con rojo de fenol, las colonias son pequeñas y blancas (figura 4). La distribución es universal desde entornos intrahospitalarios (agua de hemodiálisis y muestras de dializado, antiséptico tópico de clorhexidina-cetrimida contaminada, jabón para lavarse las manos, soluciones para lentes de contacto) (Berg, Eberl, & Hartmann, 2005) (Berg, Roskot, & Smalla, Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*, 1999) (Furushita, Okamoto, Maeda, Ohta, & Shiba, 2005) (Harris & Rogers, 2001) (Berg, Interacciones planta-microbio que promueven el crecimiento y la salud de las plantas: perspectivas para el uso controlado de microorganismos en la agricultura, 2009), hasta reservorios ambientales como cuerpos de agua, rizosfera (llegando a superar la población de bacterias propias de la rizosfera) (Alavi, y otros, 2014), parte de la microflora de algunos animales, sistemas de tratamiento y distribución de agua, plantas de aguas residuales, sumideros, lagos, ríos, biopelículas en superficies de fractura en acuíferos, ensaladas lavadas, grifos, agua embotellada, máquinas de hielo y desagües (Hoefel, Monis , Andrews, & Grooby, 2005) (Hu, Huang, Wu, Hsiao, & Yang, 2008)

Característica	Resultado	Característica	Resultado
Catalasa	+	Ornitina descarboxilasa	-
Oxidasa	+/-	Producción de H ₂ S	-
Movilidad	+	Lisina descarboxilasa	+
Voges-Proskauer	-	Reducción de nitratos	+
Citrato	+	Maltosa	+

Producción de ácido a - partir de glucosa		Producción de ácido a + partir de maltosa	
Manitol	+	Arabinosa	+
Fructuosa	+/-	Rojo de metilo	-
Lactosa	+	Trealosa	+/-
Galactosa	+/-	Gluconato	+
Manosa	+	Manitol	+
Producción de DNAsa	+	Hidrolisis de la urea	-

Tabla 1. Se muestran los resultados obtenidos en diversas pruebas bioquímicas durante el crecimiento de *Stenotrophomonas maltophilia* (Adegoke, Stenström, & Okoh, 2017).

Importancia clínica

Una característica importante que distingue a *S. maltophilia* es la capacidad de formación de biopelículas ya que se adhiere fácilmente a superficies abióticas, siendo los plásticos un reservorio preocupante en ambientes hospitalarios dado que se ha encontrado en las superficies de materiales utilizados en cánulas intravenosas, dispositivos protésicos, líneas de flotación de unidades dentales y nebulizadores. (Hutchinson, y otros, 1996) (Lai, y otros, 2006). Ocasionando diversas enfermedades infecciosas, en especial las respiratorias, no obstante, al ser considerado un organismo de baja virulencia, pero oportunista afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos. Constantemente la colonización bacteriana es mediante la irrigación de los pacientes (soluciones de irrigación, fluidos intravenosos, etc.) y el líquido corporal del paciente (aerosoles o mucosas, orina y exudados de heridas) (Brooke, 2012) . Las enfermedades infecciosas asociadas con este patógeno se mencionan en la tabla 2.

Infecciones nosocomiales

Infección del tracto respiratorio (Neumonía y exacerbaciones agudas de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica [EPOC])

Bacteriemia (con/sin neoplasias hematológicas) /Septicemia relaciona con el catéter

Sepsis biliar
Infecciones de huesos y articulaciones, tracto urinario y tejidos blandos
Infecciones oculares (queratitis, escleritis y dacriocistitis)
Endocarditis y meningitis
Fibrosis quística

Tabla 2. Principales infecciones ocasionadas por *S. maltophilia* en ambientes nosocomiales. (Brooke, 2012)

Epidemiología

Es importante el monitoreo y vigilancia de los casos asociados a *S. maltophilia* ya que es la única del género *Stenotrophomonas* que infecta a humanos, y es el tercer bacilo Gram negativo no fermentador aislado de ambientes hospitalarios, antecediendo *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp* (Adegoke, Stenström, & Okoh, 2017). De acuerdo con las estadísticas a nivel mundial representa el 3.7 % (n = 10,000) de los casos en UCI (Abbott, Slavin, Turnidge, Thursky , & Worth, 2014). Se realizó un estudio usando los datos de varios hospitales de EE.UU, en UCI durante el periodo de 1993-2004, en donde se informó que se encuentra entre los 11 organismos Gram negativos aislados con mayor frecuencia (4.3 % de un total de 74,394) (Lockhart , y otros, 2007). La incidencia de casos aumentó en 1995 a 2005 ($P \leq 0.001$) de 3 a 13.8 %, mientras que la prevalencia de 7 a 16.4 % en todas las edades (0 a >25 años) (Razvi , y otros, 2009). Hay que tomar en cuenta que *S. maltophilia* pertenece al 15% de los aislados clínicos, encontrados con más frecuencia y al afectar a pacientes inmunocomprometidos la probabilidad de supervivencia es demasiado baja, como se demuestra en un estudio del programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY, ya que, durante el periodo 2004 a 2008 la tasa de recuperación en pacientes con neumonía fue de 3.3% para los Estados Unidos, 3.2% para Europa y 2.3% para América Latina (Jones, 2010)

Factores asociados a la virulencia de *S. maltophilia*.

La patogenicidad describe el origen y evolución de la enfermedad, de manera que para *S. maltophilia* es por colonización que viene acompañada de invasión de tejidos involucrando diversos factores de virulencia para establecer una infección en el huésped, de esta manera puede expresar pilus / flagelos / fimbrias / adhesinas, todos involucradas en la adherencia a superficies bióticas y abióticas. Posteriormente se lleva a cabo la formación de biopelícula donde el lipopolisacárido de membrana externa (LPS) participa. Una parte fundamental es el quorum sensing, que es la forma de comunicación química por parte de las bacterias, donde el factor de señal difusible (DFS) es importante en la detección de quorum, que a su vez media la motilidad, la producción de enzimas extracelulares, la síntesis de LPS, la formación de microcolonias y la tolerancia a los antibióticos e iones de metales pesados; y producción de enzimas extracelulares tales como proteasas, lipasas, esterasa, DNasa, RNasa y fibrinolisisina (Brooke, 2012) (Kalidasan, Joseph, Kumar, Hamat , & Neela, 2018).

Resistencia a antibióticos

Existen diversos mecanismos de resistencia a antibióticos, estos se adquieren mediante transferencia horizontal de genes; a través de plásmidos, transposones, integrones, elementos similares a integrones, regiones comunes para elementos de inserción (ISCR) y biopelículas (Avison, Higgins, Von Heldreich, Bennett, & Walsh, 2011) Por lo que *S. maltophilia* al adaptarse a su entorno ha adquirido diversas resistencias a una amplia gama de antibióticos como lo son; trimetropim con sulfametoxazol, β -lactámicos, macrólidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, carbapenems, cloranfenicol, tetraciclinas y polimixinas.

La resistencia a quinolonas no parece tener relación con las mutaciones que presentan en los genes *gyrA* y *parC* que codifican las proteínas diana (Subunidad A del ADN girasa y topoisomerasa IV) de estas. Sin embargo, se han encontrado cepas sensibles al ácido nalidíxico y resistentes al norfloxacin o al ciprofloxacino. La resistencia a los aminoglucósidos se debe principalmente a la baja acumulación de estos en el interior de la bacteria, que podría explicarse por los cambios en las

proteínas de membrana externa o en el lipopolisacárido (Akova, Bonfiglio, & Livermore, 1991). Lo que respecta a las enzimas modificadoras, es rara su presencia, sin embargo es frecuente encontrar en diversos aislados una acetiltransferasa, la AAC(6')Iz a la que se han adjuntado la resistencia intrínseca a la amikacina, netilmicina y tobramicina y, en menor medida, a la gentamicina. La baja permeabilidad de la membrana contribuye a la resistencia intrínseca basal a β -lactámicos incluyendo cefepima, ticarcilina-clavulanato, ceftazidima y piperacilina-tazobactam. Esta resistencia debe principalmente a la producción de dos tipos de β -lactamasas inducibles, L1 y L2 (Akova, Bonfiglio, & Livermore, 1991).

A la vez que la presencia de bombas de eflujo codificadas cromosómicamente (Al-Hamad, Upton, & Burnie, 2009), las β -lactamasas (Abda, y otros, 2015) y las enzimas modificadoras de antibióticos, contribuyen en conjunto a la resistencia intrínseca de *S. maltophilia*. Algunos de los mecanismos de resistencia se muestran en la tabla 3 (Brooke, 2012).

Mecanismo	Ejemplos
β-lactamasas codificadas por cromosomas y plásmidos y en elementos móviles	Transposón similar a Tn 1, plásmido de gran tamaño que codifica a las β -lactamasas inducibles, L1 y L2
Bombas de eflujo	SmeDEF, SmeABC y SmrA, asociadas con resistencia a quinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, aminoglucósidos y β -lactamasas
Integrones y elementos IS CR	Clase I asociados con resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol
Fosfoglucomutasa (SpgM)	Asociada con resistencia a la polimixina B, polimixina E, ácido nalidíxico, gentamicina, vancomicina, ceftazidima, ácido

	ticarcilina-clavulánico y piperacilina-tazobactam
Reducción de la permeabilidad de la membrana externa.	
Determinantes de SmQnr	Asociados con la resistencia a las quinolonas.
Modificación de antibióticos.	Sitio activo
Mutaciones de genes bacterianos	Topoisomerasa y girasas

Tabla 3. Mecanismos de resistencia encontrados en el genoma de *S. maltophilia* de origen clínico. (Brooke, 2012)

Enzimas extracelulares

En el genoma se han encontrado los genes que codifican enzimas extracelulares como; proteasas, esterases, DNAasa y fibrolisina, entre otras, ya que exhiben actividad citotóxica. Tomando en cuenta que uno de los principales lugares en donde se hacen aislados, es la rizosfera, la bacteria necesita de estas, para su supervivencia, crecimiento y propagación. Sin embargo, varios de estas proteínas también se encuentran en aislados nosocomiales, contribuyendo a la patogénesis. Los principales factores de virulencia de *S. maltophilia*, se expresan en forma de enzimas que tienen efectos citotóxicos/morfológicos en las células huésped como serina proteasa (genes stmPr1 y stmPr2), fibrinolinas esterasa (k279a), fosfolipasa (plcN1(smlt1755)) ya que contribuyen a degradar tejido conectivo como colágeno y fibronectina (Brooke, 2012). La fosfoglucomutasa (spgM) tiene un papel importante en la maduración de biopelículas por que participa en la biosíntesis de alginato, al igual que la glucosas-1-fosfato timidiltrasnferasa, DSF sintasa (Mojica, y otros, 2022)

Flagelos

Los flagelos son estructuras filamentosas que tienen diversas bacterias, utilizándolas para su motilidad, adherencia y respuesta inmune. En especies, como *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica* y *Yersinia enterocolitica* se usan para

procesos de invasión y adherencia (O'Toole & Jeter, 1998). Son filamentos largos con una longitud de aproximadamente 2-15 μm y 10-15 nm de diámetro, se componen de subunidades de flagelina que es una proteína de bajo peso molecular (20-40 kDa) que se agregan de manera helicoidal. Estos tienen diferentes ubicaciones, ya sea agrupados de manera individual en un polo de la célula (flagelos monótricos), en ambos polos (flagelos anfítricos), en grandes cantidades a lo largo de la celda (flagelos perítricos), o como un mechón de flagelos en un extremo polar (flagelos lofótricos) (Hobot, 2015). En *S. maltophilia*, se expresan a 37°C y se componen de una estructura principal FliC con peso de 38 kDa, estas se muestran en la figura 1 (de Oliveira-Garcia, Dall'Agnol, & Girón, 2002)

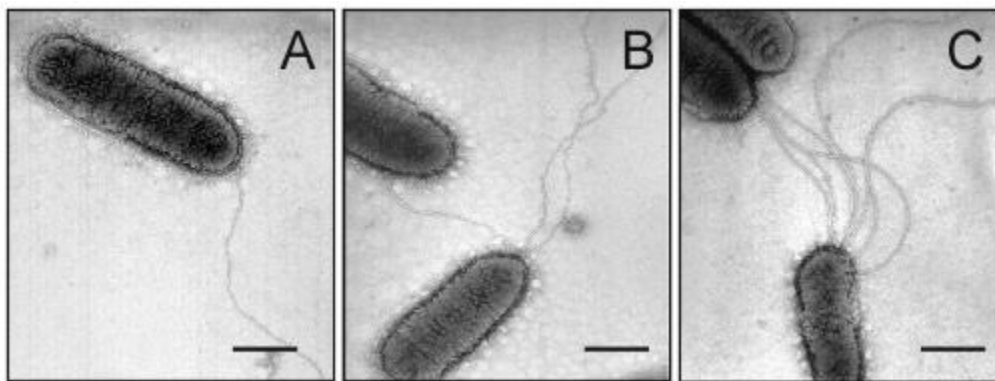


Figura 1. Se muestran las imágenes de microscopía electrónica de barrido de los flagelos expresados en la cepa SMDP92, presentando uno (A) o más (B y C) en disposición polar, Barras, 0.5 μm (de Oliveira-Garcia, Dall'Agnol, & Girón, 2002)

Fimbrias (pilis o pelos)

También llamadas adhesinas, son estructuras más pequeñas que los flagelos y se disponen alrededor (perítricas) de toda la superficie de organismos Gram negativos, mediando la adherencia a superficies bióticas y abióticas, movilidad y transferencia horizontal de genes. La estructura se origina desde la membrana plasmática, que a la vez van formando agregados de pilina que es una proteína hidrofóbica de la que están compuestas. Son importantes en patógenos ya que permiten la colonización

de tejidos específicos, debido a que las fimbrias tienen una alta afinidad por carbohidratos específicos de la superficie celular de mamíferos (Coleman & Smith, 2014).

En bacterias Gram negativas se han caracterizado estas estructuras de acuerdo con sus vías biosintéticas; tipo I y tipo P de *Escherichia coli* (vía chaperona/guía), tipo III de *Yersinia*, *Shigella* y *Salmonella* (aguja de secreción), tipo IV de *Neisseria*, tipo “rizo” de *E. coli* y *Salmonella* y el pili de secreción tipo IV. Estos pili han sido implicados en muchas funciones tales como adhesión a las células hospederas, formación de biopelículas, captación del ADN, evasión inmune, etc.

Fimbrias tipo IV

El pili tipo IV (T4P) son filamentos dinámicos que se polimerizan y despolimerizan rápidamente, permitiendo los ciclos de extensión, unión y retracción del pilus que tienen un papel importante en el twitching motility, captación del ADN y la formación de microcolonias (Craig, Forest , & Maier, Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences, 2019). Son estructuras superficiales filamentosas helicoidales delgadas (5-8 nm) que al ser flexibles y dinámicas se encuentran en muchas bacterias Gram negativas, experimentando ciclos de extensión y retracción, en esta última etapa se genera una fuerza lo suficientemente grande como para empujar una célula bacteriana hacia adelante. Se componen solamente por la subunidad pilina PilA (Dunger, Guzzo, Andrade, Jones, & Farah, 2014). En especies como *Myxococcus xanthus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Neisseria gonorrhoeae* median la motilidad en superficies, mientras que en *Escherichia coli*, *N. gonorrhoeae*, *P. aeruginosa* y *Vibrio cholerae* son importantes en la unión y formación de microcolonias para el establecimiento de una infección, además de participar en la formación de biopelículas y la absorción de ADN por transformación. Muchas de las proteínas involucradas en la biogénesis y función de T4P comparten similitud con las proteínas que se encuentran en los sistemas de secreción de tipo II (T2SS) y los sistemas de flagelo arcaico (Chang , y otros, 2016).

Biopelículas

Como ya se ha mencionado la capacidad de formación de biopelículas por parte de *S. maltophilia* es de gran importancia ya que contribuye a la adquisición de genes con resistencia a antibióticos, se ha estimado la asociación del 65 % de las infecciones adquiridas en el hospital con la formación de biopelículas. Tomando en cuenta las biopelículas formadas en superficies abióticas no son comparables con las formadas en superficies bióticas de pacientes, se necesita tomar en cuenta factores ambientales como; fosfato, concentraciones de cloruro, pH, temperatura, condiciones aeróbicas o anaeróbicas y la presencia de iones de cobre y plata.

Con respecto a la temperatura se ha observado que los aislamientos de *S. maltophilia* clínicos, forman una biopelícula mayor a 32 °C que a 37 °C y 18 °C (Di Bonaventura , Stepanović , Picciani, Pompilio, & Piccolomin, 2007). Además, que, en condiciones anaeróbicas, adicionado con un 6 % de CO₂ la producción de biopelícula se incrementó. De la misma forma se evaluó la relación con el pH produciendo una biopelícula comparable a pH 8.5 y 7.5 y con respecto a pH 5.5 esta fue menor.

Al igual que existen cepas resistentes a diversos fármacos, hay otras que no lo son, razón por la que en un estudio de 70 aislamientos (40 de ellos resistente y 30 no), se detectó un mayor nivel de formación de biopelícula en las cepas resistentes con una densidad óptica promedio a 540 nm [OD 540], a la vez que los aislados no resistentes presentaron un promedio de 0,15 nm [OD 540] y la biopelícula se correlacionó ($P \leq 0,01$) con resistencia a ceftazidima, cefepima, ticarcilina-clavulánico, piperacilina-tazobactam, aztreonam y gentamicina. La formación de biopelículas no se correlacionó con la resistencia a ciprofloxacina, levofloxacina, TMP-SMX o meropenem (Liawa, Leea , & Hsueh, 2010).

Cuórum sensing

Es un proceso por el cual las bacterias se comunican y coordinan, mediante la producción y detección de moléculas; conocido como detección de quorum, siendo el principal mecanismo de regulación de la patogénesis, ya que las poblaciones

bacterianas, cultivos puros o comunidades polimicrobianas, sincronizan la expresión génica y responden a los cambios del entorno. La detección de quorum propuesta en *S. maltophilia* comienza con el clúster de genes co-localizados en el grupo *rpf* (regulación de factores de patogenicidad) que producen y detectan señales DSF, encontrándose 2 variantes de este (*rpf-1* y *rpf-2*). De igual manera para el sensor que es una quinasa denominada RpfC hay dos variantes (RpfC-1 y RpfC-2). En cepas que tienen el tipo RpfF-1 y RpfC-1, primero se tiene que estimular la actividad de RpfF1, mediante el aumento de la densidad celular y a su vez estas sintetizan DSF (ácido cis-11-metil-2-dodecanoico), acumulándose en el medio extracelular, una vez que los niveles son considerables, RpfC-1 detecta a DSF comenzando la cascada de fosforilación en todos sus dominios citoplasmáticos, posteriormente interviene el regulador RpfG, que degrada el diguanilato cíclico (c-di-GMP) a GMP activando el regulador transcripcional Clp que estimula la expresión de genes involucrados en la formación de biopelícula, motilidad y virulencia. Para las cepas que tiene el tipo RpfF-2 y RpfC-2, hay una represión de RpfF-2 impidiendo la detección del factor de señal difusible (DFS), cuando se usa una sola cepa (condiciones axénicas). Sin embargo, cuando se juntan dos cepas con variantes de *rpf*, el DSF producido por otras bacterias es detectado por la quinasa RpfC-2, permitiendo la síntesis de DSF (Huedo, Coves, Daura, Gibert, & Yero, 2018).

DSF

El factor de señal difusible es uno de los sistemas de quorum sensing más estudiados, mediante la detección de moléculas, en este caso el ácido cis-11-metil-2-dodecanoico. Los genes involucrados en este proceso están organizados en dos operones contiguos que se transcriben de manera convergente. El primero está conformado por los genes que codifican para la ligasa RpfB y la sintasa RpfF y el operón opuesto para la quinasa RpfC y el regulador citoplasmático RpfG (Huedo, Coves, Daura, Gibert, & Yero, 2018).

Metales pesados

S. maltophilia cuenta con una amplia actividad metabólica que puede ser aprovechada en la biorremediación ya que tiene la capacidad de degradar diversos contaminantes como; p-nitrofenol, 4-clorofenol, hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos de selenio, benceno, tolueno, etilbenceno y xenobióticos (Ryan, y otros, 2009). En la agricultura se puede usar su potencial para reciclar el nitrógeno/ azufre, como promotor del crecimiento en plantas y finalmente como inhibidor del crecimiento de patógenos (Ryan, y otros, 2009). Se ha encontrado que puede, soportar altos niveles (0.1 a 50 mM) de varios metales tóxicos, como Cd, Pb, Co, Zn, Hg, Ag, y uranilo (Pages, y otros, 2008). En el estudio de la cepa *S. maltophilia* Sm777, se observó la reducción de telurio (25 mM) y selenio (50 mM) a su forma elemental, desarrollando dos posibles mecanismos que son; reducción de oxianiones a iones elementales y la acumulación de Cd, el segundo mecanismo se comprobó con los análisis de tioles solubles, donde se mostró un aumento de ocho veces el grupo cisteína en respuesta al cadmio, resistiendo concentraciones de 2 mM de CdCl₂ que llegó a acumularse hasta 4 % de su biomasa (Pages, y otros, 2008)

A nivel genómico se han encontrado diversas resistencias intrínsecas a metales, siendo los sistemas de captación los más comunes en bacterias Gram negativas, de los cuales hay dos tipos. El primero es inespecífico por lo que podría acumular metales tóxicos no esenciales, de este tipo se encontraron 7, destacándose las permeasas de sulfato pertenecientes a la familia de SulT, SulP y CysP, también podrían absorber oxoaniones como cromato, molibdato, selenato y tungstato (Yu, Chen, Sheng, & Hong, 2018) El segundo sistema de captación tiene una alta especificidad ya que regularmente usa energía de hidrólisis de ATP, encontrándose 13 genes de los cuales 10 fueron identificados como proteínas receptoras de sideróforos de Fe³⁺ de alta afinidad y los otros 3 como transportador ABC de molibdato (Yu, Chen, Sheng, & Hong, 2018). Mientras que de los sistemas de salida de metales se identificaron un total de 11 sistemas de eflujo, incluidos 5 CDF, 4 RND, una ATPasa exportadora de cobre y una proteína de eflujo de manganeso. La

mayoría de estos sistemas están involucrados en el flujo de salida de Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} y Ni^{2+} (Yu, Chen, Sheng, & Hong, 2018).

Sideróforos

El hierro (Fe) tiene un papel fundamental como catalizador en procesos enzimáticos, respiración, desintoxicación de radicales libres, la transferencia de electrones y síntesis de ADN y ARN (Aguado-Santacruz, Moreno-Gómez, Jiménez-Francisco, García-Moya, & Preciado-Ortiz, 2012) de forma concreta para *S. maltophilia* actúa como señal en sustancias poliméricas extracelulares (EPS), producción de enzimas extracelulares, respuesta al estrés oxidativo, factor de señal difusible (DSF) y producción de sideróforos en *S. maltophilia*. En la formación de biopelícula regula la motilidad de la superficie y estabiliza la matriz del polisacárido (Weinberg, 2004). De forma natural se encuentra presente en forma de sales e hidróxidos de baja solubilidad (Fe^{3+}), de manera que este no está biodisponible para las bacterias, (Aguado-Santacruz, Moreno-Gómez, Jiménez-Francisco, García-Moya, & Preciado-Ortiz, 2012) por lo que estas tienen diversos sistemas de captación, para Gram Negativas los más comunes son transferrina (Tf) o lactoferrina (Lf), hemo (Hm) y hemoglobina (Hb), sideróforos y hierro ferroso (Fe^{2+}) (Kalidasan, Joseph, Kumar, Hamat, & Neela, 2018).

Los sideróforos son agentes quelantes de metales con masas moleculares bajas (200–2000 Da) producidos por microorganismos y plantas, especialmente en condiciones limitantes de Fe, de forma específica secuestran el hierro en presencia de otros metales (Mo, Mn, Co y Ni) para reducirlo a Fe^{2+} y utilizarlo para su nutrición (Aguado-Santacruz, Moreno-Gómez, Jiménez-Francisco, García-Moya, & Preciado-Ortiz, 2012). Los sideróforos se clasifican de acuerdo con el grupo ligando que contienen, siendo los catecolatos (fenolatos), hidroximatos (ácido hidroxámico) e hidroxicarboxilatos (ácido hidroxicarboxílico) (Ahmed & Holmström, 2014). En *S. maltophilia* hay dos vías de captación de hierro que están codificadas en su genoma; el operón *entAFDBEC* dirige la producción del sideróforo, que es de tipo catecolato dependiente de EntC siendo distinto de la enterobactina, ya que el sideróforo parece tener una modificación en la posición 3 y / o la posición 4 en la estructura del

catecolato. Mientras que la captación de hem se basa en el operón *hgbBC* y *hmuRSTUV* (Kalidasan, Joseph, Kumar, Hamat , & Neela, 2018).

Cuando hay una deficiencia de Fe en el medio se estimula la formación de biopelícula y sustancias poliméricas extracelulares (EPS), desencadenando una producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), producción de enzimas extracelulares obteniendo una respuesta al estrés oxidativo. Así mismo, se informó que el hierro regula negativamente la producción de DSF a través de la interacción Fur (proteína de absorción férrica), esta regula la homeostasis, el metabolismo y la virulencia. Probablemente impide la transcripción tras la interacción con Fe^{2+} o causa una disminución en ausencia de Fe^{2+} , también se demostró la expresión de dos OMP reprimidos con hierro (IROMP), FepA y el receptor de sideróforo dependiente de TonB (Kalidasan, Joseph, Kumar, Hamat , & Neela, 2018).

Marco de Referencia

Sistema de secreción tipo IV (T4SS)

Se encuentra distribuido en diversos microorganismos desde bacterias Gram positivas y Gram negativas hasta arqueas, lo utilizan como mediador del transporte de proteínas monoméricas, así como toxinas de proteínas de múltiples subunidades y complejos de nucleoproteína, es importante recalcar que es el único sistema de secreción que se encarga de translocar ADN y proteínas a otras bacterias o células eucariontes (McCutcheon , Peters , & Dennis , 2018). A pesar de la homología que comparten entre sí, tienen distintas funciones, por lo que se han identificado 3 tipos de T4SS funcionales (Wallden, Rivera-Calzada, & Waksman, 2010).

El primero es indispensable para transferir ADN por medio del contacto célula a célula (conjugación), contribuyendo a la plasticidad genómica, que les permite la adaptación a los cambios del entorno. Los T4SS conjugativos a menudo se codifican en plásmidos autotransmisibles junto con genes que proporcionan una ventaja selectiva para la célula, como resistencia a los antibióticos, rasgos de virulencia u otras funciones metabólicas que mejoran la supervivencia (Wallden, Rivera-Calzada, & Waksman, 2010).

El segundo tipo media la absorción de ADN (trasformación) y la liberación al medio extracelular, siendo estudiados y caracterizados en *Helicobacter pylori* (ComB) y en *Neisseria gonorrhoeae* (isla GGI) (Wallden, Rivera-Calzada, & Waksman, 2010) .

El tercer tipo de T4SS se utiliza para transferir proteínas, encontrándose en su mayoría en bacterias patógenas donde son importantes para establecer la interacción patógeno-huésped y / o transferir proteínas efectoras tóxicas o complejos de proteínas al citoplasma de la célula huésped (Wallden, Rivera-Calzada, & Waksman, 2010).

El aparato T4SS está conformado por 12 proteínas centrales. VirD4 es una proteína de acoplamiento para reclutar sustrato en un complejo de membrana interna hecho de VirB3, VirB6, VirB8, VirB4 y VirB11. Luego, los sustratos se secretan a través de un complejo que atraviesa la membrana externa del periplasma compuesto por VirB7, VirB9 y VirB10. VirB2 y VirB5 forman una estructura similar a un pilus diseñada para ponerse en contacto con las membranas objetivo, y VirB1 ayuda a degradar el peptidoglicano durante el ensamblaje del aparato T4SS, para demostrar el papel de T4SS en *Stenotrophomonas* esta se cultivó junto con *Pseudomonas aeruginosa*, donde se observó un efecto bactericida ya que redujo el número de bacterias heterólogas. Mientras que la mutante virB10 del aislado clínico K279a demostró evidencia de que promueve la eliminación de macrófagos humanos mientras reduce la muerte en células epiteliales humanas (Kalidasan & Kumari Neela, Twitching motility of *Stenotrophomonas maltophilia* under iron limitation: In-silico, phenotypic and proteomic approaches, 2020) (Nas, Gabell, & Cianciot, 2021)

PilB

La dinámica del pili tipo IV T4P de extensión / retracción, se centra en dos miembros de la superfamilia de secreción ATPasas, *pilB* y *pilT*, que se han identificado en todos los sistemas T4P. El movimiento de T4P se lleva a cabo en dos pasos; el primero es la extensión por polimerización, involucrando la adición de subunidades de pilina desde un reservorio en la membrana interna (Morand , y otros, 2004) a la

base del pilus, todo esto mediado por *pilB* (Craig , y otros, 2006). El segundo paso es la retracción por despolimerización que es todo lo contrario al anterior, donde se eliminan las subunidades de pilina de la base y se transfieren a la membrana interna (Skerker & Berg, 2001).

Fimbria tipo IVb

Flp

Fimbria clasificada en la familia de la prepilina IVb, su secuencia varia de 50 a 80 aa (aminoácidos), cuenta con un motivo *flp* altamente conservado en la parte N-terminal, esta zona contiene 20 aa hidrofóbicos, no polares y alifáticos, que se caracteriza por los restos adyacentes de glutamato y tirosina, dicho dominio posiblemente funciona como un segmento transmembrana antes de la polimerización de pilina, después de lo cual probablemente se empaqueta en el centro del filamento helicoidal, como lo han revelado los análisis estructurales de varias pilinas T4P. Las prepilinas de *flp* generalmente carecen de residuos de cisteína que forman un enlace disulfuro en la región C-terminal de otras pilinas. El procesamiento de *flp1* es esencial para la función de pilina y el ensamblaje de pilus. Siendo los residuos E (+5) e Y (+6) en el motivo *flp* cruciales para el ensamblaje de pili, pero no para la expresión o procesamiento de pilina. El procesamiento de Flp1 se produce por un mecanismo similar a la maduración de las pilinas T4P, que son escindidas por las peptidasas prepilinas. Al igual que las proteínas *flp*, otras pilinas T4P también contienen el residuo E (+5), que se considera crítico para el reconocimiento de las subunidades de pilina entrantes por el pilus en crecimiento. Dado el requisito de *flp1* E (+5) para el ensamblaje de pilus, este residuo probablemente también sea importante para las interacciones de *flp* pilina-pilina. Todos estos datos son aplicables para el modelo de *A. actinomycetemcomitans* (Tomich , Planet, & Figurski, 2007).

Se puede comparar con el sistema T4P, teniendo la capacidad para retraer y facilitar el proceso denominado twitching motility en superficies sólidas, observado en bacterias, incluidas *P. aeruginosa* y especies de *Neisseria*. La retracción del *flp*-pilus

aún no se ha demostrado en ningún organismo. Sin embargo, se ha propuesto que los pili similares a *flp* de *C. crescentus* se retraen, ya que su pérdida regulada por el desarrollo de la superficie celular no conduce a la acumulación de pili o pilina en el medio (Tomich , Planet, & Figurski, 2007).

TadA

Presenta homología con la subfamilia GspE de ATPasas requerida para la secreción por los sistemas T2S, así como a las ATPasas tipo PilB de los sistemas de ensamblaje T4P de bacterias Gram negativas. Sin embargo, *tadA* parece estar más estrechamente relacionado con la subfamilia VirB11 del sistema de secreción de tipo IV (T4S) de NTPasas, esta tiene la función de acoplar energía de la hidrólisis de ATP a la secreción de proteínas o ensamblaje de pilis. Se identificó primero en el patógeno periodontal *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, de ahí el nombre *tadA*, esta se localiza en la membrana interna y el citoplasma por lo que muestra una asociación periférica con la membrana interna, mediante microscopia electrónica se han observado la formación de complejos hexaméricos en forma de anillo, siendo una característica que se presenta en T4P y T4S. *tadA* como proteína purificada tiene la función de ATPasa que depende de un motivo de unión a nucleótidos de la caja Walker A, además este motivo es esencial en la secreción de NTPasas, siendo una ATPasa que proporciona energía para el ensamble del pilus *flp*. (Tomich , Planet, & Figurski, 2007).

Fimbria tipo I

smf-1

Fimbrias semiflexibles peritricas (5-7 nm), compuesta por una subunidad de fimbrina de 17 kDa que se expresa fenotípicamente a 37 °C pero no a 18°C preferentemente en medio TSAB. Comparando la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal, presenta similitudes significativas (61%) con adhesinas fimbriales (G, F17 y 20K) encontradas en cepas patógenas de *Escherichia coli* y las fimbrias *CupA* de *Pseudomonas aeruginosa*. Tomando en cuenta que *CupA* tiene un rol importante en las diferentes etapas de la formación de biopelícula en *P. aeruginosa* y

considerando los datos obtenidos en microscopia de alta resolución, donde se observó que *Smf-1* actúa como puente entre células epiteliales y superficies inertes, se puede decir que es un factor adhesivo durante la colonización y la infección de tejidos humanos por lo que su expresión es exclusiva para cepas de origen clínico, además participa en las primeras etapas de formación de biopelículas en superficies abióticas (De Oliveira-Garcia, y otros, 2003).

PapC

Pertenece a una de las familias de proteínas ubicadas en la membrana externa que se encargan del ensamblaje y secreción de pilis, que median la adhesión de las bacterias a superficies bióticas, con el mecanismo de chaperona-usher, estudiado en *Escherichia coli* uropatógeno (Ford , y otros, 2010).

Planteamiento del problema

Stenotrophomonas maltophilia es el tercer bacilo Gram Negativo no fermentador encontrado en UCI, es denominado un patógeno nosocomial emergente ya que afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos con enfermedades asociadas a neumonía seguida de otras infecciones respiratorias, urinarias, de piel y tejidos blandos, siendo el responsable de la mortalidad del 14 al 69 % de los casos.

Todo el proceso que conlleva la colonización e infección es debido a una serie de factores de virulencia como lo son la resistencia a diversos antibióticos, las fimbrias / adhesinas / pilus / flagelos, LPS, DFS tienen un papel fundamental en la formación de biopelícula, motilidad y virulencia. Diferentes fimbrias y flagelos se han estudiado en modelos de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, como lo son las fimbrias tipo IVa, IVb y I. La fimbria tipo I (*smf-1*) forma puentes entre las bacterias que se adhieren a las superficies inertes o a células epiteliales. Las fimbrias tipo IVa (*pilA1* y *pilA2*) están involucradas en los procesos de motilidad celular. La fimbria tipo IVb y IVa se han asociado con los procesos de agregación celular y la adherencia a las superficies bióticas y abióticas, siendo sus respectivas ATPasas importantes para la extensión de dichas fimbrias.

Sin embargo, estos estudios no se han extendido a *S. maltophilia* de origen ambiental o la información es muy escasa, de igual manera para los estudios sobre epidemiología en México y caracterización, ya que dependiendo del origen de aislamiento (hospitalario o ambiental) varían diversos aspectos de su metabolismo, siendo de gran importancia los asociados a su virulencia y a su potencial para uso en biorremediación.

El estudio de fimbrias involucradas en la adherencia (IVa, IVb y I) ya se ha hecho en aislados clínicos, sin embargo, para aislados ambientales no. Tomando en cuenta que al estar en un entorno competitivo y que algunas características de su metabolismo varían incluso entre cepas con el mismo origen de aislamiento.

Las cepas de origen ambiental son usadas para biorremediación de suelos y agua, llegando a almacenar los contaminantes dentro de la célula, debido a que es tolerante a diversos metales pesados y contaminantes como hidrocarburos. Mientras que en la agricultura se puede usar como control biológico. Al tener estas aplicaciones se necesita del análisis de cepas para saber si implican un riesgo de infección para la población si son usadas para técnicas de biorremediación.

Justificación

Este estudio nos permitirá conocer la presencia de factores de virulencia asociados a *Stenotrophomonas maltophilia*, en específico aquellos involucrados en la adherencia como lo son las fimbrias con su respectiva ATPasa; tipo IVA (*pilA1* y *pilA2 /pilB*), tipo IVb (*Flp/TadA*) y tipo I (*Smf/PapC*). Debido a que estas fimbrias se relacionan con su rol en el ámbito hospitalario y los procesos infecciosos, se quiere conocer si estos también son de importancia relevante en aislados ambientales ya que logran adaptarse y sobrevivir en una microflora mega diversa. Al presentar resistencias a antibióticos en su genoma central y considerando que, por su origen de aislamiento, el contacto con antibióticos no es frecuente como en un hospital, es importante conocer la resistencia a antibióticos que presentan con respecto a cepas de origen nosocomial. El uso de esta bacteria en biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos se ha popularizado y se han identificado cepas

que degradan contaminantes específicos por lo que es necesario evaluar la resistencia a estos. Dado que existe controversia sobre el origen de las cepas ambientales y las hospitalarias, el conocer la presencia de ciertos genes relacionados con algunos factores de patogenicidad nos dará una idea sobre la conexión que pudiera existir entre las cepas ambientales y las cepas hospitalarias, la ausencia de genes relacionados con la virulencia en las cepas ambientales nos daría confianza en cuanto a su uso en biorremediación.

Hipótesis

La presencia a nivel genético de factores de virulencia (fimbrias tipo IVA, IVB y I) en *Stenotrophomonas maltophilia* está relacionado con la resistencia a antibióticos y metales pesados

Objetivo General

Identificar la presencia de genes que codifican a las fimbrias tipo IVA, IVB y I en *Stenotrophomonas maltophilia* de origen ambiental y su relación con la resistencia a antibióticos y metales pesados.

Objetivos específicos

- Obtener muestras de cuerpos de agua para aislar cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*
- Identificar y caracterizar cepas de origen ambiental mediante pruebas fenotípicas y moleculares
- Identificar la secuencia de los genes que codifican a las fimbrias tipo IVA, IVB y I en el genoma de *S. maltophilia* de origen clínico
- Obtener resultados para determinar la resistencia a antibióticos para Gram negativos (amikacina, ampicilina, cefepime, cefalotona, cefotaxima, ceftriaxona, cloranfenicol, gentamicina, netilmicina, nitrofurantoina, levofloxacino y trimetopim sulfametazol)
- Ejecutar pruebas de resistencia a metales pesados.

- Diseño estadístico para comprobar la relación de resultados

Diseño de la metodología

a) Tipo de estudio

El estudio se clasifica en tipo exploratorio cuantitativo ya que la información obtenida sobre el tema es limitada, pero ayudara para antecedentes de investigaciones futuras, siguiendo una continuidad de estudios anteriores. Al ser un estudio fundamental orientado tiene una vinculación con la práctica indirecta y por lo tanto los resultados no tienen una aplicación inmediata sin embargo conducen hacia otras que la tienen.

b) Universo del estudio

Aislados de *Stenotrophomonas maltophilia* provenientes de cuerpos de agua (ríos, lagos, lagunas, etc)

c) Tamaño de la muestra: Por lo menos 10 cepas ambientales aisladas del Río Atoyac, de la Laguna de CU, la Laguna de Chapulco y de San Martín Texmelucan.

d) Sede y lugar del estudio

Laboratorio de Micoplasmas en el Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, y Centro de Detección Biomolecular.

e) Criterios de selección (criterios de inclusión y criterios de exclusión)

Cepas de origen ambiental

f) Recursos humanos

Tesista: Lorena Belen Sánchez Mendizábal

Director: María Lilia Cedillo Ramírez

Codirector: Jorge Alberto Girón Ortiz

g) Recursos financieros

h) Diseño estadístico

Al no contar con una gran cantidad de datos se realizó una prueba de χ^2 para determinar si hay asociación entre la presencia de genes que codifican a las fimbrias tipo IVA, IVB, I con la resistencia a antibióticos y metales pesados.

Uso del software Minitap.

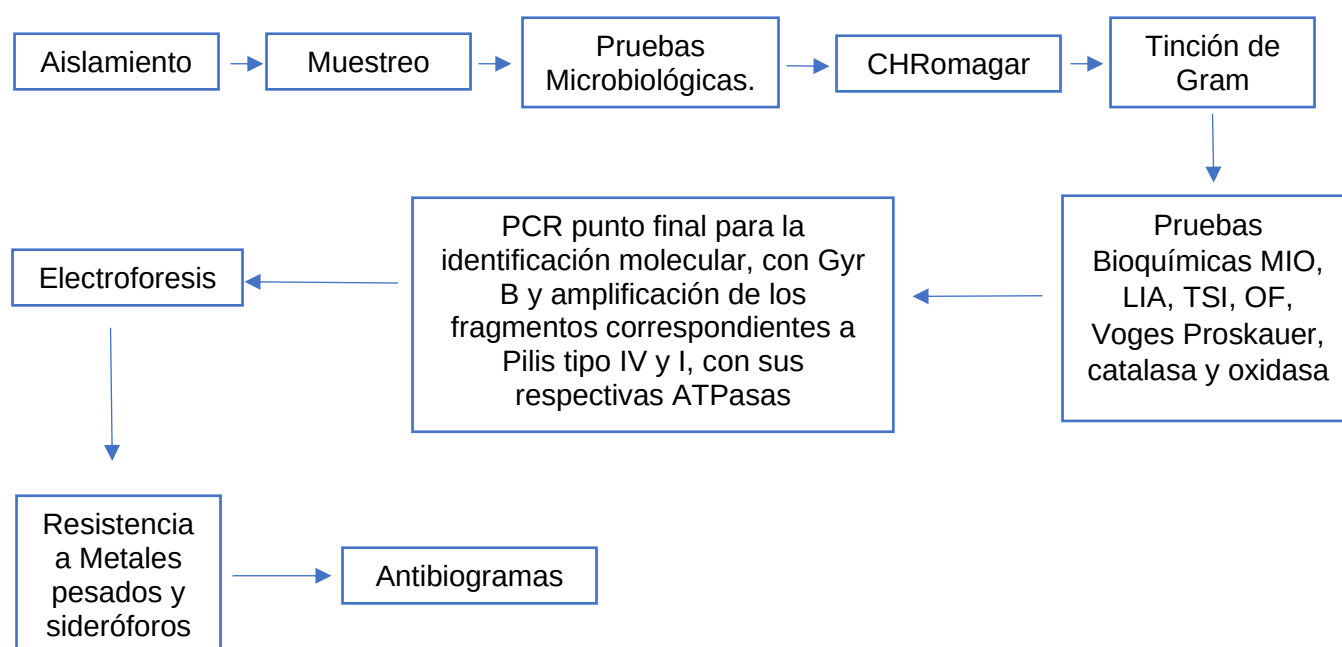


Figura 2. Se muestra la metodología general que se aplicó en las cepas de origen ambiental de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Materiales y métodos

El aislamiento se dividió en dos fases, la primera fue enfocada a métodos fenotípicos y la segunda a métodos moleculares. La identificación fenotípica bacteriana se basa en las características “observables” de las bacterias, como su

morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas. Con base a esto se utilizaron cepas caracterizadas de *S. maltophilia* para realizar pruebas en CHROMAGAR, tinción de Gram, bioquímicas (MIO, LIA, OF, catalasa y oxidasa) y resistencia a antibióticos, para observar el comportamiento de *S. maltophilia* y usarlas como control, en la figura 2 se muestra la metodología general.

Al ser muestras simples y puntuales, se usó el muestreo superficial que permitió sumergir hasta 25 cm de profundidad frascos de vidrio, previamente esterilizados (Ramos Gomez, 2008). Se concreto la recolección de muestras de agua en 4 cuerpos de agua. El primero fue realizado en el río Atoyac específicamente en el ecoparque metropolitano de Puebla (Figura 3 A), se distribuyó la toma de muestras en 5 puntos diferentes del río. El segundo muestreo se realizó en el río Atoyac, pero en la localidad de San Martin Texmelucan (Figura 3 B), donde se recolectaron 3 muestras, el tercero en la laguna de Chapulco (Figura 3 C), de igual forma aquí se obtuvieron 5 muestras, el ultimo muestreo se realizó en la laguna CU ubicada en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, campus CU (Figura 3 D).



Figura 3. Lugares de muestreo para el aislamiento de *Stenotrophomonas maltophilia*, de izquierda a derecha parque metropolitano de Puebla (A), río Atoyac en la localidad de San Martin Texmelucan (B), laguna de Chapulco (C) y laguna de CU (D).

Pruebas microbiológicas

Condiciones de crecimiento

Las bacterias patógenas por lo regular crecen en condiciones estándar a 37 °C en medios ricos, sin embargo, algunos de los aislados ambientales tienen un mejor crecimiento a temperaturas más bajas en un rango de 20 a 30 °C. Tomando en cuenta que *S. maltophilia* es sensible a las cantidades de sal que toleran la gran mayoría de las bacterias comunes de laboratorio, y tiene un amplio rango de tolerancia de pH, se usaran medios ricos como BHI, cerebro corazón. En condiciones ideales el tiempo de duplicación durante la fase logarítmica va de 20 a 40 min, en cultivos nocturnos alcanzan densidades $> 10^9$ UFC / ml, pero algunos cultivos presentan muerte significativa entre las 20 y 24 horas después de la inoculación.

Aislamiento de Cepas

Se prepararon los medios MacConkey y manitol con rojo de fenol, ambos adicionados con 5 mg/l de vancomicina, 32 mg/l de imipenem y 4 mg/l de anfotericina B. Las muestras recolectadas en cada muestreo se mezclaron de manera homogénea para tomar 50 µl y colocarlos en las placas de manitol, mientras que para MacConkey 20 µl, posteriormente se hizo estría continua.

Para medio MacConkey se usó el del laboratorio Becton Dickinson, a continuación, se describe su formulación para 1 litro de agua purificada a pH $7,1 \pm 0,2$. De igual manera para el medio manitol con rojo de fenol. (Tabla 4).

Agar MacConkey		Manitol con rojo de fenol	
Digerido pancreático de gelatina	17,0 g	Proteosa peptona n.º 3	10 g
Digerido pancreático de caseína	1,5	Extracto de carne	1 g
Digerido péptico de tejido animal	1,5	D-manitol	10 g
Lactosa	10,0	Cloruro sódico	5 g
Sales biliares	1,5	Agar	15 g

Cloruro sódico	5,0	Rojo de fenol	25 mg
Rojo neutro	0,03		
Cristal violeta	0,001		

Tabla 4. Formulación del agar MacConkey y Manitol con rojo de fenol, para 1 litro de agua purificada

Morfología

Dependiendo del medio usado las características correspondientes a la morfología van variando: a continuación, se muestran las características en medios BHI (tabla 5), MacConkey (tabla 6), VIA (Vancomicina, Imipenem y Anfotericina) (tabla 6).

<i>S. maltophilia</i> en agar BHI (Figura 4A)	
Forma	Circular pequeña
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Color	Crema

Características Ópticas	
Luz transmitida	Traslúcida
Luz reflejada	Brillante

Tabla 5. Descripción de las colonias de *S. maltophilia* en medio BHI

<i>S. maltophilia</i> en medio MacConkey (Figura 5B)	
Forma	Circular pequeña
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Color	Blanco/amarillo

Características Ópticas	
Luz transmitida	Traslúcida
Luz reflejada	Brillante

Tabla 6. Descripción de las colonias de *S. maltophilia* en medio MacConkey.

<i>S. maltophilia</i> en agar VIA (Figura 6C)	
--	--

Forma	Circular pequeña
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Color	Blanco
Características Ópticas	
Luz transmitida	Opaco
Luz reflejada	Brillante

Tabla 7. Descripción de las colonias de *S. maltophilia* en medio VIA

CHROMagar

Las cepas, se sembraron en BBL CHROMagar tomando la colonia con un asa de punta y depositándola en forma de punto sobre el agar. Es un medio orientador creado para una identificación fácil y rápida de algunos patógenos. Puede identificar microorganismos Gram negativos y algunos Gram positivos de acuerdo con la coloración producida en las colonias por reacciones enzimáticas específicas de género o especie con un sustrato cromogénico patentado.

En otros artículos se reportó que *S. maltophilia* presenta colonias indiferenciadas de blancas a claras (Merlino , y otros, 1996) Sin embargo, en las pruebas realizadas las cepas caracterizadas presentaron una coloración, azul/verde 48 hrs después de la siembra. Con esta información, de todas las muestras se seleccionarán aquellas con la coloración azul/verde.

Tinción de Gram

La técnica se realizó con el kit de tinciones HYZEL® que incluye Safranina, Yodo Gram, Violeta de Genciana y Alcohol - cetona. Se uso el siguiente protocolo (Wiley & Sons Inc., 2005)

- Se realizó la esterilización del asa bacteriológica hasta que esté al rojo vivo y se enfrió por 30 s
- En un portaobjetos, se colocó una gota de agua estéril para diluir la colonia tomada con el asa.

- Se fijo por calor la muestra haciendo pases sobre la llama del mechero.
- Se cubrió el frotis con una solución de cristal violeta por 30 s. Posteriormente se lavó suavemente con agua corriendo durante 5 segundos y se retiró el exceso de agua.
- Se cubrió el frotis con solución de yodo durante 1 minuto.
- Para decolorar se usó el alcohol cetona, inclinando ligeramente el portaobjetos y dejando caer lentamente la solución hasta cubrir toda la mancha morada. Se lavó con agua durante 5 s y se retiró el exceso de agua.
- Para la contratinción se colocó una gota de safranina sobre el portaobjetos durante 30 segundos. Se lavó con agua durante 5 s y se retiró el exceso de agua.
- Para finalizar las muestras se dejaron secar para realizar la observación al microscopio, colocando una gota de aceite de inmersión con el objetivo de 100X.

Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se realizaron fueron MIO, LIA, TSI, OF y Voges Proskauer a partir de medios formulados y se prepararon siguiendo las indicaciones del proveedor.

Los cultivos usados para la inoculación se realizaron en medio VIA con estría por agotamiento y se incubaron a 37°C por 24 horas. Para la interpretación de los resultados y metodología en general se consultó los protocolos de (MacFaddin , 2003) . La inoculación se realizó con un asa de punta tomando la misma colonia por cepa para cada prueba.

Después de la inoculación los tubos se incubaron a 37°C por 48 horas, cada ensayo se realizó por triplicado.

- Oxidasa

Se usaron tiras impregnadas de reactivo de Kovacs (disolución acuosa de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%). En las tiras se colocó con un asa de punta una colonia y se mantenían un minuto para observar si cambiaba de color o no.

- Catalasa

Se realizó a temperatura ambiente sobre un portaobjetos, donde se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 30%, con un asa de siembra se tomó una colonia y se puso en contacto con el peróxido.

Resistencia a metales pesados y prueba de producción de sideróforos

El ensayo se realizó con la técnica de difusión en agar (disco-placa), con cambios en la preparación del medio. Para las pruebas de resistencia a metales pesados se usó como agar base Mueller-Hinton pero con diferentes concentraciones de cada metal; $(\text{COO})_2\text{PB}$ a 9, 6 y 3 ppm, para AgNO_3 se prepararon a 20, 30 y 40 μg , mientras que para HgCl_2 fue a 60, 90 y 120 μg (Pages, y otros, 2008).

El medio usado para observar la producción de sideróforos fue agar Mueller-Hinton, agregando 50 mg/l de 2,2 bipyridilo. Las pruebas se realizaron conforme al siguiente protocolo.

- El agar se vertió en cajas Petri estériles de 90 mm de diámetro.
- Los cultivos para los inóculos se realizaron en un tubo estéril que contenía 5 ml de caldo BHI, estos se dejaron incubando por 16 horas.
- Con el nanofotómetro NanoPhotometer® P-Class P. se realizó la cuantificación de las células por mililitro para ajustar los inóculos a 1.5×10^8 UFC/ml con caldo BHI.
- Después un hisopo se sumergió en el tubo y se retiró el exceso de caldo, para inocular la superficie del agar por completo.
- Los cultivos se dejaron invertidos en incubación a 37°C por 18 horas.

Antibiogramas

Los antibiogramas se realizaron con la técnica de difusión en agar (disco-placa), de acuerdo con el método de Kirby-Bauer (Hudzicki, 2009)

- El medio usado fue Mueller-Hinton en cajas Petri estériles de 90 mm de diámetro.
- Para la preparación del inóculo se tomaron de 2 a 3 colonias con asa microbiológica y se depositaron en un tubo con caldo BHI, hasta que la turbidez indicara 0.5 en la escala de MacFarlan.
- Antes de que transcurrieran 15 minutos del ajuste del inóculo se tomó un hisopo de algodón estéril y se sumergió en la suspensión, se limpió contra las paredes, de modo que se quitara el exceso.
- Las placas se inocularon cubriendo completamente la superficie del agar, de manera que se deslizo el hisopo tres veces rotando 60° la caja, en cada pase y pasando por la periferia para una siembra uniforme.
- Los discos se depositaron con pinzas estériles y se presionaron ligeramente sobre la superficie del agar.
- Las cajas se dejaron invertidas, incubadas a 37° C de 16 a 18 horas.

Pruebas moleculares

Extracción de ADN genómico.

Se realizaron precultivos en 6 ml de caldo LB, donde se inoculó una colonia de cada cepa y se dejó incubando en agitación a 37°C por 24 horas.

- En tubos estériles de 1.5 ml se depositó el precultivo y se centrifugó a 12000 rpm/min a temperatura ambiente, posteriormente se retiró el sobrenadante cuidando no tirar el pellet. Esto se repitió hasta que se terminó con todo el caldo contenido en el tubo de precultivo.
- Posteriormente se resuspendió en 570 µl de buffer set y se agregó 30 µl de SDS al 20 %, esta mezcla se vortexeo por 20 s.
- El tubo se incubó a 80°C por 5 min para después enfriarlo a temperatura ambiente.
- Se adicionaron 2 µl de RNAsa (10mg/µl), dejando actuar a la enzima por 45 min a 37 °C.

- Después de enfriar el tubo a temperatura ambiente se agregó 200µl de NaCl (5 M) y se mezcló en vortex por 20 s.
- Se incubó en hielo por 5 min y después se centrifugo por 5 min a 12000 rpm a temperatura ambiente.
- El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y a este se le agrego 800 µl de isopropanol, mezclándolo por 1 min.
- El tubo se centrifugo por 5 min a 12000 rpm y se tiró el sobrenadante.
- Los lavados de se realizaron con etanol frio al 70 % agregando 700 µl y centrifugando por 5 min. Este paso se realizó 3 veces.
- Se esperó a que el etanol se evaporara para finalmente resuspender el DNA en 60 µl con agua libre de nucleasas.

Cuantificación.

La cuantificación se realizó en un Nanofotómetro NanoPhotometer® P-Class modelo P300, con un método de absorbancia, los ácidos nucleicos absorben a 260 nm, las proteínas a 280 nm y los disolventes a 230 nm, por lo que para determinar el rendimiento y la pureza se mide la proporción $A_{260}/A_{280} = 1.8$ a 2 (ácidos nucleicos/proteínas) y $A_{260}/A_{230} = >2$ (ácido nucleico / agentes caotrópicos o compuestos orgánicos). Previamente se tomó la celda y se colocó en el nanofotómetro. Se toma 0.1 µl de cada extracción y se coloca en la celda, posteriormente se colocó el factor de dilución 50 o 10 para realizar la cuantificación, dependiendo de la concentración obtenida.

Reacción en cadena de la polimerasa punto final.

Los oligonucleótidos ya se encontraban diseñados, al igual que la estandarización del método (tabla 9) para las condiciones de PCR, de acuerdo con el trabajo previo de (Valencia Ramírez, 2018), en la tabla 10 se presentan la secuencia de los oligonucleótidos, el gen que amplifica y el *locus* donde se localiza. La predicción de los genes y su posición se realizó mediante ensayos bioinformáticos con el método de predicción genética homología de proteínas. Para la amplificación e identificación de los genes *pilA1/pilB*, *pilA2/pilB* para la fimbria tipo IVa, *flp/tadA* para la fimbria

tipo IVb y *smf/papC* para la fimbria tipo 1. Se realizó de acuerdo con el protocolo de Thermo Scientific™ DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) en la tabla 9 se presentan las cantidades usadas para la reacción. Mientras que la amplificación se llevó a cabo variando el uso de los termocicladores Applied Biosystems 4375786 Veriti y Multigene Optimax Labnet, ambos con gradiente térmico y un bloque para 96 tubos de reacción.

Reactivos usados en la reacción de PCR	Cantidad por tubo
Oligo Fw	0.7 µl
Oligo Rv	0.7 µl
Agua	5.6 µl
Master Mix (taq pol, dNTPs, Mg, buffer)	7.5 µl
DNA	0.5 µl
Total	15 µl

Se preparan los reactivos de acuerdo con el número de muestras, control positivo, control negativo y un tubo extra por error de pipeteo.

Tabla 8. Reactivos y cantidades usadas para la reacción en cadena de la polimerasa de acuerdo con protocolo de Thermo Scientific™ DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X).

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95	2 minuto	30 ciclos
Alineamiento	58	1 minuto	30 ciclos
Extensión	72	1 minuto	30 ciclos
Enfriamiento	72	10 minuto	1 ciclo

Tabla 9. Se muestran las condiciones de reacción estandarizadas para la amplificación por medio de PCR punto final de los genes que codifican las fimbrias tipo IV y tipo I de *S. maltophilia* usando DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X).

Nombre y función	Región del genoma	Locus	Oligonucleotido	Tamaño (pb)	Secuencia 5´ - 3´	Tamaño del amplificado (pb)
PILI TIPO IVa						
Proteína fimbrial (Pilina) <i>PilA1</i>	4952323 -	DP16_462 1	pilA1 (forward)	20 pb	cccagttcgagatggagaag	408 pb
	4952730		pilA1 (reverse)	21 pb	ccgtagcggcatttacagt ag	
Proteína fimbrial (Pilina) <i>PilA2</i>	4952323 -	DP16_462 1	pilA2 (forward)	19 pb	atcggtgggcgcccagaacg	438 pb
	4952730		pilA2 (reverse)	21 pb	atagcgcgcttcgaacgcgc	
ATPasa pilB	4952954 -	DP16_462 2	pilB (forward)	18 pb	atgccgctgttcgacgtg	1734 pb
	4954687		pilB (reverse)	18 pb	caggatcggctcgaccac	
PILI TIPO IVb						
Proteína fimbrial (pilina) <i>pilA2 (flp)</i>	2920868 -	DP16_277 0	flp (forward)	22 pb	cgcaagttcctgaaggaa gaag	201 pb
	2921068		flp (reverse)	21 pb	cggagagggttcttgaacagcg	
ATPasa TadA	2925880 -	DP16_277 5	tadA (forward)	18 pb	agcatcgaggacgagcg c	1350 pb
	2927229		tadA (reverse)	18 pb	attgatcaggatgtcctc	
PILI TIPO I SMF-1						
Proteína fimbrial (Pilina) <i>smf</i>	648120 - 648659	DP16_603	smf-1 (forward)	18 pb	aacctcattgccgctctg	540 pb
			smf-1 (reverse)	18 pb	atgccgacggtgaccac	
ATPasa papC	649662 - 652130	DP16_605 DP16_606	papC (forward)	18 pb	ttcgtcggctacagcttc	2469 pb
			papC (reverse)	18 pb	ataggtggcgatgctctg	

Tabla 10. Se muestra la información correspondiente a los genes que codifican las fimbrias tipo IV y tipo I de *S. maltophilia* que se localizaron mediante homología de proteínas. Así como el tamaño y secuencia de los oligonucleótidos (Valencia Ramírez, 2018)

Electroforesis

Para la identificación de los fragmentos de DNA se utilizó la electroforesis en geles de agarosa ya que separo e indicó el tamaño (peso molecular) de los productos amplificados por PCR.

- La fase sólida integrada por el gel de agarosa se preparó al 1% con TAE 1X (tris, ácido acético, EDTA) y agarosa multiuso.
- Los productos de PCR fueron cargados en geles de agarosa, sumergidos en Buffer TAE 1X (tris, ácido acético, EDTA), dejándolos correr a un voltaje de 100V.
- Después de la electroforesis se tiñeron los geles con bromuro de etidio (BrEt), para poder visualizarlos en luz ultravioleta con un fotodocumentador.

Resultados

Aislamiento

Se realizaron 5 estudios de los cuales se obtuvieron 5 muestras de diferentes puntos en cada cuerpo de agua. Después del crecimiento y de acuerdo con los criterios de selección morfológica (figura 4) se obtuvieron un total de 60 posibles cepas *S. maltophilia*. Estas se sembraron en CHROMagar, de las cuales, 45 fueron positivas al color azul/verde.

Al finalizar las pruebas moleculares y morfológicas el total de aislados fue de 12 cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*, de las cuales 7 son provenientes del río Atoyac y 5 de la laguna de CU en la Benemérita Universidad autónoma de Puebla. Como control se usaron 5 aislados clínicos proporcionados por el Hospital General del norte.

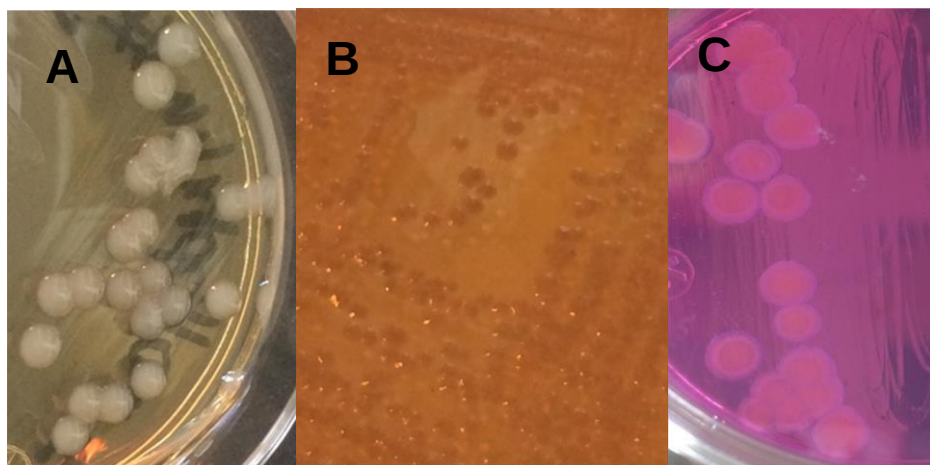


Figura 4. Se muestra la morfología de las colonias de *S. maltophilia* en diferentes medios de cultivo, BHI (A), MacConkey (B) y VIA (C).

CHROMagar

Las 5 cepas usadas como control presentaron una coloración, azul/verde, 48 hrs después de la siembra (Figura 5). Con esta información, de las 60 muestras solo se seleccionaron aquellas con la coloración azul/verde.

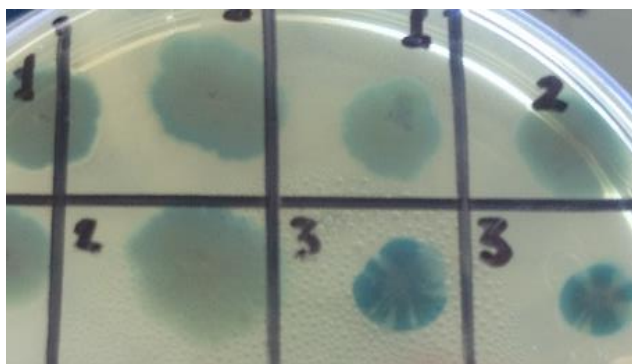


Figura 5. *S. maltophilia* en CHROMAGAR incubada 48 hrs a 37 °C, presentando una coloración verde/azul

Tinción de Gram

Las cepas posibles a ser *S. maltophilia* se sometieron a pruebas de Gram, obteniendo como resultado positivo lo que se muestra en la figura 6, bacilos Gram negativos. Teniendo un total de 30 muestras.

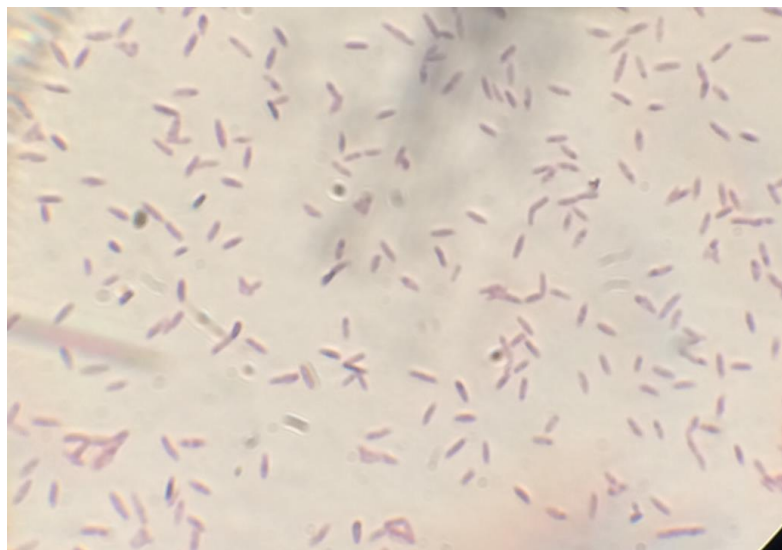


Figura 6. Tinción de Gram de *Stenotrophomonas maltophilia* (S1) vista a 100x en microscopio óptico, obteniendo como resultado bacilos Gram negativos.

Pruebas Bioquímicas

En las pruebas bioquímicas se seleccionaron aquellas que presentaban un metabolismo comparable con *S. maltophilia*, de manera que se indican los resultados de las muestras que se caracterizaron a nivel molecular en la tabla 11.

Muestra	MIO			LIA	OF		
	Movilidad	Indol	Ornitina	Descarboxilación de la lisina	Con oxígeno	Sin oxígeno	Oxidasa / catalasa
S1	+	-	-	+	+	-	+/+
S5	+	-	-	+	+	-	-/+
S6	+	-	-	+	+	-	-/+
S7	+	-	-	+	+	-	+/+
S8	+	-	-	+	+	-	+/+
S9	+	-	-	+	+	-	+/+
S10	+	-	-	+	+	-	-/+

S11	+	-	-	+	+	-	+/+
S12	+	-	-	+	+	-	-/+
S13	+	-	-	+	+	-	+/+
S14	+	-	-	+	+	-	-/+
S15	+	-	-	+	+	-	+/+

Tabla 11. Resultados de las pruebas bioquímicas MIO, LIA y OF para las muestras de origen ambiental de *S. maltophilia*.

Movilidad, indol y ornitina (MIO)

Los resultados de las pruebas se muestran en la tabla 11 y en la figura 7 se describe los resultados de coloración del medio morado, debido a que *S. maltophilia* es un organismo no fermentador de la glucosa, por lo que el medio permaneció alcalino. También se detectó la presencia de movimiento en el medio semisólido.

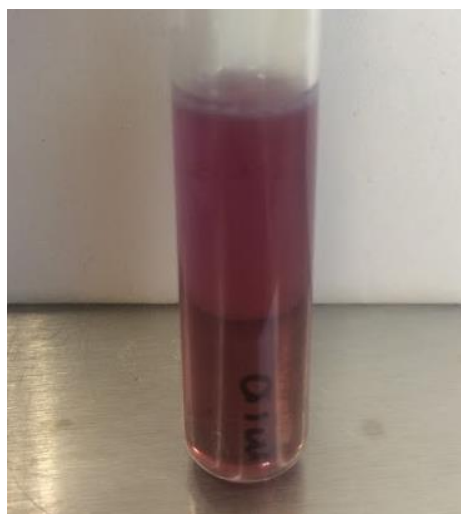


Figura 7. Resultado de la prueba bioquímica MIO para la muestra S1, indicando que hay movilidad, con un pH en el medio alcalino.

Lisina y hierro (LIA)

Esta prueba se emplea principalmente para la diferenciación de bacilos entéricos. En la figura se observó el viraje del indicador a color morado, demostrando la actividad de la lisina descarboxilasa (figura 9).

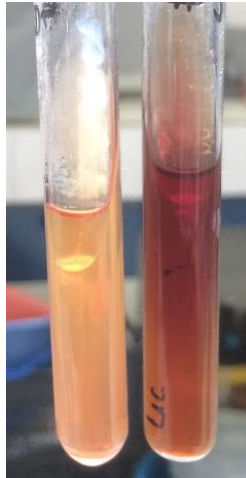


Figura 8. El primero tubo de izquierda a derecha es el control negativo mientras que el segundo tubo corresponde la muestra S5, indicando un viraje en el color del medio.

Oxidación y fermentación (OF)

Esta prueba permitió diferenciar si el organismo tenía un metabolismo oxidativo o fermentador de manera que cada muestra se sometió a dos condiciones diferentes, una con oxígeno y otra sin este. Con el indicador de color se observó si había una producción de ácidos (viraje a color amarillo, con presencia de oxígeno o sin oxígeno), para el resultado de las muestras analizadas este solo viro a color azul, para ambas (Figura 8) condiciones evidenciando que es un organismo no fermentador.

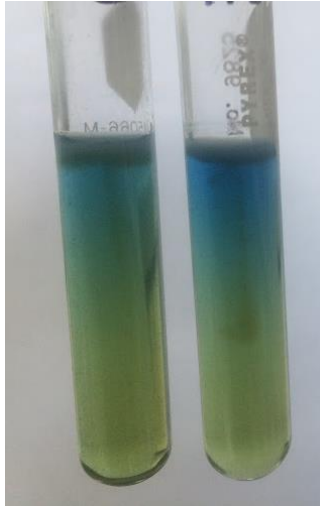


Figura 9. Resultado de la prueba Bioquímica de la muestra S1 indicando un metabolismo no fermentativo.

Oxidasa y catalasa

Todas las muestras que se identificaron como *S. maltophilia*, fueron catalasa positiva y oxidasa variable. Para los resultados de la prueba de oxidasa, 5 fueron negativas y 7 positivas.

Identificación Molecular

En la identificación molecular las cepas positivas fueron aquellas que amplificaron una parte del gen GYR B, comprobando mediante la técnica de electroforesis un fragmento de 150 pb. Para finalizar con la identificación, las cepas nombradas S1, S10, S11, S12, S13, S14 y S15 (Figura 11) se encontraron en el río Atoyac, específicamente en la zona del ecoparque metropolitano de Puebla. Mientras que las cepas S5, S6, S7, S8, y S9 (Figura 10) se encontraron en la laguna CU ubicada en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, campus CU.

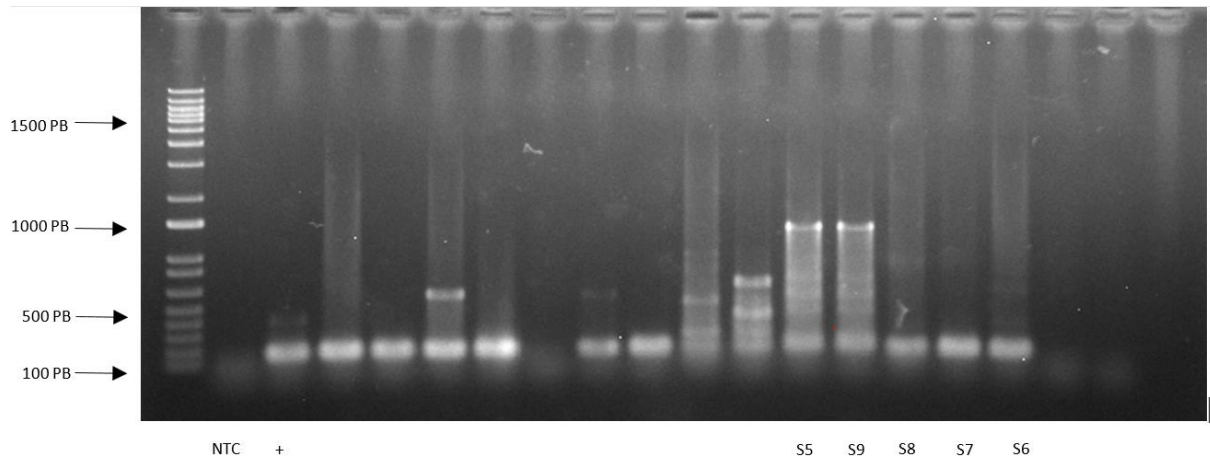


Figura 10. Resultados de la amplificación de un fragmento de GYR B con 150 pb para la identificación molecular de *Stenotrophomonas maltophilia*, de las muestras S5, S6, S7, S8 y S9.

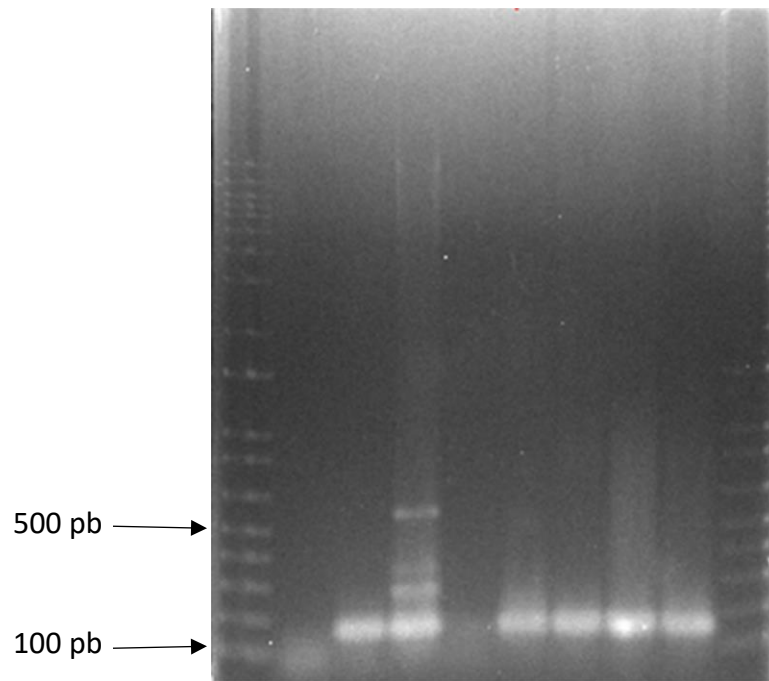


Figura 11. Resultados para la amplificación de un fragmento de GYR B con 150 pb para la identificación molecular de *Stenotrophomonas maltophilia* de las muestras S1, S10, S12, S13, S14 y S15 de izquierda a derecha.

Detección de pilis.

Este estudio nos permitió conocer la presencia de factores de virulencia asociados a *Stenotrophomonas maltophilia*, en específico aquellos involucrados en la adherencia como lo son las fimbrias con su respectiva ATPasa; tipo IVA (pilA1 y pilA2 /pilB), tipo IVb (Flp/TadA) y tipo I (Smf/PapC).

Para un total de 12 muestras confirmadas de *S. maltophilia*, 10 muestras (83.3%) presentaron el pili tipo IVB con su respectiva ATPasa (TadA) mientras que pilA1 solo se encontró en 4 muestras (41.6%), pilA2 lo presentaron 10 muestras (75%) y PilB que es la ATPasa solo estuvo presente en 8 muestras (58.3%). Los resultados para el pili tipo I fueron 9 positivos (66.6%) al igual que para la ATPasa papC. Todos los resultados se muestran en la tabla 12.

Muestra	pilA1	pilA2	pilB	flp	tadA	SMF	papC
S1	-	+	+	+	+	+	+
S10	-	+	+	+	+	+	+
S11	+	+	+	+	+	+	+
S12	-	+	+	-	-	+	-
S13	-	+	+	+	+	+	+
S14	-	+	+	+	-	+	+
S15	-	+	+	+	+	+	+
S5	+	-	-	+	+	-	+
S6	+	+	-	+	+	-	-
S7	+	+	-	+	+	-	-
S8	-	-	-	-	+	+	+
S9	+	-	-	+	+	-	+
Presente	41.67%	75%	58.33%	83.33%	83.33%	66.67%	75%
No presente	58.33%	25%	41.67%	16.67%	16.67%	33.33%	25%

Tabla 12. Resultados de la amplificación de las fimbrias tipo IVA, IVB y I, con sus correspondientes ATPasas.

Antibiogramas

De acuerdo con las indicaciones del fabricante para los discos impregnados con antibiótico, el criterio que se tomó en cuenta para saber la clasificación de las muestras en resistente, sensible o intermedio; fue la medida del halo de inhibición, como se indica en la tabla 13.

La clasificación se puede interpretar desde un punto de vista médico como;

Resistente: No se puede inhibir por las concentraciones habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos del antibiótico que se aplica como tratamiento.

Intermedio: Se puede esperar eficacia clínica en aquellas localizaciones donde se alcanzan altas concentraciones de antibióticos o cuando se emplea una dosis más elevada de lo habitual.

Sensibles: Las infecciones causadas por la cepa, pueden tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales de antibiótico.

Se evaluaron 12 antibióticos diferentes en las 12 muestras, de las cuales fueron resistentes a cefalotina y nitrofurantoína, mientras que, para ampicilina, carbencilina, cefatoxima, 11 muestras (91.7 %) mostraron resistencia. 7 muestras (58.3 %) fueron resistentes a gentamicina, netilmicina y norfloxacin. El antibiótico al cual la mayoría de las muestras fue sensible (8 cepas) es el Sulfametoxazol con Trimetopim.

Antibiótico	Concentración	Diámetro de halo (mm)			Cepa											
		Resistente Igual o menor	Intermedio entre	Sensible Igual o mayor	S1	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
Amikacina (AK)	30 mcg	14	15-16	17	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	S
Ampicilina (AM)	10 mcg				R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
Carbenicilina (CB)	100 mcg				R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
Cefalotina (CF)	30 mcg	14	15-17	18	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefotaxima (CFX)	30 mcg				R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
Ciprofloxacina (CPF)	5 mcg	15	16-20	21	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S
Cloranfenicol (CL)	30 mcg	12	13-17	18	S	I	I	S	R	R	I	R	S	S	S	R
Nitrofurantoina (NF)	300 mcg	14	15-16	17	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicina (GE)	10 mcg	12	13-14	15	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R
Netilmicina (NET)	30 mcg	12	13-14	15	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
Norfloxacina (NOF)	10 mcg	12	13-16	17	R	S	R	R	I	S	R	R	R	S	S	R
Sulfametoxazol Trimetopim (SXT)	25 mcg	10	11-15	16	S	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S

Tabla 13. Resultados de la prueba de antibiogramas para las muestras de *Stenotrophomonas maltophilia*, donde se clasifican en resistente, intermedio y sensible.

	Sensible (porcentaje %)	Intermedio (porcentaje %)	Resistente (porcentaje %)
Amikacina (AK)	41.7	0.0	58.3
Ampicilina (AM)	8.3	0.0	91.7
Carbenicilina (CB)	8.3	0.0	91.7
Cefalotina (CF)	0.0	0.0	100.0
Cefotaxima (CFX)	8.3	0.0	91.7
Ciprofloxacina (CPF)	50.0	0.0	50.0
Cloranfenicol (CL)	41.7	25.0	33.3
Nitrofurantoína (NF)	0.0	0.0	100.0
Gentamicina (GE)	41.7	0.0	58.3
Netilmicina (NET)	41.7	0.0	58.3
Norfloxacina (NOF)	33.3	8.3	58.3
Sulfametoxazol Trimetropim (SXT)	66.7	0.0	33.3

Tabla 14. Resultados de los antibiogramas, para las 12 muestras de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Producción de sideróforos

En las pruebas de sideróforos las únicas muestras que los produjeron fueron S5, S8 y S9, todas estas provenientes de la laguna de CU.

Resistencia a metales pesados

Este ensayo se realizó con tres concentraciones diferentes (tabla 15) de cada metal pesado (AgNO_3 , HgCl_2 y $(\text{COO})_2\text{PB}$). Se esperaba que en las concentraciones menores las cepas crecieran de manera abundante y en las concentraciones mayores, el crecimiento disminuyera, sin embargo, en todas, se presentó un crecimiento similar, a excepción de la cepa S15 que fue sensible a los 3 metales pesados ya que el crecimiento fue nulo. Con respecto al HgCl_2 todas las cepas no toleraron ni la mínima concentración. (tabla 16).

Compuesto	Concentración
AgNO_3	40 $\mu\text{g/ml}$
	30 $\mu\text{g/ml}$
	20 $\mu\text{g/ml}$
$(\text{COO})_2\text{PB}$	9 ppm
	6 ppm
	3 ppm
HgCl_2	60 $\mu\text{g/ml}$
	90 $\mu\text{g/ml}$
	120 $\mu\text{g/ml}$

Tabla 15. Concentraciones de los metales pesados AgNO_3 , H_2Cl_2 y $(\text{COO})_2\text{PB}$

	AgNO₃	(COO)₂PB	HgCl₂
S1	Resistente	Resistente	Intolerante
S5	Resistente	Resistente	Intolerante
S6	Resistente	Resistente	Intolerante
S7	Resistente	Resistente	Intolerante
S8	Resistente	Resistente	Intolerante
S9	Resistente	Resistente	Intolerante
S10	Resistente	Resistente	Intolerante
S11	Resistente	Resistente	Intolerante
S12	Resistente	Resistente	Intolerante
S13	Resistente	Resistente	Intolerante
S14	Resistente	Resistente	Intolerante
S15	Sensible	Sensible	Intolerante

Tabla 16. Resultados de las pruebas de resistencia a metales pesados para las cepas ambientales.

Estadística

De todas las pruebas de χ^2 realizadas solo se encontró asociación entre la cantidad de fimbrias y ATPasas con el lugar de aislamiento. Mientras que para las demás asociaciones no, además que el tamaño de la muestra es muy pequeño para obtener los conteos esperados y así la prueba sea confiable (Tabla 17).

Relación	Valor P	Conclusión
Lugar y cantidad de fimbrias	0.034	Existe asociación
Lugar y resistencia a antibióticos	0.190	No existe asociación
Resistencia a antibióticos y metales pesados	1.00	No existe asociación
Fimbria y Presencia en el genoma	0.119	No existe asociación

Tabla 17. Resultados de la prueba de χ^2 para los datos de este estudio.

Discusión de resultados

Independientemente del origen geográfico de los aislamientos y los métodos utilizados para obtener cepas, es evidente que *S. maltophilia* muestra un alto nivel de heterogeneidad molecular lo que puede estar relacionado con la amplia distribución ambiental. Tomando en cuenta los resultados de estudios filogenéticos, han confirmado que entre especies son genotípicamente similares un 95,7-99,6% en la secuencia del gen 16S rRNA, indicando una alta variabilidad intra-especies (Svensson-Stadler, A. Mihaylova, & Moore, 2012) .

No solamente a nivel molecular se encontraron dificultades para su identificación, también a nivel fenotipo porque no se observaron actividades estándar basadas en el metabolismo. Esta información puede explicar como en los ensayos de chromagar, se presentaron diferencias en la producción de sustrato, comparándolo con las especificaciones del fabricante (Merlino , y otros, 1996), donde mencionaba que el precipitado producido era de color blanco y resultó ser verde, incluso para la cepa control. Igualmente, en las pruebas de morfología, se podía apreciar diferencia entre las cepas de origen ambiental y de origen clínico.

Como en todos los procesos de identificación siempre se comienza con las pruebas bioquímicas para asegurarnos que el metabolismo que se describe coincida con los aislados, donde la prueba de OF fue crucial para la identificación de un bacilo no fermentador de la glucosa, con base al viraje del color en la prueba se demostró un metabolismo no fermentador en condiciones anaerobias y aerobias. Al tener discrepancias en algunos resultados de las pruebas bioquímicas también se consideró con gran relevancia el resultado de la prueba de movilidad porque era muy evidente en el medio.

Para su identificación a nivel genético nos basamos en el análisis de secuencias multilocus (MLSA) (Svensson-Stadler, A. Mihaylova, & Moore, 2012) que usa como biomarcadores filogenéticos de taxones bacterianos a genes de mantenimiento conservados para funciones metabólicas esenciales. Siguiendo este principio se usó el fragmento de Gyr B (Svensson-Stadler, A. Mihaylova, & Moore, 2012) que codifica la unidad β de ADN girasa, responsable de catalizar el superenrollamiento

negativo del ADN, ya que está presente en todas las bacterias en una sola copia y se ha utilizado para diferenciar especies y estimar las relaciones filogenéticas dentro de varios géneros, incluido *Pseudomonas*. En la fase molecular, se realizaron pruebas a todas las cepas que presentaron un metabolismo descrito como el de *S. maltophilia*, obteniendo amplificadores de Gyr B para las 12 muestras, unas provenientes del río Atoyac en la zona del ecoparque metropolitano de Puebla (A= S1, S10, S11, S12, S13, S14 y S15) y el segundo grupo de la laguna de CU BUAP (B= S5, S6, S7, S8, y S9).

Hay relación ($P=0.034$) entre la cantidad de fimbrias encontradas en el genoma con el lugar de aislamiento de manera que las cepas procedentes de la laguna hay menor cantidad de fimbrias presentes (22.61%) en comparación con las del Río Atoyac (46.42%) donde hay una incidencia mayor de amplificadores, esto se puede atribuir a que en la laguna el agua se encuentra estancada y además solo es tratada con agentes clarificadores o floculantes y no tiene contacto con los desechos contaminantes de diversos tipos, en contraste con las cepas provenientes del río Atoyac, donde el ambiente de competencia con diferentes organismos y sustancias pueden ser un detonante para que conserven estos genes.

De acuerdo con investigaciones anteriores de (de Oliveira-Garcia, Dall'Agnol, & Girón, 2002) en cepas de origen ambiental no se encuentra la fimbria *smf* porque tiene la capacidad de formar puentes entre bacterias que se adhieren a las superficies inertes o células epiteliales de manera que en ambientes intrahospitalarios es un mecanismo de colonización. Sin embargo, para este estudio se presentó mayormente en las cepas provenientes del río Atoyac. Al ser una zona donde desembocan diferentes contaminantes y además se juntan varios cauces, estas deberían tener un origen clínico. Mientras que en las aisladas de la laguna de CU solamente una (S8) tiene la presencia de *Smf* pero no su ATPasa *papC* que es importante para que lleve a cabo su función de extensión, por lo que estas últimas si son de origen ambiental.

Al realizar el análisis estadístico (χ^2) para comprobar si hay asociación entre las diferentes variables no se encontró una correlación ya que al ser una muestra

pequeña (14 cepas) no era posible obtener suficientes conteos esperados para asegurarnos que el valor de P fuera exacto.

La resistencia a metales pesados (Hg, Cd, y Ag) y antibióticos se debe a la actividad de la bomba de eflujo ya que se encarga de expulsar sustancias tóxicas desde el interior de las células hacia el medio exterior (Marchetti , Errecalde , & Mestorino , 2011) (Aeschlimann, 2003). La bomba de eflujo se caracterizó y clonó por primera vez para *S. maltophilia* en el 2000, se nombró SmeDEF y contribuye a la resistencia de β -lactamasas, tetraciclina, eritromicina, quinolonas, amino glúcidos y cloranfenicol (Zhang, Li, & Poole, 2001) (Brooke, 2012). Siguiendo el principio anterior al realizar la prueba de asociación entre los grupos de antibióticos con las fimbrias y ATPasas correspondientes. No se encontró una relación, obteniendo una $P=0.106$. Mientras que la relación de las resistencias a antibióticos con la resistencia a 40 $\mu\text{g/ml}$ de AgNO_3 , 9 ppm de $(\text{COO})_2\text{PB}$ y 60 $\mu\text{g/ml}$ HgCl_2 (Pages, y otros, 2008) no se presentó debido a que la $P=1$. Cabe mencionar que sin importar la concentración para AgNO_3 y $(\text{COO})_2\text{PB}$ las cepas se desarrollaron de manera óptima como si no tuvieran dichos metales en el medio.

Los sideróforos cumplen la función de captar el hierro y reducirlo a Fe^{2+} de manera que este biodisponible para la bacteria y lo use en su nutrición y otras funciones. En este estudio solamente las cepas de la laguna de CU (S5, S8 y S9) los produjeron. Pero se observó que había una menor sensibilidad a antibióticos (2.7%, 2% y 6.2%) y menor cantidad de fimbrias amplificadas (4.7%, 3.5% y 4.7% respectivamente).

Las diferentes resistencias a antibióticos se pueden encontrar en el cromosoma o en plásmidos, en los resultados se encontró que las 12 cepas son resistentes a nitrofurantoina y cefalotina, la primera se usa para tratar infecciones urinarias, esta incidencia se debe a que *S. maltophilia* ataca principalmente a pacientes inmunocomprometidos, como los que reciben diálisis y además prolongan su estancia en hospitales, aumentando el riesgo de contraer una infección o septicemia en catéter central. La cefalotina se usa también para infecciones urinarias, además de infecciones de huesos, articulaciones, tracto respiratorio, etc. por lo que los pacientes son sometidos a ventilación mecánica asistida, que es uno de los

principales reservorios de *S. maltophilia* en hospitales y es más fácil que se contraiga una infección. Para los tratamientos es necesario usar antibióticos y al no tener una respuesta efectiva con los de cuarta generación, se recurre a los de primera generación por eso se encontró que es sensible en su mayoría a trimetropim con sulfametoxazol, pero si el uso es prolongado, *S. maltophilia* puede adquirir la resistencia a este antibiótico también.

De todos los aislados la cepa S11 destacó ya que presenta todos los amplificadores y las 12 resistencias a los antibióticos. Para comprobar si hay una relación se deben hacer ensayos de biopelículas, además de mutantes para tener datos más precisos del papel que cumple cada sistema de secreción en el rol de colonizar e infectar mediante el proceso de adherencia y motilidad. De igual manera es necesario hacer una serie de mutantes para saber si hay interferencia en la producción de biopelícula ya que varios de los aislados presentaban la fimbria, pero no su ATPasa o viceversa. Las cepas procedentes de la laguna de CU presentan en su mayoría Flp/TadA que está involucrada en twitching motility de superficies sólidas.

S. maltophilia supone un riesgo exclusivo para pacientes inmunocomprometidos ya que los diversos factores de virulencia son expresados a 37 °C siendo la temperatura fisiológica óptima para que evolucione a ser un patógeno para el ser humano (Patil, y otros, 2021). Mientras que en nichos ecológicos el rango de temperatura va de 22 °C a 30 °C por lo que no serían un peligro biológico para ser usados en biorremediación. Sin embargo, en estudios recientes el análisis de RNA-Seq reveló que hay alteraciones a 28 y 37 °C, que pueden desempeñar un papel importante durante la infección (Patil, y otros, 2021) . Se ha descubierto la presencia de termómetros de ARN que son estructuras de ARN en las regiones 5' UTR de las transcripciones, especifican las proteínas reguladoras responsables de la expresión de los rasgos asociados a la virulencia, funcionando como switches que permiten o bloquean el inicio de la traducción de los genes a temperaturas no permisivas (Kortmann & Narberhaus , 2012). En un ensayo de motilidad realizado en este mismo estudio (Patil, y otros, 2021), las fimbrias periticas encargadas de la movilidad se desarrollaron en menor cantidad a 37°C (Regulación a la baja)

mientras que a 28 °C (Regulación al alta) se presentó una mayor producción. También hay que considerar otros factores para la expresión de estos genes que en huéspedes humanos pueden comprometer la salud de los pacientes.

Conclusiones

Debido a la alta heterogeneidad molecular no hay un estándar para aspectos metabólicos pertenecientes *Stenotrophomonas maltophilia*.

Dependiendo del cuerpo de agua de donde se aíslan las cepas estas van a tener en su genoma diferentes factores de virulencia ($P=0.034$).

No hay relación entre la presencia de fimbrias con la resistencia a antibióticos ($P=0.19$) y metales pesados ($P=1$).

La fimbria *smf* es propia de cepas con origen clínico. Por lo que su presencia en aislados ambientales indica que muchos de los desechos hospitalarios van a cuerpos de agua.

Se necesitan hacer más estudios para la cepa S11 ya que es altamente virulenta al poseer las 12 resistencias y todas las fimbrias que se identificaron en este estudio.

Realizar estudios para cepas de origen ambiental ya que todos están enfocados en las de origen clínico.

En un futuro realizar mutantes para saber con precisión la función de las fimbrias con su respectiva ATPasa; tipo IVa (*pilA1/pilB*, *pilA2/pilB*), tipo IVb (*flp/tadA*) y tipo I (*smf/papC*).

Bibliografía

- Abbott, I., Slavin, M., Turnidge, J., Thursky, K., & Worth, L. (Junio de 2014). *Stenotrophomonas maltophilia*: emerging disease patterns and challenges for treatment. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 9(4), 471-488. doi:10.1586/eri.11.24
- Abda, E., Krysciak, D., Krohn-Molt, I., Mamat, U., Schmeisser, C., Förstner, K., . . . Streit, W. (Diciembre de 2015). Phenotypic Heterogeneity Affects *Stenotrophomonas maltophilia* K279a Colony Morphotypes and β -Lactamase Expression. *Frontiers in Microbiology*, 6(1373), 1-16. doi:10.3389/fmicb.2015.01373
- Adegoke, A., Stenström, T., & Okoh, A. (Noviembre de 2017). *Stenotrophomonas maltophilia* as an Emerging Ubiquitous Pathogen: Looking Beyond Contemporary Antibiotic Therapy. *Frontiers in Microbiology*, 8(2276), 1-18. doi:https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02276
- Aeschlimann, J. (Enero de 2003). The Role of Multidrug Efflux Pumps in the Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and Other Gram-Negative Bacteria. *Pharmacother*, 23, 916-924. doi:http://dx.doi.org/10.1592/phco.23.7.916.32722
- Aguado-Santacruz, G., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. (Enero de 2012). impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(1), 9-21.
- Ahmed, E., & Holmström, S. (Mayo de 2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196-208. doi:10.1111/1751-7915.12117
- Akova, M., Bonfiglio, G., & Livermore, D. (1991). Susceptibility to beta-lactam antibiotics of mutant strains of *Xanthomonas maltophilia* with high- and low-level constitutive expression of L1 and L2 beta-lactamases. *Journal Medical Microbiology*, 35(4), 208-213. doi:https://doi.org/10.1099/00222615-35-4-208
- Alavi, P., Starcher, M., Thallinger, G., Zachow, C., Müller, H., & Berg, G. (Junio de 2014). *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. *BMC Genomics*, 15(482), 1-15. doi:10.1186/1471-2164-15-482
- Al-Hamad, A., Upton, M., & Burnie, J. (Octubre de 2009). Molecular cloning and characterization of SmrA, a novel ABC multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(4), 731-734. doi: https://doi.org/10.1093/jac/dkp271

- Avison, M., Higgins, C., Von Heldreich, C., Bennett, P., & Walsh, T. (Febrero de 2011). Plasmid Location and Molecular Heterogeneity of the L1 and L2 β -Lactamase Genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. *American Society for Microbiology*, 45(2), 413–419. doi:10.1128/AAC.45.2.413–419.2001
- Berg, G. (Julio de 2009). Interacciones planta-microbio que promueven el crecimiento y la salud de las plantas: perspectivas para el uso controlado de microorganismos en la agricultura. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11–18. doi:10.1007/s00253-009-2092-7
- Berg, G., Eberl, L., & Hartmann, A. (24 de Agosto de 2005). The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental microbiology*, 7(11), 1673 - 1685. doi:https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x
- Berg, G., Roskot, N., & Smalla, K. (Noviembre de 1999). Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of clinical microbiology*, 37(11), 3594–3600. doi:https://doi.org/10.1128/JCM.37.11.3594-3600.1999
- Brooke, J. (Enero de 2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(1), 2-41. doi:10.1128/CMR.00019-11
- Chang, Y.-W., Rettberg, L., Treuner-Lange, A., Iwasa, J., Søgaaard-Andersen, L., & Jensen, G. (Marzo de 2016). Architecture of the type IVa pilus machine. *Science*, 352(6282). doi:10.1126/science.aaf7977
- Coleman, J., & Smith, C. (Agosto de 2014). Structure and Composition of Microbes. *Reference Module in Biomedical Research*, 1-6. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05318-6
- Craig, L., Volkmann, N., Arvai, A., Pique, M., Yeager, M., Egelman, E., & Tainer, J. (septiembre de 2006). Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Molecular Cell*, 23(5), 651-662. doi:https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.07.004
- Craig, L., Forest, K., & Maier, B. (Julio de 2019). Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 429-440. doi:https://doi.org/10.1038/s41579-019-0195-4
- Crossman, L., Gould, V., Maxwell Dow, J., Vernikos, G., Okazaki, A., Sebaihia, M., . . . Arrowsmith, C. (Abril de 2008). The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biology*, 9(4), R74. doi:https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-4-r74

- De Oliveira-Garcia, D., Dall'Agnol, M., Rosales, M., Azzuz, A., Alcántara, N., Martinez, M., & Girón, J. (Julio de 2003). Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cellular Microbiology*, 5(9), 625-36.
- de Oliveira-Garcia, D., Dall'Agnol, M., & Girón, J. (2002). Characterization of Flagella Produced by Clinical Strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 918–923. doi:<https://doi.org/10.3201/eid0809.010535>
- Denton , M., & Kerr, K. G. (1998). Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *American Society for microbiology Journals*, 11(1), 57–80.
- Di Bonaventura , G., Stepanović , S., Picciani, C., Pompilio, A., & Piccolomin, R. (2007). Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Folia Microbiologica*, 52(1), 86-90. doi:10.1007/BF02932144
- Dunger, G., Guzzo, C., Andrade, M., Jones, J., & Farah, C. (Octubre de 2014). *Xanthomonas citri* subsp. *citri* type IV Pilus is required for twitching motility, biofilm development, and adherence. *Mol Plant Microbe Interact*, 27(10), 1132-1147. doi:10.1094/MPMI-06-14-0184-R.
- Ford , B., Toste Rêgo, A., Ragan, T., Pinkner, J., Dodson, K., Driscoll, P., . . . Waksman, G. (Abril de 2010). Structural homology between the C-terminal domain of the PapC usher and its plug. *ASM Journals / Journal of Bacteriology*, 192(7), 1824-1831. doi:10.1128/JB.01677-09. Epub 2010 Jan 29.
- Furushita, M., Okamoto, A., Maeda, T., Ohta, M., & Shiba, T. (Septiembre de 2005). Isolation of Multidrug-Resistant *Stenotrophomonas maltophilia* from Cultured Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) from a Marine Fish Farm. *American Society for Microbiology*, 71(9), 5598–5600. doi:10.1128/AEM.71.9.5598–5600.2005
- Global transcriptome analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* in response to growth at human body temperature . (s.f.). *Microbial Genomics* .
- Harris, N., & Rogers, D. (2001). Septicemia associated with *Stenotrophomonas maltophilia* in a West African dwarf crocodile (*Osteolaemus tetraspis* subsp. *tetraspis*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13(3), 255-258. doi:10.1177/104063870101300313
- Hobot, J. (2015). Bacterial Ultrastructure. En J. Hobot, *Molecular Medical Microbiology* (págs. 7-32). Elsevier.

- Hoefel, D., Monis , P., Andrews, S., & Grooby, W. (Abril de 2005). Profiling bacterial survival through a water treatment process and subsequent distribution system. *J Appl Microbiol*, 99(1), 175-86. doi:doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02573.x.
- Hu, R.-M., Huang, K.-J., Wu, L.-T., Hsiao, Y.-J., & Yang, T.-C. (Marzo de 2008). Induction of L1 and L2 B-Lactamases of *Stenotrophomonas maltophilia*. *American Society for Microbiology*, 52(3), 1198–1200. doi:10.1128/AAC.00682-07
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology*, 1-23.
- Huedo, P., Coves, X., Daura, X., Gibert, I., & Yero, D. (Abril de 2018). Quorum Sensing Signaling and Quenching in the Multidrug-Resistant Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers Cellular Infection Microbiology*, 8(122), 1-8. doi:https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00122
- Hugh , R., & Leifson, E. (1963). A description of the type strain of *Pseudomonas maltophilia*. *International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy*, 13(3), 133-138.
- Hutchinson, G., Parker , S., Duncan-Sking, F., Pryor, J., Hoffman, P., Hodson, M., . . . Pitt, T. (Marzo de 1996). Home-use nebulizers: a potential primary source of *Burkholderia cepacia* and other colistin-resistant, gram-negative bacteria in patients with cystic fibrosis. *Journal Clinical Microbiology*, 34(3), 584–587. doi:10.1128/jcm.34.3.584-587.1996
- Jones, R. (Agosto de 2010). Microbial Etiologies of Hospital-Acquired Bacterial Pneumonia and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, 51, S81–S87. doi:https://doi.org/10.1086/653053
- Kalidasan , V., & Kumari Neela, V. (2020). Twitching motility of *Stenotrophomonas maltophilia* under iron limitation: In-silico, phenotypic and proteomic approaches. *Virulence*, 11(1), 104-112. doi:l: 10.1080/21505594.2020.1713649
- Kalidasan, V., Joseph, N., Kumar, S., Hamat , R., & Neela, V. (Noviembre de 2018). Iron and Virulence in *Stenotrophomonas Maltophilia*: All We Know So Far. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(401), 1-8. doi:https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00401
- Kortmann, J., & Narberhaus , F. (2012). Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nature Reviews Microbiology volume*, 10, 255–265. doi:https://doi.org/10.1038/nrmicro2730
- Lai, C., Wong , W., C., M., Huang , C., Lin , H., Chen, W., . . . liu, c. (Octubre de 2006). Central venous catheter-related *Stenotrophomonas maltophilia*

- bacteraemia and associated relapsing bacteraemia in haematology and oncology patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(10), 986-91. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01511.x.
- Liawa, S.-J., Leea , Y.-L., & Hsueh, P.-R. (2010). Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucosyltransferase (SpgM), and melanin and biofilm formation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(2), 126–130. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.09.015
- Lockhart , S., Abramson, M., Beekmann, S., Gallagher, G., Riedel, S., Diekema, D., . . . Doern, G. (2007). Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10), 3352-3359. doi:https://doi.org/10.1128/JCM.01284-07
- MacFaddin , J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Marchetti , M., Errecalde , J., & Mestorino , N. (Octubre de 2011). Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. Impacto en la multirresistencia. 31(2), 40-53. doi:ISSN 1514-2590
- McCutcheon , J., Peters , D., & Dennis , J. (2018). Identification and Characterization of Type IV Pili as the Cellular Receptor of Broad Host Range *Stenotrophomonas maltophilia* Bacteriophages DLP1 and DLP2. *Viruses*, 10(6), 338. doi:https://doi.org/10.3390/v10060338
- Merlino , J., Siarakas, S., Robertson, G., Funnell, G., Gottlieb, T., & Bradbury, R. (Julio de 1996). Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and *Enterococcus* species. *Journal Clinical Microbiology*, 34(7), 1788-1793. doi:10.1128/JCM.34.7.1788-1793.1996.
- Mojica, M., Humphries , R., Lipuma , J., Mathers , A., Rao, G., Shelburne , S., . . . Bonomo, R. (2022). Clinical challenges treating *Stenotrophomonas maltophilia* infections: an update. *JAC-antimicrobial resistance*, 4(3), 1-19. doi:https://doi.org/10.1093/jacamr/dlac040
- Morand , P., Bille, E., Morelle, S., Euge`ne, E., Beretti, J.-L., Wolfgang, M., . . . Nassif, X. (2004). Type IV pilus retraction in pathogenic *Neisseria* is regulated by the PilC proteins. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 23(9), 2009-2017. doi:https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600200
- Mukherjee, P., & Roy, P. (Junio de 2016). Genomic Potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in Bioremediation with an Assessment of Its Multifaceted Role in

- Our Environment. *Frontiers in Microbiology*, 7(967), 1-14.
doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00967>
- Nas, M., Gabell, J., & Cianciot, N. (Junio de 2021). Effectors of the *Stenotrophomonas maltophilia* Type IV Secretion System Mediate Killing of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *ASM Journals/mBio*, 12(3).
doi:10.1128/mBio.01502-21
- O'Toole, G., & Joter, R. (Octubre de 1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295-304. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x.
- Pages, D., Rose, J., Conrod, S., Cuine, S., Carrier, P., Heulin, T., & Achouak, W. (Febrero de 2008). Heavy Metal Tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLOS ONE*, 3(2).
doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001539>
- Palleroni, N., & Bradbury, J. (Julio de 1983). *Stenotrophomonas*, a New Bacterial Genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International journal of systematic bacteriology*, 43(3), 606-609.
doi:<https://doi.org/10.1099/00207713-43-3-606>
- Patil, P., Kumar, S., Kaur, A., Midha, S., Bansal, K., & Patil, P. (Julio de 2021). Global transcriptome analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* in response to growth at human body temperature. *Microbial Genomics*, 7(7), 1-14.
doi:<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000600>
- Ramos Gomez, F. (2008). *Análisis de agua - aguas naturales epicontinentales, costeras y marinas – muestreo- PROY-NMX-AA-121/1-SCFI-2008*. México .
- Razvi, S., Quittell, L., Sewall, A., Quinton, H., Marshall, B., & Saiman, L. (Diciembre de 2009). Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *CHEST*, 136(6), 1554-1560.
doi:10.1378/chest.09-0132
- Ryan, R., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M., . . . Dow, J. (Julio de 2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 514–525.
doi:<https://doi.org/10.1038/nrmicro2163>
- Skerker, J., & Berg, H. (Mayo de 2001). Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6901-6904. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.121171698>
- Svensson-Stadler, L., A. Mihaylova, S., & Moore, E. (Febrero de 2012). *Stenotrophomonas* interspecies differentiation and identification by gyrB

- sequence analysis. *Fems Microbiology Letters*, 327(1), 15–24.
doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02452.x>
- Swings, J., De Vos, P., Van Den Mooter, M., & De Ley, J. (Abril de 1983). Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the Genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 33(2), 409-413. doi:10.1099/00207713-33-2-409
- Tomich , M., Planet, P., & Figurski, D. (Mayo de 2007). The tad locus: postcards from the widespread colonization island. *Nat Rev Microbiol*, 5(5), 363-375. doi:10.1038/nrmicro1636. PMID: 17435791
- Valencia Ramírez, I. (Junio de 2018). identificación de genes asociados a fimbrias tipo iv en ais-lados clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia* y su relación con la producción de biofilm. *BUAP*.
- Wallden, K., Rivera-Calzada, A., & Waksman, G. (Julio de 2010). Microreview: Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cellular Microbiology*, 10(6), 338. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01499.x>
- Weinberg, E. (2004). Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation. *Medical Hypotheses*, 63(5), 863-865.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.04.010>
- Wiley, J., & Sons Inc. (2005). Tinción de Gram. En R. Coico, *Gram Staining* (págs. A.3C.1-A.3C.2). New York: Wiley Online Library.
- Yu, W., Chen, X., Sheng, Y., & Hong, Q. (2018). Genomic analysis for heavy metal resistance in *S. maltophilia*. *College of Jinhua Polytechnic*, 1-20.
doi:<https://doi.org/10.1101/404954>
- Zhang, L., Li, X.-Z., & Poole, K. (Diciembre de 2001). SmeDEF Multidrug Efflux Pump Contributes to Intrinsic Multidrug Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(12), 3497–3503. doi:<https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3497-3503.2001>

Índice de Tablas

Tabla 1. Se muestran los resultados obtenidos en diversas pruebas bioquímicas durante el crecimiento de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Adegoke, Stenström, & Okoh, 2017).....	10
Tabla 2. Principales infecciones ocasionadas por <i>S. maltophilia</i> en ambientes nosocomiales. (Brooke, 2012).....	11
Tabla 3. Mecanismos de resistencia encontrados en el genoma de <i>S. maltophilia</i> de origen clínico. (Brooke, 2012).....	14
Tabla 4. Formulación del agar MacConkey y Manitol con rojo de fenol, para 1 litro de agua purificada.....	32
Tabla 5. Descripción de las colonias de <i>S. maltophilia</i> en medio BHI.....	32
Tabla 6. Descripción de las colonias de <i>S. maltophilia</i> en medio MacConkey....	32
Tabla 7. Descripción de las colonias de <i>S. maltophilia</i> en medio VIA.....	33
Tabla 8. Reactivos y cantidades usadas para la reacción en cadena de la polimerasa de acuerdo con protocolo de Thermo Scientific™ DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X).	38
Tabla 9. Se muestran las condiciones de reacción estandarizadas para la amplificación por medio de PCR punto final de los genes que codifican las fimbrias tipo IV y tipo I de <i>S. maltophilia</i> usando DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X). 38	
Tabla 10. Se muestra la información correspondiente a los genes que codifican las fimbrias tipo IV y tipo I de <i>S. maltophilia</i> que se localizaron mediante homología de proteínas. Así como el tamaño y secuencia de los oligonucleótidos (Valencia Ramírez, 2018).....	40
Tabla 11. Resultados de las pruebas bioquímicas MIO, LIA y OF para las muestras de origen ambiental de <i>S. maltophilia</i>	43
Tabla 12. Resultados de la amplificación de las fimbrias tipo IVA, IVB y I, con sus correspondientes ATPasas.	48
Tabla 13. Resultados de la prueba de antibiogramas para las muestras de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , donde se clasifican en resistente, intermedio y sensible. 49	
Tabla 14. Resultados de los antibiogramas, para las 12 muestras de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	50
Tabla 15. Concentraciones de los metales pesados AgNO ₃ , H ₂ Cl ₂ y (COO) ₂ PB..	51
Tabla 16. Resultados de las pruebas de resistencia a metales pesados para las cepas ambientales.	52
Tabla 17. Resultados de la prueba de χ^2 para los datos de este estudio.	52

Índice de Figuras

Figura 1. Se muestran las imágenes de microscopía electrónica de barrido de los flagelos expresados en la cepa SMDP92, presentando uno (A) o más (B y C) en disposición polar, Barras, 0.5 μm (de Oliveira-Garcia, Dall'Agnol, & Girón, 2002)	15
Figura 2. Se muestra la metodología general que se aplicó en las cepas de origen ambiental de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	29
Figura 3. Lugares de muestreo para el aislamiento de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , de izquierda a derecha parque metropolitano de Puebla (A), río Atoyac en la localidad de San Martín Texmelucan (B), laguna de Chapulco (C) y laguna de CU (D).	30
Figura 4. Se muestra la morfología de las colonias de <i>S. maltophilia</i> en diferentes medios de cultivo, BHI (A), MacConkey (B) y VIA (C).....	41
Figura 5. <i>S. maltophilia</i> en CHROMAGAR incubada 48 hrs a 37 °C, presentando una coloración verde/azul	41
Figura 6. Tinción de Gram de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (S1) vista a 100x en microscopio óptico, obteniendo como resultado bacilos Gram negativos.	42
Figura 7. Resultado de la prueba bioquímica MIO para la muestra S1, indicando que hay movilidad, con un pH en el medio alcalino.....	43
Figura 8. El primero tubo de izquierda a derecha es el control negativo mientras que el segundo tubo corresponde la muestra S5, indicando un viraje en el color del medio.	44
Figura 9. Resultado de la prueba Bioquímica de la muestra S1 indicando un metabolismo no fermentativo.	45
Figura 10. Resultados de la amplificación de un fragmento de GYR B con 150 pb para la identificación molecular de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , de las muestras S5, S6, S7, S8 y S9.....	46
Figura 11. Resultados para la amplificación de un fragmento de GYR B con 150 pb para la identificación molecular de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> de las muestras S1, S10, S12, S13, S14 y S15 de izquierda a derecha.	46