

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**CARACTERIZACIÓN CLONAL DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE
Stenotrophomonas maltophilia PRODUCTORES DE BIOPELÍCULA**

POR

Q.B.P. EDEER IVÁN MONTOYA HINOJOSA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN MICROBIOLOGÍA**

ENERO, 2020

CARACTERIZACIÓN CLONAL DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS
DE *Stenotrophomonas maltophilia* PRODUCTORES DE BIOPELÍCULA

Comité de Tesis



Dra. Licet Villareal Treviño

Presidente de Tesis



Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Secretario



Dra. Paola Bocanegra Ibarias

Vocal



Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

Vocal

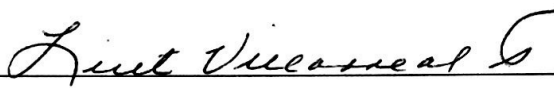


Dr. José Santos García Alvarado

Vocal

CARACTERIZACIÓN CLONAL DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS
DE *Stenotrophomonas maltophilia* PRODUCTORES DE BIOPELÍCULA

Dirección de tesis



Dra. Licet Villareal Treviño

Director



Dra. Samantha Maribel Flores Treviño

Director externo

CARACTERIZACIÓN CLONAL DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS
DE *Stenotrophomonas maltophilia* PRODUCTORES DE BIOPELÍCULA

Presentado por: Q.B.P. Edeer Iván Montoya Hinojosa

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Laboratorio Central del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad (LADIME) del servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Microbiología e Inmunología a CONACYT, por el apoyo administrativo como económico y al laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad (LADIME) y al departamento de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” por todo el apoyo brindado.

*A la **Dra. Licet Villarreal**, por abrirme las puertas y permitirme ser uno de sus alumnos de posgrado, confianza, apoyo y su gran bondad, así como paciencia brindada a cada estudiante.*

*A la **Dra. Samantha Flores**, por su apoyo y aportarme parte de sus conocimientos su paciencia, y enseñarme la dedicación por la ciencia.*

*A la **Dra. Paola Bocanegra Ibarias**, por cada detalle y momento para aclarar cualquier duda que me surgiera y compartirme parte sus conocimientos.*

*A la **Dra. Elvira Garza** por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por los conocimientos compartidos, su tiempo y su pasión por la ciencia.*

*A **Verónica Villarreal, Aurora Luna, Laura Tijerina, Flora Cruz, Marcos Hernández, Raúl de la Garza**, gracias por las experiencias y apoyo en el laboratorio y brindarme su amistad. A los chicos de servicio **Myriam Zamora, Andrea López, Fernando Casas**, por los momentos divertidos y amenizar en momentos de estrés.*

*A mis Padres (**Dionisia Hinojosa y Vicente Montoya**) y hermana (**Edith Montoya**), que son el motor incondicional que me motiva a hacer cada cosa y cada uno de mis proyectos, sin dudarle o pensarlo me apoyan en cada momento de la vida.*

A Pedro Avitia, Tania Heredia, Brenda Saldaña, Gabriel Cazares y Lucero Castro, por ser parte de cada una de las experiencias vividas en esta trayectoria, ser aquellos grandes amigos que siempre estuvieron en buenos y malos momentos para llegar juntos hasta el final de esta etapa.

DEDICATORIA

*A mis padres y hermana que a pesar de la lejanía siempre están y estarán apoyándome
hasta el final.*

ÍNDICE

SECCIÓN	Página
AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA.....	III
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT	VIII
1 Introducción	1
2 Antecedentes	2
2.1 Generalidades de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2
2.2 Características microbiológicas	2
2.3 Epidemiología	2
2.4 Importancia clínica	3
2.4.1 Factores de riesgo.....	4
2.5 Manifestaciones clínicas	4
2.5.1 Neumonía	4
2.5.2 Bacteriemia	4
2.6 Tratamiento	5
2.7 Resistencia	5
2.8 Factores de virulencia.....	6
2.8.1 Biopelícula	6
2.9 Diversidad clonal.....	7
3 Justificación	9
4 Hipótesis	10
5 Objetivos	11
5.1 Objetivo general	11
5.2 Objetivos específicos	11
6 Material y métodos	12
6.1 Obtención de los aislamientos	12
6.2 Identificación de los aislamientos de <i>S. maltophilia</i>	12
6.3 Determinación de la formación de biopelícula	12
6.4 Determinación de la diversidad clonal	13
6.5 Determinación de las secuencias tipo (ST).....	15

6.5.1	Obtención de DNA genómico	15
6.5.2	Amplificación de genes conservados.....	15
6.5.3	Purificación de productos de PCR.....	16
6.5.4	Secuenciación de genes conservados.....	16
6.6	Análisis estadístico	17
7	Resultados	18
7.1	Identificación de los aislamientos de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	18
7.2	Determinación de la producción de biopelícula	18
7.3	Diversidad clonal.....	19
7.4	Tipos ST de <i>S. maltophilia</i>	21
8	Discusión	22
9	Conclusiones	25
10	Referencias.....	26
11	ANEXO I.....	34
11.1	Preparación de reactivos y soluciones	34
12	ANEXO II.....	35
12.1	Características de los aislamientos clínicos y producción de biopelícula de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> incluidos en este estudio.....	35

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN Ácido desoxirribonucleico

g Gramos

h Horas

kb Kilobases

L Litros

MALDI-TOF *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight*

mg Miligramos

min Minutos

mL Mililitros

mM Concentración milimolar

MLST *Multilocus sequence typing*

nm Nanómetros

pb Pares de bases

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PFGE Electroforesis en Gel de Campos Pulsados

PM Peso molecular

QS *Quorum sensing*

rpm Revoluciones por minuto

s Segundos

ST Secuencia tipo

TBE Tris, ácido bórico, EDTA

TMP-SMX Trimetoprim-sulfametoxazol

TSB Caldo soya tripticaseína

UCI Unidad de Cuidados Intensivos

UFC Unidades formadoras de colonias

UV Ultravioleta

V Voltios

V_T Volumen total

µg Microgramos

µL Microlitros

RESUMEN

Stenotrophomonas maltophilia es un importante patógeno nosocomial con alta morbilidad y mortalidad. Posee diversos factores de virulencia como la producción de biopelícula en superficies abióticas y bióticas. Además, la resistencia de *S. maltophilia* a los antibióticos complica la elección de tratamiento. Debido a la importancia de este microorganismo en infecciones hospitalarias, el estudio de su epidemiología molecular es de alta importancia. Para el análisis de la diversidad genética de *S. maltophilia* se han usado técnicas de tipificación comunes tales como electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) y tipificación multilocus de secuencia (MLST). El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad clonal de aislamientos clínicos de *S. maltophilia* productores de biopelícula. Los aislamientos fueron recolectados en un periodo de enero 2007 a diciembre 2017 en dos hospitales de tercer nivel en México, con un total de 235 aislamientos, 47% provenientes de Jalisco y 53% de Monterrey. Se identificaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Se determinó la producción de biopelícula de todos los aislamientos recolectados. Se seleccionaron 50 aislamientos para el análisis de PFGE y 14 aislamientos para el análisis de MLST. El 96% (n=226) de los aislamientos fueron productores de biopelícula. Dentro de los aislamientos productores, el 14% (n=34) fueron productores débiles, el 29% (n=67) moderados y 53% (n=125) productores fuertes. El análisis filogenético demostró solo una clona y alta diversidad genética, donde se encontró 12 ST diferentes y solo uno (ST186) relacionado a la única clona encontrada. En conclusión, los aislamientos de *S. maltophilia* recolectados en un periodo de 7 años en dos hospitales de tercer nivel del país presentaron alta producción de biopelícula (96%) y en su mayoría se presentaron de origen respiratorio. Y los aislamientos de pacientes hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos presentaron baja clonalidad y alta diversidad genética, sugiriendo nula transmisión de infecciones dentro del hospital.

ABSTRACT

Stenotrophomonas maltophilia is an important nosocomial pathogen with high morbidity and mortality. It has several virulence factors such as biofilm production on abiotic and biotic surfaces. In addition, the resistance of *S. maltophilia* to antibiotics complicates the choice of treatment. Due to the importance of this microorganism in-hospital infections, the study of its molecular epidemiology is of high importance. For the analysis of the genetic diversity of *S. maltophilia*, common typing techniques such as pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) have been used. The objective of this work was to determine the clonal diversity of clinical isolates of *S. maltophilia* biofilm producers. The isolates were collected in a period from January 2007 to December 2017 in two third-level hospitals in Mexico, with a total of 235 isolates, 47% from Jalisco and 53% from Monterrey. They were identified by MALDI-TOF mass spectrometry. The biofilm production of all the collected isolates was determined. 50 isolates were selected for the PFGE analysis and 14 isolates for the MLST analysis. 96% (n = 226) of the isolates were biofilm producers. Within the producer isolates, 14% (n = 34) were weak producers, 29% (n = 67) moderate and 53% (n = 125) strong producers. The phylogenetic analysis showed only one clone and high genetic diversity, where 12 different STs were found and only one (ST186) related to the only clone found. In conclusion, the isolates of *S. maltophilia* collected over a period of 7 years in two third-level hospitals in the country had high biofilm production (96%) and were mostly of respiratory origin. And the isolates of hospitalized patients in the intensive care unit presented low clonality and high genetic diversity, suggesting no transmission of infections within the hospital.

1 Introducción

Stenotrophomonas maltophilia es un bacilo Gram negativo, aerobio, móvil, no fermentador (Gilligan 2003). Se ha aislado a partir de ambientes acuosos, suelos y plantas. Es un importante patógeno nosocomial, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, que presentan neumonía, bacteriemia, o implantes médicos. La colonización por este patógeno en entornos hospitalarios se ha presentado en pacientes con fibrosis quística, tumores malignos, catéteres venosos, soluciones de irrigación, permanencia hospitalaria prolongada y con historial previo de antibioterapia (Falagas *et al.*, 2009). *S. maltophilia* presenta altas tasas de multifarmacorresistencia por lo cual su tratamiento es complicado. En la actualidad, el tratamiento de primera elección es trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) por la baja resistencia que presentan las cepas de *S. maltophilia* (Lo *et al.*, 2002).

Uno de los factores de virulencia de *S. maltophilia* que favorece su colonización es la formación de biopelículas en superficies abióticas y bióticas, la cual protege a la bacteria de los antibióticos (Monroe 2007). En investigaciones asociadas a *S. maltophilia*, se han obtenido datos epidemiológicos, fenotípicos y genotípicos a través de la caracterización clonal para determinar si una o más clonas están involucradas en la relación con algún brote de infección (Shueh *et al.*, 2013).

En México hay escasos reportes de casos de infecciones causadas por *S. maltophilia* y estudios sobre la caracterización y diversidad clonal de *S. maltophilia* en el país, por ejemplo, infecciones a nivel respiratorio, bacteriemia y heridas en pacientes hospitalizados, destacando la producción de biopelícula en aislamientos causantes de la infección (Flores-Trevino *et al.*, 2014, Flores-Trevino *et al.*, 2019), infección de tejidos blandos (Esper *et al.*, 2012) y endocarditis (López Rodríguez *et al.*, 2003). Por lo tanto, en este estudio se busca determinar la diversidad clonal de aislamientos clínicos de *S. maltophilia*, principalmente aquellos productores de biopelícula.

2 Antecedentes

2.1 Generalidades de *Stenotrophomonas maltophilia*

S. maltophilia pertenece al grupo Gammaproteobacteria, que en el medio ambiente se puede encontrar en las rizosferas vegetales (Ryan *et al.*, 2009). Como patógeno oportunista es causal de infecciones hospitalarias comunes en pacientes inmunocomprometidos, con infecciones respiratorias, fibrosis quística, endocarditis, y virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Calza *et al.*, 2003). Además, se han reportado altas tasas de mortalidad asociadas a la infección por este patógeno en diferentes países (Looney *et al.*, 2009). La presencia de factores de virulencia como la producción de biopelícula le permiten una colonización rápida además de resistencia hacia los antimicrobianos.

2.2 Características microbiológicas

S. maltophilia es un bacilo Gram negativo, cuya morfología puede ser recta o ligeramente curvada, con un tamaño dentro de 0.5 a 1.5 μm . Presenta movilidad a través de múltiples flagelos polares. Crece a una temperatura óptima de 35°C y se inhibe a temperaturas menores de 4°C y superiores a 41°C (Brooke 2012). El crecimiento en cultivo permite observar colonias de tamaño pequeño, elevadas y de forma circular; en agar sangre son colonias verdosas, y en agar nutritivo y agar MacConkey las colonias son opacas, grisáceas y amarillas (Abbott *et al.*, 2011). *S. maltophilia* es catalasa y lactosa positivas, puede crecer en entorno de salinidad dentro de 1.5% y 3.0% y la producción de DNasa positiva (Adegoke *et al.*, 2017).

2.3 Epidemiología

S. maltophilia es un patógeno oportunista presente en todo el mundo; se ha encontrado en plantas, suelo y agua (Abbott *et al.*, 2015). Este microorganismo es de gran interés en el área hospitalaria debido a su rápida colonización en pacientes hospitalizados y la capacidad de protección contra antibióticos de algunos factores de virulencia. La transmisión de *S. maltophilia* puede ocurrir por el contacto directo (Brooke 2012) y se ha aislado en equipo médico como nebulizadores, soluciones desinfectantes, catéteres, termómetros, monitores, entre otros (Senol 2004). En Turquía, Alemania y Estados

Unidos se han reportado brotes epidemiológicos en pacientes hospitalizados con infecciones por *S. maltophilia* (Guvenir *et al.*, 2018, Gales *et al.*, 2019).

Un estudio de 11 años comprendido de 1997 a 2008 por el Programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY, reveló tasas de recuperación de este patógeno de 3.3% en Estados Unidos, 3.2% en Europa y 2.3% en Latinoamérica, en infecciones causantes de neumonía bacteriana adquirida en el hospital y neumonía asociada a ventilación mecánica (Jones 2010). En México hasta la fecha hay escasos reportes de casos aislados de infecciones causadas por *S. maltophilia*. Un estudio de nueve años en dos hospitales de tercer nivel en Nuevo León y Jalisco, con 196 aislamientos reveló 63.3% de infecciones en tracto respiratorio y 17.3% de infecciones en sangre (Herrera-Heredia *et al.*, 2017). Otro reporte de siete años con 119 aislamientos demostró una disminución en infecciones a nivel respiratorio con un 63.3% y un 16% en sangre (Flores-Trevino *et al.*, 2014). Por otro lado, un caso de una infección en tejido blando en un paciente con anemia aplásica (Esper *et al.*, 2012) y otro caso de endocarditis (Carrillo-Cordova *et al.*, 2012). También se describió las características clínicas de infecciones del torrente sanguíneo y episodios de neumonía en pacientes con cáncer causadas por *S. maltophilia* (Velazquez-Acosta *et al.*, 2018).

2.4 Importancia clínica

S. maltophilia en las últimas décadas se ha convertido en un patógeno de gran importancia debido a su capacidad de infectar a pacientes hospitalizados que se encuentran en un estado inmunocomprometido (Abbott *et al.*, 2015). Las infecciones más comunes son en pacientes con fibrosis quística y neumonía (Abbott *et al.*, 2011). Además, presenta una alta resistencia a muchos antimicrobianos como son carbapenémicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, entre otros.

Estudios posteriores han relacionado al patógeno con la capacidad de producir bacteriemia en los pacientes con problemas hematológicos inmunocomprometidos (Falagas *et al.*, 2009). Además, se ha mostrado un aumento en la mortalidad por bacteriemia por *S. maltophilia* desde 2014 hasta 2017 (Osawa *et al.*, 2018).

2.4.1 Factores de riesgo

Los principales factores de riesgo en las infecciones de *S. maltophilia* son estado inmunológico comprometido, diferentes enfermedades respiratorias, cardíacas, neoplasias hematológicas, presencia de diálisis, uso de catéteres venosos, aparatos de ventilación y una estancia prolongada durante la hospitalización. Los pacientes hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos (UCI) presentan un 4.3% de infección por bacterias Gram negativas dentro de las cuales se encuentra *S. maltophilia* (Lockhart *et al.*, 2007).

2.5 Manifestaciones clínicas

S. maltophilia causa diferentes afecciones como neumonía, bacteriemia, endocarditis, meningitis, e infecciones de piel y tejidos. Las infecciones que se han reportado con más frecuencia por este microorganismo se generan en el sistema respiratorio, áreas con alguna cirugía reciente, tracto urinario, y sistema circulatorio (Madi *et al.*, 2016).

2.5.1 Neumonía

Uno de los sitios más comunes donde *S. maltophilia* causa infecciones es el tracto respiratorio con una mortalidad del 20-30% (Aisenberg *et al.*, 2007). Las neumonías causadas por *S. maltophilia* se asocian con ventilación mecánica (Wood *et al.*, 2010, Saugel *et al.*, 2012).

2.5.2 Bacteriemia

La bacteriemia es también una infección común en presencia de *S. maltophilia* adquirida en estancia prolongada hospitalaria, ya que se adhiere a aparatos médicos como catéteres venosos y así pasa a torrente sanguíneo. Se ha reportado que la vía de entrada más frecuente son los catéteres venosos centrales con 33% de pacientes que desarrollaban bacteriemia, 15% con bacteriemia en pacientes con neumonía, y otro 20% de la cual la fuente no se tienen datos (Nukui *et al.*, 2010). Sin embargo, existen más formas de bacteriemia en estudios con porcentajes elevados de infecciones polimicrobiana donde se ve involucrada *S. maltophilia* (Yeshurun *et al.*, 2010).

2.6 Tratamiento

La elección de un tratamiento eficaz contra *S. maltophilia* es complicada debido que el microorganismo cuenta con varios factores de virulencia, como la producción de biopelícula. Además, presenta alta resistencia a los antimicrobianos tanto intrínsecamente como de forma adquirida. La resistencia adquirida se debe a distintos mecanismos moleculares como bombas de eflujo. Esta resistencia principalmente es hacia cefalosporinas, aminoglucósidos, β -lactámicos y fluoroquinolonas (Brooke 2012). El fármaco de elección para tratar las infecciones por este patógeno con más efectividad ha sido la administración de trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SXT).

Además, se han reportado diversos estudios de susceptibilidad que indican 90% de susceptibilidad a TMP-SXT en pacientes ya recuperados después de la administración del fármaco (Al Johani *et al.*, 2010). Por otro lado, se han propuesto combinaciones de antibióticos como ticarcilina y ácido clavulánico, debido a su capacidad de inhibir β -lactamasas en *S. maltophilia*, después de realizar pruebas de sensibilidad en pacientes inmunocomprometidos, o con alguna enfermedad pulmonar, cardiovascular o con infecciones relacionadas por este microorganismo, obteniendo 42% de susceptibilidad (Barbier-Frebour *et al.*, 2000).

2.7 Resistencia

La resistencia causada por *S. maltophilia* a los antibióticos dificulta la elección de tratamiento. Esta resistencia es causada por diversos mecanismos moleculares como la transferencia de genes asociados a resistencia, como elementos ISCR y genes *sul*, transposones y la presencia de bombas de eflujo, como SmeDEF, SmeABC (Barbolla *et al.*, 2004, Brooke 2012).

Las tasas de resistencia a TMP-SXT varían geográficamente y han ido en aumento gradualmente en los últimos años. En países asiáticos se ha reportado más del 30% de resistencia, principalmente en pacientes con fibrosis quística (Chang *et al.*, 2015, Hu *et al.*, 2016). Específicamente en México, se han reportado valores de hasta 32.8% de resistencia en 2014 (Flores-Trevino *et al.*, 2014), y posteriormente una tasa de resistencia del 25% en 2017 (Herrera-Heredia *et al.*, 2017). Sin embargo, en un estudio de cepas

asociadas a infecciones del torrente sanguíneo en pacientes con cáncer por un periodo de 16 años, se reporta un 5.2% de resistencia a TMP-SXT (Velazquez-Acosta *et al.*, 2018).

2.8 Factores de virulencia

S. maltophilia aún no tiene bien definido por completo sus factores de virulencia. Sin embargo, se cuenta con información que sugiere que entre los principales factores de virulencia se encuentran la producción de biopelícula, la participación de enzimas extracelulares, flagelos, fimbrias y un sistema de quorum sensing (QS) involucrado en la señalización célula-célula (Adegoke *et al.*, 2017).

2.8.1 Biopelícula

Una biopelícula es un conjunto de células bacterianas asociadas en una superficie que está dentro una matriz de sustancia extracelular (Donlan 2002). Es una característica principal de las cepas de *S. maltophilia*, con una capacidad de adherirse a superficies bióticas y abióticas, como el plástico y el vidrio. En infecciones de pacientes inmunocomprometidos y afecciones respiratorias, la formación de la biopelícula ayuda a ejercer su colonización y así modular su farmacoresistencia creando una gran importancia dentro del entorno hospitalario debido a la cantidad de infecciones adquiridas (Di Bonaventura *et al.*, 2004). A su vez, se ha confirmado que dentro de la formación de biopelículas en diferentes ambientes se ve favorecida la colonización de este patógeno por la motilidad de sus flagelos (Krzewinski *et al.*, 2001).

Se han realizado ensayos de mutantes de transposones para identificar los genes involucrados en la formación de biopelícula (Huang *et al.*, 2006). Los genes asociados a la producción de biopelícula son el gen *rpfF* y *rmlA*, así como también el gen *spgM*, con actividad enzimática fosfoglucomutasa y fosfomanomutasa (McKay *et al.*, 2003, Liaw *et al.*, 2010). El gen *bsmR* regulador de la señalización de c-di-GMP también se ha asociado a la producción de biopelícula (Liu *et al.*, 2017).

En otros estudios se ha identificado la participación de un tipo de fimbria, SMF-1, en *S. maltophilia*, con una alta afinidad hacia células epiteliales y la producción de biopelícula sobre éstas. Algunos ensayos inmunológicos con anticuerpos dirigidos han demostrado que se inhibe la adherencia a células epiteliales y la formación de biopelícula,

por lo que es de gran interés debido a su relación con las infecciones a nivel de sistema respiratorio (de Oliveira-Garcia *et al.*, 2003).

A nivel ambiental, en la formación de biopelícula se ven involucrados diversos factores químicos y fisicoquímicos como las concentraciones ricas en cloruro y fosfatos, pH entre 7.5-8.5, y temperatura entre 30 - 32° C. Por lo general, la biopelícula se forma en superficies húmedas como líneas de plomerías, tubos de succión, grifos y llaves de agua (Critchley *et al.*, 2003, Di Bonaventura *et al.*, 2007).

Recientemente se han examinado con más profundidad el efecto de varios antibióticos en aislamientos clínicos de *S. maltophilia* que puedan detener la formación de biopelícula. Algunas fluoroquinolonas (ciprofloxacina, moxifloxacina) demuestran una reducción en la producción de biopelícula con hasta el 95% (Di Bonaventura *et al.*, 2004). Se ha propuesto un estudio alternativo a nivel terapéutico en cepas de *S. maltophilia* en el que el ADN extracelular sea atacado con DNAasa y D-aminoácidos para prevenir la formación de biopelícula (Kolodkin-Gal *et al.*, 2010).

2.9 Diversidad clonal

Dentro de la epidemiología molecular e importancia de este microorganismo en infecciones hospitalarias, se han empleado técnicas de tipificaciones moleculares para la obtención de datos sobre diversidad genética correspondiente a *S. maltophilia*, con el uso de metodologías de tipificación comunes tales como electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) y tipificación multilocus de secuencia (MLST) (Denton *et al.*, 1998, Foley *et al.*, 2009).

Diferentes hospitales alrededor del mundo están realizando dichos estudios con la finalidad de obtener datos acerca de las relaciones fenotípicas y genéticas del microorganismo; varios de ellos en pacientes con fibrosis quística. Un estudio en Serbia se realizó la caracterización de cepas entre pacientes pediátricos con fibrosis quística contra un grupo control que no presentaban fibrosis quística. Dicha identificación se realizó a partir de la secuenciación del gen 16sRNA y se encontró una asociación entre los aislamientos del 95% y 99%. A su vez, un conjunto de pulsotipos relacionados con otros aislamientos fueron encontrados y analizados por MLST (Kaiser *et al.*, 2009, Madi *et al.*, 2016). Otros reportes similares revelan una alta diversidad genética con ejemplos

de pulsotipos asociados con pacientes con o sin fibrosis quística mediante la adquisición de una fuente en común detectadas en cuatro cepas (Pompilio *et al.*, 2011).

Además, estudios de restricciones enzimáticas con *XbaI* permitieron obtener un mejor rastreo de las cepas, junto a la diversidad en diferentes ambientes con el uso de la restricción de *DraI* detectando una relación entre aislamientos nosocomiales (Mercuri *et al.*, 2002).

En México sólo se cuenta con un reporte de un estudio que analiza la diversidad clonal en aislamientos clínicos de *S. maltophilia* en 2014, basado en la producción de biopelícula y resistencia antimicrobiana. Los resultados indicaron que hubo una alta diversidad clonal y los autores sugieren que cada aislamiento fue adquirido independientemente y no se trataba de una transmisión relacionada (Flores-Trevino *et al.*, 2014).

3 Justificación

Stenotrophomonas maltophilia es un patógeno oportunista causante de una alta tasa de infecciones intrahospitalarias con alta morbilidad y mortalidad. Su alta multifarmacorresistencia complica el tratamiento actual. Diversos factores de virulencia se han reportado en este patógeno, incluyendo la producción de biopelícula. Además, se ha reportado una alta diversidad clonal en cepas de *S. maltophilia* aisladas de distintos hospitales.

En México, existen pocos estudios respecto a la determinación de la diversidad clonal de este patógeno, al igual que el análisis de los factores de virulencia, principalmente la producción de biopelícula.

4 Hipótesis

Existe alta diversidad clonal en los aislamientos de *S. maltophilia* productores de biopelícula obtenidos de dos hospitales de tercer nivel del país.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar la diversidad clonal de aislamientos clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia* productores de biopelícula.

5.2 Objetivos específicos

1. Identificar aislamientos clínicos de *S. maltophilia* productores de biopelícula.
2. Determinar la diversidad clonal de *S. maltophilia* productores de biopelícula.
3. Determinar los tipos ST de *S. maltophilia* productores de biopelícula.

6 Material y métodos

6.1 Obtención de los aislamientos

Se recolectaron aislamientos clínicos de *S. maltophilia* a partir de muestras de pacientes que presentaron alguna infección por *S. maltophilia*, en un periodo de diez años, comprendido del 2007 al 2017. Las cepas fueron obtenidas de dos hospitales de tercer nivel en México, el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León localizado en el estado de Nuevo León y el Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” de la Universidad de Guadalajara localizado en el estado de Jalisco.

6.2 Identificación de los aislamientos de *S. maltophilia*

La identificación de los aislamientos de los aislamientos se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) con (sistema Microflex LT, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania).

Se utilizó la técnica de extracción directa de colonias; la muestra se obtuvo de un cultivo puro previo con 24 h de incubación. Se colocó una capa delgada de la colonia dentro del objetivo del portaobjetos (una placa de acero inoxidable con 96 pozos), se dejó secar a temperatura ambiente, se añadió 1µL de ácido fórmico al 70%, y 1µl de matriz Ácido 2-ciano-3-(4-hidroxifenil) acrílico (HCCA). Se colocó la placa dentro del espectrofotómetro para su lectura de manera automatizada a través del software del equipo y análisis de los picos logarítmicos para establecer género y especie del microorganismo dentro de los parámetros de identificación: alta probabilidad (2.300-3.00), Identificación de género segura, probable identificación de especie (2.000-2.299), probable identificación de género (1.700-1.999) e identificación no confiable (0.000-1.699) (Levesque *et al.*, 2015). El criterio de corte utilizado para la identificación a nivel de género fue un score entre 2.000-2.299 y 2.300–3.000 para su clasificación a nivel especie.

6.3 Determinación de la formación de biopelícula

Para determinar la formación de biopelícula se realizó tinción con cristal violeta, previamente descrita (Di Bonaventura *et al.*, 2004). Para ello, se sembraron los

aislamientos de *S. maltophilia* en agar sangre durante 24 h a una temperatura entre 35° C y 37° C. Se realizaron inóculos en solución salina según los estándares de turbidez de 1.0 en la escala de McFarland. En la placa de microtitulación se colocaron los inóculos con una dilución previa 1:100, con 200µL de TSB, junto a un control de TSB estéril. Se incubó nuevamente durante 24 h entre 35° C y 37° C, luego del sobrenadante se transfirieron 100µL a una placa nueva para medir su absorbancia a 600nm. Se realizaron 3 lavados en los pocillos una vez eliminado el sobrenadante, añadiendo 250µL de PBS estéril pH 7.3, posteriormente se dejó secando. Cada biopelícula se tiñó con 100µL de cristal violeta 0.5% durante 5 min a temperatura ambiente, para luego realizar 5 lavados utilizando 150µL de PBS estéril y volver a secar. Para desteñir las muestras se utilizó 150µL de ácido acético al 33% durante 15 min en constante agitación.

Basado en la clasificación por (Stepanovic *et al.*, 2007), los rangos de producción de biopelícula se establecieron de la siguiente manera de acuerdo con los valores de densidad óptica: No productor: ≤ 0.03 , producción débil: 0.07 – 0.10, moderado: 0.15-0.24 y producción fuerte: ≥ 0.25 .

6.4 Determinación de la diversidad clonal

Se realizó una selección de un total de 50 aislamientos de pacientes hospitalizados dentro de la Unidad de Cuidados Intensivos, de los dos hospitales tanto Jalisco como Nuevo León. A partir de un cultivo puro en agar soya tripticaseína se inoculó una asada de una sola colonia en 5 mL de caldo triptonsoya. Se incubó hasta fase exponencial (16-18 h) a 37°C. Posteriormente se transfirieron 2 mL del cultivo líquido a un tubo Eppendorf y se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm, se eliminó todo el sobrenadante sin remover la pastilla y se añadió 1 mL de PIV frío, se mezcló empleando el vórtex hasta disolver totalmente y se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm, se descartó el PIV de cada tubo y se añadieron 410 µL de PIV a cada muestra y se mezcló en vórtex para disolver la pastilla. Se fundió agarosa al 1.5% (Agarosa Certificada para Campos Pulsados, Bio-Rad, Inc., CA, E.U.A.) con buffer TBE 0.5X en microondas y se mantuvo entre 50-55°C mediante calentamiento en baño de agua. Se colocaron 150µL de la agarosa fundida en cada tubo y se mezcló utilizando el vórtex, esto se realizó una muestra a la vez para evitar que solidificará la agarosa, previo a la preparación de los discos. Para preparar un disco de

agarosa se colocaron 35µL de la mezcla con agarosa sobre un portaobjetos estéril forrado con papel Parafilm y se dejaron solidificar a temperatura ambiente por 5 min y se transfirieron a un tubo Falcon estéril de 15 mL. Se preparó la solución para la lisis celular (EC-lisis) al adicionar 0.1mg de lisozima (Biotech, Bio Basic, Inc., Ontario, Canadá) y 10µL ARNsa de una concentración de 5mg/mL al buffer EC que cambia a EC-lisis, se añadió 1 mL de EC-lisis a cada tubo que contenía los discos y se llevaron al fondo y se incubaron por 3 h a 37°C. Se eliminó el EC-lisis empleando una gasa estéril y se preparó la solución ESP al adicionar 1mg de proteinasa K a 1 mL de solución ES, se añadió 1 mL de la solución ESP a cada tubo y se incubó toda la noche a 55°C (mínimo 17 h). Después la solución se eliminó con una gasa estéril y se agregaron 13 mL de TE 1X a cada tubo y se agitaron por inversión durante 1 h, posteriormente se eliminó el TE 1X de cada tubo y se adicionó nuevamente 13 mL, este paso se repitió cuatro veces más; posterior a estos lavados los discos se colocaron en un tubo Eppendorf con 1mL de TE 1X y se ocuparon inmediatamente para la restricción enzimática o de no ser así fueron almacenaron a 4°C. Al día siguiente se transfirió con pinzas un solo disco a un tubo Eppendorf estéril de 2 mL y se añadieron 40µL del buffer de restricción con la enzima XbaI (Applied Biological Materials) los discos se incubaron toda la noche a 37°C. Se limpió el equipo (CHEF-DR® III Pulsed Field Electrophoresis Systems, Bio-Rad) con agua destilada estéril que se dejó circulando por 20 min, se eliminó el agua y se agregaron 3 L de TBE 0.5X estéril y se dejó en el recirculador hasta que el equipo alcanzó 14°C. Se sacaron los discos de incubación y se preparó un gel de agarosa al 1% con 150 mL de buffer. Los discos de agarosa se colocaron en el gel, y los pocillos se cubrieron con el excedente de agarosa. El gel se colocó en el equipo y se programaron las siguientes condiciones: T inicial 0.5 s, T final 35s, tiempo de corrida 20 h, voltaje 6 V y temperatura de 14°C Al concluir la corrida, se retiró el gel del equipo y se tiñó con GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium) 10 min y se lavó con agua destilada. Por último, el análisis del patrón de bandas se realizó de manera visual, con ello se creó una base de datos la cual se analizó empleando el programa estadístico SPSS® versión 25, utilizando el método de conglomeración del vecino más próximo con la medida binaria de Jaccard y como resultado final se obtuvo un dendograma con el objetivo de establecer los porcentajes de similitud entre los patrones de restricción

de los aislamientos para poder determinar la presencia de clonas. Se definió como clona a aquel aislamiento con un 100%.

6.5 Determinación de las secuencias tipo (ST)

La tipificación multilocus de secuencias (MLST) se realizó en los aislamientos seleccionados mediante la amplificación y secuenciación de siete genes conservados: *atpD*, *gapA*, *guaA*, *mutM*, *nuoD*, *ppsA*, y *recA*, para obtener los tipos secuencias (ST) específicos.

6.5.1 Obtención de DNA genómico

Los aislamientos fueron sembrados en agar sangre e incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18 h (Incubadora *Lab Cli-Micro*, modelo *0166*). Se tomaron 3 a 4 colonias y se re-suspendieron en viales de 1.5 mL con 100 μL de agua miliQ estéril. Se mezclaron en un agitador tipo vórtex (*Deluxe*, modelo *S8220*) hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente los viales fueron calentados a una temperatura de 95°C en un baño seco (*Labnet International*, modelo *D1200*) durante 15 min. Una vez transcurrido el tiempo, los viales se centrifugaron por 5 min a 13,500 rpm (*Iec Microelite* modelo *RF*). Se colectaron los sobrenadantes en viales de 0.5 mL y finalmente se congelaron a -20°C hasta su posterior uso.

6.5.2 Amplificación de genes conservados

Para la mezcla de PCR de cada uno de los siete genes que se estudiaron se añadió de 1-3 μL de ADN a 25 μL de una mezcla de reacción compuesta por: 1 μL DNA; 0.5 μL primer forward (25 μM), 0.5 μL primer reverse (25 μM), 0.5 μL ; 25 mM dNTP; 1.5 μL MgCl_2 ; 2.5 μL 10x PCR-Buffer II, 1 μL Taq-DNA-Polimerasa; 17.5 μL Aqua para PCR. Las condiciones de amplificación para los genes de *S. maltophilia* fueron las siguientes: activación inicial de la Taq-ADN-polimerasa durante 9 minutos a 95°C , seguida de 30 ciclos de desnaturalización de 20 segundos a 94°C , alineamiento durante 1 minuto a la temperatura apropiada (T_a) y una extensión por 50 segundos a 72°C . Y extensión final de 5 minutos a 72°C .

Tabla 1. Secuencias de los primers y tamaño de los genes para el análisis de MLST.

Gen	Primer	Secuencia (5'- 3')	T alineamiento	Producto (pb)
<i>atpD</i>	Forward	ATGAGTCAGGGCAAGATCGTTC	62	858
	Reverse	TCCTGCAGGACGCCCATTTC		
<i>gapA</i>	Forward	TGGCAATCAAGGTTGGTATCAAC	62	800
	Reverse	TTCGCTCTGTGCCTTCACTTC		
<i>guaA</i>	Forward	AACGAAGAAAAGCGCTGGTA	62	704
	Reverse	ACGGATGGCGGTAGACCAT		
<i>mutM</i>	Forward	AACTGCCCCGAAGTCGAAAC	62	614
	Reverse	GAGGATCTCCTTCACCGCATC		
<i>nuoD</i>	Forward	TTCGCAACTACACCATGAAC	48	514
	Reverse	CAGCGCGACTCCTTGTACTT		
<i>ppsA</i>	Forward	CAAGGCGATCCGCATGGTGTATTC	62	635
	Reverse	CCTTCGTAGATGAACCGGTTC		
<i>recA</i>	Forward	ATGGACGAGAACAAGAAGCGC	62	807
	Reverse	CCTGCAGGCCCATCGCC		

6.5.3 Purificación de productos de PCR

Para cada producto de PCR se preparó un tubo de 1.5 mL con Etanol absoluto 2.33 µl por volumen de muestra ($V_{T\text{-etanol}} = 116.5\mu\text{l}$) y se pipetearon los productos de PCR en la mezcla etanol. Se agitó por inversión y se mantuvo a 20°C por 30 o 40 min. Se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min, y se descartó el sobrenadante. Se lavó con 300µL de etanol al 70% (agitando en vórtex), se centrifugó por 10 min en frío a 14,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar el sedimento toda la noche y se re-suspendió en 50 µL de agua.

6.5.4 Secuenciación de genes conservados

Los productos fueron enviados a secuenciación a una empresa de biotecnología de Corea del Sur, MacroGen dedicada a la secuenciación del genoma, la cual utiliza la secuenciación a gran escala desarrollada por “Applied Biosystems”, el modelo “3730XL”. Las secuencias se ensamblaron en el programa BLAST (NCBI) y se sometieron a la base de datos en <http://pubmlst.org/smaltophilia/> para determinar los ST.

6.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el programa SPSS 25.0 (IBM Corporation, Somers, NY). Los patrones de bandas fueron generados con el software Labworks 4.5, con 1% de tolerancia. Los coeficientes de similitud se generaron de una matriz de similitud calculada con el coeficiente de Jaccard.

7 Resultados

7.1 Identificación de los aislamientos de *Stenotrophomonas maltophilia*

Se recolectaron 235 aislamientos clínicos previamente identificados como *S. maltophilia* de enero 2007 a enero de 2017. Los aislamientos fueron obtenidos en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León localizado en el estado de Nuevo León y el Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” de la Universidad de Guadalajara localizado en el estado de Jalisco.

El 47% de los aislamientos provenían de Jalisco y 53% de Monterrey, de los cuales el 22% (n=51) de los aislamientos obtenidos fue de la Unidad de Cuidados Intensivos, el 15% (n=35) provenían del área de Medicina Interna, el 11% (n=25) del área de Pediatría, mientras que el 52% restante fue obtenido de áreas como Cardiología, Gastroenterología, Trasplantes, Ortopedia, entre otras.

El 78% (n=182) de los aislamientos provenía de muestras de vías respiratorias, 12% (n=29) de muestras sanguíneas, 5% (n=12) de tejidos blandos, 2% (n=4) de orina, 1% (n=3) de líquido cefalorraquídeo, 1% (n=2) de abscesos y 1% (n=3) provenientes de líquido peritoneal. El 94.5% (n=222) fueron pacientes hospitalizados y 62.5% (n=147) masculino, con un rango de edad desde el primer mes de nacimiento hasta 96 años.

7.2 Determinación de la producción de biopelícula

La mayor parte de los aislamientos clínicos de *S. maltophilia* fueron productores de biopelícula (96%), de los cuales 4% (n=9) fueron no productores de biopelícula, 14% (n=34) productores débiles, 29% (n=67) productores moderados y 53% (n=125) productores fuertes (Figura 1).

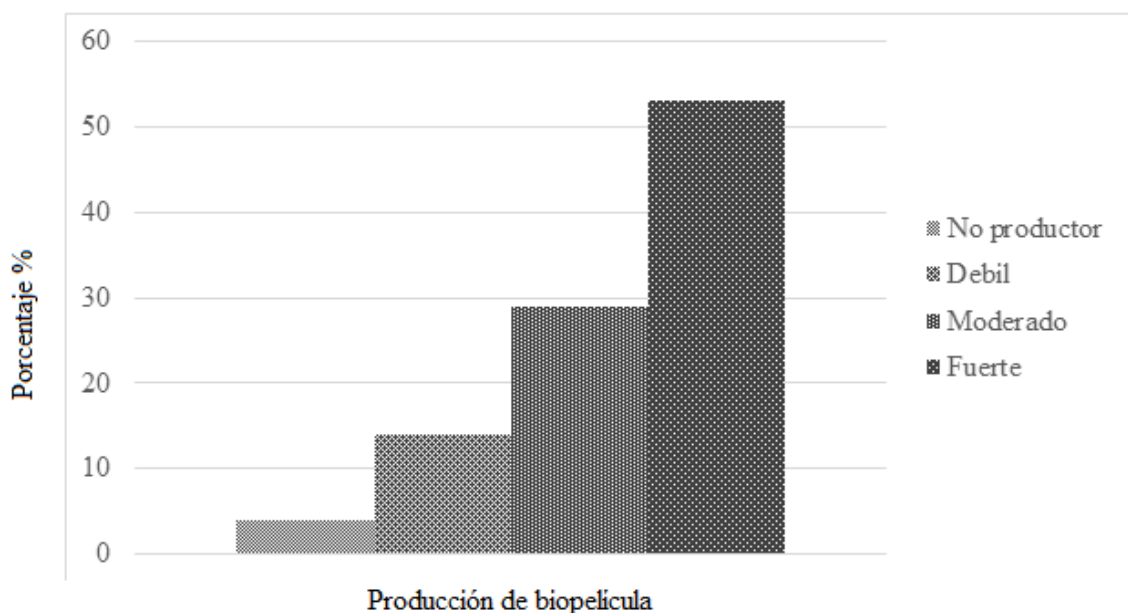


Figura 1. Producción de biopelícula de aislamientos clínicos de *S. maltophilia* (n=235).

7.3 Diversidad clonal

El análisis de PFGE de 50 aislamientos clínicos de *S. maltophilia* previamente seleccionados únicamente de pacientes hospitalizados en la UCI de los dos hospitales en el estudio. El porcentaje de similitud de los aislamientos analizados se encuentran en un rango entre el 75% al 100%. Se demostró 49 patrones distintos y dos aislamientos con patrones idénticos (Clona A), los cuales fueron obtenidos de Jalisco, de muestras de secreción bronquial, de dos pacientes femeninas, la primera de 26 años y la segunda de 44 años.

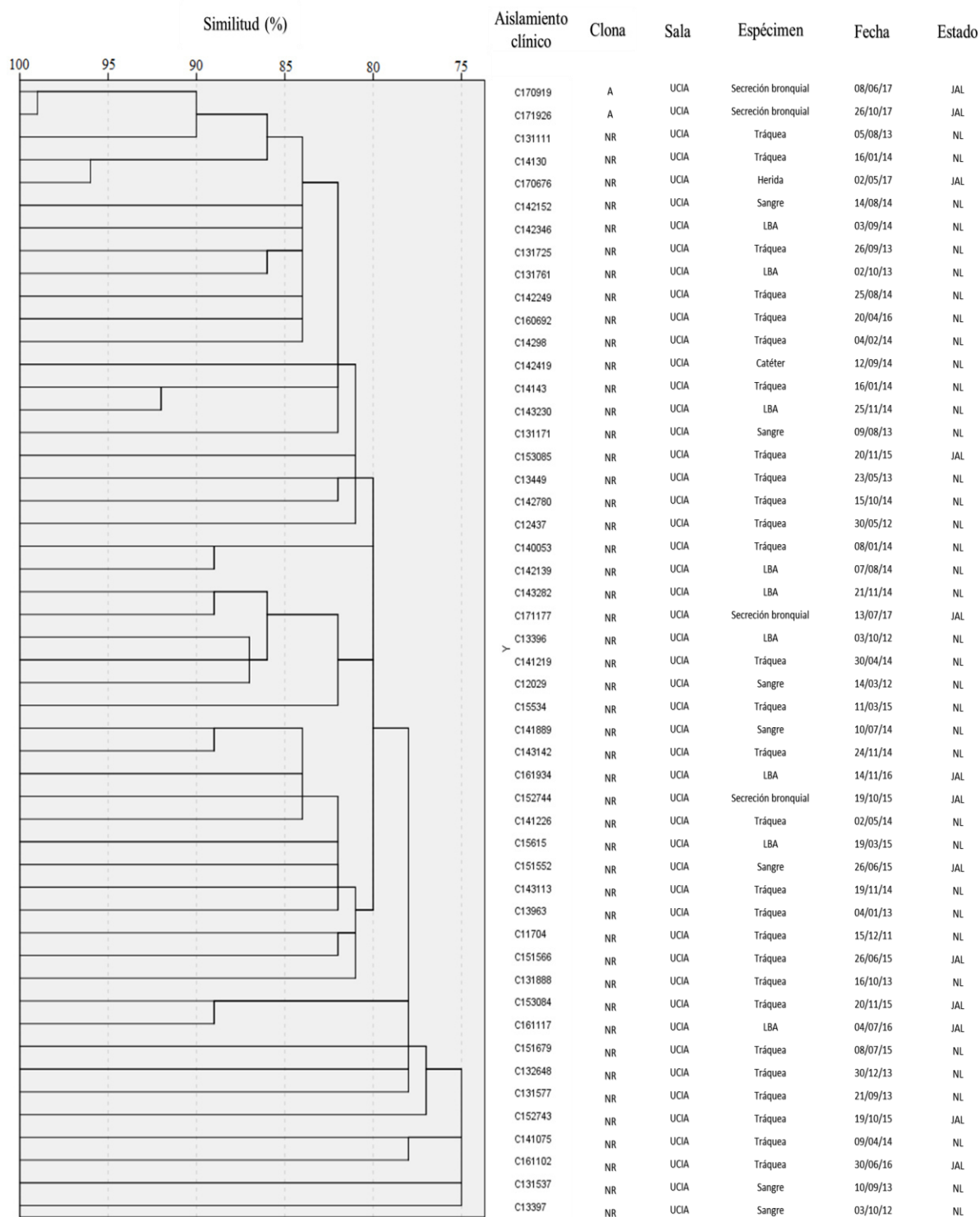


Figura 2. Análisis filogenético de aislamientos clínicos de *S. maltophilia* (n=50). El análisis por PFGE con restricción *Xba*I muestra 49 patrones distintos y dos aislamientos con patrones idénticos (C170919 y 171926), la cual será considerada como Clona A.

7.4 Tipos ST de *S. maltophilia*

En base a los resultados de PFGE, se seleccionaron 14 aislamientos para el análisis de MLST que mostró 12 tipos de secuencia diferentes y dos aislamientos que pertenecen al ST186, aislamientos correspondientes a la única clona encontrada en el análisis de PFGE (Tabla 2). Las secuencias tipo fueron determinadas mediante la base de datos MLST.

Tabla 2. Perfil alélico y secuencia tipo encontrados en los aislamientos clínicos de *S. maltophilia*.

Aislamiento	Alelo génico							ST
	<i>atpD</i>	<i>gapA</i>	<i>guaA</i>	<i>mutM</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>recA</i>	
12029	13	69	188	116	30	143	115	255
13396	93	100	93	59	63	69	94	224
13397	10	29	21	21	32	32	10	15
13-1111	120	8	236	126	4	163	131	307
13-1761	89	95	124	81	90	107	87	182
14-0053	81	89	320	73	72	98	79	381
14-1226	74	79	97	62	74	88	70	124
14-2780	28	70	83	33	18	15	16	85
15-1566	2	134	213	127	63	69	5	282
15-2743	81	136	215	79	72	85	135	296
16-1117	13	90	113	74	6	99	80	143
17-0676	3	1	82	3	25	4	62	84
17-0919	13	98	127	83	89	111	80	186
17-1926	13	99	127	83	89	111	80	186

8 Discusión

S. maltophilia como patógeno oportunista es de gran importancia en entornos hospitalarios, presentes en pacientes inmunocomprometidos (Calza *et al.*, 2003, Falagas *et al.*, 2009, Looney *et al.*, 2009, Abbott *et al.*, 2015). Estas infecciones son aisladas con más frecuencia en sistema respiratorio, áreas con alguna cirugía reciente, tracto urinario, y sistema circulatorio (Madi *et al.*, 2016). Lo anterior concuerda con nuestros resultados, ya que se encontró una frecuencia del 78% en vías respiratorias.

Uno de los principales factores de virulencia de esta bacteria es la producción de biopelícula, con capacidad de adherirse a superficies bióticas y abióticas. Estas superficies se pueden encontrar en contacto directo con los pacientes como: tubos respiratorios, lava manos, camas con humedad, catéteres y líneas intravenosas. En infecciones de pacientes inmunocomprometidos y afecciones respiratorias, esta formación de la biopelícula ayuda a ejercer su colonización y así modular su farmacorresistencia creando una gran importancia dentro del entorno hospitalario hasta con un 65% debido a la cantidad de infecciones adquiridas (Krzewinski *et al.*, 2001, Donlan 2002, Di Bonaventura *et al.*, 2004). En nuestro estudio la producción de biopelícula se encuentra presente en la mayoría de los aislamientos clínicos de *S. maltophilia* con un 96%, y un 30% del total en pacientes con infecciones a nivel respiratorio, lo que concuerda con otros estudios donde *S. maltophilia* demuestra una alta producción de biopelícula y la correlación entre pacientes con infecciones a nivel respiratorio (Pompilio *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2019). Además, se demostró un muy bajo porcentaje de aislamientos no productores de biopelícula (4%) y un porcentaje alto de producción fuerte de biopelícula (53%) dentro de los aislamientos clínicos obtenidos para el estudio, lo que concuerda con lo reportado en estudios de aislamientos clínicos obtenidos de unidades hospitalarias, reportando porcentajes de 88% a 100% (Di Bonaventura *et al.*, 2004, Flores-Trevino *et al.*, 2014).

Se han empleado técnicas de tipificaciones moleculares para la obtención de datos sobre diversidad genética, en donde diferentes hospitales alrededor del mundo realizan estos estudios con la finalidad de obtener datos acerca de las relaciones fenotípicas y genéticas del microorganismo y su transmisión hospitalaria (Denton *et al.*, 1998, Foley *et al.*, 2009, Yun *et al.*, 2016). En el presente estudio se obtuvo un porcentaje muy bajo de clonalidad del 1% presente en aislamientos clínicos del mismo año y de pacientes

hospitalizados en el área de UCI. Un estudio similar muestra resultados que concuerdan con los nuestros en donde se detectó baja clonalidad con solo 11 pulsotipos similares los cuales fueron analizados posteriormente por MLST (Madi *et al.*, 2016). Existen estudios similares donde revelan alta diversidad genética en aislamientos clínicos de *S. maltophilia* (Marchenay *et al.*, 2015), así como un mayor porcentaje de clonalidad del 21.6% (Flores-Trevino *et al.*, 2014). Además, existen estudios que concuerdan con nuestros resultados donde se reporta alta diversidad genética en aislamientos clínicos con un porcentaje del 70.7% (Pompilio *et al.*, 2011), y 62.5% de diversidad genética en aislamientos de pacientes con fibrosis quística (Marzuillo *et al.*, 2009). Además, los patrones de PFGE tienen un 75% al 100% de similitud en comparación con 28% al 80% reportado previamente (Valdezate *et al.*, 2004). Por otro lado, existen publicaciones con resultados de aislamientos genotípicamente relacionados comparados de entornos medio ambientales e infecciones hospitalarias y se reporta un porcentaje del 6% con pacientes en infecciones respiratorias (Heirali *et al.*, 2016).

Los métodos de tipificación han sido utilizados con éxito dentro del estudio molecular, como MLST, que se enfoca en secuencias de fragmentos de siete genes de mantenimiento (Kaiser *et al.*, 2009, Corlouer *et al.*, 2017). En este estudio se realizó el análisis de MLST para determinar la diversidad genética de 14 aislamientos clínicos de *S. maltophilia* de pacientes que se encontraban hospitalizados dentro de la Unidad de Cuidados Intensivos. Los resultados mostraron 12 tipos de secuencia diferentes y dos aislamientos con el mismo perfil alélico, que corresponden al ST186. Los ST84, ST182 y ST186 se reportaron previamente en un estudio de 12 años en aislamientos relacionados a pacientes con fibrosis quística en un hospital de Roma, Italia (Esposito *et al.*, 2017). Del mismo modo, los ST84 y ST85 fueron por primera vez reportados en 66 aislamientos recolectados en 2005 en un hospital en Japón (Tanimoto 2013). Por otro lado, en aislamientos clínicos procedentes de un hospital de tercer nivel en Corea, y en aislamientos de pacientes con y sin fibrosis quística de un hospital pediátrico se reportaron los ST5, ST28, y ST31 (Kaiser *et al.*, 2009, Cho *et al.*, 2012, Madi *et al.*, 2016). Por el contrario, en otro estudio no existe un predominio del ST5 en aislamientos con pacientes con fibrosis quística (Corlouer *et al.*, 2017).

En conclusión, en este trabajo se confirmó una alta tasa de producción de biopelícula en cepas obtenidas dentro de entornos hospitalarios principalmente relacionado a infecciones respiratorias, junto a una alta diversidad genética de aislamientos clínicos de *S. maltophilia*.

9 Conclusiones

Los aislamientos de *S. maltophilia* recolectados en un periodo de 7 años en dos hospitales de tercer nivel del país presentaron alta producción de biopelícula (96%) y en su mayoría se presentaron de origen respiratorio.

Los aislamientos de pacientes hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos presentaron baja clonalidad y alta diversidad genética, con solo una clona y 12 tipos ST diferentes dentro de ellos los ST84, ST85, ST182 y ST186 previamente ya reportados, sugiriendo nula transmisión de infecciones dentro del hospital.

10 Referencias

- Abbott IJ and AY Peleg. 2015. *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, and nonmelioid Burkholderia species: antimicrobial resistance and therapeutic strategies. *Semin Respir Crit Care Med* 36(1): 99-110.
- Abbott IJ, MA Slavin, JD Turnidge, KA Thursky and LJ Worth. 2011. *Stenotrophomonas maltophilia*: emerging disease patterns and challenges for treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther* 9(4): 471-488.
- Adegoke AA, TA Stenstrom and AI Okoh. 2017. *Stenotrophomonas maltophilia* as an Emerging Ubiquitous Pathogen: Looking Beyond Contemporary Antibiotic Therapy. *Front Microbiol* 8: 2276.
- Aisenberg G, KV Rolston, BF Dickey, DP Kontoyiannis, Raad, II and A Safdar. 2007. *Stenotrophomonas maltophilia* pneumonia in cancer patients without traditional risk factors for infection, 1997-2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26(1): 13-20.
- Al Johani SM, J Akhter, H Balkhy, A El-Saed, M Younan and Z Memish. 2010. Prevalence of antimicrobial resistance among gram-negative isolates in an adult intensive care unit at a tertiary care center in Saudi Arabia. *Ann Saudi Med* 30(5): 364-369.
- Barbier-Frebour N, I Boutiba-Boubake, M Nouvello and J Lemelan. 2000. Molecular investigation of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates exhibiting rapid emergence of ticarcillin-clavulanate resistance. *J Hosp Infect* 45(1): 35-41.
- Barbolla R, M Catalano, BE Orman, A Famiglietti, C Vay, J Smayevsky, D Centron and SA Pineiro. 2004. Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 48(2): 666-669.
- Brooke JS. 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev* 25(1): 2-41.
- Calza L, R Manfredi and F Chiodo. 2003. *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* as an emerging opportunistic pathogen in association with HIV infection: a 10-year surveillance study. *Infection* 31(3): 155-161.
- Carrillo-Cordova JR and LM Amezcua-Guerra. 2012. Autoimmunity as a possible predisposing factor for *Stenotrophomonas maltophilia* endocarditis. *Arch Cardiol Mex* 82(3): 204-207.

- Corlouer C, B Lamy, M Desroches, J Ramos-Vivas, E Mehiri-Zghal, O Lemenand, JM Delarbre, JW Decousser and F College de Bacteriologie-Virologie-Hygiene des Hopitaux de. 2017. *Stenotrophomonas maltophilia* healthcare-associated infections: identification of two main pathogenic genetic backgrounds. J Hosp Infect 96(2): 183-188.
- Critchley MM, NJ Cromar, NC McClure and HJ Fallowfield. 2003. The influence of the chemical composition of drinking water on cuprosolvency by biofilm bacteria. J Appl Microbiol 94(3): 501-507.
- Chang YT, CY Lin, YH Chen and PR Hsueh. 2015. Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. Front Microbiol 6: 893.
- Cho HH, JY Sung, KC Kwon and SH Koo. 2012. Expression of Sme efflux pumps and multilocus sequence typing in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. Ann Lab Med 32(1): 38-43.
- de Oliveira-Garcia D, M Dall'Agnol, M Rosales, AC Azzuz, N Alcantara, MB Martinez and JA Giron. 2003. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. Cell Microbiol 5(9): 625-636.
- Denton M, NJ Todd, KG Kerr, PM Hawkey and JM Littlewood. 1998. Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. J Clin Microbiol 36(7): 1953-1958.
- Di Bonaventura G, I Spedicato, D D'Antonio, I Robuffo and R Piccolomini. 2004. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. Antimicrob Agents Chemother 48(1): 151-160.
- Di Bonaventura G, I Spedicato, D D'Antonio, I Robuffo and R Piccolomini. 2004. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. Antimicrobial agents and chemotherapy 48(1): 151-160.
- Di Bonaventura G, S Stepanovic, C Picciani, A Pompilio and R Piccolomini. 2007. Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. Folia Microbiol (Praha) 52(1): 86-90.
- Donlan RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis 8(9): 881-890.

- Esper RC, JFM López and JGM García. 2012. Infección de tejidos blandos por *Stenotrophomonas maltophilia* en un paciente con anemia aplásica. *Medicina Interna de México* 28(6): 622.
- Esposito A, A Pompilio, C Bettua, V Crocetta, E Giacobazzi, E Fiscarelli, O Jousson and G Di Bonaventura. 2017. Evolution of *Stenotrophomonas maltophilia* in Cystic Fibrosis Lung over Chronic Infection: A Genomic and Phenotypic Population Study. *Front Microbiol* 8: 1590.
- Falagas ME, AC Kastoris, EK Vouloumanou, PI Rafailidis, AM Kapaskelis and G Dimopoulos. 2009. Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review of the literature. *Future Microbiol* 4(9): 1103-1109.
- Flores-Trevino S, P Bocanegra-Ibarias, A Camacho-Ortiz, R Morfin-Otero, HA Salazar-Sesatty and E Garza-Gonzalez. 2019. *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm: its role in infectious diseases. *Expert Rev Anti Infect Ther*: 1-17.
- Flores-Trevino S, JL Gutierrez-Ferman, R Morfin-Otero, E Rodriguez-Noriega, D Estrada-Rivadeneira, C Rivas-Morales, JM Llaca-Diaz, A Camacho-Ortiz, S Mendoza-Olazarán and E Garza-Gonzalez. 2014. *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico: antimicrobial resistance, biofilm formation and clonal diversity. *J Med Microbiol* 63(Pt 11): 1524-1530.
- Foley SL, AM Lynne and R Nayak. 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect Genet Evol* 9(4): 430-440.
- Gales AC, H Seifert, D Gur, M Castanheira, RN Jones and HS Sader. 2019. Antimicrobial Susceptibility of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex and *Stenotrophomonas maltophilia* Clinical Isolates: Results From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2016). *Open Forum Infect Dis* 6(Suppl 1): S34-S46.
- Gilligan PH, Lum, G., VanDamme, P. A. R., and Whittier, S. (2003). Manual of Clinical Microbiology. Washington, D.C., ASM Press.
- Güvenir M, B Otlu, E Tunc, E Aktas and K Suer. 2018. High Genetic Diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates from Single Hospital: Nosocomial Outbreaks or Genotypic Profile Changes during Subcultures. *Malays J Med Sci* 25(2): 40-49.
- Heirali A, S McKeon, S Purighalla, DG Storey, L Rossi, G Costilhes, SJ Drews, HR Rabin, MG Surette and MD Parkins. 2016. Assessment of the Microbial Constituents of the Home

- Environment of Individuals with Cystic Fibrosis (CF) and Their Association with Lower Airways Infections. PLoS One 11(2): e0148534.
- Herrera-Heredia SA, C Pezina-Cantu, E Garza-Gonzalez, P Bocanegra-Ibarias, S Mendoza-Olazarán, R Morfin-Otero, A Camacho-Ortiz, L Villarreal-Trevino, E Rodriguez-Noriega, L Palau-Davila, HJ Maldonado-Garza and S Flores-Trevino. 2017. Risk factors and molecular mechanisms associated with trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico. J Med Microbiol 66(8): 1102-1109.
- Hu LF, GS Chen, QX Kong, LP Gao, X Chen, Y Ye and JB Li. 2016. Increase in the Prevalence of Resistance Determinants to Trimethoprim/Sulfamethoxazole in Clinical *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates in China. PLoS One 11(6): e0157693.
- Huang TP, EB Somers and AC Wong. 2006. Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. J Bacteriol 188(8): 3116-3120.
- Jones RN. 2010. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. Clin Infect Dis 51 Suppl 1: S81-87.
- Kaiser S, K Biehler and D Jonas. 2009. A *Stenotrophomonas maltophilia* multilocus sequence typing scheme for inferring population structure. J Bacteriol 191(9): 2934-2943.
- Kolodkin-Gal I, D Romero, S Cao, J Clardy, R Kolter and R Losick. 2010. D-amino acids trigger biofilm disassembly. Science 328(5978): 627-629.
- Krzewinski JW, CD Nguyen, JM Foster and JL Burns. 2001. Use of random amplified polymorphic DNA PCR to examine epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 39(10): 3597-3602.
- Levesque S, PJ Dufresne, H Soualhine, MC Domingo, S Bekal, B Lefebvre and C Tremblay. 2015. A Side by Side Comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS Technology for Microorganism Identification in a Public Health Reference Laboratory. PLoS One 10(12): e0144878.
- Liaw SJ, YL Lee and PR Hsueh. 2010. Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucosyltransferase (SpgM), and melanin and biofilm formation. Int J Antimicrob Agents 35(2): 126-130.

- Liu W, X-Q Tian, J-W Wei, L-L Ding, W Qian, Z Liu and F-F Wang. 2017. BsmR degrades c-di-GMP to modulate biofilm formation of nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Scientific Reports* 7(1): 4665.
- Lo WT, CC Wang, CM Lee and ML Chu. 2002. Successful treatment of multi-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis with ciprofloxacin in a pre-term infant. *Eur J Pediatr* 161(12): 680-682.
- Lockhart SR, MA Abramson, SE Beekmann, G Gallagher, S Riedel, DJ Diekema, JP Quinn and GV Doern. 2007. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. *J Clin Microbiol* 45(10): 3352-3359.
- Looney WJ, M Narita and K Muhlemann. 2009. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis* 9(5): 312-323.
- López Rodríguez R, F Lado Lado, I Rodríguez López, R Gamallo Theodosio, V Lorenzo Zúñiga and L Rodríguez-Otero (2003). Endocarditis por *Stenotrophomonas maltophilia*: presentación de un caso y revisión de la literatura. *Anales de medicina interna, SciELO Espana*.
- Madi H, J Lukic, Z Vasiljevic, M Biocanin, M Kojic, B Jovicic and J Lozo. 2016. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* Strains from a Pediatric Tertiary Care Hospital in Serbia. *PLoS One* 11(10): e0165660.
- Marchenay P, G Blasco, JC Navellou, J Leroy, P Cholley, D Talon, X Bertrand and H Gbaguidi-Haore. 2015. Acquisition of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in intensive care unit: predictors and molecular epidemiology. *Med Mal Infect* 45(1-2): 34-40.
- Marzuillo C, M De Giusti, D Tufi, A Giordano, A Del Cimmuto, S Quattrucci, C Mancini and P Villari. 2009. Molecular Characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30(8): 753-758.
- McKay GA, DE Woods, KL MacDonald and K Poole. 2003. Role of phosphoglucosyltransferase of *Stenotrophomonas maltophilia* in lipopolysaccharide biosynthesis, virulence, and antibiotic resistance. *Infect Immun* 71(6): 3068-3075.

- Mercuri PS, Y Ishii, L Ma, GM Rossolini, F Luzzaro, G Amicosante, N Franceschini, JM Frere and M Galleni. 2002. Clonal diversity and metallo-beta-lactamase production in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. Microb Drug Resist 8(3): 193-200.
- Monroe D. 2007. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. PLoS Biol 5(11): e307.
- Nukui Y, S Hatakeyama, Y Shintani, H Yotsuyanagi, K Moriya and K Koike. 2010. Clinical characteristics and prognostic factors in patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. International Journal of Infectious Diseases 14: e254-e255.
- Osawa K, K Shigemura, K Kitagawa, I Tokimatsu and M Fujisawa. 2018. Risk factors for death from *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. J Infect Chemother 24(8): 632-636.
- Pompilio A, V Crocetta, D Ghosh, M Chakrabarti, G Gherardi, LA Vitali, E Fiscarelli and G Di Bonaventura. 2016. *Stenotrophomonas maltophilia* Phenotypic and Genotypic Diversity during a 10-year Colonization in the Lungs of a Cystic Fibrosis Patient. Front Microbiol 7: 1551.
- Pompilio A, S Pomponio, V Crocetta, G Gherardi, F Verginelli, E Fiscarelli, G Dicuonzo, V Savini, D D'Antonio and G Di Bonaventura. 2011. Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: genome diversity, biofilm formation, and virulence. BMC Microbiol 11: 159.
- Ryan RP, S Monchy, M Cardinale, S Taghavi, L Crossman, MB Avison, G Berg, D van der Lelie and JM Dow. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. Nat Rev Microbiol 7(7): 514-525.
- Saugel B, K Eschermann, R Hoffmann, A Hapfelmeier, C Schultheiss, V Phillip, F Eyer, KL Laugwitz, RM Schmid and W Huber. 2012. *Stenotrophomonas maltophilia* in the respiratory tract of medical intensive care unit patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31(7): 1419-1428.
- Senol E. 2004. *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. J Hosp Infect 57(1): 1-7.
- Shueh CS, V Neela, S Hussin and RA Hamat. 2013. Simple, time saving pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Microbiol Methods 94(2): 141-143.
- Stepanovic S, D Vukovic, V Hola, G Di Bonaventura, S Djukic, I Cirkovic and F Ruzicka. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical

- recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS 115(8): 891-899.
- Tanimoto K. 2013. *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from a university hospital in Japan: genomic variability and antibiotic resistance. J Med Microbiol 62(Pt 4): 565-570.
- Valdezate S, A Vindel, P Martín-Dávila, BS Del Saz, F Baquero and R Cantón. 2004. High genetic diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* strains despite their originating at a single hospital. Journal of clinical microbiology 42(2): 693-699.
- Velazquez-Acosta C, S Zarco-Marquez, MC Jimenez-Andrade, P Volkow-Fernandez and P Cornejo-Juarez. 2018. *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia and pneumonia at a tertiary-care oncology center: a review of 16 years. Support Care Cancer 26(6): 1953-1960.
- Wang B, X Tan, R Du, F Zhao, L Zhang, Y Han and Z Zhou. 2019. Bacterial composition of biofilms formed on dairy-processing equipment. Prep Biochem Biotechnol 49(5): 477-484.
- Wood GC, EL Underwood, MA Croce, JM Swanson and TC Fabian. 2010. Treatment of recurrent *Stenotrophomonas maltophilia* ventilator-associated pneumonia with doxycycline and aerosolized colistin. Ann Pharmacother 44(10): 1665-1668.
- Yeshurun M, A Gafter-Gvili, M Thaler, N Keller, A Nagler and A Shimoni. 2010. Clinical characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* infection in hematopoietic stem cell transplantation recipients: a single center experience. Infection 38(3): 211-215.
- Yun HC, CC Tully, K Mende, M Castillo and CK Murray. 2016. A single-center, six-year evaluation of the role of pulsed-field gel electrophoresis in suspected burn center outbreaks. Burns 42(6): 1323-1330.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Edeer Iván Montoya Hinojosa

Candidato para el grado de: Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: CARACTERIZACIÓN CLONAL DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE
Stenotrophomonas maltophilia PRODUCTORES DE BIOPELÍCULA.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en Hidalgo del Parral, Chihuahua, México; el 17 de agosto de 1994.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Chihuahua, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2017 en la Facultad de Ciencias Químicas

11 ANEXO I.

11.1 Preparación de reactivos y soluciones

Buffer de fosfatos 0.01 M pH 7.4. Disolver 0.4267 g de K_2HPO_4 , 0.3470 g de KH_2PO_4 en agua destilada, ajustar pH a 7.2 y aforar a 500 mL.

EDTA 500 mM. Disolver 18.62 g de EDTA en 100 mL de agua destilada y ajustar el pH a 8.0.

ES Disolver 93.1 g de EDTA en 400 ml de agua destilada, añadir 0.5 g de sarcosyl y aforar en 500 ml de agua destilada ajustando el pH a 9.0. Esterilizar en autoclave

ESP Agregar 1 ml de ES por muestra y 1 mg de Proteinasa K.

EC Disolver 29.2 g de NaCl, 1 g de Deoxicolato de sodio, 2.5 g de Brij, 5 ml de Tris 1M y 100 ml de EDTA 0.5 M y aforar en 500 ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave

Gel agarosa al 2%. Disolver 4 g de agarosa en 200 mL de TBE 1X, calentar en microondas hasta fundir, agregando 20 μ L de bromuro de etidio 2 μ g/mL y vaciar en la cámara de electroforesis.

Jugo azul 5X (Buffer de carga para electroforesis). Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3 mL de glicerol en TE IX pH 8 y aforar a 10 mL.

PIV Disolver 29.22 g de NaCl en 5 ml de Tris base 1M y aforar en 500 ml de agua destilada ajustando el pH a 8.0. Esterilizar en autoclave

TBE 10X. Disolver 27 g de Tris-base, 13.7 g de ácido bórico, 10 mL de EDTA 0.5 M pH 8 en agua destilada, ajustar a pH 8 y aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave.

TBE 0.5X. Medir 50 mL de TBE 10X y aforar a 1L con agua destilada.

12 ANEXO II

12.1 Características de los aislamientos clínicos y producción de biopelícula de *Stenotrophomonas maltophilia* incluidos en este estudio.

Aislamiento	Origen	Fecha	Sala	Espécimen	Biopelícula	Relación clonal	ST
3388	MTY	26/02/2007	Otros	Catéter	PD	NR	NA
3546	MTY	14/03/2007	Otros	LBA	PD	NR	NA
3772	MTY	24/04/2007	Otros	Orina	PD	NR	NA
11704	MTY	15/12/2011	UCIA	Tráquea	PD	NR	NA
12437	MTY	30/05/2012	UCIPQX	Tráquea	PF	NR	NA
13331	MTY	01/10/2012	Gastroenterología	Espuito	PF	NR	NA
13396	MTY	03/10/2012	UCIA	Lavado bronquial	PD	NR	224
13397	MTY	03/10/2012	UCIPQ	Sangre	PF	NR	15
13963	MTY	04/01/2013	UCIA	Tráquea	PD	NR	NA
12029	MTY	14/03/2012	UCIPQ	Sangre	PF	NR	255
13-1111	MTY	05/08/2013	UCIA	Tráquea	PM	NR	307
13-1161	MTY	09/08/2013	UCIA	Sangre	PM	NR	182
13-1318	MTY	23/08/2013	Nefrología	Líquido peritoneal	PM	NR	NA
13-1319	MTY	23/08/2013	Cx Plástica	Absceso	PM	NR	NA
13-1320	MTY	23/08/2013	Cx Plástica	Herida	PM	NR	NA
13-1725	MTY	26/09/2013	UCIPQX	Tráquea	PM	NR	NA
13-2052	MTY	04/11/2013	M. Interna	Espuito	PM	NR	NA
13-840	MTY	10/07/2013	Ginecoobstetricia	Catéter	PM	NR	NA
14-0053	MTY	08/01/2014	UCIPQ	Tráquea	PM	NR	381
14-1035	MTY	04/04/2014	M. Interna II	Tráquea	PM	NR	NA
14-1075	MTY	09/04/2014	UCIA	Tráquea	PM	NR	NA
14-1226	MTY	02/05/2014	UCIA	Tráquea	PM	NR	124

14-130	MTY	15/01/2014	UCIPQ	Tráquea	PM	NR	NA
14-1342	MTY	14/05/2014	M. Interna II	Líquido pleural	PM	NR	NA
14-1582	MTY	06/06/2014	Neurología	Tráquea	PM	NR	NA
14-1706	MTY	25/06/2014	UCIPQX	Tráquea	PM	NR	NA
14-1889	MTY	10/07/2014	UCIA	Sangre	PM	NR	NA
14-1930	MTY	15/07/2014	Externo	Herida	PM	NR	NA
14-1957	MTY	17/07/2014	PENS	Espuito	PM	NR	NA
14-2013	MTY	24/07/2014	M. Interna II	Espuito	PM	NR	NA
13-339	MTY	22/05/2013	Cardiología	Sangre	PM	NR	NA
13-449	MTY	23/05/2013	UCIPQ	Tráquea	PM	NR	NA
13-450	MTY	23/05/2013	Neurología	Tráquea	PM	NR	NA
14-2046	MTY	30/07/2014	M. Interna III	Espuito	PM	NR	NA
14-2152	MTY	14/08/2014	UCIA	Sangre	PM	NR	NA
14-2346	MTY	03/09/2014	UCIPQ	LBA	PM	NR	NA
14-2376	MTY	08/09/2014	M. Interna	LBA	PM	NR	NA
14-2456	MTY	19/09/2014	M. Interna	Espuito	PM	NR	NA
14-3113	MTY	19/11/2014	UCIA	Tráquea	PM	NR	NA
14-3231	MTY	25/11/2014	M. Interna II	LBA	PM	NR	NA
14-3282	MTY	27/11/2014	UCIA	LBA	PM	NR	NA
14-3432	MTY	21/11/2014	Otros	Secreción	PM	NR	NA
14-927	MTY	25/03/2014	Otros	Catéter	PM	NR	NA
15-1176	MTY	20/05/2015	M. Interna III	Espuito	PM	NR	NA
15-1231	MTY	27/05/2015	PQx	LBA	PM	NR	NA
15-1395	MTY	15/06/2015	M. Interna I	Sangre	PM	NR	NA
15-1548	GDL	25/06/2015	Infectología	ND	PM	NR	NA
15-1552	GDL	25/06/2015	Trasplantes	Sangre	PM	NR	NA
15-1560	GDL	25/06/2015	Neurología	LCR	PM	NR	NA
15-1561	GDL	25/06/2015	Trasplantes	Bronquial	PM	NR	NA

15-1679	MTY	08/07/2015	UCIA	Tráquea	PM	NR	NA
15-1843	MTY	27/07/2015	M. Interna II	LBA	PM	NR	NA
15-1847	MTY	23/07/2015	UCIA	LBA	PM	NR	NA
15-1849	MTY	23/07/2015	PQx	Tráquea	PM	NR	NA
14-2365	MTY	05/09/2014	CXP	Sangre	PF	NR	NA
15-1935	MTY	31/07/2015	M. Interna III	Espujo	PM	NR	NA
15-1949	MTY	03/08/2015	UCIA	Espujo	PM	NR	NA
15-2026	MTY	12/08/2015	M. Interna III	Espujo	PM	NR	NA
15-2068	MTY	14/08/2015	PQx	LBA	PM	NR	NA
15-2428	GDL	21/09/2015	Otros	Úlcera	PM	NR	NA
15-2743	GDL	19/10/2015	Trasplantes	Tráquea	PM	NR	NA
14-298	MTY	04/02/2014	UCIPQ	Tráquea	PM	NR	NA
15-436	MTY	27/02/2015	P Qx	Orina	PM	NR	NA
15-534	MTY	11/03/2015	UCIA	Tráquea	PM	NR	NA
15-615	MTY	19/03/2015	UCIA	LBA	PM	NR	NA
14-3230	MTY	25/11/2014	UCIPQ	LBA	PD	NR	NA
15-709	MTY	26/03/2015	Externo	LBA	PM	NR	NA
13-1537	MTY	10/09/2013	UCIA	Sangre	PF	NR	NA
13-1538	MTY	10/09/2013	Otros	Sangre	PF	NR	NA
13-1577	MTY	21/09/2013	UCIA	Tráquea	PF	NR	NA
13-1698	MTY	24/09/2013	M. Interna III	Tráquea	PF	NR	NA
13-1746	MTY	27/09/2013	Cx General	Espujo	PF	NR	NA
13-1761	MTY	02/10/2013	UCIA	LBA	PF	NR	NA
13-1888	MTY	16/10/2013	UCIA	Tráquea	PF	NR	NA
13-1917	MTY	21/10/2013	M. Interna	Sangre	PF	NR	NA
13-2148	MTY	13/11/2013	Otros	Tráquea	PF	NR	NA
14-1219	MTY	30/04/2014	UCIA	Tráquea	PF	NR	NA
14-1907	MTY	11/07/2014	M. Interna I	Catéter	PF	NR	NA

14-2123	MTY	06/08/2014	Cx General	Tráquea	PF	NR	NA
14-2419	MTY	12/09/2014	UCIPQX	Catéter	PF	NR	NA
14-3038	MTY	12/11/2014	M. Interna	Tráquea	PF	NR	NA
15-1121	MTY	18/05/2015	Ginecología	Sangre	PF	NR	NA
15-1547	GDL	25/06/2015	Proctología	Otros	PF	NR	NA
15-1550	GDL	25/06/2015	Nefrología	Otros	PF	NR	NA
15-1551	GDL	25/06/2015	M. Interna	Líquido pleural	PF	NR	NA
15-1554	GDL	25/06/2015	Cx. General	Otros	PF	NR	NA
15-1557	GDL	25/06/2015	Infectología	Sangre	PF	NR	NA
15-1558	GDL	25/06/2015	Nefrología	Secreción	PF	NR	NA
15-1564	GDL	25/06/2015	Infectología	Herida	PF	NR	NA
15-1566	GDL	25/06/2015	Trasplante	Tráquea	PF	NR	282
15-1568	GDL	25/06/2015	M. Interna	Sangre	PF	NR	NA
15-1848	MTY	23/07/2015	Externo	Tráquea	PF	NR	NA
15-2172	MTY	25/08/2015	PQx	LBA	PF	NR	NA
15-2426	GDL	21/09/2015	Otros	Espuito	PF	NR	NA
15-2430	GDL	21/09/2015	Hematología	Pierna	PF	NR	NA
15-2744	GDL	19/10/2015	Trasplante	Bronquial	PF	NR	NA
15-1598	MTY	01/07/2015	M. Interna III	Espuito	PF	NR	NA
13-1112	MTY	05/08/2013	M. Interna	Tráquea	PD	NR	NA
13-2231	MTY	21/11/2013	Otros	Piel	PD	NR	NA
13-2401	MTY	26/11/2013	Otros	lavado bronquial	PD	NR	NA
13-2648	MTY	30/12/2013	UCIPQX	Tráquea	PD	NR	NA
14-1227	MTY	02/05/2014	M. Interna II	Absceso	PD	NR	NA
14-1239	MTY	02/05/2014	Otros	Tejido	PD	NR	NA
14-143	MTY	16/01/2014	UCIQ	Tráquea	PD	NR	NA
14-2139	MTY	07/08/2014	UCIPQX	LBA	PD	NR	NA
14-2249	MTY	25/08/2014	UCIA	Tráquea	PD	NR	NA

14-2454	MTY	19/09/2014	Cx General	Herida	PD	NR	NA
14-2780	MTY	15/10/2014	UCIPQX	Tráquea	PD	NR	85
14-3142	MTY	24/11/2014	UCIA	Tráquea	PD	NR	NA
14-974	MTY	28/03/2014	M. Interna II	LBA	PD	NR	NA
15-2743	GDL	19/10/2015	Trasplante	LBA	PF	NR	296
15-1031	MTY	06/05/2015	Cx General	Líquido pleural	PD	NR	NA
15-1122	MTY	18/05/2015	Otros	Sangre	PD	NR	NA
15-2928	MTY	05/11/2015	UIP	Lavado bronquial	PF	NR	NA
15-2940	MTY	09/11/2015	UCIA	Lavado bronquial	PD	NR	NA
15-3010	MTY	17/11/2015	Cx General	LBA	PF	NR	NA
15-3034	MTY	19/11/2015	Cx General	LBA	PF	NR	NA
15-3056	GDL	20/11/2015	Ortopedia	Herida quirúrgica	PF	NR	NA
15-3080	GDL	20/11/2015	Oncología	Sangre	PF	NR	NA
15-3081	GDL	20/11/2015	M. Interna	Orina	PF	NR	NA
15-3082	GDL	20/11/2015	Nefrología	Abdomen	PF	NR	NA
15-3083	GDL	20/11/2015	UCI	Vías respiratorias bajas	NP	NR	NA
15-3084	GDL	20/11/2015	UCI	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
15-3085	GDL	20/11/2015	UCI	Hemocultivo	PF	NR	NA
15-3087	GDL	20/11/2015	UCIP	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
15-3088	GDL	20/11/2015	Ortopedia	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
15-3194	GDL	15/11/2015	Hematología	Faríngeo	PF	NR	NA
15-3195	GDL	20/11/2015	Urgencias pediatría	LBA	PF	NR	NA
15-3196	GDL	19/11/2015	UCINEX	Tráquea	PF	NR	NA
15-3198	GDL	21/11/2015	Urgencias pediatría	Secreción bronquial	PF	NR	NA
15-3216	GDL	27/11/2015	Infectología	Catéter venoso central	PF	NR	NA
15-3217	GDL	27/11/2015	M. Interna	Catéter venoso central	PF	NR	NA
15-3218	GDL	01/12/2015	Urgencias pediatría	Hemocultivo	PF	NR	NA
15-1250	MTY	01/06/2015	Cx General	Espujo	PD	NR	NA

15-1549	GDL	25/06/2015	Infectología	Otros	PD	NR	NA
15-1559	GDL	25/06/2015	Infectología	Secreción	PD	NR	NA
15-169	MTY	08/07/2015	M. Interna I	Secreción bronquial	PD	NR	NA
15-1691	MTY	09/07/2015	Cx General	Tráquea	PD	NR	NA
15-2164	MTY	16/08/2015	M. Interna I	Orina	PD	NR	NA
15-434	MTY	27/02/2015	Externo	Espujo	PD	NR	NA
15-435	MTY	27/02/2015	M. Interna II	Espujo	PD	NR	NA
15-914	MTY	24/04/2015	M. Interna II	Catéter	PD	NR	NA
16-0035	MTY	11/01/2016	PQx	Tráquea	PF	NR	NA
16-0066	MTY	14/01/2016	PQx	Hx Qx	PF	NR	NA
16-0123	MTY	19/01/2016	UCIP	Secreción bronquial	PF	NR	NA
16-0125	MTY	19/01/2016	UCIP	Secreción bronquial	PF	NR	NA
16-0127	MTY	20/01/2016	PQx	Tráquea	PF	NR	NA
16-0136	MTY	21/01/2016	M. Interna	LBA	PF	NR	NA
16-0258	MTY	10/02/2016	M interna	Espujo	PF	NR	NA
16-0259	MTY	10/02/2016	UCIP	Faríngeo	PF	NR	NA
16-0300	MTY	16/02/2016	UCIN	lavado bronquial	PF	NR	NA
16-0310	MTY	17/02/2016	Pediatría	LCR	PM	NR	NA
16-0561	MTY	18/03/2016	UCIA	Líquido peritoneal	NP	NR	NA
16-0599	MTY	31/03/2016	PENS	esputo	PF	NR	NA
16-0601	MTY	31/03/2016	Cx. General	Tráquea	NP	NR	NA
16-0692	MTY	20/04/2016	UCIA	Tráquea	PM	NR	NA
16-0736	MTY	26/04/2016	SME	LBA	PM	NR	NA
16-0748	GDL	28/04/2016	Transplante	Hemocultivo	NP	NR	NA
16-0749	GDL	28/04/2016	UCINEX	Vías respiratorias bajas	PM	NR	NA
16-0750	GDL	28/04/2016	UCIP	Hemocultivo	PF	NR	NA
16-0751	GDL	28/04/2016	UCIN	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
16-0771	MTY	29/04/2016	NEURO	Espujo	NP	NR	NA

16-0820	GDL	09/05/2016	Transplante	Hemocultivo	PM	NR	NA
16-0821	GDL	09/05/2016	Infectología	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
16-0822	GDL	09/05/2016	UCIN	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
16-0823	GDL	09/05/2016	UCIN	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
16-0923	MTY	25/05/2016	CXP	Tejido	PF	NR	NA
16-1048	MTY	14/06/2016	Cx General	Tráquea	PF	NR	NA
16-1065	MTY	20/06/2016	UCIP	Lavado bronquial	PF	NR	NA
16-1096	GDL	30/06/2016	Infectología	Vías respiratorias bajas	PM	NR	NA
16-1097	GDL	30/06/2016	M. Interna	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
16-1102	GDL	30/06/2016	UTIA	Hemocultivo	PF	NR	NA
16-1117	GDL	04/07/2016	UCIA	Lavado bronquial	PF	NR	143
16-1118	GDL	04/07/2016	Pediatría	Lavado bronquial	PD	NR	NA
16-1119	GDL	04/07/2016	Pediatría	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
16-1120	GDL	04/07/2016	Infecto	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
16-1162	GDL	07/07/2016	Trasplantes	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
16-1291	GDL	26/07/2016	Ortopedia	Herida Quirúrgica	PM	NR	NA
16-1292	GDL	26/07/2016	UCIN	Vías respiratorias bajas	PM	NR	NA
16-1347	GDL	08/08/2016	Dermatología	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
16-1348	GDL	08/08/2016	Neurología	Hemocultivo	PF	NR	NA
16-1349	GDL	08/08/2016	Neurología	Vías respiratorias bajas	PM	NR	NA
16-1366	GDL	11/08/2016	Gastroenterología	Espujo	NP	NR	NA
16-1497	GDL	07/09/2016	Nefrología	Catéter	PF	NR	NA
16-1498	GDL	07/09/2016	Nefrología	Herida Quirúrgica	PM	NR	NA
16-1581	GDL	14/09/2016	Infectología	Herida Quirúrgica	PF	NR	NA
16-1607	GDL	28/09/2016	Hematología	Secreción	PF	NR	NA
16-1610	GDL	28/09/2016	UTIA	Secreción	PM	NR	NA
16-1612	GDL	28/09/2016	Externo	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
16-1684	GDL	05/10/2016	Ortopedia	Herida Quirúrgica	PF	NR	NA

16-1686	GDL	05/10/2016	Neurología	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
16-1687	GDL	05/10/2016	UCIN	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
16-1688	GDL	05/10/2016	Nef.Pediatrico	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
16-1690	GDL	05/10/2016	Externo	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
16-1739	GDL	21/10/2016	Neurología	Espujo	PF	NR	NA
16-1743	GDL	21/10/2016	Neurología	Sangre	PF	NR	NA
16-1796	GDL	24/10/2016	Cx. General	Vías respiratorias bajas	NP	NR	NA
16-1817	GDL	26/10/2016	Externo	Lavado bronquial	PF	NR	NA
16-1934	GDL	14/11/2016	UCI	Lavado bronquial	PF	NR	NA
16-1937	GDL	14/11/2016	INFECTO	Lavado bronquial	PM	NR	NA
16-2004	GDL	29/11/2016	UCIP	Lavado bronquial	PF	NR	NA
16-2011	GDL	01/12/2016	Infectología	Espujo	PF	NR	NA
16-2012	GDL	01/12/2016	Neurología	Espujo	PF	NR	NA
16-2078	GDL	01/12/2016	M. Interna	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
17-0095	GDL	20/01/2017	Obstetricia	Espujo	PF	NR	NA
17-0139	GDL	09/02/2017	Ginecología	Catéter	PF	NR	NA
17-0311	GDL	23/02/2017	Trasplante	Espujo	PF	NR	NA
17-0312	GDL	23/02/2017	Neurología	lavado bronquial	PF	NR	NA
17-0676	GDL	02/05/2017	UCIA	Herida	PF	NR	84
17-0919	GDL	08/06/2017	UCIA	Secreción	PF	A	186
17-0927	GDL	08/06/2017	Cx plástica	Secreción	PF	NR	NA
17-1076	GDL	03/07/2017	Urgencias pediatría	Catéter	NP	NR	NA
17-1078	GDL	03/07/2017	Geriatría	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
17-1122	GDL	06/07/2017	Cardiología	Vías respiratorias bajas	PD	NR	NA
17-1129	GDL	06/07/2017	Ortopedia	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
17-1174	GDL	13/07/2017	Otros	Secreción	PF	NR	NA
17-1177	GDL	13/07/2017	UCIN	Secreción	PF	NR	NA
17-1178	GDL	13/07/2017	Otros	Secreción	PF	NR	NA

17-1184	GDL	13/07/2017	Geriatría	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
17-1193	GDL	13/07/2017	Urgencias pediatría	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
17-1259	GDL	20/07/2017	Cirugía plástica	Hemocultivo	PF	NR	NA
17-1488	GDL	07/08/2017	Nefrología	Vías respiratorias bajas	PF	NR	NA
17-1500	GDL	07/08/2017	M. Interna	Hemocultivo	PF	NR	NA
17-1501	GDL	07/08/2017	M. Interna	Hemocultivo	PF	NR	NA
17-1502	GDL	07/08/2017	Externo	Herida Quirúrgica	PF	NR	NA
17-1611	GDL	24/08/2017	UCINP	Herida Quirúrgica	PF	NR	NA
17-1771	GDL	28/09/2017	Otros	Secreción	PF	NR	NA
17-1801	GDL	05/10/2017	M. Legal	Líquido peritoneal	NP	NR	NA
17-1802	GDL	05/10/2017	Infectología	Secreción	PF	NR	NA
17-1926	GDL	26/10/2017	UCIN	Secreción bronquial	PF	A	186
17-1928	GDL	26/10/2017	Neurología	LCR	PF	NR	NA
17-1960	GDL	03/11/2017	Nefrología	Punta de catéter	PF	NR	NA
17-1966	GDL	03/11/2017	M. Interna	Líquido pleural	PF	NR	NA
17-2049	GDL	04/12/2017	Nefrología	Sangre	PF	NR	NA
17-2053	GDL	04/12/2017	Proctología	Secreción	PF	NR	NA

A: Clona A, Cx: Cirugía, CXP: Cirugía pediatría, GDL: Guadalajara, LBA: Líquido Bronquio Alveolar, LCR: líquido cefalorraquídeo, MTY: Monterrey, NA: No aplica, NR: No relacionado, NP: No productor, PD: Producción débil, PENS: Pensionados, PF: Producción fuerte, PM: Producción moderada, PQx: Post-quirúrgico, SME: Servicio de medicina externa, UCIA: Unidad de Cuidados Intensivos Adultos, UCINEX: Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales Externos, UCIPQ: Unidad de Cuidados Intensivos post-quirúrgico, UCIPQ: Unidad de Cuidados Intensivos Quirófano, UCIPQX: Unidad de Cuidados Intensivos Postcirugía.