



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS DE
Stenotrophomonas maltophilia HOSPITALARIAS**

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA:

QFB. ANGÉLICA MORALES LUNA

ASESOR DE TESIS:

D. C. PATRICIA LOZANO ZARAIN

PUEBLA, PUE.

ENERO, 2018



BUAP

Puebla, Pue. a 8 de enero 2018.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Angélica Morales Luna**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:


“Estudio de la resistencia a los antibióticos de *Stenotrophomonas maltophilia* hospitalarias”

A nuestro juicio, la alumna **Angélica Morales Luna** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.


Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia


D.C. Miguel Castañeda Lucio


D.C. José Antonio Munive Hernández


D.C. María Cristina González Vázquez

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- ❖ A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, por abrir las puertas del conocimiento para mí y por los recursos académicos brindados.

- ❖ Al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas**, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

- ❖ Al **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad**, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

- ❖ Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por la beca otorgada, con número de becario 686976.

- ❖ A la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado** por haber financiado este trabajo con recursos del proyecto con **No. LOZP-NAT17-I**, denominado; “Estudio de las bases genéticas de la resistencia en bacterias gramnegativas no fermentadoras causantes de infecciones nosocomiales”. Y muchas gracias por la beca otorgada correspondiente al programa de proyectos VIEP 2017 y por apoyo recibido para asistir al XVII CONGRESO LATINOAMERICANO DE INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA-XXXVI CONGRESO INTERAMERICANO DE INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA.

- ❖ Al **Hospital para el Niño Poblano**, por la donación de cepas bacterianas, mediante el proyecto: “ESTUDIO MOLECULAR Y ESTRUCTURAL DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS EN ENTEROBACTERIAS Y BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES” con número de oficio: HNP/ENS/177/2016, a través de la colaboración con la **M.C. Zita Gutiérrez Cázarez**, a quién agradezco su apoyo y disponibilidad en todo momento.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

- A la **D.C. Patricia Lozano Zarain**, primeramente, por la confianza que depositó en mí para la realización de este proyecto, sus consejos, por su paciencia y su valioso tiempo. Gracias por todo su apoyo y por sus conocimientos que me sirvieron de gran ayuda.
- A la **D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, gracias por su tiempo, por sus importantes aportaciones y comentarios, mismos que permitieron enriquecer esta tesis.
- Al **D.C. Miguel Castañeda Lucio**, por compartir sus conocimientos conmigo, por sus enseñanzas y consejos. Gracias por su apoyo y colaboración en la realización de éste trabajo científico.
- Al **D.C. José Antonio Munive Hernández**, por guiar esta tesis y por sus sugerencias. Gracias por su amabilidad al atenderme y por su disponibilidad para el desarrollo de este proyecto.
- A la **M.C. María Elena Bello López**, por su colaboración en la realización de éste trabajo. Gracias por sus consejos y enseñanzas.
- A la **D.C. María Cristina González Vázquez**, gracias por las sugerencias y los consejos brindados para la culminación de esta tesis.
- A los miembros de la **Comisión Revisora: Dr. Miguel Castañeda Lucio, Dra. María Cristina González Vázquez, Dr. José Antonio Munive Hernández, y la Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia**. Muchas gracias por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES Y DEDICATORIAS

A dios

A mi familia

- ❖ A **mis papas**, por todo su apoyo y por su amor incondicional. Gracias por acompañarme en cada paso, por enseñarme que nunca dejamos de aprender y que la perseverancia es fundamental para alcanzar el éxito.
- ❖ A **mis hermanos**, por sus regaños, por sus abrazos y por todos los momentos de diversión. Gracias por su apoyo incondicional y sus palabras de aliento cuando más me hace falta.
- ❖ A **mis sobrinos**, por preocuparse por mí y robarme una sonrisa cuando mi rostro luce triste. Infinitas gracias por compartir y aportar tanta alegría a mi vida.
- ❖ A **Fego**, por tu cariño, tu amor y tus grandes manifestaciones de afecto. Muchas gracias por las palabras motivadoras y por tu ayuda brindada para realizar este proyecto.
- ❖ A **mis amigos**, quienes siempre han estado en los momentos en que los he necesitado. Gracias por su confianza, por su cariño y su alegría.
- ❖ A **todos los que forman y formaron parte del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad**, por permitirme aprender, trabajar y convivir con ustedes, gracias por su solidaridad y compañerismo. A las que ya se fueron: **Claudia, Andrea, Oli y Carolina**, por sus consejos y por sus enseñanzas. A **Alma y Elena**, por asesorarme y por disponibilidad para enseñarme pacientemente, muchas gracias a las dos por compartir sus conocimientos conmigo. A **Gerardo y Edwin**, gracias por sus consejos y por las acertadas observaciones que realizaron durante el desarrollo de este proyecto. A **Yessy, Cesar, Miranda, Carlos, Emilio, Marisol y Lalo**, por su amistad, su apoyo, pero sobre todo por los momentos amenos y por las risas que compartimos.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Infecciones nosocomiales	1
1.2 Posición taxonómica de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2
1.3 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3
1.4 Tratamiento para infecciones por <i>S. maltophilia</i>	4
1.5 Mecanismos de resistencia a antibióticos en <i>S. maltophilia</i>	4
1.5.1 Bombas de expulsión	5
1.5.2 β -lactamasas	6
1.5.3 Enzimas modificadoras de antibióticos	9
1.5.4 Cambio en sitios blanco	9
1.6 Resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol	10
2. ANTECEDENTES	11
2.1 Antecedentes generales	11
2.2 Antecedentes específicos	13
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. OBJETIVOS	14
4.1 Objetivo general	14
4.2 Objetivos particulares	14
5. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	15
6. MATERIAL Y MÉTODOS	16
6.1 Cepas de estudio	16
6.2 Cepas control	16
6.3 Condiciones éticas	17
6.4 Comprobación de la pureza de los aislados y realización de pruebas bioquímicas	17
6.5 Determinación de la susceptibilidad a antibióticos	17
6.6 Lisis bacteriana	18
6.7 Amplificación de genes por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	19
6.8 Amplificación de genes de resistencia para β -lactámicos; <i>bla_{L1}</i> y <i>bla_{L2}</i> y otras β -lactamasas	20
6.9 Caracterización de <i>bla_{L1}</i> y <i>bla_{L2}</i>	21
6.10 Amplificación de genes de resistencia para quinolonas (<i>Smqnr</i>)	23
6.11 Búsqueda de genes de resistencia a sulfamidas	24

6.11.1 Amplificación de genes conservados en los integrones clase I	25
6.12 Genotipificación	26
6.13 Electroforesis y visualización de los productos de PCR	27
6.14 Secuenciación de los productos de PCR	27
6.15 Análisis de las secuencias	28
7. RESULTADOS	29
7.1 Datos de las cepas estudiadas	29
7.2 Determinación de la susceptibilidad a antibióticos	30
7.3 Amplificación de genes de resistencia para β -lactámicos; <i>bla</i> _{L1} , <i>bla</i> _{L2} y otras β -lactamasas	31
7.4 Mapa genómico de <i>bla</i> _{L1} y <i>bla</i> _{L2}	32
7.5 Análisis del gen codificante para la β -lactamasa L1 de algunas cepas de interés.	35
7.6 Análisis del gen codificante para la β -lactamasa L2 de las cepas StN1 y StN36	42
7.7 Amplificación de genes de resistencia para quinolonas (<i>Smqnr</i>)	44
7.8 Búsqueda de genes de resistencia a sulfamidas	46
7.9 Amplificación de genes conservados en los integrones clase I	46
7.10 Genotipificación	46
8. DISCUSIÓN	50
9. CONCLUSIONES	59
10. PERSPECTIVAS	60
BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Cepas usadas como controles positivos para la amplificación de genes de resistencia a antibióticos	16
2	Antibióticos y puntos de corte evaluados en este trabajo, CLSI 2017	18
3	Componentes de la PCR	19
4	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de β -lactamasas	20
5	Condiciones de amplificación para los genes de β -lactamasas	21
6	Oligonucleótidos empleados para la amplificación del mapa genómico de L1 y L2	22
7	Condiciones empleadas para la amplificación del mapa genómico de L1 y L2	23
8	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes <i>Smqnr</i>	23
9	Condiciones de amplificación para los genes de resistencia a quinolonas	24
10	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de <i>suB</i>	24
11	Condiciones para la amplificación de <i>suB</i>	24
12	Oligonucleótidos empleados para la búsqueda de genes conservados en los integrones clase I	25
13	Condiciones de amplificación para la búsqueda de genes conservados en los integrones clase I	25
14	Oligonucleótidos empleados para la amplificación de <i>rpoA</i>	26
15	Condiciones empleadas para la amplificación de <i>rpoA</i>	26
16	Datos generales de 11 cepas de interés para el estudio de <i>bla_{L1}</i>	36
17	Análisis de las secuencias de aminoácidos de L1 de 11 cepas	37
18	Datos generales de StN1 y StN36	42
19	Análisis de las secuencias de aminoácidos de L2 de StN1 y StN36	44
20	Resumen de las características de las cepas de estudio y sus mecanismos de resistencia	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Motivos de unión a zinc de las diferentes subclases de β -lactamasas clase B	7
2	Origen de las 45 cepas aisladas de julio 2011 a julio de 2016 en el HNP de la ciudad de Puebla	29
3	Áreas hospitalarias de donde provienen las 45 cepas aisladas de julio de 2011 a julio 2016 en el HNP de la ciudad de Puebla	30
4	Perfil de susceptibilidad a antibióticos de las 32 cepas seleccionadas de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	31
5	Amplificación de <i>bla_{L2}</i> de algunas de las cepas de estudio	32
6	Mapa genómico de <i>bla_{L1}</i> presente en el cromosoma de <i>S. maltophilia</i> y estrategia para secuenciación	33
7	Mapa genómico de <i>bla_{L2}</i> presente en el cromosoma de <i>S. maltophilia</i> y estrategia para amplificación	33
8	Amplificación del mapa genómico del gen <i>bla_{L1}</i> de las cepas StN1, StN10 y StN12	34
9	Amplificado del mapa genómico de <i>bla_{L2}</i> de algunas cepas	35
10	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de L1 de 11 cepas del HPN y L1a, L1b, L1c, L1d, L1e	39
11	Árbol filogenético <i>Neighbor-Joining</i> basado en las secuencias de aminoácidos de L1 de las cepas StN12, StN19 y StN37 y cinco variantes de ésta proteína reportadas en el GenBank	40
12	Modelado de L1 de las cepas StN19, StN37 y L1c	41
13	Comparación estructural de L1c, L1-StN19 y L1-StN37	41
14	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de L2a, L2b, L2c, L2d, L2-StN1 y L2-StN36	43
15	Amplificación del gen <i>Smqnr</i>	44
16	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de SmQnr de la cepa StN9 y SmQnr21	45
17	Árbol filogenético basado en las secuencias del gen <i>rpoA</i> de las especies de <i>Stenotrophomonas</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BET	Bromuro de Etidio
BHI	Medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón
C	Cloranfenicol
CAO	Cobre amino oxidasa
CAZ	Ceftazidima
CLSI	Instituto de Estándares de Laboratorio y Clínicos
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
HGT	Transferencia horizontal de genes
HNP	Hospital para el Niño Poblano
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud
IPM	Imipenem
LVX	Levofloxacino
MDR	Multidrogo resistentes
MEM	Meropenem
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
MIN	Minociclina
mM	Milimolar
MβL	Metalo-β-lactamasa
MPM	Marcador de peso molecular
OXA	β-lactamasa derivada de la contracción de: "β-lactamasa que otorga resistencia a Oxacilina"
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rTonB	Receptor dependiente de TonB
SXT	Trimetoprima-sulfametoxazol
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC	Unidad Formadora de Colonia
μg	Microgramo
μL	Microlitro

RESUMEN

En los últimos años *Stenotrophomonas maltophilia* ha emergido como patógeno nosocomial oportunista multirresistente, aumentando cada año el número de aislamientos en todo el mundo. Este microorganismo posee dos β -lactamasas cromosómicas: L1 y L2, que median la resistencia a los β -lactámicos. El objetivo de este estudio fue determinar el perfil fenotípico y genotípico de resistencia a los antibióticos de aislados clínicos de *S. maltophilia*. Se trabajó con 32 aislados de *S. maltophilia* del HNP recolectados durante 2011-2016, se determinó su CMI a siete antibióticos mediante dilución en agar (CLSI, 2017) y se detectaron genes de resistencia a antibióticos; *bla_{L1}*, *bla_{L2}*, *Smqnr*, *sul1*, así como la presencia de los elementos conservados en los integrones clase I y *sul3* (PCR y secuenciación). Se encontró que los porcentajes de resistencia fueron: 92% CAZ (CMI: 8 a >256 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 100% IMP (CMI ≥ 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y MEM (CMI: 32 a >128 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 34% LVX (CMI: 2-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 16% SXT (CMI: 20-152 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 9% C (CMI: 8-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 100% sensible a MIN (CMI: 1- 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se seleccionaron 25 cepas de las cuales el 76% portaban *bla_{L1}* y 72% *bla_{L2}*. Sin embargo, cuando se amplificó el mapa genómico de *bla_{L1}* (rTonB-*bla_{L1}*-CAO) y *bla_{L2}*, se observó que el 95% de las cepas portan L1 y de 18 cepas portadoras de L2, siete tienen *ampR-bla_{L2}*. El análisis de las secuencias de *bla_{L1}* de 11 cepas mostró: que la cepa StN12 presenta L1c y las demás portan nuevos alelos. Las cepas StN1 y StN36 portan nuevos alelos de L2. Las cinco cepas resistentes a SXT no amplificaron: *sul1*, *sul3* y los segmentos conservados de los integrones clase I, nueve de las 11 cepas resistentes a LVX portan *Smqnr*. Este estudio, pone en evidencia la diversidad del mapa genómico de *bla_{L1}* y *bla_{L2}* y su elevada variabilidad, la cual puede ser la responsable de los altos niveles de resistencia a CAZ y MEM. Los datos sugieren que el tratamiento más adecuado de las infecciones ocasionadas por *S. maltophilia* en este hospital es SXT; por lo tanto, se sugiere que este tipo de estudios se lleven a cabo para conocer el tipo de bacterias circulantes en cada hospital, como un seguimiento de la progresión de la resistencia bacteriana a los antibióticos, para poder establecer mejores estrategias de tratamiento y contribuir con las estadísticas mundiales.

Palabras clave: *Stenotrophomonas maltophilia*, β -lactamasas, *Smqnr*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infecciones nosocomiales

Una infección nosocomial se define como una infección que se presenta en un paciente internado en un hospital, en quien la infección no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento del internado. Comprende las infecciones contraídas en el hospital, pero manifiestas después del alta hospitalaria y también las infecciones ocupacionales del personal del establecimiento de salud (WHO/CDS/CSR/EPH., 2002).

Actualmente el término de infección nosocomial se ha redefinido y ahora este tipo de infecciones se denominan Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS), y son consideradas por el CDC desde el punto de vista epidemiológico como: todo cuadro clínico, localizado o sistémico, el cual es el resultado de una reacción adversa debida a la presencia de uno o varios agentes infecciosos o sus toxinas, sin evidencia de que estuviese presente o en fase de incubación en el momento del ingreso hospitalario (Horan *et al.*, 2008).

Las infecciones nosocomiales son reconocidas como un importante problema de seguridad para los pacientes. Durante años, eran consideradas un problema inevitable pero manejable; sin embargo, la aparición y propagación de la resistencia a antimicrobianos y la escasez de agentes antimicrobianos en investigación contra patógenos multidrogo resistentes (MDR), ha aumentado la preocupación de que estas infecciones puedan llegar a ser inmanejables debido a la falta de terapia antibacteriana eficaz (Rice, 2010). Además, la resistencia a antimicrobianos incrementa la estancia hospitalaria, mortalidad, morbilidad, y los costos económicos asociados (Sandiumenge *et al.*, 2011).

En las infecciones nosocomiales los bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF) con mayor relevancia clínica son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* y otros, como: *Burkholderia*

cepacia y *Achromobacter xylosoxidans*. Estos microorganismos son patógenos oportunistas, entre sus características comunes más importantes destacan: su gran versatilidad nutricional, que les permite adaptarse eficazmente al ambiente hospitalario, su capacidad para diseminarse desde sus reservorios exógenos (p. ej., soluciones acuosas y superficies inertes) y/o endógenos (principalmente mucosas respiratorias e intestinales en los enfermos), y persistir en el ambiente hospitalario, su resistencia intrínseca a múltiples antimicrobianos y su facilidad para adquirir resistencia a los antimicrobianos usados con fines terapéuticos (Fernández *et al.*, 2011). Después de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*; *S. maltophilia* es el tercer bacilo gramnegativo no fermentador responsable de las IAAS (Abbott *et al.*, 2011).

1.2 Posición taxonómica de *Stenotrophomonas maltophilia*

La posición taxonómica de *Stenotrophomonas maltophilia* estuvo envuelta en un debate que duró varios años, hasta que en 1993 Palleroni y Bradbury propusieron la creación de un nuevo género denominado *Stenotrophomonas* (*Stenos*, del griego estrecho; *trophos*, del griego alimento; *monas*, del griego única o unidad), que se considera la designación actualmente aceptada. *S. maltophilia* fue aislada por primera vez en 1943 como *Bacteria bookeri* y luego fue nombrada *Pseudomonas maltophilia* (*malt*, del inglés maltosa; *philia*, del griego amistad) en 1961; más adelante, el análisis de rRNA determinó que fuera nombrada más apropiadamente como *Xanthomonas maltophilia* (Brooke, 2012).

Finalmente, estudios de hibridación de ADN-rRNA, secuenciación, mapeo de genes y amplificación de genes por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como; el *16S rRNA* dieron lugar a la clasificación y denominación de *Xanthomonas maltophilia* a *Stenotrophomonas maltophilia* (Brooke, 2012). El género *Stenotrophomonas* actualmente se compone de 15 especies, pero solo *S. maltophilia*, causa infección en los seres humanos (Patil *et al.*, 2016).

1.3 *Stenotrophomonas maltophilia*

S. maltophilia es un bacilo gramnegativo no-fermentador, aerobio, que pertenece a la clase gamma de las proteobacterias, con forma de varilla recta o ligeramente curvada, que mide de 0.5 a 1.5 μm de largo (Hugh & Ryschenkow, 1961). Se puede encontrar como células individuales o en parejas y son móviles debido a la presencia de uno o pocos flagelos polares (Palleroni & Bradbury, 1993). También puede formar pequeñas colonias, considerado una forma adaptada de supervivencia en las infecciones crónicas, que puede ser difícil de detectar en muestras clínicas (Anderson *et al.*, 2007; Nyč & Matějková, 2010).

En los últimos años *S. maltophilia* ha emergido como patógeno nosocomial oportunista multirresistente, que puede ocasionar importantes infecciones en pacientes inmunodeficientes e inmunosuprimidos, así como en pacientes con fibrosis quística (Looney *et al.*, 2009), aumentando cada año el número de aislamientos en todo el mundo (Brooke, 2014). Las infecciones asociadas con *S. maltophilia* son infecciones de vías respiratorias, como la neumonía, las exacerbaciones agudas de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, además de bacteremias, infecciones del tracto urinario, infecciones de tejidos blandos como: endocarditis, meningitis y endoftalmitis (Brooke, 2012). Sin embargo, se conoce muy poco de los factores de virulencia de *S. maltophilia*, lo que ha llevado a creer que se trata de un microorganismo de virulencia limitada, pero puede causar infección nosocomial con una tasa de mortalidad considerable de hasta 37.5% (Falagas *et al.*, 2009). Pocos factores podrían estar involucrados en el mecanismo de patogenicidad de *S. maltophilia*, entre ellos: la fimbria Smf1, las hemolisinas, el lipopolisacárido (LPS) y algunas enzimas como: ADNasa, ARNasa, fibrinolisisina, lipasas, hialuronidasas, proteasas y elastasas (Abbott *et al.*, 2011; Adamek *et al.*, 2014).

1.4 Tratamiento para infecciones por *S. maltophilia*

Trimetoprima-sulfametoxazol se considera el tratamiento de elección para las infecciones causadas por *S. maltophilia*, otros antibióticos son: fluoroquinolonas tales como: levofloxacino, moxifloxacino y ofloxacino, ticarcilina-ácido clavulánico, las cefalosporinas: ceftazidima y cefepima; tetraciclinas (minociclina, tigeciclina y doxiciclina) y el cloranfenicol. Estos agentes pueden ser usados ya sea solos o en varias combinaciones (Abbott & Peleg, 2015; Abbott *et al.*, 2011; Nicodemo & Paez, 2007).

Las Polimixinas se han reconsiderando como alternativas u opciones de “último recurso”, debido a la creciente aparición de microorganismos resistentes a múltiples fármacos, una de ellas es la colistina, una combinación de las Polimixinas B y E, la cual es utilizada actualmente para tratar infecciones causadas por *S. maltophilia* (Chang *et al.*, 2015; Al-Anazi & Al-Jasser, 2014).

1.5 Mecanismos de resistencia a antibióticos en *S. maltophilia*

Múltiples mecanismos moleculares de *S. maltophilia* contribuyen a su multirresistencia a antibióticos, además de diversos factores, como son la permeabilidad disminuida de la membrana, que impide la entrada de los antimicrobianos (Brooke, 2012; Sánchez, 2015). Pero, como en la mayoría de los patógenos bacterianos, el principal mecanismo de resistencia intrínseca y adquirida responsable de su fenotipo MDR, se puede atribuir a la sobreexpresión de alguna o más de las múltiples bombas de expulsión, formadas por las proteínas Sme (“*Stenotrophomonas* multidrug efflux”) codificadas cromosómicamente e inclusive dependiendo de la bomba implicada, pueden disminuir la sensibilidad de *S. maltophilia* a β -lactámicos, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y trimetoprima-sulfametoxazol (Zhang *et al.*, 2001; Blair & Piddock, 2009; García-León *et al.*, 2015).

La resistencia intrínseca de *S. maltophilia* a los aminoglucósidos se debe a la presencia de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos, como: AAC(6')-Iz, que

se expresa de forma constitutiva y le confiere una susceptibilidad reducida a amikacina, netilmicina, sisomicina y tobramicina (Li *et al.*, 2003). Además, posee dos β -lactamasas cromosómicas e inducibles: una carbapenemasa de tipo metalo- β -lactamasa (M β L), y una cefalosporinasa de clase A, que le confieren resistencia a los β -lactámicos y la resistencia a quinolonas se ha relacionado con el gen *Smqnr* (Crossman *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2009).

La resistencia de *S. maltophilia* también puede ser adquirida por mutaciones o por la adquisición de genes de resistencia a antibióticos mediante la transferencia horizontal de genes (HGT), como es el caso del gen *sul*, el cual confiere resistencia a sulfamidas y otros genes de resistencia presentes en casete formando parte de integrones vinculados a un elemento genético móvil, como los plásmidos (Olivares *et al.*, 2013).

1.5.1 Bombas de expulsión

Las bombas de expulsión son estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma, o del periplasma de la bacteria sustancias que pueden ser tóxicas o nocivas para la integridad celular, incluyendo productos metabólicos e incluso antibióticos. Estas se componen de una proteína de membrana, un transportador dependiente de energía y una proteína de membrana externa (Nikaido & Pages, 2012). Las bombas de expulsión, conocidas hasta ahora, pertenecen a seis familias: MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance), RND (Resistance Modulation Cell Division), MATE (*Multidrug And Toxic Compounds Extrusion*), ABC (*ATP Binding Cassette*) y DMT (*Drug/Metabolite Transporter*) (Webber & Piddo; Li & Nikaido, 2009).

Hasta la fecha se han identificado ocho bombas de expulsión pertenecientes a la familia RND en el genoma de *S. maltophilia*: SmeABC, SmeDEF, SmeGH, SmeIJK, SmeMN, SmeOP-ToIC, SmeVWX y SmeYZ (García-León *et al.*, 2015). Entre ellas, SmeABC, SmeDEF, SmeIJK, SmeOP-ToIC, SmeVWX y SmeYZ han sido

caracterizadas experimentalmente y se ha confirmado que están involucradas en los fenotipos MDR de ésta bacteria (Alonso & Martínez, 2001; Li *et al.*, 2002; Crossman *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Gould *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014).

La sobreexpresión de SmeC (porina) del sistema SmeABC aumenta la resistencia de *S. maltophilia* a los β -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas (Li *et al.*, 2002). La sobreexpresión de las bombas SmeDEF y SmeVWX está implicada en la resistencia a cloranfenicol, tetraciclina y quinolonas (Alonso & Martínez, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011; García-León *et al.*, 2015). La sobreexpresión SmeDEF y SmeVWX está relacionada con mutaciones en los genes reguladores *smeT* y *smeRv*, respectivamente (García-León *et al.*, 2015).

Las bombas SmeIJK y SmeYZ tienen un papel en la resistencia intrínseca a los aminoglucósidos. El sistema SmeIJK también se ha relacionado con la resistencia a tetraciclina y ciprofloxacino (Crossman *et al.*, 2008). Además, la sobreexpresión de SmeJK proporciona resistencia a levofloxacino (Gould *et al.*, 2013).

La bomba SmeOP-ToIC, confiere baja susceptibilidad a aminoglucósidos, ácido nalidíxico, doxiciclina, macrólidos y ciertos compuestos no antibióticos, tales como cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona, dodecilsulfato de sodio y tetraclorosalicilanilida (Lin *et al.*, 2014).

1.5.2 β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas que inactivan a los antibióticos β -lactámicos por hidrólisis del enlace amida del anillo β -lactámico produciendo moléculas carentes de actividad antibacteriana (Bush & Jacoby, 2010) y representan una forma importante de resistencia. Los genes que codifican a estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, lo cual permite su fácil transferencia entre diferentes bacterias, lo que representa un gran reto para el control de las infecciones nosocomiales (Tafur *et al.*, 2008).

Las β -lactamasas son clasificadas comúnmente de acuerdo a dos esquemas generales: la clasificación Ambler y el sistema de clasificación funcional Bush-Jacoby-Medeiros. El esquema Ambler divide a las β -lactamasas en cuatro clases principales (A a D). La base de esta clasificación es la homología aminoacídica y no las características fenotípicas. En la clasificación Ambler, las β -lactamasas clase A, C y D son serin- β -lactamasas, las cuales actúan a través de un mecanismo dependiente de serina para catalizar la hidrólisis, mientras que las enzimas clase B son metalo- β -lactamasas (M β Ls), que requieren un ion divalente (Zn^{2+}) en el sitio activo para ejercer su acción (Bush & Jacoby, 2010; Jeon *et al.*, 2015).

La clasificación Bush-Jacoby-Medeiros las agrupa de acuerdo a similitudes funcionales (sustrato y perfiles de inhibición) y hay cuatro grupos principales y múltiples subgrupos en esta clasificación, este esquema fue propuesto inicialmente por Bush en 1989 y ampliado en 1995 (Bush & Jacoby, 2010).

Cada clase de β -lactamasas contiene una firma o motivos específicos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la clase A contiene tres motivos conservados: SXXK, SDN y KTG en las posiciones 70, 130 y 234, respectivamente y un cuarto elemento que forma parte del *loop* Ω : 164 REXXXN 170 (Naas *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2009). La secuencia perteneciente a la clase C contiene SXSK, YSN y KTG en las posiciones 64, 150 y 314 respectivamente. La clase D contiene los motivos SXXK, YGN y KTG en las posiciones 70, 144 y 214, respectivamente (Singh *et al.*, 2009).

Las metalo- β -lactamasas (M β Ls) son hidrolasas que generalmente usan Zn^{2+} como un ácido de Lewis para activar una molécula de agua para el ataque nucleofílico. Las M β Ls se han clasificado en las subclases B1, B2 y B3 en función de la identidad de secuencia y el requerimiento de Zn^{2+} . Los residuos de unión a metal varían entre diferentes subclases, dando lugar a diversas arquitecturas de sitios metálicos y utilizan uno o dos iones zinc divalentes para su actividad hidrolítica (Bebrone, 2007).

En la subclase B1, un ion de zinc (Zn_1) se une con tres residuos de His (H116, H118, H196) y un segundo ion de zinc (Zn_2) con tres residuos diferentes: D120, C221,

H263. Las β -lactamasas B2 tienen un motivo de unión a zinc formado por: N116, H118, H196, D120, C221 y H263. Finalmente, las β -lactamasas de la subclase B3 tienen un sitio de unión a Zn1 variado (H / Q116, H118, H196) y un sitio de unión a Zn2, que carece de Cys: D120, H121, H263, figura 1 (Mojica *et al.*, 2017; Morán-Barrio *et al.*, 2016). Las subclases B1 y B3 tienen un amplio espectro de sustrato que incluye penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, mientras que la subclase B2 tiene un espectro de sustrato estrecho que incluye carbapenémicos y penicilinas (Jeon *et al.*, 2015).

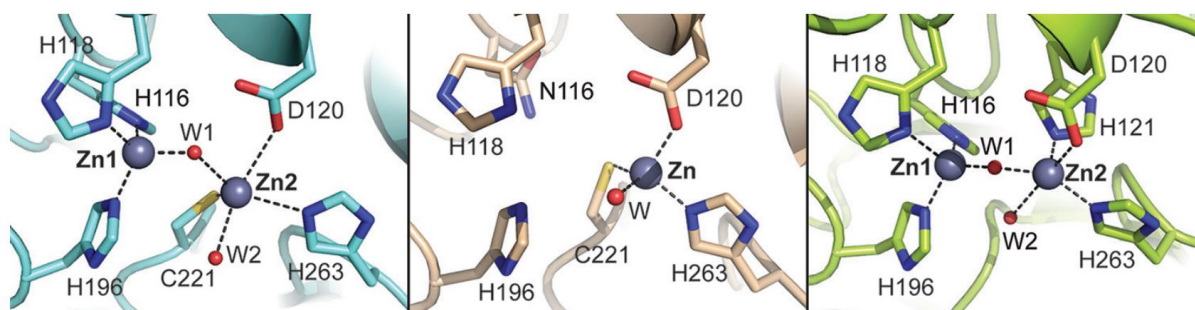


Figura 1. Motivos de unión a zinc de las diferentes subclases de β -lactamasas clase B. Motivo de unión a zinc de la subclase B1 (izquierda), B2 (centro) y B3 (derecha). Los átomos de zinc se muestran como esferas grises, y las moléculas de agua (W) se observan como esferas rojas. Los enlaces de coordinación se indican con líneas punteadas. Tomada de Morán-Barrio *et al.*, 2016.

El fenotipo de resistencia intrínseco a los β -lactámicos en *S. maltophilia*, se debe principalmente a la producción de dos tipos de β -lactamasas inducibles: **L1** y **L2** (Avison *et al.*, 2000). La **L1** es una metaloenzima de amplio espectro, clase B, dependiente de dos Zn^{2+} , capaz de hidrolizar a todos los β -lactámicos, incluidas penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, excepto monobactamas. Es sensible a la acción de agentes quelantes como el EDTA, pero no a la acción de inhibidores de β -lactamasas. L1 tiene un peso molecular aproximado de 29 kDa y un pI de 6.5. El gen codificante de esta enzima contiene un porcentaje de G+C del 68,4% (Avison *et al.*, 2000; Okazaki & Avison, 2008; Huang *et al.*, 2010).

La **L2** es una cefalosporinasa de clase A, que presenta una serina en su centro activo, esta β -lactamasa hidroliza penicilinas, cefalosporinas y aztreonam, pero no hidroliza a los carbapenémicos. Es sensible a la acción de inhibidores de β -lactamasas, especialmente al ácido clavulánico y resiste la acción del EDTA. L2 está constituida por una proteína con un peso molecular aproximado de 31,5 kDa, presenta un pI de 8.4 y el contenido en G+C del gen codificante es de 71,6% (Avison *et al.*, 2000; Okazaki & Avison, 2008; Huang *et al.*, 2010).

1.5.3 Enzimas modificadoras de antibióticos

En el genoma de *S. maltophilia* se han encontrado diferentes genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos, los cuales le confieren baja susceptibilidad a estos antibióticos (con la excepción de gentamicina). El gen *aph(3')-I/c* codifica para una aminoglucósido fosfotransferasa (Okazaki & Avison, 2007), que le confiere resistencia a kanamicina y neomicina, mientras que *aac(6')-Iz* para una aminoglucósido N-acetiltransferasa, de 16 kDa, relacionada con la resistencia intrínseca de *S. maltophilia* a la amikacina, netilmicina y tobramicina y, en menor medida, a la gentamicina. Este último tiene tres alelos *aac(6')-Iz*, *aac(6')-Iaz* y *aac(6')-Iam*, los cuales presentan más del 80% de similitud (Li *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2009). Por otro lado, la presencia de la aminoglucósido acetiltransferasa; AAC(6')-Iak en algunos aislados de *S. maltophilia* ocasiona una disminución en la susceptibilidad a la arbekacina, dibekacina, neomicina, netilmicina, sisomicina y tobramicina (Tada *et al.*, 2014).

1.5.4 Cambio en sitios blanco

Las mutaciones en la DNA girasa y la topoisomerasa IV, se han relacionado con el principal mecanismo de resistencia a quinolonas en la mayoría de las bacterias gramnegativas. Sin embargo, no se han identificado mutaciones en las topoisomerasas en éste microorganismo (Sánchez, 2015). Por lo tanto, se sabe que

la resistencia a quinolonas en *S. maltophilia* se debe a las bombas de expulsión SmeABC, SmeDEF y SmeOP-ToIC y a la presencia de la proteína cromosómica SmQnr, que le confiere un bajo nivel de resistencia a las quinolonas (Sánchez & Martínez, 2009; Chang *et al.*, 2015). Esta proteína se ha asociado con la resistencia intrínseca y adquirida de *S. maltophilia* y esta presente entre el 50-70% de los aislados clínicos (Kanamori *et al.*, 2015). SmQnr se une al complejo ADN-topoisomerasa, impidiendo la unión de las quinolonas, de manera similar a lo descrito para Qnr codificada en plásmido (Martínez-Martínez *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2005).

1.6 Resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol

Aunque el antimicrobiano de elección para las infecciones por *S. maltophilia* es trimetoprima-sulfametoxazol (SXT), la resistencia a este antibiótico es desenfrenada en varios países del mundo y puede ser mediada por los genes de resistencia a sulfonamida (*suI*) (Chang *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2015). El aumento en la CMI para trimetoprima-sulfametoxazol en aislados clínicos de *S. maltophilia* se ha asociado con la presencia del gen *suI1*, formando parte de los integrones clase I, lo que se ha relacionado con el aumento en la propagación de integrones, y evidencia posibles limitaciones en el uso de trimetoprima-sulfametoxazol como terapia en infecciones severas (Barbolla *et al.*, 2004). Un estudio demostró que *suI2* también contribuye en la resistencia a SXT y que este se encuentra localizado en plásmidos de tamaño variable (7.3 Kb y 120 Kb), asociado a elementos de regiones comunes de las secuencias de inserción (ISCR) (Toleman *et al.*, 2007). *suI3*, es la variante más nueva, podría ser la razón para un nuevo aumento en la resistencia a las sulfonamidas en aislados clínicos de *S. maltophilia* en todo el mundo (Chung *et al.*, 2015).

2. ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes generales

Stenotrophomonas maltophilia es un patógeno oportunista resistente a múltiples fármacos que causa un número creciente de infecciones nosocomiales. El Hospital Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras" de La Habana, Cuba, reportó que *S. maltophilia* se ubicó entre los 12 microorganismos más frecuentemente aislados durante el año 2006 (Martínez-Batista *et al.*, 2008). En 2008, el programa CANWARD ("Canadian Ward Surveillance"), encontró que *S. maltophilia* ocasiono el 1,4% de las infecciones nosocomiales durante 2001 a 2007 (Zhanet *et al.*, 2010). Por su parte, el programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY reporto un porcentaje de aislamiento de *S. maltophilia* del 3% en las siguientes regiones: Estados Unidos, Europa y América Latina, de 2004-2008 (Jones, 2010) y de 10.7% en la Región Mediterránea y Europa, de 2009-2012 (Sader *et al.*, 2014).

El estudio del perfil fenotípico y genotípico de resistencia a antibióticos en aislados clínicos de *S. maltophilia* ha sido estudiado alrededor del mundo. En Turquía, Gulmez y colaboradores, 2005, estudiaron 205 aislados de *S. maltophilia* y refirieron que es muy común que *S. maltophilia* cause infecciones en las unidades de cuidados intensivos (UCI), siendo sus niveles de resistencia altos para todos los agentes antimicrobianos usados, entre ellos; imipenem, meropenem, gentamicina y ciprofloxacino, a excepción de SXT (Gulmez & Hascelik, 2005).

En un estudio realizado en el Hospital de la Universidad Nacional de Taiwán, se recolectaron 70 cepas de *S. maltophilia* durante 2002-2003, de las cuales 40 fueron MDR y 30 no MDR. Los perfiles de resistencia de las cepas MDR fueron; 95% ceftazidima, 98% cefepime, meropenem y aztreonam, 100% ciprofloxacino, 68% levofloxacino y 43% trimetoprima-sulfametoxazol. Los aislados no MDR fueron 80% resistentes a meropenem, 17% a ceftazidima 10% a levofloxacino y todas las cepas fueron sensibles a trimetoprima-sulfametoxazol. 42 de los 70 aislados portaron

integrones de clase I. Los casetes genéticos dentro de los integrones encontrados fueron; *aacA4*, *aadB*, *aacC4*, *aacA6'-Ib*, *smr*, *smr / aacA4*, *qac*, *cmlA*, *catB2* y *bla_{IMP-8} / aac6-II / aadA5* (Liaw *et al.*, 2010).

En 2013 Gracia Páez y colaboradores reportaron 13 cepas de *S. maltophilia* portadoras de *Smqnr* aisladas de dos hospitales de Brasil, de las cuales siete portan *SmQnr6* y las demás, los alelos; *SmQnr4*, *SmQnr12*, *SmQnr1*, *SmQnr31*, *SmQnr39* y *SmQnr45*. Adicionalmente se determinó su susceptibilidad a antibióticos, donde dos fueron resistentes a levofloxacino, ocho a ciprofloxacino, dos a trimetoprima-sulfametoxazol y todas eran sensibles a minociclina (Gracia-Paez *et al.*, 2013).

Otro estudio realizado en Brasil por Cerezer y colaboradores en 2014, con 42 cepas de *S. maltophilia* obtenidas del Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), informaron que 33% de ellas eran resistente a ceftazidima, el 12% fue resistente a ciprofloxacino y el 10% a trimetoprima-sulfametoxazol. También, se realizó su genotipificación mediante la secuenciación y análisis de *rpoA*, *recA*, *atpA*, entre otros genes (Cerezer *et al.*, 2014).

Recientemente, en un estudio realizado por Yang y colaboradores, en 2014, con cepas de *S. maltophilia* aisladas de tres hospitales en Beijing, China, se analizó la presencia de L1 en 105 aislamientos, de los cuales, solo el 21% porto *bla_{L1}* (Yang *et al.*, 2014).

Por su parte, Kanamori y colaboradores, 2015 estudiaron 181 aislados clínicos de *S. maltophilia* procedentes de cuatro hospitales de Japón y observaron las siguientes tasas de resistencia: ceftazidima (67%), levofloxacino (6.1%), trimetoprima-sulfametoxazol (18%), cloranfenicol (8.8%) y minociclina (0%). Además, *Smqnr* fue detectado en 104 de 181 cepas (57,5%); el más frecuente fue *Smqnr6*, seguido de *Smqnr8* y *Smqnr1* (Kanamori *et al.*, 2015).

Posteriormente, en 2016, Hu y colaboradores examinaron 300 cepas de *S. maltophilia* recolectadas de 25 hospitales de China durante 2005-2014. De ellas, las cepas resistentes a SXT fueron: 30%, para los aislados del período 2005-2009

(n=145) y 47%, para las cepas obtenidas de 2010-2014 (n=155). De las 300 cepas de estudio el 60% portó *sul1* y 26% *sul2* (Hu *et al.*, 2016).

2.2 Antecedentes específicos

En México, los mecanismos y perfiles de resistencia de *S. maltophilia* se han descrito desde 2007; haciéndose algunos estudios en los cuales se han encontrado diferentes porcentajes de resistencia, así como genes que codifican para las β -lactamasas L1 y L2. Pero aun son pocos los estudios realizados en nuestro País.

En 2007, Gutiérrez y colaboradores estudiaron 66 cepas de *S. maltophilia* que fueron recuperadas del Centro Médico Nacional de Occidente de Guadalajara, Jalisco, entre enero de 2003 y agosto de 2006. A estas cepas se les determinó su susceptibilidad a antibióticos y sus perfiles de resistencia fueron: ceftazidima 31%, ticarcilina/ácido clavulánico 44%, ciprofloxacino 43%, ofloxacino 84% y trimetoprima-sulfametoxazol 90% (Gutiérrez *et al.*, 2007).

Por otra parte, Flores y colaboradores, en 2014, estudiaron 118 cepas de *S. maltophilia* recolectadas en los años de 2006 a 2013, procedentes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de Nuevo León, del Hospital Civil de Guadalajara y del Instituto de Patología Infecciosa y Experimental “Dr. Francisco Ruiz Sánchez”. Se les determinó su susceptibilidad a diferentes antimicrobianos por el método de dilución en agar. Sus perfiles de resistencia fueron: amikacina 68%, ampicilina 88%, aztreonam 88%, cefepime 21%, cefotaxima 60%, ceftazidima 41%, cloranfenicol 20%, ciprofloxacino 22%, gentamicina 78%, imipenem 100%, meropenem 92%, norfloxacino 49% y SXT 33%. A estas cepas se les determinó la presencia de genes de resistencia L1 y L2 por PCR, estando presente L1 en 91 (77%) cepas y L2 en 79 (67%) de ellas (Flores-Treviño *et al.*, 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones intrahospitalarias por cepas de *S. maltophilia* multidrogo resistentes son difíciles de tratar, puesto que las opciones de tratamiento se reducen ante ésta situación, empeorando el pronóstico de los pacientes y con ello aumentando estancias y costos hospitalarios, por lo que en el presente trabajo, se realizó el estudio de los mecanismos de resistencia a antibióticos y la genotipificación de cepas de *S. maltophilia* del Hospital para el Niño Poblano (HNP), lo que aportará mayor información acerca de la presencia de esta bacteria, así como los mecanismos implicados en la multiresistencia y servirá de base para un seguimiento epidemiológico en dicho hospital.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

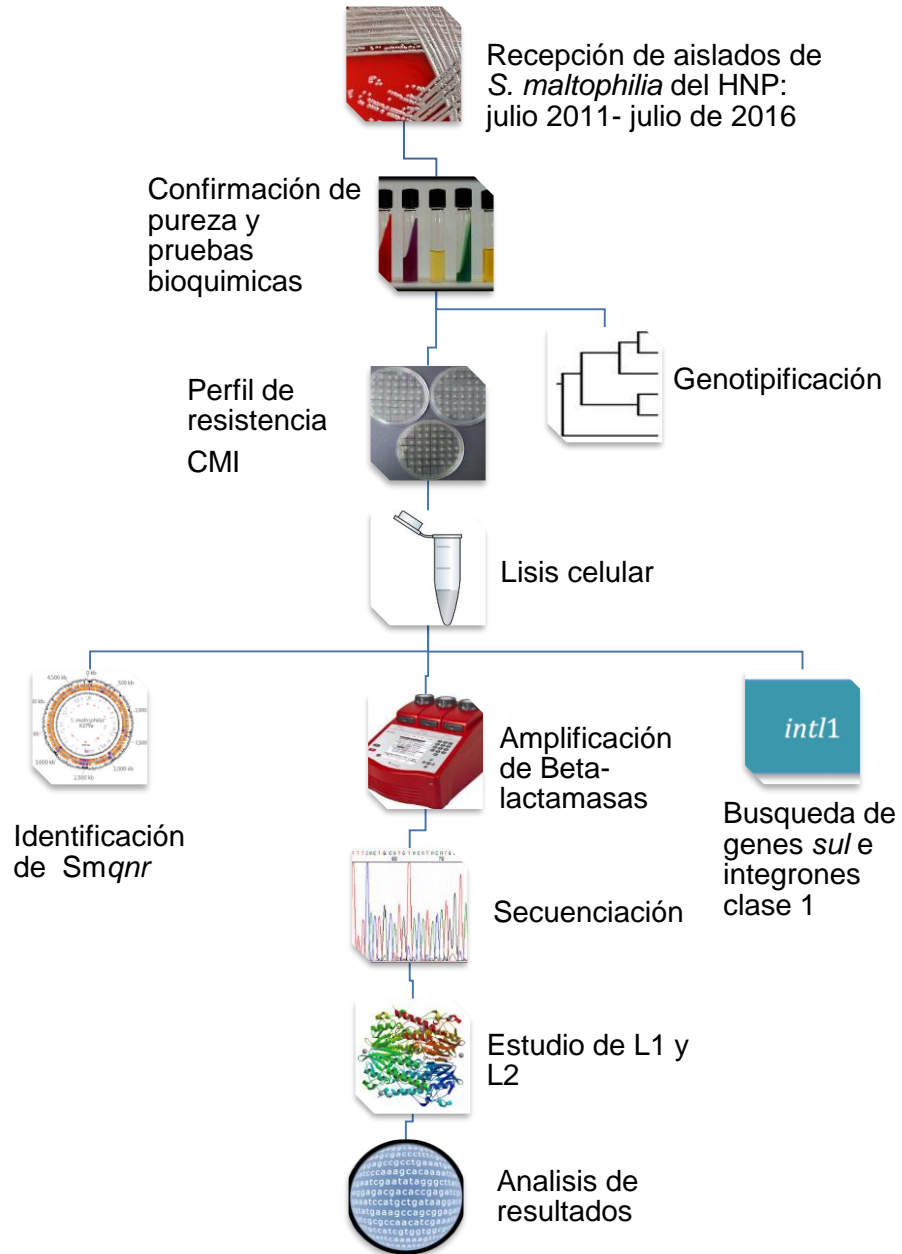
Estudiar algunos de los mecanismos de resistencia a antibióticos de cepas de *S. maltophilia* causantes de infecciones nosocomiales provenientes del HNP.

4.2 Objetivos particulares

- 1) Confirmar la pureza y fenotipificar los aislados de *S. maltophilia*.
- 2) Obtener el perfil fenotípico de resistencia a antibióticos de las cepas.
- 3) Identificar genes de resistencia para antibióticos β -lactámicos (*bla_{L1}* y *bla_{L2}*), quinolonas (*Smqnr*) y SXT (*sul*).
- 4) Detectar genes característicos de integrones clase 1 (*intl1*, *qacE Δ 1* y *sul1*).

- 5) Realizar la genotipificación de algunos de los aislados de *S. maltophilia* mediante el gen *rpoA*.

5. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cepas de estudio

Se estudiaron 45 aislados de *Stenotrophomonas maltophilia* procedentes de distintos sitios anatómicos de pacientes infectados con este microorganismo, provenientes del Hospital para el Niño Poblano de la Ciudad de Puebla, durante el periodo de julio de 2011 a julio de 2016.

6.2 Cepas control

Se usaron distintas cepas como control positivo para la amplificación de los diferentes genes de resistencia, los genes que portan estas cepas ya están secuenciados. Las características de las cepas se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas usadas como controles positivos para la amplificación de genes de resistencia a antibióticos.

Microorganismo	Denominación de la cepa	Genes secuenciados	Donada por:
<i>P. aeruginosa</i>	IMP-15	<i>bla</i> _{IMP-15}	Dr. Jesús Silva Sánchez
<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	<i>bla</i> _{VIM-2}	Dr. Jesús Silva Sánchez
<i>A. haemolyticus</i>	AN54	<i>bla</i> _{NDM}	M. C. Ma. Elena Bello López
<i>P. aeruginosa</i>	Ps36	<i>sul1</i> , <i>intl</i> , <i>qacE</i> Δ1	M.C. Elizabeth Valerio Calleja/ M.C. Cristal Ayala Arias
<i>E. coli</i>	C7222	<i>sul3</i>	D. C. Gerardo Cortés Cortés

Para *bla*_{KPC} no se tiene control positivo.

6.3 Condiciones éticas

Los aislados de estudio fueron donados por Hospital para el Niño Poblano (HNP/ENS/177/2016). Para su manejo se siguió la cadena de custodia de las cepas desde el HNP al Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (LMHC-CICM) y los datos de los pacientes fueron anónimos. Los microorganismos se desecharon de acuerdo con el manejo del RPBI conforme a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

6.4 Comprobación de la pureza de los aislados y realización de pruebas bioquímicas

Se ratificó la pureza de los aislados mediante pruebas bioquímicas: oxidasa (-), movilidad (+), oxidación de glucosa (+) y manitol (-), crecimiento a 42°C (-) e hidrolisis de DNA (+).

6.5 Determinación de la susceptibilidad a antibióticos

Para la determinación de la susceptibilidad a diferentes antibióticos se siguió la metodología del método de dilución en agar para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) siguiendo las recomendaciones del CLSI, 2017. Se partió de un cultivo puro de las cepas a evaluar, se resuspendió un inóculo en un tubo con 3 mL de Solución Salina Isotónica (SSI) al 0.85%, para ajustar la turbidez con un estándar de 0.5 de la escala de McFarland, que equivale a 1.5×10^8 UFC/mL. Posteriormente se hizo una dilución 1:10 con SSI (siendo el inóculo de 1.5×10^7 UFC/mL), se depositó por triplicado 2 μ L de ésta suspensión en placas con agar Mueller Hinton suplementadas con antibiótico, el inóculo final fue de 1.5×10^4 UFC/mL. Las placas inoculadas se dejaron a temperatura ambiente hasta que las gotas de inóculo estuvieran secas y se incubaron 24 horas a 37°C.

Después de 24 horas de incubación se observó el crecimiento en las placas y se determinó la concentración menor a la cual el antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano. Con este método se evaluó la susceptibilidad a siete antibióticos, los cuales se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Antibióticos y puntos de corte evaluados en este trabajo, CLSI 2017.

Antibiótico	Abreviatura	Puntos de corte CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
		Resistente	Intermedio	Sensible
Ceftazidima	CAZ	≥ 32	16	≤ 8
Minociclina	MIN	≥ 16	8	≤ 4
Levofloxacino	LVX	≥ 8	4	≤ 2
Trimetoprima-sulfametoxazol	SXT	$\geq 4/76$	-	$\leq 2/38$
Cloranfenicol	C	≥ 32	16	≤ 8
Imipenem	IMP	≥ 16	8	≤ 4
Meropenem	MEM	≥ 16	8	≤ 4

6.6 Lisis bacteriana

Se realizó la obtención de DNA mediante lisis bacteriana por calor a partir de un cultivo puro en agar infusión cerebro corazón (BHI), para lo cual se sembró una colonia aislada de *S. maltophilia* en placas de agar BHI, se incubó a 37°C durante 18 a 24 horas, del cultivo anterior se recogió de 2 a 3 asadas y se depositaron en un tubo Eppendorf con 800 μL de SSI estéril, esta mezcla se homogeneizó en un vórtex y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos; se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla bacteriana en 800 μL de SSI, (se realizaron 3 lavados más con 800 μL de SSI). La última pastilla se resuspendió con 800 μL de solución inyectable estéril y se colocó en baño María a temperatura de ebullición durante 10 minutos, transcurrido ese tiempo se sacó el tubo, se agitó y se centrifugó a 13,000

rpm durante 5 minutos, posteriormente se separó el sobrenadante en un tubo Eppendorf estéril, se ajustó la concentración de DNA a 200 ng/μL con el equipo NanoDrop 2000 y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.7 Amplificación de genes por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de genes se utilizó la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific). Las cantidades de los componentes para la PCR se muestran la tabla 3. Todas las reacciones de PCR se amplificaron en el termociclador Professional TRIO®.

Tabla 3. Componentes de la PCR.

Componentes	Concentración Inicial	Volumen añadido por tubo (μL)	Concentración final de la reacción
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific)	5 U/ μL	0.08	0.4 U
Buffer de reacción	10X	1	1X
MgCl ₂	25 mM	1	1.5 mM
dNTPs	10 mM	0.3	0.2 mM
Primer Forward	25 μM	0.5	0.75 mM
Primer Reverse	25 μM	0.5	0.75 mM
DNA	---	1	---
Agua libre de nucleasas	---	Hasta 10 μL	---
Volumen final		10 μL	

6.8 Amplificación de genes de resistencia para β -lactámicos: *bla_{L1}* y *bla_{L2}* y otras β -lactamasas

Se amplificaron los genes *bla_{L1}* y *bla_{L2}* a las cepas seleccionadas (n=25). Las cepas con un fenotipo de resistencia a carbapenémicos y que no amplificaron *bla_{L1}* y *bla_{L2}*, fueron candidatas para amplificar otros genes involucrados en la resistencia a estos antibióticos: *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* y *bla_{KPC}*. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 4 y las condiciones de trabajo para la amplificación de cada gen en la tabla 5.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de β -lactamasas.

Gen Blanco	Producto	Nombre de los ON	Secuencia (5' → 3')	TA (pb)	Referencia
<i>bla_{L1}</i>	L1	L1-F L1-R	CACACCTGGCAGATCGGCAC GCCGCATCCGCGTAGGC	459	Furushita <i>et al.</i> , 2005
<i>bla_{L2}</i>	L2	L2-F L2-R	CGATTCCTGCAGTTCAGT CGGTTACCTCATCCGATC	870	Furushita <i>et al.</i> , 2005
<i>bla_{IMP}</i>	IMP (1, 7, 13, 15, 22, 35)	IMPdF IMPdR	CTRCCGCAGWAGMGKCTTTG GCCADGCTACDANATTTGCGTC	515	Bello López, 2015.
<i>bla_{VIM}</i>	VIM (1, 2, 3, 4, 5, 7, 11, 12, 17, 31, 35, 36, 37)	VIMd1F VIMd2R VIMd3R	GATGGYGTGGTTCGCATATC GAATGCGCAGCACCRGGA CAACRTTMGYTGTGTGYTKGA	1-2: 400 1-3: 600	Bello López, 2015.
<i>bla_{NDM}</i>	NDM (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)	NDMv-F NDMv-R	AATATTATGCACCCGGTCGCG CATCACGATCATGCTGGCCT	732	Bello López, 2015.
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-2	KPC-F1 KPC-R2	ATGTCACTGTATCGCCGTCT TTACTGCCCGTTGACGCCCA	882	Akpaka <i>et al.</i> , 2009
ON: oligonucleótidos, TA: tamaño del amplificado.					

Tabla 5. Condiciones de amplificación para los genes de β -lactamasas.

Gen blanco	ON	DI	30 ciclos			Extensión final	CF
			Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
<i>bla_{L1}</i>	L1-F	95°C/	95°C/ 30 s	65°C/1min	72°C/ 1min	72°C/ 7min	∞4°C
	L1-R	5min					
<i>bla_{L2}</i>	L2-F	95°C/	95°C/30 s	55°C/1min	72°C/ 1min	72°C/ 7min	∞4°C
	L2-R	5min					
<i>bla_{IMP}</i>	IMPdF	94°C/	94°C/1min	56°C/1min	72°C/ 1min	72°C/ 10min	∞4°C
	IMPdR	5min					
<i>bla_{VIM}</i>	VIMd1F	94°C/	94°C/1min	54°C/1min	72°C/ 1min	72°C/ 10min	∞10°C
	VIMd2R	5min					
	VIMd1F	94°C/	94°C/1min	50°C/1min	72°C/ 1min	72°C/ 10min	∞10°C
	VIMd3R	5min					
<i>bla_{NDM}</i>	NDMv-F	94°C/	94°C/1min	54°C/1min	72°C/ 1min	72°C/ 10min	∞10°C
	NDMv-R	5min					
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-F1	94°C/	94°C/1 min	52°C/1min	72°C/ 1min	72°C/ 10 min	∞10°C
	KPC-R2	5min					

ON: oligonucleótidos, DI: desnaturalización inicial, CF: conservación final.

6.9 Caracterización de *bla_{L1}* y *bla_{L2}*

Se buscó el mapa genómico de los genes *bla_{L1}* y *bla_{L2}* en *S. maltophilia*. Para *bla_{L1}*, se utilizaron las secuencias de las cepas *S. maltophilia* disponibles en el GenBank (*S. maltophilia* K279a, *S. maltophilia* ISMMS2, *S. maltophilia* R551-3, *S. maltophilia* 13637) y se diseñaron oligonucleótidos para los genes que codifican el receptor dependiente de TonB y la cobre amino oxidasa, para obtener un fragmento de 1257 pb. También se emplearon los oligonucleótidos L1-F y L1-R (tabla 4) para caminar dentro de la secuencia de 1257 pb.

Para *bla_{L2}* se diseñaron los oligonucleótidos AmRsm-F y L2d-R, que se alinean en el gen *ampR* y *bla_{L2}*, respectivamente, con base en secuencias reportadas previamente por Chang y colaboradores, 2010. Los oligonucleótidos que se diseñaron para amplificar el mapa genómico de L1 y L2 y las condiciones de trabajo empleadas se mencionan en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del mapa genómico de L1 y L2.

Gen blanco	Fragmento Amplificado	Nombre de los ON	Secuencia (5' → 3')	TA (pb)	Referencia
<i>bla_{L1}</i>	rTonB- <i>bla_{L1}</i> -CAO	TonBsm-F CAOsm-R	AGCTACTACTCGCAGACCAC TGCAGCCGTAYACCGTYGAG	1257	Diseñados en este trabajo
<i>bla_{L1}</i>	rTonB- <i>bla_{L1}</i>	TonBsm-F L1-R	AGCTACTACTCGCAGACCAC GCCGCATCCGCGTAGGC	1006	Este trabajo Furushita <i>et al.</i> , 2005
<i>bla_{L1}</i>	<i>bla_{L1}</i> -CAO	L1-F CAOsm-R	CACACCTGGCAGATCGGCAC TGCAGCCGTAYACCGTYGAG	925	Furushita <i>et al.</i> , 2005 Este trabajo
<i>bla_{L2}</i>	<i>ampR</i> - <i>bla_{L2}</i>	AmRsm-F L2d-R	CATTCGTCGCTGCGRTAGG TCATCCGATCADBGCRTCGG	1675	Diseñados en este trabajo

ON: oligonucleótidos, TA: tamaño del amplificado.

Tabla 7. Condiciones empleadas para la amplificación del mapa genómico de L1 y L2.

Gen blanco	ON	DI	30 ciclos			Extensión final	CF
			Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
<i>bla_{L1}</i>	TonBsm-F	95°C/	95°C/ 40 s	58°C/50 s	72°C/ 1min 20 s	72°C/ 7min	∞4°C
	CAOsm-R	5min					
<i>bla_{L1}</i>	TonBsm-F	95°C/	95°C/ 40 s	60°C/50 s	72°C/ 1min	72°C/ 7min	∞4°C
	L1-R	5min					
<i>bla_{L1}</i>	L1-F	95°C/	95°C/ 40 s	62°C/50 s	72°C/ 1min	72°C/ 7min	∞4°C
	CAOsm-R	5min					
<i>bla_{L2}</i>	AmRsm-F	95°C/	95°C/40 s	58°C/50 s	72°C/ 1min 30 s	72°C/ 7min	∞4°C
	L2d-R	5min					

ON: oligonucleótidos, DI: desnaturalización inicial, CF: conservación final.

6.10 Amplificación de genes de resistencia para quinolonas (*Smqnr*)

A las cepas que presentaron fenotipo de resistencia a levofloxacino se les amplificó el gen *Smqnr*. Los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar este gen y las condiciones de trabajo empleadas se mencionan en la tabla 8 y 9, respectivamente.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes *Smqnr*.

Gen blanco	Producto	Nombre de los ON	Secuencia (5' → 3')	TA (pb)	Referencia
<i>Smqnr</i>	SmQnr (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 28, 29, 31, 32, 34, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 47, 49, 51, 52, 54)	Smqnr-F Smqnr-R	AGTGGTCGACCAGCAGTTC TGCATCAACAGCGCCACCTG	561	Diseñados en este trabajo

ON: oligonucleótidos, TA: tamaño del amplificado.

Tabla 9. Condiciones de amplificación para los genes de resistencia a quinolonas.

Gen blanco	ON	DI	30 ciclos			Extensión final	CF
			Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
Smqnr	Smqnr-F	95°C/	95°C/ 40 s	63°C/1min	72°C/ 50 s	72°C/	∞4°C
	Smqnr-R	5min					
ON: oligonucleótidos, DI: desnaturalización inicial, CF: conservación final.							

6.11 Búsqueda de genes de resistencia a sulfamidas

A las cepas que presentaron fenotipo de resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol se les amplificaron los genes *su1* y *su3* que se han asociado con la resistencia a este antibiótico. Los iniciadores y las condiciones de reacción para amplificar *su3* se muestran en las tablas 10 y 11, respectivamente.

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de *su3*.

Gen Blanco	Producto	Nombre de los ON	Secuencia (5' → 3')	TA (pb)	Referencia
<i>su3</i>	Sul-3	sul-3-F	GAGCAAGATTTTTGGAATCG	790	Perreten y Boerlin, 2003
		sul-3-R	CTAACCTAGGGCTTTGGA		
ON: oligonucleótidos, TA: tamaño del amplificado.					

Tabla 11. Condiciones de amplificación de *su3*.

Gen blanco	ON	DI	30 ciclos			Extensión final	CF
			Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
<i>su3</i>	sul-3-F	94°C/	94°C/1min	51°C/1min	72°C/ 1min	72°C/	∞4°C
	sul-3-R	5min					
ON: oligonucleótidos, DI: desnaturalización inicial, CF: conservación final.							

6.11.1 Amplificación de genes conservados en los integrones clase I

Los genes conservados de los integrones clase 1; *sul1*, *int1* y *qacEΔ1*, se amplificaron empleando los oligonucleótidos de la tabla 12 y las condiciones de reacción se muestran en la tabla 13.

Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados para la búsqueda de genes conservados en los integrones clase I.

Gen Blanco	Producto	Nombre de los ON	Secuencia (5' → 3')	TA (pb)	Referencia
<i>sul1</i>	Sul-1	sul-1-F	TGGTGACGGTGTTCGGCATTTC	790	Mazel <i>et al.</i> , 2000
		sul-1-R	GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG		
<i>Int1</i>	Int1	Int1-F	ACGAGCGCAAGGTTTCGGT	564	Mazel <i>et al.</i> , 2000
		Int1-R	GAAAGGTCTGGTCATACATG		
<i>qacEΔ1</i>	QacE	Qac-F	GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG	247	Mazel <i>et al.</i> , 2000
		Qac-R	TGAGCCCCATACCTACAAAGC		

ON: oligonucleótidos, TA: tamaño del amplificado.

Tabla 13. Condiciones de amplificación para la búsqueda de genes conservados en los integrones clase I.

Gen blanco	ON	DI	30 ciclos			Extensión final	CF
			Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
<i>sul1</i>	sul-1-F	94°C/	94°C/30 s	63°C/ 30 s	72°C/ 1min	72°C/ 8 min	∞10°C
	sul-1-R	5min					
<i>Int1</i>	Int1-F	94°C/	94°C/ 30 s	52°C/30s	72°C/ 2min	72°C/ 7min	∞10°C
	Int1-R	5min					
<i>qacEΔ1</i>	Qac-F	94°C/	94°C/ 30 s	60°C/30s	72°C/ 1min	72°C/ 7min	∞10°C
	Qac-R	5min					

ON: oligonucleótidos, DI: desnaturalización inicial, CF: conservación final.

6.12 Genotipificación

Se seleccionaron seis cepas para realizar la genotipificación mediante la amplificación y secuenciación del gen *rpoA*, utilizando los iniciadores diseñados por Locosque y colaboradores, 2011. Los oligonucleótidos empleados y las condiciones de reacción para amplificar *rpoA* se muestran en las tablas 14 y 15.

Tabla 14. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de *rpoA*.

Gen blanco	Nombre de los ON	Secuencia (5' → 3')	TA (pb)	Referencia
<i>rpoA</i>	rpoA-F	TKAAGGATGTGGCRATCC	709	Locosque et al., 2011
	rpoA-R	GGCCARTTCTCCARCTTCA		
ON: oligonucleótidos, TA: tamaño del amplicon				

Tabla 15. Condiciones empleadas para la amplificación de *rpoA*.

Gen blanco	ON	DI	30 ciclos			Extensión final	CF
			Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
<i>rpoA</i>	rpoA-F	95°C/	95°C/ 30s	55°C/1min	72°C/	72°C/	∞4°C
	rpoA-R	5min			1min		
ON: oligonucleótidos, DI: desnaturalización inicial, CF: conservación final.							

6.13 Electroforesis y visualización de los productos de PCR

La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1%. Se cargó el gel con los productos de PCR y 1 μ L de azul de bromofenol como tampón de carga. Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder y una solución 1X de Tris Ácido acético, EDTA (TAE) como buffer de electroforesis. Posteriormente se aplicó una tensión de 100V/30-35 minutos.

Los geles fueron teñidos en una solución acuosa de bromuro de etidio (BET) (60 μ L BET/ 200 mL H₂O) durante 30 segundos y se destiñeron en agua destilada. Los geles se fotografiaron en el digitalizador de imágenes MiniBIS Pro, Bio Imagen System.

6.14 Secuenciación de los productos de PCR

Los productos amplificados se purificaron con el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit™, siguiendo instrucciones de fabricante, y se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en Cuernavaca Morelos, México y al Laboratorio de Servicios Genómicos del LABORATORIO NACIONAL DE GENOMICA PARA LA BIODIVERSIDAD (LANGEBIO)- Cinvestav en Irapuato, Gto. México.

6.15 Análisis de las secuencias

Las secuencias se visualizaron en el programa Finch Tv versión 1.4.0 Geospiza.

El análisis comparativo de las secuencias se realizó con el programa BLAST 2.0 QBLAST del National Center for Biotechnology Information site (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).

Los alineamientos se realizaron con el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

La conversión de la secuencia nucleotídica a aminoacídica se realizó en ExpASy-Translate tool (<http://expasy.org/tools/dna.html>).

La construcción de árboles filogenéticos se realizó con el software MEGA6.

El modelado de las proteínas se efectuó el programa; Protein Homology/analogYRecognition Engine V 2.0 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) y con los software: RasWin Molecular Graphics versión 2.7.5.2 y Visual Molecular Dynamics (VMD) versión 1.9.3.

7. RESULTADOS

7.1 Datos de las cepas estudiadas

El Hospital para el Niño Poblano es un establecimiento que atiende a la población infantil que requiere atención médica de tercer nivel. Para este estudio se trabajó con una colección de 45 cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* recolectadas durante el periodo: julio 2011-julio 2016. Estas cepas fueron identificadas previamente por el método semiautomatizado Vitek2 y se realizó su ratificación mediante pruebas bioquímicas en el LMHC-CICM. 16 de las cepas se obtuvieron de líquido de diálisis peritoneal, 11 secreción abdominal, 10 secreción de pierna y el resto de otras secreciones como: líquido peritoneal, secreción vulvar y secreción de herida en sacro (figura 2). La distribución de la procedencia de las cepas por servicio hospitalario fue: Medicina Interna (MI) 43%, Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) 17%, Urología (U) 17% Cirugía (CX) 9%, Oncohematología (OH) 13%, ver figura 3.

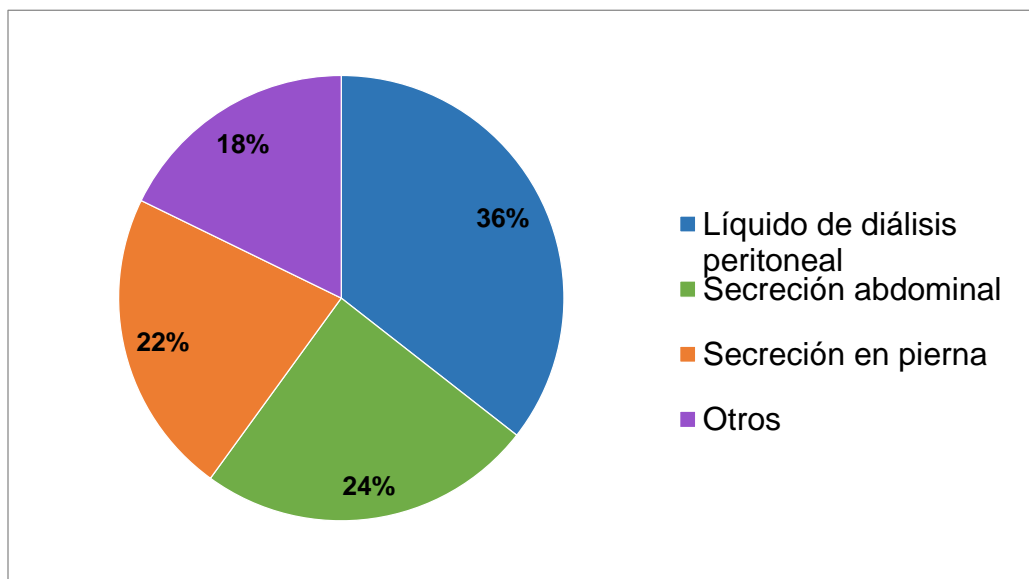


Figura 2. Origen de las 45 cepas aisladas de julio 2011 a julio de 2016 en el HNP de la ciudad de Puebla.

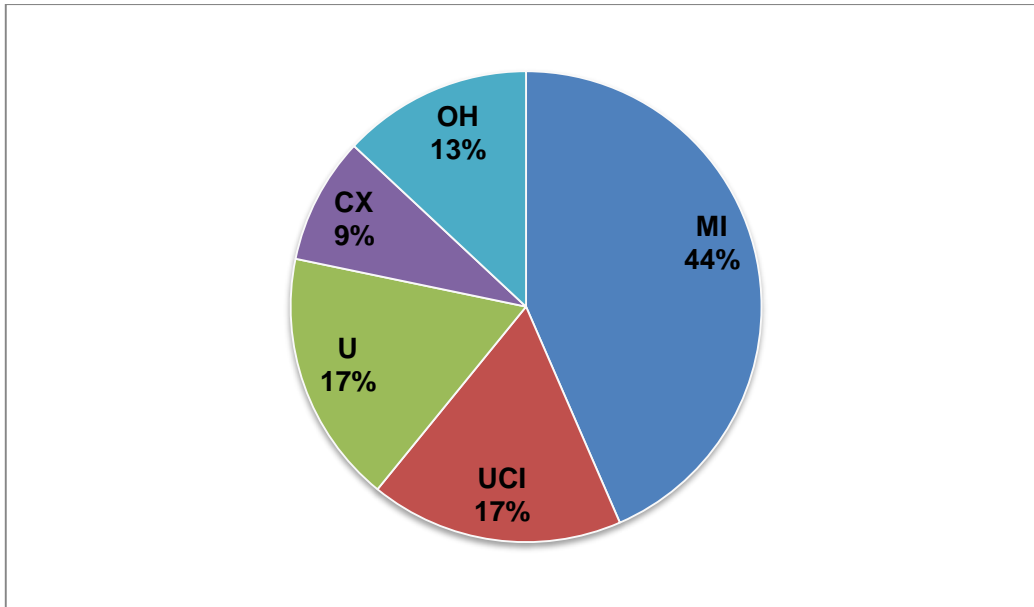


Figura 3. Áreas hospitalarias de donde provienen las 45 cepas aisladas de julio de 2011 a julio de 2016 en el HNP de la ciudad de Puebla. MI: Medicina Interna, UCI: Unidad de Cuidados Intensivos U: Urología, CX: Cirugía, OH: Oncohematología.

7.2 Determinación de la susceptibilidad a antibióticos

Se hizo una selección de 32 cepas con base a la fecha de aislamiento y procedencia, para obtener su perfil fenotípico de resistencia a antibióticos y se evaluó la susceptibilidad a siete antibióticos. La mayoría de las cepas sometidas a esta prueba fueron resistentes a los β -lactámicos probados (>90%); el 92% fue resistente a ceftazidima, el 100% a imipenem y meropenem. El 34% fue resistente levofloxacino, 16% a SXT, 9% a cloranfenicol y todas las cepas fueron sensibles a la minociclina. En la figura 4, se pueden observar los porcentajes de resistencia para cada antibiótico.

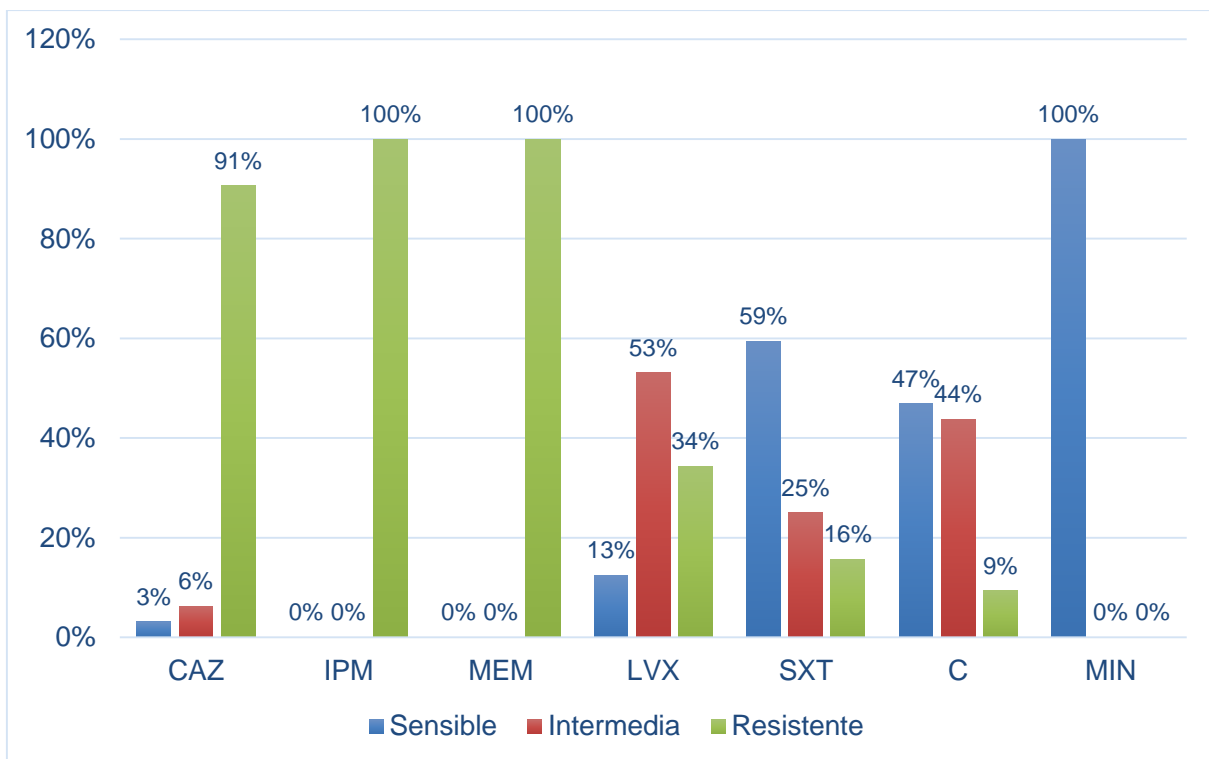


Figura 4. Perfil de susceptibilidad a antibióticos de las 32 cepas seleccionadas de *Stenotrophomonas maltophilia*. CAZ: ceftazidima, IMP: imipenem, MEM: meropenem, LVX: levofloxacino, C: cloranfenicol, MIN: minociclina, STX: trimetoprima-sulfametoxazol.

7. 3 Amplificación de genes de resistencia para β -lactámicos; *bla_{L1}*, *bla_{L2}* y otras β -lactamasas

Para la amplificación de genes de resistencia a antibióticos se hizo una selección de 25 cepas con base a su perfil fenotípico de resistencia, a las que se les buscó los genes que codifican para las β -lactamasas L1 y L2. El gen *bla_{L1}* estuvo presente en el 76% de las cepas y *bla_{L2}* en el 72%. Debido a que no se contaba con controles positivos para amplificar estos genes se secuenciaron los productos de la cepa StN1 y posteriormente se usaron como control positivo. En la figura 5 se muestra la fotografía de los productos de *bla_{L2}* (tamaño del amplificado: 894pb).

Las cepas StN13 y StN46 no amplificaron para *bla_{L1}* y *bla_{L2}*, por lo que se buscó otras β -lactamasas; *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* y *bla_{KPC}*, para tratar de explicar porque fueron

resistentes a carbapenémicos. Ambas cepas resultaron negativas para las variantes de las β -lactamasas buscadas.

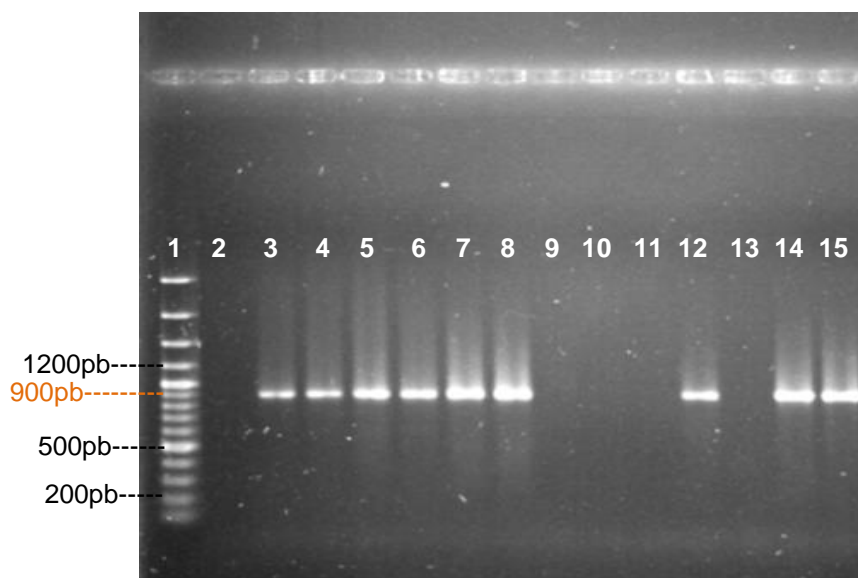


Figura 5. Amplificación de *bla*_{L2} de algunas de las cepas de estudio. Carril(C) 1: marcador de peso molecular, C 2: blanco, C 3: StN1(+), C 4: StN3, C 5: StN8, C 6: StN9, C 7: StN10, C 8: StN11, C 9: StN12, C 10: StN13, C 11: StN14, C 12: StN15, C 13: StN16, C 14: StN17, C15: StN18.

7.4 Mapa genómico de *bla*_{L1} y *bla*_{L2}

Con la finalidad de amplificar los genes *bla*_{L1} y *bla*_{L2} completos, se buscaron sus mapas genómicos y se diseñaron diferentes oligonucleótidos. Al realizar la búsqueda del mapa genómico del gen *bla*_{L1} en las siguientes cepas: *S. maltophilia* K279a, *S. maltophilia* ISMMS2, *S. maltophilia* R551-3, *S. maltophilia* 13637 con número de acceso en el GenBank: NC_010943.1, NZ_CP011305.1, NC_011071.1, NZ_CP008838.1, respectivamente, se observó que *bla*_{L1} se encuentra flanqueado por el receptor dependiente de TonB y la cobre amino oxidasa, como se muestra en la figura 6. La estrategia para secuenciar *bla*_{L1} de algunas cepas fue amplificar desde el gen codificante para el receptor dependiente de TonB (rTonB) al cobre amino oxidasa (CAO), que corresponde a un fragmento de 1257 pb, también se utilizaron

las combinaciones de los oligonucleótidos TonBsm-F/L1-R (1006 pb) y L1-F/CAOsm-R (925 pb), figura 6.

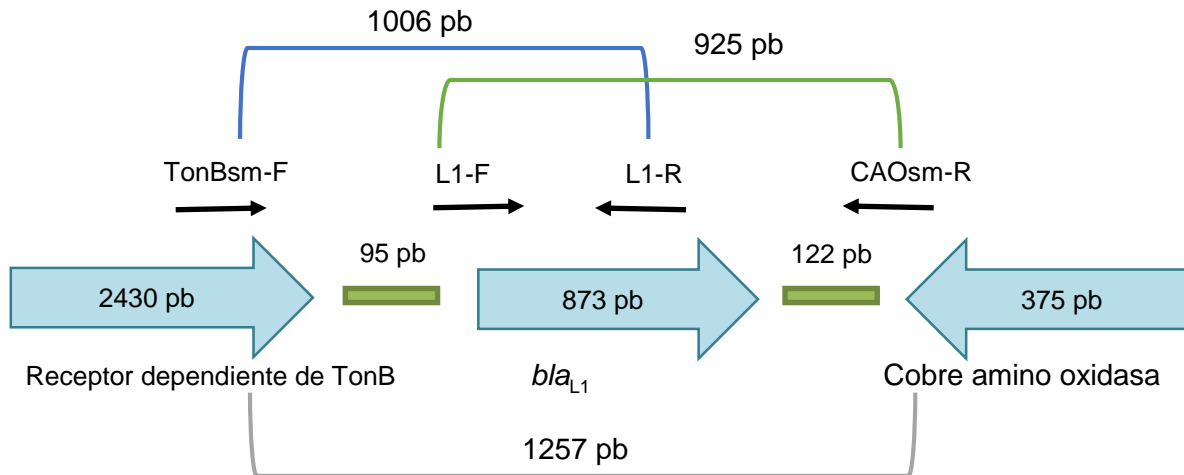


Figura 6. Mapa genómico de *bla_{L1}* presente en el cromosoma de *S. maltophilia* y estrategia para secuenciación.

Por otro lado, rio arriba de *bla_{L2}* se encuentra un regulador de β -lactamasa tipo AmpR clásico. La estrategia para amplificar *bla_{L2}* fue utilizar el juego de oligonucleótidos AmRsm-F/L2d-R, que amplifican desde *ampR* hasta el final de *bla_{L2}* (1675 pb), ver figura 7.

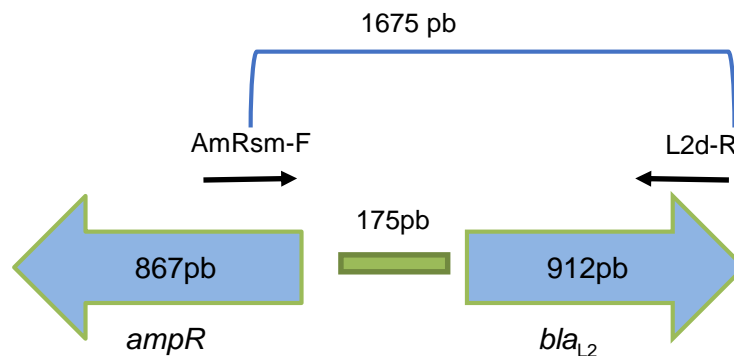


Figura 7. Mapa genómico de *bla_{L2}* presente en el cromosoma de *S. maltophilia* y estrategia para amplificación.

Luego de amplificar en el mapa genómico de *bla_{L1}*, utilizando los tres juegos de oligonucleótidos, se analizó cuantas de nuestras cepas presentaban el mapa genómico reportado. Dos cepas no portan *bla_{L1}*, 14 cepas presentan rTonB- *bla_{L1}*-CAO y el resto *bla_{L1}*-CAO. En la figura 8 se muestran los fragmentos amplificados del mapa genómico del gen *bla_{L1}* en algunas de las cepas de estudio. Debido a que no se contaba con controles positivos para amplificar estos fragmentos se secuenciaron los productos de la cepa StN12 y posteriormente se usaron como control positivo.

Después de amplificar con los oligonucleótidos AmRsm-F/L2d-R, se observó que de 18 cepas portadoras de L2 solo siete tienen el mapa genómico: *ampR- bla_{L2}* (ver tabla 20). En la figura 9 se visualiza el amplificado del mapa genómico de *bla_{L2}* de algunas cepas.

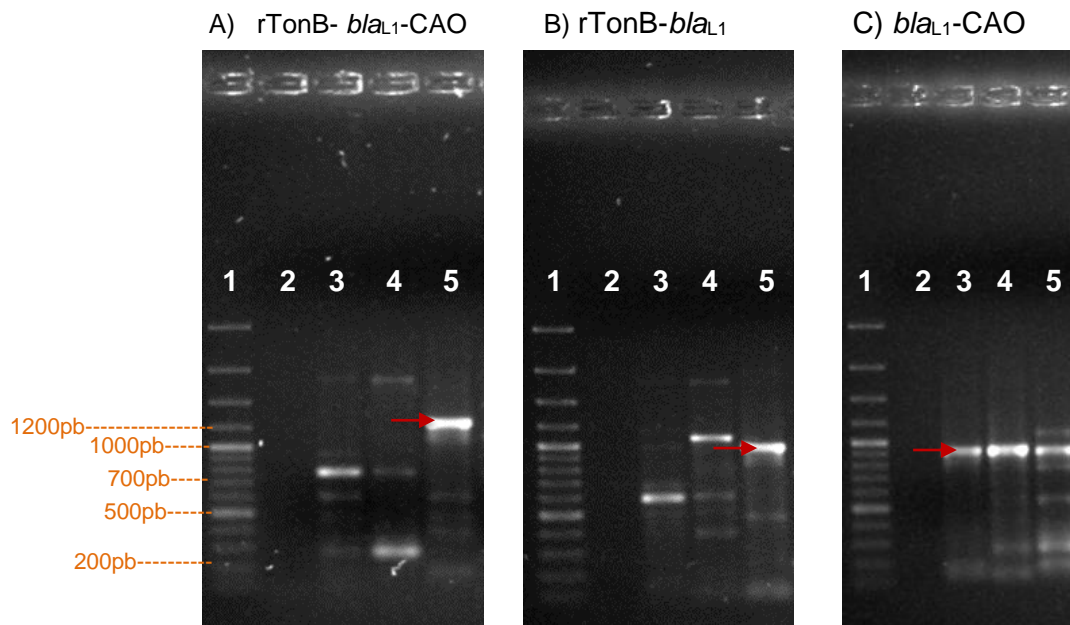


Figura 8. Amplificación del mapa genómico del gen *bla_{L1}* de las cepas StN1, StN10 y StN12. A) Amplificado de rTonB- *bla_{L1}*-CAO (1257 pb), Carril (C) 1: marcador de peso molecular (MPM), C 2: blanco, C 3: StN1, C 4: StN10, C 5: StN12. B) Amplificado de rTonB- *bla_{L1}*(1006 pb), C 1: MPM, C 2: blanco, C 3: StN1, C 4: StN10, C 5: StN12. C) Amplificado de *bla_{L1}*-CAO (925 pb), C 1: MPM, C 2: blanco, C 3: StN1, C 4: StN10, C 5: StN12. Las flechas rojas indican el producto del peso esperado. StN12 se utilizó como control positivo.

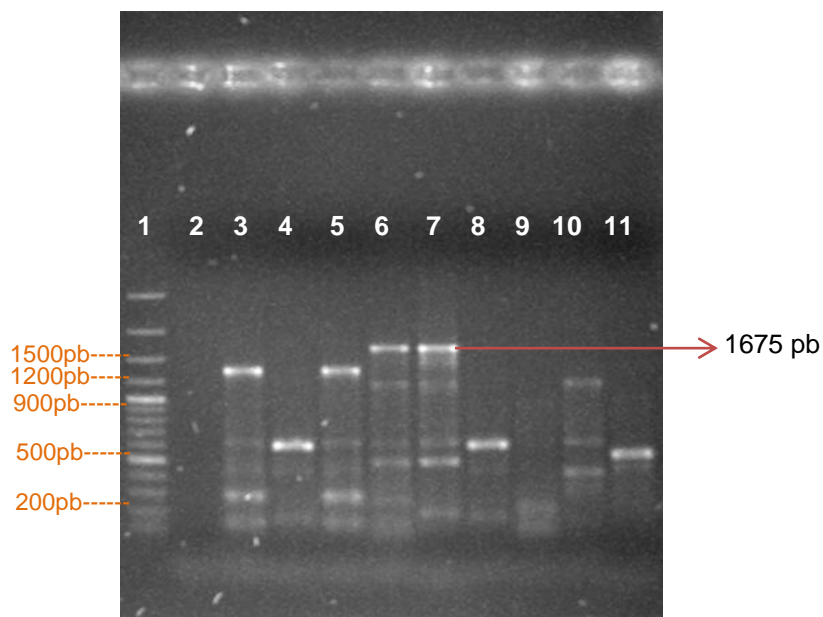


Figura 9. Amplificado del mapa genómico de *bla*_{L2} de algunas cepas. C 1: marcador de peso molecular, **C 2:** blanco, **C 3:** StN31, **C 4:** StN33, **C5:** StN35, **C 6:** StN36, **C 7:** StN37, **C 8:** StN38, **C 9:** StN41, **C 10:** StN45, **C 11:** StN46. La flecha roja indica el producto del peso esperado.

7.5 Análisis del gen codificante para la β -lactamasa L1 de algunas cepas de interés

Se seleccionaron once cepas para secuenciar *bla*_{L1}, con el objetivo de estudiar la M β L L1, debido a lo interesante de sus CMI a los antibióticos carbapenémicos, se eligieron tres cepas con CMI de 64 μ g/mL (StN12, StN19 y StN37), dos con CMI de 128 μ g/mL (StN1 y StN25) y el resto con CMI de >128 μ g/mL para MEM. Los datos generales de estas cepas se muestran en la tabla 16, en cuanto al perfil fenotípico de resistencia a β -lactámicos, el origen de la muestra y el mapa genómico de *bla*_{L1}, las CMI para los carbapenémicos se resaltan en rojo.

Tabla 16. Datos generales de 11 cepas de interés para el estudio de *bla_{L1}*.

Cepa	Fecha de aislamiento	Origen de la muestra	Servicio	CMI (µg/mL)			Mapa genómico de <i>bla_{L1}</i>
				CAZ	IPM	MEM	
StN1	28-jul-11	Tejido graso de pierna	CX	64	>128	128	<i>bla_{L1}</i> -CAO
StN10	17-ene-12	LDP	MI	32	>128	>128	<i>bla_{L1}</i> -CAO
StN12	20-ago-12	S. HX. Región abdominal	OH	64	>128	64	rTonB- <i>bla_{L1}</i> -CAO
StN17	08-jul-14	S. vulvar	UCI	8	>128	>128	<i>bla_{L1}</i> -CAO
StN18	14-ago-14	S. HX. QX. de gastrostomía	UCI	256	>128	>128	rTonB- <i>bla_{L1}</i> -CAO
SN19	15-ene-15	S. de traqueotomía	U	128	>128	64	rTonB- <i>bla_{L1}</i> -CAO
StN21	30-may-15	Lesiones orales	OH	64	>128	>128	<i>bla_{L1}</i> -CAO
StN25	25-jun-15	S. HX. Abdominal	CX	64	>128	128	<i>bla_{L1}</i> -CAO
StN29	30-jul-15	LDP	MI	128	>128	>128	rTonB- <i>bla_{L1}</i> -CAO
StN37	22-mar-16	LDP	U	64	>128	64	rTonB- <i>bla_{L1}</i> -CAO
StN38	24-abr-16	LDP	MI	256	>128	>128	rTonB- <i>bla_{L1}</i> -CAO

LDP: Líquido de diálisis peritoneal, CMI: Concentración mínima inhibitoria, U: Urología, CX: Cirugía, UCI: Unidad de Cuidados Intensivos, OH: Oncohematología, MI: Medicina Interna, S: Secreción, S. HX.: Secreción de herida, S. HX. QX.: Secreción de herida quirúrgica. CAZ: ceftazidima, IMP: imipenem, MEM: meropenem.

Una vez que se obtuvieron los productos de la amplificación de rTonB-*bla_{L1}*-CAO, *bla_{L1}*-CAO, se purificaron y se mandaron a secuenciar. Tras la obtención de las secuencias de nucleótidos y realizar estudios informáticos de las secuencias se obtuvo la traducción a aminoácidos de la proteína, se realizó un análisis de cada secuencia con respecto a cinco variantes reportadas en GenBank y se determinó el tipo de alelo que portan. La cepa StN12 porta L1c y las demás nuevos alelos.

El análisis de las secuencias de aminoácidos mostro que L1 de nuestras cepas de interés es similar a las reportadas. Se observó más del 73% de identidad entre todas las proteínas. En la tabla 17 se muestra la variante de L1 con mayor similitud a cada una de nuestras cepas. Se buscó el motivo de unión a zinc conservado en las β-lactamasas del grupo B3 y otros residuos de aminoácidos que forman parte del sitio

activo de L1 en las secuencias de aminoácidos de nuestras cepas (tabla 17), para relacionarlo con las diferencias en las CMI a MEM.

Tabla 17. Análisis de las secuencias de aminoácidos de L1 de 11 cepas.

Cepa	CMI (µg/mL)		Mapa genómico de <i>bla_{L1}</i>	Cambios en el sitio activo		% de identidad con L1a, L1b, L1c, L1d o L1e
	IPM	MEM		Motivo de unión a zinc	Otros aminoácidos	
StN1	>128	128	<i>bla_{L1}</i> -CAO	Ninguno	Ninguno	99% con L1e
StN10	>128	>128	<i>bla_{L1}</i> -CAO	Ninguno	Ninguno	98% con L1e
StN12	>128	64	rTonB- <i>bla_{L1}</i> -CAO	Ninguno	Ninguno	100% con L1c
StN17	>128	>128	<i>bla_{L1}</i> -CAO	Ninguno	Ninguno	82% con L1e
StN18	>128	>128	rTonB- <i>bla_{L1}</i> -CAO	Ninguno	Ninguno	92% con L1b
StN19	>128	64	rTonB- <i>bla_{L1}</i> -CAO	Ninguno	Ninguno	88% con L1b
StN21	>128	>128	<i>bla_{L1}</i> -CAO	Ninguno	Ninguno	89% con L1c
StN25	>128	128	<i>bla_{L1}</i> -CAO	Ninguno	Ninguno	83% con L1e
StN29	>128	>128	rTonB- <i>bla_{L1}</i> -CAO	Ninguno	Ninguno	99% con L1c
StN37	>128	64	rTonB- <i>bla_{L1}</i> -CAO	Ninguno	Ninguno	90% con L1d
StN38	>128	>128	rTonB- <i>bla_{L1}</i> -CAO	Ninguno	Ninguno	91% con L1b

IMP: imipenem, MEM: meropenem, CMI: Concentración mínima inhibitoria

El análisis de las secuencias de aminoácidos de L1 completas (cepas; StN12, StN19 y StN37) y parciales (cepas; StN1, StN10, StN17, StN18, StN21, StN29, StN37 y StN38) con respecto a los alelos L1a, L1b, L1c, L1d y L1e, se puede visualizar en la figura 10.

L1-StN10 -----
L1e MRSTLLAFALSSSLALAATLFTFDGAAADASLPQLQAYTVDPSSLQTMAPLQIADHTWQIG
L1-StN1 -----
L1-StN21 -----
L1-StN17 -----
L1-StN25 -----
L1a MRSTLLAFAL-----AVALPAAHTSAAEVPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQIADHTWQIG
L1d MRSTLLAFAL-----AVALPIAHASGAETPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQIADHTWQIG
L1-StN19 MRSSLLALTL-----AAALPAAYAVAAETPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQIADHTWQIG
L1-StN37 MRFSLLAFTL-----AVALPVAHASAAEAPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQIADHTWQIG
L1-StN38 MRCSLLTFAL-----AAALPFAQAHAAEAPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQIADHTWQIG
L1-StN18 MRFTLLAFAL-----AVALPAAHASAAEAPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQIADHTWQIG
L1b MRFTLLAFAL-----AVALPAAHASAAEAPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQVADHTWQIG
L1c MRFTLLAFAL-----AVALPAVHASAAEAPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQVADHTWQIG
L1-StN12 MRFTLLAFAL-----AVALPAVHASAAEAPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQVADHTWQIG
L1-StN29 MRFTLLAFAL-----AVALPAVHASAAEAPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQVADHTWQIG

L1-StN10 -----GQTADGLVLIIDGGMPQMASYLLTNMKASGTNTGPLRMVLLSHAHTDHAGPVA
L1e THDLTALLVQTADGLVLIIDGGMPQMASYLLTNMKARGTNTGPLRMVLLSHAHTDHAGPVA
L1-StN1 -----DGLVLIIDGGMPQMASYLLTNMKASGTNTGPLRMVLLSHAHTDHAGPVA
L1-StN21 -----LVQTADGAVLLDGGMPQMASHLISNMKVRGVAPQDLRLIILSHAHADHAGPVA
L1-StN17 -----LVRTADGAVLLDGGMPQMAGHLLDNMKARGVAAQDLRLIILSHAHADHAGPVA
L1-StN25 -----LLVRTADGAVLLDGGMPQMAGHLLDNMKARGVAAQDLRLIILSHAHADHAGPVA
L1a TEDLTALLVQTPDGAVLLDGGMPQMASHLIDNMKARGVTPRDLRLIILSHAHADHAGPVA
L1d TQDLTALLVQTADGAVLLDGGMPQMAGHLISNMKVRGVAPQDLRLIILSHAHADHAGPVA
L1-StN19 TESLTALLVQTAEGAVLLDGGMPQMAGHLLDNLKARGVAPQDLRLIILSHAHADHAGPVA
L1-StN37 TENLTALLVQTAEGAVLLDGGMPQMAGHLISNMKARGVAPQDLRLIILSHAHADHAGPVA
L1-StN38 TQELTALLVQTAEGAVLLDGGMPQMAGHLLDNMKARGVAPQDLRLIILSHAHADHAGPVA
L1-StN18 TEDLTALLVQTAEGAVLLDGGMPQMASHLISNMKVRGVAPQDLRLIILSHAHADHAGPVA
L1b TEDLTALLVQTAEGAVLLDGGMPQMAGHLLDNMKLRGVAPQDLRLIILSHAHADHAGPVA
L1c TEDLTALLVQTAEGAVLLDGGMPQMAGHLLDNMKLRGVAPQDLRLIILSHAHADHAGPVA
L1-StN12 TEDLTALLVQTAEGAVLLDGGMPQMAGHLLDNMKLRGVAPQDLRLIILSHAHADHAGPVA
L1-StN29 TEDLTALLVQTAEGAVLLDGGMPQMAGHLLDNMKLRGVAPQDLRLIILSHAHADHAGPVA
: * ** : ***** . : * : * * . * * : * : ***** : *****

L1-StN10 EIKRRTGAQVIVNAETA VLLARGGSDDLHFGDKITFPVNADRIVMDREVVKLGGI AFTA
L1e EIKRRTGAQVVVNAETA VLLARGGSDDLHFGDEITFPVNADRIVMDREVVKLGGI AFTA
L1-StN1 EIKRRTGAQVIVNAETA VLLARGGSDDLHFGDEITFPVNADRIVMDREVVKLGGI AFTA
L1-StN21 ELKRRTGASVAANAESA VLLARGGSNDLHFGDSITFPVPASTDRIIMDGEVTVGGI AFTA
L1-StN17 ELKRRTGASVAANAESA VLLARGGSNDLHFGDSITFPVPASADRIIMDGEVTVGGI AFTA
L1-StN25 ELKRRTGASVAANAESA VLLARGGSNDLHFGDSITFPVPASADRIIMDGEVTVGGI AFTA
L1a ELKRRTGAKVAANAESA VLLARGGSDDLHFGDGI TYPANADRIVMDGEVITVGGI VFTA
L1d ELKRRTGAKVAANAESA VLLARGGSDDLHFGDGI TYPASADRIVMDGEMITVGGI AFTA
L1-StN19 ELKRRTGARVVANAESA VLLARGGSDDLHFGDDI TYPASTDRIVMDGEVVTVGGI AFTA
L1-StN37 ELKRRTGAKVAANAESA VLLARGGSDDLHFGDAI TYPASADRIVMDGEVVEVGGI EFTA
L1-StN38 ELKRRTGAKVAANAESA VLLARGGSDDLHFGDGI TYPASADRIVMDGEVVSIGGIDFTA
L1-StN18 ELKRRTGAHVAANAESA VLLARGGSNDLHFGDGI TYPASADRIIMDGEAVTVGGITFTA
L1b ELKRRTGAHVAANAETA VLLARGGSNDLHFGDGI TYPASADRIIMDGEVTVGGI AFTA
L1c ELKRRTGAHVAANAETA VLLARGGSNDLHFGDGI TYPASADRIIMDGEVTVGGI AFTA
L1-StN12 ELKRRTGAHVAANAETA VLLARGGSNDLHFGDGI TYPASADRIIMDGEVTVGGI AFTA
L1-StN29 ELKRRTGAHVAANAETA VLLARGGSNDLHFGDGI TYPASADRIIMDGEVTVGGI VFTA
* : ** * * * . * * : ***** : * * * . * * : * * . : * * : * * * : * * *

L1-StN10 HFMPGHTPGSTAWTWTDRDGKPVRIAYADSL SAPGYQLQGNARYPRLVEDYRRSFATVR
L1e HFMPGHTPGSTAWTWTDRDGKPVRIAYADSL SAPGYQLQGNARYPRLVEDYRRSFATVR

```

L1-StN1      HFMPGHTPGSTAWTWTDTRDGKPVRIAYADSLSAPGYQLQGNARYPRLVEDYRRSFATVR
L1-StN21    HFMPGHTPGSTAWTWTDTRDGQPVRIAYADSLSAPGYQLQGNARYPRLVEDYRRSFATVR
L1-StN17    HFMPGHTPGSTAWTWTDTRDGQPVRIAYADSLSAPGYQLQGNARYPRLVEDYRRSFATVR
L1-StN25    HFMPGHTPGSTAWTWTDTRDGQPVRIAYADSLSAPGYQLQGNARYPRLVEDYRRSFATVR
L1a         HFMPGHTPGSTAWTWTDTRNGKPVRIAYADSLSAPGYQLQGNPRYPRLIEDYRRSFATVR
L1d         HFMPGHTPGSTAWTWTDTREGKPVRIAYADSLSAPGYQLQGNPRYPRLIEDYRHSLATVR
L1-StN19    HFMPGHTPGSTAWTWTDTRGAKPVRIAYADSLSAPGYQLRGNVRYPRRLIEDYTRSFATVR
L1-StN37    HFMPGHTPGSTAWTWSDTREGKPVRIAYADSLSAPGYQLQGNARYPRLVDDYKRSFATVR
L1-StN38    HFMPGHTPGSTAWTWTDTRDGKPVRIAYADSLSAP-----
L1-StN18    HFMPGHTPGSTAWTWTDTRDGKPVRIAYADSLSAPGYQLKGNPRYPRLIEDYKRSFITVR
L1b         HFMPGHTPGSTAWTWTDTRDGKPVRIAYADSLSAPGYQLKGNPRYPRLIEDYKRSFATVR
L1c         HFMPGHTPGSTAWTWTDTRDGKPVRIAYADSLSAPGYQLKGNPRYPRLIEDYKRSFATVR
L1-StN12    HFMPGHTPGSTAWTWTDTRDGKPVRIAYADSLSAPGYQLKGNPRYPRLIEDYKRSFATVR
L1-StN29    HFMPGHTP-----
          ***  ****

L1-StN10    GLPCDLLLTPHPGASNWNYAAGSNASEKVLSCA-----
L1e         GLPCDLLLTPHPGASNWNYAAGSNASEKVLSCAYADAAEKKFDAQLAKETAGAR
L1-StN1     GLPCDLLLTPHPGASNWNYAAGSNASEKVLSCAY-----
L1-StN21    GLPCDLLLTPHPGASNWNYAAGAEAGANALTCKAYADAAEKKFDAQLAKETATAR
L1-StN17    ALPCDLLLTPHPGASNWNYAAGAEAGANALTCKAY-----
L1-StN25    ALPCDLLLTPHPGASNWNYAAGAEAGANALTCKAYADAAEKKFDAQLAKETATAR
L1a         ALPCDVLLTPHPGASNWDYAAGARAGAKALTCKAYADAAEQKFDGQLAKETAGAR
L1d         ALPCDVLLTPHPGASNWDYAAGSKASAKALTCKAYADAAEQKFDAQLAKETAGAR
L1-StN19    GLPCDLLLTPHPGASHWDYAAGSKAGAKALTCKAYADEAEKKFDAQLAKETVRAR
L1-StN37    ALPCDVLLTPHPGASNWDYASGSKASAKALTCKAYADAAEQKFDAQLAKETARAR
L1-StN38    -----
L1-StN18    -----
L1b         ALPCDLLLTPHPGASNWNYAAGSKASAEALTCNAYADAAEKKFDAQLARETAGTR
L1c         ALPCDLLLTPHPGASNWNYAVGSKASAEALTCNAYADAAEKKFDAQLAKETAGAR
L1-StN12    ALPCDLLLTPHPGASNWNYAVGSKASAEALTCNAYADAAEKKFDAQLAKETAGAR
L1-StN29    -----

```

Figura 10. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de L1 de 11 cepas del HNP y L1a, L1b, L1c, L1d, L1e. Se resaltan en **amarillo** los residuos de aminoácidos del motivo de unión a zinc y en **azul** los otros residuos que forman parte del sitio activo.

Con las secuencias de aminoácidos de L1 completas de las cepas StN12, StN19 y StN37, se realizó un alineamiento múltiple con respecto a L1a, L1b, L1c, L1d, L1e (ver anexo 1) y se obtuvo un árbol filogenético de todas estas variantes (figura 11).

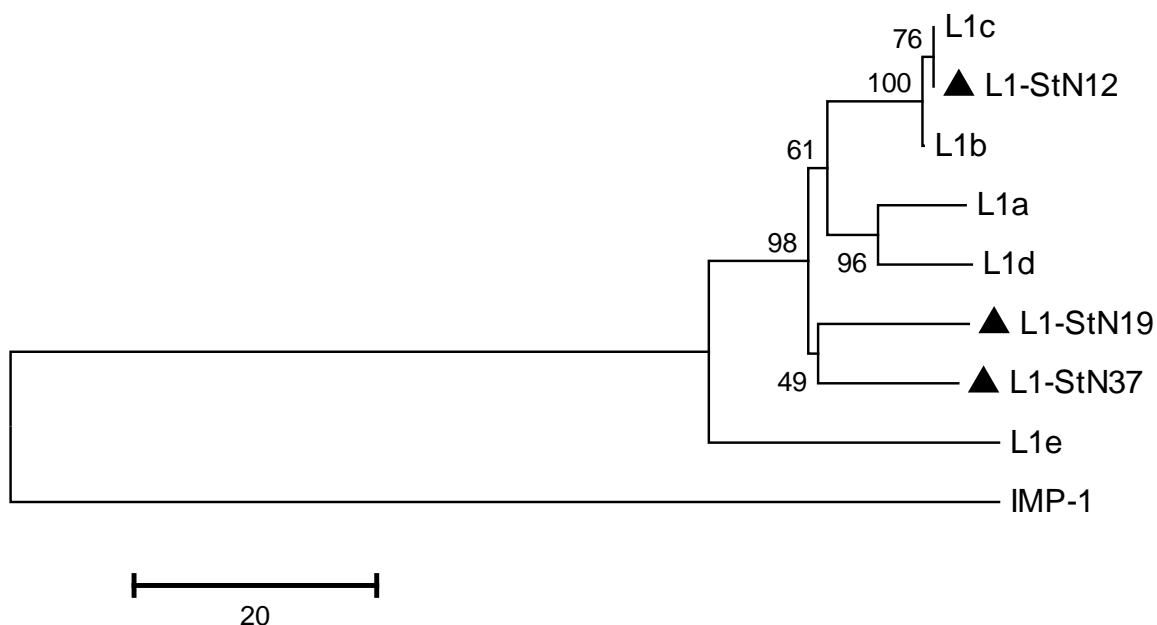


Figura 11. Árbol filogenético *Neighbor-Joining* basado en las secuencias de aminoácidos de L1 de las cepas StN12, StN19 y StN37 y cinco variantes de ésta proteína reportadas en el GenBank. El árbol se construyó usando el programa MEGA 6.0 y se empleó la β -lactamasa IMP-1 como raíz del árbol. L1 de las cepas StN19 y StN37 están marcadas con el siguiente símbolo: ▲.

Las cepas StN19 y StN37 presentaron una CMI a MEM de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y varios cambios en las secuencias de aminoácidos con respecto a L1c (ver anexo 2), que porta StN12 (CMI-MEM=64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por lo que se tuvo la inquietud de realizar el modelo tridimensional de estas proteínas (figuras 12 y 13), para apreciar si había cambios en la estructura, encontrando que la conformación de la proteína se ve poco afectada en la hélice α del extremo C-terminal en cuanto a longitud e inclinación (ver figura 12).

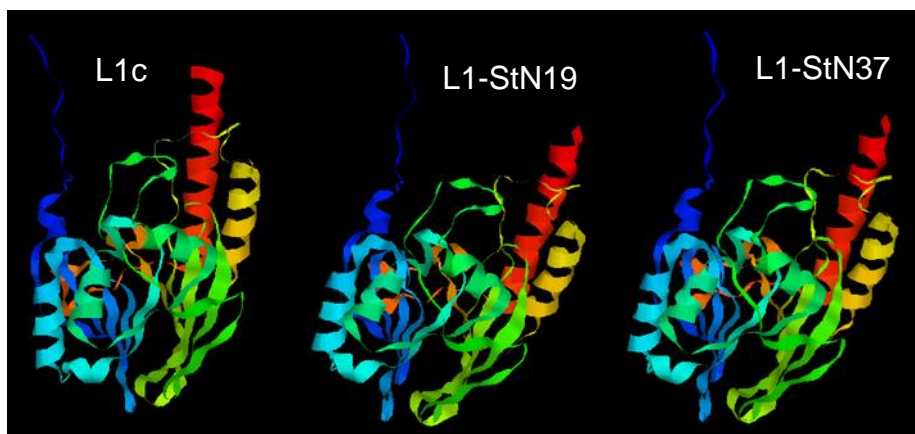


Figura 12. Modelado de L1 de las cepas StN19, StN137 y L1c. El modelo fue realizado con el programa Protein Homology/analogYRecognition Engine V 2.0 y se visualizó en el programa RasWin Molecular Graphics versión 2.7.5.2.

Para tratar de visualizar mejor las diferencias entre las tres enzimas (L1c, L1-StN19 y L1-StN37), se realizó el modelaje de las tres proteínas en un solo esquema para poder compararlas, observando que la hélice α del extremo C-terminal es diferente en cuanto a longitud y no se apreciaron cambios en los *loops* 1 y 2, donde se encuentran algunos de los residuos que forman parte del sitio activo (figura 13).

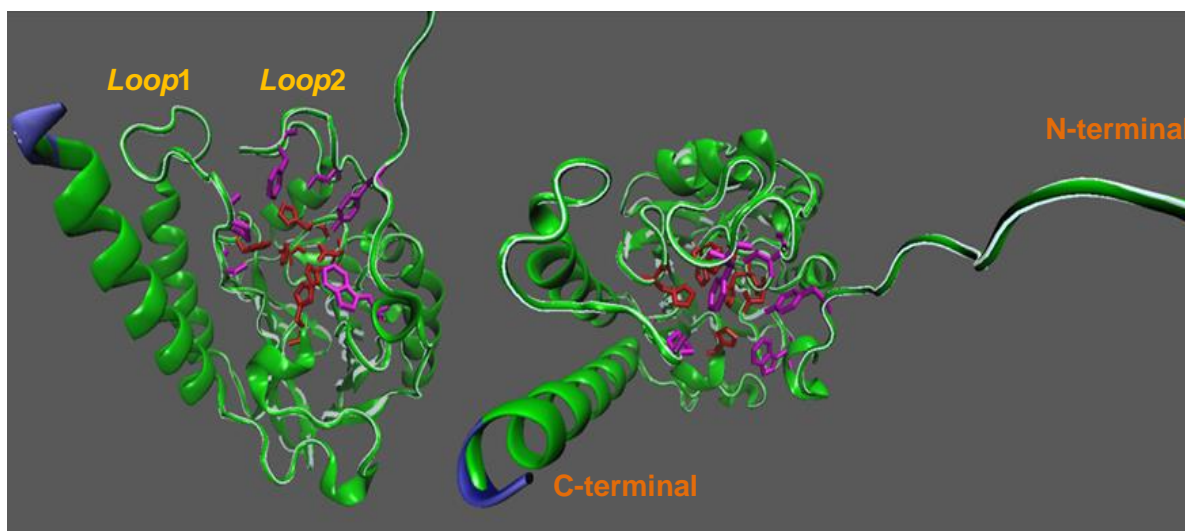


Figura 13. Comparación estructural de L1c, L1-StN19 y L1-StN37. En azul se muestra L1c, en verde L1 de StN19 y en blanco L1 de StN37. Los residuos en rojo corresponden al motivo de unión a zinc y los demás aminoácidos que forman parte del sitio activo están coloreados en magenta. Se aprecia que la hélice α del extremo C-terminal de L1c es ligeramente más larga en comparación con L1 de las cepas StN19 y StN37. El modelado fue realizado en el programa Visual Molecular Dynamics (VMD) versión 1.9.3.

7.6 Análisis del gen codificante para la β -lactamasa L2 de las cepas StN1 y StN36

Se eligieron las cepas StN1 y StN36 para secuenciar bla_{L2} por lo interesante de su CMI a ceftazidima, utilizando los oligonucleótidos L2-F/L2-R. En la tabla 18 se presentan los datos generales de las cepas, resaltando en rojo su CMI a CAZ.

Tabla 18. Datos generales de StN1 y StN36.

Cepa	Origen de la muestra	Servicio	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			bla_{L2}	Módulo $ampR-bla_{L2}$
			CAZ	IPM	MEM		
StN1	Tejido graso de pierna	CX	64	>128	128	(+)	(-)
StN36	LDP	MI	256	>128	128	(+)	(+)

LDP: líquido de diálisis peritoneal, CAZ: ceftazidima, IMP: imipenem, MEM: meropenem, CMI: Concentración mínima inhibitoria.

Las secuencias obtenidas, se analizaron con respecto a cuatro variantes de L2 reportadas en el GenBank. Ninguna es idéntica a las reportadas por lo que nuestras cepas pueden portar nuevos alelos de L2. Con las secuencias de aminoácidos obtenidas, se confirmó la presencia de los motivos: STXK, SDN y KTG conservados en las β -lactamasas de clase A, los aminoácidos conservados dentro el lazo Ω : RXEXXXN, así como los residuos de aminoácidos que forman el sitio activo de estas enzimas. Los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de L2a, L2b, L2c, L2d y L2 de las cepas StN1, StN36 y la localización de los motivos conservados en las β -lactamasas de clase A se visualizan en la figura 14, los resultados de este análisis se resumen en la tabla 19.

Tabla 19. Análisis de las secuencias de aminoácidos de L2 de StN1 y StN36.

Cepa	Alelo <i>bla_{L2}</i>	Módulo <i>ampR-bla_{L2}</i>	Motivos conservados de las β -lactamasas clase A			Cambios en el sitio activo	% de identidad con L2a, L2b, L2c o L2d
			STXK	SND	KTG		
			StN1	Nuevo alelo	(-)		
StN36	Nuevo alelo	(+)	(+)	(+)	(+)	ninguno	90% con L2d

7.7 Amplificación de genes de resistencia para quinolonas (*Smqnr*)

Nueve de las 11 cepas resistentes a LVX portan *Smqnr*. En la figura 15 se visualizan los productos obtenidos de la amplificación de *Smqnr* (561 pb) de algunas cepas de estudio.

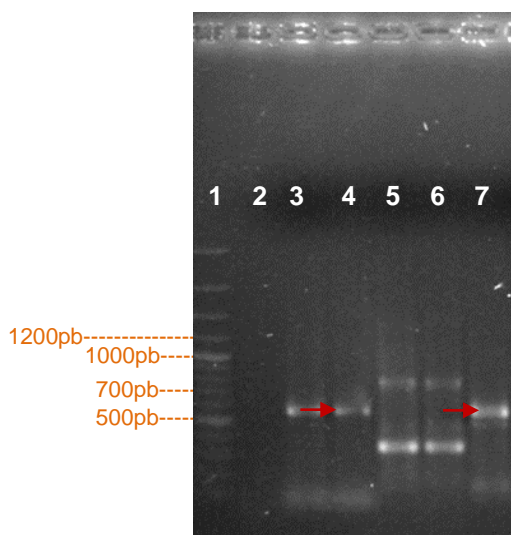


Figura 15. Amplificación del gen *Smqnr*. Carril(C) 1: marcador de peso molecular, C 2: blanco, C 3: StN08, C 4: StN09, C 5: StN13, C 6: StN14, C 7: StN18. Las flechas rojas indican el producto esperado.

El gen *Smqnr* de la cepa StN9 se purificó y se mandó a secuenciar. Tras la obtención de la secuencia de nucleótidos, se realizó la traducción a aminoácidos obteniendo la siguiente secuencia:

**LTATEFINCSFYDADSRAGCRFNGATLKEASFRSCDISMCHFNFIKALGLEISE
CRAQGADFSSASFMNQITTRS**W**FCSAFIKKSNLRYANFSRVTLKCELWENR
WDGANVSGASFAGSDLGGQFEGIDWNSANFTDCDLTNSSELGELDLRSTNL
RGATLDVQQVAL**

Se identificó un cambio en la secuencia de aminoácidos con respecto a SmQnr21, (**W/G**) y un porcentaje de identidad del 99%. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de SmQnr de la cepa StN9 y SmQnr-21 se observa en la siguiente imagen (figura 16):

SmQnr-StN9	-----LTATEFINCSFYDADSRAGCR
SmQnr21	MESLMSPTVHRKLRIGADQYTGQKVVDQQFHECDFSGADLTATEFINCSFYDADSRAGCR *****
SmQnr-StN9	FNGATLKEASFRSCDISMCHFNFIKALGLEISECRAQGADFSSASFMNQITTRS W FCSAF
SmQnr21	FNGATLKEASFRSCDISMCHFNFIKALGLEISECRAQGADFSSASFMNQITTRS G FCSAF *****
SmQnr-StN9	IKKSNLRYANFSRVTLKCELWENRWDGANVSGASFAGSDLGGQFEGIDWNSANFTDCD
SmQnr21	IKKSNLRYANFSRVTLKCELWENRWDGANVSGASFAGSDLGGQFEGIDWNSANFTDCD *****
SmQnr-StN9	LTNSSELGELDLRSTNLRGATLDVQQVAL-----
SmQnr21	LTNSSELGELDLRSTNLRGATLDVQQVALLMQRIGITVVP *****

Figura 16. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de SmQnr de la cepa StN9 y SmQnr21. En **amarillo se muestran los cambios entre las secuencias.**

7.8 Búsqueda de genes de resistencia a sulfamidas

Las cinco cepas resistentes a SXT no amplificaron *suB*.

7.9 Amplificación de genes conservados en los integrones clase I

Ninguna de las cepas resistentes a SXT (n=5) amplificaron *suI1*, ni los genes *IntI1* y *qacEΔ1*.

7.10 Genotipificación

Se seleccionaron seis aislados; entre ellos uno que porta L1 y L2 (StN1), tres que solo portan *bla_{L1}* (StN20, StN33 y StN38) y dos que no portan las β-lactamasas L1 y L2 (StN13 y StN46) con propósito confirmar la especie, ya que como se sabe no todas las cepas de *S. maltophilia* portan *bla_{L1}* y *bla_{L2}*. Para lo cual, se realizó la amplificación y secuenciación de *rpoA* con el que se corroboró la especie y se construyó un árbol filogenético utilizando el software MEGA 6.0. En la figura 17, se observan los seis aislados y su relación filogenética con respecto a otras bacterias del genero *Stenotrophomonas*.

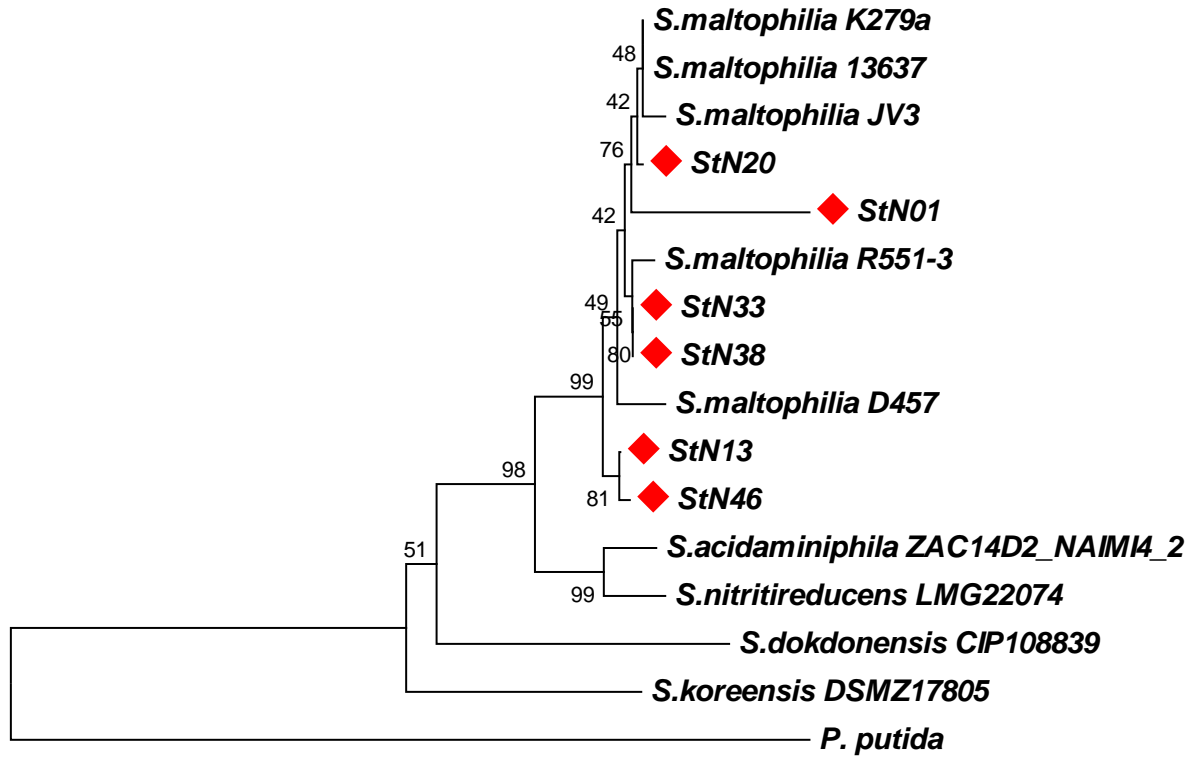


Figura 17. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *rpoA* de las especies de *Stenotrophomonas*. El árbol fue obtenido usando el método Neighbor-Joining con el programa MEGA 6, se utilizaron 1000 bootstraps y *Pseudomonas putida* como out-group. Las cepas de estudio están marcadas con rojo. Los nombres de las cepas y (número de acceso en GenBank) son los siguientes: *S. maltophilia* D457 (NC_017671.1), *S. maltophilia* JV3 (NC_015947.1), *S. maltophilia* K279a (AM743169.1), *S. acidaminiphila* ZAC14D2_NAIMI4_2 (CP012900.1), *S. maltophilia* R551-3 (CP001111.1), *S. maltophilia* 13637(CP008838.1), *S. dokdonensis* (CIP108839), *S. koreensis* DSMZ17805 (EU159014.1), *S. nitritireducens* LMG 22074 (EU159013.1), *S. acidaminiphila* LMG 22073 (EU159012.1), *P. putida* strain NCIB 9816-4 (AF506984.1).

En la tabla 20 se resumen las características de las cepas de estudio así como los diferentes mecanismos de resistencia que presentan.

Tabla 20. Resumen de las características de las cepas de estudio y sus mecanismos de resistencia.

Cepa	Origen de la muestra	Servicio	CMI (µg/mL)							Mapa genómico de <i>bla</i> _{L1} y <i>bla</i> _{L2}	Genotipo parcial de resistencia	Tipificación <i>rpoA</i>
			CAZ	IPM	MEM	LVX	SXT	C	MIN			
StN1	Tejido graso de pierna	CX	64	>128	128	4	38	24	1	<i>bla</i> _{L1} -CAO	<i>bla</i> _{L2} , <i>bla</i> _{L1}	<i>S. maltophilia</i>
StN10	LDP	MI	32	>128	>128	4	38	16	1	<i>bla</i> _{L1} -CAO <i>ampR-bla</i> _{L2}	<i>bla</i> _{L2} , <i>bla</i> _{L1}	amplificado
StN12	S. HX. Abdominal	OH	64	>128	64	4	20	8	1	rTonB- <i>bla</i> _{L1} -CAO	<i>bla</i> _{L1}	amplificado
StN13	S. HX. en pierna	MI	64	>128	32	8	76	8	1	No amplifico	---	<i>S. maltophilia</i>
StN15	LDP	MI	>256	>128	128	6	60	16	1	rTonB- <i>bla</i> _{L1} -CAO	<i>bla</i> _{L2} , <i>bla</i> _{L1}	amplificado
StN16	LDP	UCI	128	>128	>128	4	60	8	1	rTonB- <i>bla</i> _{L1} -CAO	<i>bla</i> _{L1}	amplificado
StN17	S. vulvar	UCI	8	>128	>128	4	60	16	1	<i>bla</i> _{L1} -CAO <i>ampR-bla</i> _{L2}	<i>bla</i> _{L2} , <i>bla</i> _{L1}	amplificado
StN18	S. HX. QX. de gastrostomía	UCI	256	>128	>128	64	76	32	2	rTonB- <i>bla</i> _{L1} -CAO	<i>bla</i> _{L2} , <i>bla</i> _{L1} <i>Smqnr</i>	amplificado
StN19	S. de traqueotomía	U	128	>128	64	6	38	8	1	rTonB- <i>bla</i> _{L1} -CAO	<i>bla</i> _{L1}	amplificado
StN20	LDP	MI	128	>128	>128	6	38	8	1	rTonB- <i>bla</i> _{L1} -CAO	<i>bla</i> _{L1}	<i>S. maltophilia</i>
StN21	Lesiones orales	OH	64	>128	>128	4	20	16	1	<i>bla</i> _{L1} -CAO <i>ampR-bla</i> _{L2}	<i>bla</i> _{L2} , <i>bla</i> _{L1}	amplificado
StN22	LDP	U	128	>128	>128	4	38	8	1	rTonB- <i>bla</i> _{L1} -CAO	<i>bla</i> _{L2} , <i>bla</i> _{L1}	amplificado
StN23	LDP	MI	64	>128	128	2	38	16	1	rTonB- <i>bla</i> _{L1} -CAO	<i>bla</i> _{L2} , <i>bla</i> _{L1}	amplificado

StN25	S. HX. Abdominal	CX	64	>128	128	2	38	16	1	<i>bla</i> _{L1} -CAO <i>ampR</i> - <i>bla</i> _{L2}	<i>bla</i> _{L2} , <i>bla</i> _{L1}	amplificado
StN28	S. HX. Abdominal	CX	128	>128	128	2	38	8	1	<i>bla</i> _{L1} -CAO <i>ampR</i> - <i>bla</i> _{L2}	<i>bla</i> _{L2} , <i>bla</i> _{L1}	amplificado
StN29	LDP	MI	128	>128	>128	2	20	8	1	rTonB- <i>bla</i> _{L1} -CAO	<i>bla</i> _{L2} , <i>bla</i> _{L1}	amplificado
StN31	S. HX. en Sacro	OH	256	>128	>128	4	38	16	1	<i>bla</i> _{L1} -CAO	<i>bla</i> _{L2} , <i>bla</i> _{L1}	amplificado
StN33	S. HX. en Sacro	OH	256	>128	>128	4	60	24	1	rTonB- <i>bla</i> _{L1} -CAO	<i>bla</i> _{L1}	<i>S. maltophilia</i>
StN35	LDP	MI	256	>128	>128	8	38	8	1	<i>bla</i> _{L1} -CAO	<i>bla</i> _{L2} , <i>bla</i> _{L1} <i>Smqnr</i>	amplificado
StN36	LDP	MI	256	>128	128	16	60	8	1	<i>bla</i> _{L1} -CAO <i>ampR</i> - <i>bla</i> _{L2}	<i>bla</i> _{L2} , <i>bla</i> _{L1} <i>Smqnr</i>	amplificado
StN37	LDP	U	64	>128	64	16	38	16	1	rTonB- <i>bla</i> _{L1} -CAO <i>ampR</i> - <i>bla</i> _{L2}	<i>bla</i> _{L2} , <i>bla</i> _{L1} <i>Smqnr</i>	amplificado
StN38	LDP	MI	256	>128	>128	8	20	8	1	rTonB- <i>bla</i> _{L1} -CAO	<i>bla</i> _{L1} <i>Smqnr</i>	<i>S. maltophilia</i>
StN41	LDP	MI	128	128	128	6	38	8	2	rTonB- <i>bla</i> _{L1} -CAO	<i>bla</i> _{L2} , <i>bla</i> _{L1}	amplificado
StN45	LDP	MI	>256	128	128	32	38	16	4	rTonB- <i>bla</i> _{L1} -CAO	<i>bla</i> _{L2} <i>bla</i> _{L1} <i>Smqnr</i>	amplificado
StN46	S. HX. de cabeza	UCI	16	>128	128	6	152	16	2	No amplifico	---	<i>S. maltophilia</i>
LDP: Líquido de diálisis peritoneal, CMI: Concentración mínima inhibitoria, U: Urología, CX: Cirugía, UCI: Unidad de Cuidados Intensivos, OH: Oncohematología, MI: Medicina Interna, S: Secreción, S. HX.: Secreción de herida, S. HX. QX.: Secreción de herida quirúrgica. CAZ: ceftazidima, IMP: imipenem, MEM: meropenem, LVX: Levofloxacino, C: cloranfenicol, MIN: minociclina, STX: trimetoprima-sulfametoxazol.												

8. DISCUSIÓN

Stenotrophomonas maltophilia es una bacteria que se ha convertido en una amenaza a nivel hospitalario para la salud y su tasa de aislamiento está aumentando (Senol, 2004; Nayyar *et al.*, 2017). Actualmente es el tercer patógeno nosocomial más común de las bacterias gramnegativas no fermentadoras, después de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Abbott *et al.*, 2011). Se recibieron 45 cepas de *S. maltophilia* en su mayoría aisladas de líquido de diálisis peritoneal, no coincidiendo con los reportes a nivel mundial, donde la bacteria se asocia a infecciones de tracto respiratorio provocando neumonías y bacteremias (García & Costa, 2008). Estos resultados se justifican porque el LMHC-CICM recibe del HNP aislados procedentes de muestras de secreciones y no todos los tipos de muestras, lo cual puede mostrar este sesgo.

El uso de ceftazidima contra *S. maltophilia* es limitado y los porcentajes de resistencia de las cepas de esta bacteria al antibiótico varía. Estudios realizados durante 2009-2012 han mostrado tasas de resistencia mayores al 30% (30.5-36.8%) para este antibiótico (Chang *et al.*, 2015). En el presente trabajo, la tasa de resistencia a CAZ fue 92%, que es mayor al 41.2% y 52.3% reportado en otros estudios realizados en nuestro país (Flores-Treviño *et al.*, 2014; Herrera *et al.*, 2017).

El 16% de las cepas fueron resistentes a trimetoprima-sulfametoxazol (SXT) y el 34% a levofloxacino (LVX), ambos fármacos son los más usados para tratar infecciones por esta bacteria. En contraste con nuestros resultados Church *et al.*, 2012 reportaron niveles similares de resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol (17%) y el 26% fue resistente a levofloxacino. Otros porcentajes de resistencia para SXT, en diferentes regiones del mundo son: 18% en Japón, 8% en la región Asia-Pacífico, 10% en Europa, 15% en Turquía, mientras que en Taiwán 25% y en España 27% (Looney *et al.*, 2009). El aumento de las tasas de resistencia a SXT y LVX, es alarmante y un problema de preocupación científica. En este hospital las cepas resistentes a LVX se obtuvieron durante los años más recientes y las cepas resistentes a SXT fueron recolectadas durante todo el periodo de estudio, por lo que,

se debe cuidar el uso de ambos antibióticos y emplear tratamientos combinados usando otras quinolonas; como moxifloxacino, que tiene un buen efecto antibacteriano contra *S. maltophilia* (Jia *et al.*, 2015).

La minociclina ha mostrado buena actividad contra *S. maltophilia* en diversas regiones del mundo; el programa SENTRY reporta un porcentaje de sensibilidad a este antibiótico de más de 99% en aislados de *S. maltophilia* de pacientes con neumonía en hospitales de Estados Unidos de América, Europa y la Región Mediterránea en 2009-2012 (Sader *et al.*, 2014). En el presente estudio todas las cepas fueron sensibles a minociclina. Sin embargo, el uso de este antibiótico es limitado ya que puede ocasionar tinción de los dientes e hipoplasia del esmalte y en los niños puede producir hipertensión intracraneal y retraso del crecimiento, por lo que se emplea exclusivamente cuando no existe alternativa terapéutica (Moraga *et al.*, 2014).

En trabajos previos el porcentaje de susceptibilidad de *S. maltophilia* frente a cloranfenicol fue de 11,5% al 81,4% (Herrera *et al.*, 2017; Sader *et al.*, 2014) y en éste estudio el 9% de los aislados de *S. maltophilia* fueron resistentes a este antibiótico. Aunque, debido a que cloranfenicol es muy tóxico se recomienda reservarlo para las infecciones producidas por microorganismos sensibles cuando no haya otra opción de tratamiento (Moraga *et al.*, 2014).

S. maltophilia es resistente a los antibióticos carbapenémicos debido a la presencia de la M β L cromosómica e inducible L1, codificada por el gen *bla_{L1}*. Este gen estuvo presente en el 76% de 25 cepas, utilizando los oligonucleótidos L1-F/L1-R. Sin embargo, cuando se amplificó el mapa genómico de L1, 14 cepas presentan rTonB-*bla_{L1}*-CAO, nueve solo *bla_{L1}*-CAO y dos no portan L1. Por lo tanto, el 95% de las cepas portan *bla_{L1}*, este porcentaje es mayor al reportado en México (77%) (Flores-Treviño *et al.*, 2014) y Japón (21%) (Yang *et al.*, 2014) en aislados clínicos de *S. maltophilia*. Por lo que la identificación de *bla_{L1}* es complicada, ya que este gen es muy variable, como encontramos en este estudio, por esa razón es que los oligonucleótidos L1-F/L1-R no fueron útiles para detectar L1 en algunas cepas de

este trabajo. Además, los genes que flanquean a *bla*_{L1} pueden ser variables. Por otro lado, en este trabajo se encontraron cepas con el mapa genómico de *bla*_{L1}; *bla*_{L1}-CAO, lo que indica que rTonB tiene variaciones o no está en nuestras cepas. También, no existen muchos estudios respecto al mapa genómico de *bla*_{L1}, ya que en el GenBank solo se han reportado las secuencias nucleotídicas del mapa genómico de cuatro cepas. En este contexto, es probable que las cepas que no amplificaron L1, con ninguno de los juegos de oligonucleótidos empleados: StN13 y StN46, presenten un mapa genómico diferente para L1 y por este motivo los oligonucleótidos diseñados en este trabajo no fueron útiles para detectar *bla*_{L1}, por lo tanto, se sugiere secuenciar el genoma de StN13 o StN46, para confirmar la presencia de L1.

El gen *bla*_{L2} estuvo presente en el 72% de las cepas, que es mayor al 67% detectado en otro estudio realizado en nuestro país por Flores Treviño *et al.*, 2014. El mapa genómico de L2: *ampR-bla*_{L2}, fue identificado en 2008, en el genoma de *S. maltophilia* K279a (Okazaki & Avison, 2008). Por su parte, Chang *et al.*, 2010 reportaron las secuencias de *ampR-bla*_{L2} de 16 aislados clínicos. En este trabajo de 18 cepas portadoras de L2 solo siete tienen el mapa genómico *ampR-bla*_{L2}. Por lo que es probable que *ampR* en nuestras cepas sea variable con respecto a los reportados en otros trabajos (Chang *et al.*, 2010; Crossman *et al.*, 2008) o que no se encuentre río arriba de *bla*_{L2} y por este motivo no se pudo amplificar en este estudio.

Es interesante mencionar que las cepas StN13 y StN14, no amplificaron las β-lactamasas L1 y L2; sin embargo, son resistentes a IMP y MEM. Lo que nos llevó a buscar otras β-lactamasas involucradas en la resistencia a los antibióticos carbapenémicos como *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{KPC}, obteniéndose como resultado que las dos cepas no son portadoras de las variantes de las β-lactamasas buscadas en este estudio. Estos resultados se explican porque la distribución de estas β-lactamasas en aislados clínicos de *S. maltophilia* es muy baja. Un estudio (Yang *et al.*, 2014), encontró que la cepa con denominación *S. maltophilia* DCPS-01 contenía *bla*_{NDM-1}, además de L1 y L2, y que era resistente a todos los β-lactámicos y sensible a colistina y a las fluoroquinolonas. Otro trabajo realizado en Taiwán, identificó un

aislado que porta *bla_{IMP-8}* (Liaw *et al.*, 2010). Y no existen reportes de cepas de *S. maltophilia* que porten VIM y KPC.

Por otra parte se sabe que la MβL L1 es una enzima que pertenece a la subclase B3 y muestra dos motivos de unión a Zn²⁺; el Zinc1 está tetraédricamente coordinado por His/Gln116, His118 y His196 y una molécula de agua o un hidróxido (OH⁻), el Zinc2 tiene una esfera de coordinación trigonal-piramidal, es un sitio DHH: Asp120, His121 y His263 y una molécula de agua (Jeon *et al.*, 2015; Morán-Barrio *et al.*, 2016). Una tercera molécula de agua participa como ligando, dando lugar a una esfera de coordinación piramidal cuadrada de Zn²⁺, arquitectura de sitio metálico de L1 (Ullah *et al.*, 1998). Además del motivo de unión a zinc, el sitio activo de L1 está rodeado en la parte superior por un bolsillo hidrófobo formado por los residuos: Trp38, Tyr33, Ile162, Phe156 y Pro227 y la parte inferior por una región hidrófila: Ser225 (Nauton *et al.*, 2008). En este contexto, se buscaron los residuos de los aminoácidos que forman parte del sitio activo de L1 en las 11 cepas secuenciadas, puesto que las mutaciones en este sitio podrían provocar cambios en la actividad catalítica, y se observó que todas las cepas conservan el motivo de unión a zinc, aunque de las cepas StN18, StN29 y StN38 no fue posible secuenciar el último fragmento que correspondería al residuo 263, por lo que queda por completar las secuencias. Si bien con las secuencias de aminoácidos obtenidas ninguna cepa presentó cambios en los otros seis residuos que forman parte del sitio activo reportado (Nauton *et al.*, 2008), en casi de la mitad de las cepas (StN1, StN10, StN17, StN21 y StN25) no fue posible secuenciar la primera quinta parte de la enzima (ver figura 10). Entonces, el análisis del sitio activo de L1 de nuestras cepas no está completo, por tanto, se sugiere completar las secuencias de la enzima, para su estudio.

S. maltophilia produce una MβL inducible con actividad carbapenemasa (L1) que le confiere altos niveles de resistencia a IMP y en menor medida a MEM (Howe *et al.*, 1997; Valdezate *et al.*, 2001). Curiosamente, las 11 cepas que seleccionamos para el estudio de L1 presentaron CMI diferentes para MEM (tabla 16). Esto podría indicar que el nivel de resistencia no depende sólo de la presencia del gen *bla_{L1}*, sino de la variabilidad de la enzima L1, por lo que la estudiamos. L1 está formada por 290

aminoácidos y se han reportado varios alelos de esta enzima que tienen del 3% a 21% de heterogeneidad entre las secuencias de aminoácidos, esta divergencia es única en esta familia de enzimas, puesto que no se ha demostrado que otros tipos de β -lactamasas cromosómicas, tengan tal heterogeneidad dentro de la misma especie de bacteria (Sanschagrín *et al.*, 1998; Avison *et al.*, 2001). Se reportó que L1 de las cepas *S. maltophilia* IID1275 (L1a) y *S. maltophilia* GN12873 (L1b) presentaron de 12 a 14% heterogeneidad entre las secuencias de nucleótidos y las comparaciones entre las secuencias de aminoácidos mostró 33 cambios (Walsh *et al.*, 1994; Sanschagrín *et al.*, 1998). Tres secuencias distintas se recuperaron tras secuenciar L1 a partir de aislados clínicos de *S. maltophilia*; K279a (L1c), J675a (L1d) y N531 (L1e). Las proteínas L1c, L1d y L1e son 11, 8 y 19% divergentes de L1a, respectivamente (Avison *et al.*, 2001). Otros estudios (Hu *et al.*, 2008; Mercuri *et al.*, 2002), han reportado diferentes alelos de L1 resaltando la heterogeneidad alélica de esta M β L, no obstante, no se ha determinado a que variante corresponden. En nuestro trabajo, luego de analizar L1 de la cepa StN12, esta resultó ser 100% idéntica al alelo L1c previamente descrito en *S. maltophilia* K279a (Avison *et al.*, 2001) y el resto de las cepas portan nuevos alelos, en los que se observaron varias diferencias de aminoácidos no conservados con respecto a L1a, L1b, L1c, L1d y L1e (ver figura 10).

Estas nuevas variantes de L1 pueden ser las responsables de los altos niveles de resistencia a MEM. Por lo que, se propone realizar la descripción funcional de estas proteínas o bien efectuar *docking* molecular (Bush & Jacoby, 2010; Elokely & Doerksen, 2013), para analizar si cambios en los residuos de aminoácidos que se encuentran cerca del sitio activo (*loops* 1 y 2) afectan el acoplamiento del sustrato y por lo tanto aumenta su actividad hidrolítica a MEM. Por otro lado, la sobreexpresión de las bombas de expulsión SmeABC y SmeDEF desempeñan un papel importante en la resistencia de *S. maltophilia* a meropenem (Chang *et al.*, 2004) y podría ser la causa de las altas CMI a MEM observadas en la mayoría de las cepas.

La determinación del sitio activo de L1 (Jeon *et al.*, 2015; Nauton *et al.*, 2008) ha llevado a la identificación de residuos clave implicados en la unión del sustrato y la

hidrolisis de los antibióticos β -lactámicos (carbapenémicos). Sin embargo, es probable que cambios en los residuos adyacentes a estos aminoácidos distorsionen su orientación y afecten la actividad de la enzima o no se observen modificaciones, ya que se ha reportado que mutaciones en el *loop2* de las β -lactamasas subclase B3, aumentan o disminuyen su afinidad por el sustrato, por ejemplo: Gln157 ocasiona una conformación estructural diferente en el *loop2* de SMB-1 con respecto a AIM-1, L1, FEZ-1 y BJP-1 y aumenta cuatro veces la CMI a IMP y CAZ (Wachino *et al.*, 2013). Por esta razón, se realizó el modelaje de L1 de las cepas StN12 (L1c), StN19 y StN37, las cuales presentan; las mismas CMI para los carbapenémicos, L1 de StN19 y StN37 tienen 37 y 32 cambios, respectivamente con respecto L1c. No obstante, en el modelaje no se observan cambios a nivel estructural (*loops* 1 y 2), ver figura 13.

Las cepas StN1 y StN36 fueron seleccionadas para estudiar L2, por lo interesante de sus CMI a CAZ; sin embargo, no se obtuvieron las secuencias de aminoácidos correspondientes a los extremos N-terminal y C-terminal. La β -lactamasa L2 está formada por 303 aminoácidos, esta familia de enzimas presenta una identidad del 68% a 99% (Hu *et al.*, 2009). La primera L2 (L2a) fue descrita en Reino Unido (Walsh *et al.*, 1997). Luego, un trabajo, reportó tres secuencias distintas de L2, a partir de tres aislados de *S. maltophilia*; K279a, J675a, y N531, nombradas; L2b, L2c, y L2d, respectivamente. Las enzimas L2b, L2c y L2d son 93, 95 y 68% idénticas a L2a, respectivamente (Avison *et al.*, 2001). Posteriormente, otros estudios reportaron diferentes alelos que muestran un porcentaje de divergencia del 30 al 32% (Chang *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2009). En nuestro estudio, luego de realizar el análisis de las secuencias de aminoácidos, se determinó que StN1 y StN36 portan nuevos alelos de L2. Estos alelos presentaron 63% de identidad entre ellos y más de 60% de identidad con respecto a L2a, L2b, L2c y L2d.

El aminoácido Ser70 es el residuo catalítico primario de las β -lactamasas de clase A, no obstante, se han identificado otros residuos que son catalíticamente importantes: Lys73, Glu166, Ser130, Lys234 (residuos catalíticos secundarios) y Asn136, Arg164, Asp179 son otros residuos importantes para el mantenimiento de

la estructura del sitio activo (Verma *et al.*, 2013). Estos residuos fueron localizados en las secuencias L2 de StN1 y StN36. En cuanto a la búsqueda de los elementos característicos de las β -lactamasas de clase A, los motivos: STXK (aa: 83-86), SDN (aa:143-145) y KTG (aa: 247-249), incluidos los residuos de aminoácidos conservados en el *loop* Ω (aa: 164-170: RXEXXXN), fueron identificados en las secuencias de aminoácidos de L2 de StN1 y StN36 (ver figura 14). Lo que indica que las enzimas que portan nuestras cepas presentarían actividad catalítica, puesto que los residuos de aminoácidos de estos elementos, principalmente STXK y RXEXXXN, están involucrados en la unión del sustrato y el mecanismo catalítico (Banerjee *et al.*, 1998; Philippon *et al.*, 2016). Queda por completar la secuencia de L2 de las cepas StN1 y StN36 y realizar su caracterización bioquímica, para relacionarlo con la gran diferencia en la CMI a CAZ. Sin embargo, L1 también está involucrada en la resistencia a este antibiótico (Ullah *et al.*, 1998), de manera que, sería interesante estudiar L1 de la cepa StN36. Además, la sobreexpresión de SmeABC y SmeDEF se han asociado con la resistencia a CAZ (Liaw *et al.*, 2010; Herrera *et al.*, 2017). Por lo que es probable que la producción de las β -lactamasas L1 y L2, así como la sobreexpresión de SmeABC y/o SmeDEF sean los mecanismos responsables de que StN36 presente una alta CMI a CAZ (CMI= 256 μ g/mL).

Con respecto a los mecanismos de resistencia a quinolonas, desde el descubrimiento los genes *qnr*, en el plásmido pMG252 de 180Kb de un aislado clínico de *K. pneumoniae* en 1994, éstos fueron considerados como determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas importantes (Martínez-Martínez *et al.*, 2008). No obstante, también se han descrito en el cromosoma de diferentes bacterias como: *E. faecalis* y *S. maltophilia* (Sánchez *et al.*, 2008). Las quinolonas son el segundo grupo de antibióticos utilizados en la práctica clínica y la presencia de resistencia cromosómica limita aún más el tratamiento en infecciones con este tipo de cepas. El gen *Smqnr* codificado por *S. maltophilia* confiere baja resistencia a las fluoroquinolonas (Sánchez & Martínez, 2010) y hasta el momento se han reportado 58 variantes en el GenBank. Los genes *Smqnr* han sido estudiados por varios investigadores, reportando, que entre el 47-70% de los aislado clínicos porta *Smqnr*,

en Japón (Kanamori *et al.*, 2015) y 25% en China (Jia *et al.*, 2015), por lo que buscamos estos genes en las 11 cepas resistentes a LVX, encontrando: nueve cepas portadoras de *Smqnr*. Es muy probable que las otras dos cepas porten otros mecanismos de resistencia a LVX, como, la sobreexpresión de las bombas de expulsión; en particular, *SmeDEF* que se ha relacionado con la resistencia a este antibiótico (Chong *et al.*, 2016) y *SmeABC* (Sánchez & Martínez, 2015). Por otro lado, el *SmQnr* que porta la cepa StN9 tiene un 99% de identidad con *SmQnr21*, descrito en Londres (Gordon & Wareham, 2010). Sin embargo, queda por secuenciar el gen completo, determinar la variante y su actividad frente a LVX.

Los genes *sul*, codifican para diferentes variantes de la enzima dihidrofolato sintasa y han sido relacionados con la resistencia a la sulfamidas (Hu *et al.*, 2011). Varios estudios realizados en aislamientos de *S. maltophilia* han demostrado que *sul1*, asociado con integrones de clase 1, es el principal mecanismo de resistencia a SXT (Zhao *et al.*, 2017; Chung *et al.*, 2015; Kaur *et al.*, 2015; Tanimoto, 2013; Neela *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2007; Toleman *et al.*, 2007), debido a esto, se decidió estudiar los integrones clase1, ya que son estructuras que capturan y acarrean diversos genes de resistencia, principalmente resistencia a antimicrobianos (Yauri *et al.*, 2016); obteniéndose como resultado que las cepas resistentes a SXT no portan *sul1*, así como el gen de la integrasa de clase 1 y *qacEΔ1*. *sul3* ha sido encontrado mayormente en integrones de Enterobacterias, como *Escherichia coli* y *Salmonella* (Jiang *et al.*, 2017); sin embargo, recientemente un grupo de investigadores informo la presencia de este gen en 12 aislados de *S. maltophilia* resistentes a SXT (Malekan *et al.*, 2017) y en este estudio estuvo ausente. Algunos estudios han indicado que *sul2* puede mediar resistencia a SXT en *S. maltophilia* (Zhao *et al.*, 2017; Kaur *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2011), por lo que se recomienda buscarlo en próximos estudios. Por otra parte, se ha informado que los genes *dfrA* dan lugar a un alto nivel de resistencia a SXT en aislados de *S. maltophilia* (Hu *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2011) y probablemente sean la causa de las altas CMI observadas en algunas cepas.

La sobreexpresión de la bomba de expulsión *SmeDEF* contribuye a la resistencia a SXT en *S. maltophilia* (Sánchez & Martínez, 2015). La bomba de expulsión *SmeYZ*

(Lin *et al.*, 2015) y la porina TolCsm asociada con SmeO y SmeP, podrían coadyuvar con el fenotipo de resistencia a SXT (Sánchez, 2015). Por lo que, se sugiere estudiar estas bombas y buscar los genes *dfrA* y *sul2*, para conocer los mecanismos asociados con la resistencia a SXT en las infecciones por *S. maltophilia* en el HNP.

En resumen, *S. maltophilia* es un patógeno nosocomial emergente con resistencia intrínseca a muchos agentes antimicrobianos. Este estudio evidencia la diversidad del mapa genómico de *bla_{L1}* y *bla_{L2}* y su elevada divergencia, esta puede ser la responsable de los altos niveles de resistencia a CAZ y MEM. Se muestra que el tratamiento más adecuado de las infecciones ocasionadas por *S. maltophilia* en este hospital es SXT. Por lo tanto, este tipo de estudios se deben llevar a cabo para conocer el tipo de bacterias circulantes en cada hospital, poder establecer mejores estrategias de tratamiento para infecciones por *S. maltophilia* en las distintas poblaciones de pacientes y contribuir con las estadísticas mundiales.

9. CONCLUSIONES

- ✓ El 16% de las cepas fue resistente a trimetoprima-sulfametoxazol (SXT) y el 34% a levofloxacino (LVX).
- ✓ Más del 90% de las cepas es resistente a ceftazidima.
- ✓ El 95% de las cepas porta *bla_{L1}* y el 72% *bla_{L2}*.
- ✓ El 64% de las cepas presenta el mapa genómico de *bla_{L1}*: rTonB-*bla_{L1}*-CAO.
- ✓ Las cepas StN13 y StN46 no portan *bla_{L1}* y *bla_{L2}* ni las β-lactamasas: IMP, VIM, NDM y KPC-2.
- ✓ Se confirmó la gran variabilidad de L1 y L2, se detectaron nuevos alelos de ambas β-lactamasas y se describieron dos nuevos alelos L1 (L1-StN19 y L1-StN37).
- ✓ Nueve de las 11 cepas resistentes a LVX portan *Smqnr*.
- ✓ Las cepas resistentes a SXT no portan integrones clase I y *suI3*.
- ✓ Las cepas seleccionadas para genotipificación corresponden a *S. maltophilia*.

10. PERSPECTIVAS

- Clonar los dos nuevos alelos L1 de las cepas StN19 y StN37 para saber su espectro de hidrólisis y realizar la caracterización enzimática.
- Secuenciar otras cepas que amplificaron rTonB-*bla*_{L1}-CAO, ya que pudiera haber otras variantes nuevas de L1.
- Examinar si otras β -lactamasas como: SPM y OXA, están presentes en las cepas resistentes a IMP y MEM y que no portan *bla*_{L1} y *bla*_{L2}.
- Realizar estudios de sobreexpresión de bombas (SmeDEF y SmeABC) y detección de genes *qnr* plasmídicos, en las cepas con resistencia a LVX, para identificar el mecanismo involucrado en este fenotipo.
- Efectuar la amplificación de *sul2* y *dfrA* en las cepas resistentes a SXT.
- Realizar la búsqueda de otros mecanismos de resistencia que puedan explicar la resistencia a SXT.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, I. & Peleg, A.** (2015). *Stenotrophomonas, Achromobacter, and Nonmelioid Burkholderia* Species: Antimicrobial Resistance and Therapeutic Strategies. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 36. 99-110.
- Abbott, I., Slavin, M., Turnidge, J. D., Thursky, K., Worth L.** (2011). *Stenotrophomonas maltophilia*: emerging disease patterns and challenges for treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 9 (4): 471–488.
- Adamek, M., Linke, B., Schwartz, T.** (2014). Virulence genes in clinical and environmental *Stenotrophomas maltophilia* isolates: a genome sequencing and gene expression approach. *Microb Pathog*. 67-68: 20-30.
- Akpaka, P. E., Swanston, W. H., Ihemere, H. N., Correa, A., Torres, J. A., Tafur, J. D., Villegas, M. V.** (2009). Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(8), 2670–2671.
- Al-Anazi, K. A., Al-Jasser, A. M.** (2014). Infections Caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in Recipients of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Frontiers in Oncology*. 4 (232):1-10.
- Alonso, A., Martinez, J. L.** (2001). Expression of multidrug efflux pump SmeDEF by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 45:1879-1881.
- Anderson, S. W., Stapp, J. R., Burns, J. L., Qin, X.** (2007). Characterization of small-colony-variant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the sputum specimens of five patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 45: 529-535.
- Avison, M. B., Heldreich, C. J., Higgins, C. S., Bennett, P. M., Walsh, T. R.** (2000). A TEM-2 beta-lactamase encoded on an active Tn1-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*. 46, 879-884.
- Avison, M. B., Higgins, C. S., Von, C. J., Bennett, P. M., Walsh, T. R.** (2001). Plasmid Location and Molecular Heterogeneity of the L1 and L2 β -Lactamase Genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 5(2), 413–419.
- Banerjee, S., Pieper, U., Kapadia, G., Pannell, L. K., & Herzberg, O.** (1998). Role of the omega-loop in the activity, substrate specificity, and structure of class A beta-lactamase. *Biochemistry*, 37(97), 3286–3296.

- Barbolla, R., Catalano, M., Orman, B. E., Famiglietti, A., Vay, C., Smayevsky, J., Centrón, D., Piñeiro, S. A.** (2004). Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 666-669.
- Bebrone, C.** (2007). Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical Pharmacology*, 74(12), 1686–1701.
- Bello, L. M.** (2015). Tesis de Maestría. ESTUDIO MOLECULAR DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* CAUSANTES DE INFECCIONES NOSOCOMIALES. Centro De Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Blair, J. M., Piddock, L. J.** (2009). Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 12: 512-519.
- Brooke, J. S.** (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinic Microbio Rev.* 25 (1), 2-41.
- Brooke, J. S.** (2014). New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious worldwide intrinsically drug-resistant opportunistic pathogen. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 12(1), 1–4.
- Bush, K., & Jacoby, G. A.** (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976.
- Cerezer, V. G., Bando, S. Y., Pasternak, J., Franzolin, M. R., & Moreira-filho, C. A.** (2014). Phylogenetic Analysis of *Stenotrophomonas spp.* Isolates Contributes to the Identification of Nosocomial and Community-Acquired Infections. *BioMed Research International*, 2014(15145), 1–13.
- Chang Y. T., Lin C. Y., Chen Y. H. & Hsueh P. R.** (2015). Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Front Microbiol.* 6 (893): 1-20.
- Chang, L.-L., Chen, H.-F., Chang, C.-Y., Lee, T.-M., & Wu, W.-J.** (2004). Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(3), 518–521.
- Chang, L.-L., Lin, H.-H., Chang, C.-Y., & Lu, P.-L.** (2007). Increased incidence of class 1 integrons in trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,

59(5), 1038–9.

- Chang, Y. C., Huang, Y. W., Chiang, K. H., Yang, T. C., & Chung, T. C.** (2010). Introduction of an AmpR-L2 intergenic segment attenuates the induced β -lactamase activity of *Stenotrophomonas maltophilia*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 29(7), 887–890.
- Chen, C. H., Huang, C. C., Chung, T. C., Hu, R. M., Huang, Y. W., Yang, T. C.** (2011). Contribution of resistance-nodulation-division efflux pump operon smeU1-V-W-U2-X to multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 5826–5833.
- Chong, S. Y., Lee, K., Chung, H.-S., Hong, S. G., Suh, Y., & Chong, Y.** (2016). Levofloxacin Efflux and smeD in Clinical Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Microbial Drug Resistance*, 23(2), 163–168.
- Chung, HS, Kim, K, Hong, SS, Hong, SG, Lee, K & Chong, Y.** (2015). The *sul1* Gene in *Stenotrophomonas maltophilia* with High-Level Resistance to Trimethoprim/Sulfamethoxazole. *Ann Lab Med.* 35(2), 246-9.
- Church, D., Lloyd, T., Peirano, G. & Pitout, J.** (2012). Antimicrobial susceptibility and combination testing of invasive *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Scand J Infect Dis.* 45; 265–270.
- Clinical and Laboratory Standards Institute,** (2017). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. 34(1): 68.
- Crossman, L., Gould, V., Maxwell, J., Vernikos, G., Okazaki, A., Sebahia, M., Saunders, D., Arrowsmith, C., Carver, T., Peters, N., Adlem, E., Kerhornou, A., Lord, A., Murphy, L., Seeger, K., Squares, R., Rutter, S., Quail, M., Rajandream, M.A., Harris, D., Churcher, C., Bentley, S., Parkhill J., Thomson, N. & Avison, M.B.** (2008). The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol.* 4: R74.
- Elokely, K. M. & Doerksen, Robert J.** (2013). Docking challenge: Protein sampling and molecular docking performance. *J Chem Inf Model.* 53(8), 1934–1945.
- Falagas, M., Kastoris, A. C., Vouloumanou, E. K., Rafailidis, P. I., Kapaskelis, A. M., Dimopoulos, G.,** (2009). Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review of the literature. *Future Microbiol.* 4: 1103-1109.
- Fernández, F., López, L. E., Rodríguez, J.,** (2011). Contribución del laboratorio de microbiología en la vigilancia y el control de brotes nosocomiales producidos

por bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 29(3), 40-46.

- Flores, T. S., Gutiérrez-F. J. L., Morfín-O. R., Rodríguez-N. E., Estrada-R. D., Rivas-M. C., Llaca-D. J., Camacho-O. A., Mendoza-O. S., Garza-G. E.** (2014). *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico: antimicrobial resistance, biofilm formation and clonal diversity. *J Med Microbiol.* 63: 1524–1530.
- Furushita, M., Okamoto, A., Maeda, T., Ohta, M., & Shiba, T.** (2005). Isolation of Multidrug-Resistant *Stenotrophomonas maltophilia* from Cultured Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) from a Marine Fish Farm. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5598–5600.
- Garcia Paez, J. I. & Costa, S. F.** (2008). Risk factors associated with mortality of infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review. *J Hosp Infect.* 70: 101-108.
- García-León, G., Ruiz de Alegría, Puig, C., García de la Fuente, C., Martínez-Martínez, L., Martínez, J. L., & Sánchez, M. B.** (2015). High-level quinolone resistance is associated with the overexpression of *smeVWX* in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(5), 464–467.
- Gordon, N. C., & Wareham, D. W.** (2010). Novel variants of the *Smqnr* family of quinolone resistance genes in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 65(3): 483–489.
- Gould, V. C., Okazaki, A., Avison, M. B.** (2013). Coordinate hyperproduction of *SmeZ* and *SmeJK* efflux pumps extends drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 655-657.
- Gracia-Paez, J. I., Ferraz, J. R., Ivan, I. A., Rossi, F., Levin, A. S., & Costa, S. F.** (2013). *Smqnr* VARIANTS IN CLINICAL ISOLATES OF *Stenotrophomonas maltophilia* IN BRAZIL. *Rev Inst Med Trop, Sao Paulo.* 55(6), 417–420.
- Gulmez & Hascelik** (2005). *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial resistance and molecular typing of an emerging pathogen in a Turkish university hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 880–886.
- Gutiérrez, M. C. A., Reyes, G. E. y Corona, J. F.** (2007). *Stenotrophomonas maltophilia*, una bacteria multirresistente. *Rev Asoc Mex Med Crit y Ter Int.* 21(2): 91-94.
- Herrera-Heredia S. A., Pezina-Cantú C., Garza-González E., Bocanegra-Ibarias P., Mendoza-Olazarán S., Morfín-Otero R., Camacho-Ortiz A., Villarreal-Treviño L., Rodríguez-Noriega E., Paláu-Davila L., Maldonado-Garza H. J., Flores-Treviño S.** (2017). Risk factors and molecular mechanisms

associated with trimethoprim–sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico. J Med Microbiol. 66(8):1102-1109.

- Horan, T. C., Andrus, M., & Dudeck, M. A.** (2008). CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. Am J Infect Control. 6(5): 309–32.
- Howe, R. A., Wilson, M. P., Walsh, T. R., & Millar, M. R.** (1997). Susceptibility testing of *Stenotrophomonas maltophilia* to carbapenems. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 40(1), 13–17.
- Hu, L.-F., Chen, G.-S., Kong, Q.-X., Gao, L.-P., Chen, X., Ye, Y., & Li, J.-B.** (2016). Increase in the Prevalence of Resistance Determinants to Trimethoprim/Sulfamethoxazole in Clinical *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates in China. PLOS ONE, 11(6), e0157693.
- Hu, L-F., Chang X., Ye Y., Wang, Z-X, Shao Y-B., Shi W., Li X., Li, J-B.** (2011). *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of *sul* and *dfrA*(S1) genes in a plasmid-mediated class 1 integron. Int J Antimicrob Agents. 37: 230-4.
- Hu, R. M., Chiang, K. H., Chang, Y. C., Yang, T. C.** (2009). Characterization of the charge variants of L2 β -lactamase in *Stenotrophomonas maltophilia*. Journal of Medical Microbiology, 58(3), 318–321.
- Hu, R. M., Chiang, K. H., Lin, C. W., Yang, T. C.** (2008). Modified nitrocefin-EDTA method to differentially quantify the induced L1 and L2 β -lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*. Letters in Applied Microbiology, 47(5), 457–461.
- Huang, Y. W., Lin, C. W., Hu, R. M., Lin, Y. T., Chung, T. C., Yang, T. C.** (2010). AmpN-AmpG operon is essential for expression of L1 and L2 beta- lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 54: 2583–2589.
- Hugh, R. & Ryschenkow, E.** (1961) *Pseudomonas maltophilia*, an Alcaligenes-like species. J Gen Microbiol 26:123–132.
- Jeon, J. H., Lee, J. H., Lee, J. J., Park, K. S., Karim, A. M., Lee, C. R., Lee, S. H.** (2015). Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. International Journal of Molecular Sciences, 16(5), 9654–9692.
- Jia, W., Wang, J., Xu, H., & Li, G.** (2015). Resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* to fluoroquinolones: Prevalence in a university hospital and possible mechanisms. International Journal of Environmental Research and Public Health, 12(5), 5177–5195.

- Jiang, X., Xu, Y., Li, Y., Zhang, K., Liu, L., Wang, H., Tian, J., Ying, H., Shi, L. & Yu T.** (2017). Characterization and horizontal transfer of *qacH*-associated class 1 integrons in *Escherichia coli* isolated from retail meats. *Int J Food Microbiol.* 3; 258:12-17.
- Jones, R. N.** (2010). Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 51(Suppl. 1), S81–S87.
- Kanamori, H., Yano, H., Tanouchi, A., Kakuta, R., Endo, S., Ichimura, S. & Kaku, M.** (2015). Prevalence of *Smqnr* and plasmid-mediated quinolone resistance determinants in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* from Japan: Novel variants of *Smqnr*. *New Microbes and New Infections*, 7, 8–14.
- Kaur, P., Gautam, V. & Tewari R.** (2015). Distribution of Class 1 Integrons, *sul1* and *sul2* Genes Among Clinical Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* from a Tertiary Care Hospital in North India. *Microbial Drug Resistance.* 21(4): 380-385.
- Li, X. Z. & Nikaido, H.** (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria an update. *Drugs.* 69:1555- 1623.
- Li, X. Z., Zhang, L., McKay, G. A., & Poole, K.** (2003). Role of the acetyltransferase AAC (6')-Iz modifying enzyme in aminoglycoside resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(4), 803–811.
- Li, X. Z., Zhang, L., Poole K.** (2002). SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 333-343.
- Liaw, S.J., Lee, Y.L, Hsueh, P. R.** (2010). Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucomutase (SpgM), and melanin and biofilm formation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(2), 126–130.
- Lin, C. W., Huang, Y., Hu, R. M., Yang, T. C.** (2014). SmeOP-TolCSm efflux pump contributes to the multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 58: 2405-2408.
- Lin, Y. T., Huang, Y. W., Chen, S. J., Chang, C. W., & Yang, T. C.** (2015). The SmeYZ efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* contributes to drug resistance, virulence-related characteristics, and virulence in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(7), 4067–4073.
- Locosque-Ramos, P., Moreira-Filho, C. A., Van Trappen, S., Swings, J., Vos, P. De, Ramos-Barbosa, H., Thompson-Carneiro C., Vasconcelos- Ribeiro,**

- A. T., & Thompson- Lopes, F.** (2011). An MLSA-based online scheme for the rapid identification of *Stenotrophomonas* isolates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(4), 394-399.
- Looney, J., Narita, M., Muhleman, K.** (2009). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis.* 9: 312–23.
- Malekan, M., Tabaraie, B., Akhoundtabar, L., & Afrough, P.** (2017). Distribution of Class I Integron and *smqnr* Resistance Gene Among *Stenotrophomonas maltophilia* Isolated from Clinical Samples in Iran, 9(3), 14–17.
- Martínez Batista, M. L., Halley Posada, M. del C., Espinosa Rivera, F., & Hart Casares, M.** (2008). Aislamientos de *Stenotrophomonas maltophilia* en el Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras", año 2006. *Revista Cubana de Medicina*, 47(4).
- Martínez-Martínez, L., Eliecer-Cano, M., Rodríguez-Martínez, J., Calvo, J., & Pascual, Á.** (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6(5), 685–711.
- Mazel, D., Dychinco B., Webb V.A. & Davies J.** (2000). Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:1568 -74.
- Mercuri, P. S., Ishii, Y., Ma, L., Rossolini, G. M., Luzzaro, F., Amicosante, G., & Franceschini, N.** (2002). Clonal Diversity and Metallo- β -Lactamase Production in Clinical Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Microbial Drug Resistance*, 8(3), 193–200.
- Mojica, M. F., Bonomo, R. A., Fast, W., Louis, S., Cleveland, S., Affairs, V., & Division, C.** (2017). B1-Metallo-Beta-Lactamases: Where do we stand? *Curr Drug Targets.* 17(9), 1029–1050.
- Moraga, F. A. & Cabañas** (2014). *Guía de antiinfecciosos en pediatría.* 8ª edición.
- Morán-Barrio, J., Lisa, M., Larrieux, N., Drusin, S. I., Viale, A. M., & Moreno, D. M.** (2016). Crystal Structure of the Metallo- β -Lactamase GOB in the Periplasmic Dizinc Form Reveals an Unusual Metal Site. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(10), 6013–6022.
- Naas, T., Dortet, L., & Iorga, B.** (2016). Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. *Current Drug Targets*, 17(9), 1006–1028.
- Nauton, L., Kahn, R., Garau, G., Hernandez, J. F., Dideberg, O., Grenoble, F., Cedex, F. M.** (2008). Structural Insights into the Design of Inhibitors for the L1

Metallo- β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. J Mol Biol. 375, 257–269.

Nayyar, C., Thakur, P., Tak, V., & Saigal, K. (2017). *Stenotrophomonas maltophilia*: An Emerging Pathogen in Paediatric Population. J Clin Diagn Res.11(1), DC08–DC11.

Neela, V., Rankouhi, S.Z., van Belkum, A., Goering, R.V. & Awang R. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia* in Malaysia: molecular epidemiology and trimethoprim-sulfamethoxazole resistance. Int J Infect Dis. 16(8): e603-7.

Nicodemo, A. C. & Paez, J. I. (2007). Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 26: 229-237.

Nikaido, H. & Pages, J. M. (2012). Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev. 36: 340-363.

Nyč O., & Matějková J. (2010). *Stenotrophomonas maltophilia*: significant contemporary hospital pathogen – review. Folia Microbiol. 55 (3), 286–294.

Okazaki, A. & Avison, M. B. (2008). Induction of L1 and L2 -Lactamase Production in *Stenotrophomonas maltophilia* is dependent on an AmpR-Type regulator. Antimicrob Agents Chemother. 52: 1525–1528.

Okazaki, A., & Avison, M. B. (2007). Aph (3')-IIC, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51(1), 359–360.

Olivares, J., Bernardini, A., Garcia, G., Corona, F., Sanchez, M. B., Martinez, J. L. (2013). The intrinsic resistome of bacterial pathogens. Front Microbiol. 4 (103), 1-15.

Palleroni, N. J. & Bradbury, J. F. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980). Int J Syst Bacteriol. 43: 606-609.

Patil, P. P., Midha, S., Kumar, S., & Patil, P. B. (2016). Genome sequence of type strains of genus *Stenotrophomonas*. Frontiers in Microbiology, 7:309.

Perreten, V. & Boerlin, P. (2003). A new sulfonamide resistance gene (*su13*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. Antimicrob Agents Chemother; 47, 1169 -72.

Philippon, A., Slama, P., & Labia, R. (2016). A Structure-Based Classification of Class A Beta-Lactamases, a Broadly. Clinical Microbiology Reviews, 29(1), 29–57.

- Rice, L. B.** (2010). Progress and challenges in implementing the research on ESKAPE pathogens. *Infection control and hospital epidemiology*. Papers from the fifth decennial international conference on healthcare-associated infections. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 31(S1), S7-S10.
- Sader, H. S., Farrell, D. J., Flamm, R. K. & Jones R. N.** (2014). Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012. *Int J Antimicrob Agents*. 43(4), 328-34.
- Sánchez, M. B.** (2015). Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Microbiol*. 6 (658), 1-7.
- Sánchez, M. B., & Martínez, J. L.** (2010). SmQnr contributes to intrinsic resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 580–581.
- Sánchez, M. B., & Martínez, J. L.,** (2015). The efflux pump SmeDEF contributes to trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(7), 4347–4348.
- Sanchez, M. B., Hernandez, A. & Martinez, J. L.** (2009). *Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance. *Future Microbiol*. 4 (6): 655-660.
- Sánchez, M. B., Hernández, A., Rodríguez-Martínez, J. M., Martínez-Martínez, L., & Martínez, J. L.** (2008). Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. *BMC Microbiology*, 8, 148.
- Sandiumenge, A., Lisboa, T., Gomez, F., Hernandez, P., Canadel, L., Rello, J.** (2011). Effect of antibiotic diversity on ventilator-associated pneumonia caused by ESKAPE organisms. *Chest*: 40 (3): 643–651.
- Sanschagrin, F., Dufresne, J., Levesque, R. C.** (1998). Molecular Heterogeneity of the L-1 Metallo- β -Lactamase Family from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42(5), 1245–1248.
- Senol, E.** (2004). *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. *J Hosp Infect*. 57 (1), 1–7.
- Singh, R., Saxena, A., & Singh H.** (2009). Identification of group specific motifs in Beta-lactamase family of proteins. *J Biomed Sci*. 16(1); 109.
- Tada, T., Miyoshi-Akiyama, T., Dahal, R. K., Mishra, S. K., Shimada, K., Ohara, H., Pokhrel, B. M.** (2014). Identification of a Novel 6'-N-Aminoglycoside Acetyltransferase, AAC(6')-Iak, from a Multidrug-Resistant Clinical Isolate of

Stenotrophomonas maltophilia. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58(10), 6324–6327.

- Tafur, J. D., Torres, J. A. & Villegas, M. V.**, 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. Rev ACIN. 12(3):217-26.
- Tanimoto, K.** (2013). *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from a university hospital in Japan: genomic variability and antibiotic resistance, Journal of Medical Microbiology. 62: 565-570.
- Toleman, M. A., Bennett, P. M., Bennett, D. M., Jones, R. N., Walsh, T. R.** (2007). Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of *sul* genes. Emerg Infect Dis.13, 559-565.
- Tran, J. H., Jacoby, G. a, & Hooper, D. C.** (2005). Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein Qnr with *Escherichia coli* DNA Gyrase. Society, 49(1), 118–125.
- Ullah, J. H., Walsh, T. R., Taylor, I. A., Emery, D. C., Verma, C. S., Gamblin, S. J., & Spencer, J.** (1998). The Crystal Structure of the L1 Metallo- β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia* at \AA Resolution 1.7 \AA . J Mol Biol. 284, 125-136.
- Valdezate, S., Vindel, A., Loza, E., Baquero, F., & Cantón, R.** (2001). Antimicrobial Susceptibilities of Unique *Stenotrophomonas maltophilia* Clinical Strains. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45(5), 1581–1584.
- Verma, D., Jacobs, D. J., & Livesay, D. R.** (2013). Variations within Class-A β -Lactamase Physiochemical Properties Reflect Evolutionary and Environmental Patterns, but not Antibiotic Specificity. PLoS Computational Biology, 9(7), e1003155.
- Wachino, J. I., Yamaguchi, Y., Mori, S., Kurosaki, H., Arakawa, Y., & Shibayama, K.** (2013). Structural insights into the subclass B3 metallo- β -lactamase SMB-1 and the mode of inhibition by the common metallo- β -lactamase inhibitor mercaptoacetate. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57(1), 101–109.
- Walsh, T. R., Hall, L., Assinder, S. J., Nichols, W. W., Cartwright, S. J., MacGowan, A. P., Bennett, P. M.** (1994). Sequence analysis of the L1 metallo- β -lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. BBA - Gene Structure and Expression, 1218(2), 199–201.
- Walsh, T. R., MacGowan, A. P., & Bennett, P. M.** (1997). Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 41(7), 1460–4.

- Webber, M. A., & Piddock, L. J. V.** (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9–11.
- WHO/CDS/CSR/EPH.**, (2002). Prevención de las infecciones nosocomiales. Práctica. 2ª edición.
- Yang, Z., Liu, W., Cui, Q., Niu W., Li, H., Zhao, X., Wei, X., Wang, X., Huang, S., Dong, D., Lu, S., Bai, C., Li, Y., Huang, L., Yuan, J.** (2014). Prevalence and detection of *Stenotrophomonas maltophilia* carrying metallo- β -lactamase *bla_{L1}* in Beijing, China. *Front Microbiol. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, 5(692).
- Yauri, M. F., Alcocer, I. & Rodríguez-Riglos M.** (2016) Caracterización de la región variable de integrones clase 1 en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenemes. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*. 37(2), 2477-9148.
- Zhanel, G. G., Decorby, M., Adam, H., Mulvey, M. R., Mccracken, M., Lagacé-Wiens, P., et al.**, (2010). Prevalence of antimicrobial-resistant pathogens in Canadian hospitals: results of the Canadian Ward Surveillance Study (CANWARD 2008). *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4684–4693.
- Zhang, L., Li, X. & Poole K.** (2001). Fluoroquinolone susceptibilities of efflux-mediated multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia*. *J Antimicrob Chemother.* 48, 549-552.
- Zhao, S., Yang, L., Liu, H. & Gao, F.** (2017). *Stenotrophomonas maltophilia* in a university hospital of traditional Chinese medicine: molecular epidemiology and antimicrobial resistance. *J Hosp Infect.* 96(3), 286-289.

ANEXOS

Anexo 1. Alineamiento de L1a, L1b, L1c, L1d, L1e y L1 de las cepas StN19 y StN37.

L1e	MRSTLLAFALSSLALAATLFTFDGAAADASLPQLQAYTVDPSSLQTMAPLQIADHTWQIG
L1-StN19	MRSSLLALTL-----AAALPAAYAVAAETPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQIADHTWQIG
L1b	MRFTLLAFAL-----AVALPAAHASAAEAPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQVADHTWQIG
L1c	MRFTLLAFAL-----AVALPAVHASAAEAPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQVADHTWQIG
L1-StN37	MRFSLLAVTL-----AAVLPVAHASAAEAPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQIADHTWQIG
L1a	MRSTLLAFAL-----AVALPAAHTSAAEVPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQIADHTWQIG
L1d	MRSTLLAFAL-----AVALPIAHASGAETPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQIADHTWQIG ** :***.:* *..* .*:.. ***:***** ** * :***:*****
L1e	THDLTALLVQTADGLVLIIDGGMPQMASYLLTNMKARGTNTGPLRMVLLSHAHTDHAGPVA
L1-StN19	TESLTALLVQTSEGAVLLDGGMPQMAGHLLDNLKARGVAPQDLRLILLSHAHADHAGPVA
L1b	TEDLTALLVQTAEGAVLLDGGMPQMAGHLLDNLKARGVAPQDLRLILLSHAHADHAGPVA
L1c	TEDLTALLVQTAEGAVLLDGGMPQMAGHLLDNLKARGVAPQDLRLILLSHAHADHAGPVA
L1-StN37	TENLTALLVQTAEGAVLLDGGMPQMAGHLISNMKARGVAPQDLRLILLSHAHADHAGPVA
L1a	TEDLTALLVQTPDGAVLLDGGMPQMASHLLDNLKARGVTPRDLRLILLSHAHADHAGPVA
L1d	TQDLTALLVQTADGAVLLDGGMPQMAGHLISNMKVRGVAPQDLRLILLSHAHADHAGPVA *..***** :* **:*****.:*: *:* ** . **.:*****:*****
L1e	EIKRRTGAQVVNAETAVALLRAGGSDDLHFGDEITFPVNAADRIVMDREVVKLGGAFTA
L1-StN19	ELKRRTGARVVANAESAVLLRAGGSDDLHFGDDITYPPASTDRIVMDGEVTVGGIAFTA
L1b	ELKRRTGAHVAANAETAVALLRAGGSNDLHFGDITYPPASADRIIMDGEVTVGGIAFTA
L1c	ELKRRTGAHVAANAETAVALLRAGGSNDLHFGDITYPPASADRIIMDGEVTVGGIAFTA
L1-StN37	ELKRRTGAKVAANAESAVLLRAGGSDDLHFGDAITYPPASADRIIMDGEVVEVGGIEFTA
L1a	ELKRRTGAKVAANAESAVLLRAGGSDDLHFGDITYPPANADRIVMDGEVITVGGIVFTA
L1d	ELKRRTGAKVAANAESAVLLRAGGSDDLHFGDITYPPASADRIIMDGEVITVGGIAFTA *:*****:..**.:*****:***** **:*..:***:** *: :*** **
L1e	HFMPGHTPGSTAWTWTDRDGKPVRIAYADSLAPGYQLQGNARYPRLVEDYRRSFATVR
L1-StN19	HFMPGHTPGSTAWTWTDRGAKPVRIAYADSLAPGYQLRGNVRYPRLIEDYTRSFATVR
L1b	HFMPGHTPGSTAWTWTDRDGKPVRIAYADSLAPGYQLKGNPRYPRLIEDYKRSFATVR
L1c	HFMPGHTPGSTAWTWTDRDGKPVRIAYADSLAPGYQLKGNPRYPRLIEDYKRSFATVR
L1-StN37	HFMPGHTPGSTAWTWSDTREGKPVRIAYADSLAPGYQLQGNARYPRLVDDYKRSFATVR
L1a	HFMPGHTPGSTAWTWTDRNGKPVRIAYADSLAPGYQLQGNPRYPRLIEDYRRSFATVR
L1d	HFMPGHTPGSTAWTWTDRGKPVRIAYADSLAPGYQLQGNPRYPRLIEDYRHSLATVR *** *****:*** .*****:*** ** * :***:*** :* :***
L1e	GLPCDLLLTPHPGASNWNYAAGSNASEKVLSCAYADAAEKKFDAQLAKETAGAR
L1-StN19	GLPCDLLLTPHPGASHWDYAAGSKAGAKALTCKAYADEAEKKFDAQLAKETVRAR
L1b	ALPCDLLLTPHPGASNWNYAAGSKASAEALTCNAYADAAEKKFDAQLARETAGTR
L1c	ALPCDLLLTPHPGASNWNYAAGSKASAEALTCNAYADAAEKKFDAQLAKETAGAR
L1-StN37	ALPCDVLLTPHPGASNWDYASGSKASAKALTCKAYADAAEQKFDAQLAKETARAR
L1a	ALPCDVLLTPHPGASNWDYAAGARAGAKALTCKAYADAAEQKFDAQLAKETAGAR
L1d	ALPCDVLLTPHPGASNWDYAAGSKASAKALTCKAYADAAEQKFDAQLAKETAGAR .***:*****:*** *..* .*:..:*** **:*..:***:*** ** :*

Anexo 2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de L1 de las cepas StN19 y StN37 y L1c.

```

L1-StN19      MRSSLLALTLAAALPAAAYVAAETPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQIADHTWQIGTESLT
L1-StN37      MRFSLLAVTLAAVLPVAHASAAEAPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQIADHTWQIGTENLT
L1c           MRFTLLAFALAVLLPVAVHASAAEAPLPQLRAYTVDASWLQPMAPLQVADHTWQIGTEDLT
              ** :***.:**..* **.:* *****:*****.**

L1-StN19      ALLVQTSEEGAVLLDGGMPQMAGHLLDNLKARGVAPQDLRLIILSHAHADHAGPVAELKRR
L1-StN37      ALLVQTAEEGAVLLDGGMPQMAGHLISNMKARGVAPQDLRLIILSHAHADHAGPVAELKRR
L1c           ALLVQTAEEGAVLLDGGMPQMAGHLLDNMKLRGVAPQDLRLIILSHAHADHAGPVAELKRR
              *****:*****.:*:* *****:*****

L1-StN19      TGARVVANAESAVLLARGGSDDLHFGDDITYPPASTDRIVMDGEVVTVGGIAFTAHFMPG
L1-StN37      TGAKVAAANAESAVLLARGGSDDLHFGDAITYPPASADRIVMDGEVVEVGGIEFTAHFMPG
L1c           TGAHVAANAETAVLLARGGSNDLHFGDGITYPPASADRIIMDGEVVTVGGIAFTAHFMPG
              ***:*.***:*****:***** *****:***:***** **** *****

L1-StN19      HTPGSTAWTWTDTRGAKPVRIAYADSLSAPGYQLRGNVRYPRLIEDYTRSFATVRGLPCD
L1-StN37      HTPGSTAWTWSDTREGKPVRIAYADSLSAPGYQLQGNARYPRLVDDYKRSFATVRALPCD
L1c           HTPGSTAWTWTDTRDGKPVRIAYADSLSAPGYQLKGNPRYPRLIEDYKRSFATVRALPCD
              *****:***.*****:*** *****:*.***.*****.****

L1-StN19      LLLTPHPGASHWDYAAGSKAGAKALTCKAYADEAEKKFDAQLLAKETVRRAR
L1-StN37      VLLTPHPGASNWDYASGSKASAKALTCKAYADAEQKFDAQLLAKETARAR
L1c           LLLTPHPGASNWNYAVGSKASAEALTCNAYADAEKKFDAQLLAKETAGAR
              :*****:*.*** ****.*:***:*** **:******. **

```

Se subrayan en **amarillo** los cambios que hay entre las secuencias de aminoácidos de L1c, L1-StN19 y L1-StN37.