

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CONTRIBUCIÓN DE ADHESINAS FIMBRIALES DE *Serratia marcescens* SmUNAM836 EN
LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA Y ADHERENCIA A CÉLULAS PULMONARES**

Presentado por

M.C. Martín Andrés González Montalvo

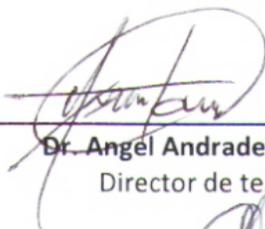
**Como requisito parcial para la obtención del Grado de
Doctor en Ciencias con orientación en Microbiología Médica**

Agosto 2021

CONTRIBUCIÓN DE ADHESINAS FIMBRIALES DE *Serratia marcescens* SmUNAM836 EN

LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA Y ADHERENCIA A CÉLULAS PULMONARES

Aprobación de la tesis:



Dr. Ángel Andrade Torres

Director de tesis



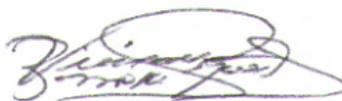
Dra. Faviola Tavares Carreón

Co- director de tesis



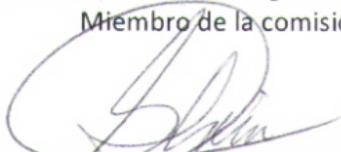
Dr. Miguel Ángel Becerril García

Miembro de la comisión



Dra. Viviana Zomosa Signoret

Miembro de la comisión



Dr. Gloria María González González

Miembro de la comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

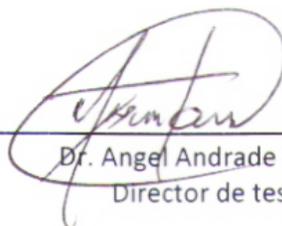
Subdirector de Estudios de Posgrado

CONTRIBUCIÓN DE ADHESINAS FIMBRIALES DE *Serratia marcescens* SmUNAM836 EN
LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA Y ADHERENCIA A CÉLULAS PULMONARES

Presentado por:

M.C. Martín Andrés González Montalvo

Este trabajo se realizó en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRECEI) adscrito al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Angel Andrade Torres. Contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a la Ciencia y la Tecnología (PAICYT) con el número CN885-19 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología FORDECYT-PRONACES/40760/2020.



Dr. Angel Andrade Torres
Director de tesis

**CONTRIBUCIÓN DE ADHESINAS FIMBRIALES DE *Serratia marcescens* SmUNAM836 EN
LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA Y ADHERENCIA A CÉLULAS PULMONARES**

EL M.C MARTÍN ANDRÉS GONZÁLEZ MONTALVO FUÉ BECARIO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) CON EL NO. DE CVU 529711 Y NÚMERO DE BECARIO 333543.

RESUMEN

S. marcescens es un bacilo Gram-negativo multidrogo-resistente, patógeno oportunista causante de infecciones de tracto urinario, sepsis y queratitis. Entre sus principales factores de virulencia se encuentran la citolisina ShIA, proteasas, lipasas, nucleasas y fimbrias. Las fimbrias bacterianas participan en procesos como la adherencia a sustratos (abióticos y bióticos), formación de biopelícula y evasión a fagocitosis. En proteobacterias las fimbrias tipo chaperona-acomodador están ampliamente distribuidas y se clasifican en las familias α , β , γ , κ , π y σ . Los estudios de fimbrias en *S. marcescens* son escasos por lo que es necesario conocer su distribución y caracterizarlas.

Metodología. Se analizaron 39 genomas de *S. marcescens* para identificar todos los posibles operones fimbriales y se clasificaron de acuerdo a su filogenia y organización genética. Se analizó la actividad transcripcional de todos los promotores fimbriales de las cepas SmUNAM836 (clínica) y Db10 (ambiental). Utilizando el sistema λ -Red, se eliminaron los genes *fgooC*, *fgovC* y *fpsC* de la cepa SmUNAM836. Posteriormente, se comparó la formación de biopelícula en poliestireno, borosilicato y en medio líquido de las cepas generadas (SmUNAM836 Δ *fgooC*::*nptII*, SmUNAM836 Δ *fgovC*::*nptII* y SmUNAM836 Δ *fpsC*::*nptII*) con la cepa silvestre. También se determinó su motilidad tipo *swarming*, la capacidad de agregar levaduras y de adherirse a la línea celular NCI-H460. Finalmente, se visualizó por microscopía electrónica de transmisión la presencia de estructuras fimbriales en la cepa SmUNAM836.

Resultados. El pangenoma de *S. marcescens* codifica 20 operones fimbriales conservados, 6 clasificados como *centrales* o *core*; y 17 operones no-conservados. Los operones fimbriales tuvieron una expresión simultánea y diferencial. Los mayores niveles de actividad transcripcional correspondieron a *fgoo*, *fgov*, *fpo* y *fps*. Las cepas SmUNAM836 Δ *fgooC*::*nptII*, SmUNAM836 Δ *fgovC*::*nptII* y SmUNAM836 Δ *fpsC*::*nptII* no formaron biopelícula en medio líquido, mientras que en poliestireno se redujo en un 31%, 86% y 56%, respectivamente. Las mutantes SmUNAM836 Δ *fgovC*::*nptII* y SmUNAM836 Δ *fpsC*::*nptII* sufrieron una reducción del 51% y 32%, en la formación de biopelícula en borosilicato, y del 71 % y 44% en la capacidad de agregación de levaduras, respectivamente. Además, la cepa SmUNAM836 Δ *fgooC*::*nptII* tuvo una reducción del 37% en la adherencia células NCI-H460. Finalmente, mediante microscopía electrónica de transmisión se observaron 12 estructuras fimbriales con morfología diferente en la cepa *S. marcescens* SmUNAM836.

DEDICATORIA

*A mi familia, amigos
y maestros,
por acompañarme
en el último trayecto
de esta aventura.*

*A la vida,
que las sorpresas
nunca acaben*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Angel Andrade Torres por todo el apoyo brindado en materia profesional y personal. Por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, por su amistad y por todos los consejos brindados. Agradezco enormemente la confianza que depositó en mi durante esta etapa de mi formación profesional, por guiarme durante este proyecto, así como por apoyarme en mi desarrollo como investigador. Y por supuesto por la paciencia infinita que me tuvo.

A la Dra. Faviola Tavares Carreón por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto, por las discusiones y observaciones que mejoraron día a día este trabajo. Por apoyarme en mi desarrollo académico y profesional, por los consejos dados y por su paciencia.

Al. Dr. Miguel Becerril por su apoyo y enseñanzas como profesor, así como por las pláticas enriquecedoras.

A la Dra. Gloria por haber confiado en mí al aceptarme como alumno del departamento. Por su actitud positiva siempre contagiosa y por animarnos a nunca desistir.

A la Dra. Viviana Zomosa Signoret por su apoyo en los experimentos de actividad transcripcional y por habernos permitido hacer uso del luminómetro Glomax; así como por sus consejos.

Al. Dr. Miguel A. Valvano por permitirme realizar una estancia corta pero muy fructífera en su laboratorio, la cual amplió infinitamente mis horizontes. Por compartir sus conocimientos conmigo y por contribuir de manera sustancial al desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Julia Monjarás por haberme recibido en Belfast, por su confianza, amistad y apoyo dentro y fuera del laboratorio, así como por compartir conmigo consejos y experiencias.

A la Dra. Inma Garcia por su amistad y apoyo durante mi estancia en Belfast, así como por su ayuda en el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del MV Lab, Guanbo, Keren, Georgiana, Nico por las pláticas y por compartir sus proyectos y un poco de su vida conmigo.

A la M.C. Fernanda Flores por las pláticas y por su confianza, porque su invaluable ayuda permitió que este trabajo fluyera afablemente.

Al Q.B.P. Francisco y al M.C. Fernando Espinosa, gracias a que sus contribuciones permitieron la finalización de este proyecto.

Al personal del Biobanco por haberme permitido hacer uso de sus equipos, un paso indispensable en el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Alejandro Sanchez por su amistad, consejos y discusiones, así como por el uso del Fluoroskan.

A mis compañeros Rebe, Sandra, Lizzy, por su amistad y complicidad dentro del laboratorio. Gracias por amenizar el ambiente durante las horas de trabajo, por compartir sus aspiraciones y sus historias.

A mis amigos del posgrado Anita, Orlando, Gerardo, así como al resto de los compañeros, gracias por estar ahí día a día, por amenizar la monotonía, por escuchar y confiar. Les deseo lo mejor.

Al personal del Centro Regional de Enfermedades Infecciosas, gracias por todo el apoyo proporcionado en las distintas etapas de este proyecto.

A la Dra. Pola Becerril, por siempre estar ahí después de tantos años. Porque gracias a sus enseñanzas me encuentro en donde estoy.

A mis amigos Debanhi, Oziel, Erbey por estar ahí para una buena platica a pesar de la distancia y el tiempo.

A mis padres por su apoyo y cariño incondicional, por compartir mis logros y emocionarse con ellos. Por su paciencia durante los momentos difíciles.

A mis hermanas por siempre estar ahí para apoyarme y para escuchar mis historias y progreso, aunque no me entiendan.

ÍNDICE

SECCIÓN.....	PÁGINA
1. Introducción	1
1.1. Reseña histórica de <i>Serratia marcescens</i>	1
1.2. Epidemiología de <i>S. marcescens</i>	3
1.3. Plasticidad genómica y resistencia de <i>S. marcescens</i> a fármacos antimicrobianos	5
1.4. Patogénesis de <i>S. marcescens</i>	8
1.5. Biopelícula en <i>S. marcescens</i>	11
1.6. Fimbrias bacterianas	13
1.7. Fimbrias tipo chaperona-acomodador (CA)	15
1.7.1. Organización genética y biosíntesis	15
1.7.2. Clasificación de fimbrias tipo CA	19
1.8. Fimbrias tipo CA en <i>S. marcescens</i>	23
2. Justificación	29
3. Objetivos	30
3.1. Objetivo general	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. Hipótesis	31
5. Material y Métodos	32
5.1. Análisis Bioinformático	32
5.1.1. Generación de secuencias consenso	32
5.1.2. Búsqueda de operones fimbriales tipo CA de <i>S. marcescens</i>	33
5.1.3. Análisis filogenético y clasificación de operones fimbriales	33
5.2. Material biológico	34
5.2.1. Cepas bacterianas	34
5.2.2. Cultivo celular <i>in vitro</i>	35
5.3. Manipulación de DNA	36
5.3.1. Clonación de regiones promotoras	36

5.3.2. Generación de cepas mutantes de <i>S. marcescens</i> -----	37
5.3.3. Preparación de células electrocompetentes -----	40
5.3.4. Electroporación -----	41
5.4. Cuantificación de la expresión de promotores fimbriales -----	42
5.5. Formación de biopelícula en poliestireno -----	43
5.6. Formación de biopelícula en borosilicato -----	43
5.7. Formación de biopelícula AL en medio líquido (<i>Pellicle</i>) -----	44
5.8. Movilidad en superficie semisólida (<i>swarming</i>) -----	44
5.9. Adherencia a células pulmonares NCI-H460 -----	45
5.10. Microscopía electrónica de transmisión -----	46
5.11. Análisis estadísticos -----	47
6. Resultados -----	48
6.1. Búsqueda e identificación de operones tipo CA en genomas de <i>S. marcescens</i> -----	48
6.2. Actividad transcripcional de operones fimbriales tipo CA de las cepas de <i>S. marcescens</i> SmUNAM836 y Db10 -----	55
6.3. Mutagénesis de proteínas acomodadoras -----	60
6.4. Formación de biopelícula en medio líquido -----	61
6.5. Formación de biopelícula en poliestireno -----	62
6.6. Formación de biopelícula en borosilicato -----	64
6.7. Movimiento tipo <i>swarming</i> de la cepa SmUNAM836 y mutantes isogénicas -----	66
6.8. Agregación de levaduras -----	68
6.9. Adherencia de la cepa SmUNAM836 y mutantes isogénicas a células NCI-H460 -----	70
6.10. Identificación de estructuras fimbriales mediante TEM -----	72
7. Discusión -----	77
7.1. Descripción del fimbrioma de <i>S. marcescens</i> -----	77
7.2. Las fimbrias Fgoo, Fgov y Fps participan en la formación de biopelícula en superficies abióticas sólidas y líquidas -----	83

7.3. La mutación de los genes <i>fgooC</i> , <i>fgovC</i> y <i>fpsC</i> modifica el patrón de swarming en <i>S. marcescens</i> SmUNAM836 -----	88
7.4. Adherencia de <i>S. marcescens</i> SmUNAM836Δ <i>fgooC</i> :: <i>nptII</i> , SmUNAM836Δ <i>fgovC</i> :: <i>nptII</i> y SmUNAM836Δ <i>fpsC</i> :: <i>nptII</i> a sustratos bióticos ---	91
7.5. <i>S. marcescens</i> SmUNAM836 sintetiza múltiples estructuras fimbriales ----	93
8. Conclusiones -----	95
9. Perspectivas -----	96
10. Referencias Bibliográficas -----	97
11. Anexos -----	113

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Características generales de las fimbrias tipo CA -----	18
2. Árbol filogenético tipo Neighbor-Joining no enraizado de las 421 proteínas acomodadoras identificadas en 39 genomas de <i>S. marcescens</i> -----	49
3. Organización genética y distribución de los 20 operones tipo CA conservados de <i>S. marcescens</i> -----	51
4. Distribución de operones fimbriales de <i>S. marcescens</i> en los 39 genomas analizados -----	54
5. Curva de crecimiento de las cepas SmUNAM836 y Db10 -----	56
6. Expresión de promotores fimbriales de <i>S. marcescens</i> SmUNAM836 y Db10 -----	59
7. Mutación de los genes <i>fgooC</i> , <i>fgovC</i> y <i>fpsC</i> de <i>S. marcescens</i> SmUNAM836	60
8. La pérdida de las fimbrias Fgoo, Fgov o Fps elimina la formación de biopelícula AL -----	61
9. La ausencia de las fimbrias Fgoo, Fgov y Fps altera la formación de biopelícula en poliestireno -----	63
10. La eliminación de las fimbrias Fgov y Fps modifica la formación de biopelícula en borosilicato-----	65
11. Movimiento tipo swarming de <i>S. marcescens</i> SmUNAM836 y mutantes isogénicas -----	67
12. La mutagénesis de los genes <i>fgovC</i> y <i>fpsC</i> impacta en la capacidad de agregar levaduras -----	69

13. La fimbria F _g oo participa en la adherencia a células pulmonares NCI-H460 -----	71
14. Visualización de fimbrias de <i>S. marcescens</i> SmUNAM836 por TEM -----	74
15. Fimbrias de <i>S. marcescens</i> SmUNAM836 obtenidas por desprendimiento mecánico y visualizadas por TEM -----	76

LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Fimbrias descritas en <i>S. marcescens</i> -----	27
2. Lista de cepas bacterianas utilizadas en este estudio -----	35
3. Plásmidos utilizados y construcciones generadas -----	38
4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de regiones promotoras --	39
5. Oligonucleótidos usados en la mutagénesis de los genes codificantes de las proteínas acomodadoras -----	40
6. Distribución y ubicación de los operones <i>ncf</i> de <i>S. marcescens</i> -----	53

LISTA DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Condiciones de amplificación de PCR -----	113
2. Coordinadas genómicas de genes codificantes de proteínas acomodadoras en <i>S. marcescens</i> -----	114

1. INTRODUCCIÓN

1.1.-Reseña histórica de *Serratia marcescens*

Serratia marcescens es un microorganismo con una peculiaridad histórica en el campo de la bacteriología, siendo el tercer género bacteriano descrito, precedido por *Vibrio* y *Polyangium*. La historia de este microorganismo comienza en el siglo XIX, siendo una de las primeras bacterias que aparecen en la literatura. Pues se consideraba responsable de la aparición de “sangrados milagrosos” en diversos objetos, especialmente en alimentos. Los primeros reportes de este microorganismo con fundamentos científicos datan de 1819, donde de manera independiente, el Dr. Vincenzo Sette y el farmacólogo Bartolomeo Bizio trabajaron para identificar la fuente del “Sangrado” en polenta, pan y sopa de arroz [1]. Ambas figuras realizaron experimentos rústicos que los llevaron a sugerir que la fuente de la coloración roja se debía al efecto de un “hongo” sobre los alimentos. Fue Bizio quien se aventuró a afirmar que había descubierto un organismo que pertenecía a un nuevo género no descrito previamente. De esta manera decidió nombrar a este organismo como *Serratia* en honor a su compatriota Serafino Serrati. Además, acuñó a *Serratia* el distintivo *marcescens* debido a que, al alcanzar la “madurez”, el organismo decaía en una masa fluida, viscosa y mucilaginosa [2]. Fue hasta 1923 cuando el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* legitimó el nombre asignado por Bizio.

En la actualidad, *S. marcescens* está clasificada dentro de la familia *Enterobacteriaceae* y aún es reconocida por su pigmento rojo denominado prodigiosina. *S. marcescens* es un

bacilo Gram negativo que tiene la capacidad de crecer eficientemente a temperaturas de entre 25°C y 42°C, las cepas productoras de pigmento suelen sintetizarlo a temperaturas menores a 30°C [3, 4]. Por muchos años *S. marcescens* fue considerada como un microorganismo inocuo, llegando a emplearse en experimentos de rastreo con la finalidad de anticipar la diseminación de posibles agentes patógenos empleados en bioterrorismo [5]. En 1952 se reportó por primera vez un cuadro infeccioso causado por *S. marcescens*. Dicho paciente cursó con una infección de tracto urinario, bacteriemia y endocarditis, siendo la última la responsable de su fallecimiento [5, 6]. A partir de esa fecha, en los EE.UU. comenzaron a reportarse diversos casos de infecciones por esta bacteria, y para 1977 existían más de 100 brotes en los que se identificó a *S. marcescens* como el patógeno responsable [7]. Este microorganismo es hoy en día reconocido como un patógeno oportunista de relevancia médica que se caracteriza por ser multidrogo resistente [5, 8]. *S. marcescens* es capaz de establecerse en diversas zonas anatómicas, ocasionando una amplia gama de infecciones tales como bacteriemia, neumonía, queratitis, endocarditis, infecciones urinarias, meningitis y fascitis necrotizante; afectando principalmente a neonatos y pacientes inmunocomprometidos [5, 9].

1.2.-Epidemiología de *S. marcescens*

En 1997 comenzó el Programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY, uno de los estudios de vigilancia epidemiológica de mayor duración. Este programa proporcionó los primeros datos epidemiológicos de *Serratia* a gran escala, donde conformó el 1.4 % de los aislados de torrente sanguíneo en ese año, ocupando el 12° puesto entre los patógenos bacterianos más aislados [10]. En un estudio SENTRY subsecuente (2005 a 2008) reportó al género *Serratia* como responsable del 3.5% de las neumonías en pacientes hospitalizados. Dicho estudio desglosa los datos por regiones, encontrando que *Serratia* causó el 4.1% de las neumonías en EE.UU., el 3.2% en Europa y el 2.4% en Latino América [11]. Un estudio realizado en 2008 por el ECDC ubicó a *Serratia* como el agente responsable del 2.8% de las neumonías y del 2% de las infecciones de torrente sanguíneo asociadas a unidades de cuidados intensivos, correspondiente al 10° microorganismo más aislado [12].

Dentro del género *Serratia* la especie *S. marcescens* es la más frecuentemente aislada a nivel global. En Polonia un estudio durante 2003 - 2004 evidenció a esta bacteria entre los primeros cinco patógenos bacterianos del total de aislados clínicos, comprendiendo el 4% de los aislados [13]. De manera semejante en Japón en 2008, se encontró que *S. marcescens* estaba presente en el 6.4% de las infecciones de tracto urinario, representado el 5° patógeno más aislado [14]. En un estudio realizado durante 2009 en

el Centro Médico Militar Madigan en Pierce County, EE.UU se describe que *S. marcescens* ocupó el 9° lugar entre los bacilos Gram negativos más aislados, causando el 33.6% de infecciones de vías respiratorias, 23.8% de infecciones de tracto urinario y el 22.8% de infecciones en heridas [5].

Previamente, los estudios epidemiológicos no buscaban activamente a *S. marcescens*. Sin embargo, actualmente se busca de manera activa a este microorganismo debido al incremento en su importancia como patógeno oportunista multidrogo-resistente. Esto se evidencia en los datos actualizados del programa SENTRY en Latino América de 2016. Aquí se reporta que en las infecciones de torrente sanguíneo, *S. marcescens* estuvo presente entre los 10 microorganismos más aislados, observándose un incremento en la incidencia de 1.5% durante el periodo 1997-2003 a 3.3% durante 2013-2016 [15]. Respecto a las infecciones de vías respiratorias SENTRY reportó en 2016, que las neumonías asociadas a *S. marcescens* corresponden al 3.8% en Norte América, 2.5% en Latino América, 3.3% en Europa y 3.1% en Asia-Pacífico [16]. Resultados que ubican a *S. marcescens* entre el 7° y 9° lugar de los patógenos causantes de infecciones de tracto respiratorio.

1.3.- Plasticidad genómica y resistencia de *S. marcescens* a fármacos antimicrobianos

S. marcescens es un microorganismo con una gran plasticidad genómica, lo que le confiere ventajas competitivas para establecerse en diversos nichos ecológicos, incluido el humano. Para entender de mejor manera dicha versatilidad metabólica diversos grupos han evaluado el pangenoma de *S. marcescens* de manera independiente, se describe que este microorganismo presenta un pangenoma compuesto por 13,614 a 35,595 genes [17–20]. A pesar de la discrepancia en estos valores, todos los estudios concuerdan en que *S. marcescens* posee un pangenoma central reducido que oscila entre los 2,107 a 3,714 genes [17–20]. Estos análisis indican que las cepas de *S. marcescens* poseen un amplio set de genes accesorios (7,656 - 18,883), algunos de los cuales se asocian con resistencia a antibióticos [17–20].

S. marcescens es frecuentemente sensible al efecto de fármacos como aminoglucósidos, carbapenémicos, trimetoprim-sulfametoxazol, cefalosporinas y tobramicina, sin embargo también presenta resistencia intrínseca a diferentes clases de antibióticos[5]. Esta resistencia se asocia principalmente a genes cromosomales, los cuales pueden ser parte del genoma central o representar genes accesorios.

La mayoría de las cepas de *S. marcescens* poseen de manera ubicua determinantes que les permiten resistir penicilinas, macrólidos, clindamicina, linezolid, glucopéptidos, rifampicina, quinupristin-dalfopristin y péptidos antimicrobianos [5, 21, 22]. Entre estos se encuentran los genes *ampC*, *arn* y *qrn* que confieren resistencia a β -lactámicos,

polipéptidos y quinolonas, respectivamente [21–23]. La alta resistencia a β -lactámicos que se reporta en cepas de *S. marcescens* se asocia con la producción de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL, por sus siglas en inglés) algunas de las cuales son resistentes a inhibidores, como el ácido clavulánico. Estas enzimas se han identificado en cepas epidémicas de países como Bulgaria, Italia, Grecia, México, Taiwan, Polonia, Argentina, Japón y Korea [24]. En 2007, Peng reportó la presencia de integrones de clase I en cepas de *S. marcescens*. Además de estos, *S. marcescens* posee numerosas bombas de eflujo, que proveen resistencia a un amplio rango de antibióticos [5, 21, 22]. Por otra parte, aunque en los genomas de distintas cepas de *S. marcescens* se encuentran genes implicados en la resistencia a quinolonas es común que las cepas sean susceptibles a este grupo de antibióticos [19]. Además, se ha reportado que algunas cepas de *S. marcescens* son capaces de resistir el efecto de amoxicilina, tetraciclina, colistina, cefamicina, cefuroxima y quinolonas [5, 21, 22]. Sin embargo, se cree que se asocia a la presencia de determinantes de resistencia adquiridos por transferencia horizontal o con mutaciones espontáneas. Uno de los principales elementos genéticos móviles son los integrones, los cuales se suelen encontrar insertados dentro de los cromosomas bacterianos o en plásmidos [25, 26]. Estos elementos genéticos se caracterizan por presentar genes codificantes de integrasas, un sitio de recombinación asociado a integrones y un promotor asociado a integrones [25, 27]. También es común la presencia de determinantes de resistencia a antibióticos así como genes de virulencia [27]. Además, en *S. marcescens* existen diferentes reportes de plásmidos que codifican genes relacionados con la resistencia a antibióticos, éstos tienen una mayor prevalencia entre

cepas clínicas [21]. A su vez, se ha evidenciado que cepas de *S. marcescens* pueden adquirir plásmidos de otras especies clínicamente relevantes como *K. pneumoniae* y *Escherichia coli* [18]. Análisis genómicos han demostrado que las cepas de *S. marcescens* que han adquirido plásmidos que codifican determinantes de resistencia son en su mayoría aislados clínicos, lo que sugiere la adquisición de estos plásmidos mediante transferencia horizontal [28]. De acuerdo con lo anterior, *S. marcescens* puede adquirir mediante conjugación plásmidos que poseen los genes *bla_{CMY-2}*, *bla_{TEM}* o *bla_{KPC}* [29, 30]. La presencia y diseminación de estos determinantes de resistencia en *Serratia* es importante debido a que limitan las opciones terapéuticas en infecciones que atentan contra la vida de los pacientes.

1.4.- Patogénesis de *S. marcescens*

La patogénesis de *S. marcescens* se encuentra poco estudiada, sin embargo, se han reportado diversos factores de virulencia como hemolisina, proteasas, lipasas, nucleasas y algunas fimbrias. También se han descrito cascadas regulatorias involucradas en la expresión o represión de factores y de procesos asociados a la virulencia de este microorganismo [31].

El factor de virulencia de *S. marcescens* mejor estudiado es la toxina formadora de poros ShIA, esta citolisina es secretada mediante un sistema de secreción tipo Vb y se considera el principal factor de virulencia de *S. marcescens* [32, 33]. La secreción de ShIA requiere la unión a moléculas de fosfatidiletanolamina, este complejo posteriormente migra hacia la proteína de membrana externa ShIB, la cual se encarga de activar y secretar a ShIA en su forma activa [31, 34, 35]. Una vez secretada, ShIA tiene la capacidad de interactuar con residuos de fosfatidilserinas presentes en la membrana de las células eucariotas [35]. La toxina puede insertarse como un dímero o monómero y oligomerizarse hasta formar un poro a través del cual se pierden iones K^+ [36]. Para mantener el balance osmótico se activan canales de Na^+/K^+ que consumen ATP [31, 36]. Finalmente, la célula eucariota comienza a vacuolizarse debido al desbalance osmótico y energético. Además de esto, se ha descrito que la citolisina ShIA causa liberación de leucotrienos LTB₄ y LTC₄ en leucocitos y de histidina en células cebadas [37]. Cepas mutantes en esta toxina reducen drásticamente su capacidad de afectación en tejidos pulmonares y líneas celulares [31,

36, 38]. La producción de ShIA se encuentra regulada por el sistema de dos componentes RssBA y por el complejo regulatorio FlhDC [33]. El sistema de dos componentes RssAB consta de la cinasa sensora RssA y el regulador de respuesta RssB, éstos regulan de manera negativa al operón *flhDC* [33, 39]. A su vez, el complejo proteico FlhDC participa en la activación de los genes flagelares de clase II [40], promueve la producción de ShIA y el movimiento tipo *swarming*. La sobreexpresión del operón *flhDC* reduce la capacidad de *S. marcescens* para formar biopelícula, favorece el movimiento tipo *swarming*, aumenta la producción de ShIA y la citotoxicidad sobre la línea celular BEAS-2B y epitelio pulmonar [33]. Por el contrario, todos estos fenotipos se observan afectados en ausencia de FlhDC [33].

Diversos procesos de *S. marcescens*, entre ellos la patogénesis, dependen de un mecanismo de comunicación poblacional denominado *quorum sensing* (QS). El QS requiere de la síntesis de N-acil-homoserin-lactonas (AHLs) o autoinductores por parte de una acil-homoserin-sintasa (I) [41]. Cuando la concentración de AHLs incrementa se activa una molécula receptora (R) que actúa como factor transcripcional de distintos genes [41]. En *S. marcescens* se han descrito hasta 3 diferentes sistemas de QS que pueden estar operando de manera simultánea: SwrI/SwrR, Smal/SmaR y SpnI/SpnR [5]. La sintasa SwrI produce las moléculas C₄-HSL y C₆-HSL en una proporción de 1:10, estas moléculas son reconocidas por el receptor SwrR [42]. El sistema SwrI/SwrR se ha relacionado con el movimiento tipo *swarming*, la maduración y desprendimiento de biopelícula y en la adherencia a sustratos abióticos [42–45].

Además, SwrI regula la secreción de otros factores de virulencia como la lipasa LipA, el monómero de capa S SlaA y la metaloproteasa PrtS. *In vitro*, PrtS ejerce un efecto citotóxico en la línea celular de córnea HCLE, sin embargo su rol durante la infección no se encuentra bien establecido [9, 46]. Otro sistema de QS de *S. marcescens*, Smal/SmarR, se ha implicado en la actividad hemolítica y formación de biopelícula además de favorecer la producción de caseinasas, quitinasas y el movimiento tipo swarming [47]. Por otra parte, la sintasa SpnI produce C₆-HSL así como 3O-C₆-HSL, C₇-HSL y C₈-HSL. Este sistema, SpnI/SpnR, contribuye en la represión de la nucleasa NucA, prodigiosina y de surfactantes a través de la actividad represora de SpnR [5, 48–50]. SpnR también regula de manera negativa su propia expresión y su actividad represora disminuye en concentraciones altas de 3O-C₆-HSL [48, 49]. Los sistemas de QS Smal/SmaR y SpnI/SpnR están flanqueados por elementos de recombinación lo que sugiere su transferencia entre cepas. Dicha movilización ha sido evidenciada para Smal/SmaR [47].

La patogénesis de *S. marcescens* también responde al estrés oxidativo, a través del regulador OxyR, el cual es necesario para la expresión de por lo menos un sistema fimbrial, el cual a su vez está involucrado en la formación de biopelícula [51]. Este regulador también es requerido para el desarrollo del movimiento tipo *swarming* y durante interacciones célula-célula [51].

1.5.- Biopelícula en *S. marcescens*

La biopelícula es una estructura de resistencia y persistencia que le permite a los microorganismos mitigar el efecto de factores externos. Esta comunidad bacteriana se compone por células estrechamente unidas que forman microcolonias embebidas en una matriz extracelular [52], puede desarrollarse sobre una superficie sólida o como flóculos en sustratos líquidos [53]. En el área clínica la presencia de biopelículas sobre equipo médico representa un riesgo de diseminación y persistencia de diferentes microorganismos, particularmente de patógenos con resistencia a antibióticos [52, 54]. Además, durante un proceso infeccioso la matriz extracelular de las biopelículas obstaculiza la llegada de células inmunes además de reducir la permeabilidad y el efecto de los antibióticos [52, 55, 56].

El papel de las biopelículas de *S. marcescens* durante un proceso infeccioso no se conoce a detalle. No obstante, se ha asociado con la persistencia en catéteres de silicón, superficies de vidrio o poliestireno, en la colonización de tejidos y en la resistencia a antibióticos [5, 53, 55, 57, 58]. Su formación requiere de una adherencia inicial, una etapa de *swarming* y finaliza con la maduración como una estructura tridimensional. Desde el punto de vista estructural, la biopelícula de *S. marcescens* es porosa y filamentosa, dos características particulares que la diferencian de la producida por otras bacterias como *P. aeruginosa* [43]. Además, las células que componen una biopelícula madura se encuentran filamentadas las cuales se agregan hasta formar cadenas

bacterianas enrolladas [43]. La producción de biopelícula en *S. marcescens* se encuentra fuertemente influenciada por el QS y la disponibilidad de nutrientes [44]. Se ha demostrado que una alta concentración de nutrientes polariza la biopelícula hacia la arquitectura filamentosa. Por otro lado, la ausencia de nutrientes favorece el desarrollo de una biopelícula compuesta por microcolonias [45]. Respecto al papel del QS en la formación de biopelícula se ha descrito que el sistema SwrI/SwrR favorece el movimiento tipo *swarming*, participa en la maduración de la biopelícula y es necesario para la activación de los genes inducidos por C₄-HSL: *bsmA* y *bsmB* [43, 44]. La ausencia de los genes *swrI*, *bsmA* y *bsmB* ocasionan la aparición de fenotipos deficientes en autoagregación celular y en la formación de cadenas bacterianas [43]. El sistema Smal/SmaR también parece estar involucrada en la formación de biopelícula, pues su ausencia reduce la capacidad de formar esta estructura en aproximada el 50% [47].

Otro mecanismo que está involucrado en la formación de biopelícula es la respuesta al estrés oxidativo, específicamente la que se encuentra bajo el control del regulador OxyR. La ausencia de este regulador afecta la expresión de genes fimbriales (*fimABCD*), lo que ocasiona una reducción en la capacidad de formar biopelícula de esta bacteria [51]. Adicionalmente, la presencia de adhesinas fimbriales se ha relacionado con la formación de biopelícula [59–61].

1.6.- Fimbrias bacterianas

Las fimbrias procariontes se describieron por primera vez a finales de la década de los 50's, durante observaciones de bacterias al microscopio electrónico [62]. Los primeros experimentos emplearon técnicas serológicas, para la clasificación e identificación de estas estructuras [63–66]. Sin embargo, debido a la alta diversidad de dichos apéndices, estos experimentos arrojaron resultados que derivaron en la desestimación de las fimbrias como elementos patogénicos. Fue hasta el año 1972 cuando se demostró que la fimbria K88 de *E. coli* estaba involucrada en la adherencia a epitelio intestinal de cerdos [67]. Actualmente se reconoce que las fimbrias juegan un papel indispensable en la adherencia y subsecuente colonización de nichos ecológicos, como pueden ser sustratos inertes o bióticos [68]. Además, se ha demostrado que participan en la formación de biopelícula, anclando a los microorganismos a la matriz extracelular o entre ellos mismos. Otros procesos menos comunes, en los cuales estas estructuras pueden contribuir son la evasión a la depredación, tipos especiales de movilidad e intercambio de material genético [66].

Las fimbrias se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos bacterianos, y actualmente se han descrito 4 grandes familias de acuerdo a su mecanismo de ensamblaje: tipo IV, conjugativas F, curli y tipo chaperona-acomodador (CA) [66]. Las fimbrias de estas 4 familias difieren estructuralmente, sin embargo, algunas participan en procesos similares. Las fimbrias tipo IV son estructuras adherentes que pueden

ensamblarse y desensamblarse para permitir el movimiento tipo *twitching* así como captar DNA exógeno [69]. Las fimbrias conjugativas F, forman parte de algunos sistemas de secreción tipo IV y participan en la transferencia horizontal de material genético [66]. Por otro lado, las fimbrias curli están involucradas en autoagregación bacteriana, adherencia a múltiples sustratos y forman parte de la matriz extracelular de algunas biopelículas [70]. Por último, las fimbrias tipo CA están involucradas principalmente en la adherencia a distintos sustratos y en la formación de biopelícula.

1.7.- Fimbrias tipo chaperona-acomodador (CA)

De entre los 4 tipos de fimbrias mencionados previamente, las fimbrias tipo CA son las más abundantes entre Proteobacterias. Las fimbrias CA son estructuras filamentosas que se extienden extracelularmente desde la membrana externa de la bacterias su longitud va de unos cuantos nanómetros hasta varias micras [66, 71, 72]. Las fimbrias CA mejor caracterizadas son la fimbria tipo 1 y tipo P, presentes en patógenos como *Salmonella* y *E. coli* uropatógena (UPEC) [73, 74].

1.7.1.-Organización genética y biosíntesis

Los componentes genéticos de estas estructuras suelen encontrarse dispuestos en un solo operón cuya expresión es controlada por un único promotor. Estos operones están compuestos por genes codificantes de unidades estructurales (subunidades fimbriales, adhesinas, chaperonas y acomodadores), así como por genes no estructurales (reguladores genéticos y proteínas sin función conocida). Las fimbrias tipo CA reciben su nombre a partir de dichos componentes, pues son indispensables para la biogénesis de estos apéndices[66, 75]. El ensamble de las fimbrias CA requiere la presencia de 1 a 3 chaperonas fimbriales [76]. Por otro lado, la proteína acomodadora se encuentra codificada en una única copia, una característica que esta conservada en todos los operones CA reportados a la fecha. Caso contrario, los genes codificantes de subunidades y adhesinas pueden encontrarse en más de una copia dependiendo del

grupo al que pertenezcan[76]. Por último, en algunos operones existe la presencia de genes que codifican proteínas reguladoras, cuya función varía dependiendo del operón fimbrial, existiendo numerosos operones fimbriales cuyo mecanismo de regulación se desconoce[76]. Por ejemplo, en la fimbria tipo 1 de *E. coli* la regulación se lleva a cabo gracias a una invertasa que controla la dirección en la que se encuentra la región promotora[77]. Sin embargo, en la fimbria P la región promotora se encuentra reprimida por la proteína Lrp; dicha represión es removida por el secuestro de Lrp por PapI y de la metilación de la región promotora, impidiendo la unión de Lrp a esta región genética [77]. Además de los reguladores, se ha descrito la presencia de genes sin función conocida, sin embargo, debido a su ubicación dentro del operón fimbrial deben de cumplir un papel importante en la biogénesis o regulación de estos operones[76].

El mecanismo de ensamblaje de las fimbrias tipo CA se encuentra conservado, comienza con la síntesis de los componentes en el citoplasma, los cuales son translocados al periplasma a través de la vía Sec [78]. La proteína acomodadora es ensamblada como un poro en la membrana externa (ME) con la asistencia de la maquinaria BAM y TAM [79]. En el periplasma las chaperonas interactúan con las subunidades fimbriales o adhesinas, dicha interacción mantiene a las subunidades en una conformación competente para su posterior secreción, además de prevenir su autoagregación y degradación por la proteasa DegP [80]. La interacción de una subunidad fimbrial con su respectiva chaperona da lugar a un complejo denominado chaperona-subunidad [78, 81]. Este complejo proteico se estabiliza mediante la inserción de una hebra de la

chaperona dentro de la subunidad fimbrial en un evento denominado *complementación por hebra donadora* [78, 81]. Posteriormente, el complejo chaperona-subunidad se dirige hacia la cara periplásmica de la proteína acomodadora, la cual facilita la polimerización de las subunidades fimbriales [78, 81]. Cada subunidad es incorporada desde la región proximal del filamento a través de un proceso llamado *intercambio de hebra donadora* [78, 81]. De esta manera la chaperona queda libre para captar nuevas subunidades y el acomodador puede reconocer el siguiente complejo continuando con la elongación del filamento [78, 81]. Una característica importante del ensamblaje del filamento es la incorporación de las subunidades en un orden estricto, existiendo en algunas fimbrias existe una subunidad terminadora, cuya estructura carece de la hendidura receptora por lo que la integración de esta subunidad al filamento finaliza la síntesis de la fimbria [78].

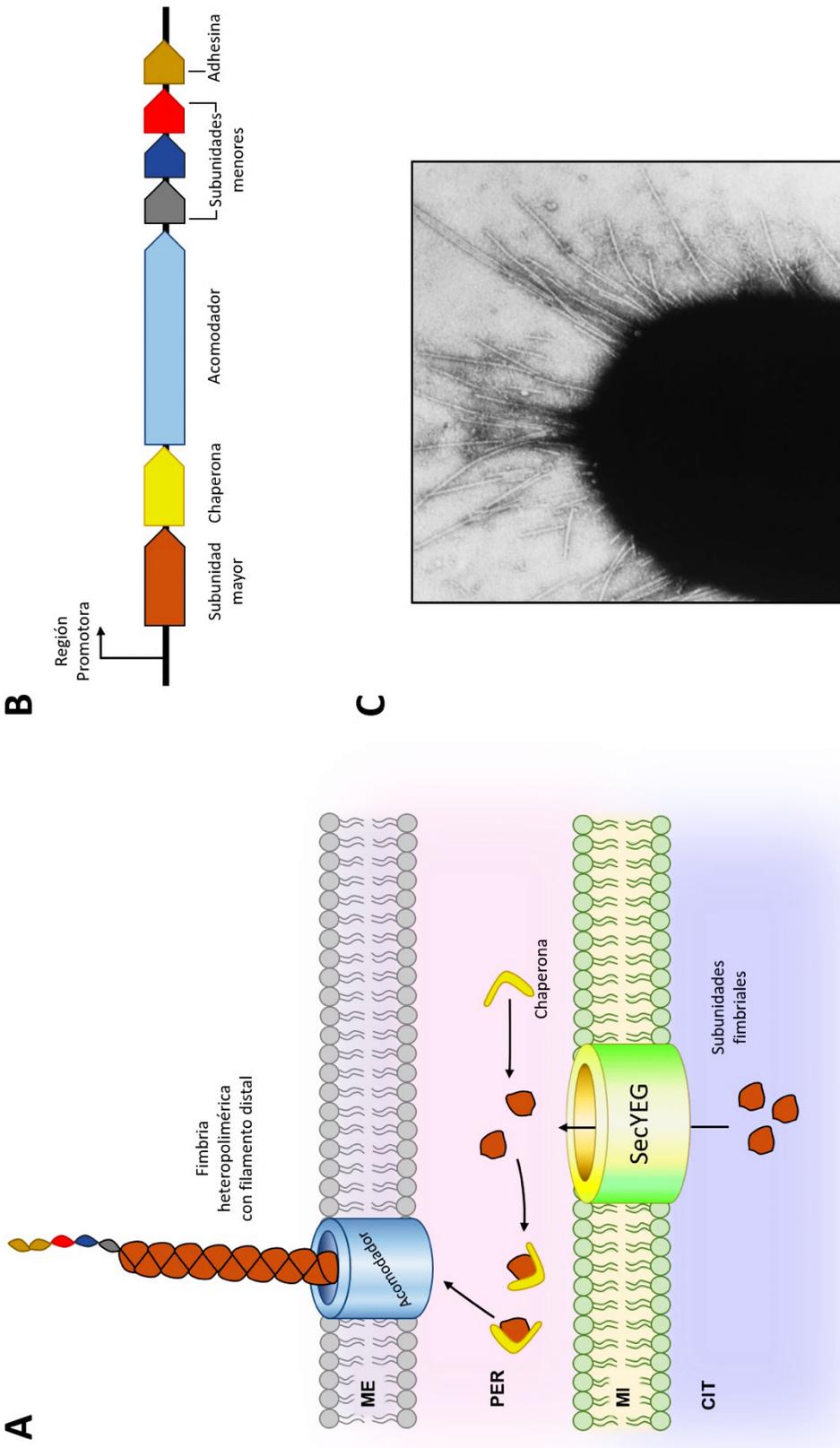


Figura 1.- Características generales de las fimbrias tipo CA. A) Esquema general de ensamble de una fimbria tipo CA. Las subunidades fimbriales son transportadas al periplasma por el translocón del sistema de secreción general (SecYEG). En el periplasma la proteína chaperona de la fimbria dirige las subunidades hacia la proteína acomodadora donde comienza el ensamble del filamento fimbrial. **B)** Distribución general de los operones codificantes de fimbrias tipo CA. ME: Membrana Externa, PER: Periplasma, MI: Membrana Interna **C)** Fotografía de microscopía electrónica de transmisión en la que se observan fimbrias rígidas del tipo CA con una distribución periférica (Tomada de Nataro, 1998).

1.7.2.-Clasificación de fimbrias tipo CA

Las fimbrias CA están ampliamente distribuidas entre distintos géneros bacterianos, presentando morfología, organización genética y funciones variadas. Ante la necesidad de agrupar o clasificar estas estructuras, Nuccio y Bäumler sugirieron inferir relaciones filogenéticas usando como referencia la secuencia aminoacídica de la proteína acomodadora. Lo anterior, debido a que la proteína acomodadora presenta una menor variabilidad entre géneros bacterianos e hipotéticamente debe mantenerse conservada al no interactuar con factores externos [76]. Esta clasificación utilizó como denominadores letras griegas por lo que se le conoce como “Clasificación Griega”. Por otra parte, esta clasificación filogenética de las proteínas acomodadoras evidenció características comunes de los operones que las codifican. De acuerdo a lo anterior, actualmente se reconocen 6 familias de fimbrias tipo CA: α , β , γ (subdividida en γ_1 , γ_2 , γ_3 y γ_4), κ , π y σ [76]. Si bien esta clasificación agrupa filogenéticamente estos filamentos, existen diferencias estructurales y funcionales entre fimbrias de la misma familia. Además, la abundancia de las fimbrias también es variable. Es por estas diferencias que es imposible clasificar estos apéndices visualmente mediante microscopía electrónica. La información estructural disponible proviene de fimbrias modelo con las que se resaltan las posibles características de la familia a la que pertenecen, principalmente de la fimbria tipo 1 (familia γ) y fimbria P (familia π).

La familia α parece agrupar múltiples fimbrias que poseen moléculas adherentes que reconocen substratos presentes en el cuerpo humano, como pueden ser gangliósidos, azúcares y proteínas con residuos de ácido siálico, tejido intestinal y mucina [65, 82]. Múltiples factores de colonización de *E. coli* forman parte de esta familia, todos involucrados principalmente en adherencia a tejido intestinal [76, 83]. La estructura de estos organelos fimbriales suele presentarse como un eje fimbrial rígido compuesto por subunidades mayores, así como por una adhesina ubicada en la punta de la estructura. Sin embargo, también se pueden presentar como fibrillas delgadas y flexibles, como es el caso de CS5 [84].

La familia β está compuesta por un número reducido de fimbrias, las cuales han sido identificadas en su mayoría por secuenciación genética [76]. Es por esta razón que, hasta el momento, no están descritas características funcionales o estructurales de los apéndices de esta familia.

La familia γ está compuesta por operones fimbriales con proteínas acomodadoras que se diferencian marcadamente de las otras familias. Esta familia es la que posee más miembros con características descritas y de donde proviene la mayoría de la información conocida hasta el momento. Sin embargo, el árbol filogenético de esta familia tiene un nivel de resolución baja (Valor de Bootstrap: 577), por lo que sus miembros se subclasificaron en las subfamilias γ_1 a γ_4 . La fimbria más estudiada de esta familia es la fimbria tipo 1 de *E. coli*, su presencia se ha relacionado con la colonización del tracto urinario [85].

Dentro de la familia γ_1 las fimbrias mejor caracterizadas son la tipo 1 de *E. coli*, Lpf de *Salmonella*, las fimbria S y 1C de UPEC y la fimbria Atf de *Proteus mirabilis* [86–89]. El filamento de este grupo de fimbrias presenta una subunidad mayor y una región adherente de menor grosor en la punta [76, 90]. Los miembros representativos de la familia γ_2 corresponden a las fimbrias CS12, CS18 y F6 de *E. coli* [91–93]. El apéndice de estas estructuras es similar al de la familia γ_1 , compuesto de un filamento grueso además de un filamento delgado con propiedades adherentes en la región distal [76, 92, 94–96]. Además, este grupo se caracteriza por la presencia de 3 genes codificantes de chaperonas en el operón fimbrial [76].

En la subfamilia γ_3 los miembros más estudiados son las fimbrias CS3, CS6, Afa y Dr (*E. coli*), así como la fimbria F1 de *Yersinia pestis* [97–101]. El filamento de las fimbrias γ_3 está compuesto por 1 o 2 subunidades estructurales que a su vez pueden funcionar como adhesinas [76]. Mediante microscopía electrónica se observan como filamentos delgados y flexibles aunque también se han descrito como estructuras “afimbriales”, que no son observables al microscopio electrónico [76, 98, 102, 103].

Por último, la subfamilia γ_4 agrupa la mayor cantidad de representantes, sin embargo, solo se encuentran caracterizadas las fimbrias Mrk de *K. pneumoniae*, HiB de *Haemophilus*, Acu de *Acinetobacter* además de CupB y CupC de *Pseudomonas aeruginosa* [104–107]. Morfológicamente las fimbrias γ_4 son filamentos delgados y flexibles que poseen una adhesina en la punta. Esta adhesina puede estar unida directamente al eje fimbrial o formar parte de un filamento delgado localizado en la región distal [76].

Las fimbrias de la familia κ son estructuras delgadas de 2 a 5 nm de diámetro [108, 109]. La mayoría de los operones de esta familia se localizan en plásmidos conjugativos y se describen como asociadas a patógenos porcinos [76, 110]. La fimbria K88 es la representante de esta familia, siendo la que da el nombre a este grupo [67]. Su adherencia es mediada mayormente por subunidades menores, sin embargo, las subunidades mayores también pueden contribuir en este proceso [111, 112].

La familia π se compone de fimbrias poco caracterizadas, siendo la fimbria P de *E. coli* la más estudiada. Esta estructura presenta un eje fimbrial rígido y grueso con subunidades mayores dispuestas de forma helicoidal [113, 114]. La adherencia es mediada por un filamento delgado que se ubica en la punta de la fimbria, el cual está compuesto de varias subunidades menores y por una adhesina [113, 114]. La fimbria P en conjunto con la fimbria MR/P de *P. mirabilis*, se han asociado a procesos infectivos de tracto urinario [115, 116].

Por último, las fimbrias de la familia σ se encuentran ampliamente distribuidas en filos bacterianos no relacionados por lo que se conocen como fimbrias arcaicas. Existe poca información sobre estas estructuras. En relación a su función se ha descrito que la fimbria CSU de *A. baumannii* participa en la formación de biopelícula [117]. También se ha identificado que en *M. xanthus* el operón *mcuABCD* codifica proteínas de envoltura de la spora. Entre estas proteínas están las Proteínas U, que están involucradas en la formación de la capa externa de spora [118, 119]. De la información antes mencionada se ha hipotetizado que las proteínas U son capaces de ensamblarse en apéndices filamentosos no fimbriales [76].

1.8.- Fimbrias tipo CA en *S. marcescens*

El repertorio completo de fimbrias de *S. marcescens* reportadas en la literatura se enlista en la Tabla 1. La primera descripción de éstas la realizó Amako y colaboradores en 1981, dicho grupo demostró que algunas cepas de *S. marcescens* tenían la capacidad de autoagregarse al colocarlas en orina humana; propiedad que se perdía después de calentar el cultivo a 55°C por 10 minutos [120]. Ensayos de microscopía electrónica revelaron la presencia de 2 filamentos con morfología distinta en la cepa US5 de *S. marcescens*, interrupciones químicas y físicas de dichos filamentos demostraron su contribución en autoagregación [120]. Posteriormente, en 1983 Adegbola y colaboradores demostraron la presencia ubicua de 3 hemaglutininas fimbriales expresadas de manera simultánea entre diferentes cepas de *S. marcescens* [121, 122]. Dichas estructuras de superficie fueron denominadas: hemaglutinina sensible a manosa (MS-HA), hemaglutinina resistente a manosa similar a *Klebsiella* (MR/K) y hemaglutinina resistente a manosa similar a *Proteus* (MR/P) [121, 122]. Este mismo grupo de investigadores describió a la fimbria MS-HA como rígida y gruesa con un diámetro de 8 a 9 nm, y a la fimbria MR/P como delgada y rígida con un diámetro de 3 a 4 nm [121].

En los años siguientes, Amako y colaboradores describieron en la cepa de *S. marcescens* US5 dos apéndices con morfología diferente: la fimbria SMF-1 y SMF-3 [123, 124]. SMF-1 se reportó como flexible y delgada con una longitud de hasta 300 nm y un diámetro de 3 nm; con una subunidad fimbrial de 19 kDa y participación en la adherencia a mucina

y epitelio urinario [123–125]. En contraste, SMF-3 se describió como rígida y gruesa con un diámetro de 5 nm y una longitud promedio de 400 nm [123]. De manera semejante, en la cepa de *S. marcescens* US46 se describieron 3 fimbrias con morfologías distintas, aunque no se les asignó un nombre para distinguirlas, razón por la que aquí se les refiere como US46-MS, US46-MR1 y US46-MR2. La primera, US46-MS, presentó un diámetro de 3 nm y capacidad de hemaglutinación sensible a manosa, semejante a SMF-1 de la cepa US5 [123, 124, 126]. US46-MS también se asoció con la inducción de superóxido por parte de leucocitos polimorfonucleares [127, 128]. Por otro lado, US46-MR1 y US46-MR2 presentaron hemaglutinación resistente a manosa y tuvieron diámetros de 7 nm y 4.5 nm, respectivamente [126, 129]. Anticuerpos producidos contra la fimbria de 7 nm de la cepa US46 reaccionaron con fimbrias de diferentes cepas de *S. marcescens* y algunas cepas de *Klebsiella* [129]. Además, se identificó la región genómica que codificaba la fimbria de 7 nm; compuesta al menos por los genes *smfA*, *smfC* y *smfD* [126].

Años después un grupo catalán describió apéndices fimbriales en la cepa de *S. marcescens* ATCC 43821, no relacionados con la fimbria P de *E. coli* [130]. Estos apéndices fueron denominados fimbrias MR-T por presentar hemaglutinación resistente a manosa y por ser gruesos (*Thick*), presentando un diámetro de 11 nm y una longitud de 0.7-1.0 μm [130]. Adicional a la resistencia a manosa, esta fimbria también resultó ser resistente a D-fructosa, D-arabinosa, D-xylosa, D-glucosa y D-galactosa, indicando que el sustrato de esta fimbria carece de dichos azúcares [130, 131]. Además de la adherencia a tejido, se reportó que la fimbria MR-T de la cepa de *S. marcescens* ATCC 43821 era necesaria para la adherencia a borosilicato [130]. La descripción de fimbrias en *S. marcescens*

continua hacia el final de la década de los 80's, Clegg y colaboradores estudiaron la presencia de fimbrias con hemaglutinación sensible a manosa en diversas especies de la familia *Enterobacteriaceae* [132, 133]. Sus resultados indicaron que la cepa de *S. marcescens* IA506 presentaba hemaglutinación sensible a manosa asociada a una fimbria tipo 1 [133]. Para dicha estructura se describió la secuencia de los genes *fimA*, *fimB*, *fimC* y *fimD*, así como el mapa de restricción de *fimA* (Tabla 1)[134–136]. Casi dos décadas después, en la cepa de *S. marcescens* MG1 se identificó dicha fimbria tipo 1 como necesaria para la adherencia a epitelio de córnea, pero dispensable para la adherencia a superficies hidrofóbicas [45]. Además, se descartó que la regulación de este organelo estuviera relacionada con la molécula C₄-HSL. De manera paralela, otro grupo reportó que la regulación de la fimbria tipo 1 (codificada por el operón *fimABCD*) en la cepa *S. marcescens*-D y el desarrollo de biopelícula se encontraba controlado por OxyR [51]. Adicionalmente, se describió que el AMP cíclico (cAMP) regula negativamente la expresión del operón *fimABCD*, la eliminación de *cydA* (codificante de una adenilato ciclasa) resulta en la aparición de fenotipos hiperfimbriados y un incremento en la formación de biopelícula [137, 138]. El mecanismo preciso de esta regulación aún se desconoce, sin embargo se sabe que la proteína receptora de cAMP (CRP) activa la expresión del operón *flhDC* mientras que reprime a *oxyR* y concomitantemente al operón *fimABCD* [60, 139].

Respecto al estudio de las fimbrias CA en cepas de *S. marcescens* de México a la fecha solo se cuenta con la identificación de la fimbria Lpf codificada en el genoma de *S.*

marcescens SmUNAM836, cepa aislada a partir de un lavado bronquial de un paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica [140]. Esta cepa no es pigmentada y se describió como resistente a tobramicina, ciprofloxacina y polimixina B.

En diferentes especies de la familia *Enterobacteriaceae*, como *E. coli*, se han reportado un repertorio fimbrial amplio, por lo que se presume que *S. marcescens* comparte dicha característica [74, 83]. Esta noción se ha confirmado recientemente mediante el análisis genómico de las cepas SM39 (de origen clínico) y Db11 (aislada de una mosca) [141]. Este análisis identificó 6 operones fimbriales hipotéticos conservados en ambas cepas; además de 4 y 5 operones fimbriales específicos de la cepa SM39 y Db11, respectivamente (Tabla 1). Cabe mencionar que todos los operones fimbriales identificados en dicho estudio pertenecen a la familia CA [141].

Tabla 1.- Fimbrias descritas en *S. marcescens*.

Fimbria	Características estructurales	Función descrita	Ref.
MS-HA	· Sensible a Manosa · 8-9 nm diámetro	· Hemaglutinina	[121]
MR/K	· Resistente a Manosa	· Hemaglutinina	[121]
MR/P	· Resistente a Manosa · 3-4 nm diámetro	· Hemaglutinina	[121]
SMF-1	· Flexible · Sensible a Manosa · 3 nm diámetro · 300 nm de longitud	· Unión a mucina · Adherencia y persistencia en epitelio urinario. · Autoagregación en orina	[120, 123–125]
SMF-3	· 5 nm diámetro · 400 nm de longitud	· N/D	[123]
US46-MS	· 3 nm de diámetro	· Involucrada en cicatrización renal · Estimulación de superóxido en PMN	[126, 129]
US46-MR1	· Flexible · Resistente a Manosa · 7 nm de diámetro	· N/D	[126, 129]
US46-MR2	· Resistente a Manosa · 4.5 nm de diámetro	· N/D	[126, 129]
MR-T	· 11 nm de diámetro · Entre 0.76 y 1.08 μm de longitud	· Adherencia a epitelio urinario · Adherencia a borosilicato	[130, 131]
Tipo 1 (Fim)	· Flexible · Sensible a Manosa	· Colonización de superficies abióticas · Formación Biopelícula · Expresión inducida por OxyR · Expresión reprimida por cAMP · Adherencia a células de córnea	[45, 51, 60, 133–136]

N/D=No descrito

Las fimbrias CA contribuyen en la patogénesis de diferentes microorganismos, en *S. marcescens* se sugiere su participación en la adherencia a tejidos, sustratos abióticos y en la formación de biopelícula [45, 51]. Sin embargo, el papel en la virulencia y/o la función específica de estas fimbrias todavía se desconoce.

De acuerdo con los antecedentes previamente descritos, este trabajo se centró en la identificación y clasificación de todos los posibles operones fimbriales codificados en el pangenoma de *S. marcescens*. Adicionalmente, para inferir la expresión de las fimbrias identificadas se llevó a cabo un análisis transcripcional de los promotores fimbriales utilizando como modelo a las cepas Db10 y SmUNAM836. En esta última, además se analizó la presencia de estructuras fimbriales mediante microscopía electrónica y se interrumpieron los genes codificantes de las proteínas acomodadoras correspondientes en tres de los cuatro operones con mayor actividad transcripcional. La caracterización de las cepas mutantes reveló una participación diferencial de las fimbrias asociadas en la formación de biopelícula, movimiento tipo *swarming* y la adherencia a células NCI-H460.

2. JUSTIFICACIÓN

La adhesión y colonización de un tejido representan puntos fundamentales en el establecimiento de un cuadro infeccioso. La adherencia de la mayoría de las bacterias depende de apéndices fimbriales indispensables en la patogénesis bacteriana y en la formación de biopelícula. En *Serratia marcescens* las fimbrias son componentes de virulencia poco caracterizados. Por esta razón estudiar las estructuras fimbriales nos proporcionará información relevante sobre la patogénesis de esta bacteria.

3. OBJETIVOS

3.1.-Objetivo General

Identificar y categorizar todos los posibles operones codificantes de fimbrias CA en *S. marcescens* mediante un análisis genómico y evaluar la contribución de las fimbrias de *S. marcescens* SMUNAM836 en la formación de biopelícula y en la adherencia a células pulmonares.

3.2.-Objetivos Específicos

- 1.- Identificar todos los posibles operones fimbriales tipo CA en 39 genomas de *S. marcescens*.
- 2.- Determinar la expresión de la región promotora de los operones fimbriales de las cepas de *S. marcescens* SMUNAM836 y Db10.
- 3.-Generar cepas de *S. marcescens* SMUNAM836 mutantes en las fimbrias con mayor actividad transcripcional.
- 4.- Evaluar la formación de biopelícula, la capacidad de aglutinar levaduras y la adherencia a células pulmonares de la cepa *S. marcescens* SMUNAM836 y las cepas isogénicas generadas.
- 5.-Analizar mediante TEM las fimbrias presentes en la cepa *S. marcescens* SmUNAM836.

4. HIPÓTESIS

Cepas de *S. marcescens* presentan en su genoma diversos operones que codifican estructuras fimbriales las cuales contribuyen de manera diferencial en la formación de biopelícula y en la adherencia a células pulmonares.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.- Análisis Bioinformático

5.1.1.-Generación de secuencias consenso

Para realizar la búsqueda de operones fimbriales tipo CA se generaron secuencias consensos de la secuencia aminoacídica de las familias α , β , γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , κ , y π . Para las familias γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , κ , y π , se emplearon las secuencias aminoacídicas descritas previamente por [76] y se generó un único alineamiento por familia. Por otro lado, los integrantes de las familias α y β se agruparon por similitud, generando 3 alineamientos distintos por familia. Los alineamientos se incorporaron en el paquete de análisis *cons* (EMBOSS, <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cons>) con parámetros estándar, para obtener las secuencias consenso correspondientes. Este procedimiento no permitió generar una secuencia consenso para la familia σ , por lo que se seleccionaron 13 secuencias representativas (GenBank: AAK88718.1, CAG70003.1, AAF12639.1, ABI62227.1, ABI78617.1, ABI56132.1, ABF87854.1, AAY93214.1, ABE05058.1, CAD18649.1, BAA10202.1, BAC94284.1, and CAL20339.1).1, AAY93214.1, ABE05058.1, CAD18649.1, BAA10202.1, BAC94284.1, and CAL20339.1) para la búsqueda de proteínas pertenecientes a la familia σ en *S. marcescens*.

5.1.2.-Búsqueda de operones fimbriales CA de *S. marcescens*

Las secuencias consenso generadas fueron utilizadas para realizar un tBLASTn limitando la búsqueda únicamente a genomas de *S. marcescens* (taxid: 615) del GenBank. Los genes de acomodador identificados se utilizaron para generar una base de datos, la cual se depuró de duplicados y falsos positivos. Posteriormente, se analizó el contexto genético para confirmar la presencia de por lo menos un gen codificante de proteína chaperona y de una subunidad fimbrial. Los genes anotados como hipotéticos fueron sometidos a un pBLAST para identificar la presencia de dominios de acomodador, chaperona o subunidad fimbrial. En total se analizaron 39 genomas secuenciados de *S. marcescens* (Anexo 2) depositados en la base de datos del NCBI.

5.1.3.-Análisis filogenético y clasificación de operones fimbriales

Para el análisis filogenético de las proteínas acomodadoras se realizaron dos árboles tipo *Neighbor-Joining*, el primero fue conformado por las 421 secuencias de proteínas acomodadoras de *S. marcescens* aquí identificadas, y el segundo fue compuesto por las secuencias antes mencionadas más 189 secuencias reportadas previamente [76]. Las secuencias proteicas se alinearon con ClustalX v2, utilizando la matriz BLOSUM 30 para alineamientos de pares; mientras que para alineamientos múltiples se empleó la serie de matrices BLOSUM. Posteriormente, el programa MEGA X fue utilizado para procesar los alineamientos obtenidos en CLUSTAL y generar un árbol tipo *Neighbor-Joining*, utilizando como matriz de sustitución el modelo de Jones-Taylor-Thorton, con eliminación en pares y 1000 bootstraps. La clasificación de los operones fimbriales de *S.*

marcescens se infirió de acuerdo con la filogenia de las proteínas acomodadoras, la organización genética y la ubicación en el genoma de los operones fimbriales.

5.2 Material Biológico

5.2.1.- Cepas Bacterianas

Las cepas utilizadas en este estudio se describen en la Tabla 2. Los cultivos bacterianos se crecieron rutinariamente en medio Luria-Bertani (LB, 1% peptona, 1% NaCl, 0.5% extracto de levadura), medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco/Ham's F-12 (50/50; DMEM/F-12; Corning) sin glutamina o Medio Mínimo M9 suplementado con 0.4% de glucosa (Sigma) y 10mM de MgSO₄ (Jalmek). Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C con o sin agitación (195 RPM). Los cultivos de *E. coli* se suplementaron con ampicilina [100 µg/mL], kanamicina [50 µg/mL], cloranfenicol [30 µg/mL] o tetraciclina [25 µg/mL], cuando fue requerido. Los cultivos de *S. marcescens* se suplementaron con ampicilina [150 µg/mL], kanamicina [150 µg/mL], cloranfenicol [150 µg/mL] y/o tetraciclina [25 µg/mL], cuando fue requerido. Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se preservaron en medio LB con 20% de glicerol a -70°C.

Tabla 2.- Lista de cepas bacterianas utilizadas en este estudio

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i>		
Dh5 α	F ⁻ ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 endA1 recA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44 thi-1 ΔgyrA96 relA1</i>	Colección de Laboratorio
<i>S. marcescens</i>		
SmUNAM836	Aislado clínico de paciente con bronquitis.	[140]
SmUNAM836 Δ <i>fgooC::nptII</i>	SmUNAM836 con reemplazamiento del <i>fgooC</i> por <i>nptII</i>	Este trabajo
SmUNAM836 Δ <i>fgovC::nptII</i>	SmUNAM836 con reemplazamiento del <i>fgovC</i> por <i>nptII</i>	Este trabajo
SmUNAM836 Δ <i>fpsC::nptII</i>	SmUNAM836 con reemplazamiento del <i>fpsC</i> por <i>nptII</i>	Este trabajo
Db10	Aislado de <i>D. melanogaster</i>	[142]

5.2.2.- Cultivo celular in vitro

La línea celular de carcinoma pulmonar de células grandes NCI-H460 (RRID:CVCL_0459; ATCC® HTB-177™) se cultivó utilizando medio DMEM/F-12 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y con 10mM de buffer HEPES realizando cambios de medio cada 3 días y cosechando al alcanzar una confluencia del 80%. La propagación del cultivo se realizó desprendiendo las células con 3 mL de EDTA 0.5mM por 8 min a 37°C en una atmosfera de 5% CO₂. El EDTA se inactivo con 2 volúmenes de medio completo y las células desprendidas se transfirieron a un tubo cónico de 15 mL para ser centrifugadas por 5 min a 1000 RPM. La viabilidad de las células se analizó con azul tripano en una relación 1:1 y el conteo se realizó en un hemocitómetro.

5.3 Manipulación de DNA

Para la extracción de DNA genómico y limpieza de productos de PCR se utilizaron los kits E.Z.N.A. de OMEGA Bio-Tek. Para la extracción de DNA plasmídico se utilizó el kit Fast-n-Easy Plasmid Mini Prep (JENA Bioscience). En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

Los plásmidos utilizados y las construcciones generadas en este estudio se enlistan en la tabla 3. Todos los oligonucleótidos utilizados en este estudio se describen en las Tablas 4 y 5. El diseño de oligonucleótidos se realizó utilizando como referencia las secuencias genómicas de las cepas de *S. marcescens* SmUNAM836 (NZ_CP012685.1) y Db10 (HG326223.1).

5.3.1 Clonación de regiones promotoras

Cada una de las regiones promotoras se amplificó mediante PCR con la enzima Accuzyme (Meridian Bioscience), utilizando los pares de oligonucleótidos correspondientes (Tabla 6). Las condiciones de amplificación utilizadas se indican en el Anexo 1. Los productos de PCR se purificaron mediante el kit comercial E.Z.N.A. de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR purificados ($\approx 2 \mu\text{g}$) se digirieron con las enzimas *EcoRI* (Invitrogen) y *BamHI* (Invitrogen) a 35°C por 3 h 30 min, el plásmido pSEVA246 ($\approx 25 \mu\text{g}$) fue digerido con las mismas enzimas. Todas las reacciones de digestión enzimática se limpiaron mediante el kit Omega EZNA y se eluyeron en un volumen final de $30 \mu\text{L}$ de

H₂O. Estas digestiones se ligaron en una relación vector:inserto de 2:1 con la enzima T4 Ligasa (Invitrogen). Las ligaciones se incubaron por 18 h a 16°C o por 24 h a 4°C. Las reacciones de ligación se precipitaron con 5 volúmenes de etanol absoluto por 24 h, y se centrifugaron a 4°C por 30 min 17000 × g. La pastilla resultante se lavó con etanol 70 % y resuspendió en 10 µL de H₂O.

5.3.2 Generación de cepas mutantes de *S. marcescens*

La mutagénesis se realizó mediante el sistema λ-Red [143]. Los casetes de resistencia a kanamicina con regiones homologas al gen de interés se amplificaron utilizando los oligonucleótidos de la Tabla 5 y las condiciones indicadas en el Anexo 1. Los productos de PCR se precipitaron por 18 h utilizando isopropanol frío, se centrifugaron a 17000 × g a 4°C por 30 min y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, la pastilla se lavó con 1 mL de etanol 70 %, se centrifugó por 30 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en 10 µL de H₂O estéril y todo el volumen se utilizó para electroporar células de *S. marcescens* SmUNAM836 portadora del plásmido pKD78. Las células se recuperaron en LB por 1 h en agitación y se sembraron en agar LB suplementado con kanamicina. Las colonias resultantes fueron analizadas mediante PCR utilizando los oligonucleótidos ScM_FgooC, ScM_FgovC y ScM_Fpsc-F (Tabla 5).

Tabla 3.- Plásmidos utilizados y construcciones generadas.

Plásmido/ Construcción	Descripción	Referencia
pSEVA246	Vector reportero que contiene el operon <i>luxCDABE</i> , un gen de resistencia a kanamicina y el origen de replicación ColE1	[144]
pSmAO	Promotor fimbrial <i>fao</i> de SmUNAM836 clonado en pSEVA246.	Este estudio.
pSmGO1	Promotor fimbrial <i>fgoo</i> de SmUNAM836 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pSmGO4	Promotor fimbrial <i>fgof</i> de SmUNAM836 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pSmGO5-836	Promotor fimbrial <i>fgov</i> de SmUNAM836 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pSmGF1-836	Promotor fimbrial <i>fgfo</i> de SmUNAM836 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pSmGF2	Promotor fimbrial <i>fgft</i> de SmUNAM836 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pSmPO	Promotor fimbrial <i>fpo</i> de SmUNAM836 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pSmPT	Promotor fimbrial <i>fpt</i> de SmUNAM836 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pSmPV	Promotor fimbrial <i>fpv</i> de SmUNAM836 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pSmPS	Promotor fimbrial <i>fps</i> de SmUNAM836 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pSmPN	Promotor fimbrial <i>fpn</i> de SmUNAM836 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pSmSO	Promotor fimbrial <i>fso</i> de SmUNAM836 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pSmBT	Promotor fimbrial <i>fbt</i> de Db10 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pSmGO2	Promotor fimbrial <i>fgot</i> de Db10 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pSmGO5-Db10	Promotor fimbrial <i>fgov</i> de Db10 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pSmGF1-Db10	Promotor fimbrial <i>fgfo</i> de Db10 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pSmPF	Promotor fimbrial <i>fpf</i> de Db10 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pSmNC6	Promotor fimbrial <i>ncf6</i> de Db10 clonado en pSEVA246.	Este estudio
pJT04	Vector pIN62 que codifica DSRed, Tc ^R	[146]
pKD4	Plásmido templado para amplificar un casete de resistencia a kanamicina.	[143]
pKD78	Plásmido con origen de replicación termosensible repA101-ts. Codifica los genes de las recombinasas <i>exo</i> , <i>bet</i> y <i>gam</i> bajo el promotor AraB.	[143]

Tabla 4.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de regiones promotoras.

Oligo	Secuencia 5'-3'	Sitio de restricción	Propósito
<i>pfao</i> -F	5' TATAGAATTCAAATGTGGCAAGAGTCACCT 3'	<i>Eco</i> RI	Amplif. del promotor
<i>pfao</i> -R	5' TATAGGATCCGGTATAACTCCCTTCAATGT 3'	<i>Bam</i> HI	<i>fao</i> de SmUNAM836.
<i>pfgoo</i> -F	5' TATAGGATCCCCTACTTTCCTTAAAATTATG 3'	<i>Bam</i> HI	Amplif. del promotor
<i>pfgoo</i> -R	5' TATAGAATTCGTTAAGGAGTCACCTTGAA 3'	<i>Eco</i> RI	<i>fgoo</i> de SmUNAM836.
<i>pfgof</i> -F	5' TATAGAATTCATGGATAACCTCATCCAGC 3'	<i>Eco</i> RI	Amplif. del promotor
<i>pfgof</i> -R	5' TGTGGGATCCGTACTTATTCATATAAATATCC 3'	<i>Bam</i> HI	<i>fgof</i> de SmUNAM836.
<i>pfgov</i> -F	5' TATAGAATTCGTCGACAGACCATTTAACG 3'	<i>Eco</i> RI	Amplif. del promotor
<i>pfgov</i> -R	5' TATAGGATCCAGTTGCAGACAATACCAG 3'	<i>Bam</i> HI	<i>fgov</i> de SmUNAM836.
<i>pfgfo1</i> -F	5' TATAGAATTCCTAGGAGTTCGTTATTTTGTCAC 3'	<i>Eco</i> RI	Amplif. del promotor
<i>pfgfo1</i> -R	5' TATAGGATCCGAGATAAACTCCATAACAGTTTGG 3'	<i>Bam</i> HI	<i>fgfo</i> de SmUNAM836.
<i>pfgft</i> -F	5' TATAGGATCCGTGAAATGCCCTTAATTTAC 3'	<i>Bam</i> HI	Amplif. del promotor
<i>pfgft</i> -R	5' TCTAGAATTCTGCAAAGTACACCGATATAA 3'	<i>Eco</i> RI	<i>fgft</i> de SmUNAM836.
<i>pfpo</i> -F	5' TATAGAATTCAGTCGATCTAATATCTCGCATAAC 3'	<i>Eco</i> RI	Amplif. del promotor
<i>pfpo</i> -R	5' TATAGGATCCTCATTCTCAGGTTCTGTAG 3'	<i>Bam</i> HI	<i>fpo</i> de SmUNAM836.
<i>pfpt</i> -F	5' TATAGGATCCACGCCAAACGCCAGAACAG 3'	<i>Bam</i> HI	Amplif. del promotor
<i>pfpt</i> -R	5' TGATCAGAATTCGCTTTTACGATCTGTTGTC 3'	<i>Eco</i> RI	<i>fpt</i> de SmUNAM836.
<i>pfpv</i> -F	5' TATAGGATCCTATAACCAATTATCCTTAATCG 3'	<i>Bam</i> HI	Amplif. del promotor
<i>pfpv</i> -R	5' TATAGAATTCGAATAACCCTGATTCTCTGT 3'	<i>Eco</i> RI	<i>fpv</i> de SmUNAM836.
<i>pfps</i> -F	5' TATAGAATTCCTGTGCTTAGGCAGGGGTGG 3'	<i>Eco</i> RI	Amplif. del promotor
<i>pfps</i> -R	5' TATAGGATCCCAAATGCAATCACTGCAGC 3'	<i>Bam</i> HI	<i>fps</i> de SmUNAM836.
<i>pfso</i> -F	5' TATAGGATCCCTTATATTCTTGCCGATGA 3'	<i>Bam</i> HI	Amplif. del promotor
<i>pfso</i> -R	5' TATAGAATTCGGCGATGAATGCATCGTCAC 3'	<i>Eco</i> RI	<i>fso</i> de SmUNAM836.
<i>pfbt</i> -F	5' TATAGAATTCACGGCAAAAGTGC GCGCC 3'	<i>Eco</i> RI	Amplif. del promotor
<i>pfbt</i> -R	5' TATAGGATCCATGCCGTTGCCTTCCAAC TG 3'	<i>Bam</i> HI	<i>fbt</i> de Db10.
<i>pfgot</i> -F	5' TGTGGGATCCTACTTTTTCATATAAGTCCC 3'	<i>Bam</i> HI	Amplif. del promotor
<i>pfgot</i> -R	5' TATAGAATTCGTTTTGGTCTTTTGGTGAGC 3'	<i>Eco</i> RI	<i>fgot</i> de Db10.
<i>pfgov2</i> -F	5' TATAGAATTCAGCAATTGTCCGATTTTCG 3'	<i>Eco</i> RI	Amplif. del promotor
<i>pfgov2</i> -R	5' TCTCGGATCCATTTAGACTCTCGATGAATT 3'	<i>Bam</i> HI	<i>fgov</i> de Db10.
<i>pfgfo2</i> -F	5' TATAGAATTCGAGGAGAAGGAGGGAAGGAATCTAAG 3'	<i>Eco</i> RI	Amplif. del promotor
<i>pfgfo2</i> -R	5' TATAGGATCCCATTACTTTCTTCGCTGAGAGAGC 3'	<i>Bam</i> HI	<i>fgfo</i> de Db10.
<i>pfpf</i> -F	5' TATAGAATTCCTCACTTCACTTTCTGTGTC 3'	<i>Eco</i> RI	Amplif. del promotor
<i>pfpf</i> -R	5' TATAGGATCCGCCAGCATGATTTTATTCAG 3'	<i>Bam</i> HI	<i>fpf</i> de Db10.
<i>pncf6</i> -F	5' TGTGGAATTCATTTTATTTACCCGTC AAC 3'	<i>Eco</i> RI	Amplif. del promotor
<i>pncf6</i> -R	5' TGTGGGATCCATAGAGATTCCTTACATTCC 3'	<i>Bam</i> HI	<i>ncf6</i> de Db10.
158	5' AGCGGATAACAATTTACACAGGA 3'	N/A	Cribaje de clonaciones
159	5' CTTTCGGGAAAGATTTCAACCTGG 3'	N/A	en pSEVA246

Amplif.=Amplificación

Tabla 5.- Oligonucleótidos usados en la mutagénesis de los genes codificantes de las proteínas acomodadoras.

Oligo	Secuencia 5'-3'	Propósito
Mut_Fgoo-F	5' ATT GCC CCAC TTA ACC CGC AAC CGC CCG CTA TCC GCC AGG CCA GCG TG TAG GCT GGA GCT GCT TC 3'	Obtención de amplicón mutagénico con resistencia a Km y regiones homólogas al gen <i>fgooC</i>
Mut_Fgoo-R	5' GGC ACG GCT TAT GCG CGC GAT TAT TTC AAC CCG GCG TTG CTG GAA CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG 3'	Obtención de amplicón mutagénico con resistencia a Km y regiones homólogas al gen <i>fgovC</i>
Mut_Fgov-F	5'GGA GTG AAG CGG CGC TGG CAG AGT TTA ACA TGT CGT TTA TTC ACG TGT AGG CTG GAG CTG CTTC 3'	Obtención de amplicón mutagénico con resistencia a Km y regiones homólogas al gen <i>fgovC</i>
Mut_Fgov-R	5'CTG GTC GGC TTT CGG CCC CCA TTT GAT CGT CAG TTT CTC ACC CGC CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG 3'	Obtención de amplicón mutagénico con resistencia a Km y regiones homólogas al gen <i>fpsC</i>
Mut_Fps-F	5' GGT CTA TGC CGC CGA CGT GAT TCA ATT CAA TAC CGA CGT ATT GGA GTG TAG GCT GGA GCT GCT TC 3'	Obtención de amplicón mutagénico con resistencia a Km y regiones homólogas al gen <i>fpsC</i>
Mut_Fps-R	5' CAG CTG GAT TTC ACA CTG CGC CGC GCC GTT CCA GTG CAC GCT CAT CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG 3'	Confirmación de la mutación del gen <i>fgooC</i>
ScM_FgooC-F	GAA CAC ACT GCC CGA AAG CCG CCT	Confirmación de la mutación del gen <i>fgovC</i>
ScM_FgooC-F	GCT CCG GAA TAA CGC TGG AGC AGG	Confirmación de la mutación del gen <i>fgovC</i>
ScM_FgovC-F	CAG GGA ATG GCA AAT CAA CG	Confirmación de la mutación del gen <i>fpsC</i>
ScM_FgovC-R	CAG TTT TTG GCA TTG CAG GG	Confirmación de la mutación del gen <i>fpsC</i>
ScM_FpsC-F	CGAGTGCTGAATTATTCCATGACGT	
ScM_FpsC-F	GATACGGCAACTGTTTGTCTGGTT	

5.3.3.-Preparación de células electrocompetentes

Las cepas de *E. coli* o *S. marcescens* se sembraron en caldo LB toda la noche. Posteriormente los cultivos se diluyeron en una proporción 1:100 en medio LB y se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ 0.5-0.6. Para las cepas con el plásmido pKD78, el crecimiento se realizó en LB suplementado con 1mM de L-arabinosa (MARCA) e incubadas a 30°C. Una vez alcanzada esta densidad óptica se centrifugó a 7400 × g a 4°C durante 30 min, la pastilla resultante se lavó con 5mL de H₂O estéril fría. Posteriormente, se agregó un volumen igual de H₂O fría estéril y se mezcló por inversión, se centrifugó, este proceso se repitió tres veces. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 1.5 mL de glicerol 20% y las células se distribuyeron en alícuotas de 100 µL y se

conservaron a -70°C . Las células para mutagénesis se resuspendieron en $200\ \mu\text{L}$ de glicerol 20% y se electroporaron directamente.

5.3.4 Electroporación

A cada alícuota de células electrocompetentes se agregó $2\ \mu\text{L}$ de plásmido cerrado o el volumen total de los amplicones mutagénicos o ligaciones precipitadas y se dejaron interaccionar en hielo por 5 min. Posteriormente se transfirieron a una celda de electroporación de 1 mm de grosor y se les aplicó un pulso eléctrico de 1800 V. Inmediatamente, se adicionaron $800\ \mu\text{L}$ de medio LB y se incubaron a 37°C durante 1 hora o a 30°C por 3 h (para cepas pKD78 positivas). Finalmente, $150\ \mu\text{L}$ de los cultivos electroporados se sembraron en agar LB suplementado con el antibiótico correspondiente.

5.4.-Cuantificación de la expresión de promotores fimbriales

Las cepas de *S. marcescens* SmUNAM836 y Db10 transformadas con las construcciones promotor-pSEVA246 (Tabla 3) se incubaron toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente, 2 mL de los cultivos se centrifugaron a 17000 x g por 10 min, el sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió en 1 mL de H₂O estéril. Se determinó la absorbancia de la suspensión bacteriana utilizando un espectrofotómetro (UNICO 1100 RS). Dicha suspensión se utilizó para inocular 7 mL de medio LB, DMEM o M9 ajustando a una DO₆₀₀ de 0.05. Los medios inoculados se incubaron en agitación o en condiciones estáticas a 37°C. Alícuotas de 180 µL se tomaron a las 6 h y 24 h, y se transfirieron a una placa de 96 pozos blanca con fondo transparente. La placa se mantuvo en oscuridad por 15 min para extinguir la señal lumínica. Posteriormente, las unidades relativas de luminiscencia (RLU) y la absorbancia de los cultivos DO₆₀₀ nm se determinaron en el lector GloMax® Discover (Promega). Los valores obtenidos se reportaron como RLU/absorbancia.

5.5.-Formación de biopelícula en poliestireno

Las cepas de *S. marcescens* SmUNAM836 y las cepas isogénicas generadas se sembraron en caldo LB toda la noche a 37°C en agitación. Estos cultivos se diluyeron en relación 1:5 en medio LB y 5 µL de dicha suspensión bacteriana se utilizó para inocular 140 µL de caldo LB en placas de 96 pozos. Los cultivos se incubaron a 37°C en crecimiento estático dentro de una cámara húmeda parcialmente descubierta. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se retiró el sobrenadante de los pozos y estos se lavaron 3 veces con H₂O. Para teñir la biopelícula formada en el material plástico se agregaron 200 µL de 1% Cristal Violeta filtrado y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, se retiró el colorante de los pozos y se lavaron 3 veces con H₂O. Se agregaron 150 µL de ácido acético 33% por 30 min, para solubilizar el colorante. Por último, se determinó la absorbancia OD₅₉₅ usando el lector Multiskan Sky (ThermoScientific).

5.6.-Formación de biopelícula en borosilicato

La cepa de *S. marcescens* SmUNAM836 y las cepas isogénicas generadas se incubaron en medio LB por 18 h. Posteriormente, 100 µL de estos cultivos fueron utilizados para inocular 3 mL de caldo LB, los cuales se incubaron por 24 h en agitación a 230 RPM. Luego, se agregaron 260 µL de paraformaldehído 37% (Sigma) y se incubaron a temperatura ambiente por 1 h. Después, los cultivos bacterianos se decantaron, se

lavarón 3 veces con agua destilada y se dejaron secar al aire. Para teñir la biopelícula formada se agregaron 4 mL de Cristal Violeta 1% filtrado y se incubaron durante 1 h, se lavó el exceso de colorante y se dejó secar al aire. La capacidad de formar biopelícula se analizó y comparó de manera cualitativa.

5.7.-Formación de biopelícula AL en medio líquido (*Pellicle*)

La cepa de *S. marcescens* SmUNAM836 y las cepas isogénicas generadas se incubaron en medio LB a 37°C por 24 h a 230 RPM. Una vez finalizada esta incubación, se tomó 1 mL de los cultivos bacterianos para inocular vasos de precipitado de 50mL que contenían 15 mL de medio LB. La incubación se realizó a 37°C a 230 RPM por 24 h. Al concluir la incubación, los vasos se retiraron y la formación de biopelícula en la interfaz aire-agua se analizó de manera cualitativa como positiva o negativa.

5.8.- Movilidad en superficie semisólida (*swarming*)

La movilidad tipo swarming se evaluó en medio mínimo M8 (Na₂HPO₄ 0.6%, KH₂PO₄ 0.3%, NaCl 0.05%, Dextrosa 0.2% y Triptona 0.5%) y medio infusión cerebro-corazón, con 0.8 % de agar bacteriológico [147] . Las placas se inocularon con 2.5 µL de cultivos de 24 h de *S. marcescens* SmUNAM836 o de las cepas isogénicas generadas y se incubaron en

una cámara húmeda en oscuridad a temperatura ambiente por 24 y 48 h. El patrón de desplazamiento se analizó de manera cualitativa.

5.9.-Adherencia a células pulmonares NCI-H460

Un total de 75,000 células NCI-H460 se sembraron e incubaron por 24 h a 37 °C con 5 % CO₂. Las células NCI-H460 se tiñeron con 1 µg/mL de Hoechst 33342 (ThermoScientific) durante 1 h, y se lavaron 3 veces con PBS 1X. Cultivos de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 y las cepas isogénicas generadas ajustados a una DO₆₀₀ de 0.1 en PBS se tiñeron con 10 µg/mL naranja de acridina durante 1 hora en oscuridad, posteriormente las células se centrifugaron a 100 × g y resuspendieron en un volumen igual de PBS estéril. Las células NCI-H460 se infectaron con una MOI 1:50 de cada suspensión bacteriana teñida con naranja de acridina. La suspensión se centrifugó por 5 min a XX × g y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Las bacterias no adheridas se lavaron con PBS 1X y las células se fijaron con 3 % paraformaldehído (SIGMA). Los valores de fluorescencia a 460 nm (células NCI-H460) y 538 nm (células bacterianas) se determinaron utilizando el Fluroskan (ThermoScientific). Los datos se reportaron como una relación de fluorescencia 460nm/538nm.

5.10.- Microscopía electrónica de transmisión

Se prepararon cultivos de 24 h de *S. marcescens* SmUNAM836 en medio M9. Luego, 4 mL de los cultivos bacterianos fueron centrifugados a 100 x g por 5 min. El sobrenadante fue aspirado cuidadosamente y la pastilla se resuspendió suavemente en un volumen igual de PBS 1X; este proceso se repitió 2 veces más. Luego, la pastilla fue resuspendida suavemente en 500 µL de PBS 1X. Posteriormente, 10 µL de la suspensión bacteriana fueron colocados en Parafilm y sobre esta gota se flotó una rejilla de cobre (cuadrícula de 300 cubierta con Formvar; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA). Se permitió la interacción de la rejilla con la suspensión bacteriana por 1 min para luego realizar 3 lavados sobre gotas de agua miliQ estéril. En todos los casos, el exceso de líquido fue removido haciendo uso de tiras de papel filtro. Finalmente, se agregó acetato de uranilo al 1% como contraste por 10 min, seguido de 3 lavados de 1 min en PBS 1X.

De manera alternativa, se realizaron preparaciones especiales que consistieron en la remoción física de las proteínas de membrana. Esto se realizó utilizando cultivos de 100 mL de la cepa SmUNAM836 incubados por 24 h en medio M9. A estos cultivos se les agregó inhibidor de proteasas cOMplete EDTA-free (Roche), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Posteriormente, este cultivo se dividió en volúmenes iguales en 4 tubos cónicos de 50 mL. Para el desprendimiento mecánico se utilizaron 2 tubos de manera simultánea, sometidos a agitaciones en vortex con una duración de 5 min. Al finalizar cada agitación, los tubos se colocaron en hielo para prevenir la desnaturalización por fricción. Este proceso se repitió un total de 5 veces y los tubos se

centrifugaron a 13 000 RPM por 15 min. Luego, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se centrifugó a 100000 x g por 1 h en una ultracentrífuga (Beckman Coulter Life Science). El sobrenadante se decantó, la pastilla se resuspendió en agua miliQ y transfirió a micro tubos de 1.5 mL. Esta fracción contuvo las proteínas de membrana desprendidas de la bacteria y fue la que se utilizó para preparaciones de microscopía electrónica como se indica anteriormente.

5.11.- Análisis estadísticos

Para el análisis transcripcional de promotores fimbriales se empleó una ANOVA de dos vías con la prueba LSD de Fischer; el punto de significancia estadística se estableció como $p < 0.05$. Para la comparación de fenotipos entre mutantes y cepa silvestre, los datos se analizaron mediante *t-student* utilizando como punto de corte $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1.-Búsqueda e identificación de operones tipo CA en genomas de *S. marcescens*

Para llevar a cabo la búsqueda de los operones codificantes de tipo fimbrias CA en *S. marcescens* se generaron secuencias consenso de las proteínas acomodadoras pertenecientes a las familias α , β , γ , κ y π . Cada secuencia consenso, así como 13 secuencias individuales de proteínas acomodadoras σ , fueron utilizadas como semilla de búsqueda en un tBLAST seleccionando como blanco la base de datos genómica de *S. marcescens*. De acuerdo con estas búsquedas, se identificaron un total de 421 proteínas acomodadoras codificadas en 39 genomas de *S. marcescens* analizados. Posteriormente, las 421 secuencias de proteínas acomodadoras se alinearon mediante ClustalX y se realizó un análisis filogenético tipo Neighbor-Joining (Figura 2).

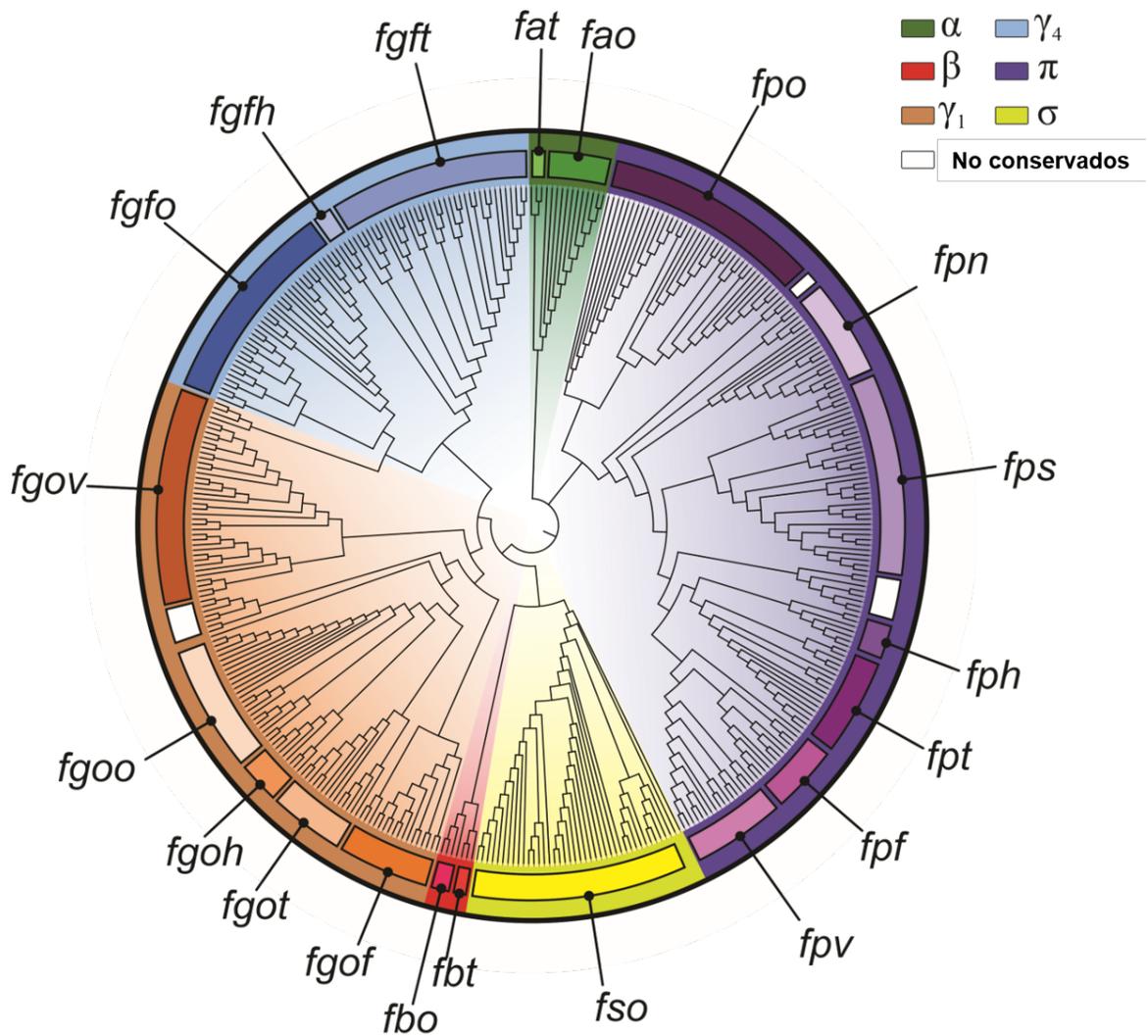


Figura 2. Árbol filogenético tipo Neighbor-Joining no enraizado de las 421 proteínas acomodadoras identificadas en 39 genomas de *S. marcescens*. Cada recuadro en color indica un operón fimbrial conservado y todas las ramas que lo componen presentan una arquitectura genética similar. Los recuadros en blanco indican operones no conservados y los operones de las ramas que lo componen no comparten la misma organización genética. Las familias a las que pertenecen los operones conservados se indican en diferentes colores. El análisis filogenético comprendió un total de 1077 posiciones aminoacídicas y un valor *bootstrap* de 1000. Todas las proteínas acomodadoras usadas pertenecían a un operón fimbrial completo; no se usaron pseudogenes ni genes con desplazamiento en el marco de lectura.

Posteriormente, se realizó una búsqueda manual, para analizar la organización genética, la ubicación genómica y el contexto genético de los genes codificantes de las proteínas acomodadoras. De acuerdo a lo anterior, se determinó que el fimbrioma CA de *S. marcescens* está compuesto por 20 operones fimbriales conservados y 17 operones fimbriales no conservados (Figura 3 y Tabla 6). Los operones conservados poseen características que indican estabilidad en el genoma, tales como un mismo contexto genético, una ubicación similar en el genoma y ausencia de elementos genéticos móviles (Figura R2). Por otro lado, los operones fimbriales no conservados o *ncf* (por sus siglas en inglés, *non-conserved fimbriae*) comparten un nodo dentro del árbol filogenético pero no presentan un mismo contexto genético, se encuentran en zonas distintas del genoma y están flanqueados por múltiples elementos que sugieren adquisición mediante transferencia horizontal (Tabla 6). La clasificación por familia de cada operón se realizó mediante un segundo análisis filogenético tipo Neighbor-Joining en el cual se adicionaron 189 proteínas acomodadoras previamente clasificadas por Nuccio y Baumler [76]. En el caso de los operones conservados, se evidenció que en el fimbrioma CA de los 39 genomas de *S. marcescens* analizados están codificados 2 operones de la familia α y 2 de la β ; 5 operones de la subfamilia γ_1 y 3 de la γ_4 ; así como 7 operones de la familia π . Además, se identificó 1 operón de la familia σ (Figura 2) y ninguno perteneciente a la familia κ . Por otro lado, los 17 operones *ncf* se distribuyeron de la siguiente manera: 3 de la familia γ_1 , 1 de la γ_3 , 11 de la familia π y 2 en la familia σ .

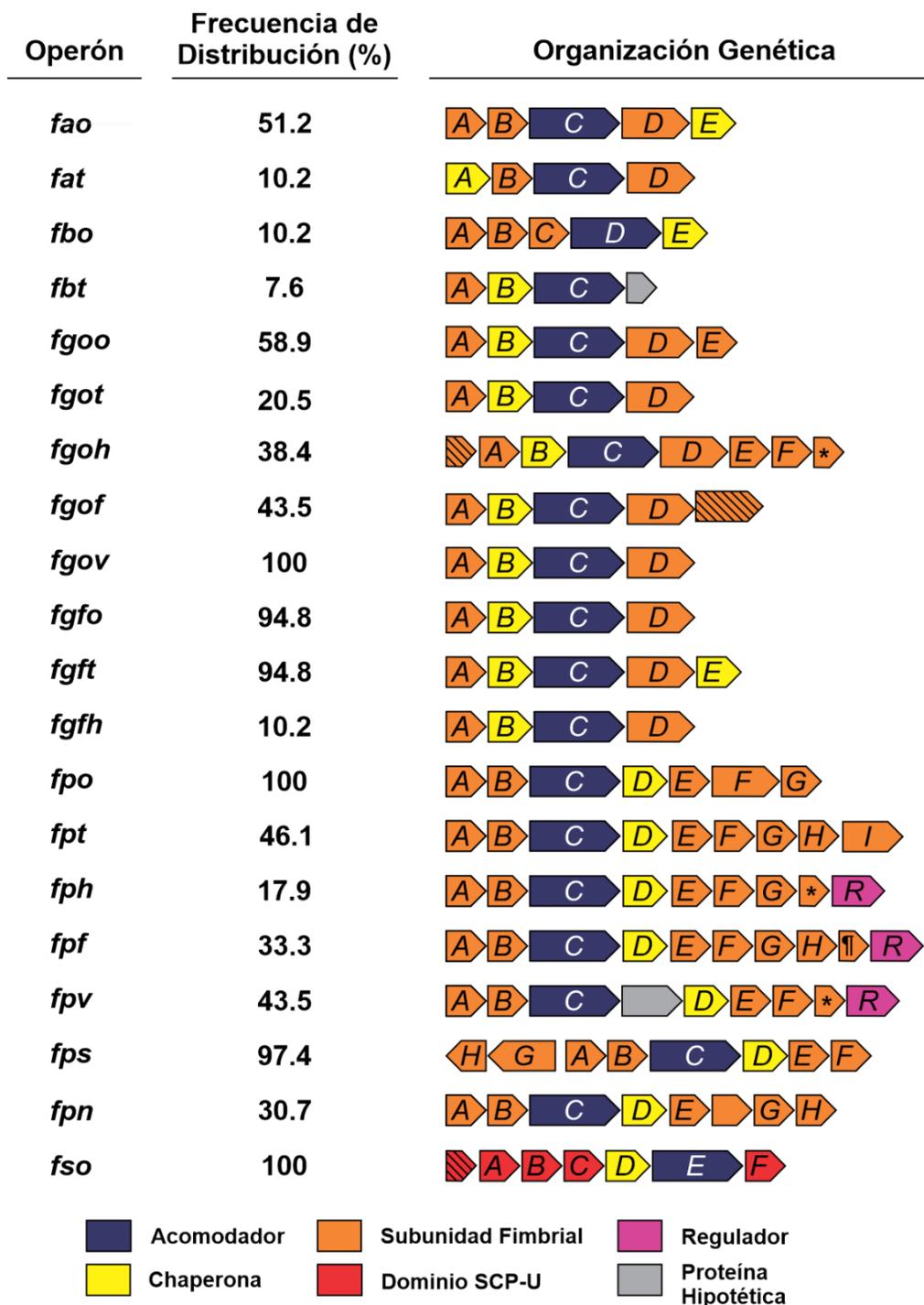


Figura 3. Organización genética y distribución de los 20 operones tipo CA conservados de *S. marcescens*. La distribución se muestra en porcentajes relativo a los 39 genomas analizados. Los operones esta representados en diagramas de flechas que indican la dirección de la transcripción. Los componentes de cada operón están catalogados en colores de acuerdo a su función hipotética asignada por el NCBI-CDD. Las diagonales dentro de una flecha indica que ese gen puede estar ausente en algunas cepas; (*) indica que puede haber 1 o 2 genes en esa posición; (†) indica que el número de subunidades puede variar entre 1 y 5.

Para poder distinguir cada uno de los 20 operones conservados mencionados, se estableció una nomenclatura basada en la familia a la que pertenecen. Esta nomenclatura se compone por un código de 3 letras (ej. *fao* corresponde a *fimbriae alpha* operon *one*) o de 4 letras para aquellos operones de las subfamilias γ (ej. *fgov* corresponde a *fimbriae gamma one operon five*). En los casos en que la primera letra del número se encuentra asignada previamente, se utilizó la primera consonante (ej. *fph* corresponde a *fimbriae pi three*). Para los *ncf* se asignó una nomenclatura distinta, en la cual se utilizan únicamente las siglas *ncf* seguidas de un número consecutivo (ej. *ncf1*, *ncf2*, *ncf3*, etc).

Interesantemente, encontramos que los operones *fgoo*, *fgov*, *fgfo*, *fgft*, *fpo*, *fps* y *fso* se encontraban en $\geq 94\%$ de las cepas analizadas por lo que se les denominó como operones centrales o *core* (Figura 3). Por el contrario, cada operón *ncf* se encontró únicamente en el rango de 1 a 3 genomas (Tabla 6). Doce de los diecisiete operones *ncf* estuvieron codificadas en un único genoma, mientras que *ncf2* y *ncf6* se encontraron en 2 genomas. Por último, los operones *ncf1*, *ncf5* y *ncf8* se identificaron en 3 cepas distintas. Además, el operón *ncf1* se encontró duplicado en la cepa UMH5.

Tabla 6. Distribución y ubicación de los operones *ncf* de *S. marcescens*

Familia	Operón	Cepa	Ubicación en el genoma
γ_1	<i>ncf1</i>	Strain 1274	3271366
		UMH2	3433094
		UMH5	3814401; 50422829
	<i>ncf2</i>	Strain 1274	4291001
		UMH8	5104869
γ_3	<i>ncf3</i>	UMH5	292442
	<i>ncf4</i>	UMH5	303565
π	<i>ncf5</i>	EL1	3256580
		KS10	4684246
		WW4	692071
	<i>ncf6</i>	Db11	4767165
		UMH1	4746914
	<i>ncf7</i>	B3R3	99811
	<i>ncf8</i>	RSC-14	1749970
		UMH2	4992937
		UMH7	4872535
	<i>ncf9</i>	AS1	5478606
	<i>ncf10</i>	UMH5 (plásmido)	37930
	<i>ncf11</i>	B3R3 (plásmido)	52122
	<i>ncf12</i>		15886
	<i>ncf13</i>	N4-5	1162209
	<i>ncf14</i>	WW4	116754
<i>ncf15</i>	4110612		
σ	<i>ncf16</i>	AS-1	86537
	<i>ncf17</i>		73173

Adicionalmente, se llevó a cabo un escrutinio manual para evidenciar una posible distribución de los operones fimbriales dependiente del origen de los aislados. Se encontró que el operón *fpv* estaba presente principalmente en cepas de origen clínico, mientras que *fat* solo estaba en cepas de origen ambiental (Figura 4).

6.2.- Actividad transcripcional de operones fimbriales tipo CA de las cepas de *S. marcescens* SmUNAM836 y Db10.

Una vez elucidado el fimbrioma de *S. marcescens*, se realizó un análisis de la actividad transcripcional bajo condiciones controladas de los promotores fimbriales de las cepas SmUNAM836 y Db10. Las distintas regiones promotoras de los operones fimbriales se fusionaron al operón *luxCDABE* (Tabla 3). Estas dos cepas de *S. marcescens* comparten todos los operones denominados *core*, de los cuales *fgft*, *fpo*, *fps* y *fso* poseen una región promotora con una identidad promedio del 91%; mientras que la homología de la región promotora de *fgov* es del 83%. En contraste, las regiones promotoras de los operones *fgfo* carecen de similitud. Por lo anterior, se utilizaron las construcciones derivadas de las regiones promotoras de *fgft*, *fpo*, *fps* y *fso* de la cepa SmUNAM836 para realizar también la evaluación en la cepa Db10. El resto de los promotores, incluidos *fgov* y *fgfo*, fueron obtenidos amplificando la región respectiva en cada cepa.

La determinación de la producción de luminiscencia se realizó bajo distintas condiciones: medio rico en nutrientes (LB), medio de cultivo celular (DMEM-F12) y medio bajo en nutrientes (M9). Observamos que las cepas utilizadas crecían de manera distinta dependiendo del medio de cultivo. Sin embargo, las fases de crecimiento se alcanzaron en tiempos similares (Figura 5). Por esta razón se establecieron dos puntos de muestro: 6h y 24 h. El primer tiempo corresponde a la fase logarítmica en los medios LB y DMEM, mientras que en M9 el cultivo se halla en fase logarítmica tardía. En el momento de la segunda lectura, los cultivos se encuentran en fase estacionaria en los 3 medios.

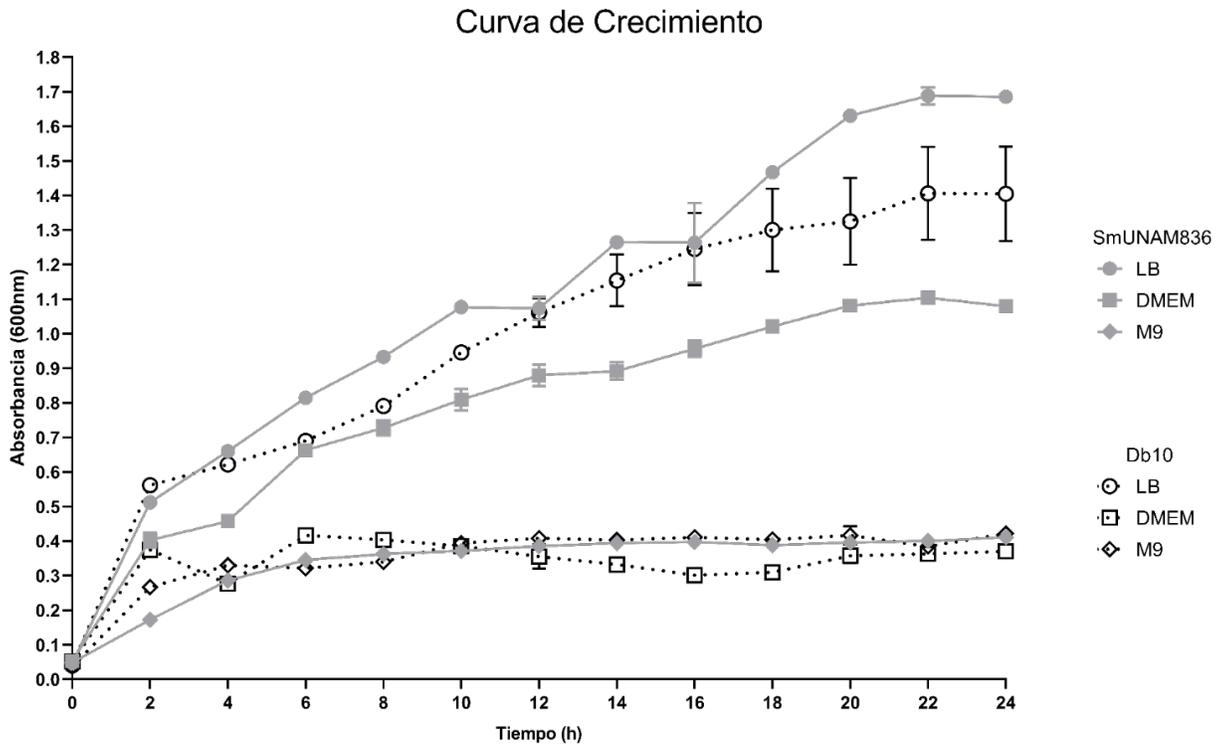


Figura 5. Curva de crecimiento de las cepas SmUNAM836 y Db10. Las cepas se inocularon en tubos de 15x100 y se realizaron lecturas cada 2 h hasta alcanzar las 24 h de crecimiento. En glifos grises se muestra la cepa SmUNAM836 y en glifos vacíos la cepa Db10. El medio LB se indica con un círculo, DMEM con un cuadrado y M9 con un rombo.

En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos, donde se observó que todos los promotores fimbriales presentan niveles de luminiscencia. Sin embargo, los valores de actividad lumínica fueron variados entre los distintos promotores y el medio de cultivo. Por lo anterior, los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías, el cual mostró que existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.0001$) en la expresión de los operones de ambas cepas dependiendo del medio utilizado (Figura 6). Interesantemente, aún con niveles de crecimiento bajo (Figura 5), la actividad transcripcional de ambas cepas fue mayor bajo las condiciones limitantes provistas por el medio M9 (Figura 6). En las dos cepas analizadas, los promotores que tuvieron mayor actividad pertenecen al fimbrioma *core*: *fpo*, *fps* y *fgov*. Sin embargo, en la cepa SmUNAM836 la actividad se observó durante la fase exponencial y estacionaria. Adicionalmente, en la cepa SmUNAM836 el promotor de *fgoo* tuvo valores similares a los promotores antes mencionados (Figura 6). Por otro lado, la cepa Db10 presentó valores de expresión mayores durante la fase exponencial, los cuales se redujeron ligeramente al alcanzar la fase estacionaria (Figura 6). De los operones *core*, *fso* mostró una expresión 233 veces mayor en la cepa SmUNAM836 en comparación con la cepa Db10 en medio M9. En contraste, *fgfo* presentó una expresión 74 veces mayor en la cepa Db10 en medio M9. Cabe señalar que el promotor *fgfo* presentó una gran variabilidad. Un análisis comparativo de los componentes de estas regiones promotoras demuestra que los elementos que las componen no son compartidos, existiendo una pérdida de esta región en la cepa SmUNAM836. El sexto promotor de los operones fimbriales *core*,

fgft, se comportó de manera similar en ambas cepas, presentando los niveles de luminiscencia más bajos de todos los promotores (Figura 6).

Del resto de los promotores, en SmUNAM836 *fgof* y *fpt* tuvieron la mayor expresión en medio M9, mientras que *fao* y *fpv* tuvieron los valores más bajos. Mientras que en la cepa Db10 *fbt* fue el que presentó una mayor expresión durante la fase exponencial y estacionaria. En contraste, *fso* y *ncf6* tuvieron valores extremadamente bajos al alcanzar la fase estacionaria. Estos resultados sugieren que en *S. marcescens* existe una expresión simultánea y en diferente proporción de los distintos operones fimbriales codificados en cada cepa.

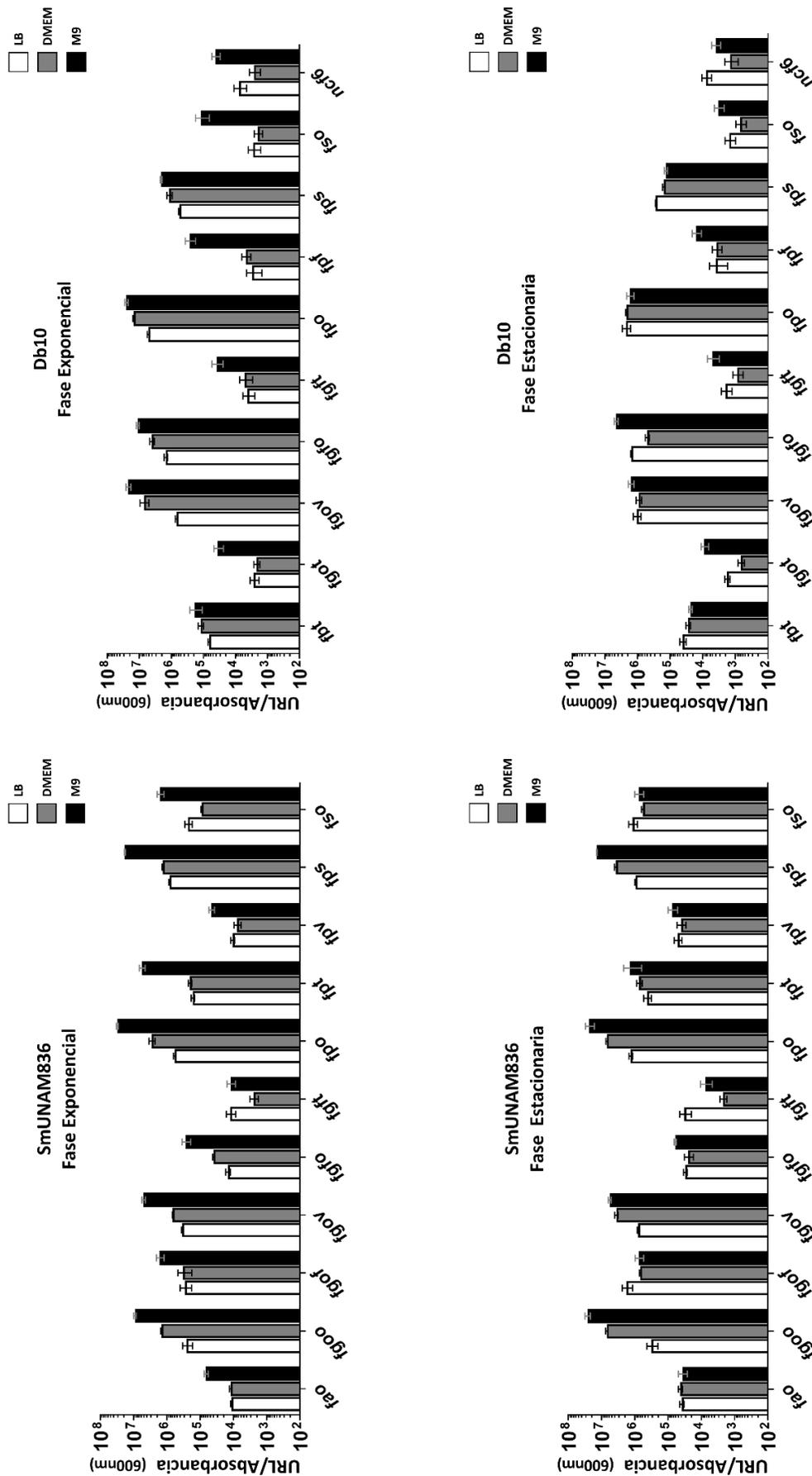


Figura 6. Expresión de promotores fimbriales de *S. marcescens* SmUNAM836 y Db10. Los valores se expresan como unidades relativas de luz sobre absorbancia (URL/Absorbancia). Las mediciones se realizaron durante la fase exponencial (6 h) o estacionaria (24 h).

6.3.- Mutagénesis de proteínas acomodadoras

De acuerdo con los resultados obtenidos de actividad transcripcional de los promotores fimbriales se seleccionaron los operones *fgoo*, *fgov* y *fps* para continuar caracterizándolos. Debido a que la proteína acomodadora es indispensable para el ensamblaje de las fimbrias CA se decidió substituir en *S. marcescens* SmUNAM836 el gen codificante de dicha proteína en los operones *fgoo*, *fgov* y *fps* por un gen casete de resistencia a kanamicina mediante el sistema de λ -Red.

La substitución de los genes correspondientes en las cepas resultantes SmUNAM836 Δ *fgooC*::*nptII*, SmUNAM836 Δ *fgovC*::*nptII* y SmUNAM836 Δ *fpoC*::*nptII* se confirmó mediante la amplificación de la región cromosómica de cada cepa (Figura 7).

Las cepas mutantes obtenidas fueron empleadas en ensayos fenotípicos.

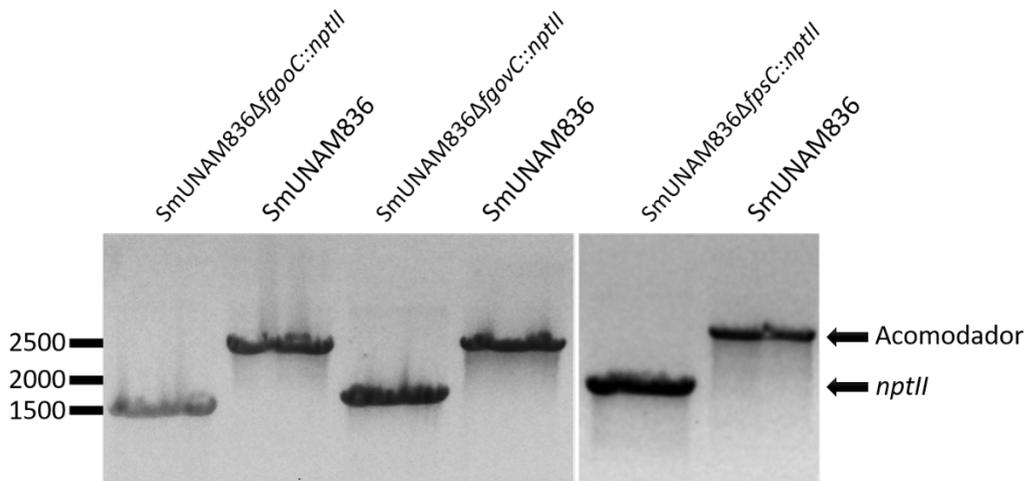


Figura 7. Mutación de los genes *fgooC*, *fgovC* y *fpsC* de *S. marcescens* SmUNAM836. Gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación por PCR de los genes *fgooC*, *fgovC* y *fpsC* en la cepa silvestre y su reemplazo por un casete de kanamicina en las cepas mutantes.

6.4.- Formación de biopelícula en medio líquido.

Las biopelículas en medio líquido (*pellicles* en inglés) también se denominan biopelículas AL (Aire-líquido) debido a que suelen formarse en dicha interfaz, en *S. marcescens* se desconocen los componentes que favorecen el desarrollo y maduración de esta estructura por lo que se evaluó la formación de biopelícula AL en las cepas de *S. marcescens* SmUNAM836, SmUNAM836 Δ fgooC::*nptII*, SmUNAM836 Δ fgovC::*nptII* y SmUNAM836 Δ fpoC::*nptII*. En cultivos líquidos de 24 h de crecimiento se evidenció la pérdida de la formación de biopelícula en las cepas SmUNAM836 Δ fgooC::*nptII*, SmUNAM836 Δ fgovC::*nptII* y SmUNAM836 Δ fpoC::*nptII* en comparación de la cepa parental (Figura 8).

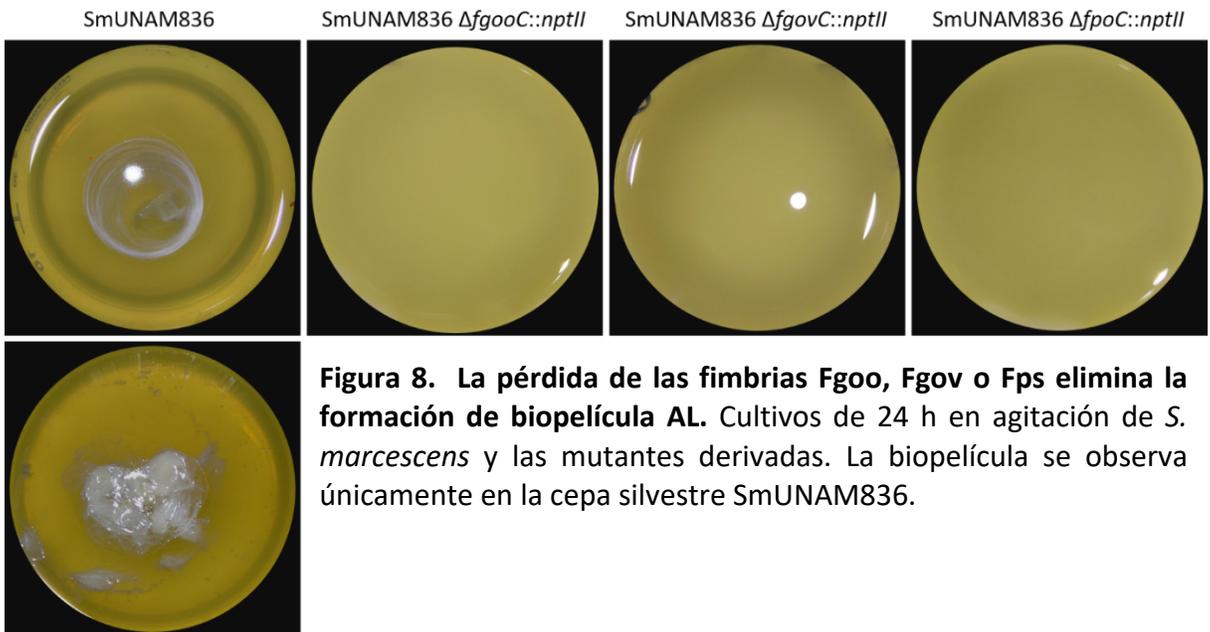


Figura 8. La pérdida de las fimbrias Fgoo, Fgov o Fps elimina la formación de biopelícula AL. Cultivos de 24 h en agitación de *S. marcescens* y las mutantes derivadas. La biopelícula se observa únicamente en la cepa silvestre SmUNAM836.

6.5.- Formación de biopelícula en poliestireno.

Generalmente las bacterias forman biopelículas más robustas al ser crecidas en medios ricos en nutrientes. En este trabajo se evaluó la capacidad de formar biopelícula de las cepas *SmUNAM836ΔfgooC::nptII*, *SmUNAM836ΔfgovC::nptII* y *SmUNAM836ΔfpoC::nptII*. Los resultados obtenidos indican que la eliminación de los genes *fgooC* y *fpsC* reduce un 31% y 56%, respectivamente la formación de biopelícula en comparación con la cepa parental. Además, la eliminación de *fgovC* causó una reducción del 86%, lo que sugiere que, de las fimbrias estudiadas, *fgovC* tiene un papel más importante durante la formación de biopelícula. Es importante observar que, aún con la ausencia de ciertas fimbrias, la cepa *SmUNAM836* conserva la capacidad de formar biopelícula. Lo anterior sugiere que este proceso requiere de múltiples componentes y que la pérdida de uno puede ser compensado por la presencia de otros determinantes de persistencia.

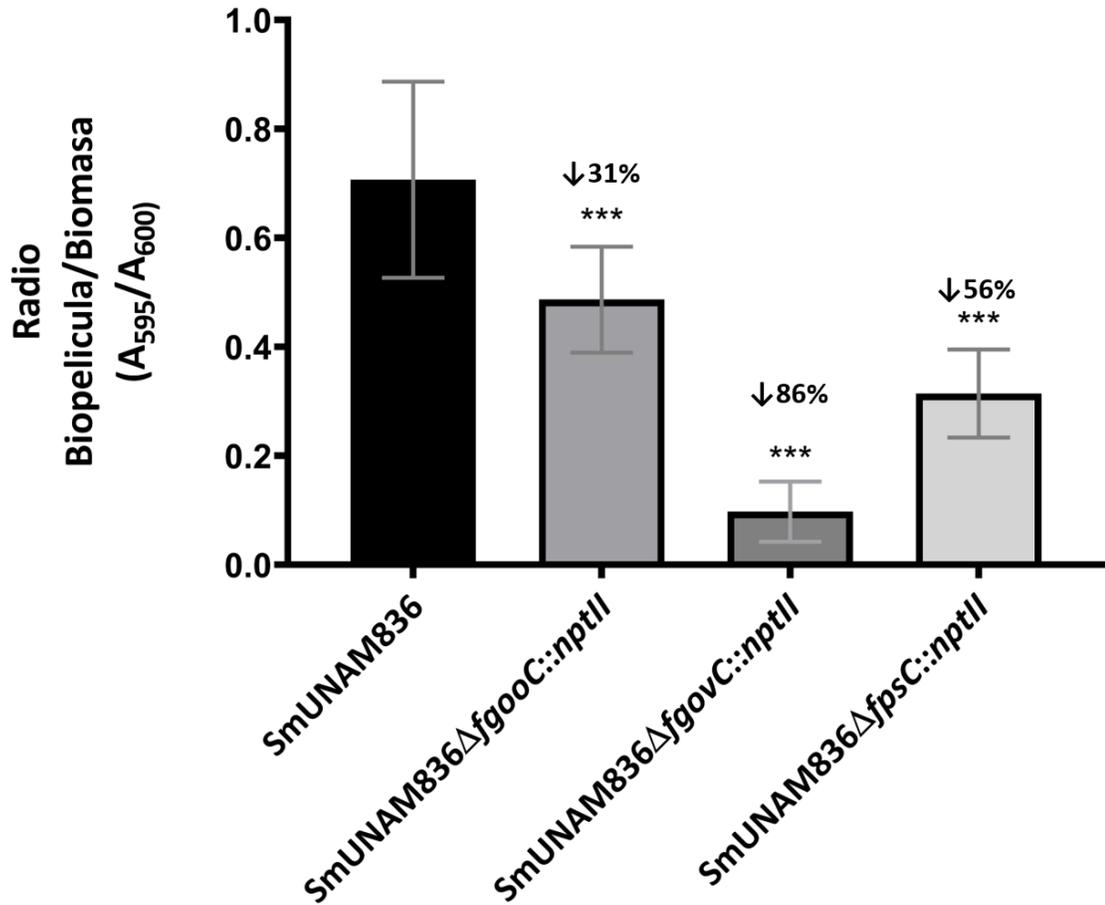


Figura 9. La ausencia de las fimbrias Fg_{oo}, Fg_{ov} y Fp_s altera la formación de biopelícula en poliestireno. Valores de absorbancia obtenidos mediante el método de tinción con cristal violeta. Los valores se normalizaron utilizando la absorbancia del cultivo. Los resultados de las cepas *SmUNAM836ΔfgooC::nptII*, *SmUNAM836ΔfgovC::nptII* y *SmUNAM836ΔfpsC::nptII* se compararon con la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 mediante *t*-student. ***: $p < 0.0001$

6.6.- Formación de biopelícula en borosilicato.

Para concluir el análisis de formación de biopelícula se analizó el desarrollo de esta estructura en borosilicato en medio LB, durante un periodo de incubación de 24 h con altos niveles de aireación. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10, donde se pueden observar las alteraciones en la formación de biopelícula de manera cualitativa y cuantitativa. Se determinó que la cepa *SmUNAM836ΔfgovC::nptII* fue la que tuvo una mayor reducción en la capacidad de formar biopelícula con una reducción del 51% ($p<0.05$) (Figura R9A). A esta le siguen las cepas *SmUNAM836ΔfgooC::nptII* con una reducción del 27% ($p=0.1$) y *SmUNAM836ΔfpsC::nptII* con un 32% de reducción ($p<0.05$) (Figura 10A). La biopelícula se formó de manera preferencial en la interfaz aire-agua y sobre la superficie del vidrio que se encontraba en dicha zona como se puede observar en la figura R9B. Sin embargo, el colorante también tiñó de manera leve toda la superficie del vidrio donde estuvo la bacteria, esto se observó mayormente en la cepa silvestre y en las mutantes *SmUNAM836ΔfgooC::nptII* y *SmUNAM836ΔfpsC::nptII* (Figura 10B).

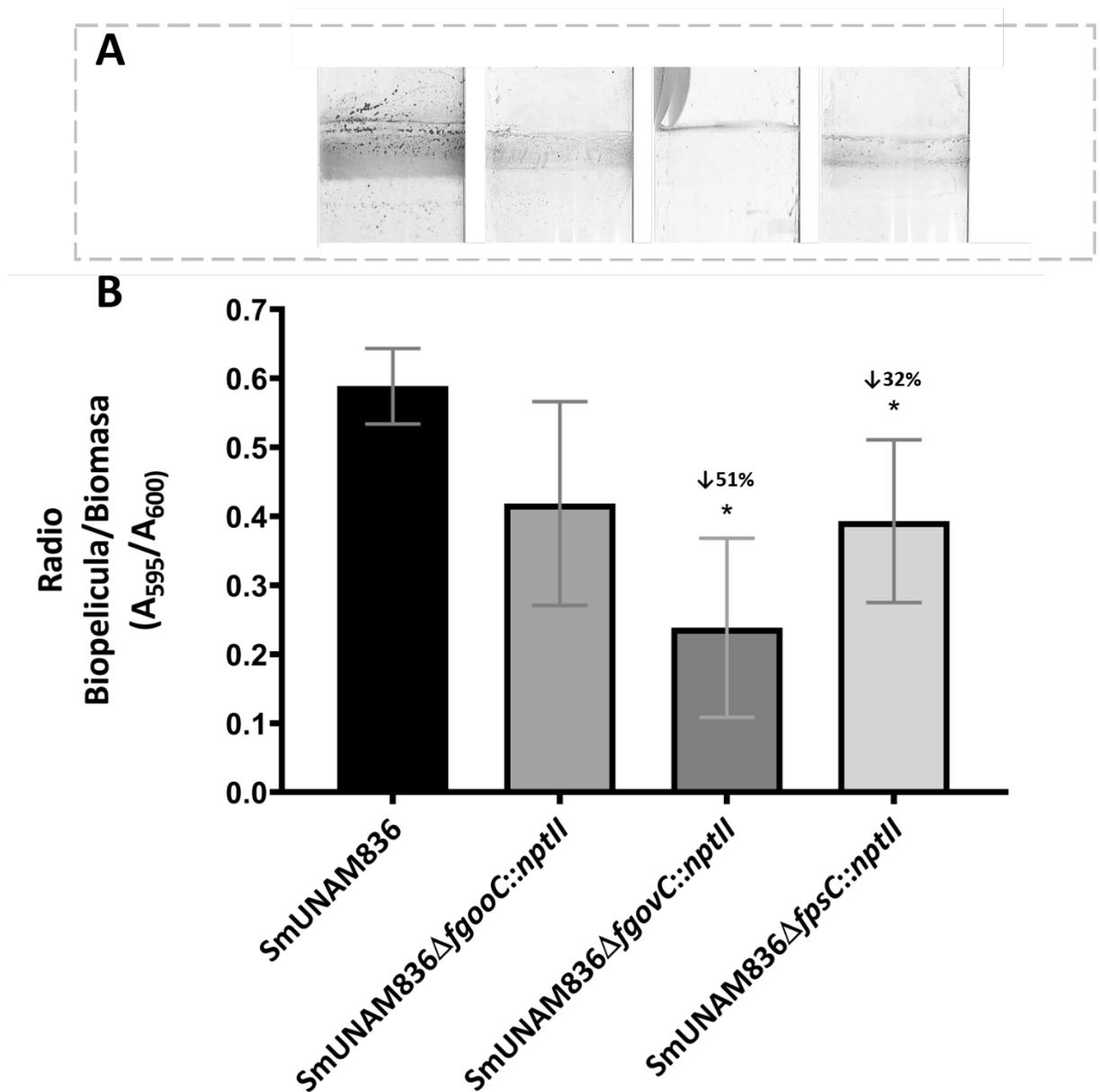


Figura 10. La eliminación de las fimbrias Fgov y Fps modifica la formación de biopelícula en borosilicato. A) Imágenes representativas de biopelícula formada sobre superficie de borosilicato teñida con cristal violeta 1%. Las imágenes corresponden a las cepas indicadas en la gráfica inferior. B) Absorbancia de cristal violeta solubilizado proveniente de las cepas analizadas. Los datos se compararon con la cepa silvestre mediante *t-student*. *: $p < 0.05$

6.7.- Movimiento tipo *swarming* de la cepa SmUNAM836 y mutantes isogénicas

El movimiento tipo *swarming* es un tipo de desplazamiento sobre superficies semisólidas descrito únicamente en firmicutes, alfa-proteobacterias y gamma-proteobacterias. Se evaluó este tipo de movimiento en medio M8 o BHI con una concentración de agar del 0.8%, en una cámara húmeda para evitar la desecación de la superficie. La cepa SmUNAM836 presentó un movimiento tipo *swarming* eficiente en medio M8 a las 24 h en comparación con el medio BHI (Figura 11). La cepa mutante en *fgoC* mantuvo un patrón de desplazamiento muy similar al de la cepa silvestre en medio M8, pero en medio BHI el movimiento fue marcadamente reducido a las 48 h (Figura 11). Mientras que la cepa SmUNAM836 Δ *fgoC::nptII*, tuvo una alteración en el patrón de desplazamiento a las 24 h en medio M8, con ausencia de anillos y ondulaciones en comparación de la cepa parental. En medio BHI, SmUNAM836 Δ *fgoC::nptII* presentó diferencias con la cepa silvestre a las 24 h, observándose alteraciones en el crecimiento radial. Sin embargo, a las 48 h observamos un aumento en crecimiento con la diferencia de que esta cepa presentaba anillos de consolidación evidentes, los cuales no están presentes en la cepa silvestre (Figura 11). Por último, la cepa SmUNAM836 Δ *fpsC::nptII* a las 24 h de incubación no presentó movilidad, manteniéndose como una colonia delimitada y redonda (Figura 11). Mientras que, a las 48 h, esta cepa parece recuperar en cierto grado la capacidad de realizar movimiento tipo *swarming*, pero en menor dimensión en comparación con la cepa SmUNAM836. La cepa SmUNAM836 Δ *fpsC::nptII* no logró desplazarse en ningún tiempo estudiado en medio BHI.

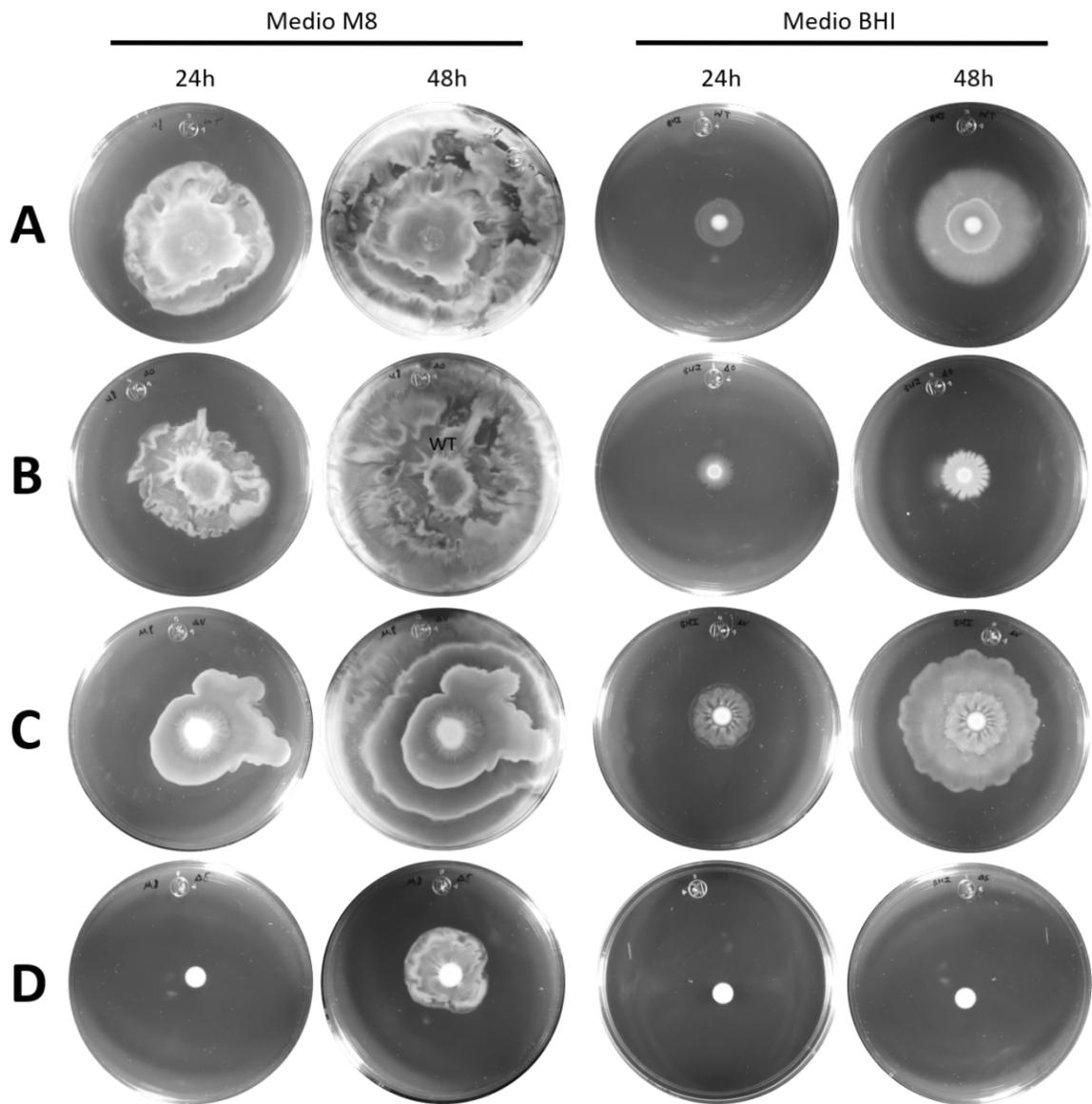


Figura 11. Movimiento tipo *swarming* de *S. marcescens* SmUNAM836 y mutantes isogénicas. Una gota de los cultivos se sembró en el centro de la placa y se incubaron a temperatura ambiente en cámara húmeda por 24h y 48 h. **A)** Cepa silvestre SmUNAM836. **B)** SmUNAM836 Δ *fgooC::nptII*. **C)** SmUNAM836 Δ *fgovC::nptII*. **D)** SmUNAM836 Δ *fpsC::nptII*.

6.8.- Agregación de levaduras

Para finalizar los análisis fenotípicos de las cepas *SmUNAM836ΔfgovC::nptII*, *SmUNAM836ΔfgooC::nptII* y *SmUNAM836ΔfpsC::nptII* se evaluó su capacidad de agregar levaduras del género *Saccharomyces*. El objetivo de este ensayo fue identificar si la cepa *SmUNAM836* y sus mutantes son capaces de interacción con moléculas de la pared celular de este organismo. Los resultados se muestran en la figura 12, la cepa *SmUNAM836* fue capaz de agregar aproximadamente el 80% de las levaduras, semejante a la cepa *SmUNAM836ΔfgooC::nptII*. Por otro lado, la cepa *SmUNAM836ΔfgovC::nptII* mostró una reducción del 71%, mientras que la cepa *SmUNAM836ΔfpsC::nptII* tuvo una reducción del 44%. Esto sugiere una posible interacción de las fimbrias *Fgov* y *Fps* con moléculas presentes en la pared celular de *S. cerevisiae*, como proteínas manosiladas u otros azúcares.

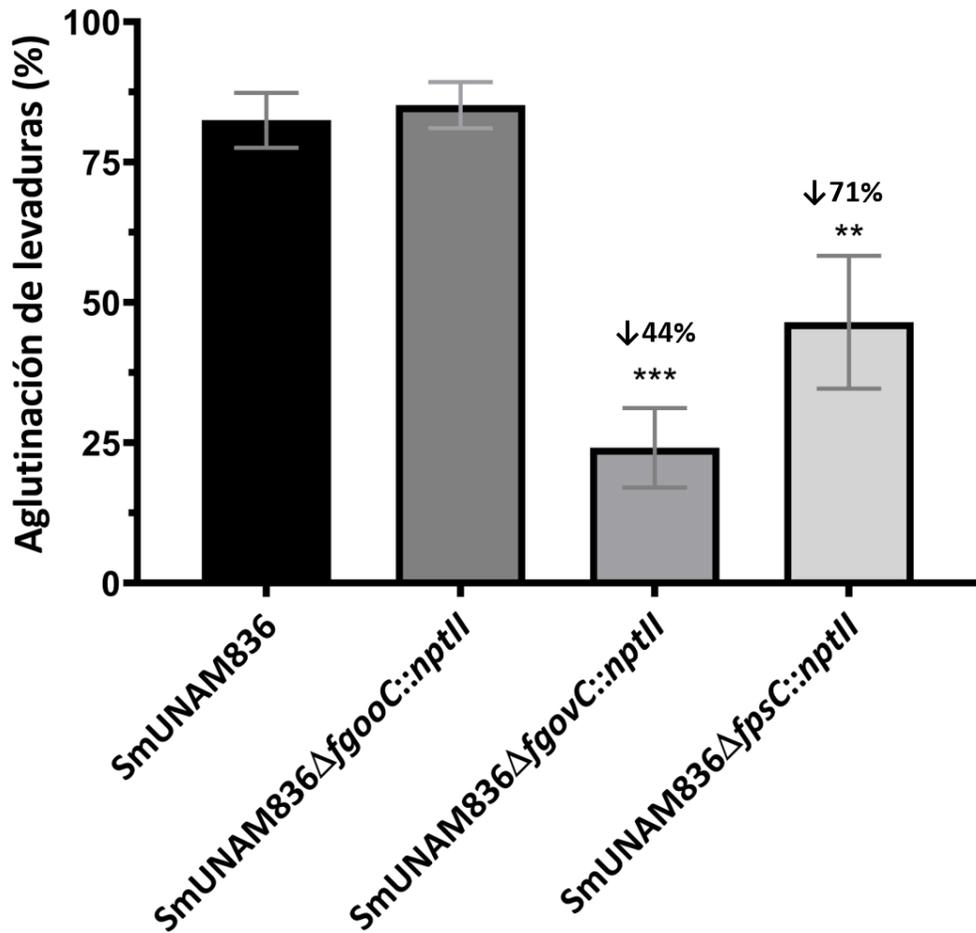


Figura 12. La mutagénesis de los genes *fgovC* y *fpsC* impacta en la capacidad de agregar levaduras. Células de *S. cerevisiae* se interaccionan con la cepa silvestre SmUNAM836 o las mutantes SmUNAM836Δ*fgovC*::nptII, SmUNAM836Δ*fgooC*::nptII o SmUNAM836Δ*fpsC*::nptII. El porcentaje de agregación se determinó como la absorbancia residual posterior a la sedimentación de la suspensión bacteria-levadura. Los valores de agregación se compraron con la cepa silvestre. **:p<0.005; ***:p<0.0001

6.9.- Adherencia de la cepa SmUNAM836 y mutantes isogénicas a células NCI-H460

El siguiente sustrato analizado fueron células de adenocarcinoma de pulmón obtenidas de lavado pleural. Estas células, denominadas NCI-H460 permitieron elucidar si la cepa SmUNAM836 era capaz de adherirse a este tejido y ver si la delección de los genes *fgooC*, *fgovC* o *fpsC* alteraba este fenotipo. Encontramos que la pérdida de las 3 fimbrias causaba una reducción en la adherencia (Figura 13). La reducción fue de 37% en la cepa SmUNAM836 Δ *fgooC::nptII*, 28% para la mutante SmUNAM836 Δ *fgovC::nptII* y del 17% para SmUNAM836 Δ *fpsC::nptII*. Sin embargo, esta reducción solo presentó significancia estadística para la cepa SmUNAM836 Δ *fgooC::nptII*. Esto permite sugerir que solo la fimbria Fgoo parece estar participando en la adherencia a células NCI-H460. Además, dado que solo observamos una atenuación leve en los valores de adherencia, es posible que otras adhesinas sean las responsables de la adherencia a esta línea celular.

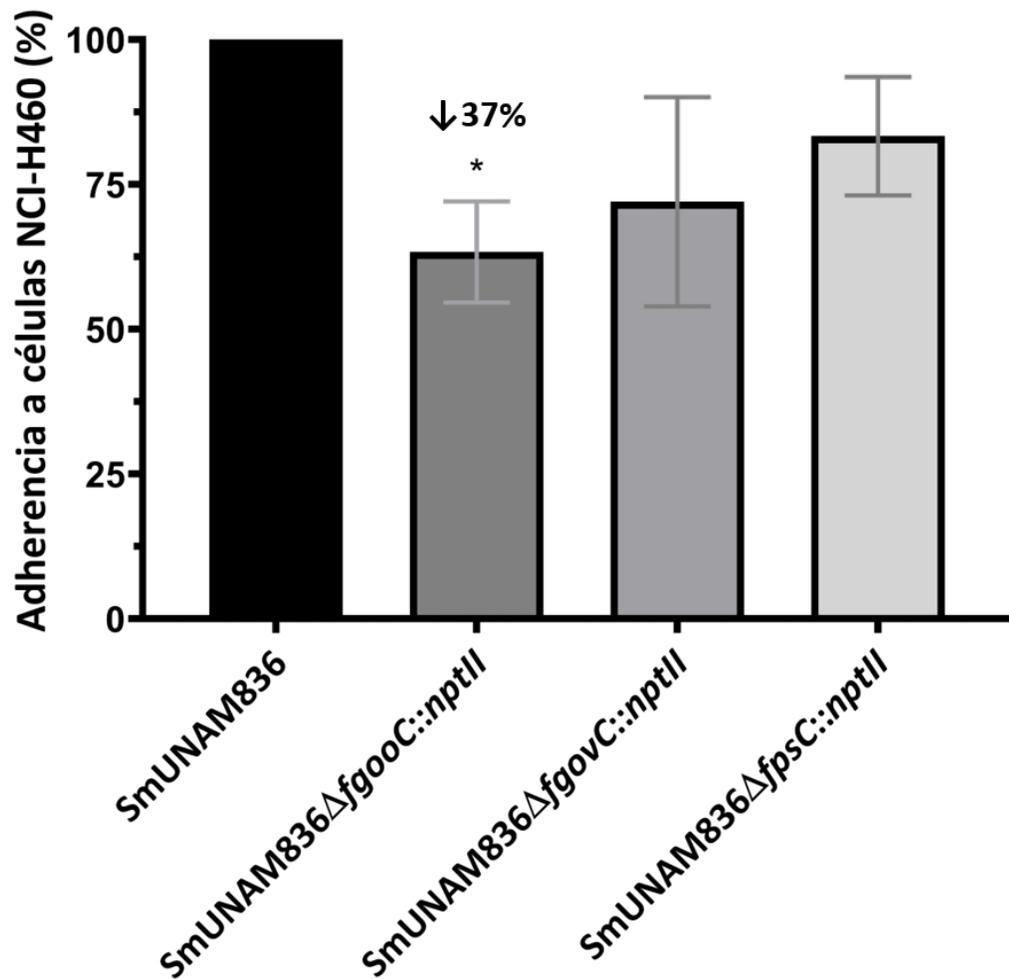


Figura 13. La fimbria Fgoo participa en la adherencia a células pulmonares NCI-H460. La monocapa celular se infectó con la cepa silvestre SmUNAM836 o con las mutantes SmUNAM836 Δ fgovC::nptII, SmUNAM836 Δ fgooC::nptII o SmUNAM836 Δ fpsC::nptII. Los niveles de adherencia se calculan utilizando como el 100% de adherencia a la cepa silvestre SmUNAM836. *:p<0.01

6.10.- Identificación de estructuras fimbriales mediante TEM

Se evaluó la presencia de estructuras fimbriales en *S. marcescens* SmUNAM836 cultivada en medio M9, condición que presentó la mayor expresión de promotores fimbriales. Esta evaluación se realizó utilizando 2 estrategias: la visualización de estructuras directamente en la célula bacteriana y concentrando las estructuras fimbriales mediante desprendimiento mecánico y ultracentrifugación.

Los primeros experimentos nos permitieron identificar que células de la cepa SmUNAM836, provenientes del mismo cultivo, se encuentran expresando estructuras con distinta morfología fimbrial (Figura 14). Sin embargo, se observó que algunas células solo expresaban un conjunto de fimbrias a la vez, por lo que es posible que la expresión de estas estructuras suceda de manera diferencial dependiendo de las condiciones de cultivo. Basándonos en la medición de su diámetro y en sus características de electrodensidad, rigidez y fragilidad, definimos 8 estructuras fimbriales.

La fimbria No.1 fue una abundante que se distribuía por toda la periferia de la célula, fue de estructura frágil, pues se hallaba fragmentada sobre la superficie de la bacteria y tenía un diámetro de 7 nm así como un filamento rígido. La fimbria No.2, fue hallada también en abundancia sobre la membrana bacteriana, de filamento flexible y delgado con un diámetro de 1 a 3 nm. Esta estructura se observó en conjunto con la fimbria No.3, la cual se presentó como un único filamento grueso y ligeramente flexible de 50 nm de diámetro

procedente de un polo de la bacteria. La Fimbria No. 4. presentó un filamento grueso flexible con un diámetro de 25 nm. Las fimbrias No. 5 y No. 6, ambas de filamentos flexibles y halladas de manera simultánea y abundante sobre la misma célula se observaron de longitud larga, pero con distinta electrodensidad. La Fimbria No. 5 fue marcadamente más electrodensa y tuvo diámetros de 3 a 4 nm. La Fimbria No. 6 fue ligeramente menos electrodensa con diámetros de 4 a 5 nm. La Fimbria No.7 se determinó con un diámetro similar a la Fimbria No.5, pero con mayor flexibilidad y se encontró en toda la superficie celular formando bucles de manera ocasional. La Fimbria No. 8 se determinó con un diámetro 3 a 5 nm y diferente al resto de las fimbrias descritas, estos filamentos se observaron formando pares. Esta fimbria aparenta ser una estructura frágil pues sus filamentos estaban fragmentados.

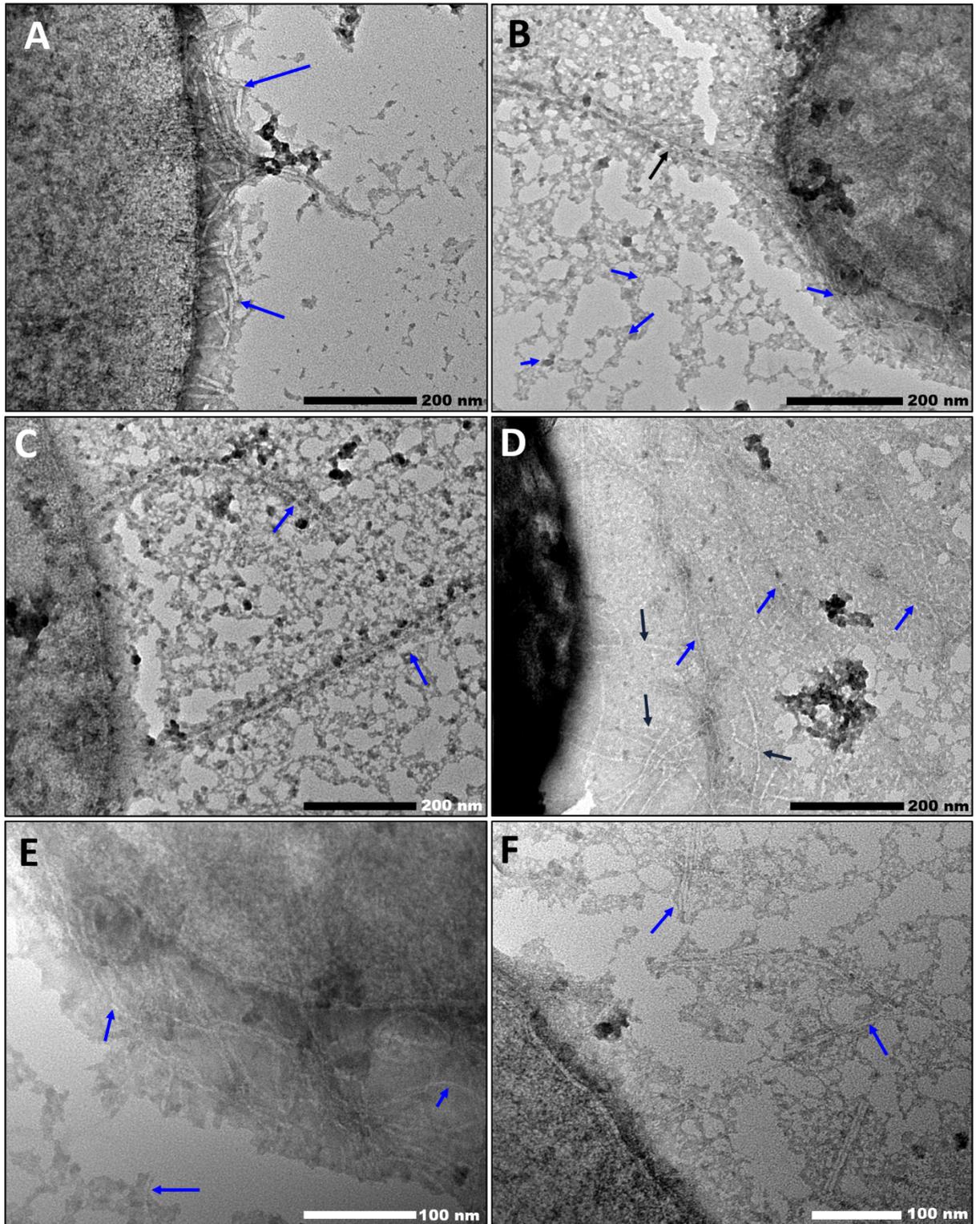


Figura 14. Fimbrias de la cepa SmUNAM836 visualizadas por TEM. A) Flechas azules indican fimbria No.1. **B)** Flecha negra señala Fimbria No.2 y flecha azul la fimbria No.3. **C)** Se indica la Fimbria No.4. **D)** Con flechas azules se marcan las Fimbrias No. 5 y con negras la No.6. **E)** Se señala la Fimbria No. 7. **F)** Las flechas indican la fimbria No.8.

De manera paralela, se analizaron las estructuras desprendidas por disrupción mecánica. Dado la imposibilidad de confirmar si los filamentos pertenecen a la misma fimbria, decidimos continuar con la numeración de estas estructuras. De esta manera en la figura 14 se puede observar a la fimbria No.9, la cual tuvo un diámetro de entre 18 y 23 nm, flexible y con una ligera tendencia a formar agregados. Dentro de la misma preparación fue posible observar un tipo de estructura más gruesa, flexible y muy electrodensa, a esta fimbria se le etiqueto como fimbria No.10 y presentó un diámetro de entre 45 y 55 nm. También se encontraba en el mismo campo otra estructura con un diámetro de entre 23 y 25 nm, denominada Fimbria No. 11. De manera similar a la fimbria No.9, ésta también forma agregados, pero en mayor proporción, y con la diferencia de ser marcadamente menos electrodensa. Por último, la fimbria No. 12, con un diámetro de entre 10 y 15 nm onduladas, flexibles e individuales. Debido a la falta de marcaje específico y a que la cepa SmUNAM836 codifica solo 11 fimbrias CA, es posible que estemos considerando una fimbria como dos estructuras diferentes o alguno de los filamentos más gruesos pertenezcan a una fimbria tipo IV. Este resultado demuestra que la cepa SmUNAM836 está expresando y sintetizando de manera simultánea múltiples estructuras fimbriales con características diferentes.

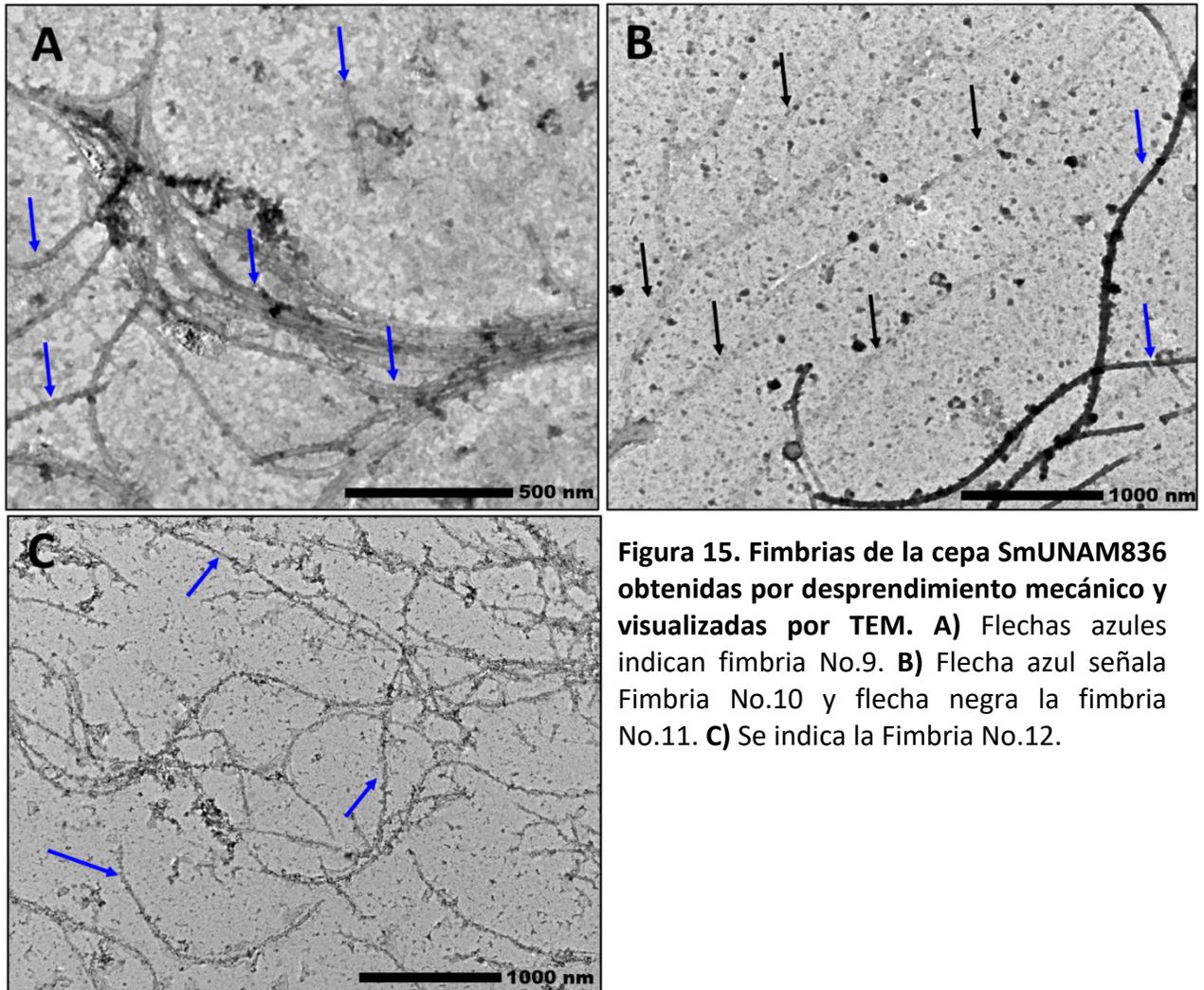


Figura 15. Fimbrias de la cepa SmUNAM836 obtenidas por desprendimiento mecánico y visualizadas por TEM. A) Flechas azules indican fimbria No.9. B) Flecha azul señala Fimbria No.10 y flecha negra la fimbria No.11. C) Se indica la Fimbria No.12.

7. DISCUSIÓN

7.1.-Descripción del fimbrioma de *S. marcescens*

La adherencia, colonización de superficies y formación de biopelícula son eventos indispensables para el establecimiento de un microorganismo en un nicho ecológico. Estos procesos dependen de varios tipos de moléculas, entre ellas las adhesinas. Las fimbrias tipo CA se encuentran entre las adhesinas más estudiadas y mayormente distribuidas a lo largo de los diversos filos bacterianos. Estas estructuras son apéndices de superficie que son capaces de participar en una amplio rango de procesos. Recientemente, la búsqueda del repertorio de fimbrias asociadas a diferentes especies bacterianas ha evidenciado una amplia variedad de fimbrias codificadas en los genomas procariontes. Además, la importancia de estos estudios se acentúa debido al papel de estos apéndices en la patogénesis de algunos microorganismos, como *E. coli*, *Salmonella* o *P. mirabilis* [148–150]. Debido a que se desconocía el repertorio de fimbrias de *S. marcescens* en este trabajo se realizó un análisis exhaustivo para definir su fimbrioma y se asignó una nomenclatura sistemática a cada una de las fimbrias identificadas en su genoma.

Nuestros resultados indican que el repertorio fimbrial de *S. marcescens* comprende 20 operones fimbriales tipo CA conservados y 17 no conservados, semejante a lo descrito para *E. coli* (38 operones CA) y *Salmonella* (36 operones CA) [148, 151]. Debido a que seis operones conservados (*fgoo*, *fgov*, *fgfo*, *fgft*, *fpo*, *fps* y *fso*) se encontraron de manera ubicua en >94% de los genomas analizados, éstos se denominaron operones centrales o *core*. De acuerdo a lo anterior, también se han descrito 7 operones centrales en *Salmonella* (*bcf*, *fim*, *saf*, *stb*, *std*, *sti* y *sth*) [149, 151], y en *E. coli* (Tipo 1, F9, Mat, Yad, Ybg, Yeh y Yfc) [148]. La presencia de un fimbrioma central en estas especies, así como en *S. marcescens*, sugiere que estas estructuras participan en procesos fisiológicos importantes. Además del fimbrioma conservado, se encontraron operones *ncf* con una baja distribución entre los genomas analizados. Debido al contexto genético de los operones *ncf*, es posible que éstos hayan sido adquiridos mediante transferencia horizontal. En ese sentido, algunos estudios han reportado que *S. marcescens* posee un gran número de genes accesorios, lo que indica una gran plasticidad genómica [17–20]. La adquisición de operones fimbriales exógenos podría favorecer la colonización y persistencia en nichos ecológicos donde existe competencia con otros microorganismos.

En *S. marcescens* existen pocos estudios de las fimbrias tipo CA. La única fimbria de este organismo que ha sido estudiada es *Fgov* (originalmente denominada *Fim*). Esta fimbria se ha asociado con adherencia a células de córnea HCE, aglutinación de levaduras y producción de biopelícula [45, 51]. Filogenéticamente *Fgov* se encuentra relacionada con *Etf* de *Edwardsiella tarda*, fimbria involucrada en hemaglutinación resistente a manosa

[152] y con distribución restringida a cepas ictiopatógenas [153]. Ya que Fgov se distribuye de manera ubicua en las diferentes cepas de *S. marcescens* es probable que contribuya en procesos necesarios para la bacteria, como la adherencia a superficies o la agregación entre bacterias. Esta idea es apoyada por nuestros resultados, los cuales muestran que la actividad transcripcional del promotor de *fgov* en las cepas SmUNAM836 y Db10 es alta durante el crecimiento en aeración independientemente del medio de cultivo utilizado y que la pérdida de Fgov impacta en la adherencia a superficies abióticas en la cepa SmUNAM836. Este resultado también concuerda con lo reportado por Shanks y colaboradores, quienes observaron que la activación del promotor *fgov* (*fim*) era regulada de manera positiva por el regulador OxyR [51].

Por otra parte, la actividad transcripcional del promotor de *fgfo* presentó gran variación entre las cepas SmUNAM836 y Db10. De acuerdo con esto, la actividad lumínica del promotor *fgfo*_{Db10} presentó 41 veces más actividad que *fgfo*_{SmUNAM836} en fase logarítmica y 72 veces más actividad en fase estacionaria. Un análisis comparativo de las regiones promotoras de esta fimbria demostró que el promotor *fgfo*_{Db10} presenta dos cajas -10 y -35 mientras que el promotor de *fgfo*_{SmUNAM836} solo posee una. Además, río arriba de la región promotora de *fgfo*_{SmUNAM836} se encuentra codificada una proteína con dominios de hélice-giro-hélice, la cual está ausente en *fgfo*_{Db10}. Las proteínas con dominios hélice-giro-hélice están asociadas a unión del DNA y regulación transcripcional. La presencia de reguladores fimbriales río arriba de los genes estructurales se ha observado previamente en las fimbria P de *E. coli* y Sde de *Salmonella* [151, 154]. Estas variaciones en las regiones promotoras probablemente son la causa de las diferencias observadas entre las cepas

evaluadas. Sin embargo, se necesitan más estudios para conocer cuál de estos operones es el que posee una región promotora alterada.

La fimbria Fgft, aunque forma parte del fimbrioma *core*, presentó valores de expresión bajos en ambas cepas. Es posible que este operón se exprese bajo condiciones particulares y/o que participe en procesos específicos. Este comportamiento se ha observado previamente en las fimbrias Fim (γ_1) y Stb (γ_4), las cuales forman parte del fimbrioma *core* de *S. enterica* [155]. Estas estructuras tienen una expresión baja *in vitro*, sin embargo, la pérdida de la fimbria Fim reduce la capacidad de la bacteria de adherirse e invadir células epiteliales, mientras que la ausencia de Stb ocasiona un incremento en el número de bacterias fagocitadas [155]. Por otro lado, el análisis filogenético de proteínas acomodadoras relaciona a Fgft con la fimbria CupB de *P. aeruginosa*, que en conjunto con CupC son responsables del desarrollo de microcolonias y de la formación de biopelícula [105]. La regulación de estas fimbrias está íntimamente regulada por el sistema de dos componentes Roc1. Por lo que un sistema regulatorio semejante pudiera participar en la expresión de *fgft*.

Formando parte del genoma *core* de *S. marcescens* están también *fpo* y *fps*, dos operones de la familia π . En este trabajo encontramos que los operones fimbriales de esta familia están altamente distribuidos en los genomas de *S. marcescens*, lo que sugiere una contribución importante en la fisiología de este microorganismo. Los promotores de Fpo y Fps se ubicaron entre los que tuvieron la mayor actividad en la cepa SmUNAM836 y Db10. El comportamiento de *fpo* fue similar para ambas cepas, mientras que la actividad del promotor de Fps fue mayor en SmUNAM836. Algunas fimbrias π se

han asociado con procesos patogénicos como la Fimbria P y MR/P, las cuales participan en la infección a tracto urinario y el desarrollo de pielonefritis [156–158]. Desafortunadamente, Fpo y Fps no presentan similitud con ninguna fimbria de la familia π descrita hasta el momento. Esto podría deberse a que las fimbrias π de *S. marcescens* posean papeles muy especializados tal y como es el caso de las fimbrias MR/P y PMF de *P. mirabilis* que participan en la colonización de riñón y vejiga [115].

El operón *fso* pertenece a la familia σ y es el sexto y último de los operones *core* de *S. marcescens*. Las fimbrias σ son consideradas organelos ancestrales cuya distribución se extiende a diversos filos bacterianos [76], se caracterizan por poseer una región de reconocimiento de ligando compuesta por bucles en forma de dedos [159]. A pesar de su amplia distribución, los operones fimbriales σ no son comunes en especies de la familia *Enterobacteriaceae* [76, 148, 151]. Sin embargo, *fso* estuvo presente en todos los genomas de *S. marcescens* analizados, encontrándose una copia adicional de este operón en la cepa B3R3. Interesantemente, los ensayos transcripcionales demostraron que existen diferencias importantes en la expresión de estos promotores en las cepas analizadas, existiendo una mayor actividad en la cepa SmUNAM836. A la fecha se conoce muy poco sobre los procesos en los que participan las fimbrias σ . En *Acinetobacter baumannii* se ha descrito que la fimbria Csu juega un papel indispensable en la formación de biopelícula sobre superficies abióticas [117]. La baja actividad de *fso* observados en la cepa Db10 podrían derivar de la necesidad de condiciones específicas para su expresión. Algo similar a lo que sucede en *S. arizonae*, en donde la expresión de su fimbria σ

requiere de bajas temperaturas, lo que le permite interactuar con receptores intestinales en hospederos de sangre fría [151].

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad transcripcional sugieren que algunas fimbrias tipo CA de *S. marcescens* cumple funciones fisiológicas esenciales, pues su expresión es constante en las cepas estudiadas y bajo distintas condiciones nutricionales. Sin embargo, el resto de las fimbrias que tuvieron una baja expresión podrían estar relacionadas con la colonización de nichos específicos y condiciones particulares para su expresión. Esto concuerda con la variación fenotípica que presentan algunos aislados de *S. marcescens* en distintos procesos, por ejemplo en la agregación de levaduras [138].

Parte fundamental de este trabajo fue evaluar los procesos en los que están involucradas las fimbrias de *S. marcescens* con mayor actividad transcripcional. Por lo que se decidió eliminar el gen codificante de la proteína acomodadora de los operones *fgoo*, *fgov*, *fpo* y *fps* de la cepa SmUNAM836. Sin embargo, la mutagénesis de *fpoC* no se consiguió posterior a la realización de distintos métodos por lo que se descartó de los experimentos posteriores.

7.2.-Las fimbrias Fg_{oo}, Fg_{ov} y Fp_s participan en la formación de biopelícula en superficies abióticas sólidas y líquidas

La biopelícula es una estructura de resistencia cuya formación requiere, en algunos, la presencia de fimbrias [53]. Existe evidencia de que la biopelícula bacteriana se puede formar sobre diversos sustratos abióticos sólidos y líquidos [160]. En el área clínica gran parte del material médico, como catéteres y tubos endotraqueales, están conformados por matrices de polímeros plásticos [161]. De manera similar, los contenedores de soluciones suelen ser plásticos o borosilicato (BS). El material de estos objetos posee diferentes grados de hidrofobicidad el cual se ha observado influye en la capacidad de un microorganismo para adherirse a dicha superficie [162–165]. Sin embargo, no existe un consenso definitivo sobre el efecto de esta propiedad física en la adherencia y formación de biopelícula a superficies hidrofóbicas [161]. En *S. marcescens* se ha estudiado previamente la formación de biopelícula en superficies plásticas hidrofóbicas como el poliestireno (PS) y el cloruro de polivinilo (PVC) [39, 43, 51]. Se ha encontrado que este microorganismo puede formar biopelícula de manera eficiente en estas superficies y que la presencia de la fimbria Fg_{ov} es necesaria para el correcto desarrollo de esta estructura. Además, la formación de biopelícula es controlada de manera positiva por el sistema de dos componentes RssAB [39] y mediante QS a través de los sistemas SwrI/SwrR y Smal/SmaR [44, 45, 47]. En este trabajo, durante el cultivo rutinario, observamos que la formación de biopelícula en la cepa SmUNAM836 era mucho más robusta en condiciones con altos niveles de aeración. Estas condiciones

presentaban altas fuerzas de desprendimiento, las cuales no afectaron la formación de esta estructura. Esto se debe en parte a que la formación de biopelícula está controlada por el regulador de respuesta al estrés oxidativo OxyR, cuya activación se favorece bajo condiciones de aireación. En *S. marcescens* la fimbria Fgov es un componente importante de en la formación de biopelícula y su expresión es inducida por OxyR [51]. La mutante SmUNAM836 Δ fgovC::nptII presentó una reducción del 86% en la formación de biopelícula en PS de manera similar a lo reportado por otros autores [45, 51, 60]. Además, esta mutante presentó una reducción del 51% en la capacidad de formar biopelícula en BS. Esto difiere levemente a lo reportado por Kalivoda y colaboradores, los cuales encontraron que la pérdida de *fimC* (*fgovC*) en la cepa CMS376 eliminaba por completo la formación de biopelícula en BS [137]. La discrepancia anterior se puede deber a que en el genoma de la cepa CMS376 no estén codificadas otras fimbrias (como Fgoo), que compensen la formación de biopelícula en ausencia de Fgov. Las fimbrias Fgoo y Fps no han sido estudiadas previamente por otros grupos de trabajo. Los resultados obtenidos de la cepa SmUNAM836 Δ fgooC::nptII demuestran que la pérdida de esta estructura reduce en un 31% la capacidad de producir biopelícula en PS. En BS, dicha mutante presentó menor cantidad de biopelícula, pero esta reducción no tuvo significancia estadística. Por último, la mutante SmUNAM836 Δ fgooC::nptII tuvo alteraciones en la capacidad de formar biopelícula en PS, reducción del 56%, así como en BS, con una reducción del 32%. Los resultados obtenidos de estos ensayos sugieren que la fimbria Fgoo, Fgov y Fps están participando en la adherencia y formación de biopelícula sobre PS y probablemente sobre otras superficies hidrofóbicas. Esto sugeriría

que estas estructuras podrían participar en la colonización de material médico hecho de polímeros plásticos hidrofóbicos. Por otro lado, solo Fgov y Fps fueron importantes en la formación de biopelícula en BS. El hecho de que más de una estructura fimbrial participe en la formación de biopelícula en la cepa de *S. marcescens* SmUNAM836 contrasta con lo observado en *K. pneumoniae*, donde las fimbrias tipo 3 (Mrk) son el principal componente requerido para la formación de biopelícula. Además, ejercen una regulación indirecta sobre las fimbrias tipo 1 polarizando la bacteria hacia un fenotipo en donde estas estructuras no se están expresando [166].

El género *Serratia* tiene una relación filogenética estrecha con el género *Yersinia*. Diversos operones fimbriales se han asociado con la formación de biopelícula en *Y. pestis*. Esto se ha describió al movilizar los operones codificantes de fimbrias *y0561-0563*, *y1858-1862* y *y0348-0352*, a una cepa de *E. coli* no fimbriada y no productora de biopelícula. El operón *y0561-0563* fue el que permitió a *E. coli* desarrollar la biopelícula más robusta a 28°C, seguido de los operones *y1858-1862* y *y0348-0352*. Mientras que, a 37°C, los operones que tuvieron una mayor influencia en la formación de biopelícula fueron *y0561-0563* y *y3478-3480*. Esto concuerda con nuestros resultados en los cuales más de una fimbria tipo CA está involucrada en la formación de biopelícula de *S. marcescens*.

Para concluir el estudio de biopelícula en superficies sólidas, la cepa SmUNAM836 y las mutantes isogénicas presentaron patrones de formación de biopelícula similares en PS y BS, dos materiales con distintos grados de hidrofobicidad [162, 167]. Esto sugiere que la hidrofobicidad del sustrato no influyó en la capacidad de formar esta biopelícula en estos ensayos. Lo anterior podría deberse a que *S. marcescens* tiene la capacidad de secretar surfactantes, como la Serrawetina, que modifican de la hidrofobicidad de superficies, permitiendo a la bacteria realizar movimiento tipo *swarming* y posteriormente de formar biopelícula [168, 169]. Este hecho es relevante, pues prevendría que las estrategias que involucran la modificación de la hidrofobicidad de superficies para combatir la formación de biopelícula sobre material médico no funcionen por completo para *S. marcescens* [161, 170].

Nuestro trabajo también analizó la formación de biopelícula AL en la cepa SmUNAM836, un fenotipo que no se ha reportado previamente en *S. marcescens*. Observamos que el cultivo rutinario en LB permitía a la cepa SmUNAM836 formar biopelícula en la interfaz aire-agua de manera consistente; a diferencia de los medios DMEM y M9. La formación de biopelícula suele asociarse a factores nutricionales, en *S. enterica* Typhimurium y Enteritidis se ha observado que dichas bacterias forman biopelícula AL en medios ricos en nutrientes pero no en medio mínimo [171, 172]. En *Salmonella*, la capacidad de formar biopelícula AL depende en gran medida de fimbrias curli, organelos no descritos hasta el momento en *S. marcescens* [171]. También, encontramos que la biopelícula AL de la cepa SmUNAM836 difiere en tamaño, estabilidad y densidad al compararla con la

de otros organismos como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*, *A. baumannii* o *Shewanella oneidensis* [173–176]. La formación de biopelícula AL robusta se ha asociado con una matriz extracelular rica en celulosa como es el caso de *A. baumannii* y *Pseudomonas* [176, 177]. Hasta el momento no se ha descrito la presencia de estos genes en *S. marcescens*, por lo que la ausencia de estos genes o una baja expresión, podrían explicar la diferencia en el fenotipo de la biopelícula AL. Por otro lado, un estudio de la composición de la biopelícula AL de *A. baumannii*, demostró la presencia de proteínas fimbriales de tres operones tipo CA [176]. Una de estas fimbrias era Csu, de la familia σ , una estructura que en *A. baumannii* es esencial para la formación de biopelícula [159], así como A1S_2088-2091 y A1S_1510-1507 (también llamado F-17) [176]. El operón F-17 se ha asociado previamente con la formación de biopelícula pues se encuentra sobreexpresado en bacterias que están dentro de la matriz y su pérdida afecta la formación de biopelícula [178]. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, demostraron que la pérdida de Fgoo, Fgov o Fps, eliminan por completo la formación de biopelícula AL en la cepa SmUNAM836. Esto concuerda con lo mencionado anteriormente para *A. baumannii*, en donde la formación de biopelícula AL se altera con la pérdida de alguno de sus componentes.

7.3.-La mutación de los genes *fgooC*, *fgovC* y *fpsC* modifica el patrón de *swarming* en *S. marcescens* SmUNAM836

El movimiento sobre superficies semisólidas o tipo *swarming* se ha asociado con la expresión de factores de virulencia y persistencia [179, 180]. En cepas de *S. marcescens*, este fenómeno ha sido estudiado por diversos autores [51, 168, 181, 182]. El patrón de *swarming* de *S. marcescens* es muy diferente al desplazamiento “clásico” de *Proteus* el cual consiste de múltiples anillos de consolidación [179]. En el caso de *S. marcescens* su migración inicia a través de anillos de consolidación que, a medida que el cultivo envejece, son reemplazadas por zonas de crecimiento en forma de ondulaciones [181, 183]. Otras variaciones descritas en cepas de *S. marcescens* consisten en prolongaciones en lugar de anillos [51, 183]. En *S. marcescens* se sabe que el *swarming* es regulado por QS, que depende de la producción de flagelo y surfactantes (denominados serrawetinas) [5, 33, 182]. Además, se sugiere que la escases de nutrientes lo promueven [179, 184, 185]. En este trabajo se describe por primera vez el patrón de *swarming* de la cepa SmUNAM836 en medio mínimo M8 y en medio enriquecido BHI. La mayor motilidad se observó en medio M8 donde a las 24 h presentó un patrón de ondulaciones sin anillos de consolidación marcados. Patrón semejante al reportado para las cepas de *S. marcescens* MG1, 274, y PIC-3611 [181–183]. A las 48 h en medio M8, la cepa SmUNAM836 continuó desplazándose hasta cubrir por completo la placa. En contraste, en medio BHI sólo se desplazó la mitad de la longitud, pudiéndose observar un anillo de consolidación. Esto es similar a lo reportado por Shanks y colaboradores para la cepa

pigmentada *S. marcescens*-D al crecer en medio LB [51]. Estos resultados sugieren que semejante a *Proteus* [184] la composición del medio influye en el movimiento tipo *swarming* de *S. marcescens*. Al analizar la capacidad de las cepas SmUNAM836 Δ *fgooC::nptII*, SmUNAM836 Δ *fgovC::nptII* y SmUNAM836 Δ *fpsC::nptII* de realizar movimiento tipo *swarming* se observó que en medio M8 la pérdida de la fimbria Fgov favorece la aparición de anillos de consolidación mientras que la ausencia de Fps previene la motilidad tipo *swarming* hasta las 48 h. Por otra parte, en medio BHI las cepas mutantes presentaron alteraciones en el desplazamiento en comparación con la cepa parental. En particular, la cepa SmUNAM836 Δ *fpsC::nptII* perdió la motilidad tipo *swarming*. No obstante las estructuras fimbriales no suelen contribuir en el movimiento tipo *swarming*, en *E. coli* K12 se ha descrito que la eliminación de *fimA* deriva en un menor número de flagelos en su superficie y reduce drásticamente el *swarming* [186].

Por otra parte, en *Salmonella* y *P. mirabilis* se ha descrito una relación inversa en la expresión de algunos operones fimbriales y genes flagelares, pues la sobreexpresión de FimZ y MrpJ, respectivamente, favorece un fenotipo hiperfimbirado que eliminó el nado mediado por flagelo [187, 188]. En este sentido, FimZ es un activador transcripcional que favorece la expresión de la fimbria tipo 1, a la vez que ocasiona la represión de genes flagelares de clase 1 (*flhDC*) y la biogénesis del flagelo [187]. Lo anterior abre la posibilidad de que las cepas mutantes de *S. marcescens* analizadas presenten diferencias con la cepa silvestre en los patrones de expresión de genes fimbriales, incluyendo reguladores transcripcionales. Por ejemplo el operón *fps* de la cepa SmUNAM836

codifica un regulador transcripcional tipo Lux, por lo que el fenotipo observado en SmUNAM836 Δ *fpsC::nptII* puede ser consecuencia de un efecto polar sobre dicho gen.

Esto cobra importancia al tomar en cuenta que en *S. marcescens* se encuentran expresados de manera simultánea y diferencial varios operones fimbriales como *fgfo*, *fgft*, *fpo*, *fps* o *fso*, los cuales poseen reguladores tipo LuxR, LysR o con dominio de hélice-giro-hélice. Los operones *lux* están asociados a la regulación de QS y es se ha observado previamente que el QS es responsable del fenotipo de swarming en *S. marcescens* [189, 190]. La evidencia aquí mostrada indica la necesidad de estudiar el papel de los operones fimbriales de *S. marcescens* en diversos procesos.

7.4.- Adherencia de *S. marcescens* SmUNAM836 Δ fgooC::nptII , SmUNAM836 Δ fgovC::nptII y SmUNAM836 Δ fpsC::nptII a sustratos bióticos

Algunas fimbrias además de interactuar con sustratos abióticos también pueden mediar a adherencia a otros organismos y a tejidos. Los ensayos de agregación de levaduras se han usado desde hace décadas para evaluar la presencia de fimbrias sensibles a manosa [85, 191, 192]. Identificamos que en la cepa SmUNAM836 Δ fgovC::nptII se reduce drásticamente la capacidad de agregar levaduras, dicho resultado concuerda con lo reportado previamente para una cepa *S. marcescens*-D Δ fimA (Δ fgovA) [51], indicando que esta fimbria es importante para este fenotipo independientemente de la cepa estudiada. Por otro lado, la cepa SmUNAM836 Δ fpsC::nptII presentó una reducción moderada. Los resultados anteriores sugieren que Fgov tiene una mayor afinidad que Fps a componentes de la pared celular de las levaduras, tales como manoproteínas, los cuales son moléculas manosiladas. Esto es relevante pues múltiples tejidos en el humano presentan receptores o moléculas manosiladas como la uroplaquina, por lo que podrían facilitar la colonización de *S. marcescens* [193].

Por otra parte, la adherencia a líneas celulares permite indagar más específicamente en la capacidad de un microorganismo para colonizar un tejido particular. Se ha demostrado que *S. marcescens* tiene la capacidad de adherirse a diversas líneas celulares inmortalizadas como HCE (cornea), RT112 (vejiga), HEP-2 (laringe) y CHO (ovario de hamster) [38, 45, 194]. En este trabajo analizamos la adherencia de las cepas isogénicas SmUNAM836 Δ fgooC::nptII, SmUNAM836 Δ fgovC::nptII, SmUNAM836 Δ fpsC::nptII y la

cepa parental a la línea celular de pulmón NCI-H460, un sustrato no analizado previamente. Los resultados obtenidos demostraron que la pérdida de las 3 fimbrias ocasiona una ligera reducción en la adherencia, sin embargo, solo la ausencia de FgocC tuvo significancia estadística. Estos resultados fueron diferentes a los esperados, pues Labbate y colaboradores reportaron previamente que la mutagénesis de *fgovC* ocasionaba una reducción mayor al 90 % en la adherencia a células HCE [45]. Es posible que Fgov este participando en la adherencia a moléculas ausentes en la línea celular NCI-H460. Análogamente, la fimbria tipo 1 de *E. coli*, requerida para la adherencia a epitelio urinario, no participa en la unión a células intestinales [195, 196]. Por otro lado, la ausencia de FgocC ocasionó una reducción en la adherencia de *S. marcescens* SmUNAM836 a tejido pleural. Sin embargo, la cepa SmUNAM836 Δ *fgocC::nptII* aun presentó una adherencia residual del 63%, lo que indica que otras adhesinas están participando en la interacción con las células NCI-H460. Esto se ha observado en ensayos de adherencia con mutantes en diversas adhesinas. Tal es el caso de *E. coli* enteropatógena E2348/69, cuya adherencia a células HT-29 (adenocarcinoma de colón) depende de la acción en conjunto de la fimbria ECP y de la fimbria tipo 4 BFP [197]. La eliminación de ECP reduce ligeramente la adherencia a la línea HT-29 en un 19%, mientras la mutación posterior de BFP disminuye los niveles de adherencia hasta en 91.6% [197]. Estos resultados sugieren que, adicional a FgocC, otras adhesinas diferentes a Fgov y Fps están mediando la unión de la cepa SmUNAM836 a la línea NCI-H460.

7.5.- *S. marcescens* SmUNAM836 sintetiza múltiples estructuras fimbriales

De acuerdo a nuestros resultados, distintos operones fimbriales se expresan de manera simultánea en la cepa SmUNAM836, en consecuencia, se puede anticipar la presencia de diferentes estructuras fimbriales en su superficie. Para confirmar lo anterior, realizamos ensayos de TEM de la cepa SmUNAM836 cultivada en medio M9. Las imágenes obtenidas permitieron describir, en bacterias provenientes de un mismo cultivo, hasta 8 fimbrias con morfología diferente. La distribución y abundancia de estas 8 estructuras varió entre las células analizadas, hallando entre 1 y 2 tipos de fimbrias diferentes ancladas a la membrana bacteriana. También se obtuvieron las proteínas de superficie por desprendimiento mecánico para tener una muestra libre de bacterias. De esta manera se encontraron 4 estructuras fimbriales adicionales. Las fimbrias de *S. marcescens* cepa US5 se visualizaron por primera vez mediante TEM en la década de los 80 reportándose una fimbria MS con diámetro aproximadamente 3 nm [124, 129]. Posteriormente en la cepa US46 se describieron tres fimbrias con morfología distinta: US46-MR1, US46-MR2 y US46-MS, las cuales presentaron diámetros de 7 nm, 4.5 nm y 3 nm, respectivamente [126, 129]. De las estructuras visualizadas, solo la fimbria No.1 de la cepa SmUNAM836 presenta un diámetro de 7 nm, mientras que las fimbrias No.2 y No.5 a No.7 presentaron diámetros de entre 3 a 5 nm. Aunque esto demuestra que existen fimbrias con características similares entre cepas de *S. marcescens*, no es posible afirmar que alguna de estas estructuras corresponda a lo observado en nuestro trabajo. Esto debido a que en la mayoría de los casos no existe un genoma secuenciado que nos permita conocer si la cepa en cuestión comparte operones fimbriales con la cepa SmUNAM836. Más

recientemente, en 2007 Shanks y colaboradores realizaron la mutagénesis de la fimbria Fgov de la cepa *S. marcescens*-D, permitiéndoles comparar mediante TEM a la cepa silvestre fimbriada con la cepa mutante que carecía de cualquier fimbria [51]. En la cepa D, las fimbrias Fgov putativas se señalan como estructuras onduladas abundantes alrededor de la célula observada. Sin embargo, Labbate y colaboradores en ese mismo año realizaron ensayos de TEM en la cepa de *S. marcescens* MG1 silvestre, así como en la mutante MG1 Δ *fimA* (*fgovA*)[45]. En este trabajo, Fgov es observada en la cepa silvestre como fimbrias con mayor rigidez a lo mostrado por Shanks. Es importante señalar que ninguno de estos dos trabajos empleo inmunomarcaje que permitiera identificar con certeza estas estructuras. Por lo anterior, aunque en estos casos existen genomas que nos permitan conocer el repertorio fimbrial de estas cepas, es difícil afirmar la identidad de estas estructuras. Nuestro trabajo presenta un problema similar: la ausencia de marcaje específico. Esto nos impide identificar a que operón fimbrial pertenece cada estructura observada y cabe la posibilidad de que alguna pertenezca a un sistema diferente al CA. Por otro lado, el gran número de fimbrias observadas de manera simultánea en un cultivo de la cepa SmUNAM836 es algo que difiere de lo reportado para *E. coli* y *K. pneumoniae*, donde la expresión fimbrial se encuentra altamente regulada[192, 198]. Sin embargo, *S. marcescens* no es el único organismo en el que se ha observado la presencia de múltiples fimbrias de manera simultánea, pues se ha observado algo similar en *P. mirabilis* [150, 199, 200]. La expresión de múltiples fimbrias le permitiría a *S. marcescens* ventajas en diversos ambientes, permitiéndole adherirse mejor a diversas superficies o evadir fagocitosis.

8. CONCLUSIONES

- El fimbríoma de *S. marcescens* está compuesto por 20 operones fimbriales conservados y 17 operones no conservados.
- Los operones *fgoo*, *fgov*, *fgfo*, *fgft*, *fps*, *fpo* y *fso* componen el fimbríoma central (*core*) de *S. marcescens*.
- Los operones fimbriales se expresan de manera simultánea y diferencial dependiendo de las condiciones de cultivo y el fondo genético.
- Los operones *fgov*, *fpo* y *fps* fueron los que se expresaron en mayor proporción en la cepa SmUNAM836 y Db10.
- La ausencia de *fgooC* en la cepa SmUNAM836 reduce la adherencia a células NCI-460, así como la formación de biopelícula en superficie líquida, borosilicato y poliestireno; también altera el swarming en medio BHI.
- La pérdida del gen *fgovC* ocasiona, en la cepa SmUNAM836, una reducción significativa de la agregación de levaduras, formación de biopelícula en superficie líquida, borosilicato y poliestireno, así como la alteración de *swarming* en medio M8 y BHI.
- En la cepa SmUNAM836, la eliminación de *fpsC* atenúa la capacidad de agregar levaduras, así como de formar biopelícula en borosilicato y poliestireno. Además, eliminó la capacidad de formar biopelícula en medio líquido y de realizar swarming en medio M8 y BHI a las 24 h.
- En la cepa SmUNAM836 se visualizaron mediante TEM hasta 12 fimbrias con morfología distinta expresadas de manera simultánea en el mismo cultivo.

9. PERSPECTIVAS

- Complementar las mutantes generadas para observar restauración de fenotipos.
- Realizar marcaje inmunológico para identificar mediante TEM las estructuras fimbriales de la cepa SmUNAM836.
- Analizar la función de las fimbrias Fgo, Fgov y Fps en la adherencia a líneas celulares de distinto origen.
- Evaluar la expresión de promotores en las mutantes generadas para elucidar cambios en los patrones de expresión.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Bennett JW, Bentley R.** Seeing red: The story of prodigiosin. *Advances in Applied Microbiology* 2000;47:1–32:. DOI:10.1016/s0065-2164(00)47000-0.
2. **Merlino C.** Bartolomeo Bizio's letter to the most eminent priest, Angelo Bellani, concerning the phenomenon of the red-colored polenta. *J Bacteriol* 1924;9:527–543.
3. **Tsuji A, Kaneko Y, Takahashi K, Ogawa M, Goto S.** The Effects of Temperature and pH on the Growth of Eight Enteric and Nine Glucose Non-Fermenting Species of Gram-Negative Rods. *Microbiol Immunol* 1982;26:15–24:. DOI:10.1111/j.1348-0421.1982.tb00149.x.
4. **Romanowski EG, Lehner KM, Martin NC, Patel KR, Callaghan JD, et al.** Thermoregulation of Prodigiosin Biosynthesis by *Serratia marcescens* is Controlled at the Transcriptional Level and Requires HexS. *Polish J Microbiol* 2019;68:43–50:. DOI:10.21307/pjm-2019-005.
5. **Mahlen SD.** *Serratia* infections: From military experiments to current practice. *Clin Microbiol Rev* 2011;24:755–791:. DOI:10.1128/CMR.00017-11.
6. **Wheat R, Zuckerman A, Rantz L.** Infection due to chromobacteria; a report of eleven cases. *AMA Arch Intern Med* 1951;88:461–466.
7. **Farmer J, Davis B, PAD G, F G.** Source of American *Serratia*. *Lancet* 1977;310:459–460.
8. **Centers for Disease Control U.** Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Atlanta, Georgia. Epub ahead of print November 2019. DOI: 10.15620/cdc:82532.
9. **Petersen LM, Tisa LS.** Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. *Can J Microbiol* 2013;59:627–640:. DOI:10.1139/cjm-2013-0343.
10. **Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN, Doern G V., Winokur PL, et al.** Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. *Clin Infect Dis* 1999;29:595–607:. DOI:10.1086/598640.
11. **Jones RN.** Microbial etiologies of Hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. In: *Clinical Infectious Diseases*. Clin Infect Dis. Epub ahead of print 1 August 2010. DOI: 10.1086/653053.
12. **European centre for disease prevention and control.** Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2010. 2010.
13. **Empel J, Baraniak A, Literacka E, Mrówka A, Fiett J, et al.** Molecular survey of β -lactamases conferring resistance to newer β -lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2449–2454:. DOI:10.1128/AAC.00043-08.

14. **Ishikawa K, Matsumoto T, Yasuda M, Uehara S, Muratani T, et al.** The nationwide study of bacterial pathogens associated with urinary tract infections conducted by the Japanese Society of Chemotherapy. *J Infect Chemother* 2011;17:126–138:. DOI:10.1007/s10156-010-0174-1.
15. **Diekema DJ, Hsueh PR, Mendes RE, Pfaller MA, Rolston K V., et al.** The microbiology of bloodstream infection: 20-year trends from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother*;63:. DOI:10.1128/AAC.00355-19. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1128/AAC.00355-19.
16. **Sader HS, Castanheira M, Arends SJR, Goossens H, Flamm RK.** Geographical and temporal variation in the frequency and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from patients hospitalized with bacterial pneumonia: results from 20 years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2016). *J Antimicrob Chemother* 2019;74:1595–1606:. DOI:10.1093/jac/dkz074.
17. **Matteoli FP, Passarelli-Araujo H, Reis RJA, Da Rocha LO, De Souza EM, et al.** Genome sequencing and assessment of plant growth-promoting properties of a *Serratia marcescens* strain isolated from vermicompost. *BMC Genomics* 2018;19:750:. DOI:10.1186/s12864-018-5130-y.
18. **Moradigaravand D, Boinett CJ, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J.** Recent independent emergence of multiple multidrug-resistant *Serratia marcescens* clones within the United Kingdom and Ireland. *Genome Res* 2016;26:1101–1109:. DOI:10.1101/gr.205245.116.
19. **Saralegui C, Ponce-Alonso M, Pérez-Viso B, Moles Alegre L, Escribano E, et al.** Genomics of *Serratia marcescens* Isolates Causing Outbreaks in the Same Pediatric Unit 47 Years Apart: Position in an Updated Phylogeny of the Species. *Front Microbiol* 2020;11:1–15:. DOI:10.3389/fmicb.2020.00451.
20. **Abreo E, Altier N.** Pangenome of *Serratia marcescens* strains from nosocomial and environmental origins reveals different populations and the links between them. *Sci Rep* 2019;9:1–8:. DOI:10.1038/s41598-018-37118-0.
21. **Sandner-Miranda L, Vinuesa P, Cravioto A, Morales-Espinosa R.** The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*. *Front Microbiol* 2018;9:828:. DOI:10.3389/fmicb.2018.00828.
22. **Stock I, Grueger T, Wiedemann B.** Natural antibiotic susceptibility of strains of *Serratia marcescens* and the *S. liquefaciens* complex: *S. liquefaciens sensu stricto*, *S. proteamaculans* and *S. grimesii*. *Int J Antimicrob Agents* 2003;22:35–47:. DOI:10.1016/S0924-8579(02)00163-2.
23. **Velasco C, Rodríguez-Martínez JM, Briales A, Dýaz de Alba P, Calvo J, et al.** Smaqnr, a new chromosome-encoded quinolone resistance determinant in *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother* 2009;65:239–242:. DOI:10.1093/jac/dkp424.
24. **Yang H, Cheng J, Hu L, Zhu Y, Li J.** Mechanisms of antimicrobial resistance in *Serratia*

- marcescens*. *African J Microbiol Res* 2012;6:4427–4437:. DOI:10.5897/AJMR11.1545.
25. **Peng C, Lee M, Fu H, Chen Y, Hsu H.** Characterization of class 1 integrons and antimicrobial resistance in CTX-M-3-producing *Serratia marcescens* isolates from southern Taiwan. *Japanese J Infect Dis* 2007;60:250–256.
 26. **Wyrsh ER, Chowdhury PR, Chapman TA, Charles IG, Hammond JM, et al.** Genomic microbial epidemiology is needed to comprehend the global problem of antibiotic resistance and to improve pathogen diagnosis. *Frontiers in Microbiology*;7:. DOI:10.3389/fmicb.2016.00843. Epub ahead of print 2016.
 27. **Gillings MR.** Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiol Mol Biol Rev* 2014;78:257:. DOI:10.1128/MMBR.00056-13.
 28. **Sandner-Miranda L, Vinuesa P, Cravioto A, Morales-Espinosa R.** The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*. *Front Microbiol* 2018;9:1–16:. DOI:10.3389/fmicb.2018.00828.
 29. **Mo SS, Sunde M, Ilag HK, Langsrud S, Heird E.** Transfer potential of plasmids conferring extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Escherichia coli* from poultry. *Appl Environ Microbiol*;83:. DOI:10.1128/AEM.00654-17.
 30. **Tsakris A, Voulgari E, Poulou A, Kimouli M, Pournaras S, et al.** In vivo acquisition of a plasmid-mediated blaKPC-2 gene among clonal isolates of *Serratia marcescens*. *J Clin Microbiol* 2010;48:2546–2549:. DOI:10.1128/JCM.00264-10.
 31. **Hertle R.** The Family of *Serratia* type Pore Forming Toxins. *Curr Protein Pept Sci* 2005;6:313–325:. DOI:10.2174/1389203054546370.
 32. **Meuskens I, Saragliadis A, Leo JC, Linke D.** Type V secretion systems: An overview of passenger domain functions. *Frontiers in Microbiology* 2019;10:1163:. DOI:10.3389/fmicb.2019.01163.
 33. **Lin CS, Horng JT, Yang CH, Tsai YH, Su LH, et al.** RssAB-FlhDC-ShlBA as a major pathogenesis pathway in *Serratia marcescens*. *Infect Immun* 2010;78:4870–4881:. DOI:10.1128/IAI.00661-10.
 34. **R H.** *Serratia marcescens* hemolysin (ShlA) binds artificial membranes and forms pores in a receptor-independent manner. *J Membr Biol* 2002;189:1–14:. DOI:10.1007/S00232-001-0191-1.
 35. **Hertle R, Brutsche S, Groeger W, Hobbie S, Koch W, et al.** Specific phosphatidylethanolamine dependence of *Serratia marcescens* cytotoxin activity. *Mol Microbiol* 1997;26:853–865.
 36. **Hertle R, Hilger M, Weingardt-kocher S.** Cytotoxic Action of *Serratia marcescens* Hemolysin on Human Epithelial Cells C. *Am Soc Microbiol* 1999;67:817–825.
 37. **Konig w., Faltin Y, Scheffer J, Schoffler H, Braun V.** Role of cell-bound hemolysin as a pathogenicity factor for *Serratia* infections. *Infect Immun* 1987;55:2554–2561:.

DOI:10.1128/iai.55.11.2554-2561.1987.

38. **Hertle R, Schwarz H.** *Serratia marcescens* internalization and replication in human bladder epithelial cells. *BMC Infect Dis* 2004;4:16:. DOI:10.1186/1471-2334-4-16.
39. **Wei JR, Tsai YH, Soo PC, Horng YT, Hsieh SC, et al.** Biochemical characterization of RssA-RssB, a two-component signal transduction system regulating swarming behavior in *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 2005;187:5683–5690:. DOI:10.1128/JB.187.16.5683-
40. **Gauger EJ, Leatham MP, Mercado-Lubo R, Laux DC, Conway T, et al.** Role of motility and the *flhDC* operon in *Escherichia coli* MG1655 colonization of the mouse intestine. *Infect Immun* 2007;75:3315–3324:. DOI:10.1128/IAI.00052-07.
41. **Prescott RD, Decho AW.** Flexibility and Adaptability of Quorum Sensing in Nature. *Trends in Microbiology* 2020;28:436–444:. DOI:10.1016/j.tim.2019.12.004.
42. **Eberl L, Winson M, Sternberg C, Stewart G, Christiansen G, et al.** Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol* 1996;20:127–136.
43. **Labbate M, Queck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M, et al.** Quorum Sensing-Controlled Biofilm Development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* 2004;186:692–698:. DOI:10.1128/JB.186.3.692-698.2004.
44. **Rice S a, Koh KS, Queck SY, Labbate M, Lam KW, et al.** Biofilm Formation and Sloughing in *Serratia marcescens* Are Controlled by Quorum Sensing and Nutrient Cues. *J Bacteriol* 2005;187:3477–3485:. DOI:10.1128/JB.187.10.3477.
45. **Labbate M, Zhu H, Thung L, Bandara R, Larsen MR, et al.** Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. *J Bacteriol* 2007;189:2702–2711:. DOI:10.1128/JB.01582-06.
46. **Shanks RMQ, Stella NA, Hunt KM, Brothers KM, Zhang L, et al.** Identification of SlpB, a cytotoxic protease from *Serratia marcescens*. *Infect Immun* 2015;83:2907–2916:. DOI:10.1128/IAI.03096-14.
47. **Coulhurst SJ, Williamson NR, Harris AKP, Spring DR, Salmond GPC.** Metabolic and regulatory engineering of *Serratia marcescens*: Mimicking phage-mediated horizontal acquisition of antibiotic biosynthesis and quorum-sensing capacities. *Microbiology* 2006;152:1899–1911:. DOI:10.1099/mic.0.28803-0.
48. **Horng YT, Deng SC, Daykin M, Soo PC, Wei JR, et al.** The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*. *Mol Microbiol* 2002;45:1655–1671:. DOI:10.1046/j.1365-2958.2002.03117.x.
49. **Takayama Y, Kato N.** In vitro analysis of essential binding sites on the promoter of the *Serratia marcescens* spn operon with the quorum-sensing receptor SpnR. *Biotechnol Bioeng* 2016;113:2513–2517:. DOI:10.1002/bit.26013.

50. **Takayama Y, Kato N.** Switch of SpnR function from activating to inhibiting quorum sensing by its exogenous addition. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;477:993–997:. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.07.017.
51. **Shanks RMQ, Stella NA, Kalivoda EJ, Doe MR, O’Dee DM, et al.** A *Serratia marcescens* OxyR homolog mediates surface attachment and biofilm formation. *J Bacteriol* 2007;189:7262–7272:. DOI:10.1128/JB.00859-07.
52. **Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P.** Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:95–108:. DOI:10.1038/nrmicro821.
53. **Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, et al.** Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:563–575:. DOI:10.1038/nrmicro.2016.94.
54. **Shirtiliff M, Leid J.** The Role of Biofilms in Device-Related Infections. 1st ed. Springer Berlin Heidelberg; 2009.
55. **Donlan RM.** Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clin Infect Dis* 2001;33:1387–1392:. DOI:10.1086/322972.
56. **Ray C, Shenoy AT, Orihuela CJ, González-Juarbe N.** Killing of *Serratia marcescens* biofilms with chloramphenicol. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2017;16:1–6:. DOI:10.1186/s12941-017-0192-2.
57. **Smith J, Fratamico P, Uhlich G.** Molecular mechanisms involved in biofilm formation by food-associated bacteria. In: Fratamico PM, Annous BA, Guenther NW (editors). *Biofilms in the Food and Beverage Industries*. Woodhead Publishing Limited; 2009. pp. 42–98.
58. **Satpathy S, Sen SK, Pattanaik S, Raut S.** Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatal Agric Biotechnol* 2016;7:56–66:. DOI:10.1016/j.bcab.2016.05.002.
59. **Wang H, Wilksch JJ, Chen L, Tan JWH, Strugnell RA, et al.** Influence of Fimbriae on Bacterial Adhesion and Viscoelasticity and Correlations of the Two Properties with Biofilm Formation. *Langmuir* 2017;33:100–106:. DOI:10.1021/acs.langmuir.6b03764.
60. **Shanks RMQ, Stella NA, Brothers KM, Polaski DM.** Exploitation of a hockey-puck phenotype to identify pilus and biofilm regulators in *Serratia marcescens* through genetic analysis. *Can J Microbiol* 2016;62:83–93:. DOI:10.1139/cjm-2015-0566.Exploitation.
61. **Kikuchi T, Mizunoe Y, Takade A, Naito S, Yoshida S.** Curli Fibers Are Required for Development of Biofilm Architecture in *Escherichia coli* K-12 and Enhance Bacterial Adherence to Human Uroepithelial Cells. 2005;49:875–884.
62. **Brinton CC.** Non-Flagellar appendages of bacteria. *Nature* 1959;183:782–786:. DOI:10.1038/183782a0.
63. **Gillies RR, Duguid JP.** The fimbrial antigens of *Shigella flexneri*. *J Hyg (Lond)*

- 1958;56:303–318:. DOI:10.1017/S0022172400037803.
64. **Orskov F, Orskov I.** Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol* 1984;Volume 14:43–112:. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70447-1.
 65. **Gaastra W, Svennerholm A.** Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol* 1996;4:444–452.
 66. **Thanassi DG, Nuccio S, Shu S, So KIN, Bäumlér AJ.** Fimbriae : Classification and Biochemistry. *EcoSalPlus*;. DOI:10.1128/ecosalplus.2.4.2.1.
 67. **Jones GW, Rutter JM.** Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. *Infect Immun* 1972;6:918–927.
 68. **Testerman TL, McGee DJ, Mobley HLT.** Chapter 34: Adherence and Colonization. In: *Helicobacter pylori: Physiology Genetics* 2001;1–52.
 69. **Hospenthal MK, Costa TRD, Waksman G.** A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 2017;15:365–379:. DOI:10.1038/nrmicro.2017.40.
 70. **Evans ML, Chapman MR.** Curli biogenesis: Order out of disorder. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2014;1843:1551–1558:. DOI:10.1016/j.bbamcr.2013.09.010.
 71. **Mortezaei N, Singh B, Zakrisson J, Bullitt E, Andersson M.** Biomechanical and Structural features of CS2 fimbriae of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Biophys J* 2015;109:49–56:. DOI:10.1016/j.bpj.2015.05.022.
 72. **Nataro JP, Kaper JB.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:142–201.
 73. **Althouse C, Patterson S, Fedorka-cray P, Isaacson RE.** Type 1 Fimbriae of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Bind to Enterocytes and Contribute to Colonization of Swine In Vivo. *Society* 2003;71:6446–6452:. DOI:10.1128/IAI.71.11.6446.
 74. **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:123–40:. DOI:10.1038/nrmicro818.
 75. **Proft T, Baker EN.** Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol life Sci* 2009;66:613–35:. DOI:10.1007/s00018-008-8477-4.
 76. **Nuccio S-P, Bäumlér AJ.** Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007;71:551–575:. DOI:10.1128/MMBR.00014-07.
 77. **Werneburg GT, Thanassi DG.** Pili Assembled by the Chaperone/Usher Pathway in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *EcoSal Plus*;8:. DOI:10.1128/ecosalplus.esp-0007-2017. Epub ahead of print 8 February 2018. DOI: 10.1128/ecosalplus.esp-0007-2017.
 78. **Geibel S, Waksman G.** The molecular dissection of the chaperone-usher pathway. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2014;1843:1559–1567:.

DOI:10.1016/j.bbamcr.2013.09.023.

79. **Stubenrauch C, Belousoff MJ, Hay ID, Shen HH, Lillington J, et al.** Effective assembly of fimbriae in *Escherichia coli* depends on the translocation assembly module nanomachine. *Nat Microbiol* 2016;1:1–8:. DOI:10.1038/nmicrobiol.2016.64.
80. **Bakker D, Vader CEM, Roosendaal B, Mooi FR, Oudega B, et al.** Structure and function of periplasmic chaperone-like proteins involved in the biosynthesis of K88 and K99 fimbriae in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1991;5:875–886:. DOI:10.1111/j.1365-2958.1991.tb00761.x.
81. **Busch A, Waksman G.** Chaperone-usher pathways: Diversity and pilus assembly mechanism. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*;. DOI:10.1098/rstb.2011.0206.
82. **González EA, Blanco J.** Comparative study of inhibition of mannose-resistant haemagglutination caused by CFA/I, CFA/II, K88 and K99-positive *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol Lett* 1985;29:115–121:. DOI:10.1111/J.1574-6968.1985.TB00845.X.
83. **Madhavan T, Sakellaris H.** Colonization Factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier. pp. 155–197.
84. **Duthy TG, Staendner LH, Manning PA, Heuzenroeder MW.** CS5 pilus biosynthesis genes from enterotoxigenic *Escherichia coli* O115:H40. *J Bacteriol* 1999;181:5847–5851:. DOI:10.1128/jb.181.18.5847-5851.1999.
85. **Müller CM, Åberg A, Strasevičiene J, Emody L, Uhlin BE, et al.** Type 1 fimbriae, a colonization factor of uropathogenic *Escherichia coli*, are controlled by the metabolic sensor CRP-cAMP. *PLoS Pathog*;. DOI:10.1371/journal.ppat.1000303.
86. **Scavone P, Iribarnegaray V, Caetano AL, Schlapp G, Härtel S, et al.** Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. *Pathog Dis*;. DOI:10.1093/femspd/ftw033. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1093/femspd/ftw033.
87. **Cordonnier C, Etienne-Mesmin L, Thévenot J, Rougeron A, Rénier S, et al.** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis: Role of Long polar fimbriae in Peyer's patches interactions. *Sci Rep*;. DOI:10.1038/srep44655.
88. **Johnson JR, Stell a L.** Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000;181:261–72:. DOI:10.1086/315217.
89. **Adlerberth I, Hanson L a, Svanborg C, Svennerholm a M, Nordgren S, et al.** Adhesins of *Escherichia coli* associated with extra-intestinal pathogenicity confer binding to colonic epithelial cells. *Microb Pathog* 1995;18:373–385:. DOI:10.1006/mpat.1995.0034.
90. **CH J, JS P, R R, J H, AV N, et al.** FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the *Enterobacteriaceae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2081–2085:. DOI:10.1073/PNAS.92.6.2081.

91. **Honarvar S, Choi BK, Schifferli DM.** Phase variation of the 987P-like CS18 fimbriae of human enterotoxigenic *Escherichia coli* is regulated by site-specific recombinases. *Mol Microbiol* 2003;48:157–171:. DOI:10.1046/j.1365-2958.2003.03419.x.
92. **Isaacson RE, Nagy B, Moon HW.** Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: colonization and adhesion factors of pig enteropathogens that lack K88. *J Infect Dis* 1977;135:531–539:. DOI:10.1093/infdis/135.4.531.
93. **Tacket CO, Maneval DR, Levine MM.** Purification, morphology, and genetics of a new fimbrial putative colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* O159:H4. *Infect Immun* 1987;55:1063–1069:. DOI:10.1128/iai.55.5.1063-1069.1987.
94. **Viboud GI, Binsztein N, Svennerholm AM.** A new fimbrial putative colonization factor, PCFO20, in human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1993;61:5190.
95. **Khan AS, Schifferli DM.** A minor 987P protein different from the structural fimbrial subunit is the adhesin. *Infect Immun* 1994;62:4233–4243:. DOI:10.1128/iai.62.10.4233-4243.1994.
96. **Cao J, Khan AS, Bayer ME, Schifferli DM.** Ordered translocation of 987P fimbrial subunits through the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1995;177:3704–3713:. DOI:10.1128/jb.177.13.3704-3713.1995.
97. **Jalajakumari MB, Thomas CJ, Halter R, Manning PA.** Genes for biosynthesis and assembly of CS3 pili of CFA/II enterotoxigenic *Escherichia coli* : novel regulation of pilus production by bypassing an amber codon. *Mol Microbiol* 1989;3:1685–1695.
98. **Wolf MK, De Haan LAM, Cassels FJ, Willshaw GA, Warren R, et al.** The CS6 colonization factor of human enterotoxigenic *Escherichia coli* contains two heterologous major subunits. *FEMS Microbiol Lett* 1997;148:35–42:. DOI:10.1016/S0378-1097(97)00009-8.
99. **Garcia MI, Jouve M, Nataro JP, Gounon P, Le Bouguéne C.** Characterization of the AfaD-like family of invasins encoded by pathogenic *Escherichia coli* associated with intestinal and extra-intestinal infections. *FEBS Lett* 2000;479:111–117:. DOI:10.1016/S0014-5793(00)01898-6.
100. **Zavialov A V., Berglund J, Pudney AF, Fooks LJ, Ibrahim TM, et al.** Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: Preserved folding energy drives fiber formation. *Cell* 2003;113:587–596:. DOI:10.1016/S0092-8674(03)00351-9.
101. **Berger CN, Billker O, Meyer TF, Servin AL, Kansau I.** Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC). *Mol Microbiol* 2004;52:963–983:. DOI:10.1111/j.1365-2958.2004.04033.x.
102. **Wennerås C, Neeser JR, Svennerholm a M.** Binding of the fibrillar CS3 adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* to rabbit intestinal glycoproteins is competitively prevented by GalNAc beta 1-4Gal-containing glycoconjugates. *Infect Immun* 1995;63:64064–6.

103. **Levine MM, Black R, Young C, Clements ML, Cheney C, et al.** Coli Surface Antigens 1 and 3 of colonization factor antigen II-Positive Enterotoxigenic *Escherichia coli* : Morphology, Purification, and Immune Responses in Humans. *Infect Immun* 1984;44:409–420.
104. **Di Martino P, Cafferini N, Joly B, Darfeuille-Michaud A.** *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Res Microbiol* 2003;154:9–16:. DOI:10.1016/S0923-2508(02)00004-9.
105. **Ruer S, Stender S, Filloux A, De Bentzmann S.** Assembly of fimbrial structures in *Pseudomonas aeruginosa*: Functionality and specificity of chaperone-usher machineries. *J Bacteriol* 2007;189:3547–3555:. DOI:10.1128/JB.00093-07.
106. **Virkola R, Brummer M, Rauvala H, Van Alphen L, Korhonen TK.** Interaction of fimbriae of *Haemophilus influenzae* type B with heparin-binding extracellular matrix proteins. *Infect Immun* 2000;68:5696–5701:. DOI:10.1128/IAI.68.10.5696-5701.2000.
107. **Gohl O, Friedrich A, Hoppert M, Averhoff B.** The thin pili of *Acinetobacter* sp. strain BD413 mediate adhesion to biotic and abiotic surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:1394–1401:. DOI:10.1128/AEM.72.2.1394-1401.2006.
108. **Hahn E, Wild P, Schraner EM, Bertschinger HU, Häner M, et al.** Structural analysis of F18 fimbriae expressed by porcine toxigenic *Escherichia coli*. *J Struct Biol* 2000;132:241–250:. DOI:10.1006/jsbi.2000.4323.
109. **Rippinger P, Bertschinger HU, Imberechts H, Nagy B, Sorg I, et al.** Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease. *Vet Microbiol* 1995;45:281–295:. DOI:10.1016/0378-1135(94)00141-I.
110. **Adams LM, Simmons CP, Rezmann L, Strugnell RA, Robins-Browne RM.** Identification and characterization of a K88- and CS31A-like operon of a rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* strain which encodes fimbriae involved in the colonization of rabbit intestine. *Infect Immun* 1997;65:5222–5230:. DOI:10.1128/iai.65.12.5222-5230.1997.
111. **Bakker D, Willemsen PTJ, Simons LH, van Zijderveld FG, de Graaf FK.** Characterization of the antigenic and adhesive properties of FaeG, the major subunit of K88 fimbriae. *Mol Microbiol* 1992;6:247–255:. DOI:10.1111/j.1365-2958.1992.tb02006.x.
112. **Smeds A, Hemmann K, Jakava-Viljanen M, Pelkonen S, Imberechts H, et al.** Characterization of the adhesin of *Escherichia coli* F18 fimbriae. *Infect Immun* 2001;69:7941–7945:. DOI:10.1128/IAI.69.12.7941-7945.2001.
113. **Busch A, Waksman G.** Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2012;367:1112–1122:. DOI:10.1098/rstb.2011.0206.
114. **Busch A, Phan G, Waksman G.** Molecular mechanism of bacterial type 1 and P pili assembly. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*;373:. DOI:10.1098/rsta.2013.0153.

115. **Zunino P, Sosa V, Schlapp G, Allen AG, Preston A, et al.** Mannose-resistant *Proteus*-like and *P. mirabilis* fimbriae have specific and additive roles in *P. mirabilis* urinary tract infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;51:125–133:. DOI:10.1111/j.1574-695X.2007.00285.x.
116. **Hull RA, Donovan WH, Terzo M Del, Stewart C, Rogers M, et al.** Role of Type 1 Fimbria- and P Fimbria-Specific Adherence in Colonization of the Neurogenic Human Bladder by *Escherichia coli* Role of Type 1 Fimbria- and P Fimbria-Specific Adherence in Colonization of the Neurogenic Human Bladder by *Escherichia coli*. . DOI:10.1128/IAI.70.11.6481.
117. **Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA.** Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 2003;149:3473–3484:. DOI:10.1099/mic.0.26541-0.
118. **Gollop R, Inouye M, Inouye S.** Protein U, a late-developmental spore coat protein of *Myxococcus xanthus*, is a secretory protein. *J Bacteriol* 1991;173:3597–3600.
119. **Zhu W, Wu M, Cao S, Peng Y, Mao X.** Characterization of McuB, a periplasmic chaperone-like protein involved in the assembly of *Myxococcus* spore coat. *J Bacteriol* 2013;195:3105–3114:. DOI:10.1128/JB.02225-12.
120. **Amako K, Ohshima H, Yasunaka K, Kono K.** Pili Mediated Agglutination of *Serratia marcescens* in Human Urine. *Microbiol Immunol* 1981;25:981–992:. DOI:10.1111/j.1348-0421.1981.tb00104.x.
121. **Adegbola RA, Old DC.** New fimbrial hemagglutinin in *Serratia* species. *Infect Immun* 1982;38:306–315.
122. **Old DC, Adegbola RA, Scott S.** Multiple fimbrial haemagglutinins in *Serratia* species. *Med Microbiol Immunol* 1983;172:107–115.
123. **Moriya T, Kawabata S, Mizunoe Y, Amako K.** A Cryptic Fimbrial Gene in *Serratia marcescens*. 1989;171:6629–6636.
124. **Kohno K, Yamamoto T, Kuroiwa A, Amako K.** Purification and characterization of *Serratia marcescens* US5 pili. *Infect Immun* 1984;46:295–300.
125. **Yamamoto T, Ariyoshi A, Amako K.** Fimbria-Mediated Adherence of *Serratia marcescens* Strain US5 to Human Urinary Bladder Surface. *Microbiol Immunol* 1985;29:677–681.
126. **Mizunoe Y, Nakabeppu Y, Sekiguchi M, Kawabata S, Moriya T, et al.** Cloning and sequence of the gene encoding the major structural component of mannose-resistant fimbriae of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 1988;170:3567–3574.
127. **Matsumoto T, Haraoka M, Mizunoe Y, Kubo S, Takahashi K, et al.** Renal scarring is enhanced by phorbol myristate acetate following infection with bacteria with mannose-sensitive pili. *Nephron* 1993;64:405–409.
128. **Mizunoe Y, Matsumoto T, Haraoka M, Sakumoto M, Kubo S, et al.** Effect of pili of *Serratia marcescens* on superoxide production and phagocytosis of human

- polymorphonuclear leukocytes. *J Urol* 1995;154:1227–1230.
129. **Jingushi S, Mitsuyama M, Moriya T, Amako K.** Antigenic analysis of *Serratia marcescens* fimbriae with monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1987;55:1600–1606.
 130. **Leranoz S, Orús P, Berlanga M, Dalet F, Viñas M.** New fimbrial adhesins of *Serratia marcescens* isolated from urinary tract infections: Description and properties. *J Urol* 1997;157:694–698. DOI:10.1016/S0022-5347(01)65252-2.
 131. **Kärkkäinen U, Ikäheimo R, Katila M, Mäntyjärvi R.** P-fimbriation of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis demonstrated by a commercial agglutination test (PF Test). *J Clin Microbiol* 1991;29:221.
 132. **Clegg S, Gerlach GF.** Enterobacterial fimbriae. *J Bacteriol* 1987;169:934–938.
 133. **Clegg S, Hull S, Hull R, Pruckler J.** Construction and comparison of recombinant plasmids encoding type 1 fimbriae of members of the family *Enterobacteriaceae*. *Infect Immun* 1985;48:275–279.
 134. **Gerlach GF, Clegg S, Ness NJ, Swenson DL, Allen BL, et al.** Expression of type 1 fimbriae and mannose-sensitive hemagglutinin by recombinant plasmids. *Infect Immun* 1989;57:764–770.
 135. **Clegg S, Purcell BK, Pruckler J.** Characterization of Genes Encoding Type 1 Fimbriae of *Klebsiella*. *Infect Immun* 1987;55:281–287.
 136. **Nichols WA, Clegg S, Brown MR.** Characterization of the type 1 fimbrial subunit gene (fimA) of *Serratia marcescens*. *Mol Microbiol* 1990;4:2119–2126. DOI:10.1111/j.1365-2958.1990.tb00573.x.
 137. **Kalivoda EJ, Brothers KM, Stella NA, Schmitt MJ, Shanks RMQ.** Bacterial Cyclic AMP-Phosphodiesterase Activity Coordinates Biofilm Formation. *PLoS One*;8. DOI:10.1371/journal.pone.0071267.
 138. **Stella N, Shanks RMQ.** Cyclic-AMP inhibition of fimbriae and prodigiosin production by *Serratia marcescens* is strain-dependent. *Arch Microbiol* 2014;196:323–330. DOI:10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x. Endothelial.
 139. **Kalivoda EJ, Stella NA, O’Dee DM, Nau GJ, Shanks RMQ.** The cyclic AMP-dependent catabolite repression system of *Serratia marcescens* mediates biofilm formation through regulation of type 1 fimbriae. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:3461–3470. DOI:10.1128/AEM.02733-07.
 140. **Sandner-miranda L, Vinuesa P, Soberón-chávez G, Morales-espinosa R.** Complete Genome Sequence of *Serratia marcescens* SmUNAM836, a Nonpigmented Multidrug-Resistant Strain Isolated from a Mexican. *Genome Announc* 2016;4:e01417-15. DOI:10.1128/genomeA.01417-15. Copyright.
 141. **Iguchi A, Nagaya Y, Pradel E, Ooka T, Ogura Y, et al.** Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen. *Genome*

- Biol Evol* 2014;6:2096–2110:. DOI:10.1093/gbe/evu160.
142. **Flyg C, Kenne K, Boman HG.** Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*: Phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. *J Gen Microbiol* 1980;120:173–181:. DOI:10.1099/00221287-120-1-173.
 143. **Datsenko K a, Wanner BL.** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6640–5:. DOI:10.1073/pnas.120163297.
 144. **Martínez-García E, Goñi-Moreno A, Bartley B, McLaughlin J, Sánchez-Sampedro L, et al.** SEVA 3.0: An update of the Standard European Vector Architecture for enabling portability of genetic constructs among diverse bacterial hosts. *Nucleic Acids Res* 2020;48:D1164–D1170:. DOI:10.1093/nar/gkz1024.
 145. **Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J.** Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P(BAD) promoter. *J Bacteriol* 1995;177:4121–4130:. DOI:10.1128/jb.177.14.4121-4130.1995.
 146. **Hanuszkiewicz A, Pittock P, Humphries F, Moll H, Rosales AR, et al.** Identification of the flagellin glycosylation system in urkholderia cenocepacia and the contribution of glycosylated flagellin to vasion of human innate immune responses. *J Biol Chem* 2014;289:19231–19244:. DOI:10.1074/jbc.M114.562603.
 147. **Ha DG, Kuchma SL, O’Toole GA.** Plate-based assay for swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Mol Biol* 2014;1149:67–72:. DOI:10.1007/978-1-4939-0473-0_8.
 148. **Wurpel DJ, Beatson SA, Totsika M, Petty NK, Schembri MA.** Chaperone-Usher Fimbriae of *Escherichia coli*. *PLoS One* 2013;8:e52835:. DOI:10.1371/journal.pone.0052835.
 149. **Cheng RA, Wiedmann M.** Recent Advances in Our Understanding of the Diversity and Roles of Chaperone-Usher Fimbriae in Facilitating *Salmonella* Host and Tissue Tropism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2021;10:920:. DOI:10.3389/fcimb.2020.628043.
 150. **Kuan L, Schaffer JN, Zouzias CD, Pearson MM.** Characterization of 17 chaperone-usher fimbriae encoded by *Proteus mirabilis* reveals strong conservation. *J Med Microbiol* 2014;63:911–922:. DOI:10.1099/jmm.0.069971-0.
 151. **Yue M, Rankin SC, Blanchet RT, Nulton JD, Edwards RA, et al.** Diversification of the *Salmonella* Fimbriae: A model of macro- and microevolution. *PLoS One* 2012;7:e38596:. DOI:10.1371/journal.pone.0038596.
 152. **Sakai T, Kanai K, Osatomi K, Yoshikoshi K.** Identification and characterization of a fimbrial gene cluster of *Edwardsiella tarda* expressing mannose-resistant hemagglutination. *Fish Pathol* 2004;39:87–93:. DOI:10.3147/jsfp.39.87.
 153. **Sakai T, Iida T, Osatomi K, Kanai K.** Detection of type 1 fimbrial genes in fish pathogenic

- and non-pathogenic *Edwardsiella tarda* strains by PCR. *Fish Pathol* 2007;42:115–117:. DOI:10.3147/jsfp.42.115.
154. **Werneburg GT, Thanassi DG.** Pili Assembled by the Chaperone/Usher Pathway in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *EcoSal Plus* 2018;8:. DOI:10.1128/ecosalplus.esp-0007-2017.
 155. **Dufresne K, Saulnier-Bellemare J, Daigle F.** Functional analysis of the chaperone-usher fimbrial gene clusters of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Front Cell Infect Microbiol*;. DOI:10.3389/fcimb.2018.00026.
 156. **Melican K, Sandoval RM, Kader A, Josefsson L, Tanner GA, et al.** Uropathogenic *Escherichia coli* P and type 1 fimbriae act in synergy in a living host to facilitate renal colonization leading to nephron obstruction. *PLoS Pathog* 2011;7:e1001298:. DOI:10.1371/journal.ppat.1001298.
 157. **Stromberg N, Marklund BI, Lund B, Ilver D, Hamers A, et al.** Host-specificity of uropathogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gal α 1-4Gal-containing isoreceptors. *EMBO J* 1990;9:2001–2010:. DOI:10.1002/j.1460-2075.1990.tb08328.x.
 158. **Jansen AM, Lockatell V, Johnson DE, Mobley HLT.** Mannose-resistant *Proteus*-like fimbriae are produced by most *Proteus mirabilis* strains infecting the urinary tract, dictate the in vivo localization of bacteria, and contribute to biofilm formation. *Infect Immun* 2004;72:7294–7305:. DOI:10.1128/IAI.72.12.7294-7305.2004.
 159. **Pakharukova N, Tuittila M, Paavilainen S, Malmi H, Parilova O, et al.** Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:5558–5563:. DOI:10.1073/pnas.1800961115.
 160. **Hobley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR.** Giving structure to the biofilm matrix: An overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev* 2015;39:649–669:. DOI:10.1093/femsre/fuv015.
 161. **Loo CY, Young PM, Lee WH, Cavaliere R, Whitchurch CB, et al.** Superhydrophobic, nanotextured polyvinyl chloride films for delaying *Pseudomonas aeruginosa* attachment to intubation tubes and medical plastics. *Acta Biomater* 2012;8:1881–1890:. DOI:10.1016/j.actbio.2012.01.015.
 162. **De-la-Pinta I, Cobos M, Ibarretxe J, Montoya E, Eraso E, et al.** Effect of biomaterials hydrophobicity and roughness on biofilm development. *J Mater Sci Mater Med* 2019;30:1–11:. DOI:10.1007/s10856-019-6281-3.
 163. **Tang H, Cao T, Liang X, Wang A, Salley SO, et al.** Influence of silicone surface roughness and hydrophobicity on adhesion and colonization of *Staphylococcus epidermidis*. *J Biomed Mater Res - Part A* 2009;88:454–463:. DOI:10.1002/jbm.a.31788.
 164. **Quirynen M, Bollen CML.** The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man: A review of the literature. *J Clin*

- Periodontol* 1995;22:1–14:. DOI:10.1111/j.1600-051X.1995.tb01765.x.
165. **Sousa C, Teixeira P, Oliveira R.** Influence of Surface Properties on the Adhesion of Staphylococcus epidermidis to Acrylic and Silicone. *Int J Biomater* 2009;2009:1–9:. DOI:10.1155/2009/718017.
 166. **Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C.** Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol* 2010;10:1–10:. DOI:10.1186/1471-2180-10-179.
 167. **Thormann E, Simonsen AC, Hansen PL, Mouritsen OG.** Interactions between a polystyrene particle and hydrophilic and hydrophobic surfaces in aqueous solutions. *Langmuir* 2008;24:7278–7284:. DOI:10.1021/la8005162.
 168. **Lindum PW, Anthoni U, Christophersen C, Eberl L, Givskov M.** N -Acyl-L-Homoserine Lactone Autoinducers Control Production of an Extracellular Lipopeptide Biosurfactant Required for Swarming Motility of *Serratia liquefaciens* MG1. 1998;180:6384–6388.
 169. **Matsuyama T, Kaneda K, Nakagawa Y, Isa K, Hara-Hotta H, et al.** A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum- dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 1992;174:1769–1776:. DOI:10.1128/jb.174.6.1769-1776.1992.
 170. **Desrousseaux C, Sautou V, Descamps S, Traoré O.** Modification of the surfaces of medical devices to prevent microbial adhesion and biofilm formation. *Journal of Hospital Infection* 2013;85:87–93:. DOI:10.1016/j.jhin.2013.06.015.
 171. **Paytubi S, Cansado C, Madrid C, Balsalobre C.** Nutrient composition promotes switching between pellicle and bottom biofilm in *Salmonella*. *Front Microbiol* 2017;8:2160:. DOI:10.3389/fmicb.2017.02160.
 172. **Paytubi S, de La Cruz ML, Tormo JR, Martín J, González I, et al.** A high-throughput screening platform of microbial natural products for the discovery of molecules with antibiofilm properties against *Salmonella*. *Front Microbiol* 2017;8:326:. DOI:10.3389/fmicb.2017.00326.
 173. **Liang Y, Gao H, Chen J, Dong Y, Wu L, et al.** Pellicle formation in *Shewanella oneidensis*. *BMC Microbiol* 2010;10:1–11:. DOI:10.1186/1471-2180-10-291.
 174. **Kovács ÁT, Dragoš A.** Evolved Biofilm: Review on the Experimental Evolution Studies of *Bacillus subtilis* Pellicles. *Journal of Molecular Biology* 2019;431:4749–4759:. DOI:10.1016/j.jmb.2019.02.005.
 175. **Spiers AJ, Rainey PB.** The *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader biofilm requires attachment factor, cellulose fibre and LPS interactions to maintain strength and integrity. *Microbiology* 2005;151:2829–2839:. DOI:10.1099/mic.0.27984-0.
 176. **Nait Chabane Y, Marti S, Rihouey C, Alexandre S, Hardouin J, et al.** Characterisation of pellicles formed by *Acinetobacter baumannii* at the air-liquid interface. *PLoS One*

- 2014;9:e111660:. DOI:10.1371/journal.pone.0111660.
177. **Ude S, Arnold DL, Moon CD, Timms-Wilson T, Spiers AJ.** Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environ Microbiol* 2006;8:1997–2011:. DOI:10.1111/j.1462-2920.2006.01080.x.
 178. **Rumbo-Feal S, Gómez MJ, Gayoso C, Álvarez-Fraga L, Cabral MP, et al.** Whole Transcriptome Analysis of *Acinetobacter baumannii* Assessed by RNA-Sequencing Reveals Different mRNA Expression Profiles in Biofilm Compared to Planktonic Cells. *PLoS One* 2013;8:e72968:. DOI:10.1371/journal.pone.0072968.
 179. **Kearns DB.** A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology* 2010;8:634–644:. DOI:10.1038/nrmicro2405.
 180. **Butler MT, Wang Q, Harshey RM.** Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:3776–3781:. DOI:10.1073/PNAS.0910934107.
 181. **O’Rear J, Alberti L, Harshey RM.** Mutations that impair swarming motility in *Serratia marcescens* 274 include but are not limited to those affecting chemotaxis or flagellar function. *J Bacteriol* 1992;174:6125–6137:. DOI:10.1128/jb.174.19.6125-6137.1992.
 182. **Shanks RMQ, Lahr RM, Stella NA, Arena KE, Brothers KM, et al.** A *Serratia marcescens* PigP Homolog Controls Prodigiosin Biosynthesis, Swarming Motility and Hemolysis and Is Regulated by cAMP-CRP and HexS. *PLoS One* 2013;8:e57634:. DOI:10.1371/journal.pone.0057634.
 183. **Alagely A, Krediet CJ, Ritchie KB, Teplitski M.** Signaling-mediated cross-talk modulates swarming and biofilm formation in a coral pathogen *Serratia marcescens*. *ISME J* 2011 510 2011;5:1609–1620:. DOI:10.1038/ismej.2011.45.
 184. **Jones HE, Park RW.** The influence of medium composition on the growth and swarming of *Proteus*. *J Gen Microbiol* 1967;47:369–378:. DOI:10.1099/00221287-47-3-369.
 185. **Harshey RM.** Bees aren’t the only ones: swarming in Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 1994;13:389–394:. DOI:10.1111/j.1365-2958.1994.tb00433.x.
 186. **Inoue T, Shingaki R, Hirose S, Waki K, Mori H, et al.** Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 2007;189:950–957:. DOI:10.1128/JB.01294-06.
 187. **Clegg S, Hughes KT.** FimZ is a molecular link between sticking and swimming in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* 2002;184:1209–1213:. DOI:10.1128/jb.184.4.1209-1213.2002.
 188. **Li X, Rasko DA, Lockett CV, Johnson DE, Mobley HLT.** Repression of bacterial motility by a novel fimbrial gene product. *EMBO J* 2001;20:4854–4862:. DOI:10.1093/emboj/20.17.4854.
 189. **Givskov M, Ostling J, Eberl L, Lindum PW, Christensen AB, et al.** Two separate

- regulatory systems participate in control of swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* 1998;180:742–745.
190. **Eberl L, Winson MK, Sternberg C, Stewart GSAB, Christiansen G, et al.** Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol* 1996;20:127–136:. DOI:10.1111/j.1365-2958.1996.tb02495.x.
 191. **Schembri MA, Sokurenko E V., Klemm P.** Functional Flexibility of the FimH Adhesin: Insights from a Random Mutant Library. *Infect Immun* 2000;68:2638:. DOI:10.1128/IAI.68.5.2638-2646.2000.
 192. **Stahlhut SG, Struve C, Krogfelt KA.** *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbriae agglutinate yeast in a mannose-resistant manner. *J Med Microbiol* 2012;61:317–322:. DOI:10.1099/jmm.0.036350-0.
 193. **Bouckaert J, Mackenzie J, De Paz JL, Chipwaza B, Choudhury D, et al.** The affinity of the FimH fimbrial adhesin is receptor-driven and quasi-independent of *Escherichia coli* pathotypes. *Mol Microbiol* 2006;61:1556–1568:. DOI:10.1111/j.1365-2958.2006.05352.x.
 194. **J B, Castelli M, Venanzio G Di, Colombo M, Vescovi EG.** The PhoP/PhoQ system and its role in *Serratia marcescens* pathogenesis. *J Bacteriol* 2012;194:249–2961.
 195. **McCormick BA, Franklin DP, Laux DC, Cohen PS.** Type 1 pili are not necessary for colonization of the streptomycin-treated mouse large intestine by type 1-piliated *Escherichia coli* F-18 and *E. coli* K-12. *Infect Immun* 1989;57:3022–3029:. DOI:10.1128/iai.57.10.3022-3029.1989.
 196. **Bower JM, Eto DS, Mulvey MA.** Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the Urinary Tract. *Traffic* 2005;6:18–31:. DOI:10.1111/j.1600-0854.2004.00251.x.
 197. **Saldaña Z, Erdem AL, Schüller S, Okeke IN, Lucas M, et al.** The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. *J Bacteriol* 2009;191:3451–3461:. DOI:10.1128/JB.01539-08.
 198. **Xia Y, Gaily D, Forsman-Semb K, Uhlin BE.** Regulatory cross-talk between adhesin operons in *Escherichia coli*: Inhibition of type 1 fimbriae expression by the PapB protein. *EMBO J* 2000;19:1450–1457:. DOI:10.1093/emboj/19.7.1450.
 199. **Massad G, Bahrani FK, Mobley HLT.** *Proteus mirabilis* fimbriae: Identification, isolation, and characterization of a new ambient-temperature fimbria. *Infect Immun* 1994;62:1989–1994:. DOI:10.1128/iai.62.5.1989-1994.1994.
 200. **Rocha SPD, Pelayo JS, Elias WP.** Fimbriae of uropathogenic *Proteus mirabilis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;51:1–7:. DOI:10.1111/J.1574-695X.2007.00284.X.

11. ANEXOS

Anexo 1.- Condiciones de amplificación de PCR

Gen	Enzima	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Número de ciclos
Promotores (excepto fgfo)	Accuzyme Alta Fidelidad	95	5	1
		95	0:15	
		56	0:15	30
		72	1:00	
		72	10	1
Promotor <i>fgfo₈₃₆ /fgfo_{Db10}</i>	Accuzyme Alta Fidelidad	95	5	1
		95	0:15	
		60	0:15	30
		72	0:35	
		72	10	1
Confirmación Clonación en pSEVA246	Taq	95	5	1
		95	0:45	
		56	0:30	30
		72	0:45	
		72	10	1
pKD4 (<i>nptII</i>)	Taq	95	5	1
		94	1	
		65	1	30
		72	2	
		72	10	1
Confirmación de Mutagénesis (<i>fgooC, fgovC, fpsC</i>)	Taq	95	3	1
		95	1	
		55	0:30	30
		72	2:45	
		72	10	1

Cepa	Origen del Aislado	Número de Acceso NCBI	Operones Conservados												Total de operones conservados (por Cepa)										
			γ1						γ4							π		σ							
			fao	fat	fbo	fbt	fgo0	fgot	fgoh	fgof	fgov	fgfo	fgft	fgfh		fpo	fpt	fph	fpf	fpv	fps	fjn	fso	o	
ASI	Anopheltes	CP010584.1	4370089	-	-	-	-	1522807	3587626	2502519	2047818	4349064	4042313	3854204	810026	2514692	-	193855	4208792	-	4208792	-	193855	3659518	12
DB11	<i>D. melanogaster</i>	HG326223.1	-	-	-	3420456	-	3037179	3587626	3957016	3957016	821600	1818780	1307244	4168954	-	4779875	955375	-	955375	-	4779875	-	1432579	9
RSC-14	<i>Solanum nigrum</i>	CP021639.1	-	-	-	-	3026144	3037179	3587626	3957016	3957016	547200	250872	73522	2342056	3969221	-	1754186	410039	-	410039	-	1754186	5023980	9
SOLR4	<i>Solanaceae rhizosphere</i>	CP025698.1	-	-	-	-	3086500	3037179	3587626	3957016	3957016	969851	142501	5136137	2672493	4353558	-	2224005	832786	-	832786	-	2224005	3500559	9
Strain 1274	<i>Agave sisalana</i>	CP013046.2	-	-	-	-	4400059	3452420	3452420	3452420	3452420	1570932	2107072	5203314	5195945	361731	-	321954	1786987	-	1786987	-	321954	2385285/4618312	11
B3R3	<i>Zea mays</i>	CP027300.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1570932	2107072	5203314	5195945	361731	-	321954	1786987	-	1786987	-	321954	2385285/4618312	13
SGAI0764	Aire tropical	AP019009.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1570932	2107072	5203314	5195945	361731	-	321954	1786987	-	1786987	-	321954	2385285/4618312	6
AS-1	Suelo	CP031316.1	-	589042	-	-	-	-	-	-	-	1514449	1807800	1976054	4798069	-	350913	1665459	-	1665459	-	350913	-	2118820	7
N4-5	Suelo	CP027796.1	-	3800708	2020393	-	-	-	-	-	-	4736990	5024631	98833	2909684	-	3532745	4865620	-	4865620	-	3532745	-	2094910	9
ELI	Marino	CP027798.1	-	4138428	729455	-	-	-	-	-	-	3203041	2915431	2651483	5031176	-	4408064	2529218	-	2529218	-	4408064	-	208664	10
KS10	Marino	CP027798.1	-	650970	4124990	-	-	-	-	-	-	3369790	1938769	2169800	5002949	-	380490	2594124	-	2594124	-	380490	-	2294124	10
WM4	Máquina Productora de papel	NC_020211.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
AR_0027	Clinico	CP026702.1	1424068	-	-	-	-	4160810	-	-	4712868	1403120	111279	1675991	5144647	-	3831587	1775639	-	1775639	-	3831587	532336	13	
AR_0091	Clinico	CP027533.1	1110484	-	-	-	-	3836164	-	-	3347606	1131351	1465487	1675991	5144647	-	4624321	4135684	-	4135684	-	4624321	5263206	13	
AR_0099	Clinico	CP027533.1	4662503	-	-	-	-	2040208	-	-	2578840	4641560	4341744	4164783	2975823	645547	-	1821598	4512688	-	4512688	-	1821598	4051127	13
AR_0121	Clinico	CP028949.1	851600	-	-	-	-	3390181	-	-	3875521	830647	525623	348673	2649170	4281221	-	3172364	701779	-	701779	-	3172364	243427	12
AR_0122	Clinico	CP029746.1	4183562	-	-	-	-	1644875	-	-	1159617	4204359	4509485	4686393	2385931	753860	-	1862698	4332887	-	4332887	-	1862698	3584315	12
AR_0123	Clinico	CP028948.1	5092408	-	-	-	-	2490049	-	-	2975381	5071455	4766430	4589880	1749038	3381082	-	2272232	4942587	-	4942587	-	2272232	4476135	12
AR_0124	Clinico	CP028946.1	3104677	-	-	-	-	554168	-	-	27391	3125475	3425758	3645661	1294699	4808074	-	774751	3254406	-	3254406	-	774751	3760084	12
AR_0130	Clinico	CP028947.1	-	-	-	-	-	4185962	-	-	3746399	3705676	1901908	2086649	4906097	4898733	-	358450	1710782	-	1710782	-	358450	2203269	12
AR_0131	Clinico	CP029715.1	465291	-	-	-	-	3067539	-	-	2582288	488068	791214	968122	3285362	615016	-	3285362	615016	-	615016	-	3285362	1082660	12
SW39	Paciente séptico	AP013063.1	950015	-	-	-	-	4116217	-	-	3107644	971089	1303418	1478631	4284188	2650428	-	3761974	1103507	-	1103507	-	3761974	1581110	10
SMBZ089	Aislado de Brote	HG738868.1	1578568	-	-	-	-	4116217	-	-	3658117	1599380	1902340	2078534	4890598	3234053	-	4356798	1732118	-	1732118	-	4356798	2188185	12
SmlUNA0836	Aspirado Bronquial (Dx:POC)	CP012685.1	865411	-	-	-	-	3572183	-	-	884820	1217416	1393695	4269813	2655623	-	3781634	1013826	-	1013826	-	3781634	1500754	12	
Strain 332	Herida (Anciano 72 años)	CP021164.1	1465174	-	-	-	-	4237459	-	-	1485972	1779526	1779526	4799186	-	-	-	4324812	-	-	-	-	4324812	2068397	7
CAV1492	Vías Respiratorias	CP011642.1	935326	-	-	-	-	3431214	4563438	4061256	914370	593371	397193	2815273	-	-	-	3337988	772780	-	772780	-	3337988	260999	11
CAV1761	Arca Peri-rectal	CP029449.1	1046893	-	-	-	-	3542395	4679685	4172497	1025937	706938	507361	2926514	3279755	-	-	3466880	884347	-	884347	-	3466880	371167	11
FDAARGOS_65	Aspirado endotraqueal (Dx:Tos)	CP026050.1	1436922	-	-	-	-	3988558	-	-	1415895	1080694	903352	3279755	-	-	-	2669564	3785036	-	3785036	-	2669564	794040	10
UMH1	Bacteriemia	CP018915.1	-	-	-	-	-	3571995	-	-	841294	1144329	1336751	4154820	-	-	-	4863588	978096	-	978096	-	4863588	1454960	8
UMH10	Bacteriemia	CP018928.1	-	-	-	-	-	3595300	-	-	842672	1142521	1329325	4233528	-	-	-	4863588	978096	-	978096	-	4863588	1454960	8
UMH11	Bacteriemia	CP018929.1	-	-	-	-	-	3595345	-	-	842672	1142521	1329325	4233528	-	-	-	4863588	978096	-	978096	-	4863588	1454960	8
UMH12	Bacteriemia	CP018930.1	-	-	-	-	-	3595345	-	-	842672	1142521	1329325	4233528	-	-	-	4863588	978096	-	978096	-	4863588	1454960	8
UMH2	Bacteriemia	CP018924.1	-	-	-	-	-	3591726	3718509	2671030	3193064	870609	1172729	1388760	4379624	4273708	-	3172364	701779	-	701779	-	3172364	243427	7
UMH3	Bacteriemia	CP018925.1	-	-	-	-	-	3591726	3718509	2671030	3193064	870609	1172729	1388760	4379624	4273708	-	3172364	701779	-	701779	-	3172364	243427	7
UMH5	Bacteriemia	CP018917.1	-	-	-	-	-	3659651	-	-	897998	1192062	1435179	1388760	4379624	4273708	-	3172364	701779	-	701779	-	3172364	243427	11
UMH6	Bacteriemia	CP018926.1	-	-	-	-	-	3619663	-	-	941860	1245601	1466393	4366576	2726207	-	-	3878588	999441	-	999441	-	3878588	1548829	11
UMH7	Bacteriemia	CP018927.1	-	-	-	-	-	3577565	-	-	26512356	26512356	26512356	26512356	26512356	26512356	-	4965236	1080551	-	1080551	-	4965236	1575522	11
UMH8	Bacteriemia	CP018919.1	-	-	-	-	-	3524263	3554698	2603283	3082921	899144	1195045	1399088	4805667	4813121	-	4875616	1031013	-	1031013	-	4875616	1514707	11
UMH8	Bacteriemia	CP018927.1	-	-	-	-	-	3524263	3554698	2603283	3082921	899144	1195045	1399088	4805667	4813121	-	4875616	1031013	-	1031013	-	4875616	1514707	11
UMH8	Bacteriemia	CP018927.1	-	-	-	-	-	3524263	3554698	2603283	3082921	899144	1195045	1399088	4805667	4813121	-	4875616	1031013	-	1031013	-	4875616	1514707	11
UMH9	Bacteriemia	CP018923.1	844822	-	-	-	-	3373935	-	-	858839	1219843	1440859	1352572	4278221	-	-	4813668	995782	-	995782	-	4813668	1476417	7
UMH9	Bacteriemia	CP018923.1	844822	-	-	-	-	3373935	-	-	858839	1219843	1440859	1352572	4278221	-	-	4813668	995782	-	995782	-	4813668	1476417	7
Operons Totales (por familia)			20	4	4	3	23	8	15	17	39	37	37	4	39	18	7	13	17	38	12	40	395		

Anexo 2.- Coordenadas genómicas de genes codificantes de proteínas acomodadoras en *S. marcescens*. Cada fila corresponde a una cepa de *S. marcescens*. Las columnas están organizadas de acuerdo a la familia de los operones tipo CA y las subcolumnas por tipo de operon. Cada número corresponde a la ubicación en el genoma del gen de la proteína acomodadora en la cepa que se indica. El número total de operones de cada cepa se encuentra en la columna derecha. El total de operones de cada familia se ubica en la columna inferior.