

**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE
SECUENCIAS DE RNA ENCONTRADAS EN
MUESTRAS DE AIRE DE LA ESTACIÓN DEL
METRO HOSPITAL 20 DE NOVIEMBRE Y EL
CENTRO MÉDICO NACIONAL HOSPITAL 20
DE NOVIEMBRE**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A :

Carla Georgina Cicero Sarmiento

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dra. Minerva Camacho Nuez

Secretario: Dra. Claudia Selene Zárate Guerra

Vocal: Dra. Mariana Peimbert Torres

1er. Suplente: Dra, Lilia López Cánovas

Lugar donde se realizó el posgrado:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra

Universidad Autónoma De la Ciudad De México

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y a los profesores del posgrado en Ciencias genómicas por permitirme el acceso y por su importante contribución a mi formación durante la maestría.

Al Conacyt, por haberme otorgado la beca No. 635796 durante el periodo de julio de 2017 a julio de 2019.

A la doctora Selene Zárate, por aceptarme como alumna en el laboratorio de Bioinformática de la UACM, por su tutoría durante el desarrollo de este trabajo y por hacerme partícipe del proyecto de la UACM PI-CCyT-2019-05.

A la doctora Mariana Peimbert, por hacerme partícipe del proyecto SECITI/102/2017, por el acceso al Cluster para permitirme agilizar el procesamiento y análisis de los datos y por su asesoría durante la realización del proyecto.

A la Dra. Sofía Alcaraz por aceptarme en su laboratorio y por enseñarme las técnicas experimentales que se utilizaron para este proyecto.

A la Dra. Minerva Camacho Nuez y a la Dra. Lilia López Cánovas por sus recomendaciones y contribuciones a este trabajo.

A Caro y Apolinar por apoyarnos a tomar las muestras y por sus consejos metodológicos y bioinformáticos.

.

DEDICATORIA

A Dios, quien me permite todos los días ver su favor en mi vida y alcanzar nuevas metas y proyectos.

A mi familia que siempre ha estado conmigo y me ha animado a superarme más cada día.

A mi esposo que estuvo apoyándome desde el inicio hasta el final de la maestría, gracias por estar ahí y por ser mi coach, mi pañuelo y mi amigo.

A mi mamá por sus consejos y por enseñarme con el ejemplo a salir adelante pese a las adversidades que se presenten.

A mi papá Isidro y mamá Lupita que me inspiran a ser determinada y perseverante en la vida, por sus consejos y amor.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Estudio de la diversidad de las comunidades microbianas en los bioaerosoles de ambientes urbanos	12
1.1.2 RNA-seq.....	16
1.2 Comunidades microbianas y su importancia en el ambiente y la salud pública	17
1.3 Mecanismos de resistencia microbiana	20
1.3.1 Resistencia adquirida por mutaciones	21
1.3.2 Resistencia adquirida por transferencia horizontal de genes.....	22
1.4 Factores de virulencia	24
1.4.1 Mecanismos de virulencia que participan durante la fase infectiva temprana.....	25
1.4.2 Mecanismos de virulencia que participan durante la fase infectiva tardía	28
1.4.3 Tipos de factores de virulencia	30
2. ANTECEDENTES PARTICULARES	33
2.1 Estudio de las comunidades microbianas en ambientes hospitalarios	33
2.1.2 Estudios basados en medios de cultivos	33
2.1.3 Estudios libres de medios de cultivos	35
2.2 Estudio de las comunidades microbianas en el medio de transporte colectivo “metro”	37
2.3 Estudios enfocados a la identificación de genes de resistencia a los antimicrobianos	39
3. JUSTIFICACIÓN	44
4. HIPÓTESIS	45
5. OBJETIVOS	46
5.1 Objetivo General	46
5.2 Objetivos específicos.....	46
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	47
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
7.1 Recolección de muestras de aire	48
7.2 Preparación y almacenamiento de las muestras	49
7.3 Extracción de RNA	49
7.4 Secuenciación masiva	50
7.5 Análisis de la calidad de las secuencias.....	51
7.6 Eliminación de adaptadores y de nucleótidos de baja calidad	51
7.7 Eliminación de las secuencias redundantes.....	52

7.8	Análisis preliminar con la herramienta Kraken	52
7.9	Validación: asignación taxonómica con Taxonomer	54
7.10	Asignación taxonómica de los “ <i>contigs</i> ” con MEGAN Metagenomics.....	54
7.10.1	Ensamblaje <i>de novo</i> para la obtención de “ <i>contigs</i> ”	54
7.10.2	BLASTx de las secuencias	55
7.10.3	Análisis de diversidad microbiana con MEGAN metagenomics.....	56
7.11	Identificación de secuencias de RNA de microorganismos potencialmente patógenos presentes en las muestras.	57
7.11.1	Identificación del virus de la Influenza A H1N1 en las muestras colectadas	58
7.12	Análisis de secuencias que correspondan a genes relacionados con resistencia a antimicrobianos.	60
7.13	Análisis de secuencias que correspondan a factores de virulencia.	61
8.	RESULTADOS	62
8.1	Datos de temperatura y humedad relativa.....	62
8.2	Concentraciones de RNA en las muestras de aire	66
8.3	Análisis preliminar con Kraken.....	68
8.4	Validación: asignación taxonómica con Taxonomer	73
8.5	Análisis de la biodiversidad de las muestras ambientales a partir de los “ <i>contigs</i> ” con MEGAN Metagenomics.....	75
8.6	Microorganismos “potencialmente patógenos” encontrados a partir del análisis preliminar de los <i>contigs</i>	81
8.6.1	Detección del virus de la influenza A H1N1 en las muestras de aire	83
8.6.2	Detección del virus de la influenza A H1N1 en las muestras de superficies.....	84
8.7	Identificación de genes que codifican para proteínas implicadas en la	84
	resistencia a antimicrobianos	84
8.8	Identificación de genes que codifican para factores de virulencia	95
9.	DISCUSIÓN.....	98
9.1	Diversidad taxonómica partiendo de las lecturas y de los “ <i>contigs</i> ”	98
9.2	Agentes biológicos que pueden causar enfermedades en humanos.	100
9.3	Genes de resistencia a los antimicrobianos.....	103
9.4	Factores de virulencia	106
10.	CONCLUSIONES	109
11.	PERSPECTIVAS	110
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	111
13.	ANEXOS	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alternativas metodológicas para el estudio de bioaerosoles.	15
Figura 2. Transferencia vertical y horizontal de genes.	21
Figura 3. Conjugación, transformación y transducción.	23
Figura 4. Abundancia relativa de genes que confieren resistencia a los antimicrobianos presentes en el aire de 19 ciudades alrededor del mundo.	43
Figura 5. Estrategia experimental.	47
Figura 6. Formato Fastq.	51
Figura 7. Algoritmo de clasificación utilizado por la herramienta Kraken.	53
Figura 8. Reporte taxonómico en Kraken.	53
Figura 9. Programación de la PCR en el termociclador.	59
Figura 10. Gráfico FastQC de la muestra de aire de vagón tomada el 12 de noviembre.	67
Figura 11. Asignación taxonómica de las lecturas en las categorías bacterias, eucaria y virus.	69
Figura 12. Diversidad taxonómica a nivel Fila en las muestras de aire.	70
Figura 13. Géneros bacterianos predominantes en todas las muestras.	71
Figura 14. Diversidad taxonómica a nivel de géneros en las muestras de aire.	72
Figura 15. Asignación taxonómica realizada con Taxonomer.	74
Figura 16. Fila bacterianos predominantes según Taxonomer.	75
Figura 17. Asignación taxonómica con MEGAN metagenomics.	77
Figura 18. Análisis funcional de las proteínas implicadas en la virulencia que estuvieron presentes en las muestras.	78
Figura 19. Proteínas relacionadas con virulencia y resistencia a los antibióticos que estuvieron presentes en las muestras.	80
Figura 20. Abundancia de microorganismos con potencial patógeno en los diferentes sitios muestreados.	82
Figura 21. Diversidad de beta-lactamasas encontradas en las muestras.	90
Figura 22. Alineamiento del contig NODE_290_length_220_cov_2.872727 contra su referencia en la base de datos CARD por medio de BLASTx.	92
Figura 23. Alineamiento de la lectura NS500502:84:HCCVTBGX9:2:12103:20278:18413 contra su referencia en la base de datos CARD por medio de BLASTx.	92

Figura 24. Alineamiento de la lectura NS500502:84:HCCVTBGX9:1:21204:14351:19874 contra su referencia en la base de datos CARD por medio de BLASTx.	93
Figura 25. Alineamiento de la lectura NS500502:84:HCCVTBGX9:1:22103:16524:19743 contra su referencia en la base de datos CARD por medio de BLASTx.	94
Figura 26. Alineamiento del contig NODE_1198_length_252_cov_1.852792 contra su referencia en la base de datos CARD por medio de BLASTx.	94
Figura 27. Tipos de factores de virulencia predominantes en todas las muestras clasificados según su función.	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sitios y fechas de muestreo en la estación del metro Hospital 20 de noviembre y en el Hospital 20 de noviembre.	48
Tabla 2. Formato tabular en BLAST.	56
Tabla 3. Clasificación de los agentes biológicos (Advisory Committee on Dangerous Pathogens, 2016), (Institute for Occupational Safety and Health of the German Social Accident Insurance, 2019).	57
Tabla 4. Mezcla de reacción para la PCR en tiempo real.	58
Tabla 5. Cebadores propuestos por el CDC para detectar influenza A H1N1.	59
Tabla 6. Temperatura y humedad relativa durante la toma de muestras del 1 y 2 de octubre.	62
Tabla 7. Temperatura y humedad relativa durante la toma de muestras del día 22 de octubre.	63
Tabla 8. Temperatura y humedad relativa durante la toma de muestras del día 12 de noviembre.	64
Tabla 9. Temperatura y humedad relativa durante la toma de muestras del día 26 de noviembre.	65
Tabla 10. Concentraciones de RNA y relación 260/280, 260/230 de las muestras de aire que fueron seleccionadas para mandar a secuenciar.	66
Tabla 11. Análisis de la calidad de las secuencias: número de lecturas totales, % de GC y calidad según el score de PRHED.	68
Tabla 12. Número de lecturas asignadas por categoría por muestra.	73
Tabla 13. Análisis de la calidad del ensamblaje de novo por QUAST.	76
Tabla 14. Grupos de proteínas relacionadas con virulencia y resistencia, que fueron encontradas en el análisis funcional de MEGAN.	79
Tabla 15. Detección de influenza AH1N1 en las muestras de aire.	83
Tabla 16. Detección del virus de la influenza A H1N1 en las muestras de superficies.	84

Tabla 17. Proteínas implicadas en la resistencia a los antimicrobianos que se encontraron en las muestras..... 85

Tabla 18. Tabla comparativa de las proteínas implicadas en la resistencia a los antimicrobianos que se encontraron en las muestras. 89

Tabla 19. Factores de virulencia que se encontraron presentes en todas las muestras. 97

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

RNA-seq	secuenciación de RNA
RNAr	RNA ribosomal
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
NGS	secuenciación de nueva generación
cDNA	DNA complementario
FV	Factores de virulencia
LPS	Lipopolisacáridos
LOS	Lipooligosacáridos
UFC	Unidad formadora de colonias
OXA	Oxacilinasas
GRA	Genes de resistencia a los antimicrobianos
BRA	Bacterias resistentes a los antimicrobianos
OTU	Unidades Taxonómicas operativas
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineación local.
MEGAN	Analizador de metagenomas.
CARD	Base de datos completa de resistencia a los antibióticos.
VFDB	Base de datos de los factores de virulencia.
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica.
ACDP	Comité asesor sobre patógenos peligrosos
DGUV	Instituto de seguridad y salud laboral del seguro social alemán de accidentes.
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades
SAM	Mapa de alineación de secuencia
BAM	Mapa de alineación binario
SD	Desviación Estándar
EF-tu	Factor de elongación Tu

RESUMEN

Las comunidades microbianas de un espacio confinado podrían contribuir directamente sobre el funcionamiento del ecosistema y sobre la salud humana. Dado que las comunidades microbianas no existen de forma aislada, sino que están en constante interacción es de esperarse que ocurran procesos de intercambio de material genético. Mecanismos como la transferencia lateral de genes, la conjugación y la transducción ocurren activamente en el ambiente y contribuyen a la evolución de las comunidades microbianas.

En el presente estudio se describe la diversidad de los microorganismos presentes en muestras de aire recolectadas en la estación del metro Hospital 20 de noviembre y el Centro Médico Nacional Hospital 20 de noviembre, a partir de la secuenciación mediante RNA-seq del RNA aislado de las muestras.

Los resultados obtenidos revelan que las Proteobacterias, Actinobacterias y Firmicutes figuran como filo predominantes y que la mayor contribución se atribuye a los géneros *Acinetobacter* (4.07%), *Paracoccus* (3.81%), *Pseudomonas* (3.38%), *Corynebacterium* (2.20%) y *Propionibacterium* (2.06%). Si bien, no es viable catalogar a los microorganismos como “patógenos” sin hallazgos de causalidad que lo comprueben, en el análisis preliminar se identificaron especies que pueden causar enfermedades en humanos y que se relacionan con infecciones nosocomiales en entornos hospitalarios, tal es el caso de *Acinetobacter Baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, todas las cuales se relacionan con infecciones respiratorias. Además, se identificó por medio de PCR en tiempo real la presencia del virus de la Influenza A H1N1 en muestras de superficies y aire durante los meses de octubre y noviembre del año 2018.

Otro hallazgo interesante fue encontrar genes que codifican para beta-lactamasas, transportadores multidrogas y factores de virulencia que aumentan la capacidad de supervivencia y resistencia de las comunidades microbianas.

ABSTRACT

Microbial communities in a confined space could contribute directly to the ecosystem functioning and to human health. Since microbial communities do not exist in isolation, but are in constant interaction, it is expected that exchange processes of genetic material occur. Mechanisms such as lateral gene transfer, conjugation and transduction actively occur in the environment and contribute to microbial communities evolution.

The present study describes the diversity of microorganisms present in air samples collected at the subway station "Hospital 20 de noviembre" and the National Medical Center "Hospital 20 de noviembre", from sequencing by RNA-seq of RNA isolated from samples.

The results obtained reveal that Proteobacteria, Actinobacterias and Firmicutes appear as the predominant phyla and that the greatest contribution is attributed to the genera *Acinetobacter* (4.07%), *Paracoccus* (3.81%), *Pseudomonas* (3.38%), *Corynebacterium* (2.20%) and *Propionibacterium* (2.06%). Although it is not feasible to classify microorganisms as "pathogens" without causality findings that prove it, species that can cause diseases in humans and that are related to nosocomial infections in hospital settings were identified, such as *Acinetobacter Baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, all of which are related to respiratory infections. In addition, the presence of the H1N1 Influenza A virus in surface and air samples was identified through real-time RT-PCR during the October-November 2018 period.

Another interesting finding was identify genes that code for beta-lactamases, multi-drug transporters and virulence factors that increase the microbial communities survival and resistance capacity.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Estudio de la diversidad de las comunidades microbianas en los bioaerosoles de ambientes urbanos

Las comunidades microbianas y su contribución e impacto sobre los ambientes urbanos han sido un foco de interés durante los últimos años. Se define como comunidad microbiana al conjunto de microorganismos definidos que coexisten en el espacio y en el tiempo y que por ende, tienen el potencial de interactuar entre ellos y con el ambiente en el que se encuentran (Nemergut *et al.*, 2013). La importancia de estudiar estas comunidades en parte radica en entender las posibles interacciones y sus implicaciones (es decir, estas interacciones pueden ser favorables para ambas partes, o uno de ellos puede afectar a otro u otros pueden inhibir su crecimiento y regular naturalmente la población del ecosistema) (Pacheco and Segrè, 2019). Un ejemplo claro son los virus, los cuales resultan ser importantes en el control de las comunidades microbianas participando como depredadores; se calcula que cerca de $1e^{27}$ virus por minuto inducen la muerte de aproximadamente $1e^{25}$ microbios cada 60 segundos (Rohwer *et al.*, 2009). Además, los virus son capaces de impulsar la evolución microbiana, a través de la competencia entre especies (sobre todo bacterianas) (Winter *et al.*, 2010).

Las comunidades microbianas se pueden encontrar depositadas en las superficies, en el suelo o suspendidas en el aire como bioaerosoles (Tolabi *et al.*, 2019). El término bioaerosol indica la presencia atmosférica de partículas suspendidas de origen biológico como células bacterianas, esporas de hongos, virus, polen y sus productos derivados como las endotoxinas (Stetzenbach *et al.*, 2004).

Debido a la creciente evidencia que afirma que la composición de los bioaerosoles puede tener efectos críticos en los sistemas biológicos, ha aumentado el interés por estudiarlos. Por ejemplo, los bioaerosoles podrían afectar negativamente la salud humana y el funcionamiento del ecosistema a través de la propagación de patógenos de animales, plantas y humanos (Bertolini, 2014).

La mayoría de las personas en los países desarrollados pasan aproximadamente el 90% de su tiempo en varios microambientes interiores, de modo que quedan expuestas a la fracción biológica de las partículas en suspensión en el aire (Taylor *et al.*, 2004), las cuales pueden ser de naturaleza alérgica y como ya también se mencionó, patógena. Por otro lado, aunque no existe evidencia que lo demuestre, se ha propuesto también que algunos microorganismos presentes en la atmósfera podrían ser capaces de degradar diferentes contaminantes presentes en el aire en las partículas atmosféricas (mejor conocidas como PM), dichas partículas no sólo tienen un impacto importante sobre la salud del ser humano, sino que también afectan sobre el clima y los procesos de precipitación (Bertolini, 2014).

Una amplia variedad de técnicas permiten el estudio de los bioaerosoles, el más convencional de estos consiste en hacer medios de cultivo que son colocados en espacios abiertos con el objetivo de que por sedimentación gravitacional se depositen en dicho medio y crezcan (Buttner M *et al.*, 2002) (Figura1). Aunque este método había sido considerado el estándar de oro para identificar y describir microorganismos, tiene la desventaja de que permite el análisis de un número limitado de aislados y por lo tanto subestima tanto el número como la diversidad de microorganismos presentes en un entorno dado (Núñez *et al.*, 2016), además se sabe que menos del 1% de los microorganismos totales pueden ser cultivados eficientemente (Bertolini, 2014). Una alternativa que surgió para mejorar algunas de estas limitantes, fue la extracción del material genético de los medios de cultivo y la posterior amplificación del gen 16S del RNAr por medio de la PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), a partir de estos amplicones se construyen bibliotecas para la secuenciación. De este modo se evitan los sesgos vinculados a los cultivos en el laboratorio (Buttner M *et al.*, 2002). El gen 16S del RNAr se utiliza en estos casos como un marcador filogenético que permite identificar microorganismos individuales, hacer un estudio comunitario o cuantificar el número total de bacterias (Bertolini, 2014).

García-Mena y sus colaboradores (García-Mena *et al.*, 2016) realizaron un estudio en donde recolectaron muestras de bioaerosoles por medio del método de sedimentación gravitacional en medios de cultivo en diferentes puntos de la ciudad de México durante las temporadas de invierno, primavera, verano y otoño en los

años 2008-2012. En el análisis de las secuencias (secuenciación por el método de Sanger) de la región hipervariable V3 del gen 16S los autores encontraron principalmente bacterias pertenecientes a los filo firmicutes, Proteobacterias y Actinobacterias, y diferentes géneros como *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Erwinia spp.*, *Gluconacetobacter spp.*, *Proteus spp.* y *Staphylococcus spp.*

Una segunda alternativa para el estudio de los bioaerosoles son los colectores de aire comerciales, que permiten por succión y fuerza centrífuga depositar aire del ambiente en tubos que contengan un medio apto para el mantenimiento de los microorganismos (Figura 1) (Carvalho *et al.*, 2008). Este método de muestreo es eficaz para coleccionar microorganismos que no son cultivables, y permite captar la gran diversidad presente en el ambiente, sin embargo, se enfrenta al desafío de que durante la caracterización de estas partículas en el aire (utilizando la tecnología de secuenciación de nueva generación), hay una baja abundancia de ellos y como resultado, baja cantidad de material genético al momento de hacer las extracciones. Como alternativa se ha propuesto recolectar grandes volúmenes de aire en poco tiempo o bien tomar muestras a flujos más bajos, pero en tiempos prolongados (Núñez *et al.*, 2016). Si consideramos que la abundancia y diversidad de los bioaerosoles pueden cambiar muy rápido en función del flujo de aire y el flujo de personas en el ambiente; la segunda opción parece ser la más viable para la obtención de muestras representativas (Núñez *et al.*, 2016).

El surgimiento de la secuenciación de nueva generación (NGS), mejoró en gran manera la capacidad de describir comunidades microbianas, ya que el material genético que se extrae de las muestras de aire colectadas es mandado a secuenciar y se obtienen millones de secuencias de fragmentos de material genético de una muestra biológica (Boers *et al.*, 2019). Estos resultados posteriormente son usados para ensamblar las secuencias y analizar la diversidad de microorganismos presentes utilizando herramientas bioinformáticas (Boers *et al.*, 2019).

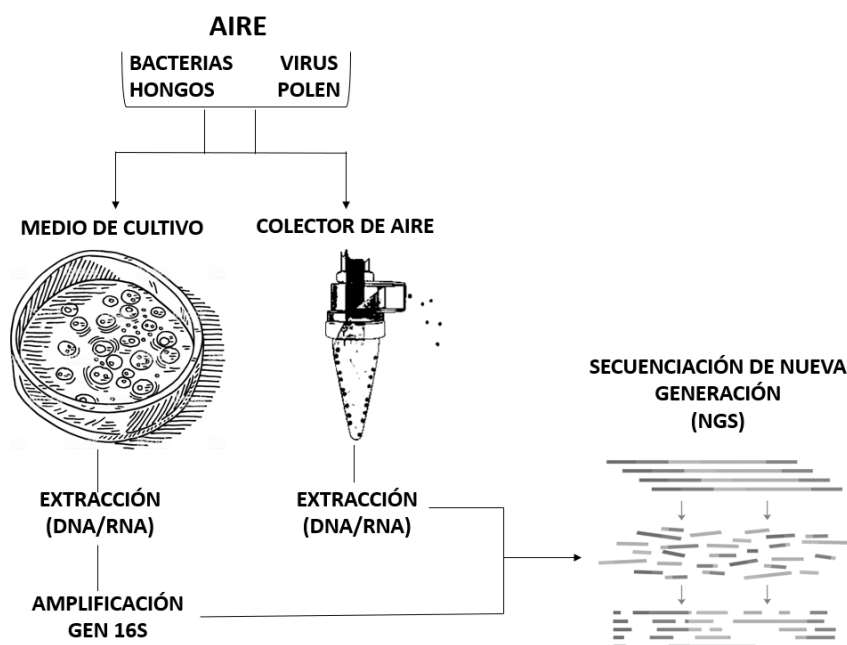


Figura 1. Alternativas metodológicas para el estudio de bioaerosoles.

Los bioaerosoles pueden ser recolectados por el método de sedimentación gravitacional o por colectores de aire comerciales. El material genético de las muestras se extrae y se pueden obtener amplicones del gen 16S para hacer una secuenciación de amplicones o bien mandar directamente a secuenciación masiva el material genético obtenido.

Una debilidad intrínseca de los métodos de secuenciación es que no se puede distinguir entre lo vivo y lo muerto, o partículas biológicas completas y fragmentadas. Esto es importante considerando que los hongos patógenos, virus, bacterias o esporas resistentes, generalmente necesitan ser metabólicamente activos para inducir cualquier enfermedad, mientras que, fragmentos de estos no son viables para producirlas (Núñez *et al.*, 2016), por otro lado para el polen y los alérgenos fúngicos, incluso los fragmentos pueden inducir síntomas clínicos cuando se supera un umbral (Taylor *et al.*, 2004). A pesar de esta limitante, la secuenciación de nueva generación permite una fácil identificación de cualquier tipo de organismo a la vez y tiene potencial para identificar patógenos y sustancias alergénicas, esto la posiciona como una herramienta prometedora para el monitoreo de bioaerosoles y descripción del genoma del aire (Viegas *et al.*, 2017).

1.1.2 RNA-seq

Podemos darnos una idea de la viabilidad de los microorganismos patógenos presentes en las muestras y saber si están siendo metabólicamente activos por la expresión de sus genes. El RNA-seq (secuenciación del RNA) es una herramienta transcriptómica basada en los desarrollos NGS. Esta tecnología consiste en la captura del RNA total, el cual se fragmenta y convierte en una librería de cDNA para la posterior obtención de las secuencias que serán analizadas (Wang *et al.*, 2009).

El desarrollo del RNA-seq como herramienta transcriptómica hace posible obtener perfiles de expresión asociados a respuestas de defensa (Wang *et al.*, 2009), a resistencia a los antimicrobianos (Wang *et al.*, 2009), y a expresión de factores de virulencia (Wang *et al.*, 2009). Lo anterior ofrece buenas posibilidades para profundizar en el entendimiento de los mecanismos que se activan durante las respuestas e interacciones del ambiente y que resultan ser de interés particular para la salud pública.

Cada ciudad tiene un perfil microbiano particular, que es definido por las condiciones ambientales y epidemiológicas del sitio (Wang *et al.*, 2009). Más específicamente, existen perfiles de resistencia que cambian en función de las amenazas a las que los microorganismos están constantemente sometidos (por ejemplo, el consumo de antimicrobianos). De hecho, estos perfiles de resistencia se han descrito en hospitales y ameritan el estudio y evaluación constante de los centros de salud para identificarlos y solucionarlos debido al creciente número de enfermedades nosocomiales causadas por patógenos oportunistas (Gashe *et al.*, 2018).

El análisis de secuencias obtenidas por RNA-seq puede proporcionar una mejor comprensión de las comunidades microbianas que son potencialmente activas dentro de los entornos, siempre y cuando la cantidad del RNA sea lo suficientemente alta y tenga buena pureza.

1.2 Comunidades microbianas y su importancia en el ambiente y la salud pública

Los microorganismos como bacterias, hongos, parásitos y virus a menudo forman algunas redes complejas de interacción dentro del ecosistema en lugar de existir como células individuales (Tshikantwa *et al.*, 2018). Estas interacciones pueden darse entre la misma especie, con diferentes especies, o incluso entre diferentes géneros y familias. Los patrones de interacción dentro de estas redes pueden ser positivos (en beneficio de las especies), negativos (pérdida) o neutrales (donde no hay ningún efecto en las especies que interactúan) (Tshikantwa *et al.*, 2018). Las formas en que las especies microbianas interactúan entre sí y con su huésped es un problema complejo que solo comienza a ser entendido.

En el medio ambiente, las bacterias juegan un papel importante eliminando metales pesados contaminantes del suelo a través de tres procesos: movilización de metales; transformación y desintoxicación (Chen *et al.*, 2015) (Tiwari and Lata, 2018). Otra actividad que desempeñan las bacterias y que brinda un beneficio ecológico es la descomposición o la biodegradación de materiales orgánicos complejos en formas de carbono que pueden ser utilizadas por otros organismos (Díaz, 2008).

Las bacterias también participan en la fijación del Nitrógeno en una forma utilizable, sin embargo, una dificultad que tienen es que una de las enzimas necesarias para la fijación de nitrógeno es destruida por el oxígeno. Una solución a esto es la formación de relaciones simbióticas con otros organismos (como los hongos) que les confieren la capacidad de metabolizar el nitrógeno sin que las enzimas bacterianas sean inactivadas por el oxígeno (Madigan *et al.*, 2017).

Un ejemplo claro de interacción microbiana competitiva y cooperativa es la producción de sideróforos. Los sideróforos son agentes quelantes que secuestran el hierro del ambiente y lo hacen disponible para su uso en numerosos procesos esenciales, ya que el hierro es un importante factor regulador de la virulencia en muchos microbios patógenos (Ahmed and Holmström, 2014). No todos los microorganismos presentes en el medio son capaces de sintetizar estas moléculas y para aquellos que pueden hacerlo resulta ser un proceso energéticamente costoso, de modo que en las comunidades microbianas hay productores de sideróforos y

aquellos que explotan dicho recurso sin pagar el costo de producirlo (Niehus *et al.*, 2017). En este sentido podemos ver interacciones de cooperación (entre las comunidades productoras) pero también de competencia para el aprovechamiento del recurso disponible (entre comunidades productoras y no productoras).

Algunas especies de *Pseudomonas*, sintetizan un grupo de sideróforos llamados pioverdinas, las cuales actúan como moléculas de señalización que desencadenan una cascada que resulta en la producción de factores de virulencia como la exotoxina A (Lamont *et al.*, 2002). Otras funciones que desempeñan estas moléculas quelantes en las comunidades microbianas son como agentes en la regulación del estrés oxidativo, como antibióticos, y mejorando la adaptación microbiana en diferentes ambientes (Johnstone and Nolan, 2015).

Además de las interacciones microbianas dadas por la síntesis de metabolitos o moléculas secundarias, hay interacciones que permiten que los microorganismos estén protegidos de la acción de los anticuerpos, del ataque de las células fagocíticas y de los tratamientos antimicrobianos (Stewart and Costerton, 2001). La formación de biopelículas es un mecanismo que promueve la interacción microbiana entre una o varias especies y tiene como fin otorgar a dichas comunidades un espacio en donde puedan sobrevivir y nutrirse sin verse afectados por las amenazas a las cuales están constantemente sometidos (Yung-Hua Li *et al.*, 2016). La biopelícula o *biofilm* es un ecosistema microbiano organizado, en el cual los microorganismos están asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas (Donlan and Costerton, 2002).

Las biopelículas permiten que las comunidades microbianas obtengan los nutrientes necesarios para su supervivencia a través de alimentación cruzada. La alimentación cruzada es un tipo de cooperación en donde se forman cadenas alimentarias dentro de la comunidad (Celiker and Gore, 2013). Por ejemplo, los estreptococos orales son bien conocidos por su capacidad de generar ácido láctico a partir de la fermentación del azúcar, mientras que otros microorganismos como *Veillonella sp.*, no pueden fermentar el azúcar, pero usan ácido láctico como fuente de carbono preferida para generar energía (Guo *et al.*, 2014).

La formación de biopelículas se ha relacionado también a infecciones resistentes debido a diferentes mecanismos que le confieren protección (Mah and O'Toole, 2001):

- 1.-Proporciona una barrera física y química que impide la penetración de los antimicrobianos (Singh *et al.*, 2016).
- 2.-El microambiente del biofilm puede antagonizar la acción del antibiótico (Hobley *et al.*, 2015).
- 3.-La activación de respuestas ante el estrés provoca cambios en la fisiología de los microorganismos de modo que se promueve la aparición de un fenotipo específico del *biofilm* que activamente combate los efectos negativos de las sustancias antimicrobianas (Lasa *et al.*, 2005).

Las biopelículas también permiten evadir el sistema inmune del hospedero y evitar la detección y fagocitosis bacteriana a través de la activación de reguladores de respuesta, interruptores o supresores genéticos que afectan la actividad de las células inmunes (González *et al.*, 2018). Aunado a ello, la sustancia polimérica extracelular (EPS) que constituye a las biopelículas, ha demostrado reducir la quimiotaxis, inhibir la activación del sistema de complemento e inhibir la fagocitosis de los macrófagos y neutrófilos, lo anterior se ha observado en *Pseudomonas aeruginosa* (Jensen *et al.*, 2010).

Si bien la creación de biofilms puede ser ventajosa para una o varias especies microbianas, para otras puede resultar perjudicial. Por ejemplo, la formación de biopelículas bacterianas en hongos es antagonista del crecimiento fúngico debido a la utilización bacteriana de los hongos como fuentes de nutrientes, además, los productos bacterianos extracelulares contribuyen a la muerte de las hifas fúngicas (Hogan *et al.*, 2007).

En un contexto general las interacciones entre microorganismos de diferentes especies contribuyen importantemente a los ecosistemas, pero también aumentan la probabilidad de supervivencia, infección y resistencia en comunidades microbianas

que son patógenas para el humano (Braga *et al.*, 2016), esto es importante si consideramos que en el contexto de la salud pública hoy en día nos enfrentamos a un importante problema de resistencia ante los agentes antimicrobianos.

1.3 Mecanismos de resistencia microbiana

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno mundial emergente que la OMS ha designado como uno de los tres problemas más importantes que enfrenta la salud humana en este siglo (Boucher *et al.*, 2011). La introducción de fármacos con actividad antimicrobiana (antibióticos, antimicóticos, antivirales, etc.) en la práctica clínica y su uso irracional propició una pronta diseminación de mecanismos de resistencia en bacterias y posteriormente en virus, parásitos y hongos (Pérez, 2017). La situación es crítica si consideramos además el hecho de que la industria farmacéutica no ha trabajado en producir nuevos antimicrobianos durante los últimos años dada la poca rentabilidad de este grupo de fármacos en comparación con los utilizados para tratar enfermedades crónicas-degenerativas.

La resistencia a algunas familias de antimicrobianos puede transmitirse de generación a generación en microorganismos de la misma especie por medio de transmisión vertical (Tortora, Funke and Case, 2007) (Figura 2). Esto les confiere ventajas competitivas con respecto a otras cepas.

La resistencia a los antimicrobianos también puede ser el resultado de la interacción de muchos organismos con su entorno, la mayoría de los compuestos antimicrobianos son moléculas producidas naturalmente y, como tal, las bacterias co-residentes han desarrollado mecanismos para superar su acción con el fin de sobrevivir y adaptarse (Munita *et al.*, 2016). El proceso anterior es conocido como "resistencia adquirida". El término "resistencia adquirida" se refiere a una población que originalmente era susceptible al compuesto antimicrobiano pero que desarrolló resistencia por el resultado de mutaciones en genes claves o debido a la adquisición de determinantes genéticos externos de resistencia (Munita *et al.*, 2016), es decir, por intercambio de genes de resistencia (transferencia horizontal). En el caso de las bacterias, la transferencia horizontal de genes les permite adquirir la resistencia a

uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos (Figura 2).

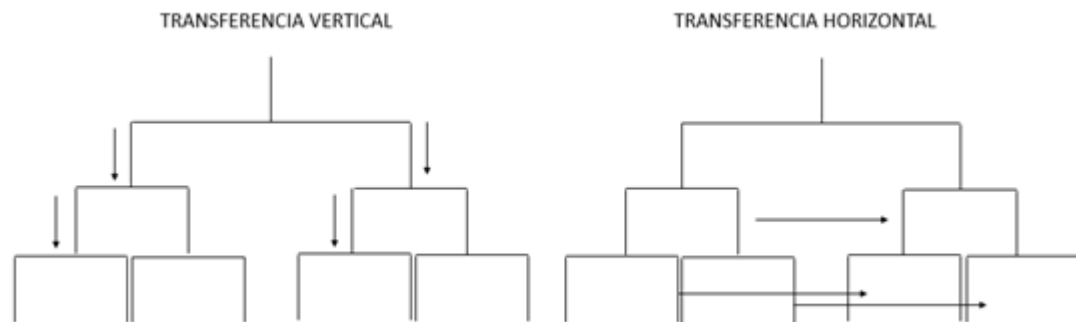


Figura 2. Transferencia vertical y horizontal de genes.

La transferencia vertical de genes se da entre microorganismos de la misma especie y se transmite por generaciones y la transferencia horizontal se puede dar entre diferentes especies microbianas y puede darse mediante diferentes mecanismos (conjugación, transducción y conjugación).

1.3.1 Resistencia adquirida por mutaciones

Las poblaciones microbianas son susceptibles a mutaciones en genes que modulan negativamente la actividad del fármaco antimicrobiano, resultando en su supervivencia. Una vez que emerge un mutante resistente, el antibiótico elimina la población susceptible y selecciona las resistentes (Munita *et al.*, 2016). Las mutaciones que resultan en resistencia antimicrobiana alteran la acción antibiótica a través de diferentes mecanismos:

- 1.-Disminuyendo la afinidad por el fármaco (modificación del sitio blanco) (Traub and Nomura, 1968).
- 2.- Disminuyendo la absorción del fármaco (Knopp, 2018).
- 3.- Por activación de bombas clave para expulsar la molécula dañina (Eicher *et al.*, 2012).
- 4.-Por cambios en las vías metabólicas importantes para el fármaco (por ejemplo, por producción de enzimas que inactivan el antimicrobiano) (Morar and Wright, 2010).

1.3.2 Resistencia adquirida por transferencia horizontal de genes

La transferencia horizontal de genes puede darse a través de 3 diferentes procesos: conjugación (por plásmidos, integrones y transposones), transducción (mediada por fagos) y transformación (incorporación de DNA desnudo) (Figura 3) (Pérez, 2017).

Conjugación

La conjugación utiliza elementos genéticos móviles como vehículos para compartir información genética (Tortora, Funke and Case, 2007). Los elementos genéticos móviles mejor descritos en este proceso son los plásmidos (pequeños fragmentos de DNA circularizado), transposones (secuencias de DNA que se mueven de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula) e integrones.

Los integrones son sistemas de recombinación específicos de sitio que reclutan marcos de lectura abiertos en forma de casetes de genes móviles, estos proporcionan un mecanismo eficiente para la adición de nuevos genes en los cromosomas, junto con la maquinaria necesaria para asegurar su expresión (Munita *et al.*, 2016).

Se cree que la aparición de resistencia en el entorno hospitalario a menudo implica el mecanismo de conjugación (Lerminiaux and Cameron, 2019).

Transformación

La transformación es la alteración genética de una célula resultante de la incorporación de material genético exógeno de su entorno a través de las membranas celulares. Para que tenga lugar la transformación, las bacterias receptoras deben estar en un estado de competencia (Johnston *et al.*, 2014).

Transducción

La transducción es el proceso mediante el cual un virus introduce DNA extraño en una célula (Griffiths *et al.*, 2015). Cuando los bacteriófagos infectan las células bacterianas, estos aprovechan la maquinaria de la célula huésped para producir sus nuevos viriones. La transducción ocurre a través del ciclo lítico o del ciclo lisogénico. Si se adopta el ciclo lisogénico, el cromosoma del fago se integra en el cromosoma

bacteriano, donde puede permanecer latente durante miles de generaciones. Si se induce el lisógeno, el genoma del fago se elimina del cromosoma bacteriano e inicia el ciclo lítico, que culmina en la lisis de la célula y la liberación de partículas de fago. El ciclo lítico conduce a la producción de nuevas partículas de fago que se liberan por lisis del huésped (Griffiths *et al.*, 2015).

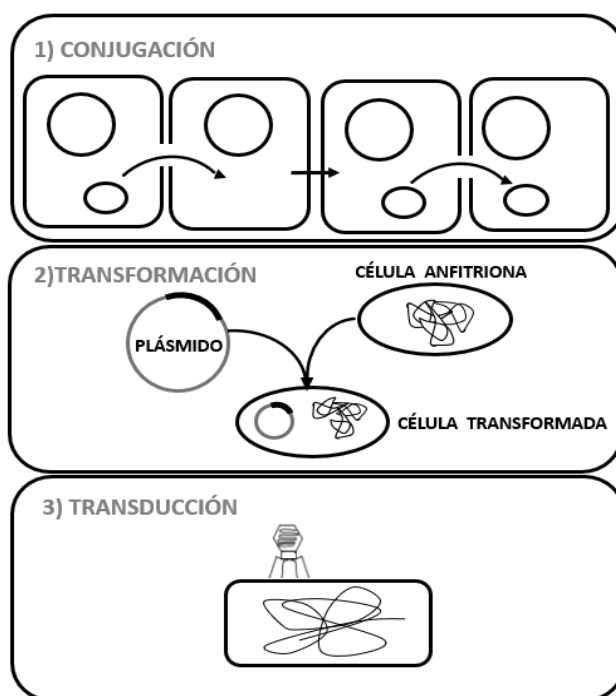


Figura 3. Conjugación, transformación y transducción.

1) La conjugación se da mediante el contacto directo entre dos células procariotas, en donde la célula donadora provee un elemento genético móvil que porta la información genética y la transfiere a la célula receptora. 2) La transformación consiste en la incorporación de material genético exógeno que se introduce a través de las membranas celulares. 3) En la transducción, un virus introduce su material genético a una célula bacteriana.

Actualmente, se conoce poco respecto a los mecanismos de resistencia que se dan activamente en los bioaerosoles, sería interesante identificar elementos móviles implicados en la transferencia horizontal de genes y genes de resistencia a los antimicrobianos en muestras de aire de espacios confinados.

1.4 Factores de virulencia

Los factores de virulencia (FV) son productos génicos que confieren a los microorganismos la capacidad de entrar, replicarse y persistir en un hospedero a su vez que aumenta su potencial para causar enfermedades (Cross, 2008). Los FV incluyen toxinas, proteínas de la superficie celular que median la unión, carbohidratos, proteínas de la superficie celular y enzimas hidrolíticas que pueden contribuir a la patogenicidad de los microorganismos (NHC Key Laboratory of Systems Biology of Pathogens, 2019).

Todo microorganismo patógeno posee la capacidad de producir un daño, a cualquier nivel, en un organismo hospedero susceptible. La virulencia es una medida cuantitativa de la patogenicidad y se mide por el número de microorganismos necesarios para causar una enfermedad, es decir, el grado de patogenicidad (Sanchez, 2011).

Los atributos microbianos que confieren el potencial de virulencia o patogenicidad son (Casadevall and Pirofski, 2009):

- 1.-Capacidad de ingresar a un hospedero
- 2.-Capacidad de evadir las defensas del hospedero
- 3.-Capacidad de contrarrestar las respuestas inmunes del hospedero
- 4.-Capacidad de competir por la obtención de nutrientes

Todos estos se logran mediante los diferentes mecanismos de virulencia. Los mecanismos de virulencia se clasifican en 2 tipos según la fase infectiva (temprana o tardía), dentro de estos mecanismos participan diversos FV (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014).

Es posible que un factor de virulencia confiera dos o más atributos y por ende, participe en varios mecanismos de virulencia, por ejemplo: las enzimas que digieren el tejido blanco dañan al hospedero, generan nutrientes y pueden promover la

entrada, y la evasión de la respuesta inmune del hospedero (Casadevall and Pirofski, 2009).

1.4.1 Mecanismos de virulencia que participan durante la fase infectiva temprana

Durante la fase infectiva temprana los mecanismos que participan son la adherencia, la quimiotaxis y la invasión por disparo o cierre (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014).

La adherencia es la capacidad que tiene el microorganismo de permanecer unido o fijarse a las células de un tejido blanco en el hospedero a través de moléculas de superficie (adhesinas o ligandos) que se unen a receptores específicos (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014). De este modo el microorganismo patógeno no es eliminado por las secreciones mucosas de su hospedero.

La quimiotaxis es un mecanismo mediante el cual las células microbianas se mueven como respuesta a un estímulo químico, a través del sistema de transducción de señales (Sourjik and Wingreen, 2012), esta respuesta tiene como fin tener un acercamiento con sustancias químico-atrayentes o favorables (como nutrientes) (Xu *et al.*, 2016) o bien, alejarse de las sustancias tóxicas, para lograrlo se hace uso de los flagelos y fimbrias. De este modo se ve favorecido el crecimiento de la población microbiana y su sobrevivencia (Gharasoo *et al.*, 2014).

La invasión por disparo o cierre, consiste en el uso de los sistemas de secreción. Los sistemas de secreción permiten transferir o inyectar proteínas propias del patógeno microbiano a las células eucariontes y de este modo facilitar su invasión y virulencia en la célula hospedera (Green and Mecsas, 2016). Los sistemas de secreción se pueden dividir en diferentes clases, en función de sus estructuras, funciones y especificidad:

Sistema de secreción tipo I: Consta de tres subunidades que incluyen la proteína ABC, la proteína de fusión a la membrana y la proteína de la membrana externa. En conjunto, estas subunidades forman un canal contiguo que cruza las membranas interiores y exteriores de las bacterias y permite el transporte de enzimas digestivas, como proteasas y lipasas, adhesinas y toxinas. Es un sistema sec-independiente, es decir, no necesita una secuencia señal ni un intermediario periplásmico (Thomas *et*

al., 2014). *E. coli* utiliza este sistema de secreción para transportar la toxina α (HlyA) (Gentschev *et al.*, 2002).

Sistema de secreción tipo II: Este sistema de secreción es complejo y consta de hasta 16 proteínas diferentes llamadas Gsp (General secretion pathway). Todas ellas se ensamblan en un complejo multiproteico que constituye una gran estructura (el secretón) que une el periplasma y lo conecta con el espacio extracelular a través de la membrana externa e interna (Green and Mecsas, 2016). El transporte en este sistema se da por una translocación de dos pasos, en donde primero, un precursor proteico desdoblado pasa a través de la membrana interna por el sistema Sec o bien, un precursor plegado por medio del sistema Tat (Keyzer *et al.*, 2003). Posteriormente, tras ser cortada la señal peptídica, se lleva a cabo el transporte de las exoproteínas maduras a través de la membrana externa a través del secretón (Green and Mecsas, 2016). *Vibrio Cholerae* a través de este sistema transporta la toxina del cólera (Zielke *et al.*, 2014).

Sistema de secreción tipo III o inyectisomas: Requiere más de 20 proteínas diferentes que forman parte del inyectisoma o que son requeridas para su ensamblaje. Es un sistema sec-dependiente utilizado por patógenos Gram-negativos para secretar proteínas con el fin de esquivar el sistema defensivo de la célula hospedera. Algunas de las bacterias que utilizan este sistema de secreción son *Yersinia spp*, *Salmonella*, *Burkholderia pseudomallei*, *Aeromonas salmonicida*, *Chlamydia spp.*, y *Bordetella pertussis* (Fernández, 2010).

Sistema de secreción tipo IV: La mayoría de estos sistemas están compuestos por 11 proteínas, llamadas de VirB1 a VirB11 (Fronzes *et al.*, 2009). Poseen una gran versatilidad en cuanto a la naturaleza del sustrato que transportan, que puede ser DNA, proteínas, o complejos nucleoproteicos, así como en cuanto al destino del sustrato transportado (Fernández, 2010). El DNA puede ser movilizado entre bacterias por conjugación, las proteínas pueden ser secretadas al medio extracelular, a otras bacterias (en conjugación), o a la célula eucariota (Green and Mecsas, 2016). *Helicobacter pylori* utiliza este sistema de secreción para inyectar el factor de virulencia CagA en las células epiteliales gástricas (Shibata *et al.*, 2006).

Sistema de secreción tipo V: Los sustratos del sistema de secreción de tipo V llevan su propio dominio de barril β , que se inserta en la membrana externa y forma un canal de modo que el resto de la proteína sea transportada a través de él (Van-Ulsen *et al.*, 2014). Para ello, las proteínas primero son translocadas a través de la membrana interna y dentro del periplasma en un estado desplegado de manera Sec-dependiente (Van-Ulsen *et al.*, 2014).

Los sustratos más conocidos de este sistema son factores de virulencia, que sirven como toxinas y proteínas de unión al receptor. Un ejemplo es la proteasa de la inmunoglobulina A (IgA) de *N. gonorrhoeae*, que escinde anticuerpos del hospedero (Green and Meccas, 2016).

Sistema de secreción tipo VI: Desempeña un papel clave en la competencia interbacteriana y las interacciones bacterianas con las células eucariotas. Son sistemas altamente versátiles dada su capacidad de proporcionar una amplia gama de proteínas efectoras, con distintas actividades y modos de interacción con la maquinaria de secreción (Coulthurst, 2019). El mecanismo por el cual se da el transporte a través de este sistema es conocido como “contracción” o “disparo”, en donde se impulsa a una estructura de punción extracelular fuera de la célula secretora. La fuerza de esta propulsión a su vez promueve la translocación contacto dependiente de las proteínas efectoras a las células diana (Coulthurst, 2019). Bacterias que utilizan este sistema de secreción son *P. aeruginosa* y *V. cholerae* (Russell *et al.*, 2017).

Sistema de secreción tipo VII: Este sistema está presente en los microorganismos Gram-positivos que contienen una capa densa de pared celular llamada micomembrana. Se compone de dos componentes básicos: una ATPasa (EccC) probablemente necesaria para el suministro de energía, y una proteasa (MycP) involucrada en el procesamiento de sustratos específicos. Además, una chaperona intracelular participa en el reconocimiento de los sustratos (Ates *et al.*, 2016). Este sistema de secreción es indispensable para la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* (Tiwari *et al.*, 2017).

1.4.2 Mecanismos de virulencia que participan durante la fase infectiva tardía

Durante la fase infectiva tardía los mecanismos que participan son: la sobrevivencia intracelular (a través de sideróforos y efectores de mimetismo molecular), la movilidad intracelular (por medio de efectores de escape vacuolar y de unión a componentes del citoesqueleto), la evasión de la respuesta inmune (por variación antigénica) y el sometimiento y confrontación (uso y modificación de enzimas hospederas) (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014).

La sobrevivencia intracelular consiste en la obtención de los recursos necesarios para la sobrevivencia del patógeno, para el caso del hierro algunas bacterias sintetizan sideróforos que les permiten unir el hierro a sus proteínas transportadoras y captarlo en la superficie celular (Hider and Kong, 2010). Algunos sideróforos actúan como moléculas de señalización que desencadenan cascadas que resultan en la producción de FV (Lamont *et al.*, 2002).

Otra estrategia de sobrevivencia intracelular bien estudiada es el mimetismo molecular. El mimetismo es el reconocimiento de una molécula extraña como si fuera propia debido a su similitud, pudiendo ocurrir que un microorganismo presente un mimetismo molecular con una molécula de un hospedero inmunocompetente. (Gowthaman and Eswarakumar, 2013). El mimetismo le confiere al patógeno una ventaja ofensiva o defensiva.

La movilidad intracelular es otra estrategia que utilizan los microorganismos durante las fases tardías de infección. Este es un mecanismo eficiente que involucra la internalización celular con el fin de evitar los procesos inmunes de la célula hospedera o bien, la unión a los diferentes componentes del citoesqueleto para facilitar la movilidad intracelular. Por ejemplo, se ha descrito que *Shigella dysenteriae* y *Listeria monocytogenes* usan actina para impulsarse a través del citoplasma en la célula infectada y propagarse hacia las células vecinas, de este modo logran invadir y destruir la mucosa intestinal del colon provocando una disentería (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014).

Evasión de la respuesta inmune por variación antigénica

Un buen ejemplo de evasión al sistema inmune es el virus de la influenza, en el cual constantemente se están introduciendo mutaciones en los genes que codifican para sus proteínas de superficie (hemaglutinina y neuraminidasa). La variabilidad antigénica de estas proteínas impide que los anticuerpos obtenidos en una infección o vacunación pasadas puedan proporcionar inmunidad protectora contra las nuevas cepas de influenza que circulan anualmente (Ryu, 2017).

En bacterias, la variación antigénica se ha reportado en *Campylobacter jejuni*, *S. pneumoniae*, algunos serogrupos de *N. meningitidis*, *H. influenzae*, y *Bacterioides fragilis* (Palmer *et al.*, 2016).

En las *N. gonorrhoeae*, los genes que codifican para la pilina (proteína que constituyen al pilli) consisten en uno o dos loci de expresión y diez a veinte loci silenciosos, cada uno conteniendo seis secuencias codificantes llamadas minicassettes (Varilly and Chandler, 2009). La variación antigénica de la proteína pilina resulta de una alta tasa de conversión entre loci silenciosos y de expresión. Así, es posible crear más de 106 combinaciones cuyos productos proteicos son antigénicamente distintos (Varilly and Chandler, 2009). Este mecanismo de variación antigénica ayuda a la bacteria a “escapar” de los anticuerpos específicos (Varilly and Chandler, 2009).

Sometimiento y confrontación

Cuando los patógenos microbianos se fijan a las células blanco de su hospedero utilizan a la célula para obtener nutrimentos y generar residuos, por lo tanto, la virulencia es facilitada por la producción de enzimas extracelulares y sustancias relacionadas (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014). El sometimiento consiste en el secuestro de algunas vías de señalización y en el uso y modificación de las enzimas de la célula hospedera en favor del huésped.

1.4.3 Tipos de factores de virulencia

Exotoxinas y endotoxinas

Algunos genes que son transportados en fagos, plásmidos o islas de patogenicidad pueden codificar para toxinas. Las toxinas bacterianas contribuyen a la virulencia al interferir con la homeóstasis celular. Es decir, algunas enzimas contribuyen a la virulencia al interferir con la función de los macrófagos e inhibir la respuesta inmune. La abolición de la producción de toxinas generalmente se acompaña de la anulación de la virulencia (Casadevall and Pirofski, 2009).

Las exotoxinas son toxinas secretadas extracelularmente que pueden causar gran daño al hospedero al destruir sus células o perturbar su metabolismo normal celular. Numerosas exotoxinas formadoras de poros también activan el inflamasoma (plataforma molecular que permite la liberación de IL-1 β e IL18). Algunas exotoxinas se comportan como superantígenos, y activan la liberación de citocinas por los linfocitos T. Ejemplos de exotoxinas son: exotoxinas tipo A y B, proteolíticas, formadoras de poro y alterantes de membrana (Cavaillon, 2018).

Las endotoxinas están presentes en las membranas externas de algunas bacterias como lipopolisacáridos (LPS) y lipooligosacaridos (LOS) y solo se liberan después de la destrucción de la pared celular. Las endotoxinas son estimulantes del sistema inmune, con un potente efecto tóxico y también desempeñan un papel importante en la adhesión a las células epiteliales (Raetz and Whitfield, 2002).

Modulinas

Las modulinas son compuestos microbianos que pueden dañar a una célula a través de un aumento en la producción de citoquinas o moléculas bioactivas similares (Casadevall and Pirofski, 2009). Algunas exotoxinas actúan como modulinas, otras modulinas importantes son: el LPS, los ácidos teicoicos y algunas proteínas de la membrana externa.

La familia de modulinas solubles en fenol (PSM) por ejemplo, desempeña múltiples funciones en la patogénesis del patógeno *Staphylococcus aureus* y contribuyen en gran medida al éxito patogénico debido a que causan la lisis de muchos tipos de

células humanas, incluidos los leucocitos y los eritrocitos, además estimulan las respuestas inflamatorias y contribuyen al desarrollo de biopelículas (Cheung *et al.*, 2014).

Enzimas

Las enzimas que se consideran FV contribuyen a la virulencia provocando un daño tisular que hace que el hospedero sea permisivo a la infección microbiana. También algunas enzimas pueden contribuir a la patogenicidad interfiriendo en la fagocitosis o inactivando sustancias antimicrobianas. Dentro de estos factores se encuentran las proteasas, neurominidasas y fosfolipasas. Estas enzimas dañan las células y a su vez proporcionan nutrimentos al digerir los sustratos en componentes más pequeños que pueden ser asimilados por los microbios (Casadevall and Pirofski, 2009).

Adhesinas

La mayoría de los patógenos microbianos que interactúan con sus hospederos eucariotas expresan moléculas adhesivas en sus superficies que promueven la interacción con los receptores de las células blanco del hospedero o con otras macromoléculas solubles (Kline *et al.*, 2009). Las adhesinas son moléculas químicamente diversas que incluyen proteínas, polisacáridos y componentes de la pared celular bacteriana. Algunas adhesinas bacterianas incluso interactúan con los fagocitos y llevan a cabo mecanismos que les permiten a través de esta interacción evadir la respuesta inmune innata (Kline *et al.*, 2009).

Sideróforos

Los sideróforos son factores de unión al hierro que permiten que algunas bacterias compitan con el huésped por el hierro, que se une a la hemoglobina, la transferrina y la lactoferrina (Peterson, 2013).

Cápsulas

Muchas bacterias están rodeadas de cápsulas que las protegen de la opsonización y la fagocitosis (Peterson, 2013).

Factores de invasión

Los mecanismos que permiten que una bacteria invada las células eucariotas facilitan la entrada en las superficies mucosas. Los componentes de la superficie que permiten que la bacteria invada las células huésped pueden codificarse en los plásmidos, pero con mayor frecuencia están en el cromosoma (Peterson, 2013).

El interés por estudiar en conjunto los factores de virulencia y la resistencia microbiana se fundamenta en el hecho de que los diferentes mecanismos de virulencia en microorganismos patógenos han experimentado un largo proceso evolutivo debido a la presión de selección provocada por la introducción de los antimicrobianos, esta presión ha obligado a los microorganismos a adaptarse a condiciones cambiantes, adquiriendo o desarrollando nuevos mecanismos de patogenicidad y resistencia de manera continua, provocando cambios importantes en las funciones celulares (Casadevall and Pirofski, 2009). Lo anterior repercute en las interacciones huésped-hospedero.

2. ANTECEDENTES PARTICULARES

La microbiota presente en el ambiente puede ser dinámica y sensible a los cambios por factores directos e indirectos que van desde la variación del clima exterior hasta el flujo de personas y el establecimiento de diversos micronichos (Tang *et al.*, 2018). El contacto directo entre las diferentes especies en un mismo ambiente da lugar a una gran variedad de interacciones que repercuten sobre los ecosistemas y la salud pública.

Por lo anterior, recientemente ha crecido el interés por describir las comunidades microbianas presentes en ambientes urbanos, en sitios en donde se concentran un gran número de personas y en donde además el flujo de aire es limitado (Šantl-temkiv *et al.*, 2019). Los lugares que cumplen con estas características son considerados “focos infecciosos”, dado el mayor riesgo de transmisión de enfermedades de tipo infecciosas (Porta *et al.*, 2008). Algunos ejemplos de focos infecciosos son los hospitales y los medios de transporte colectivos.

2.1 Estudio de las comunidades microbianas en ambientes hospitalarios

En los hospitales hay un enorme número de organismos transmisibles y virulentos que tienen su reservorio en las instalaciones o se propagan de paciente a paciente en una población susceptible, dando lugar a las infecciones transmitidas en los hospitales, mejor conocidas como enfermedades nosocomiales (Khan *et al.*, 2017). Estas infecciones pueden ser virales, bacterianas, protozoarias o fúngicas (Afshinneko *et al.*, 2015). A la fecha, hay insuficiente evidencia con respecto tanto a la fuente como al desarrollo de infecciones nosocomiales, además son pocos los hospitales que llevan a cabo un seguimiento constante para conocer las comunidades microbianas y los perfiles de resistencia que más predominan.

2.1.2 Estudios basados en medios de cultivos

En Colombia, Caicedo y sus colaboradores colectaron muestras de aire en medios de cultivo en diferentes unidades de cuidados intensivos para adultos, niños y

neonatos. El objetivo de este estudio fue identificar los patógenos que predominaban en estos sitios y que se asociaban con infecciones nosocomiales. En sus evidencias ellos reportaron la presencia de aerobacterias como *Staphylococcus* y *Pseudomonas spp* con una concentración máxima obtenida de $979,9 \pm 31,3$ UFC/m³ (Vélez and Camargo, 2014).

En Hamadan, Irán, se estudiaron 30 salas de espera en cinco hospitales educativos en donde se recogieron 180 muestras de aire (Vaidya, 2011). Las muestras se transfirieron a agar sangre y medio Sabouraud y se cultivaron. El objetivo del estudio fue evaluar que las concentraciones de los bioaerosoles estuvieran dentro de los parámetros establecidos. En sus resultados ellos observaron que en algunos hospitales las concentraciones de los bioaerosoles superaban las 30 UFC / m³ y por ende requerían de un mayor control y manejo de estrategias para mantener las concentraciones de los bioaerosoles dentro de los límites aceptables. Además, reportaron que los hongos que predominaron en las muestras fueron *Penicelium spp.* (32.06%), *Cladosporium spp.* (20.5%), *Aspergillus fumigatus* (14.61%) y *A. niger* (7.43%). Las bacterianas más abundantes en todas las muestras fueron estafilococos coagulasa negativos (32.49%), *Bacillus spp.* (14,74%), *Micrococcus spp.* (13,68%) y *Staphylococcus aureus* (11.34%). Con los hallazgos encontrados, los investigadores concluyeron que la densidad de los bioaerosoles de los hospitales se relaciona con la presencia de pacientes en salas y sus visitantes, de la ventilación incorrecta y la desinfección ineficiente. Este tipo de estudios permiten diseñar nuevas estrategias para el control de comunidades microbianas en entornos hospitalarios.

En México se llevó a cabo un estudio piloto para determinar la calidad del aire en dos hospitales en León, Guanajuato, México. Los objetivos del trabajo fueron identificar, determinar y caracterizar los propágulos fúngicos y aerobacterias dentro de estos sitios públicos, otro objetivo fue aislar y caracterizar los organismos que pudieran comportarse como patógenos potenciales en el ambiente hospitalario (Viegas *et al.*, 2017). Para ambos hospitales los niveles de bacterias y propágulos fúngicos estuvieron muy por arriba de los aceptables de acuerdo con lo establecido por la Organización Mundial de la Salud (WHO 1990). En el hospital 1 se encontraron 17

géneros de bacterias y 15 de hongos y en el hospital 2 se identificaron 17 géneros de bacterias y 22 de hongos. Dentro de los aislados obtenidos los que más predominaron fueron enterobacterias como *Escherichia coli*, *Enterobacter cancerogenus* y *Acinetobacter sp.* Entre los hongos, *Fusarium* y *Penicillium* fueron los más comunes, sin embargo también se encontraron hongos de gran importancia clínica como *Microsporium audouinii*, *Cladosporium oxysporum*, *Mucor ramosissimus* y *Cryptococcus albidus* (Viegas *et al.*, 2017).

El Dr. S. Sudharsanam y sus colaboradores colectaron muestras de aire por los métodos de placa expuesta, por el método de impacto con el colector de aire BioSampler y por el método de filtración (con un filtro de casete) en una sala de hospital que se encuentra al oeste de Chennai, India. Los investigadores encontraron que las cargas microbianas en hospitales varían según el método de muestreo, siendo mayor con el método de placa expuesta. En cuanto a diversidad encontraron sobre todo estafilococos, micrococos, y bacterias del género *Enterobacter* y *Pseudomonas* (Sudharsanam *et al.*, 2012).

2.1.3 Estudios libres de medios de cultivos

La tecnología de secuenciación masiva permite captar la diversidad del material genético de los microorganismos presentes en una muestra y a su vez permite detectar genes asociados a resistencia a antimicrobianos dentro de las diferentes comunidades microbianas, incluidas las de microorganismos no cultivables (Lax and Gilbert, 2015). La desventaja es que se ve reducida la capacidad de caracterizar cepas específicas.

En hospitales se han llevado a cabo investigaciones haciendo uso de la tecnología de secuenciación masiva para caracterizar el microbioma del aire e identificar microorganismos patógenos que pudieran estar presentes en las instalaciones, esto es de interés particular considerando que las personas por lo general llegan a permanecer en salas de espera u hospitalizados por períodos largos de tiempo, aumentando la probabilidad de infección. En un estudio dirigido por el Dr. Gregory Gray (Nguyen *et al.*, 2017), se identificó la presencia de virus respiratorios como

influenza y adenovirus en muestras de aire tomadas de una sala de espera en un hospital de Singapur.

En otro estudio donde se muestrearon las diferentes habitaciones de un hospital, se encontró que en los interiores que contaban con ventilación mecánica, había menos diversidad microbiana pero mayor número de organismos estrechamente relacionados con patógenos. Al abrir las ventanas de las habitaciones se reducía significativamente el porcentaje de bacterias patógenas en el aire (Kembel *et al.*, 2012). Con esta evidencia se concluyó que el flujo de aire influye directamente sobre el tipo y el número de microorganismos que habitan el microbioma del aire en entornos hospitalarios.

En un estudio realizado en Estados Unidos se tomaron muestras en entornos prehospituarios para analizar las comunidades microbianas y su influencia en la salud y las enfermedades humanas, otro de los objetivos de este estudio fue identificar genes asociados a la resistencia a los antimicrobianos. Por *shotgun* secuenciaron 398 muestras de 137 ambulancias (O'Hara *et al.*, 2017). Los hallazgos encontrados fueron que las 10 especies más abundantes correspondían a microbios ambientales comunes asociados con el microbioma humano o especies asociadas con infecciones nosocomiales. También encontraron evidencia de marcadores de resistencia a los antimicrobianos (hits ~ 90% de las muestras) (O'Hara *et al.*, 2017).

La transferencia lateral de genes asociados a resistencia a los antimicrobianos *in vivo* se ha evidenciado en entornos hospitalarios (Ciusa *et al.*, 2012) (Spanu *et al.*, 2009). También se han logrado identificar amenazas emergentes relacionadas con resistencia a múltiples fármacos en bacterias Gram-negativas en hospitales. El Dr. Evan Snitkin y sus colaboradores (Snitkin *et al.*, 2012) rastrearon un brote de *K. pneumoniae* resistente a los carbapenems en el año 2011 en el centro clínico del Instituto Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos a través de la secuenciación del genoma completo de aislados de pacientes. De manera interesante, *K. pneumoniae* estuvo presente aún cuando el equipo del hospital se sometió a una limpieza rigurosa, sugiriendo que la bacteria tenía un alto grado de estabilidad y

supervivencia. Este estudio permitió reconstruir la ruta de transmisión del brote e implementar nuevos métodos de control efectivos para evitar su diseminación. Además, demostró que la integración de datos genómicos y epidemiológicos en conjunto, pueden proporcionar información útil para facilitar el control de la transmisión de enfermedades nosocomiales.

Otro estudio a gran escala comparó aislamientos de *S. aureus* resistentes a meticilina distribuidos globalmente en los hospitales. Los investigadores partieron de los datos obtenidos de la secuenciación masiva, para desarrollar modelos filogenéticos, además de rastrear la propagación mundial de estas cepas en el transcurso de cuatro décadas (Harris *et al.*, 2010).

Las evidencias anteriores, en conjunto, sustentan la necesidad de estudiar las comunidades microbianas en los bioaerosoles de los entornos hospitalarios, en primer lugar, porque algunos de los microorganismos presentes en el aire pueden representar un riesgo para la diseminación enfermedades, y, en segundo lugar, debido a que es necesario diseñar estrategias de control para mantener las concentraciones de los bioaerosoles dentro de los límites aceptables, establecidos por la OMS. Dentro de estas estrategias se pueden incluir la adecuada ventilación, la limpieza y desinfección correcta de los materiales y de las diferentes áreas dentro de los hospitales y la vigilancia continua de los bioaerosoles para la detección oportuna de infecciones emergentes causadas por patógenos multirresistentes a los antibióticos.

2.2 Estudio de las comunidades microbianas en el medio de transporte colectivo “metro”

En la Ciudad de México según datos del INEGI habitan cerca de 8 918 653 personas, siendo la ciudad con mayor número de habitantes en el país (INEGI, 2018), de los cuales, aproximadamente 5.5 millones son usuarios del Metro de la Ciudad de México, que diariamente transitan por algunas de las 12 líneas que atraviesan la ciudad (Excelsior, 2017). Según un reporte proporcionado por la guía de transporte público moovit, el promedio de tiempo que los mexicanos dedican a desplazarse en

transporte público es de 88 min (Índice de Transporte Público de Moovit, 2018). En conjunto, el número elevado de usuarios, el tiempo de permanencia, la limitada exposición a la luz solar que tienen los transportes subterráneos y el uso deficiente de los sistemas de ventilación mecánica, figuran como importantes factores de riesgo para la exposición ante algún agente o microorganismo patógeno, ya que a menudo las personas están en contacto, tosen, estornudan o hablan a lo largo del viaje. Otros factores que contribuyen a la supervivencia y permanencia de patógenos microbianos es el contenido de humedad, la densidad del aire, la temperatura, las tasas de intercambio de aire e inclusive la infraestructura del sitio (Ghosh *et al.*, 2015).

A nivel mundial, se han realizado estudios cuyo objetivo primordial se centra en caracterizar la diversidad microbiana en las diferentes líneas que componen la red del metro en ciudades como Nueva York, Hong Kong y Barcelona. En Nueva York se recolectaron muestras de aire en un período de año y medio y los hallazgos encontrados mediante pirosecuenciación, se asociaron sobre todo a bacterias comensales de piel y especies características del suelo y agua del ambiente. (Robertson *et al.*, 2013). Dichos resultados coinciden con los obtenidos en el metro de Hong Kong (Leung *et al.*, 2014).

Otro estudio realizado en el metro de Barcelona examinó la composición microbiológica y la abundancia en el espacio y tiempo de las muestras de aire recolectadas durante un período de frío. Además, a través de PCR cuantificaron bacterias totales, *Aspergillus fumigatus* y virus de interés particular como influenza y rinovirus. *Methylobacterium* fue el género bacteriano más abundante y los resultados de la PCR fueron positivos para 30 de 54 muestras en caso de influenza A y 26 de 54 muestras en caso de influenza B (Triadó-Margarit *et al.*, 2017).

En México, la Dra. Mariana Peimbert (Vargas-robles *et al.*, 2019) analizó el perfil de diversidad bacteriana del metro de la ciudad mediante la secuenciación masiva del gen 16S RNAr en 47 muestras de las 12 líneas de metro. En este estudio encontraron un total de 50,197 unidades taxonómicas operativas (OTU) y 1058 géneros. En las muestras predominó sobre todo el filo *Actinobacteria* y los géneros

Propionibacterium (15%), *P. acnes* (13%), *Corynebacterium* (13%), *Streptococcus* (9%), *Staphylococcus* (5%) y (*S. epidermidis*; 4%), componentes microbianos de la piel humana (Vargas-robles *et al.*, 2019).

Otro tipo de publicaciones basadas en modelos que simulan las interacciones de los pasajeros del metro con sus lugares de trabajo, escuelas, hogares y actividades comunitarias, refieren que de haber una reemergencia pandémica del virus de la influenza, el 4% de las transmisiones se produciría en el metro (Cooley *et al.*, 2011), dicho modelo fue calibrado utilizando datos históricos de las pandemias de influenza de 1957-1958 y de las encuestas de viajes de Nueva York. Lo anterior sustenta en parte la relevancia de estos sitios en la diseminación de enfermedades transmitidas por bioaerosoles.

Si bien hay una vasta cantidad de evidencia de bioaerosoles en diversos sitios de interés, la mayoría de los estudios consideran un único sitio o nicho de interés para analizar el microbioma y por ende no crean evidencia relacionada con comparaciones o hallazgos de contribución entre 2 o más focos infectivos como hospitales y estaciones del metro que se encuentran cercanos.

El estudio que aquí se presenta permite la comparación de muestras de aire entre sí y con entornos cercanos (metro-hospital).

2.3 Estudios enfocados a la identificación de genes de resistencia a los antimicrobianos

Algunos estudios se han enfocado sobre todo a identificar genes de resistencia a antimicrobianos en los bioaerosoles de ambientes urbanos.

En China, caracterizaron perfiles de resistencia a diferentes antibióticos en muestras de aire de espacios como hospitales, residencias en ciudades, residencias rurales y granjas. En total, encontraron 177 genes de resistencia a antimicrobianos, en donde predominaron sobre todo los genes de resistencia a beta-lactámicos y tetraciclinas. Se detectaron seis genes de resistencia a beta-lactámicos (*bl1_ampC*, *bl2_ges*,

bl2b_tem1, *bl2d_oxa10*, *bl3_cpha*, *fox5*) y ocho de resistencia a tetraciclinas (*tetg*, *teth*, *tetk*, *tetl*, *tetm*, *teto*, *tetq*, *tetx*). La mayor abundancia relativa de genes a antimicrobianos se encontró en hospitales y granjas. El gen *Bl3_cpha* (de resistencia a beta-lactámicos) fue el subtipo de gen de resistencia más abundante en muestras hospitalarias con una abundancia de 2.01×10^{-4} copias (16S RNAr), en este estudio además determinaron que los filo Proteobacterias y Actinobacterias eran los posibles hospederos de los genes de resistencia encontrados (Li *et al.*, 2019).

Los hallazgos encontrados en el proyecto anterior son congruentes con el hecho de que, uno de los primeros fármacos utilizados para tratar infecciones causadas por bacterias fueron los beta-lactámicos (en el año 1940) y que dentro de estos, la penicilina y la amoxicilina son los de mayor uso (Zhang *et al.*, 2015).

Los antibióticos β -lactámicos son análogos de la D-alanil-D-alanina, el aminoácido terminal de las subunidades peptídicas precursoras de la pared de peptidoglicano (Kelly and Knox, 1989). La similitud estructural que existe entre estos antibióticos y la D-alanil-D-alanina facilita su unión al centro activo de unas proteínas conocidas como proteínas de unión a la penicilina (Zervosen *et al.*, 2012). Estas proteínas facilitan la transpeptidación (paso final de la síntesis de peptidoglicanos). Los antibióticos β -lactámicos actúan inhibiendo la síntesis de la barrera de peptidoglicanos de la pared celular de las bacterias (Kelly and Knox, 1989).

Pese al éxito que tuvieron los beta-lactámicos por un tiempo, las bacterias desarrollaron diferentes mecanismos de resistencia, dentro de los cuales el principal es la producción de beta-lactamasas, enzimas capaces de inactivar los antibióticos de la familia beta-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos) (Vaidya, 2011). Hasta el año 2013 se habían descrito más de 160 tipos de beta-lactamasas tipo TEM, 100 tipos de SHV, 65 tipos de CTX-M, y más de 200 tipos de oxacilinasas (OXA) (Morejón, 2013). Estas enzimas pueden ser codificadas por plásmidos y se transfieren a otras bacterias por conjugación, lo que favorece su rápida dispersión (Vaidya, 2011).

Otros mecanismos de resistencia contra los beta-lactámicos son la disminución de la entrada del antibiótico por expulsión activa del fármaco (por medio de bombas de eflujo) y modificación de las proteínas de unión a la penicilina (Vaidya, 2011).

Las tetraciclinas por otro lado actúan provocando una inhibición de la síntesis proteica. Si bien el mecanismo de acción de esta familia de antibióticos no está del todo claro, se ha sugerido que las tetraciclinas se unen a RNAr (RNA ribosomales) de doble cadena y de esta forma inhiben su procesamiento y, en consecuencia, la síntesis de proteínas (Chukwudi, 2016). Dentro de las tetraciclinas se encuentran la clortetraciclina y tetraciclina (de primera generación), la doxicilina y tiaciclina (de segunda generación) y la tigeciclina (de tercera generación) (Chopra and Roberts, 2001).

Los mecanismos bacterianos implicados en la aparición de resistencia a estos fármacos son el bombeo activo del antibiótico al exterior, o la síntesis de una proteína protectora que separa al antibiótico del ribosoma permitiéndole continuar con la síntesis proteica. Cualquiera de estos genes pueden estar presentes en plásmidos (Vicente and Pérez, 2010).

Aunque en el estudio realizado en China se encontraron principalmente genes de resistencia a beta-lactámicos y tetraciclinas, existen otras familias de antibióticos de uso clínico para los cuales se han reportado resistencia. Tal es el caso de las quinolonas y los aminoglucósidos (Li *et al.*, 2018).

Las quinolonas de primera y segunda generación actúan inhibiendo a la DNA girasa (conocida también como topoisomerasa II), mientras que las de tercera y cuarta generación inhiben a la topoisomerasa IV, esta inhibición no permite la replicación del material genético bacteriano conduciendo a la muerte de la bacteria (Hooper and Jacoby, 2016). Los mecanismos de resistencia descritos para esta familia de antibióticos son las mutaciones cromosómicas en los genes codificantes, por sobreexpresión de sistemas de transporte de eflujo multidrogas (bombas) y por genes de resistencia mediados por plásmidos (Álvarez *et al.*, 2015). Algunos

ejemplos de estos genes son variantes de la aminoglucósido acetil transferasa y los genes *qnr* (Álvarez *et al.*, 2015).

Los aminoglucósidos actúan inhibiendo la síntesis proteica por unión a las subunidades 30S y 12S (estreptomicina) de los ribosomas, los mecanismos de resistencia que las bacterias han desarrollado para esta familia de antibióticos incluyen disminución de la permeabilidad de la célula y por ende de la entrada del antibiótico, alteración en los sitios de unión a los ribosomas y modificación de enzimas (sobre todo N-acetiltransferasas, O-adeniltransferasas y O-fosfotransferasas) (Davies and Wright, 1997). Algunos miembros de esta familia son la estreptomicina, gentamicina y amikamicina.

Otro estudio en relación con los genes que confieren resistencia a los antimicrobianos presentes en el aire es el realizado por el Dr. Maosheng Yao, quien analizó los perfiles de abundancias relativas de 30 subtipos de genes de resistencia a antimicrobianos de 19 ciudades.

Dentro de los antibióticos analizados estuvieron las quinolonas, β -lactámicos, macrólidos, tetraciclinas, sulfonamidas, aminoglucósidos y vancomicinas. Este autor encontró que el gen que confiere resistencia a los antibióticos betalactámicos *blaTEM* fue el más abundante, seguido por el gen de resistencia a quinolonas *qepA* (resistente al ciprofloxacino), genes de resistencia a los macrólidos, tetraciclinas, sulfonamidas, aminoglucosidos y vancomicina. También se encontraron elementos genéticos móviles como la transposasa que codifica para *tnpA* y para la integrasa clase 1. En total encontraron 30 subtipos diferentes de genes de resistencia. En este trabajo, los autores sugieren que la transmisión de genes de resistencia a antimicrobianos es un proceso que se da activamente en los bioaerosoles de ambientes urbanos (Li *et al.*, 2018).

En ese mismo estudio los autores observaron importantes diferencias en la abundancia relativa de los genes resistentes a los antibióticos entre las ciudades estudiadas; la concentración total más alta de genes de resistencia se detectó en San Francisco, EE. UU. Al, con una abundancia relativa de dichos genes en las

muestras de partículas en suspensión en el aire de 5,6, mientras que en Indonesia de Bandung fue casi 100 veces menor (Figura 4). En cuanto a diversidad en Beijing, los investigadores encontraron la mayor variedad de genes, con 18 subtipos; mientras que en Zurich, Suiza, encontraron solo seis subtipos en material particulado.

El Dr. Maosheng Yao y sus colaboradores proponen que las bacterias resistentes a los antibióticos pueden ser transportadas en el aire, a su vez que pueden adquirir nuevos genes de resistencia por medio del proceso de transformación (Figura 4).

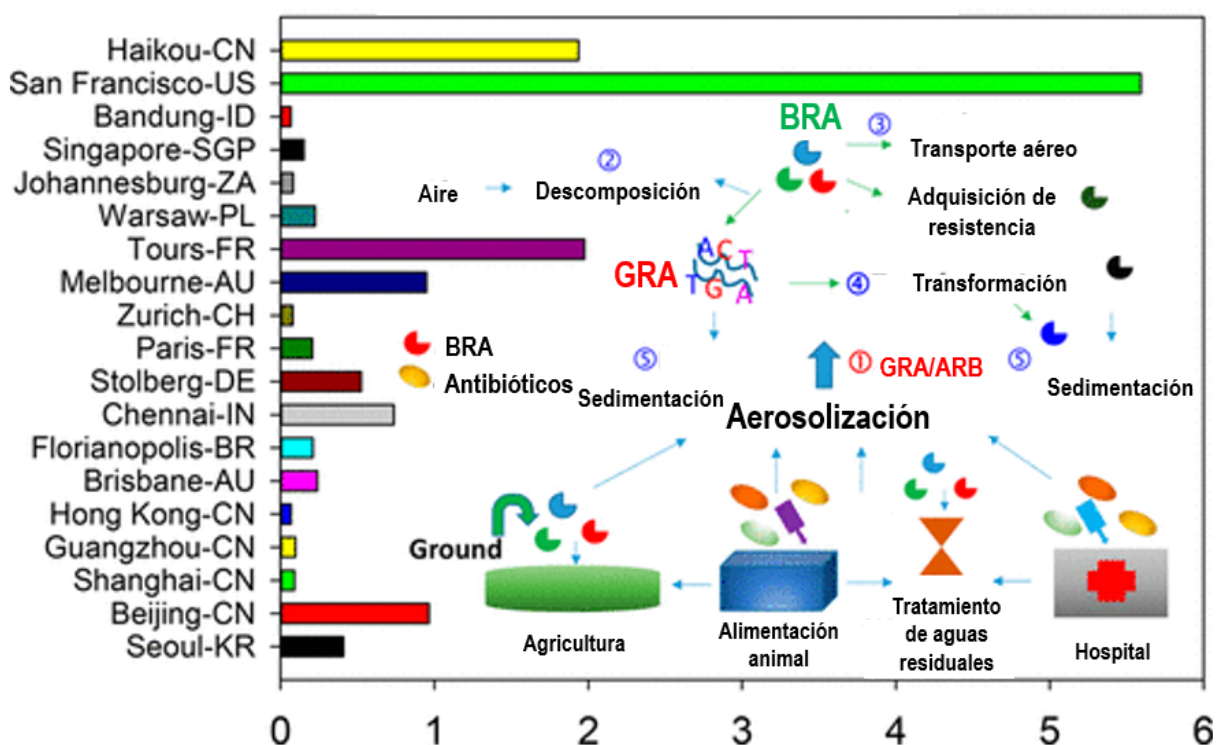


Figura 4. Abundancia relativa de genes que confieren resistencia a los antimicrobianos presentes en el aire de 19 ciudades alrededor del mundo.

Figura modificada de Li et al., 2018. La mayor abundancia relativa de genes de resistencia a los antibióticos (GRA) se detectó en San Francisco, EE. UU (con un valor de 5,6), en Indonesia de Bandung la abundancia relativa fue casi 100 veces menor a la encontrada en San Francisco. Los autores sugieren que las bacterias resistentes a los antibióticos (BRA) se descomponen y los GRA son transportados en el aire, estos genes son adquiridos por medio de un proceso de transformación y son depositados en suelos de hospitales, aguas residuales y tierras en donde se lleva a cabo agricultura (Li et al., 2018).

En México no existe evidencia que describa el perfil de resistencia que predomina en los bioaerosoles de espacios urbanos, más aún sería interesante analizar el perfil de resistencia en el entorno hospitalarios.

Otro aspecto interesante de estudiar es la presencia de factores de virulencia en muestras de aire, a la fecha no hay evidencia al respecto.

3. JUSTIFICACIÓN

Dado que la composición del aire en los ambientes representa una unidad ecológica que impacta en la salud pública de las poblaciones humanas, resulta de interés particular describir la diversidad de microorganismos cuyo RNA se encuentra presente en las muestras de aire colectadas en el metro y el Hospital 20 de noviembre, así como identificar la presencia de microorganismos potencialmente patógenos en estos espacios urbanos, en donde la probabilidad de infección por patógenos es mayor dado el tiempo prolongado de exposición y permanencia en dichos sitios. Otro hallazgo interesante es la posibilidad de encontrar secuencias que correspondan a genes de resistencia o factores de virulencia.

4. HIPÓTESIS

Existe una relación entre las secuencias de RNA de las comunidades microbianas encontradas en la estación del metro y en el Hospital 20 de noviembre.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Analizar la diversidad de RNAs presentes en las muestras de aire colectadas en la estación del metro Hospital 20 de noviembre y en el Hospital 20 de noviembre.

5.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar la diversidad de microorganismos encontrados en las muestras de aire colectadas en la estación del metro Hospital 20 de noviembre y el Hospital 20 de noviembre.
- 2) Identificar la presencia de secuencias de RNA de microorganismos potencialmente patógenos presentes en las muestras.
- 3) Identificar la presencia de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia en las muestras colectadas.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

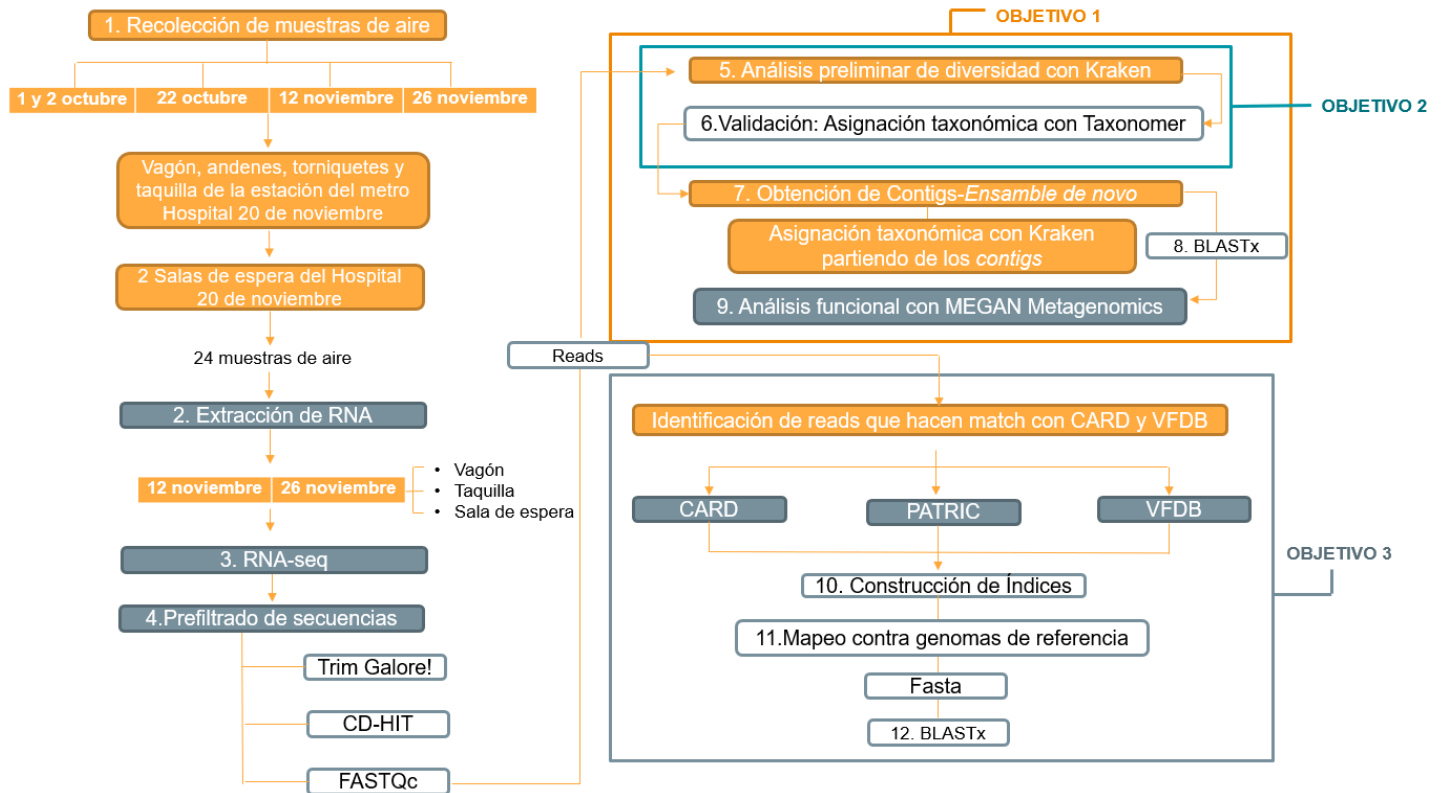


Figura 5. Estrategia experimental.

1) Recolección de muestras de aire en el metro Hospital 20 de noviembre y en el Hospital 20 de noviembre. Las partículas fueron captadas con un colector de aire Coriolis[®] utilizando solución de Hanks como medio de transporte. 2) Extracción del RNA con el kit QIAamp[®]. 3) Se seleccionaron las muestras de vagón, taquilla y sala de espera de los días 12 y 26 de noviembre y se mandaron a secuenciar por RNA-seq en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. 4) Prefiltrado de las secuencias: consistió en la eliminación de adaptadores (Trim Galore! Galaxy Version 0.6.3), lecturas de baja calidad (Trim Galore! Galaxy Version 0.6.3), lecturas redundantes (Hooper and Jacoby, 2016) y en un análisis de la calidad de las secuencias (Andrews S., 2010). 5) Análisis de diversidad taxonómica con Kraken a partir de las lecturas (Wood and Salzberg, 2014). 6) Validación del análisis taxonómico con Taxonomer a partir de las lecturas (Flygare et al., 2016). 7) Obtención de “contigs” por ensamblaje de novo con metaSPAdes (Nurk et al., 2017) y análisis preliminar con Kraken partiendo de los *contigs* (a nivel nucleótidos). 8) BLASTx de todos los “contigs” obtenidos (Altschup et al., 1990). 9) Análisis de la biodiversidad de las muestras y análisis funcional partiendo de los “contigs” con MEGAN (Huson et al., 2007). 10) Construcción de índices con las bases de datos CARD (para genes de resistencia a antimicrobianos) (Huson et al., 2007) y VFDB (para factores de virulencia) (Chen et al., 2005). 11) Mapeo de las lecturas contra los genomas de referencia contenidos en los índices previamente construidos (Sanger Institute, 2020). 12) BLASTx de las lecturas que coincidieron con las bases de datos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Recolección de muestras de aire

Para la recolección de muestras de aire se utilizó un recolector de la marca Coriolis Micro – Air Sampler®, el cual introduce el aire por un vial cónico en un movimiento de tipo remolino mediante succión; las partículas son arrojadas contra la pared por fuerza centrífuga y son depositadas en un medio líquido (Carvalho *et al.*, 2008). El tiempo de recolección de muestras aéreas fue de 30 minutos en un volumen de 10 ml, a una altura de 1 metro sobre el nivel del piso, considerando una capacidad de absorción de 200 L de aire por minuto. Los sitios muestreados fueron las salas de espera del Hospital 20 de noviembre y las áreas de taquilla, torniquetes, andenes, y el interior de un vagón en la estación del metro Hospital 20 de noviembre, que se encuentra en la línea 12 (Tabla 1)¹. Además, se tomaron los datos de temperatura y humedad relativa por sitio de muestreo cada 10 minutos. La recolección de muestras se hizo los días 1, 2 y 22 de octubre y los días 12 y 26 de noviembre del año 2018.

Tabla 1. Sitios y fechas de muestreo en la estación del metro Hospital 20 de noviembre y en el Hospital 20 de noviembre.

Sitio de muestreo	Fecha de recolección mes de octubre	Fecha de recolección mes de noviembre
Vagón ²	1, 2 y 22 de octubre	12 y 26 de noviembre
Taquilla	1, 2 y 22 de octubre	12 y 26 de noviembre
Torniquetes	1, 2 y 22 de octubre	12 y 26 de noviembre
Andenes	1, 2 y 22 de octubre	12 y 26 de noviembre
Sala de espera 1	1, 2 y 22 de octubre	12 y 26 de noviembre
Sala de espera 2	1, 2 y 22 de octubre	12 y 26 de noviembre

¹ Las muestras fueron recolectadas en el Hospital 20 de noviembre y en la estación del metro Hospital 20 de noviembre debido a que son sitios cercanos uno del otro.

² Todos los vagones en los que se colectaron muestras contaban con ventilación mecánica funcional.

Además de las muestras de aire, se tomaron muestras de superficies en los siguientes sitios: pasamanos de las escaleras del Hospital 20 de noviembre y en los torniquetes de la estación del metro, suelo debajo de los torniquetes y pasamanos en el interior de un vagón.

7.2 Preparación y almacenamiento de las muestras

Para las muestras de aire, se hicieron 5 alícuotas de 1000 µl cada una y se centrifugaron a 20,000 x g durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos y la pastilla se conservó por aparte. Las muestras fueron almacenadas a -70°C.

7.3 Extracción de RNA

La extracción del RNA se realizó con el kit de extracción de RNA viral de la marca QIAamp® (Qiagen, 2018) con el siguiente procedimiento:

- **Lisis:** La muestra se lisó bajo las condiciones desnaturalizantes proporcionadas por el amortiguador “AVL” del kit QIAamp® (para inactivar las RNasas y asegurar el aislamiento del RNA viral intacto) (Qiagen, 2018). Para ello, se preparó una solución stock que contenía RNA acarreador y amortiguador AVL en una relación 1:100 y se agregaron 560 µl de este stock a la muestra.
- **Adición de etanol:** Se agregaron 560 µl de etanol (96-100%) a la muestra y se agitó con vórtex por 15 segundos. Se añadieron 630 µl de la muestra procesada a la mini columna QIAamp contenida en un tubo de 2ml y se centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) por 1 min. Se colocó la mini columna QIAamp en otro tubo limpio de 2ml y se añadieron los 630 µl restantes de la muestra procesada. Se centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) por 1 min y se eliminó el sobrenadante.

El procedimiento anterior se realizó 4 veces más para obtener la mayor concentración de RNA posible (se utilizaron en total 700 µl de cada muestra).

- **Lavados:** se añadieron 500 µl del amortiguador AW1 del kit QIAamp® a la mini columna y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. Se colocó la minicolumna QIAamp en un tubo nuevo de 2 ml y se eliminó el sobrenadante. Luego, se agregaron 500 µl del amortiguador AW2 y se centrifugó a 20,000 x g (14000 rpm) por 3 minutos. Se realizó un último lavado con etanol al 70% y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min. Se eliminó el sobrenadante y se colocó la mini columna en un nuevo tubo. Se centrifugó en seco a velocidad máxima por 1 min.
- **Elución:** se colocó la mini columna en un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml y se añadieron 30 µl de agua de inyección. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. El RNA contenido en el tubo de 1.5 ml se almacenó a -70°C hasta ser procesado.

7.4 Secuenciación masiva

Se seleccionaron las siguientes muestras de aire: vagón, taquilla y sala de espera 2 del hospital, colectadas el 12 y el 26 de noviembre. De cada una de estas muestras se enviaron 30 µL de RNA a la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM.

La secuenciación masiva RNA-seq (*Shotgun*) se realizó empleando un sistema MiSeq® (Illumina) *paired-end* (Illumina, 2011).

La secuenciación *paired-end* genera lecturas a partir de cada uno de los extremos de cada fragmento. Para ello, se fragmenta el RNA en pequeños segmentos (<300pb) de los que se secuencia el final de ambos extremos. El RNA fue fragmentado por la acción de una solución de catión divalente (Cu^{2+} o Zn^{2+}) calentada a 94 °C durante 8 min. Seguido de esto se sintetizó el cDNA; para la retrotranscripción (RT) se emplearon cebadores aleatorios y una retrotranscriptasa, y para la PCR se empleó una DNA polimerasa y RNAsaH. Los extremos del cDNA fueron reparados con enzima T4 DNAPol y enzima Klenow y posteriormente fosforilados empleando una polinucleótido cinasa y ATP. Se adicionó una adenina a los extremos 3' y se ligaron los adaptadores de doble cadena. Se realizó la selección de los fragmentos según el tamaño deseado, verificando por electroforesis capilar.

7.5 Análisis de la calidad de las secuencias

Las lecturas derivadas de la secuenciación se reportaron en formato Fastq (Figura 6). Fastq es un formato basado en texto que almacena secuencias de nucleótidos y sus puntajes de calidad correspondientes según el score PHRED Q (Cock *et al.*, 2010).

Un archivo FASTQ normalmente usa cuatro líneas por secuencia:

```
@NS500502:84:HCCVTBGX9:1:11101:5664:1056 1:N:0:TCTCGCGC+CTTCGCCT
CTCCANCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTT
+
AAAA/#####6#####6#####
```

Figura 6. Formato Fastq.

Línea 1) comienza con un carácter '@' y es seguida por el nombre o ID de la secuencia y una descripción opcional. Línea 2) es la secuencia. Línea 3) comienza con un carácter '+' y, opcionalmente, le sigue el mismo ID o nombre de la secuencia. Línea 4) contiene los valores de calidad para la secuencia.

La calidad de las secuencias se evaluó mediante el software FastQC (Andrews S., 2010). El cual permite saber:

- Calidad de la secuencia por cada base.
- Contenido de la secuencia por base (es decir, la proporción de cada una de las bases que hay en la secuencia).
- Contenido de bases no asignadas (N).
- Porcentaje de GC.
- Número de secuencias duplicadas y sobrerrepresentadas.
- Distribución de tamaños de los fragmentos en el archivo.
- Contenido de adaptadores.

7.6 Eliminación de adaptadores y de nucleótidos de baja calidad

Los nucleótidos de baja calidad y los adaptadores fueron eliminados de las secuencias mediante la herramienta Trim Galore!, disponible en usegalaxy.org (Trim Galore! Galaxy Version 0.6.3, 2020).

Para ello, el programa identifica las bases de baja calidad desde el extremo 3' y las elimina antes de retirar el adaptador.

Trim Galore! detecta automáticamente el adaptador que se ha utilizado en las primeras 12 o 13 pb tomando en cuenta los siguientes adaptadores estándar:

Illumina:	AGATCGGAAGAGC
Small RNA:	TGGAATTCTCGG
Nextera:	CTGTCTCTTATA

7.7 Eliminación de las secuencias redundantes

Para remover los duplicados se empleó la herramienta CD-HIT-dup. CD-HIT-dup permite eliminar duplicados de las lecturas pareadas, para ello, el programa tomará ambos extremos de las lecturas, y las unirá para formar una sola lectura para hacer el análisis. A cada lectura se asigna un número de abundancia, que es el número de duplicados para la lectura (Hooper and Jacoby, 2016).

Para ejecutar el programa se empleó la siguiente línea de comandos:

```
cd-hit-dup -i Trim_S13R1.fastq -i2 Trim_S13R2.fastq -o  
S13R2_cdhit.fastq -o2 S13R2_cdhit.fastq
```

La ejecución del programa da como resultado los archivos fastq sin las lecturas duplicadas.

7.8 Análisis preliminar con la herramienta Kraken

Se realizó un análisis preliminar con la herramienta Kraken³ (Wood and Salzberg, 2014). El análisis preliminar tenía por objetivo caracterizar la diversidad del microbioma presente en las muestras, así como su distribución.

Kraken permite clasificar las secuencias asignando etiquetas taxonómicas a las lecturas (Figura 7).

³ Disponible en <https://usegalaxy.org/>

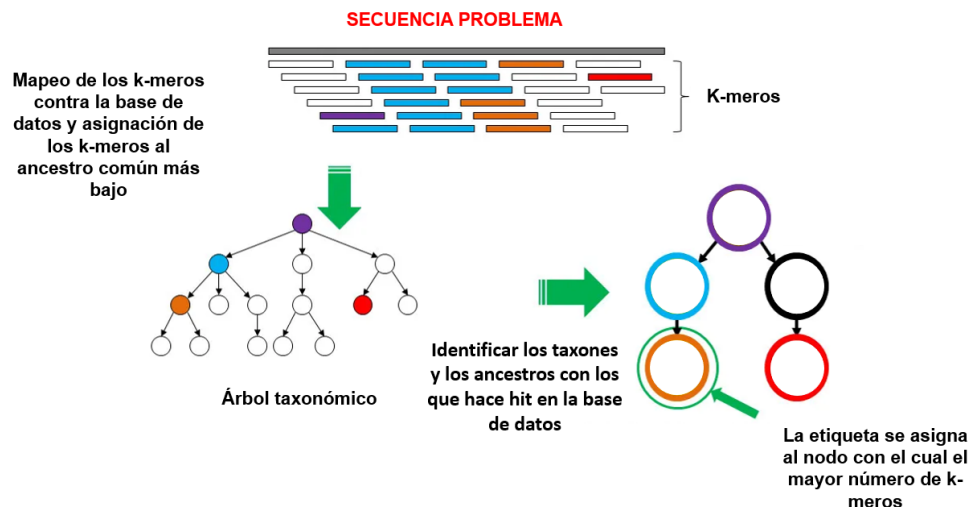


Figura 7. Algoritmo de clasificación utilizado por la herramienta Kraken.

Kraken identifica los k-meros dentro de una secuencia y utiliza una base de datos contra la cual mapea dichos k-meros. Luego se asigna el ancestro común más bajo en un árbol taxonómico donde se encuentran todos los genomas que contienen el k-mero de interés. La etiqueta que se asigna corresponde al nodo con el cual se asoció el mayor número de k-meros en el árbol taxonómico (Wood and Salzberg, 2014).

Luego de hacer la asignación taxonómica se generó un reporte con la herramienta “Kraken report”, la cual ofrece tablas con 6 columnas (Figura 8).

Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5	Columna 6
44.13	1065504	1065504	U	0	unclassified
55.87	1349183	0	-	1	root
55.87	1349183	1290	-	131567	cellular organisms
55.60	1342645	48738	D	2	Bacteria
28.79	695287	15040	P	1224	Proteobacteria
12.45	300698	36310	C	1236	Gammaproteobacteria
6.64	160248	1524	O	72274	Pseudomonadales
5.23	126212	5869	F	468	Moraxellaceae

Figura 8. Reporte taxonómico en Kraken.

La columna 1 corresponde al porcentaje de lecturas cubiertas por el clado enraizadas en un taxón, la columna 2 es el número de lecturas cubiertas por el clado enraizado en un taxón, la columna 3 es el número de lecturas asignadas directamente al taxón, la columna 4 contiene un código que indica (U) para organismos no clasificados, (D) para el dominio, (K) reino, (P) filo, (C) clase, (O) orden, (F) familia, (G) género, o (S) especies. La columna 5 corresponde al ID taxonómico según NCBI y la columna 6 contiene el nombre científico con el cual se identificó la lectura.

7.9 Validación: asignación taxonómica con Taxonomer

Taxonomer⁴ es una herramienta que permite el análisis integral de los datos metagenómicos procedentes de una secuenciación de alto rendimiento, permite visualizar el perfil de comunidades microbianas presentes en la muestra problema (Flygare *et al.*, 2016).

Para ello, utiliza los archivos FASTA o FASTQ sin procesar como input, permitiendo introducir lecturas pareadas para el análisis conjunto de las mismas.

Taxonomer asigna cada read a una de las siguientes categorías: humanos, bacterianos, virales, fagos, fúngicos, phix, ambiguos o desconocidos. La categoría “ambiguo” es para las lecturas que entran en 2 o más categorías y “desconocido” es para las lecturas que no entran en ninguna de las categorías.

La clasificación taxonómica de bacterias, hongos y virus se visualiza como un gráfico de tipo proyección solar, en el que el tamaño de un segmento dado representa la abundancia relativa en el nivel de lectura. Los rangos taxonómicos se muestran jerárquicamente con el rango más alto en el centro del gráfico.

7.10 Asignación taxonómica de los “*contigs*” con MEGAN Metagenomics

7.10.1 Ensamblaje *de novo* para la obtención de “*contigs*”

A partir de los archivos con lecturas pareadas en fastq se armaron “*contigs*”. Para ello se utilizó el ensamblador *de novo* metaSPAdes. MetaSPAdes es una versión del ensamblador *de novo* SPAdes que permite la obtención de “*contigs*” procedentes de muestras metagenómicas, una de las ventajas que proporciona esta herramienta es que crea gráficos probando 3 longitudes diferentes de k-meros, y el archivo de salida en formato fasta corresponde al mejor ensamblaje considerando el tamaño de k-mero más óptimo, además el gráfico desarrollado detecta y elimina lecturas quiméricas (Nurk *et al.*, 2017). El comando que se utilizó para hacer el ensamblaje fue el siguiente:

⁴ Disponible en <https://www.taxonomer.com/>

```
./spades.py --meta -1 inputR1.fastq -2 inputR2.fastq -o  
"contigs".fasta
```

En donde R1 y R2 son los archivos pareados en formato fastq.

La calidad de los ensamblajes se evaluó con la herramienta QUAST considerando los siguientes parámetros de calidad: N50, N75, longitud de los “*contigs*” y el contig más largo.

7.10.2 BLASTx de las secuencias

BLASTx es un programa que permite comparar las secuencias obtenidas contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos y a su vez indica la significancia estadística de la similitud y porcentaje de identidad. Esto permite la identificación de las secuencias problema según el gen y organismo al que pertenece (Altschup *et al.*, 1990).

Para ello, se utilizó BLAST 2.8.1, se construyó un índice partiendo de la base de datos nr.fasta disponible en refseq utilizando la siguiente línea de comando:

```
makeblastdb -in nr.fasta -dbtype prot -out nr2019_index
```

Una vez construido el índice, se realizó el BLASTx de cada una de las muestras utilizando el siguiente comando:

```
blastx -db nr2019_index -query "contigs".fasta -outfmt 6 -out  
vagon12Nov_blastx
```

Nota: -query indica el input con los “*contigs*” según cada muestra.

Los archivos de salida son en formato tabular estándar (-outfmt “6”) y contiene los encabezados mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Formato tabular en BLAST.

1.	qseqid	query (e.g., gene) sequence id
2.	sseqid	subject (e.g., reference genome) sequence id
3.	pident	percentage of identical matches
4.	length	alignment length
5.	mismatch	number of mismatches
6.	gapopen	number of gap openings
7.	qstart	start of alignment in query
8.	qend	end of alignment in query
9.	sstart	start of alignment in subject
10.	send	end of alignment in subject
11.	eval	<u>expect value</u>
12.	bitscore	<u>bit score</u>

7.10.3 Análisis de diversidad microbiana con MEGAN metagenomics

MEGAN es un programa bioinformático que permite el análisis optimizado de grandes conjuntos de datos metagenómicos (Huson *et al.*, 2007). La metagenómica es el análisis de las secuencias obtenidas a partir de una muestra ambiental generalmente no cultivada (Lindon *et al.*, 2018).

MEGAN contiene un conjunto de herramientas que permite analizar de forma interactiva los datos de microbioma. Estas herramientas permiten realizar análisis taxonómicos (utilizando la taxonomía NCBI), análisis funcionales utilizando SEED y permite además elaborar mapas para la representación de los datos.

MEGAN emplea como input los archivos de salida obtenidos en BLASTx en formatos estándar, XML o en formato tabular.

7.11 Identificación de secuencias de RNA de microorganismos potencialmente patógenos presentes en las muestras.

Se realizaron asignaciones taxonómicas a partir de los *contigs* obtenidos a través de metaSPAdes, como parte de un análisis exploratorio preliminar. Para ello, se obtuvo un reporte taxonómico con Kraken a nivel nucleótidos.

Para definir a una especie en la categoría de “potencialmente patógena” se consultó la categorización de agentes biológicos del Comité Asesor Sobre Patógenos Peligrosos (ACDP) (Advisory Committee on Dangerous Pathogens, 2016) y la base de datos de Agentes Biológicos GESTIS (Biological Agents Database) del Instituto de Seguridad y Salud laboral del Seguro Social Alemán de Accidentes (DGUV) (Institute for Occupational Safety and Health of the German Social Accident Insurance, 2019). En ambas fuentes, los agentes biológicos se clasifican en grupos de acuerdo al nivel de riesgo que el agente tiene para provocar infecciones en humanos (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de los agentes biológicos (Advisory Committee on Dangerous Pathogens, 2016), (Institute for Occupational Safety and Health of the German Social Accident Insurance, 2019).

Grupo 1	No es probable que cause enfermedad humana.
Grupo 2	Puede causar enfermedades humanas, poco probable que se extienda a la comunidad.
Grupo3	Puede causar enfermedades humanas graves, puede extenderse a la comunidad, pero hay tratamiento efectivo disponible.
Grupo4	Causa enfermedad humana severa, es probable que se extienda a la comunidad y generalmente no hay tratamiento efectivo disponible.

Aquellas especies que están dentro de las clasificaciones 2, 3 y 4 se consideraron como “potencialmente patógenas”.

7.11.1 Identificación del virus de la Influenza A H1N1 en las muestras colectadas

Dado que el virus de la influenza es un patógeno respiratorio que circula predominantemente durante la época de frío, las muestras colectadas durante los meses de octubre y noviembre fueron utilizadas para detectar el virus en el hospital y en la estación del metro Hospital 20 de noviembre. Considerando que todos los casos de Influenza en el Hospital 20 de noviembre correspondieron a Influenza A H1N1, el análisis de detección del virus se dirigió a este tipo⁵. Para ello, se realizó una RT-PCR en tiempo real *One-Step* con cebadores dirigidos a la proteína M de matriz.

PCR en tiempo real *One-Step*

La reacción de PCR en tiempo real *One-Step* se preparó con la mezcla de reacción detallada en la Tabla 4.

Tabla 4. Mezcla de reacción para la PCR en tiempo real.

Amortiguador	5µL
Cebador <i>Forward</i>	0.5µL
Cebador <i>Reverse</i>	0.5µL
Muestra (colectada en solución de hanks)	3.25µL
Enzima Agpath de ThermoFisher	0.25µL
Sonda	0.5µL
TOTAL	10µL

⁵ Se hizo una revisión de los casos reportados de Influenza en el Hospital 20 de noviembre durante los meses en los que se colectaron las muestras.

Para el control negativo se utilizó agua libre de RNAsas, además se incluyó como control una muestra de aire tomada en el laboratorio en donde se procesaron las muestras.

Los cebadores utilizados para la detección del virus de la Influenza A H1N1 son los establecidos por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (por sus siglas en inglés, CDC), los cuales van dirigidos a la proteína M de matriz y genera amplicones de 102 pb (Tabla 5).

Tabla 5. Cebadores propuestos por el CDC para detectar influenza A H1N1.

	Secuencia (5' → 3')	Etiqueta
Cebador <i>Forward</i>	GACCRATCCTGTACCTCTGAC	No
Cebador <i>Reverse</i>	AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA	No
Sonda	TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG	FAM, BHQ-1

El termociclador se programó con el esquema mostrado en la figura 9.

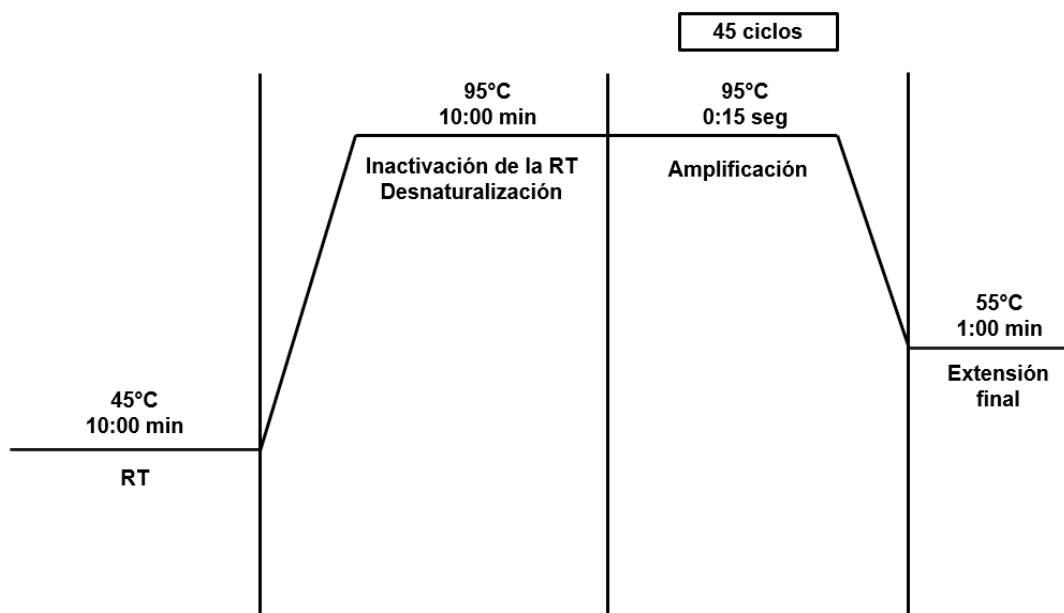


Figura 9. Programación de la PCR en el termociclador.

La enzima Agpath permite llevar la reacción de retrotranscripción (RT) y la PCR en un solo paso (One-step), para ello, el termociclador se programó siguiendo las especificaciones del manual de uso (Pub. no. 1005M Rev. H). Etapa 1) Retrotranscripción (RT). Etapa 2) Inactivación de la RT y desnaturalización. Etapa 3) Amplificación. Etapa 4) Extensión final.

7.12 Análisis de secuencias que correspondan a genes relacionados con resistencia a antimicrobianos.

Se elaboró un índice con SMALT (Sanger Institute, 2020), utilizando como genomas de referencia la base de datos completa de CARD⁶ (en total 17,658 secuencias) (Huson *et al.*, 2007). CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database) es una base de datos biológica que recopila y organiza información de referencia sobre genes, proteínas y fenotipos de resistencia a los antimicrobianos.

El comando utilizado para la elaboración del índice fue:

```
smalt index -k 13 -s 4 CARD_index CARD.fasta
```

Para realizar la búsqueda de secuencias de transcritos que corresponden a genes relacionados con resistencia a antimicrobianos se mapearon cada una de las muestras pareadas contra el índice construido utilizando la siguiente línea de comando:

```
smalt map -f samsoft -o output.sam -y 0.6 -i 320 -j 80 -l pe  
nombre_index forward.fastq reverse.fastq
```

El resultado del mapeo ofrece un archivo de salida de tipo SAM (Sequence Alignment/Map), del que es posible extraer las secuencias que coincidieron con la base de datos. Para ello se emplearon diversos comandos de SAMtools 1.3.1 (Li *et al.*, 2009).

Compactar archivo SAM mediante la conversión de este en un formato binario tipo BAM:

```
samtools view -b -S -o output.bam input.sam
```

- Seleccionar y escribir en otro archivo SAM todas las lecturas coincidieron con la base de datos:

```
samtools view -f 2 input.bam | tee output_hits.sam
```

- Contar el número de lecturas que coincidieron con la base de datos:

⁶ Disponible en <https://patricbrc.org/>

```
samtools view -c -f 2 output.bam
```

- Convertir a formato fasta las lecturas que coincidieron con la base de datos:

Secuencias *Forward*:

```
cut -f 1,2,10,11 input.sam | awk '$2==83||$2==99' | cut -f 1,3,4  
|awk '{print $1"\n"$2"\n"+" "\n"$3}' | sed -e  
"s/NS500/@NS500/g" >matchF_output.fastq
```

Secuencias *Reverse*:

```
cut -f 1,2,10,11 input.sam | awk '$2==147||$2==163' | cut -f  
1,3,4 |awk '{print $1"\n"$2"\n"+" "\n"$3}' | sed -e  
"s/NS500/@NS500/g" >matchR_output.fastq
```

Los archivos de salida fastq, se convirtieron a formato fasta con el siguiente comando:

```
seqtk seq -a input.fastq > output.fasta
```

En cada uno de los casos se realizó un BLASTx con el objetivo de identificar las proteínas a las cuales corresponden los transcritos y hacer una descripción que contenga datos como: gen, antibiótico al que produce resistencia, tipo de resistencia y los hallazgos descritos en los tabulares ofrecidos por BLAST.

7.13 Análisis de secuencias que correspondan a factores de virulencia.

Para el análisis de secuencias de transcritos que correspondían a factores de virulencia se siguió el mismo procedimiento descrito para el análisis de genes antimicrobianos. La base de datos utilizada para construir el índice en este caso fue la base de datos de los factores de virulencia (VFDB⁷).

VFDB contiene información actualizada sobre los FV de diversos patógenos (Chen *et al.*, 2005). Se utilizaron 53,218 secuencias de referencia para hacer el mapeo.

⁷ Disponible en <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>

8. RESULTADOS

8.1 Datos de temperatura y humedad relativa.

1 y 2 de octubre del 2018

El promedio de la humedad relativa en los diferentes sitios fue del 53.8% ($\pm$ SD 4.24). La humedad relativa máxima se encontró en el área de andenes (61%) y la mínima en el área de torniquetes y en el interior del vagón (48%). Respecto a la temperatura, el promedio fue de 21.3°C ($\pm$ SD 1.60) con una temperatura máxima reportada de 24°C en el interior del vagón y mínima de 19°C en las salas de espera del Hospital 20 de noviembre (Tabla 6).

Tabla 6. Temperatura y humedad relativa durante la toma de muestras del 1 y 2 de octubre.

Sitio de muestreo	Fecha	Hora	Humedad relativa (%)	Temperatura
Área Taquilla	1 octubre	9:35 am	58	22°C
		9:43 am	52	23°C
		10:01 am	54	22°C
Área Torniquetes	1 octubre	9:29 am	48	23 °C
		9:38 am	52	22 °C
		9:58 am	53	22 °C
Área Andenes	1 octubre	10:29 am	61	21°C
		10:40 am	51	21°C
		10:47 am	59	21°C
Área Vagón ⁸	1 octubre	11:13 am	49	24 °C
		11:19 am	48	24°C
		11:29 am	49	23 °C
Área Sala de Espera 1	2 octubre ⁹	10:19 am	53	19°C
		10:29 am	52	20°C
		10:39 am	52	20°C
Área Sala de Espera 2	2 octubre	10:52 am	60	19 °C
		11:02 am	59	19 °C
		11:12 am	59	20 °C

⁸ Todos los vagones en los que se colectaron muestras contaban con ventilación mecánica funcional.

⁹ El muestreo de las salas de espera en el Hospital 20 de noviembre se realizó el día 2 de octubre, debido a que el 1 de octubre fue día de asueto para los trabajadores del ISSSTE.

22 de octubre del 2018

La humedad relativa promedio fue del 52.8% ($\pm$ SD 5.80) (al igual que el muestreo del 1 de octubre). Sin embargo, la variación fue mayor; con una humedad mínima del 42% en la sala de espera 2 del Hospital 20 de noviembre y una humedad máxima de 63% en el área de andenes. La temperatura promedio fue de 21.7 °C ($\pm$ SD 1.36) (Tabla 7).

Tabla 7. Temperatura y humedad relativa durante la toma de muestras del día 22 de octubre.

Sitio de muestreo	Hora	Humedad relativa (%)	Temperatura
Área Taquilla	9:14 am	59	21°C
	9:24 am	56	22°C
	10:34 am	54	22°C
Área Torniquetes	9:14 am	59	21 °C
	9:24 am	58	21 °C
	9:34 am	58	21 °C
Área Andenes	9:52 am	57	21°C
	10:02 am	59	19°C
	10:12 am	63	19°C
Área Vagón	10:34 am	49	24 °C
	10:44 am	48	24°C
	10:57 am	49	23 °C
Área Sala de Espera 1	12:48 pm	47	22°C
	12:58 pm	47	22°C
	1:08 pm	47	22°C
Área Sala de Espera 2	12:38 pm	42	23 °C
	12:48 pm	47	23 °C
	12:58 pm	52	21 °C

12 de noviembre del 2018

La humedad relativa promedio durante el muestreo del día 12 de noviembre fue del 42.3% ($\pm$ SD 2.81), es decir, 11% menor que la reportada en el mes de octubre. En este caso el valor mínimo fue del 38% en la sala de espera 1 del Hospital 20 de noviembre y máximo de 49% en el área de taquillas. La temperatura promedio fue de 22.4 °C ($\pm$ SD 0.76) (Tabla 8).

Tabla 8. Temperatura y humedad relativa durante la toma de muestras del día 12 de noviembre.

Sitio de muestreo	Hora	Humedad relativa (%)	Temperatura
Área Taquilla	9:04 am	49	21°C
	9:14 am	47	22°C
	10:24 am	46	22°C
Área Torniquetes	9:24 am	43	22°C
	9:34 am	43	22°C
	9:45 am	42	22°C
Área Andenes	10:03 am	41	23°C
	10:18 am	41	22°C
	10:26 am	42	22°C
Área Vagón	9:51 am	42	23 °C
	10:02 am	40	24°C
	10:18 am	41	23 °C
Área Sala de Espera 1	12:23 pm	38	23 °C
	12:33 pm	43	23 °C
	12:43 pm	42	23 °C
Área Sala de Espera 2	12:20 pm	37	23 °C
	12:38 pm	44	21 °C
	12:43 pm	42	23 °C

26 de noviembre del 2018

El 26 de noviembre el promedio de humedad relativa reportada en las áreas de muestreo fue del 46.3% ($\pm$ SD 4.39), es decir 7% menor que la referida en el mes de octubre. Los valores de humedad relativa fueron variables y oscilaron entre el 38% (en el interior del vagón) y 55% (en la sala de espera 2 del Hospital 20 de noviembre). La temperatura promedio fue de 21.16°C ($\pm$ SD 1.30) con un valor mínimo de 19°C en andenes y sala de espera 2 y un valor máximo de 24°C en el interior del vagón (Tabla 9).

Tabla 9. Temperatura y humedad relativa durante la toma de muestras del día 26 de noviembre.

Sitio de muestreo	Hora	Humedad relativa (%)	Temperatura
Área Taquilla	9:13 am	49	21°C
	9:22 am	48	21°C
	10:32 am	48	21°C
Área Torniquetes	9:10 am	48	21°C
	9:20 am	46	21°C
	9:30 am	45	21°C
Área Andenes	9:55 am	46	22°C
	10:05 am	48	20°C
	10:18 am	50	19°C
Área Vagón	10:04 am	42	23 °C
	10:14 am	41	23°C
	10:24 am	38	24 °C
Área Sala de Espera 1	11:59 pm	42	22 °C
	12:06 pm	42	22 °C
	12:18 pm	42	21 °C
Área Sala de Espera 2	11:59 am	51	20 °C
	12:11 pm	53	20 °C
	12:21 pm	55	19 °C

En general, la temperatura se mantuvo estable en los días de muestreo que abarcaron los meses de octubre y noviembre, sin embargo, la humedad fue hasta 7% menor durante el muestreo del mes de noviembre.

8.2 Concentraciones de RNA en las muestras de aire

Las concentraciones de RNA obtenidas y la relación 260/280 y 260/230 de las muestras seleccionadas para mandar a RNA-seq están detallados en la tabla 10.

Tabla 10. Concentraciones de RNA y relación 260/280, 260/230 de las muestras de aire que fueron seleccionadas para mandar a secuenciar.

Sitio	fecha	Concentración en ng/μl	Relación 260/280	Relación 260/230
Vagón	12 noviembre	501.3	3.53	2.67
Taquilla	12 noviembre	379.3	3.52	2.37
Sala de espera 2	12 noviembre	344.8	3.49	2.91
Vagón	26 noviembre	342.2	3.50	2.23
Taquilla	26 noviembre	239.6	3.44	3.24
Sala de espera 2	26 noviembre	240.5	3.46	1.57

La mayor concentración de RNA fue en la muestra de vagón del día 12 de noviembre con 501.3 ng/ul, el área de taquilla del día 26 de noviembre fue la muestra de la que se obtuvo la menor cantidad de RNA (240.5 ng/ul), los datos anteriores fueron obtenidos por el nanodrop.

8.3 Número de lecturas y análisis de la calidad de las secuencias

En total se obtuvieron 27,814,988 lecturas totales¹⁰, considerando las 6 muestras que se mandaron a secuenciar. En la tabla 11 se detalla el número de lecturas por cada muestra. La longitud de las lecturas fue en promedio de 76 pb.

El análisis de calidad realizado con FastQC indica que, para todas las muestras, la calidad de las lecturas es buena (promedio de score PHRED entre 32 y 36) (Figura 10).

¹⁰ Corresponde a la suma de todas las lecturas *forward* y *reverse*. Es decir que, de cada lado se obtuvieron 13,907,494.

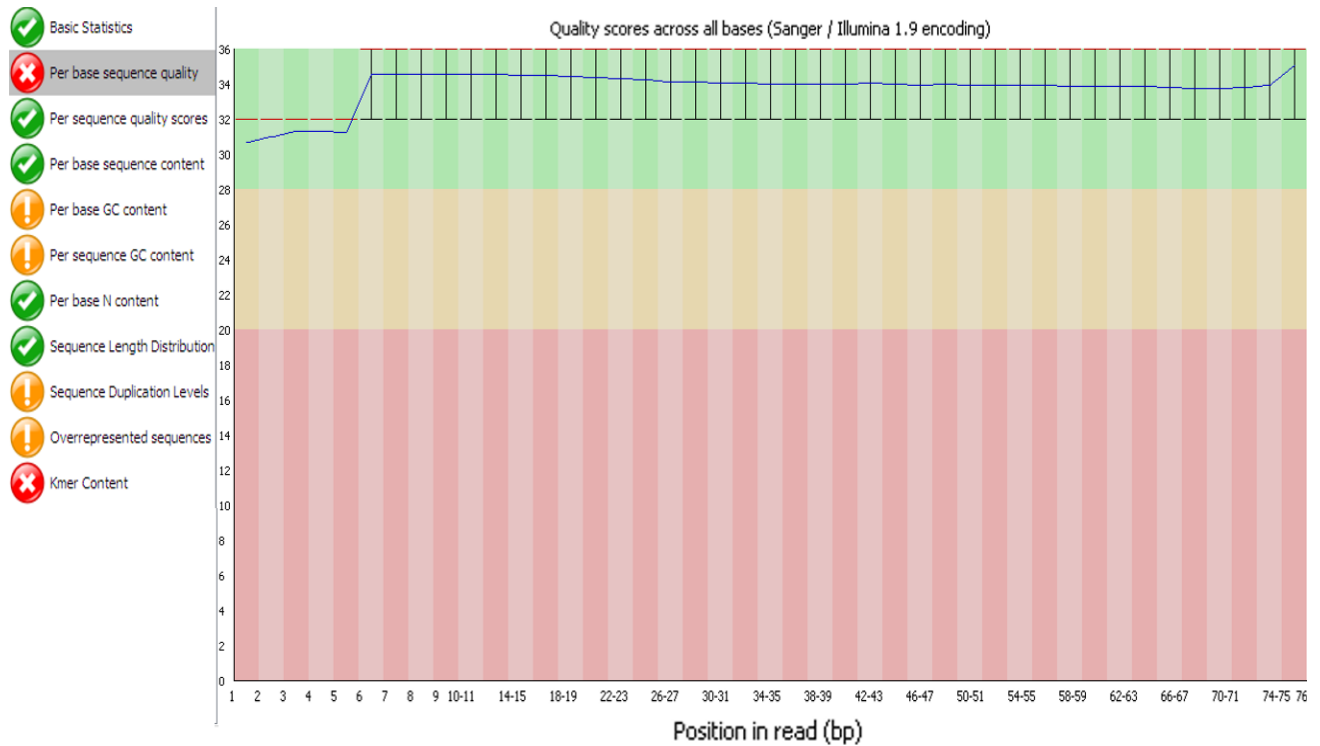


Figura 10. Gráfico FastQC de la muestra de aire de vagón tomada el 12 de noviembre.

El gráfico representa la calidad de las lecturas, luego de haber sido procesadas (eliminación de adaptadores, lecturas duplicadas y de nucleótidos de mala calidad). Los cuartiles se representan en forma de gráficos de cajas y bigotes, la línea azul es la mediana y la línea roja, la media de la calidad. En el eje X, se representa las bases de las lecturas y cada lectura tiene en este caso 76 pb. En el eje Y, se representan las calidades que van de 0-36, distinguiéndose tres zonas: La zona verde que abarca del 28-36 corresponden a una muy buena calidad, la zona naranja que abarca del 20-28 indica una calidad intermedia y la zona roja que abarca del 0-20 indican una mala calidad.

Tabla 11. Análisis de la calidad de las secuencias: número de lecturas totales, % de GC y calidad según el score de PRHED.

Con secuencias redundantes			Sin secuencias redundantes			Calidad
Número de muestra	Muestra	Secuencias totales	Secuencias totales	Secuencias de baja calidad	%GC	Calidad de las secuencias (valor PRHED)
1	Vagón 12 nov-Fw ¹¹	3359019	2167298	0	50	Buena (32-36)
1	Vagón 12 nov-Rv ¹²	3359019	2167298	0	49	Buena (32-36)
2	Taquilla 12 nov-Fw	3093541	2110229	0	52	Buena (32-36)
2	Taquilla 12 nov-Rv	3093541	2110229	0	50	Buena (32-36)
3	Hospital 12 nov-Fw	2036389	1404925	0	50	Buena (32-36)
3	Hospital 12 nov-Rv	2036389	1404925	0	48	Buena (32-36)
4	Vagón 26 nov-Fw	3738708	2414687	0	52	Buena (32-36)
4	Vagón 26 nov-Rv	3738708	2414687	0	50	Buena (32-36)
5	Taquilla 26 nov-Fw	3542346	2274345	0	52	Buena (32-36)
5	Taquilla 26 nov-Rv	3542346	2274345	0	51	Buena (32-36)
6	Hospital 26 nov-Fw	5696453	3536010	0	52	Buena (32-36)
6	Hospital 26 nov-Rv	5696453	3536010	0	50	Buena (32-36)

En general, el 31%-37% de las secuencias obtenidas correspondían a secuencias redundantes.

8.3 Análisis preliminar con Kraken

El promedio total de las lecturas fue de 2,317,915 (*forward*) y el mismo valor para las lecturas *reverse*¹³. Considerando este valor promedio, el análisis preliminar con Kraken reveló que el 42% de las lecturas pertenece a bacterias, dentro de las cuales predomina sobre todo el filo Proteobacterias (47.38%), seguido de Actinobacterias (22.45%) y Firmicutes (9.06%).

En menor porcentaje se encontraron *Cyanobacteria* (6.91%), *Bacteroidetes* (4.99%) *Spirochaetia* (0.68%), *Fusobacterias* (0.42%), *Planctomycetes* (0.33%), *Acidobacteria* (0.11%) y *Dyctyoglomi* (0.02%). La proporción de Eucaria asignada por Kraken fue

¹¹ Forward

¹² Reverse

¹³ Se hizo la sumatoria del número de lecturas en cada una de las muestras (una vez que se eliminaron las secuencias redundantes) y se dividió entre el número total de muestras (es decir, entre 6). El cálculo se realizó por separado para las lecturas *forward* y las *reverse*.

del 2% y los virus se encontraron en un 0.2%. El 55.8% de las lecturas no fueron asignadas a ninguna de estas categorías con esta herramienta de asignación taxonómica (Figura 11).

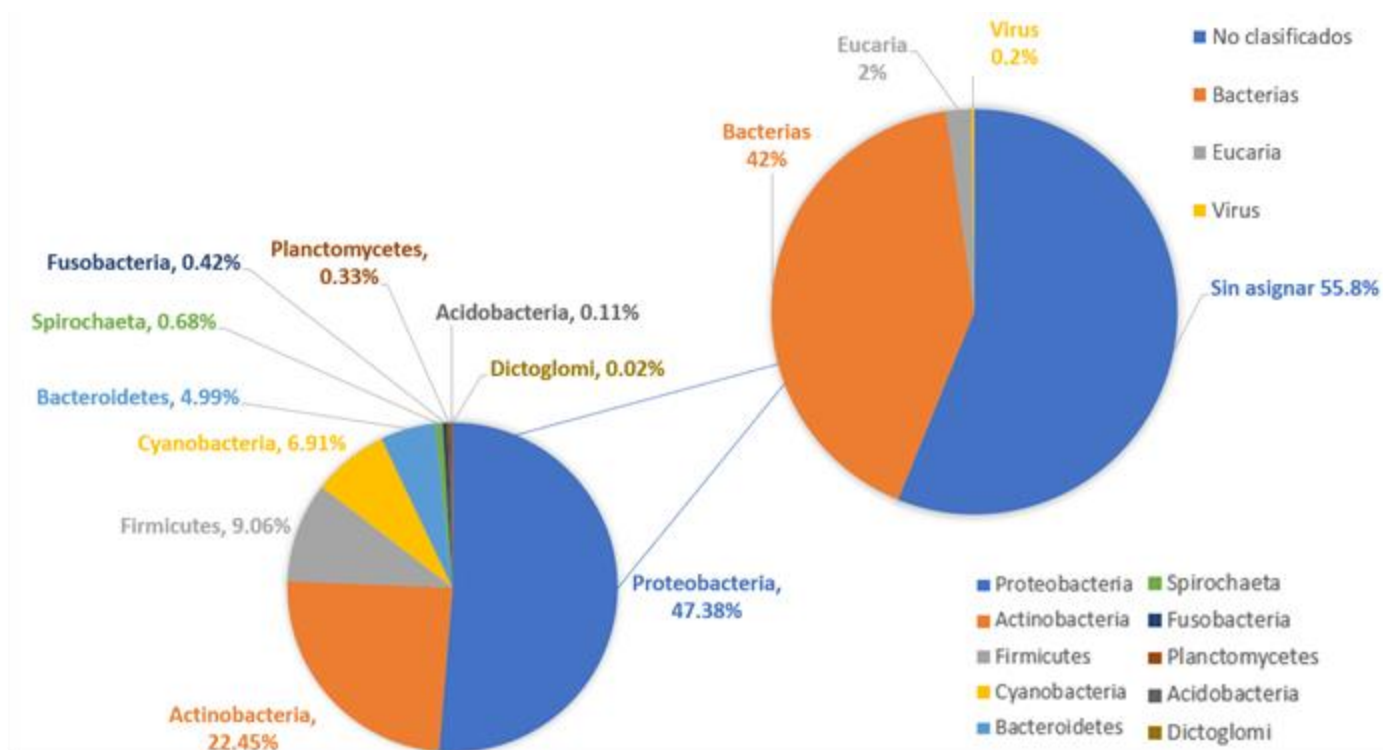


Figura 11. Asignación taxonómica de las lecturas en las categorías bacterias, eucaria y virus.

Partiendo del promedio, el análisis preliminar con Kraken refiere que el 42% pertenece a bacterias (en color naranja), el 2% a Eucaria (en color gris) y el 0.2% a virus (en color amarillo). Los fila de bacterias que predominaron fueron *Proteobacterias* (47.38%), *Actinobacterias* (22.45%) y *Firmicutes* (9.06%). En menor proporción se encontraron *Cyanobacterias* (6.91%), *Bacteroidetes* (4.99%) *Spirochaetia* (0.68%), *Fusobacterias* (0.42%), *Planctomycetes* (0.33%), *Acidobacteria* (0.11%) y *Dyctyoglomi* (0.02%).

Las muestras fueron analizadas de manera independiente, la figura anterior representa la distribución promedio considerando las 6 muestras y en el caso de bacterias se representan los fila y la proporción en que se encontraron.

La distribución proporcional de los fila bacterianos se mantuvo similar en la mayoría de las muestras (Figura 12).

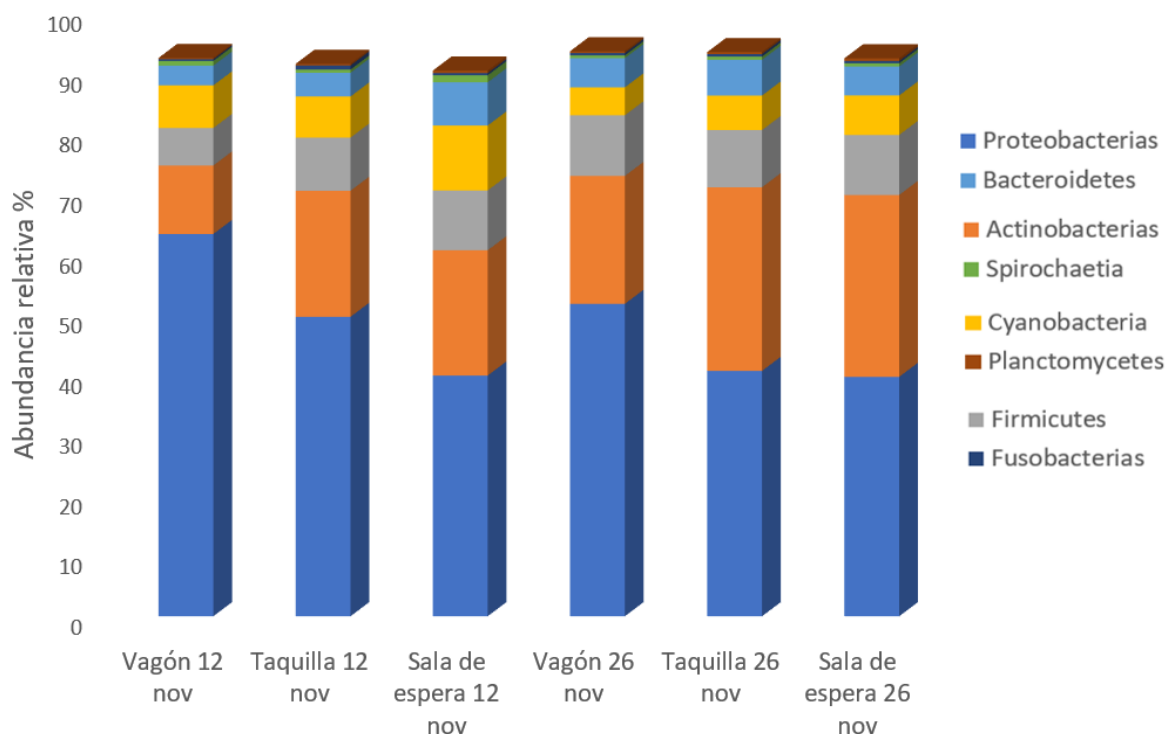


Figura 12. Diversidad taxonómica a nivel Fila en las muestras de aire.

En el eje “X” se especifica el sitio y la fecha de muestreo y en el eje “Y” se indica la abundancia relativa (%). La distribución proporcional de los fila bacterianos se mantuvo similar en todas las muestras, en donde predominaron sobre todo las Proteobacterias, Actinobacterias y Firmicutes.

Para el análisis a nivel de géneros bacterianos, se separaron aquellos géneros que fueron predominantes en todas las muestras según el número de lecturas asignadas y se obtuvo el promedio de todas las muestras (Figura 13). El género que predominó en todas las muestras fue *Acinetobacter* (4.07%), en cuyo caso, la mayoría de sus especies se distribuyen ampliamente en la naturaleza, siendo la mayoría de tipo ambientales. Algunas especies de *Acinetobacter* se relacionan también con infecciones nosocomiales, por ejemplo *A. baumannii*, que tiene cepas multirresistentes a los tratamientos farmacológicos. Como géneros predominantes de tipo ambiental se encontraron *Paracoccus* (3.81%), *Rhodobacter* (1.35%), *Psychrobacter* (1.16%), *Kocuria* (1.04%), *Microlunatus* (1.16%), *Flavobacterium* (0.95%), *Deinococcus* (0.88%) y *Synechococcus* (0.76%). Géneros como *Pseudomonas* (3.30%), *Corynebacterium* (2.43%), *Propionibacterium* (2.03%),

Streptococcus (1.14%), *Flavobacterium* (0.94%) y *Aeromonas* (0.73%) se encontraron como géneros que además de tener especies relacionadas con el ambiente, tienen especies consideradas como patógenos oportunistas, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* representa una importante causa de enfermedades nosocomiales en hospitales.

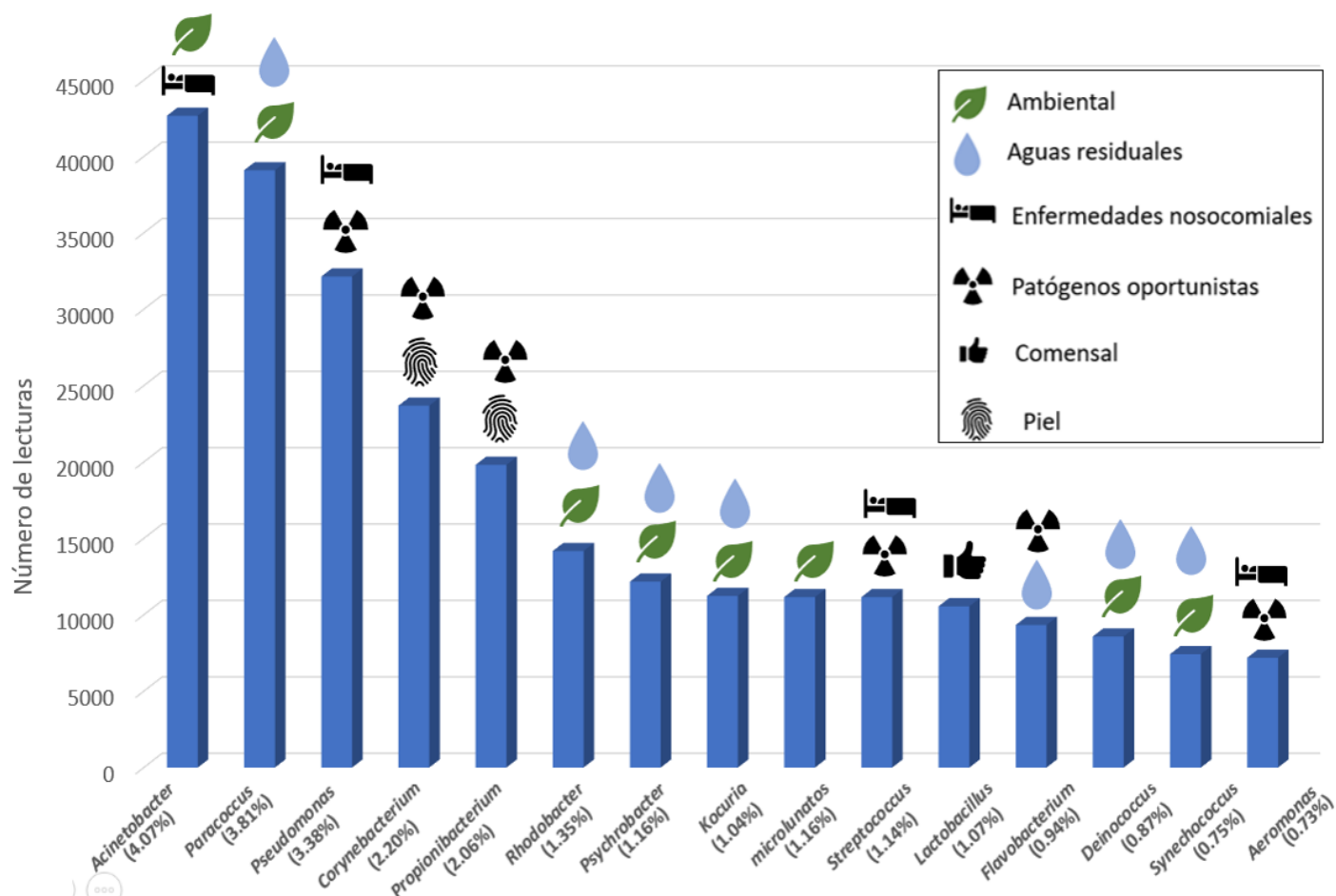


Figura 13. Géneros bacterianos predominantes en todas las muestras.

En el eje “X” se grafica el número de lecturas asociadas a un género particular y en el eje “Y” se especifica el género y el porcentaje en el que estuvo presente en las muestras. Para ello, se obtuvo el promedio del número de lecturas asociadas a cada género en todas las muestras. Los géneros que estuvieron presentes en mayor proporción en todas las muestras fueron *Acinetobacter* (4.07%), *Paracoccus* (3.81%), *Pseudomonas* (3.38%), *Corynebacterium* (2.20%) y *Propionibacterium* (2.06%).

Las muestras también fueron analizadas por separado con el objetivo de determinar las diferencias en la proporción de bacterias en función de sus géneros (Figura 14).

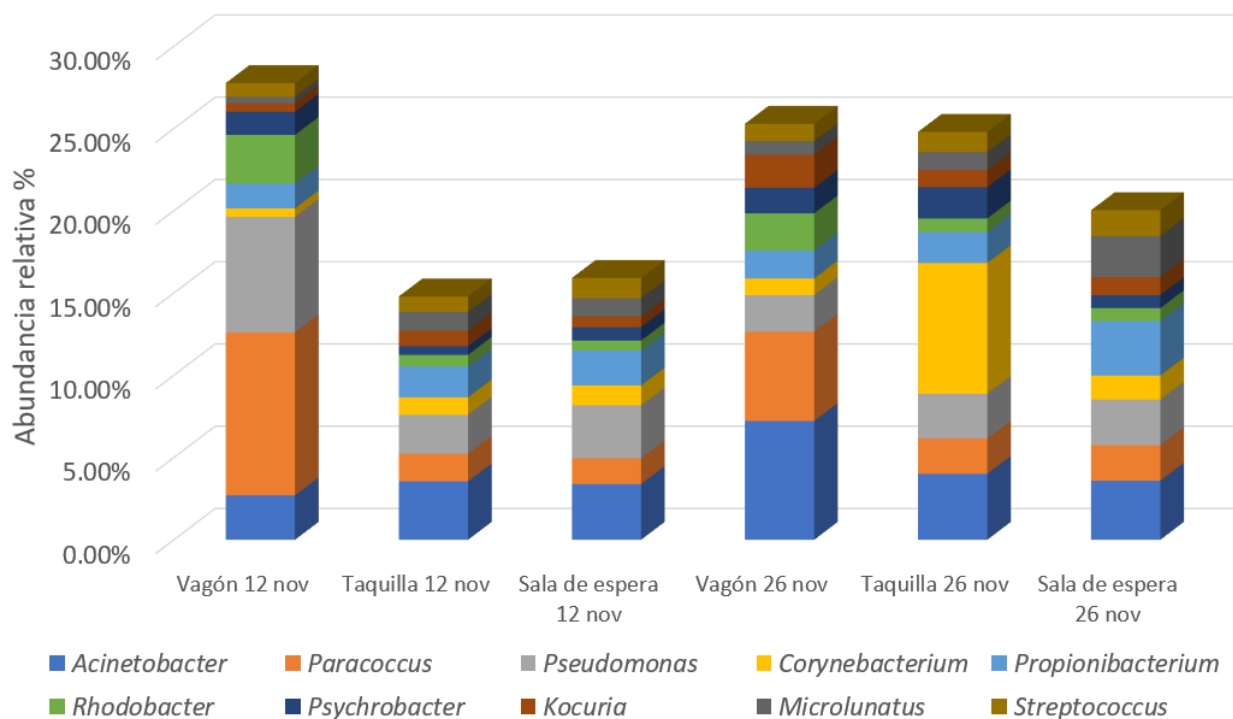


Figura 14. Diversidad taxonómica a nivel de géneros en las muestras de aire.

En el eje “X” se especifica el sitio y la fecha de muestreo y en el eje “Y” se indica la abundancia relativa (%). A nivel de géneros se observa que, el género *Paracoccus* (en color naranja) estuvo presente en una mayor proporción en las muestras de aire del vagón del día 12 y 26 de noviembre en comparación con los otros sitios muestreados, mientras que los géneros *Propionibacterium* (en color azul cielo) y *Streptococcus* (en color café) se mantuvieron en proporciones similares en todas las muestras.

8.4 Validación: asignación taxonómica con Taxonomer

Taxonomer agrupa las lecturas en las siguientes categorías: humano, bacterias, hongos, virus y fagos, en el caso de aquellas lecturas que se identifican con 2 categorías son asignados como “ambigüos” y las lecturas que no caben en ninguna categoría son clasificados como “Desconocido”. A diferencia de Kraken, taxonomer emplea diferentes fuentes o bases de datos por categoría: *The human transcript database* para la categoría “humano”, UNITE para la categoría “hongos”, *Greengenes* para la categoría “bacterias” y UniRef90 para la categoría “virus”) (Flygare *et al.*, 2016).

La clasificación de las lecturas en las categorías mencionadas por cada muestra se detalla en la tabla 12:

Tabla 12. Número de lecturas asignadas por categoría por muestra.

Muestra	Humano	Bacterias	Virus	Fagos	Hongos	Desconocido	Ambigüos
VAGÓN 12 NOV	276,569	870,418	4,545	179	8,858	776,785	229,944
TAQUILLA 12 NOV	322,480	999,174	3,333	210	19,833	536,809	234,382
HOSPITAL 12 NOV	19,867	497,881	2,968	163	16,044	485,786	195,204
VAGÓN 26 NOV	244,182	1,264,309	3,285	232	24,529	608,462	269,661
TAQUILLA 26 NOV	290,618	1,125,293	2,906	174	22,649	552,996	279,709
HOSPITAL 26NOV	910,708	910,202	3,218	141	24,890	909,805	777,046

Para tener una mejor representación de la tabla anterior se obtuvo el promedio del número de lecturas asignadas por categoría considerando todas las muestras¹⁴ (Figura 15):

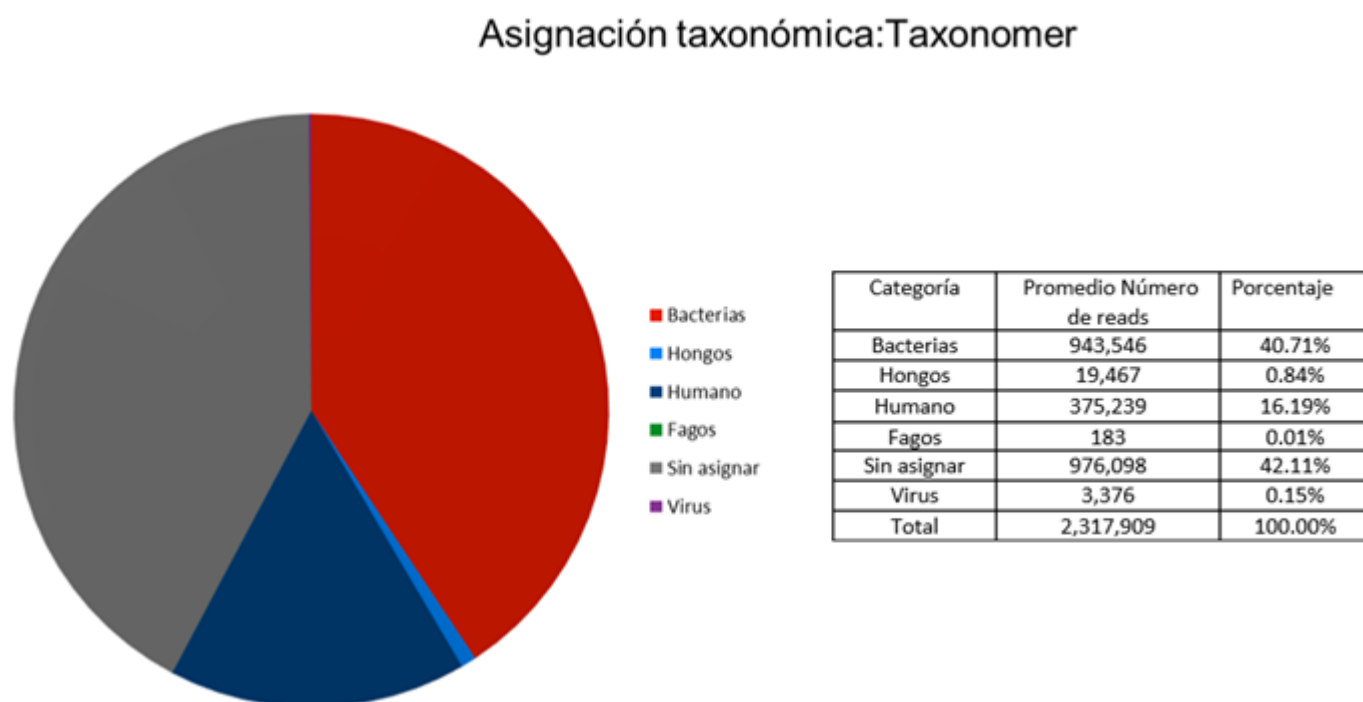


Figura 15. Asignación taxonómica realizada con Taxonomer.

El 40.71% en todas las muestras correspondió a bacterias (representadas en color rojo), mientras que el 16.19% se asignó a humano (representadas en color azul marino), el 0.84% a hongos (representadas en color azul cielo), y el 0.15% a virus (representadas en color morado).

Con Taxonomer, el % de lecturas no asignadas fue del 42.11%, en comparación con Kraken, en donde el porcentaje fue del 55.8% (Taxonomer redujo en un 13.8% las lecturas sin asignar). Los hongos y las lecturas asignadas a humano entran dentro de la categoría categoría “Eucaria”, en donde el porcentaje es del 17.03%, un 15.03% más que la asignación realizada con Kraken; para el caso de los virus, el porcentaje asignado es del 0.16% (tomando en cuenta virus y fagos), en donde la diferencia en comparación con el porcentaje asignado por Kraken es sólo del 0.04%. En un promedio de todas las muestras, la categoría bacterias tuvo un 40.72%.

¹⁴ El promedio se calculó sumando el número de lecturas asignadas a cada categoría, de todas las muestras colectadas (Vagón, Taquilla y Sala de espera del Hospital de los días 12 y 26 de noviembre). El producto de la suma se dividió entre el número de muestras (es decir, entre 6).

A nivel Fila bacterianos, Taxonomer identifica como predominantes Proteobacterias, seguido de Actinobacterias y Firmicutes (Figura 16).

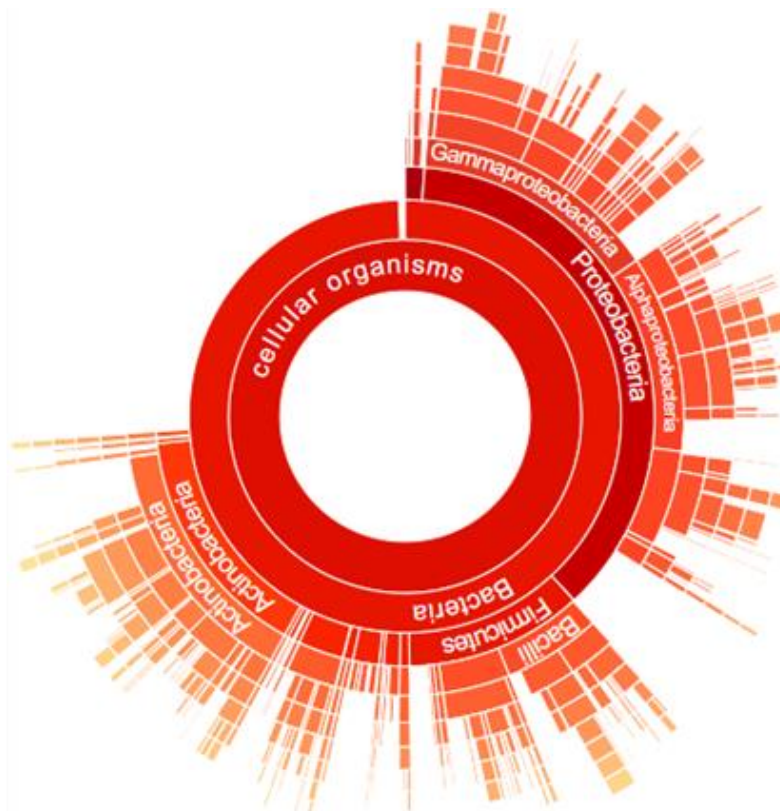


Figura 16. Fila bacterianos predominantes según Taxonomer.

Los fila que se encontraron en mayor proporción fueron Proteobacterias (sobre todo gammaproteobacterias y alfaproteobacterias), seguido de Actinobacterias y Firmicutes. Estos hallazgos son consistentes con los reportados en Kraken.

8.5 Análisis de la biodiversidad de las muestras ambientales a partir de los “contigs” con MEGAN Metagenomics

Obtención de los “contigs” por ensamblaje de novo.

La calidad de los ensamblajes *de novo* obtenida por QUAST se describe en la tabla 13. Se lograron ensamblar en total 48,943 “contigs” de hasta 3722pb, en todas las

muestras se obtuvieron al menos cuatro mil “*contigs*”, todos los cuales fueron analizados por BLASTx y posteriormente en MEGAN.

Tabla 13. Análisis de la calidad del ensamblaje de novo por QUAST.

Parámetro de calidad	Vagon 12Nov	Taquilla 12Nov	Hospital 12Nov	Vagon 26Nov	Taquilla 26Nov	Hospital 26Nov
# “ <i>contigs</i> ” (>= 76 pb)	4852	8446	5325	9327	8793	12200
# “ <i>contigs</i> ” (>= 1000 pb)	26	41	38	41	44	115
Contig más largo	3721	3722	2554	2553	3359	2836
N50	786	771	748	733	801	815
N75	594	604	584	590	600	606
GC (%)	49.54	47.52	48.74	48.72	50.08	49.55

Las especies microbianas que no son posibles de cultivar en el laboratorio están subrepresentadas en gran parte de las bases de datos, lo cual es un desafío para la clasificación taxonómica de muestras ambientales. Además, la tasa de evolución microbiana es más rápida en comparación con los organismos eucariotas debido a las tasas de replicación más altas (Bentley and Parkhill, 2004). Por lo anterior, los estudios metagenómicos a menudo ignoran una gran fracción de datos que permanecen sin ser clasificados o solo muestran bajas similitudes de secuencia con las especies conocidas. En tales muestras, el uso de la clasificación a nivel de proteínas puede aumentar la precisión, debido a que las secuencias de proteínas están más conservadas que el DNA subyacente (Menzel *et al.*, 2016). Además, la comparación de secuencias de proteínas es más tolerante a los errores de secuenciación debido a la degeneración del código genético (Menzel *et al.*, 2016).

MEGAN, utiliza las secuencias que fueron alineadas contra una base de datos de referencia de proteínas (en este caso NCBI-nr), y luego las analiza usando el algoritmo LCA (ancestro común más bajo), que asigna cada *contig* en el nodo taxonómico más bajo.

Para conocer la biodiversidad de las muestras ambientales utilizando MEGAN, se utilizaron los archivos de salida de BLASTx (que permite hacer alineaciones de nucleótidos traducidos a proteínas, usando como referencia la base de datos NCBI-nr), en automático, el programa asignó a cada secuencia un grupo taxonómico (Figura 17). Como ya se mencionó, la razón por la cual se utilizaron las secuencias de referencia de proteínas, es que las bases de datos de referencia de DNA actuales sólo cubren una pequeña fracción de la verdadera diversidad de los genomas que existen en el medio ambiente.

MEGAN realizó un mapa de calor (Figura 17) que representa la proporción de microorganismos asignados a un filo particular.

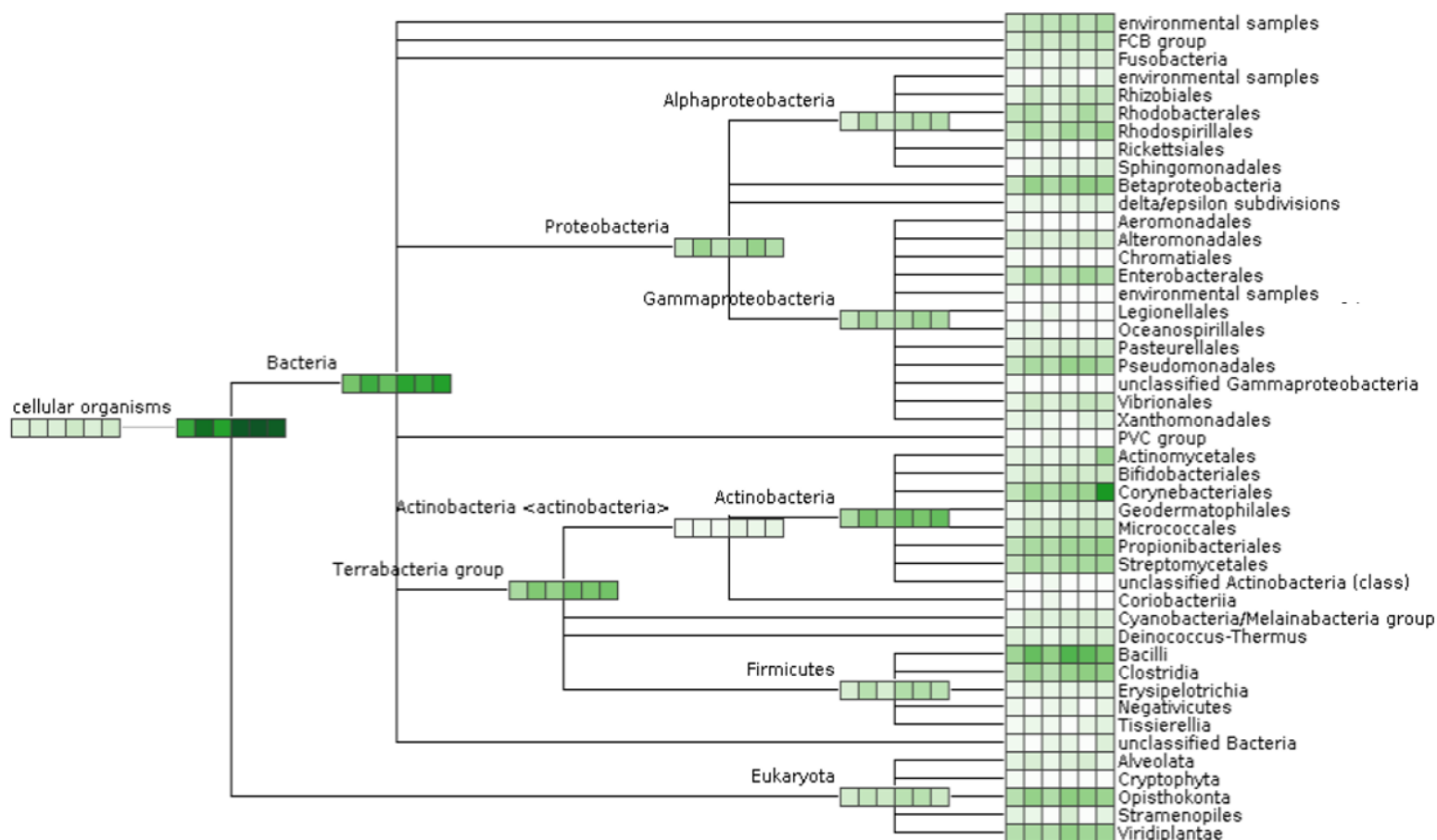


Figura 17. Asignación taxonómica con MEGAN metagenomics.

Los 6 cuadrantes representan las muestras analizadas, partiendo desde el lado izquierdo. Cuadrante 1) Vagón 12 noviembre. Cuadrante 2) Taquilla 12 noviembre, Cuadrante 3) Hospital 12 noviembre. Cuadrante 4) Vagón 26 noviembre. Cuadrante 5) Taquilla 26 noviembre. Cuadrante 6) Hospital 26 noviembre. En la figura, la intensidad del color indica la proporción de microorganismos asignados a cada grupo. A nivel fila, se observa que sobre todo predominaron las Proteobacterias y Actinobacterias.

A nivel fila, los que más predominaron fueron Proteobacteria y Actinobacteria, lo anterior es consistente con los hallazgos encontrados en Kraken y Taxonomer. Además, al hacer la apertura completa de todas las ramas, se encontraron géneros como *klebsiella*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Mycobacterium* y *Streptococcus*.

Análisis funcional con MEGAN metagenomics.

Además de la asignación taxonómica, MEGAN permite hacer análisis funcionales, en donde el interés particular fue encontrar genes que codifican para proteínas cuya función se relaciona sobre todo con mecanismos de resistencia y virulencia (Figura 18).

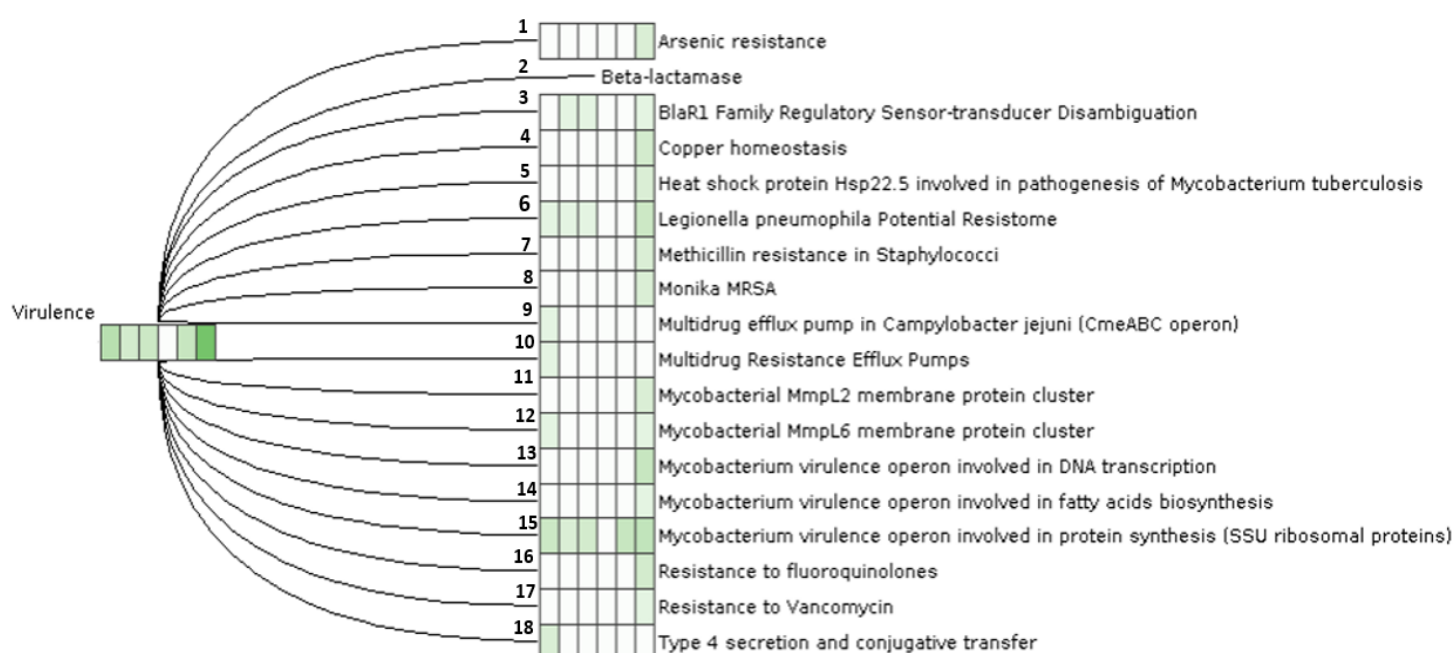


Figura 18. Análisis funcional de las proteínas implicadas en la virulencia que estuvieron presentes en las muestras.

Los 6 cuadrantes representan las muestras analizadas, partiendo desde el lado izquierdo. Cuadrante 1) Vagón 12 nov. Cuadrante 2) Taquilla 12 nov. Cuadrante 3) Hospital 12 nov. Cuadrante 4) Vagón 26 nov. Cuadrante 5) Taquilla 26 nov. Cuadrante 6) Hospital 26 nov. Se asignó a cada grupo de proteínas un número. En total, se encontraron 18 grupos de proteínas relacionadas con funciones de resistencia y virulencia, dentro de estas, Beta-lactamasas, Bombas de eflujo, Sistemas de secreción tipo IV, proteínas que inducen resistencia a las fluoroquinolonas y a la metilina, proteínas que participan en la regulación del cobre, etc.

MEGAN clasificó las proteínas que desempeñan funciones de virulencia y resistencia en 18 grupos (Tabla 14).

Tabla 14. Grupos de proteínas relacionadas con virulencia y resistencia, que fueron encontradas en el análisis funcional de MEGAN.

1.-Proteínas involucradas en la resistencia al arsénico	10.-Bombas de eflujo involucradas en la resistencia a múltiples antibióticos
2.-Beta-lactamasas	11.-Proteínas de membrana de micobacterias (MmpL2)
3.-Proteínas de membrana sensoras/transductoras BlaR1	12.-Proteínas de membrana de micobacterias (MmpL6)
4.- Proteínas que participan en la regulación del cobre	13.-Proteínas involucradas en la transcripción del DNA (codificadas por operones que regulan la <i>virulencia de Mycobacterium</i>)
5.-Proteínas de choque térmico Hsp22.5 involucradas en la patogénesis de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14.- Proteínas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos (codificadas por operones que regulan la <i>virulencia de Mycobacterium</i>)
6.-Resistoma de <i>Legionella pneumophila</i>	15.- Proteínas ribosomales SSU (codificadas por operones que regulan la <i>virulencia de Mycobacterium</i>)
7.- Proteínas involucradas en la resistencia a la metilina en estafilococos	16.- Proteínas involucradas en la resistencia a las fluoroquinolonas
8.- Proteínas involucradas en la resistencia a la metilina en <i>S. aureus</i>	17.- Proteínas involucradas en la resistencia a vancomicina
9.-Bombas multidrogas de eflujo en <i>Campylobacter jejuni</i> (operón CmeABC)	18.-Sistema de secreción tipo 4

En la figura 19 se detallan todas las proteínas asignadas a los grupos mencionados en la Tabla 14. Dentro de estas, se encontraron la subunidad α de la girasa, el factor de elongación Tu, bombas de eflujo de la familia RND, transportadores multidrogas de la familia Bcr/CflA, proteínas VirB6 del sistema de secreción tipo IV, la subunidad β de la RNA polimerasa y enzimas como la oxidasa multicobre, arseniato reductasa, succinato deshidrogenasa, etc.

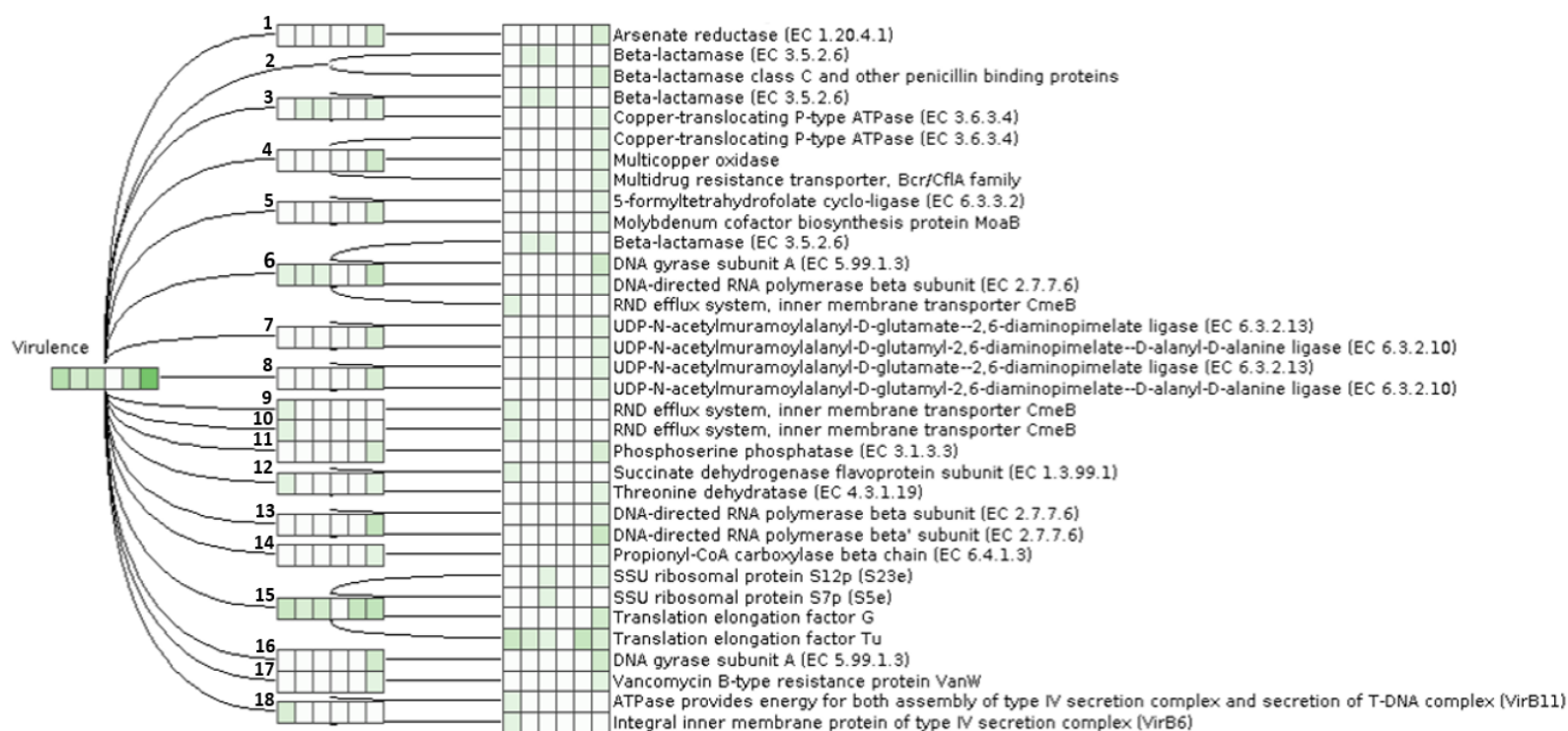


Figura 19. Proteínas relacionadas con virulencia y resistencia a los antibióticos que estuvieron presentes en las muestras.

Los 6 cuadrantes representan las muestras analizadas, partiendo desde el lado izquierdo. Cuadrante 1) Vagón 12 nov. Cuadrante 2) Taquilla 12 nov. Cuadrante 3) Hospital 12 nov. Cuadrante 4) Vagón 26 nov. Cuadrante 5) Taquilla 26 nov. Cuadrante 6) Hospital 26 nov. Cada número indica el grupo al que pertenecen las proteínas encontradas, de acuerdo con la tabla 14. Dentro de las proteínas estuvieron beta-lactamasas, proteínas ribosomales (S12p y S7p), la subunidad α de la girasa, el factor de elongación Tu, bombas de eflujo de la familia RND, proteínas VirB6 del sistema de secreción tipo IV, la subunidad β de la RNA polimerasa y enzimas como la oxidasa multicobre, arseniato reductasa, succinato deshidrogenasa, etc.

8.6 Microorganismos “potencialmente patógenos” encontrados a partir del análisis preliminar de los *contigs*.

Para caracterizar la diversidad taxonómica de las muestras a nivel de especies, se realizó un análisis preliminar con Kraken, partiendo de los *contigs* obtenidos con metaSPAdes (Figura 5). Tomando en cuenta los géneros bacterianos que fueron más abundantes en todas las muestras, se identificaron especies como *Acinetobacter baumannii*, *Propionibacterium acnes*, *Aeromonas veronii*, *Paracoccus denitrificans*, entre otras (Anexo 1). Los géneros que tuvieron la mayor diversidad de especies encontradas fueron *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Pseudomonas*.

Se consideraron como “potenciales patógenos”, aquellos microorganismos que según la ACDP (Advisory Committee on Dangerous Pathogens, 2016) y la base de datos GESTIS se encontraban clasificadas dentro de las categorías 2 a la 4 (Tabla 3).

En total se encontraron 88 especies diferentes. La mayor parte de estos agentes biológicos con potencial patogénico se relaciona sobre todo con infecciones respiratorias, seguido de infecciones gastro-intestinales (Anexo 2). También se encontraron, aunque con una menor diversidad, especies relacionadas con infecciones urinarias, infecciones en piel y heridas, infecciones periodontales e infecciones transmitidas por pulgas o garrapatas (Anexo 2). Especies de interés particular relacionadas con infecciones nosocomiales son *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Paradisi *et al.*, 2001), (Obritsch *et al.*, 2005).

Partiendo de las especies “potencialmente patógenas” encontradas en las muestras, se realizó un mapa de calor, considerando únicamente aquellas que se relacionan con infecciones respiratorias y gastrointestinales¹⁵, en donde, la mayor intensidad en el color es indicativo de un mayor número de *contigs* que correspondieron a una especie particular. Esto con la finalidad de observar diferencias en la abundancia de microorganismos con potencial patógeno en los diferentes sitios muestrados (Figura 20).

¹⁵ Se consideraron estos grupos debido a que en ellos se encontró la mayor diversidad de especies con “potencial patogénico”.

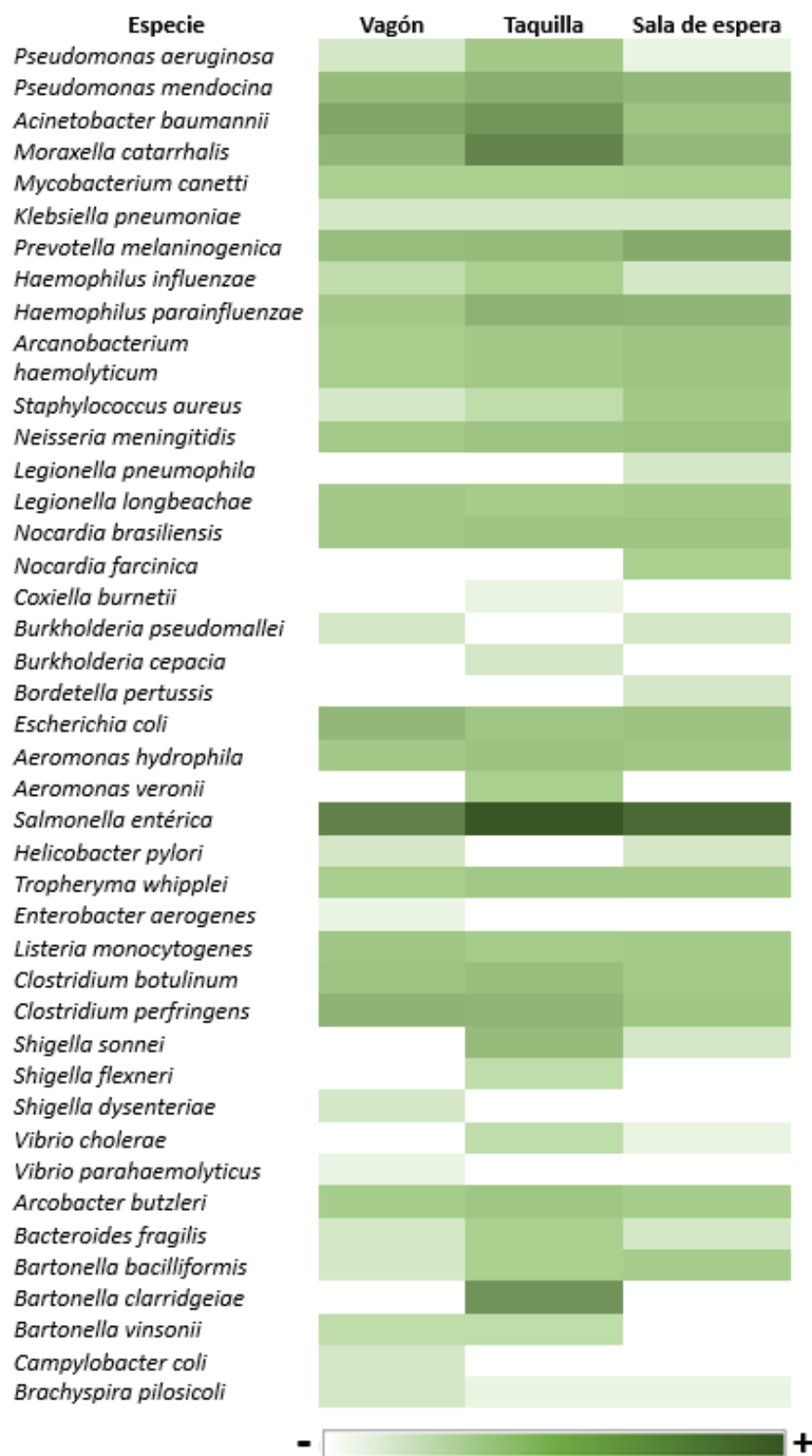


Figura 20. Abundancia de microorganismos con potencial patógeno en los diferentes sitios muestreados.

En el mapa de calor, la mayor intensidad en el color es indicativo de un mayor número de contigs que correspondieron a una especie particular. La mayoría de los géneros se encuentran presentes en los 3 sitios muestreados, con excepción de los géneros *Legionella pneumophila*, *Nocardia farcinica* y *Burkholderia cepacia* que se encontraron únicamente en las muestras de las salas de espera del Hospital 20 de noviembre y los géneros *Coxiella burnetii*, *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas veronii*, *Shigella flexneri*, *Bartonella clarridgeiae*, *Enterobacter aerogenes* y *Shigella dysenteriae* que estuvieron presentes en la estación del metro Hospital 20 de noviembre pero no en las salas de espera.

Considerando que estos hallazgos son preliminares, será necesario corroborar estos datos a partir de otro tipo de análisis que incluya asignaciones taxonómicas con MEGAN partiendo de archivos de salida de BLASTn, en donde se consideren únicamente *contigs* con una longitud ≥ 1500 pb, además para tener una certeza de las especies que se encuentren en los aerosoles de ambientes cerrados, en estudios a futuro se deberán complementar este tipo de hallazgos con el estudio simultáneo de muestras de aire a través de medios de cultivos. Lo anterior permitirá tener una idea más completa respecto de las comunidades microbianas que se encuentran presentes en los aerosoles.

8.6.1 Detección del virus de la influenza A H1N1 en las muestras de aire

De las 25 muestras de aire colectadas, 11 fueron positivas para el virus de la influenza A H1N1 en la RT-PCR en tiempo real, es decir que el virus estuvo presente en el 44% de las muestras obtenidas en los meses de octubre y noviembre.

El área en donde se encontró el virus en la mayoría de las muestras fue en las salas de espera del Hospital 20 de noviembre, seguido del área de taquilla del metro, en este caso el virus se encontró en 3 de las muestras colectadas que corresponden al 22 de octubre y el 12 y 26 de noviembre (Tabla 15).

Tabla 15. Detección de influenza AH1N1 en las muestras de aire¹⁶.

Sitio	1 y 2 oct	22 oct	12 nov	26 nov
Aire taquilla	+	+	+	+
Aire torniquetes	-	-	-	-
Aire andén	+	+	-	-
Aire vagón	-	-	+	-
Aire sala de espera 1	-	+	-	-
Aire sala de espera 2	-	+	+	+
Aire del laboratorio ¹⁷	-	-	-	-

¹⁶ Las muestras positivas se marcan con un signo “+” y las negativas con el signo “-”.

¹⁷ Una muestra de aire del laboratorio fue utilizada como control negativo.

8.6.2 Detección del virus de la influenza A H1N1 en las muestras de superficies.

En total el virus estuvo presente en 7 de las 17 muestras analizadas por la RT-PCR en tiempo real (Tabla 16).

Tabla 16. Detección del virus de la influenza A H1N1 en las muestras de superficies.

Sitio	1 oct	22 oct	12 nov	26 nov
Suelo	-	-	-	+
Torniquetes	-	+	-	+
Vagón	-	+	+	-
Escaleras del Hospital 20 de noviembre	+	+	-	-
Mesa de trabajo del laboratorio ¹⁸	-	-	-	-

8.7 Identificación de genes que codifican para proteínas implicadas en la resistencia a antimicrobianos

Partiendo de un total de 27,814,988 2038 lecturas, se hizo el mapeo contra el índice que se construyó con la base de datos CARD¹⁹. El resultado del mapeo contra el índice arrojó en total 2038 lecturas, tomando en cuenta que las lecturas fueron pareadas, se considera que en total se encontraron 1019 genes relacionados con resistencia a los antimicrobianos. A partir de estos, se realizó un BLASTx para identificar las proteínas para las cuales codifican estos genes. La tabla 17 agrupa las proteínas identificadas por BLASTx, según su función, y la familia de antibióticos para la cual se ha reportado resistencia. Los resultados completos, obtenidos por BLASTx se añadieron en el Anexo 3.

Las lecturas que coincidieron con las secuencias de referencia de la base de datos CARD, en su mayoría corresponden a genes que codifican para el Factor de elongación Tu (EF-Tu) (24%), beta-lactamasas (18.5%), la subunidad β de la RNA-polimerasa (12%), transportadores de la familia RND (12%), y para las subunidades

¹⁸Una muestra de superficie de la mesa de trabajo del laboratorio se utilizó como control negativo.

¹⁹ Disponible en

[https://www.patricbrc.org/view/Taxonomy/2#view_tab=specialtyGenes&filter=and\(or\(eq\(property,%22Antibiotic%20Resistance%22\)\),eq\(source,%22CARD%22\)\)](https://www.patricbrc.org/view/Taxonomy/2#view_tab=specialtyGenes&filter=and(or(eq(property,%22Antibiotic%20Resistance%22)),eq(source,%22CARD%22)))

α y β de la DNA girasa (6%), También se encontraron, aunque en menor proporción, lecturas que codifican para las subunidades ribosomales S12p y S7p (4%) y para las subunidades α y β de la topoisomerasa IV (2.9%) (Tabla 17).

Tabla 17. Proteínas implicadas en la resistencia a los antimicrobianos que se encontraron en las muestras.

Proteína	% de Lecturas	Función	Antibiótico (s) relacionados con resistencia
Factor de elongación Tu	24.02	Participa en la etapa de elongación durante la traducción	Kirromicina
Beta-lactamasas (TEM 1, TEM 12, TEM, TEM 89, TEM 116, TEM 160, OXA-12, OXA-134, OXA-235, OXA-276, OXA-726, MOX-13)	18.52	Inactiva los antibióticos de la familia beta-lactámicos, los cuales buscan inhibir la síntesis de la pared bacteriana	Antibióticos beta-lactámicos
Transportadores multidrogas RND	12.28	Bombas de eflujo bacteriano, transporte activo de sustratos	Tetraciclinas Macrólidos Fluoroquinolonas Diaminopirimidinas Beta-lactámicos Aminoglucósidos Aminocumarina Acriflavina
Subunidad β de la RNA polimerasa dependiente de DNA	12.08	Síntesis de RNAm durante transcripción	Rifamicina y fidaxomicina
DNA girasa (subunidades α y β)	6.19	Actúa durante la replicación del DNA para reducir la tensión molecular causada por el superenrollamiento	Fluoroquinolonas
Proteínas no caracterizadas	4.93	Desconocido	Desconocido
Proteínas ribosomales (S7p, S10p, S12p)	4.26	Forman el complejo para dar lugar al inicio de la traducción	Tetraciclina-S7 y derivados (Tigleciclina)-S10 Aminoglucósidos-S12
DNA Topoisomerasa IV (subunidades α y β)	2.94	Contribuye a la desnaturalización y desacetilación de las hebras	Quinolonas
Alanina—tRNA sintetasa	2.48	Conversión del ácido dihidrofólico a su forma funcional, el ácido tetrahidrofólico	Cicloserina
Transportadores multidrogas MFS	2.05	Proteínas de transporte de membrana que facilita el movimiento de solutos a través de las membranas celulares en respuesta a gradientes quimiosmóticos	Tetraciclinas Fluoroquinolonas Gliciliclinas Beta-lactámicos Macrólidos Lincosamida Fenicoles Fosfomicina Oxazolidinona Diaminopirimidina
Transportadores ABC (ATP-binding)	1.74	Proteínas transportadoras de	Fluoroquinolonas

cassette domain-containing protein)		membrana	Tetraciclinas Beta-lactámicos Acridina Rifamicina Nitroimidazol Pleuromutilina
Sistema de dos componentes (histidina quinasa): BasS/PmrB y Envz	0.81	Detectan y amplifican las señales o cambios en las condiciones ambientales, permitiendo la generación de respuestas específicas.	Péptidos antimicrobianos Carbapenem y etapenem
Sistema de reparación de nucleótidos acoplado a transcripción	0.70	Reclutamiento de la maquinaria de reparación de escisión de nucleótidos, Actividad de ATPasa	Quinolonas
Regulador transcripcional LysR	0.70	Regula la transcripción de genes blanco (beta-lactamasas, toxoflavina, entre otros)	Tetraciclinas Cloruro de benzalconio Isoniazida Nitroimidazol Glicilciclina Rodamina Rifamicina Acridina Cefalosporinas Lincosamida Macrólidos Fosfomicina Fluoroquinolonas
Transposasas	0.70	Cataliza el movimiento de los transposones	Pueden contener diversos genes de resistencia a los antibióticos
Isoleucil-RNAt sintetasa	0.50	Cataliza la conjugación del RNAt con el aminoácido. Una vez que el RNAt se ha cargado, el ribosoma puede transferir el aminoácido desde el RNAt a un péptido en crecimiento	Mupirocina
Lincosamida nucleotidiltransferasa Lnu	0.50	Metilación del RNAr 23S por metiltransferasas e inactivación del antibiótico por adenilación de la Lincosamida (Luo <i>et al.</i> , 2017)	Lincomicina Clindamicina
Hidroperoxidasa I (HPI) (codificada por katG)	0.50	Factor de virulencia que participa en la desintoxicación de los compuestos reactivos de oxígeno generados por los macrófagos del huésped (Devito and Morris, 2003)	Aminoglucósidos Isoniazida
Regulador transcripcional del operón KDP	0.47	Codifica para Transportador de K ⁺ , el cual participa en la regulación del control osmótico. La resistencia se atribuye a su participación en el efujo de salida de los antibióticos (Zhou <i>et al.</i> , 2003)	Aminoglucósidos

UDP-N-acetilglucosamina aciltransferasa (LpxA)	0.40	Involucrado en la biosíntesis del lípido A en bacterias Gram negativas y las mutaciones a este gen pueden causar resistencia a los péptidos antimicrobianos que se dirigen a la membrana externa	Péptidos antimicrobianos
Dihidropteroato sintetasa tipo 2 (proteína de resistencia a sulfonamida)	0.40	Origina la incorporación del ácido paraaminobenzoico (PABA) en el ácido dihidropteroico, el precursor inmediato del ácido fólico	Sulfonamida
Dihidrofolato reductasa	0.30	Enzima clave en el metabolismo de los folatos,	Diaminopirimidinas (Trimetoprim)
Aminoglucósidos fosfotransferasa	0.20	Cataliza la adición de un fosfato de ATP al grupo 3'-hidroxilo de un aminoglucósido, esta fosforilación altera eficazmente su mecanismo de acción	Aminoglucósidos
Aminotransferasa Clase III dependiente de piridoxalfosfato	0.20	Formación de una aldimina externa luego de la disociación del residuo lisina	Desconocido
Dominio de unión a GTP	0.20	No especificado	Desconocido
UDP-N-acetilglucosamina 1-carboxiviniltransferasa	0.20	Formación de la pared celular (peptidoglucano). Agrega enolpiruvilo a la UDP-N-acetilglucosamina	Fosfomicina
Transportadores FMN/FAD	0.17	Coenzima que interviene en las reacciones metabólicas de oxidación-reducción	Análogos de Riboflavina
Proteína Tirosina fosfatasa	0.17	eliminan los grupos fosfato de los residuos de tirosina fosforilados en las proteínas	Desconocido
Proteína de resistencia a la kenamicina	0.13	Induce resistencia a la kenamicina	Kenamicina (aminoglucósidos)
Proteína de unión a la penicilina	0.13	Tienen afinidad de unión por la penicilina	Penicilina
Factor de elongación G	0.13	Cataliza la translocación del RNAt y el RNAm a través del ribosoma	Ácido fusídico
Proteínas de resistencia a eritromicina Erm(B)	0.13	RNAr metiltransferasa	Eritromicina (aminoglucósidos)
Transportador de glicerol-3-fosfato	0.10	Biosíntesis de fosfolípidos en la célula	fosfomicina
Bomba de eflujo de la familia MATE (mdtK)	0.10	Transportador antiport (fármacos, sodio o protones)	Tetraciclinas Fluoroquinolonas Glicilicilina Acridina
Proteína accesoria de la hidrogenasa-HypA	0.10	Participa en la maduración de hidrogenasas. Necesario para la transferencia de níquel en el centro activo de Sukla hidrogenasa	Desconocido
UDP-3-O-[3-hidroximiristoil] N-	0.10	Biosíntesis del lípido A en	Péptidos antimicrobianos

acetilglucosamina desacetilasa		bacterias Gram negativas	
Ácido UDP-glucurónico oxidasa bifuncional/UDP-4-amino-4-desoxi-L-arabinosa formiltransferasa	0.10	Biosíntesis de lipopolisacáridos.-cataliza la descarboxilación oxidativa del ácido UDP-glucurónico y la adición de un grupo formilo a la UDP-4-amino-4-desoxi-L-arabinosa	Polimixina
Regulador de respuestas	0.10	Regula la respuesta de una célula a los cambios en su entorno como parte de un sistema regulador de dos componentes.	Tetraciclinas Aminocoumarin Beta-lactámicos Aminoglucósidos Fluoroquinolonas Macrólidos Aminopirimidina Acridina Triclosán Glicilciclina Fenicol
Regulador transcripcional Crp (proteína cíclica del receptor de AMP)	0.10	Regulador de la transcripción que controla diversos procesos celulares bacterianos: juega un papel crítico en la germinación de esporas y el desarrollo de colonias	Tetraciclinas Beta-lactámicos Fenicol Fluoroquinolonas Aminocoumarina Acridina Diaminopirimidina Aminoglucósidos Macrólidos Triclosán Glicilciclina
Proteína resistente al ácido fusídico	0.10	Unión al factor de elongación G	Ácido fusídico
Proteína de resistencia al isotiocianato alifático	0.03	Transportador/bomba de eflujo	Isotiocianato

Al comparar las muestras entre sitios y fechas de muestreo, se encontraron en común en todos los sitios y fechas las beta-lactamasas, el EF-Tu, la RNA-polimerasa, los transportadores de la familia RND, la DNA girasa, subunidades de las proteínas ribosomales y transportadores de la familia MFS (Tabla 18). Dentro de aquellas que fueron únicas de sitio estuvieron la aminoglucósido 3' fosfotransferasa, la isoleucina RNAt ligasa y el regulador transcripcional Crp (en el Hospital 20 de noviembre), la dihidrofolato reductasa, el factor del acoplamiento de reparación de la transcripción y la proteína de resistencia a la kenamicina (en el vagón), la proteína de resistencia a eritromicina, el factor de elongación G y la proteína de resistencia a sulfonamida (en la taquilla).

Tabla 18. Tabla comparativa de las proteínas implicadas en la resistencia a los antimicrobianos que se encontraron en las muestras.

	Vagón 12 nov	Taquilla 12 nov	Hospital 12 nov	Vagón 26 nov	Taquilla 26 nov	Hospital 26 nov
Beta-lactamasas						
EF- Tu						
RNA polimerasa						
Transportadores RND						
DNA girasa						
Transportadores MFS						
Proteínas ribosomales						
Alanina-tRNA ligasa						
DNA topoisomerasa IV						
Transportadores ABC						
Sistema regulador de dos componentes (Bass/PmrB)						
Dihidropteroato sintasa						
Proteína de resistencia a la acriflavina						
Regulador transcripcional LysR						
Proteína de resistencia a la tetraciclina						
Proteína de resistencia a la kenamicina						
Dihidrofolato reductasa						
Factor del acoplamiento de reparación de la transcripción						
Proteínas de resistencia a entromicina						
Proteína de unión a la penicilina						
Factor de elongación G						
Aminoglucósido 3' fosfotransferasa						
Aminotransferasa clase III dependiente de piridoxalfosfato						
Transportador de glicerol-3-fosfato						
UDP-N-acetilglucosamina aciltransferasa						
Transportadores FMN/FAD						
Transposasas						
Regulador transcripcional del operón KDP						
UDP-3-O- N-acetilglucosamina desacetilasa						
Ácido UDP-glucurónico oxidasa bifuncional						
Bomba de flujo de la familia MATE (mdtK)						
Lincosamida nucleotidiltransferasa (Lnu)						
Proteína accesorio de la hidrogenasa- HypA						
Proteína de resistencia a sulfonamida						
Hidroxiperoxidasa I HPI						
Isoleucina-tRNA ligasa						
UDP-N-acetilglucosamina 1-carboxiviniltransferasa						
Proteína Tirosina fosfatasa						
Regulador transcripcional Crp						

La mayor diversidad de genes que codifican para proteínas implicadas en la resistencia a los antimicrobianos la encontramos en la muestra de vagón recolectada el día 26 de noviembre, en donde se observaron transposasas, el regulador transcripcional del operón KDP, la UDP-3-O-N-acetilglucosamina desacetilasa, la lincosamida nucleotidiltransferasa (*Lnu*), bombas de eflujo de la familia MATE (*mdtK*), entre otras (Tabla 18). En la muestra de vagón del 26 de noviembre también se encontraron tipos de beta-lactamasas que no estuvieron presentes en las demás muestras, tal es el caso de las beta-lactamasas TEM-12, OXA-134, OXA-235, OXA-276, OXA-361 y MOX-13 (Figura 21).

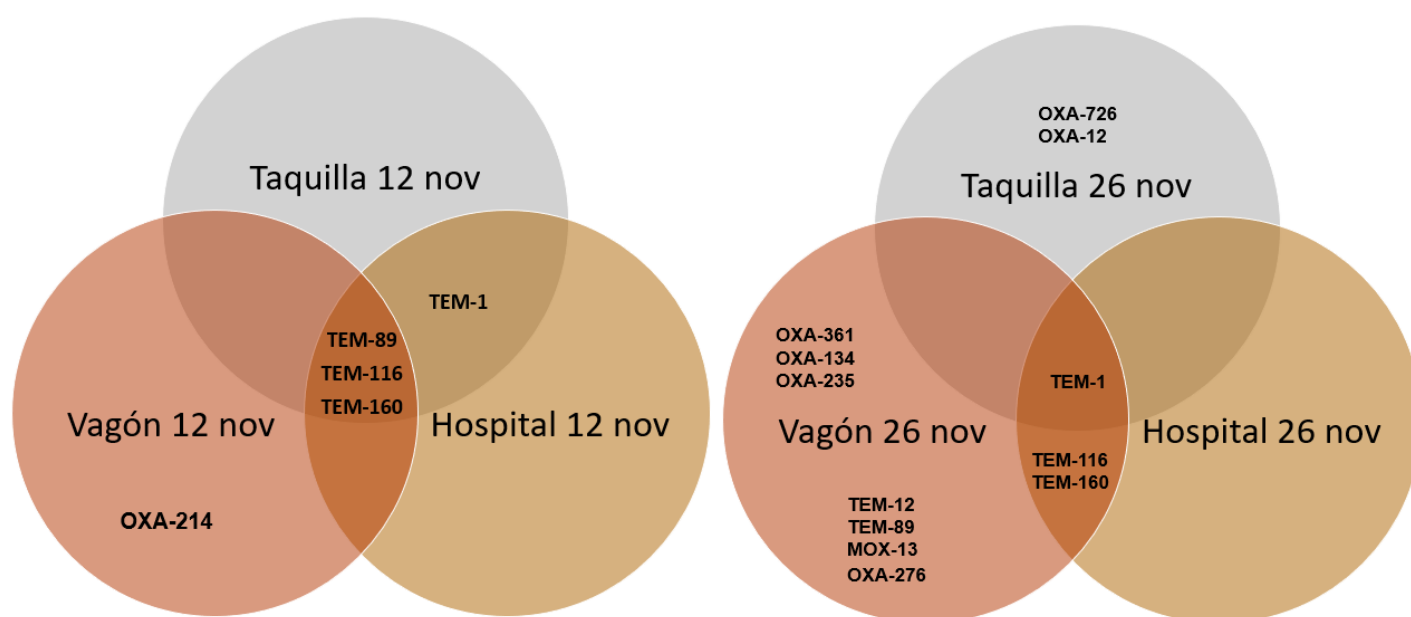


Figura 21. Diversidad de beta-lactamasas encontradas en las muestras.

En total se encontraron 13 tipos de beta-lactamasas: TEM 1, TEM-12, TEM-89, TEM-116, TEM 160, OXA-12, OXA-134, OXA-214, OXA-235, OXA-276, OXA-361, OXA-726 y MOX-13. Las beta-lactamasas TEM-89, TEM-116 y TEM-160 estuvieron presentes en todas las muestras colectadas el 12 de noviembre. El 26 de noviembre TEM-1 fue la única beta-lactamasa en común entre los tres sitios (vagón, taquilla y sala de espera del Hospital 20 de noviembre), en la muestra de vagón del 26 de noviembre se encontraron tipos de beta-lactamasas que no estuvieron presentes en las demás muestras (incluidas las recolectadas el 12 de noviembre), tal es el caso de las beta-lactamasas TEM-12, OXA-134, OXA-235, OXA-276, OXA-361 y MOX-13.

Considerando que la mayoría de los genes encontrados codifican para proteínas que forman parte de la maquinaria celular y son indispensables para los procesos de replicación, transcripción y traducción, se corroboró a nivel de lecturas y de “*contigs*” que estuvieran presentes las mutaciones relacionadas con resistencia a los antimicrobianos. Para ello, CARD cuenta con una herramienta que permite hacer alineamientos contra la referencia con la cual se encontró una mayor identidad, a través de los números de acceso de las referencias se identifica el antibiótico al cual se genera la resistencia y la mutación que la confiere. Al azar, se tomaron algunas de las lecturas y *contigs* que resultaron del mapeo para verificar que cubran la región en la cual se encuentran las mutaciones que confieren la resistencia.

El contig con etiqueta NODE_290_length_220_cov_2.872727 corresponde al gen que codifica para el factor de elongación Tu (Figura 22). El factor de elongación (EF-Tu) actúa en la síntesis de proteínas, favoreciendo la unión del aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma, durante la fase de elongación de la cadena proteica. En el ribosoma, EF-Tu hidroliza GTP para producir (GDP) y fosfato inorgánico luego del emparejamiento codón-anticodón. Esto provoca un cambio conformacional en el EF-Tu que a su vez provoca que se libere del ribosoma (Sprinzl, 1994). Los antibióticos pueden alterar el funcionamiento normal de EF-Tu evitando su asociación con el aminoacil-tRNA o evitando la disociación de EF-Tu del ribosoma después de la hidrólisis de GTP a GDP (Prezioso *et al.*, 2017).

Por medio de un alineamiento del contig NODE_290_length_220_cov_2.872727 con su referencia²⁰, se identificaron 2 mutaciones en las posiciones 121 y 125 de la proteína (Figura 22). Dichas mutaciones confieren resistencia a la kirromicina, un antibiótico que es producido por algunas bacterias que viven en el medio ambiente, bacterias del género *Streptomyces*, por ejemplo, son productoras naturales de kirromicina.

²⁰ Número de acceso de la referencia ARO:3003368

```

Query  401  VAKAKFERTKPHVNIQTIGHVDHGKTTTAAITKVLADAYPDLNQAFDAIDKAPEEKE  222
      ++K KFERTKPHVN+GTIGHVDHGKTT TAAIT VLA  Y    A AFD ID APEEK
Sbjct   1   MSKEKFERTKPHVMVGTIGHVDHGKTTLTAAITTVLAKTYG--GAARAFDQIDNAPEEKA  58

Query  221  RGITINISHVEYQTEKRHYAHVDAPGHADYIKNMITGAAQMDGAILVVAATDGPMPQTRE  42
      RGITIN SHVEY T  RHYAHVD PGHADY+KNMITGAAQMDGAILVVAATDGPMPQTRE
Sbjct   59  RGITINTSHVEYDTPTRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQMDGAILVVAATDGPMPQTRE  118

Query  41   HVLLARQVGVPI  3
      H+LL RQVGVPI
Sbjct  119  HILLGRQVGVPI  131
      ↑      ↑

```

Figura 22. Alineamiento del contig NODE_290_length_220_cov_2.872727 contra su referencia en la base de datos CARD por medio de BLASTx.

Por BLASTx se identificó que el contig corresponde al gen que codifica para el Factor de elongación Tu. El alineamiento se realizó a nivel de proteínas, con una flecha se indica la posición en donde se encuentran las mutaciones y los aminoácidos implicados. En este caso las mutaciones señaladas en las posiciones 121 y 125 confieren resistencia a la kirromicina.

Otros inhibidores del EF-Tu son las elfamicinas, que al igual que la kirromicina, son producidas naturalmente por bacterias, no obstante, se han completado ensayos clínicos de fase 2 en un derivado de elfamicinas denominado GE2270 (Prezioso *et al.*, 2017).

La lectura NS500502:84:HCCVTBGX9:2:12103:20278:18413 codifica para el EF-Tu. Al hacer el alineamiento contra su referencia²¹ se identificó una mutación en la posición 258 que confiere resistencia a GE2270 (Figura 23).

```

Query   1   DSDKPFMMPVEDVFSITGRGTVATG  75
      D+DKPFMMPVEDVFSITGRGTVATG
Sbjct  234  DNDKPFMMPVEDVFSITGRGTVATG  258
      ↑

```

Figura 23. Alineamiento de la lectura NS500502:84:HCCVTBGX9:2:12103:20278:18413 contra su referencia en la base de datos CARD por medio de BLASTx.

Por BLASTx se identificó que la lectura corresponde al gen que codifica para el Factor de elongación Tu. El alineamiento se realizó a nivel de proteínas, con una flecha se indica la posición en donde se encuentran las mutaciones y los aminoácidos implicados. En este caso la mutación señalada en la posición 258 confiere resistencia a GE2270.

²¹ Número de acceso de la referencia: ARO:3003438

Otra proteína implicada en la maquinaria celular es la RNA-polimerasa dependiente de DNA. En la figura 24 se observa un ejemplo de alineamiento contra la referencia²² de mayor identidad encontrada (100%) para una de las lecturas que corresponde al gen que codifica para la subunidad β de la RNA- polimerasa (*rpoC*). En este caso, la glutamina en la posición 961 de la proteína se relaciona con resistencia a la daptomicina.

```

Query   2      RTFHTGGVAGSDITQGLPRIQEIFE 76
          RTFHTGGVAGSDITQGLPRIQEIFE
Sbjct  941      RTFHTGGVAGSDITQGLPRIQEIFE 965

```



Figura 24. Alineamiento de la lectura NS500502:84:HCCVTBGX9:1:21204:14351:19874 contra su referencia en la base de datos CARD por medio de BLASTx.

Por BLASTx se identificó que la lectura corresponde al gen que codifica para la subunidad β de la RNA- polimerasa (*rpoC*) de *Staphylococcus aureus* (con una identidad del 100%). El alineamiento se realizó a nivel de proteínas, con una flecha se indica la posición en donde se encuentra la mutación y el aminoácido implicado. En este caso, la glutamina en la posición 961 confiere el fenotipo de resistencia a la daptomicina.

Una de las familias de antibióticos de mayor uso son las fluoroquinolonas, cuya proteína blanco es la DNA girasa. La DNA girasa es responsable del mantenimiento de la topología del DNA dentro de la célula bacteriana, cataliza la introducción dependiente de ATP de superenrollamientos negativos en el DNA, así como la relajación independiente de ATP del DNA superenrollado (Barnard and Maxwell, 2001).

En el alineamiento de la lectura NS500502:84:HCCVTBGX9:1:22103:16524:19743 contra su referencia²³, observamos tres mutaciones (posiciones 80 y 83) que se asocian con el fenotipo de resistencia a las fluoroquinolonas (Figura 25).

²² Número de acceso de la referencia: ARO:3003291

²³ Número de acceso de la referencia: ARO:3003684

```

Query   3   RIVGDVIGKYHPHGDSAVYDTIVR   74
        R+VGDVIGKYHPHGD+AVYDTIVR
Sbjct   68   RVVGDVIGKYHPHGDTAVYDTIVR   91
                ↑      ↑

```

Figura 25. Alineamiento de la lectura NS500502:84:HCCVTBGX9:1:22103:16524:19743 contra su referencia en la base de datos CARD por medio de BLASTx.

Por BLASTx se identificó que la lectura corresponde al gen que codifica para la subunidad α de la DNA-girasa (*gyrA*) de *Pseudomonas aeruginosa* (con una identidad del 91%). El alineamiento se realizó a nivel de proteínas, con una flecha se indica la posición en donde se encuentra la mutación y el aminoácido implicado. En este caso, las posiciones 80 y 83 confieren el fenotipo de resistencia a las fluoroquinolonas.

Finalmente, el *contig* con etiqueta NODE_1198_length_252_cov_1.852792 corresponde a la muestra de aire del Hospital del 12 de noviembre y codifica para la proteína ribosomal 30S-S12²⁴, esta proteína es blanco de los aminoglucósidos, una familia de antibióticos que se unen a la subunidad pequeña del ribosoma (30S) de forma que impide que se forme el complejo de iniciación de la síntesis proteica. En este caso se encontró una mutación en la posición 88 de la proteína, la cual se relaciona con resistencia a estreptomycin (Figura 26) (Ballif *et al.*, 2012).

```

Query   252   LQEHSVVLVRGGRVKDLPGVRYHIVRGTLDTAGVKDRKNSRS   127
        LQEHS+VLVRGGRVKDLPGVRY I+RG+LDT GVK+RK +RS
Sbjct   74   LQEHSMLVLRGGRVKDLPGVRYKIIRGSLDTQGVKNRQARS   115
                ↑

```

Figura 26. Alineamiento del contig NODE_1198_length_252_cov_1.852792 contra su referencia en la base de datos CARD por medio de BLASTx.

Por BLASTx se identificó que la lectura corresponde al gen que codifica para la proteína ribosomal 30S-S12. El alineamiento se realizó a nivel de proteínas, con una flecha se indica la posición en donde se encuentra la mutación y el aminoácido implicado. En este caso la mutación señalada en la posición 88 confiere resistencia a la estreptomycin.

²⁴Número de acceso de la referencia: ARO:3003395

8.8 Identificación de genes que codifican para factores de virulencia

Los factores de virulencia encontrados fueron clasificados de acuerdo con su función según la clasificación en la base de datos PATRIC²⁵. La figura 27 representa los tipos de factores de virulencia que predominaron en todas las muestras de acuerdo con la función a la cual se relacionan.

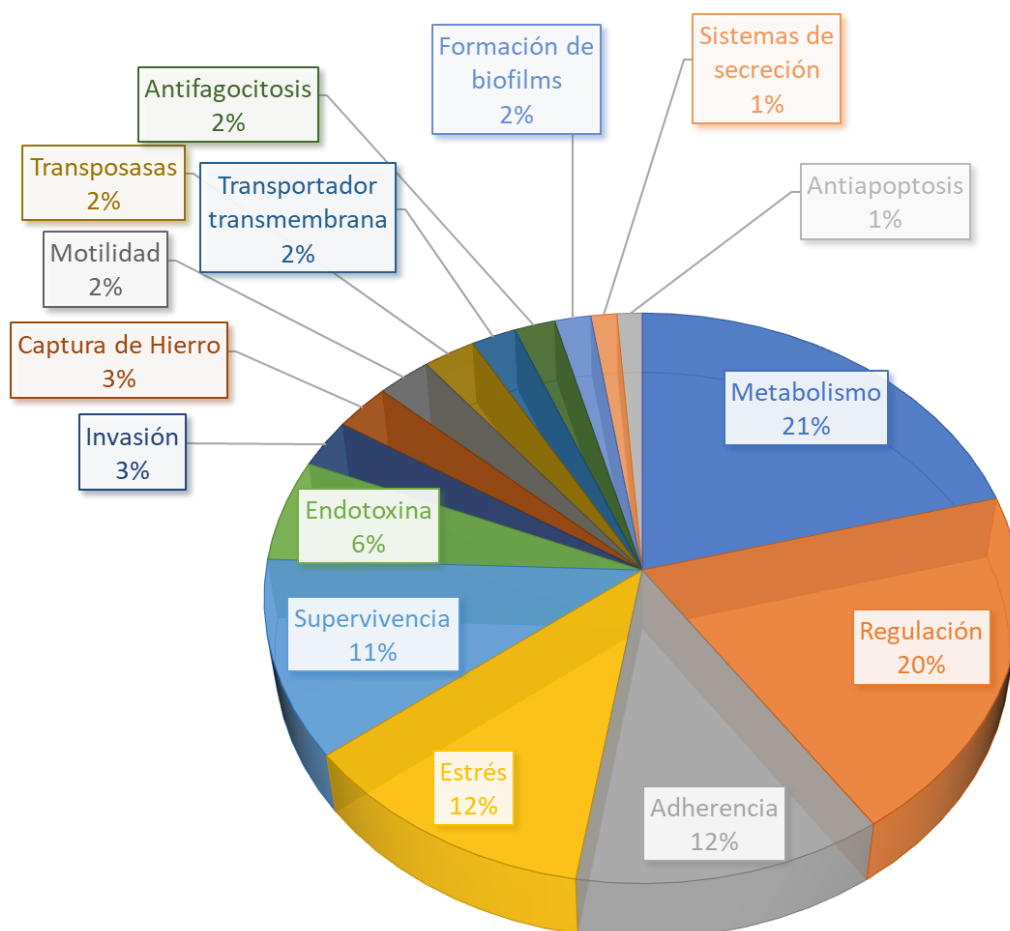


Figura 27. Tipos de factores de virulencia predominantes en todas las muestras clasificados según su función.

Los factores de virulencia encontrados se relacionan sobre todo con funciones de metabolismo celular (en color azul, 21%), regulación de la expresión de otros genes asociados a virulencia (en color naranja, 20%), adherencia (en color gris, 12%), estrés (en color amarillo, 12%), supervivencia (en color azul cielo, 11%), endotoxinas (en color verde, 6%), invasión (en color azul marino, 3%) y en menor porcentaje aquellos implicados en la invasión al hospedero, captura de hierro, motilidad, transposasas, transportadores transmembrana, antifagocitosis, formación de biofilms, sistemas de secreción y antiapoptosis.

²⁵ Disponible en <https://patricbrc.org/>

El mayor porcentaje se encontró en factores de virulencia que participan a nivel de metabolismo celular, dentro de esta categoría los más abundantes fueron:

- La **subunidad grande de la carbamoil fosfato sintasa** (gen *Cpa2*), el cual aumenta la patogenicidad mediante la modulación de la biosíntesis de arginina (Liu *et al.*, 2016). La arginina es catabolizada por la arginasa, una enzima que limita la producción de óxido nítrico a través de la inhibición de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (Morris, 2007). El óxido nítrico es un elemento crucial de la inmunidad innata y es uno de los valiosos antimicrobianos de la primera línea de defensa del hospedero (Xiong *et al.*, 2016). La razón por la cual la arginina aumenta la patogenicidad bacteriana es por que la arginasa producida por las bacterias puede competir con la enzima iNOS de las células del hospedero limitando así la síntesis de óxido nítrico y facilitando la evasión del sistema inmune (Xiong *et al.*, 2016).
- **Piruvato deshidrogenasa** tiene un sitio de unión a plasminógeno, el cual al convertirse a plasmina interactúa con componentes de la matriz extracelular de su hospedero, de este modo contribuye a la patogénesis (Thomas *et al.*, 2013).
- **Formato c-acetiltransferasa** (gen *pflA*) promueve la virulencia a través del aumento en la capacidad de captar nutrimentos en tejidos hipóxicos por medio de la fermentación ácida mixta (Yesilkaya *et al.*, 2009).

Otros factores de virulencia encontrados fueron *PilT/PilU*, vinculados con la movilidad y la adherencia, la chaperona GroEL, la cual juega un papel importante en ayudar a las bacterias a hacer frente al ambiente estresante inducido por el hospedero (fagocitosis), contribuyendo así a la patogénesis (Neckers and Tatu, 2008) y sistemas de captación y transporte de hierro (genes *fepD*, *fepA* y *TonB*).

En total se encontraron 1132 factores de virulencia, aquellos que fueron comunes en todas las muestras se enlistan en la tabla 19:

Tabla 19. Factores de virulencia que se encontraron presentes en todas las muestras.

Gen	Proteína
<i>UvrA</i>	Exinucleasa ABC
<i>rpoS</i>	Factor sigma de la RNA polimerasa
<i>FlhA</i>	Proteína de biosíntesis de flagelos
<i>Clp</i>	Endopeptidasa Clp
<i>ycbZ</i>	Endopeptidasa La
<i>CPS</i>	Carbamoil fosfato sintasa
<i>GroEL</i>	Chaperona GroEL
<i>FepD</i>	Transportador de hierro
<i>TnpA</i>	Transposasas
<i>cstA</i>	Carbon starvation protein A

Todos los factores de virulencia encontrados y la función que desempeñan se detallan en el Anexo 4.

9. DISCUSIÓN

9.1 Diversidad taxonómica partiendo de las lecturas y de los “contigs”.

El estudio de comunidades microbianas en el aire presenta grandes retos, en primer lugar, pese a que es posible captar la diversidad presente en el ambiente, los métodos de recolección de bioaerosoles son técnicas de "muestreo aleatorio" y, por lo tanto, representan solo aproximaciones de concentraciones microbianas transitorias en la atmósfera (Cox *et al.*, 2019). Además, es un hecho que la densidad de los microorganismos en el aire es baja y aunque es posible hacer estimaciones relacionadas con abundancia, es probable que esta sea afectada por factores como el tiempo, el espacio y el flujo de personas (Behzad *et al.*, 2015). Los estudios previos realizados con bioaerosoles se han llevado a cabo partiendo del DNA que se extrae de las muestras, no obstante, el presente estudio se realizó a partir de la secuenciación del RNA, esto es un reto si consideramos que el RNA tiene una menor estabilidad y que el material genético recuperado de las muestras de aire es menor en comparación con otro tipo de muestras (como las muestras recolectadas en superficies, por ejemplo). La secuenciación por RNA-seq sin embargo, nos permite identificar microorganismos vivos, que están metabólicamente activos, esto nos brinda información valiosa que va más allá de describir únicamente la diversidad de microorganismos presentes en el ambiente.

Otro importante desafío al momento de analizar las muestras de aire es que pese a la basta información disponible en las bases de datos, aún hay un gran número de microorganismos no identificados que son captados en las muestras pero que no son clasificados ni asignados a ningún grupo taxonómico. En el caso del presente estudio, el porcentaje de lecturas no clasificadas fue del 42.11% (con Taxonomer) y del 55.8% (con Kraken) (Figuras 11 y 15). Lo anterior probablemente se deba en parte a que Taxonomer cuenta con diferentes fuentes de bases de datos específicas de cada grupo de interés (humano, bacterias, virus, fagos y hongos), además análisis previos han reportado un mayor porcentaje de asignaciones taxonómicas con esta herramienta (Flygare *et al.*, 2016). No obstante, la proporción de lecturas no

asignadas continúa siendo considerablemente alta fundamentando la necesidad de identificar y caracterizar nuevos géneros microbianos.

Dado a que uno de nuestros objetivos era determinar la diversidad de microorganismos encontrados en las muestras de aire, consideramos que la mejor herramienta para cubrir este objetivo fue Taxonomer, debido a que nos permitió el mayor porcentaje de lecturas asignadas.

En todos los casos, ya sea a nivel de lecturas como a nivel de “*contigs*”, la mayor proporción de las secuencias corresponden a bacterias (42%), dentro de las cuales, abundaron sobre todo las Proteobacterias (47.38%), seguido de Actinobacterias (22.45%) y Firmicutes (9.06%) (Figura 11). Estos hallazgos son consistentes con lo reportado por Patrick K. et al, en su estudio realizado en el metro de Hong Kong (Leung *et al.*, 2014), en donde los filo predominantes fueron Proteobacteria (23.4%), Actinobacteria (15.6%) y Firmicutes (6.3%). Otro hallazgo que concuerda con estos resultados es el estudio dirigido por la Dra. Mariana Peimbert (Vargas-robles *et al.*, 2019), en donde estos 3 filo figuran como los más predominantes en muestras colectadas en 24 estaciones del metro de la ciudad de México y 23 superficies de vagones, en este caso el filo que más abundó fue Actinobacteria, seguido de Firmicutes y Proteobacterias (Vargas-robles *et al.*, 2019).

Al comparar a nivel de géneros entre este estudio y los realizados en Hong Kong, Nueva York y México, sólo hubo 2 géneros predominantes que fueron compartidos entre los estudios realizados en México y en Hong Kong: *Propionibacterium* y *Corynebacterium*.

En nuestra investigación, *Acinetobacter* (4.07%), *Paracoccus* (4.01%), *Pseudomonas* (3.30%), *Corynebacterium* (2.43%) y *Propionibacterium* (2.03%) figuran como géneros predominantes (Figura 13), en el realizado por Vargas-robles et al., predominaron *Propionibacterium* (15%), *Corynebacterium* (13%), *Streptococcus* (9%), y *Staphylococcus* (5%). En Hong Kong fueron *Micrococcus* (4.9%), *Enhydrobacter* (3.1%), *Propionibacterium* (2.9%), *Staphylococcus* (1.8%), y *Corynebacterium* (1.5%) y en el proyecto realizado en Nueva York, los géneros predominantes fueron *Arthrobacter* y *Psychibacter*. Estas diferencias pueden atribuirse a diversos factores, en primer lugar, el estudio de Vargas-robles et al.,

aunque fue llevado a cabo en México, las muestras colectadas fueron de superficies, esto podría explicar porqué hubo un mayor porcentaje en los géneros reportados en comparación con el estudio presentado aquí y con los realizados en Nueva York y Hong Kong, en donde las muestras analizadas fueron de bioaerosoles recolectados. Otros factores que en conjunto influyen directamente sobre el perfil de diversidad microbiana son los factores geográficos, la localización e infraestructura de los sitios muestreados, factores culturales o étnicos y los factores ambientales.

En este estudio los géneros que fueron predominantes residen en varios nichos ecológicos, incluido el suelo (*Acinetobacter*), agua (*Paracoccus*) y plantas (p.ej. *Pseudomonas syringae*) (Figura 13). Además, *Propionibacterium* y *Corynebacterium* se encontraron entre los géneros asociados al hospedero.

Si bien la mayor parte de las especies incluidas dentro de estos géneros constituyen la microbiota normal de la piel y mucosas en humano, recientemente han surgido especies de microorganismos resistentes a los antibióticos. Lo anterior nos lleva a la necesidad de hacer una vigilancia de las comunidades microbianas en entornos como los son hospitales y medios de transporte colectivos, ya que estos entornos pueden fomentar la transmisión horizontal de microorganismos entre un gran número de viajeros (Leung *et al.*, 2014) en el caso del metro y de pacientes en el caso del hospital.

9.2 Agentes biológicos que pueden causar enfermedades en humanos.

El estudio de microorganismos patógenos a partir de los bioaerosoles presenta muchas limitaciones, en primer lugar, no podemos definir a un agente biológico como “patógeno” dado que la presencia o ausencia del mismo en una muestra no es suficiente para demostrar la causalidad de una enfermedad. Por otro lado, hay microbios catalogados como “comensales” o “no patógenos” que pueden causar enfermedades oportunistas emergentes (Vargas-robles *et al.*, 2019). Una limitante más es que en la secuenciación masiva se ve reducida la capacidad de caracterizar cepas específicas, la identificación a menudo llega a ser hasta nivel de géneros o especies.

Dado que la intención de este estudio no es demostrar causalidad, sino únicamente limitarnos a describir la diversidad de las comunidades microbianas captadas de los bioaerosoles, se separaron aquellas especies microbianas que según el Comité Asesor Sobre Patógenos Peligrosos (ACDP) y la base de datos de Agentes Biológicos GESTIS se consideran como “agente biológico que puede causar enfermedad”, de acuerdo a una categorización basada en el nivel de riesgo que el agente biológico tiene para provocar infecciones en humanos, en donde el mayor riesgo de provocar enfermedades y de que estas se diseminen se asigna a la categoría 4.

A partir de los *contigs* obtenidos con metaSPAdes, se hizo una asignación taxonómica a nivel de nucleótidos para identificar especies que estuvieran presentes en las muestras de aire. Cabe resaltar, que este fue un análisis exploratorio preliminar y que será necesario hacer una validación a partir de un análisis más completo, en donde no sólo se consideren únicamente *contigs* con ≥ 1500 pb, sino también involucrar medios de cultivos en estudios a futuro.

En su mayoría los microorganismos encontrados pertenecieron a la categoría 2, es decir, aquellos microorganismos que pueden causar enfermedades humanas, pero es poco probable que se extiendan a la comunidad), por mencionar algunos de importancia clínica se identificaron: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, en cuyos casos se han asociado con enfermedades nosocomiales y resistencia a antimicrobianos sobre todo en entornos hospitalarios. Sólo las siguientes especies fueron clasificadas dentro de la categoría 3 (pueden causar enfermedades humanas graves y pueden extenderse a la comunidad, pero hay tratamiento efectivo disponible): *Mycobacterium canettii*, *Burkholderia pseudomallei* y *Coxiella burnetii* relacionadas con infecciones del tracto respiratorio y *Orientia tsutsugamushi* relacionada con infecciones transmitidas por garrapatas, ácaros o rodeos.

Vale la pena mencionar que estas especies no sólo fueron encontradas en el análisis taxonómico partiendo de los *contigs* a nivel nucleótidos, sino que, de igual manera se observaron en el análisis de biodiversidad de las muestras ambientales en MEGAN, en donde se encontraron también especies de relevancia clínica como:

Streptococcus pneumoniae, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus Influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, todas las cuales se relacionan con infecciones del tracto respiratorio, lo cual es consistente con el hecho de que la toma de estas muestras coincide con la temporada de frío, en donde la incidencia de infecciones respiratorias es mayor.

Otro interés particular de este estudio fue identificar la presencia del virus de Influenza A H1N1 en muestras de superficies y aire de la estación del metro y del Hospital 20 de noviembre por medio de la técnica de RT-PCR en tiempo real. El virus de Influenza A tiene un promedio de supervivencia de 24 a 48 hrs en superficies (Bean *et al.*, 1982), dado que se estima que su concentración promedio es de 15,000 virus por m³ de aire y el tamaño promedio de una microgota con la partícula viral es menor de 2.5 µm, se cree que el virus podría permanecer suspendido en el aire durante horas (Yang *et al.*, 2011). Aunado a lo anterior, la mayor incidencia de infecciones causadas por Influenza es sobre todo durante la temporada de frío. De manera interesante, de las 25 muestras de aire colectadas 11 fueron positivas para Influenza, es decir que el virus estuvo presente en el 44% de las muestras obtenidas en los meses de octubre y noviembre.

En el estudio realizado en el metro subterráneo de Barcelona los investigadores encontraron el virus de la Influenza A en 30 de las 54 muestras, es decir, el virus estuvo presente en un 55.5% de sus muestras colectadas (Triadó-Margarit *et al.*, 2017). Estos hallazgos son consistentes con los encontrados en nuestro estudio.

El área en donde se encontró el virus en la mayoría de las muestras fue en las salas de espera del Hospital 20 de noviembre, seguido del área de taquilla de la estación del metro. En el caso de las muestras de superficies, el virus estuvo presente en 7 de las 17 muestras analizadas (dentro de estas, en los tubos de las escaleras del hospital, en torniquetes del metro y del vagón y en el suelo debajo de los torniquetes).

En general, aunque el mayor número de especies microbianas encontradas en el análisis preliminar se relacionan con un riesgo de causar infecciones respiratorias, también hubo un considerable número de especies relacionadas con enfermedades de tipo gastrointestinales. Algunas especies relacionadas con infecciones

gastrointestinales fueron: *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Helicobacter pylori* y *Shigella sonnei*, lo anterior puede deberse en parte a que durante el viaje a menudo hay pasajeros que se encuentran consumiendo alimentos y que además el contacto con los pasamanos u otras superficies que pudieran estar contaminadas podría aumentar la diseminación de estas bacterias, además hay evidencia de que la bacteria *E. coli* puede sobrevivir en el aire durante varias horas cuando las condiciones de temperatura y humedad son óptimas (Wathes *et al.*, 2010).

Dado que la hipótesis de este trabajo es que existe una relación entre las secuencias de RNA de las comunidades microbianas encontradas en el metro y en el Hospital 20 de noviembre, se hizo un análisis tomando en cuenta los diferentes lugares (vagón, taquilla y sala de espera del Hospital 20 de noviembre) y las especies bacterianas “potencialmente patógenas” que se asociaron con infecciones del tracto respiratorio e infecciones gastrointestinales (considerando que fueron los que tuvieron la mayor diversidad de especies reportadas), de manera general observamos que la mayoría de las especies se encuentran presentes en los 3 sitios muestreados, con excepción de *Legionella pneumophila*, *Nocardia farcinica* y *Burkholderia cepacia* que se encontraron únicamente en las muestras de las salas de espera del Hospital 20 de noviembre y *Coxiella burnetii*, *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas veronii*, *Shigella flexneri*, *Bartonella clarridgeiae*, *Enterobacter aerogenes* y *Shigella dysenteriae* que estuvieron presentes en la estación del metro Hospital 20 de noviembre pero no en las salas de espera (Figura 20).

9.3 Genes de resistencia a los antimicrobianos

RNA-seq permite analizar la expresión de genes que están implicados en procesos clave (en este caso, el interés particular fue identificar la expresión de genes que se relacionan con resistencia a los antimicrobianos que estuvieran presentes en el ambiente), esto es relevante si consideramos que aquellas partículas están en el aire y son inhaladas diariamente.

La resistencia a los antimicrobianos es una de las amenazas de salud pública mundial más graves en este siglo. En el 2014, la Organización Mundial de la Salud

publicó una lista prioritaria de bacterias resistentes a los antibióticos para dirigir la investigación y el desarrollo de nuevos medicamentos efectivos (Prestinaci *et al.*, 2015). Cuatro de los patógenos resistentes a los antibióticos de preocupación mundial son: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella no tifoidea* y *Mycobacterium tuberculosis*.

La resistencia a los antibióticos ocurre cuando las bacterias, hongos o virus están bajo la presión selectiva de los antimicrobianos, los microorganismos susceptibles son eliminados, mientras que aquellos que son resistentes tienen una mayor probabilidad de sobrevivir y multiplicarse. La transferencia horizontal de genes, la conjugación y la transducción contribuyen al intercambio de material genético que puede contener información para conferir resistencia, las comunidades microbianas dado que no se encuentran aisladas en los microbiomas pueden transferir y recibir genes de resistencia.

Un mecanismo por el cual las bacterias pueden desarrollar resistencia a los antimicrobianos es por medio de mutaciones en genes claves de procesos biológicos como la replicación, transcripción y traducción, los cuales en su mayoría son blancos de un gran número de antibióticos.

Para identificar genes que confieren resistencia a los antimicrobianos, se recurrió a la base de datos CARD, las lecturas que mapearon contra esta base de datos fueron identificados mediante BLASTx y nuevamente se alinearon contra los genomas de referencia disponibles en CARD, los cuales además indican la posición del residuo cuya mutación confiere resistencia y el tipo de antibiótico para el cual la desarrolla. Dado que en su mayoría los genes encontrados codifican para proteínas claves como el Factor de elongación Tu, la subunidad β de la RNA polimerasa, la DNA girasa y las subunidades 30S de las proteínas ribosomales, se verificó en 3 de las lecturas y 2 “*contigs*” mapeados, que contuvieran la región clave para conferir la resistencia (Figuras 22-26).

En el caso de los inhibidores del EF-Tu, los antibióticos para los cuales se reportaron resistencia (kirromicina y elfamicina) son producidos por bacterias de manera natural y sólo el derivado de elfamicina GE2270 ha sido probado en ensayos clínicos. Dado que la resistencia a los antimicrobianos ha incrementado, los investigadores

proponen nuevos derivados de elfamicina para hacer frente a este problema (Prezioso *et al.*, 2017).

Dentro de los antibióticos de uso comercial para los cuales se observaron mutaciones que confieren resistencia estuvieron las fluoroquinolonas (Figura 25) y la daptomicina (Figura 24).

El análisis funcional de MEGAN y el mapeo contra la base de datos CARD, coincidieron en identificar la presencia de beta-lactamasas y factores de elongación (Tu) como genes asociados a resistencia antimicrobiana que predominaron en las muestras. El hecho de haber encontrado genes que codifican para beta-lactamasas nos indica que la resistencia a las penicilinas y sus derivados está presente en los bioaerosoles de los ambientes muestreados.

Resulta interesante que, aunque en menor abundancia, se encontraron genes que codifican para proteínas blanco de antibióticos de última generación, tal es el caso de los aminoglucósidos, cuya resistencia se debe a mutaciones en el gen que codifica para la subunidad ribosomal 30S (Figura 26).

En conjunto estos hallazgos sugieren que la resistencia farmacológica en bacterias del ambiente no sólo se limita a antibióticos de primera generación. La estreptomycin es el fármaco indicado para tratar infecciones causadas por *Mycobacterium Tuberculosis*, una bacteria considerada por la OMS dentro de la lista para el desarrollo de nuevos antimicrobianos.

Al hacer la comparación de los genes que codifican para proteínas implicadas en la resistencia a los antimicrobianos, encontramos que, aunque hay proteínas que se encontraron en todos los sitios (EF-Tu, beta-lactamasas, transportadores RNA, etc), en cada muestra se encontraron proteínas que fueron únicas de sitio y fecha (Tabla 20), esto quiere decir que aunque hay microorganismos (Figura 20) y genes de resistencia que se comparten en la estación del metro y el Hospital 20 de noviembre, cada lugar tiene microorganismos y un perfil de resistencia único que es definido por factores que pueden ser la arquitectura del lugar, el flujo de aire, el tipo de personas que frecuentan esos lugares, entre otros.

9.4 Factores de virulencia

La secuenciación por RNA-seq también nos permite darnos cuenta de la viabilidad de los microorganismos que estuvieron presentes en las muestras debido a la expresión de genes que en este caso, codifican para factores de virulencia.

Los factores de virulencia encontrados fueron agrupados de acuerdo con su función en las siguientes categorías:

- Metabolismo celular
- Estrés
- Supervivencia intracelular y replicación
- Regulación de la expresión de genes asociados con virulencia
- Adherencia y movilidad
- Endotoxinas
- Antifagocitosis
- Sistemas de secreción
- Resistencia al ácido y Termoestabilidad
- Invasión
- Sistemas de transporte de membrana
- Chaperonas
- Receptores de exotoxinas
- Captura de Hierro
- Transposasas o transposones
- Formación de biofilms
- Sistema toxina-antitoxina
- Secuestro de antibióticos
- Captura de Mg
- Conjugación

Los factores de virulencia que predominaron fueron sobre todo aquellos que regulan la expresión de genes asociados con virulencia y del metabolismo celular, para la obtención y asimilación de nutrientes necesarios para la supervivencia microbiana.

También se encontraron presentes genes relacionados con la transferencia horizontal de genes, lo cual nos indica que estos mecanismos se están dando activamente en los ambientes.

Aunque hubo factores de virulencia en común en todas las muestras (*UvrA*, *GroEL*, *rpoS*, entre otros), algunos fueron particulares de sitio. En el Hospital 20 de noviembre, por ejemplo, se encontraron 49 tipos de Factores de virulencia específicos de este sitio de muestreo, por ejemplo, el transportador tipo ABC de Zinc ZnuABC, encontrado en *Klebsiella pneumoniae*. El zinc es necesario para el correcto plegamiento y estabilidad de las proteínas en la célula y sirve como catalizador para muchas enzimas. El transportador ZnuABC, contribuye a la supervivencia del patógeno en el huésped infectado (Tanaka *et al.*, 2018).

Los factores de virulencia implicados en el metabolismo celular, a menudo contribuyen a la virulencia del microorganismo por medio de la modulación de la biosíntesis de nutrimentos claves (Somerville and Proctor, 2009) o de metabolitos necesarios para lograr una interacción con la célula hospedera (Somerville *et al.*, 2003), otro mecanismo implicado en la virulencia es a través de un aumento en la capacidad de capturar nutrimentos necesarios en tejidos en donde la disponibilidad de estos es limitada. (Holden and Bachman, 2015)

Como factores de virulencia cuya función es la regulación de la expresión de genes claves para la virulencia, se encontraron los reguladores transcripcionales *Fis*, *LytR* y *CarD*. *Fis* modula la expresión de genes implicados en la producción de enzimas extracelulares y exopolisacáridos, la motilidad, la formación de biopelículas y la agregación celular (Mingfa *et al.*, 2018). *LytR* en cambio, participa en el anclaje a la pared celular, lo cual es importante para la virulencia bacteriana (Ye *et al.*, 2018). El mecanismo por el cual *CarD* promueve la virulencia no es del todo conocido, sin embargo se ha visto que la ausencia de este regulador conduce a muerte por estrés oxidativo, inanición y daño en el DNA, acompañado de una falla en la reducción de la transcripción del RNAr (Stallings *et al.*, 2009).

Los mecanismos por los cuales los factores de virulencia promueven la invasión, la supervivencia y la patogenicidad son diversos y aún algunos de estos se desconocen a detalle, no obstante, algunos de estos son considerados como factores de

virulencia dado a que en ausencia o delección de estos reducen la supervivencia y la capacidad de invasión de los microorganismos en modelos de infección.

En nuestro estudio encontramos factores de virulencia en bacterias de relevancia clínica como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

Otro hallazgo interesante fue que se encontraron transposasas, enzimas que catalizan el movimiento de los transposones a otra parte del genoma, en donde, estos elementos móviles promueven la evolución microbiana y contribuyen a la posibilidad de adquirir material genético del exterior a expensas de plásmidos. Lo anterior permite inferir que en el ambiente estos mecanismos están siendo activos y promueven el intercambio de material genético relacionado con virulencia o resistencia.

10. CONCLUSIONES

- Los microorganismos que predominaron en los bioaerosoles de las muestras colectadas en la estación del metro y el Hospital 20 de noviembre fueron las bacterias (40%-42%), en menor proporción se encontraron hongos (0.84%) y virus (0.15%).
- Aunque hay microorganismos (Figura 20) y genes de resistencia (Tabla 18) que se comparten en la estación del metro y el Hospital 20 de noviembre, cada lugar tiene microorganismos y un perfil de resistencia único que es definido por factores que pueden ser la arquitectura del lugar, el tipo de personas que frecuentan esos lugares, las rutinas de limpieza, entre otros. Además, la abundancia y diversidad de los bioaerosoles pueden cambiar muy rápido en función del flujo de aire y el flujo de personas en el ambiente.
- En el ambiente, la resistencia a los antimicrobianos no sólo se atribuye al uso indiscriminado de antibióticos comerciales, sino también a la presión selectiva que se da ante la constantemente exposición a algunos antibióticos que son producidos naturalmente por otras bacterias (como es el caso de la kirromicina).
- La identificación de transposones y de elementos del sistema de secreción tipo IV sugieren que la transferencia lateral de genes se da activamente en los ambientes muestreados.
- La identificación del virus de la Influenza A H1N1 en el Hospital 20 de noviembre y en la estación del metro en las diferentes fechas revela que el virus estuvo circulando en ambos sitios, sugiriendo que el flujo continuo de personas entre ambos lugares contribuye en la diseminación de enfermedades de tipo infecciosas.
- Los factores de virulencia y los genes implicados en la resistencia a los antimicrobianos están presentes en el aire y por ende pueden ser diseminados a otros sitios, pueden ser inhalados, o bien, pueden ser depositados en las superficies y ahí entrar en contacto con nuevas especies microbianas.

11. PERSPECTIVAS

El estudio de bioaerosoles en ambientes deberá ser respaldado por experimentos en el laboratorio (microbiológicos, física, química e ingeniería de aerosoles), con el fin de obtener una comprensión de los flujos de bioaerosol, lo cual es crucial para pronosticar su capacidad o fuerza de emisión y distribución. Si bien el presente estudio tuvo por objetivo describir la diversidad presente en dos ambientes que se encuentran cercanos (estación del metro Hospital 20 de noviembre y Hospital 20 de noviembre), hay factores que son determinantes y que deberán ser estudiados para poder hacer asociaciones de causalidad. La presencia o ausencia de un microorganismo particular no implica que pueda causar un efecto esperado positivo o negativo en los ambientes de estudio, aquí los factores determinantes pueden ser la concentración del aerosol, la integridad de la partícula y su viabilidad. Estudios a futuro deben dirigirse a cubrir con estos aspectos para llegar a una evidencia más completa que permita la comprensión de los bioaerosoles y sus repercusiones entre otras comunidades microbianas y en el humano.

Por otro lado, el monitoreo de genes implicados en la resistencia a antimicrobianos sobre todo en los hospitales podría contribuir a una comprensión del perfil de resistencia que se está dando en dicho entorno específico. Para corroborarlo, será necesario hacer cultivos que contengan antibióticos y por densidad gravitacional captar la diversidad de aquellos que únicamente se desarrollaron con resistencia al antimicrobiano presente en los medios de cultivo. La secuenciación masiva del material genético que se extrae de los medios de cultivo podría darnos una idea de las variantes relacionadas con resistencia a los antimicrobianos que están presentes en el ambiente. Dicha evidencia ayudaría a respaldar los hallazgos encontrados.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Afshinnikoo, E. *et al.* (2015) 'Geospatial Resolution of Human and Bacterial Diversity with City-Scale Metagenomics', *Cell Systems*, 1(1), pp. 72–87. doi: 10.1016/j.cels.2015.01.001.
- Ahmed, E. and Holmström, S. (2014) 'Siderophores in environmental research: Roles and applications', *Microbial Biotechnology*, 7(3), pp. 196–208. doi: 10.1111/1751-7915.12117.
- Altschup, S. *et al.* (1990) 'Basic Local Alignment Search Tool', *J. Mol. Biol.*, 215(3), pp. 403–410.
- Álvarez, D. *et al.* (2015) 'Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia', *Rev Chilena Infecto*, 5(32), pp. 499–504.
- Andrews S. (2010) *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.*, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Ates, L. *et al.* (2016) 'Type VII Secretion: A Highly Versatile Secretion System', *Microbiology Spectrum*, 4(1), pp. 1–21. doi: 10.1128/microbiolspec.vmbf-0011-2015.
- Ballif, M. *et al.* (2012) 'Drug resistance-conferring mutations in Mycobacterium tuberculosis from Madang, Papua New Guinea', *BMC Microbiology*, 12(191). doi: 10.1186/1471-2180-12-191.
- Barnard, F. and Maxwell, A. (2001) 'Interaction between DNA Gyrase and Quinolones: Effects of Alanine Mutations at GyrA Subunit Residues Ser 83 and Asp 87', 45(7), pp. 1994–2000. doi: 10.1128/AAC.45.7.1994.
- Bean, B. *et al.* (1982) 'Survival of influenza viruses on environmental surfaces', *Journal of infectious diseases*, 146(1), pp. 47–51.
- Behzad, H. *et al.* (2015) 'Challenges and opportunities of airborne metagenomics', *Genome Biology and Evolution*, 7(5), pp. 1216–1226. doi: 10.1093/gbe/evv064.
- Bentley, S. and Parkhill, J. (2004) 'COMPARATIVE GENOMIC STRUCTURE OF PROKARYOTES', *Annu. Rev. Genet.*, 38, pp. 771–792. doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.094318.
- Bertolini, V. (2014) *Urban Airborne Microorganisms: Biodiversity, Variability and Community - Assembly Processes*, *Tesi di dottorato, Università degli Studi di Milano-Bicocca*. UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA.
- Boers, S. *et al.* (2019) 'Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory', *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(6), pp. 1059–1070. doi: 10.1007/s10096-019-03520-3.
- Boucher, H. *et al.* (2011) 'Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives', *Clinical Infectious Diseases*, 52(Suppl 5), pp. S397–S428. doi: 10.1093/cid/cir153.

- Braga, R. *et al.* (2016) 'Microbial interactions: ecology in a molecular perspective', *Brazilian Journal of Microbiology*. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 47(S1), pp. 86–98. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.005.
- Buttner M *et al.* (2002) 'Sampling and analysis of airborne microorganisms.', in Hurst CJ, Crawford RL, Knudsen G, McInerney M, S. L. (ed.) *Manual of environmental microbiology*. 2nd edn. Washington DC: ASM Press, pp. 814–826. Available at: <http://www.rac.es/ficheros/doc/00919.pdf>.
- Cárdenas-Perea, M. *et al.* (2014) 'Factores de virulencia bacteriana: la "inteligencia" de las bacterias', *Elementos*, 94, pp. 35–43.
- Carvalho, E. *et al.* (2008) 'Performance of the Coriolis air sampler, a high-volume aerosol-collection system for quantification of airborne spores and pollen grains', *Aerobiologia*, 24(4), pp. 191–201. doi: 10.1007/s10453-008-9098-y.
- Casadevall, A. and Pirofski, L. (2009) 'Virulence factors and their mechanisms of action: The view from a damage-response framework', *Journal of Water and Health*, 7(SUPPL. 1), pp. 2–18. doi: 10.2166/wh.2009.036.
- Cavaillon, J. (2018) 'Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines', *Toxicon*, 149, pp. 45–53. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.10.016.
- Celiker, H. and Gore, J. (2013) 'Cellular cooperation: Insights from microbes', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 23(1), pp. 9–15. doi: 10.1016/j.tcb.2012.08.010.
- Chen, L. *et al.* (2005) 'VFDB: A reference database for bacterial virulence factors', *Nucleic Acids Research*, 33, pp. 325–328. doi: 10.1093/nar/gki008.
- Chen, M. *et al.* (2015) 'Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs', *Biotechnology Advances*, 33(6), pp. 745–755. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.05.003.
- Cheung, G. *et al.* (2014) 'Phenol-soluble modulins - critical determinants of staphylococcal virulence', *FEMS Microbiology Reviews*, 38(4), pp. 698–719. doi: 10.1111/1574-6976.12057.
- Chopra, I. and Roberts, M. (2001) 'Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance', *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 65(2), pp. 232–260. doi: 10.1128/MMBR.65.2.232.
- Chukwudi, C. (2016) 'rRNA Binding Sites and the Molecular Mechanism of Action of the Tetracyclines', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(8), pp. 4433–4441. doi: 10.1128/AAC.00594-16.Address.
- Ciusa, M. *et al.* (2012) 'A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus*', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(3), pp. 210–220. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.04.021.
- Cock, P. *et al.* (2010) 'The Sanger FASTQ file format for sequences with quality

- scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants', *Nucleic Acids Research*, 38(6), pp. 1767–1771. doi: 10.1093/nar/gkp1137.
- Cooley, P. *et al.* (2011) 'The Role of Subway Travel in an Influenza Epidemic: A New York City Simulation', 88(5), pp. 982–995. doi: 10.1007/s11524-011-9603-4.
- Coulthurst, S. (2019) 'The Type VI secretion system: A versatile bacterial weapon', *Microbiology (United Kingdom)*, 165(5), pp. 503–515. doi: 10.1099/mic.0.000789.
- Cox, J. *et al.* (2019) 'Field sampling of indoor bioaerosols', *Aerosol Sci Technol.* doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- Cross, A. (2008) 'What is a virulence factor?', *Critical care (London, England)*, 12(6), p. 196. doi: 10.1186/cc7127.
- Davies, J. and Wright, G. (1997) 'Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics', *Trends in Microbiology*, 5(6), pp. 234–240. doi: 10.1016/S0966-842X(97)01033-0.
- Devito, J. and Morris, S. (2003) 'Exploring the Structure and Function of the Mycobacterial KatG Protein Using trans -Dominant Mutants', 47(1), pp. 188–195. doi: 10.1128/AAC.47.1.188.
- Díaz, E. (2008) *Microbial biodegradation: genomics and molecular biology*. 1st edn. Edited by E. Díaz. Madrid, Spain: Caister Academic Press. Available at: <https://www.caister.com/biod> (Accessed: 16 August 2019).
- Donlan, R. and Costerton, J. (2002) 'Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms', *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), pp. 167–193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
- Eicher, T. *et al.* (2012) 'Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), pp. 5687–5692. doi: 10.1073/pnas.1114944109.
- Excelsior (2017) 'Transporte público moviliza más de 5.5 millones de usuarios en CDMX', 27 February. Available at: <https://www.excelsior.com.mx/comunidad/2017/02/27/1148973> (Accessed: 31 July 2018).
- Fernández, H. (2010) *Estudio comparativo de sistemas de secreción tipo IV implicados en transferencia conjugativa de DNA y virulencia bacteriana*. Universidad de Cantabria. Available at: [http://digital.csic.es/bitstream/10261/80403/4/Estudio comparativo.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/80403/4/Estudio_comparativo.pdf).
- Flygare, S. *et al.* (2016) 'Taxonomer: An interactive metagenomics analysis portal for universal pathogen detection and host mRNA expression profiling', *Genome Biology*, 17(111). doi: 10.1186/s13059-016-0969-1.
- Fronzes, R. *et al.* (2009) 'The structural biology of type IV secretion systems', *Nat Rev Microbiol.*, 7(10), pp. 1–7. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- García-Mena, J. *et al.* (2016) 'Airborne Bacterial Diversity from the Low Atmosphere of Greater Mexico City', *Microbial Ecology*, 72(1), pp. 70–84. doi: 10.1007/s00248-

016-0747-3.

Gashe, F. *et al.* (2018) 'Antimicrobial Resistance Profile of Different Clinical Isolates against Third-Generation Cephalosporins', *Journal of Pharmaceutics*. Hindawi, 2018, pp. 1–7. doi: 10.1155/2018/5070742.

Gentschev, I. *et al.* (2002) 'The E. coli α -hemolysin secretion system and its use in vaccine development', *Trends in Microbiology*, 10(1), pp. 39–44. doi: 10.1016/S0966-842X(01)02259-4.

Gharasoo, M. *et al.* (2014) 'How the chemotactic characteristics of bacteria can determine their population patterns', *Soil Biology and Biochemistry*, 69, pp. 346–358. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.11.019.

Ghosh, B. *et al.* (2015) 'Review of bioaerosols in indoor environment with special reference to sampling, analysis and control mechanisms', *Environment International*. Elsevier Ltd, 85, pp. 254–272. doi: 10.1016/j.envint.2015.09.018.

Gowthaman, U. and Eswarakumar, V. (2013) 'Molecular mimicry: Good Artists Copy, Great Artists Steal', *Virulence*, 4(6), pp. 433–434. Available at: <http://quoteinvestigator.com/2013/03/06/artists-steal/>.

Green, E. and Mecsas, J. (2016) 'Bacterial Secretion Systems: An Overview', *Microbiol Spectr*, 4(1), pp. 10110–1128. doi: 10.1128/microbiolspec.vmbf-0012-2015.

Griffiths, A. *et al.* (2015) *An Introduction to Genetic Analysis*. 11th edn, ISBN. 11th edn. New York: Freeman.

Guo, L. *et al.* (2014) 'Intercellular communications in multispecies oral microbial communities', *Frontiers in Microbiology*, 5(328), pp. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2014.00328.

Harris, S. *et al.* (2010) 'Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread', *Science*, 327(5964), pp. 469–474. doi: 10.1126/science.1182395.

Health and Safety Executive (2016) 'The Approved List of Biological Agents', *Health & Safety Executive*, pp. 1–35.

Hider, R. and Kong, X. (2010) 'Chemistry and biology of siderophores', *Natural Product Reports*, 27(5), pp. 637–657. doi: 10.1039/b906679a.

Hobley, L. *et al.* (2015) 'Giving structure to the biofilm matrix: An overview of individual strategies and emerging common themes', *FEMS Microbiology Reviews*, 39(5), pp. 649–669. doi: 10.1093/femsre/fuv015.

Hogan, D. *et al.* (2007) 'Bacterial Biofilms on Fungal Surfaces', in Kjelleberg, S. and Givskov, M. (eds) *The biofilm mode of life: mechanisms and adaptations*. Horizon Bioscience, pp. 235–245.

Holden, V. and Bachman, M. (2015) 'Diverging roles of bacterial siderophores during infection', *Metallomics*, 7(6), pp. 986–995. doi: 10.1039/c4mt00333k.

Hooper, D. and Jacoby, G. (2016) 'Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6, pp. 1–21.

Huson, D. *et al.* (2007) 'MEGAN analysis of metagenomic data', *Genome Res*, 17(3), pp. 377–386. doi: 10.1101/gr.5969107.

Illumina (2011) *MiSeq System, Specification Sheet*. Available at: http://res.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_hiseq_systems.pdf.

Índice de Transporte Público de Moovit (2018) *Datos y estadísticas del transporte público en Ciudad de Mexico*. Available at: https://moovitapp.com/insights/es/Moovit_Insights_Índice_de_Transporte_Público-822 (Accessed: 31 July 2018).

INEGI (2018) *Censos y conteos. Población y Vivienda, Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) Censos y conteos. Población y Vivienda*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI. Available at: <http://www.beta.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/?ag=15#tabMCcollapse-Indicadores> (Accessed: 31 July 2018).

Institute for Occupational Safety and Health of the German Social Accident Insurance (2019) *GESTIS Biological Agents Database, GESTIS Biological Agents Database*. Available at: <http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/bioen/000000.xml?f=templates&fn=default.htm&v id=gestisbioeng:biosdbeng>.

Johnston, C. *et al.* (2014) 'Bacterial transformation: Distribution, shared mechanisms and divergent control', *Nature Reviews Microbiology*, 12(3), pp. 181–196. doi: 10.1038/nrmicro3199.

Johnstone, T. and Nolan, E. (2015) 'Beyond iron: Non-classical biological functions of bacterial siderophores', *Dalton Transactions*, 44(14), pp. 6320–6339. doi: 10.1039/c4dt03559c.

Kelly, J. and Knox, J. (1989) 'Crystallographic Mapping of fi-Lactams Bound to a Peptidase Target Enzyme', *J. Mol. Biol.* (1989), 61(209), pp. 281–295.

Kembel, S. *et al.* (2012) 'Architectural design influences the diversity and structure of the built environment microbiome', *ISME Journal*, 6(8), pp. 1469–1479. doi: 10.1038/ismej.2011.211.

Keyzer, J. *et al.* (2003) 'The bacterial translocase: A dynamic protein channel complex', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(10), pp. 2034–2052. doi: 10.1007/s00018-003-3006-y.

Khan, H. *et al.* (2017) 'Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Elsevier B.V., 7(5), pp. 478–482. doi: 10.1016/j.apjtb.2017.01.019.

Kline, K. *et al.* (2009) 'Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions', *Cell Host and Microbe*, 5(6), pp. 580–592. doi: 10.1016/j.chom.2009.05.011.

Knopp, M. (2018) *Mechanisms of Antibiotic Resistance Evolution*. Edited by Uppsala University. Sweden: Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 1477. Available at: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-355532>.

- Lamont, I. L. et al. (2002) 'Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), pp. 7072–7077. doi: 10.1073/pnas.092016999.
- Lasa, I. et al. (2005) 'Bacterial biofilms and infection', *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), pp. 163–175.
- Lax, S. and Gilbert, J. (2015) 'Hospital-associated microbiota and implications for nosocomial infections', *Trends in Molecular Medicine*, 21(7), pp. 427–432. doi: 10.1016/j.molmed.2015.03.005.
- Lerminiaux, N. and Cameron, A. (2019) 'Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments', *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), pp. 34–44. doi: 10.1139/cjm-2018-0275.
- Leung, M. et al. (2014) 'Indoor-air microbiome in an urban subway network: Diversity and dynamics', *Applied and Environmental Microbiology*, 80(21), pp. 6760–6770. doi: 10.1128/AEM.02244-14.
- Li, H. et al. (2009) 'The Sequence Alignment/Map format and SAMtools', *Bioinformatics*, 25(16), pp. 2078–2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.
- Li, J. et al. (2018) 'Global Survey of Antibiotic Resistance Genes in Air', *Environmental Science and Technology*, 52(19), pp. 10975–10984. doi: 10.1021/acs.est.8b02204.
- Li, Y. et al. (2019) 'Prevalence of antibiotic resistance genes in air-conditioning systems in hospitals, farms, and residences', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(5), p. 683. doi: 10.3390/ijerph16050683.
- Lindon, J. et al. (2018) *The handbook of metabolic phenotyping*. Edited by J. C. Lindon, J. K. Nicholson, and E. Holmes. London, UK: Elsevier.
- Liu, X. et al. (2016) 'Carbamoyl phosphate synthetase subunit MoCPA2 affects development and pathogenicity by modulating arginine biosynthesis in *magnaporthe oryzae*', *Frontiers in Microbiology*, 7(2023). doi: 10.3389/fmicb.2016.02023.
- Luo, H. et al. (2017) 'A novel resistance gene, *lnu* (H), confers resistance to lincosamides in *Riemerella anatipestifer* CH-2', *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier B.V., 51(1), pp. 136–139. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.08.022.
- Madigan, M. et al. (2017) *Brock Biology of Microorganisms*. 15th edn. Pearson.
- Mah, T. and O'Toole, G. (2001) 'Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents', *Trends in Microbiology*, 9(1), pp. 34–39. doi: 10.1016/S0966-842X(00)01913-2.
- Menzel, P. et al. (2016) 'Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju', *nature commun.* Nature Publishing Group, 7(11257), pp. 1–9. doi: 10.1038/ncomms11257.
- Mingfa, L. et al. (2018) 'Fis is a global regulator critical for modulation of virulence factor production and pathogenicity of *Dickeya zeae*', *Scientific Reports*, 8(1), p. 341.

doi: 10.1038/s41598-017-18578-2.

Morar, M. and Wright, G. D. (2010) 'The Genomic Enzymology of Antibiotic Resistance', *Annual Review of Genetics*. Annual Reviews, 44(1), pp. 25–51. doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163517.

Morejón, M. (2013) 'Betalactamasas de espectro extendido', *Revista Cubana de Medicina*, 52(4).

Morris, S. (2007) 'Arginine Metabolism: Boundaries of Our Knowledge', *The Journal of Nutrition*, 137(6 Suppl 2), pp. 1602S-1609S. doi: 10.1093/jn/137.6.1602s.

Munita, J. et al. (2016) 'Mechanisms of Antibiotic Resistance', 4(2), pp. 1–37. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.Mechanisms.

Neckers, L. and Tatu, U. (2008) 'Molecular Chaperones in Pathogen Virulence: Emerging New Targets for Therapy', *Cell Host and Microbe*, 4(6), pp. 519–527. doi: 10.1016/j.chom.2008.10.011.

Nemergut, D. et al. (2013) 'Patterns and Processes of Microbial Community Assembly', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(3), pp. 342–356. doi: 10.1128/membr.00051-12.

Nguyen, T. et al. (2017) 'Bioaerosol sampling in clinical settings: A promising, noninvasive approach for detecting respiratory viruses', *Open Forum Infectious Diseases*, 4(1), pp. 2–6. doi: 10.1093/ofid/ofw259.

NHC Key Laboratory of Systems Biology of Pathogens (2019) *VFDB: Virulence Factors of Bacterial Pathogens*. Available at: <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi> (Accessed: 19 August 2019).

Niehus, R. et al. (2017) 'The evolution of siderophore production as a competitive trait', *Evolution*, 71(6), pp. 1443–1455. doi: 10.1111/evo.13230.

Núñez, A. et al. (2016) 'Monitoring of airborne biological particles in outdoor atmosphere . Part 2 : Metagenomics applied to urban environments', 19(2), pp. 69–80. doi: 10.2436/20.1501.01.265.

Nurk, S. et al. (2017) 'MetaSPAdes: A new versatile metagenomic assembler', *Genome Research*, 27(5), pp. 824–834. doi: 10.1101/gr.213959.116.

O'Hara, N. et al. (2017) 'Metagenomic characterization of ambulances across the USA', *Microbiome*, 5(1), p. 125. doi: 10.1186/s40168-017-0339-6.

Obritsch, M. et al. (2005) 'Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology and treatment options', *Pharmacotherapy*, 25(10), pp. 1353–1364. doi: 10.1592/phco.2005.25.10.1353.

Pacheco, A. and Segrè, D. (2019) 'A multidimensional perspective on microbial interactions', *FEMS microbiology letters*, 366(11), pp. 1–11. doi: 10.1093/femsle/fnz125.

Palmer, G. et al. (2016) 'Antigenic Variation in Bacterial Pathogens', *Physiology & behavior*, 4(1), pp. 1–43. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

Paradisi, J. *et al.* (2001) 'Streptococcus pneumoniae as an agent of nosocomial infection: Treatment in the era of penicillin-resistant strains', *Clinical Microbiology and Infection*. European Society of Clinical Infectious Diseases, 7(SUPPL. 4), pp. 34–42. doi: 10.1046/j.1469-0691.2001.00056.x.

Pérez, D. (2017) 'Resistencia antimicrobiana : evolución y perspectivas actuales ante el enfoque " Una salud " Antimicrobial resistance : evolution and current perspectives in the context of the " One health " approach', 69(3), pp. 1–17.

Peterson, J. (2013) 'Medical Microbiology/Chapter 7 Bacterial Pathogenesis', *Medical Microbiology*. 4th edition. doi: 10.1101/cshperspect.a012476.

Porta, M. *et al.* (2008) *A dictionary of epidemiology*. 6th edn. Edited by J. Porta, M; Greenland, S; Hernán, M; dos Santos Silva, I; Last. Oxford University Press.

Prestinaci, F. *et al.* (2015) 'Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon', *Pathogens and Global Health*, 109(7), pp. 309–318. doi: 10.1179/2047773215Y.0000000030.

Prezioso, S. *et al.* (2017) 'Efamycins: inhibitors of elongation factor-Tu', *Molecular Microbiology*, 106(1), pp. 22–34. doi: 10.1111/mmi.13750.

Qiagen (2018) *QIAamp Viral RNA Mini Handbook*, *QIAamp Viral RNA Mini Handbook*. Available at: www.qiagen.com.

Raetz, C. and Whitfield, C. (2002) 'Lipopolysaccharide Endotoxins', *Annual Review of Biochemistry*, 71, pp. 635–700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.

Robertson, C. *et al.* (2013) 'Culture-independent analysis of aerosol microbiology in a metropolitan subway system', *Applied and Environmental Microbiology*, 79(11), pp. 3485–3493. doi: 10.1128/AEM.00331-13.

Rohwer, F. *et al.* (2009) 'Roles of viruses in the environment', *Environmental Microbiology*, 11(11), pp. 2771–2774. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02101.x.

Russell, A. *et al.* (2017) 'Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells', *Physiology & behavior*, 176(5), pp. 139–148. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

Ryu, W. (2017) *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. 1st edn, *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. 1st edn. Edited by J. Leonard. London: Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-800838-6.00021-7.

Sanchez, C. (2011) 'Bacterial pathogenesis: The importance of first impressions', *Nature Reviews Microbiology*, 9(9), pp. 630–631. doi: 10.1038/nrmicro2633.

Sanger Institute (2020) *SMALT*. Available at: <https://www.sanger.ac.uk/science/tools/smalt-0> (Accessed: 14 January 2020).

Šantl-temkiv, T. *et al.* (2019) 'Bioaerosol field measurements: Challenges and perspectives in outdoor studies', *Aerosol Science and Technology*. Taylor & Francis, pp. 1–27. doi: 10.1080/02786826.2019.1676395.

Shibata, W. *et al.* (2006) 'CagA protein secreted by the intact type IV secretion system leads to gastric epithelial inflammation in the Mongolian gerbil model', *Journal*

of *Pathology*, 210(3), pp. 306–314. doi: 10.1002/path.2040.

Singh, R. *et al.* (2016) 'Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences', *Pathogens and Disease*, 74(6), pp. 1–6. doi: 10.1093/femspd/ftw056.

Snitkin, E. *et al.* (2012) 'Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing', *Science Translational Medicine*, 4(148), p. 148ra116. doi: 10.1126/scitranslmed.3004129.

Somerville, G. *et al.* (2003) 'Synthesis and Deformylation of *Staphylococcus aureus* δ -Toxin Are Linked to Tricarboxylic Acid Cycle Activity', *Journal of Bacteriology*, 185(22), pp. 6686–6694. doi: 10.1128/JB.185.22.6686-6694.2003.

Somerville, G. and Proctor, R. (2009) 'At the Crossroads of Bacterial Metabolism and Virulence Factor Synthesis in *Staphylococci*', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2), pp. 233–248. doi: 10.1128/mmbr.00005-09.

Sourjik, V. and Wingreen, N. (2012) 'Responding to chemical gradients: Bacterial chemotaxis', *Current Opinion in Cell Biology*, 24(2), pp. 262–268. doi: 10.1016/j.ceb.2011.11.008.

Spanu, T. *et al.* (2009) 'In vivo emergence of tigecycline resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(8), pp. 4516–4518. doi: 10.1128/AAC.00234-12.

Sprinzl, M. (1994) 'Elongation factor Tu: a regulatory GTPase with an integrated effector', *Trends in Biochemical Sciences*, 19(6), pp. 245–250. doi: 10.1016/0968-0004(94)90149-X.

Stallings, C. *et al.* (2009) 'CarD Is an Essential Regulator of rRNA Transcription Required for *Mycobacterium tuberculosis* Persistence', *Cell*, 138(1), pp. 146–159. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.041.

Stetzenbach, L. *et al.* (2004) 'Detection and enumeration of airborne biocontaminants', *Curr Opin Biotechnol*, 15(3), pp. 170–174. doi: 10.1016/j.copbio.2004.04.009.

Stewart, P. and Costerton, W. (2001) 'Antibiotic resistance of bacteria in biofilms REVIEW', 358(9276), pp. 135–138. doi: 10.1016/S0140-6736(01)05321-1.

Sudharsanam, S. *et al.* (2012) 'Characterization of indoor bioaerosols from a hospital ward in a tropical setting', *African Health Sciences*, 12(2), pp. 217–225. doi: 10.4314/ahs.v12i2.22.

Tanaka, K. *et al.* (2018) 'Selective substrate uptake: The role of ATP-binding cassette (ABC) importers in pathogenesis', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1860(4), pp. 868–877. doi: 10.1016/j.bbamem.2017.08.011.

Tang, K. *et al.* (2018) 'Characterization of atmospheric bioaerosols along the transport pathway of Asian dust during the Dust-Bioaerosol 2016 Campaign', pp. 7131–7148.

- Taylor, P. et al. (2004) 'Birch pollen rupture and the release of aerosols of respirable allergens', *Clin Exp Allergy*, 34(10), pp. 1591–1596. doi: 10.1111/j.1365-2222.2004.02078.x.
- Thomas, C. et al. (2013) 'Characterization of pyruvate dehydrogenase subunit B and enolase as plasminogen-binding proteins in mycoplasma pneumoniae', *Microbiology (United Kingdom)*, 159(2), pp. 352–365. doi: 10.1099/mic.0.061184-0.
- Thomas, S. et al. (2014) 'The Type 1 secretion pathway - The hemolysin system and beyond', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.09.017.
- Tiwari, S. et al. (2017) 'Infect and Inject: How Mycobacterium tuberculosis Exploits Its Major Virulence-Associated Type VII Secretion System, ESX-1', *Physiology & behavior*, 176(1), pp. 139–148. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- Tiwari, S. and Lata, C. (2018) 'Heavy metal stress, signaling, and tolerance due to plant-associated microbes: An overview', *Frontiers in Plant Science*, 9, p. 452. doi: 10.3389/fpls.2018.00452.
- Tolabi, Z. et al. (2019) 'The investigation of type and concentration of bio-aerosols in the air of surgical rooms: A case study in Shariati hospital, Karaj', *MethodsX*. Elsevier B.V., 6, pp. 641–650. doi: 10.1016/j.mex.2019.03.016.
- Tortora, G., Funke, B. and Case, C. (2007) 'Genética microbiana', *Introducción a la microbiología*.
- Traub, P. and Nomura, M. (1968) 'Streptomycin resistance mutation in Escherichia coli: Altered ribosomal protein', *Science*, 160(3824), pp. 198–199. doi: 10.1126/science.160.3824.198.
- Triadó-Margarit, X. et al. (2017) 'Bioaerosols in the Barcelona subway system', *Indoor Air*, 27(3), pp. 564–575. doi: 10.1111/ina.12343.
- Trim Galore! Galaxy Version 0.6.3 (2020) *Trim Galore! (Galaxy Version 0.6.3)*, http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/.
- Tshikantwa, T. et al. (2018) 'Current trends and potential applications of microbial interactions for human welfare', *Frontiers in Microbiology*, 9(1156), pp. 1–19. doi: 10.3389/fmicb.2018.01156.
- Vaidya, V. (2011) 'Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance by Extended-Spectrum β Lactamase-Producing Enterobacteriaceae', *Journal of Laboratory Physicians*, 3(1), pp. 37–42. doi: 10.4103/0974-2727.78563.
- Van-Ulsen, P. et al. (2014) 'Type V secretion: From biogenesis to biotechnology', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 1843(8), pp. 1592–1611. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.11.006.
- Vargas-robles, D. et al. (2019) 'Station and train surface microbiomes of Mexico City 's metro (subway / underground)'.
- Varilly, P. and Chandler, D. (2009) 'Pilin gene variation in Neisseria gonorrhoeae: reassessing the old paradigms', *FEMS Microbiol Rev.*, 33(3), pp. 521–530. doi:

10.1007/s10955-011-0269-9.Quantifying.

Vélez, A. and Camargo, Y. (2014) 'Aerobacterias en las unidades de cuidado intensivo del hospital universitario "Fernando Troconis", Colombia', *Revista Cubana de Salud Publica*, 40(3), pp. 362–368.

Vicente, D. and Pérez, T. (2010) 'Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol', *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(2), pp. 122–130. doi: 10.1016/j.eimc.2009.10.002.

Viegas, C. et al. (2017) *Exposure to Microbiological Agents in Indoor and Occupational Environments*. 1st edn. Edited by C. Viegas et al. Cham, Switzerland: Springer.

Wang, Z. et al. (2009) 'RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics', *Nat Rev Genet*. 2009, 10(1), pp. 57–63. doi: 10.1038/nrg2484.RNA-Seq.

Wathes, C. et al. (2010) 'The survival of Escherichia coli in an aerosol at air temperatures of 15 and 30 °C and a range of humidities', *Journal of Hygiene*, 74(1), pp. 42–57. doi: 10.1017/S0022172400063671.

Winter, C. et al. (2010) 'Trade-Offs between Competition and Defense Specialists among Unicellular Planktonic Organisms: the "Killing the Winner" Hypothesis Revisited', 74(1), pp. 42–57. doi: 10.1128/MMBR.00034-09.

Wood, D. and Salzberg, S. (2014) 'Kraken: Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments', *Genome Biology*, 15(3), p. R46. doi: 10.1186/gb-2014-15-3-r46.

Xiong, L. et al. (2016) 'Arginine Metabolism in Bacterial Pathogenesis and Cancer Therapy', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(363), pp. 1–18. doi: 10.3390/ijms17030363.

Xu, F. et al. (2016) 'A multi-scale model of Escherichia coli chemotaxis from intracellular signaling pathway to motility and nutrient uptake in nutrient gradient and isotropic fluid environments', *Computers and Mathematics with Applications*, 71(11), pp. 2466–2478. doi: 10.1016/j.camwa.2015.12.019.

Yang, W. et al. (2011) 'Concentrations and size distributions of airborne influenza A viruses measured indoors at a health centre, a day-care centre and on aeroplanes', *J. R. Soc. Interface*, 8, pp. 1176–1184.

Ye, W. et al. (2018) 'Pneumococcal LytR protein is required for the surface attachment of both capsular polysaccharide and teichoic acids: Essential for pneumococcal virulence', *Frontiers in Microbiology*, 9, p. 1199. doi: 10.3389/fmicb.2018.01199.

Yesilkaya, H. et al. (2009) 'Pyruvate formate lyase is required for pneumococcal fermentative metabolism and virulence', *Infection and Immunity*, 77(12), pp. 5418–5427. doi: 10.1128/IAI.00178-09.

Yung-Hua Li et al. (2016) 'Microbial Interactions in Biofilms: Impacts on Homeostasis and Pathogenesis', in Dhanasekaran, D. and Thajuddin, N. (eds) *Microbial Biofilms: Importance and applications*. Intech, pp. 43–56. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/57353>.

Zervosen, A. *et al.* (2012) 'Development of New Drugs for an Old Target — The Penicillin Binding Proteins', *Molecules*, 17, pp. 12478–12505. doi: 10.3390/molecules171112478.

Zhang, Q. *et al.* (2015) 'Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance', *Environmental Science and Technology*, 49(11), pp. 6772–6782. doi: 10.1021/acs.est.5b00729.

Zhou, L. *et al.* (2003) 'Phenotype MicroArray Analysis of Escherichia coli K-12 Mutants with Deletions of All Two-Component Systems', 185(16), pp. 4956–4972. doi: 10.1128/JB.185.16.4956.

Zielke, R. *et al.* (2014) 'The type II secretion pathway in *Vibrio cholerae* is characterized by growth phase-dependent expression of exoprotein genes and is positively regulated by σE ', *Infection and Immunity*, 82(7), pp. 2788–2801. doi: 10.1128/IAI.01292-13.

13. ANEXOS

Anexo 1. Diversidad de especies bacterianas encontradas en el análisis preliminar de Kraken, considerando todas las muestras.

En la tabla, se incluyen únicamente las especies de los géneros que fueron predominantes en todas las muestras.

Especies bacterianas		
ACINETOBACTER	PARACOCCLUS	PROPIONIBACTERIUM
• <i>Acinetobacter baumannii</i> • <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> PHEA-2 • <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1 • <i>Acinetobacter oleivorans</i> DR1	• <i>Paracoccus aminophilus</i> JCM 7686 • <i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	• <i>Propionibacterium acnes</i> • <i>Propionibacterium propionicum</i> • <i>Propionibacterium freudenreichii</i> • <i>Propionibacterium acidipropionici</i> • <i>Propionibacterium avidum</i>
PSYCHROBACTER	KOCURIA	MICROLUNATUS
• <i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1	• <i>Kocuria rhizophila</i>	• <i>Microlunatus phosphovorus</i>
DEINOCOCCUS	FLAVOBACTERIUM	AEROMONAS
• <i>Deinococcus gobiensis</i> • <i>Deinococcus radiodurans</i> • <i>Deinococcus geothermalis</i> • <i>Deinococcus deserti</i> • <i>Deinococcus maricopensis</i> • <i>Deinococcus peraridilitoris</i> • <i>Deinococcus proteolyticus</i>	• <i>Flavobacterium branchiophilum</i> • <i>Flavobacterium psychrophilum</i> • <i>Flavobacterium johnsoniae</i> • <i>Flavobacterium indicum</i> • <i>Flavobacterium columnare</i>	• <i>Aeromonas hydrophila</i> • <i>Aeromonas salmonicida</i> • <i>Aeromonas veronii</i>
RHODOBACTER	SYNECHOCOCCUS	CORYNEBACTERIUM
• <i>Rhodobacter capsulatus</i> • <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	• <i>Synechococcus elongatus</i> • <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7502	• <i>Corynebacterium aurimucosum</i> • <i>Corynebacterium maris</i> • <i>Corynebacterium urealyticum</i> • <i>Corynebacterium diphtheriae</i> • <i>Corynebacterium argentoratense</i> • <i>Corynebacterium callunae</i> • <i>Corynebacterium glutamicum</i>

		• <i>Corynebacterium efficiens</i> • <i>Corynebacterium halotolerans</i> • <i>Corynebacterium jeikeium</i> • <i>Corynebacterium resistens</i> • <i>Corynebacterium variabile</i> • <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
PSEUDOMONAS	LACTOBACILLUS	STREPTOCOCCUS
• <i>Pseudomonas stutzeri</i> • <i>Pseudomonas mendocina</i> • <i>Pseudomonas resinovorans</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Pseudomonas fulva 12-X</i> • <i>Pseudomonas putida</i> • <i>Pseudomonas fluorescens</i> • <i>Pseudomonas protegens</i> • <i>Pseudomonas entomophila</i> • <i>Pseudomonas denitrificans</i> • <i>Pseudomonas syringae</i>	• <i>Lactobacillus reuteri</i> • <i>Lactobacillus crispatus</i> • <i>Lactobacillus plantarum</i> • <i>Lactobacillus sakei</i> • <i>Lactobacillus brevis</i> • <i>Lactobacillus fermentum</i> • <i>Lactobacillus salivarius</i> • <i>Lactobacillus helveticus</i> • <i>Lactobacillus delbrueckii</i> • <i>Lactobacillus ruminis</i> • <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> • <i>Lactobacillus acidophilus</i> • <i>Lactobacillus johnsonii</i> • <i>Lactobacillus buchneri</i> • <i>Lactobacillus gasseri</i> • <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> • <i>Lactobacillus rhamnosus</i> • <i>Lactobacillus amylovorus</i>	• <i>Streptococcus suis</i> • <i>Streptococcus mitis</i> • <i>Streptococcus pneumoniae</i> • <i>Streptococcus salivarius</i> • <i>Streptococcus constellatus</i> • <i>Streptococcus anginosus</i> • <i>Streptococcus intermedius</i> • <i>Streptococcus thermophilus</i> • <i>Streptococcus dysgalactiae</i> • <i>Streptococcus equi</i> • <i>Streptococcus mutans</i> • <i>Streptococcus oralis</i> • <i>Streptococcus pyogenes</i> • <i>Streptococcus sanguinis</i> • <i>Streptococcus agalactiae</i> • <i>Streptococcus oligofermentans</i> • <i>Streptococcus sp. I-P16</i> • <i>Streptococcus parasanguinis</i> • <i>Streptococcus macedonicus</i> • <i>Streptococcus gordonii</i> • <i>Streptococcus lutetiensis</i> • <i>Streptococcus parauberis</i> • <i>Streptococcus gallolyticus</i>

Anexo 2. Especies bacterianas consideradas con “potencial patogénico” según el ACDP y la base de datos GESTIS.

En la Tabla se mencionan las especies encontradas y entre paréntesis se indica la categoría a la cual pertenecen.

Infecciones respiratorias	Infecciones gastro-intestinales	Infecciones urinarias
• <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2) • <i>Pseudomonas mendocina</i> (2) • <i>Acinetobacter baumannii</i> (2)	• <i>Escherichia coli</i> (2) • <i>Aeromonas hydrophila</i> (2) • <i>Aeromonas veronii</i> (2)	• <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (2) • <i>Providencia stuartii</i> (2)

• <i>Moraxella catarrhalis</i> (2) • <i>Mycobacterium canetti</i> (3) • <i>Klebsiella pneumoniae</i>(2) • <i>Prevotella melaninogenica</i>(2) • <i>Haemophilus influenzae</i>(2) • <i>Haemophilus parainfluenzae</i> (2) • <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> (2) • <i>Staphylococcus aureus</i>(2) • <i>Neisseria meningitidis</i> (2) • <i>Legionella pneumophila</i> (2) • <i>Legionella longbeachae</i> (2) • <i>Nocardia brasiliensis</i> (2) • <i>Nocardia farcinica</i> (2) • <i>Coxiella burnetii</i> (3) • <i>Burkholderia pseudomallei</i> (3) • <i>Burkholderia cepacia</i> (2) • <i>Bordetella pertussis</i> (2)	• <i>Salmonella entérica</i> (2) • <i>Helicobacter pylori</i> (2) • <i>Tropheryma whipplei</i> (2) • <i>Enterobacter aerogenes</i> (2) • <i>Listeria monocytogenes</i> (2) • <i>Clostridium botulinum</i> (2) • <i>Clostridium perfringens</i> (2) • <i>Shigella sonnei</i> (2) • <i>Shigella flexneri</i> (2) • <i>Shigella dysenteriae</i> (2) • <i>Vibrio cholerae</i> (2) • <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2) • <i>Arcobacter butzleri</i>(2) • <i>Bacteroides fragilis</i> (2) • <i>Bartonella bacilliformis</i> (2) • <i>Bartonella clarridgeiae</i> (2) • <i>Bartonella vinsonii</i> (2) • <i>Campylobacter coli</i> (2) • <i>Brachyspira pilosicoli</i> (2)	• <i>Klebsiella oxytoca</i> (2) • <i>Proteus mirabilis</i> (2) • <i>Enterobacter cloacae</i> (2) • <i>Enterobacter aerogenes</i> (2) • <i>Aerococcus urinae</i> (2) • <i>Serratia marcescens</i> (2)
Infecciones en piel y heridas	Infecciones periodontales	Infecciones transmitidas por garrapatas
• <i>Propionibacterium acnes</i> (2) • <i>Propionibacterium propionicum</i> (2) • <i>Staphylococcus epidermidis</i> (2) • <i>Mycobacterium leprae</i> (3) • <i>Streptococcus pyogenes</i> (2) • <i>Finogoldia magna</i> (2) • <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> (2)	• <i>Fusobacterium nucleatum</i> (2) • <i>Rothia mucilaginosa</i> (2) • <i>Prevotella intermedia</i> (2) • <i>Porphyromonas gingivalis</i> (2) • <i>Olsenella uli</i> (2) • <i>Filifactor alocis</i> (2) • <i>Capnocytophaga ochracea</i> (2)	• <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> (2) • <i>Orientia tsutsugamushi</i> (3) • <i>Bartonella quintana</i> (2) • <i>Ehrlichia chaffeensis</i> (2)

--	--	--

Anexo 3. Identificación de genes que codifican para proteínas implicadas en la resistencia a antimicrobianos por BLASTx.

Las tablas incluyen los números de acceso con los cuales se identificó la mejor puntuación basados en el valor E y el % de identidad. Además, se incluyen los antibióticos para los cuales se ha reportado resistencia por mutaciones en la proteína blanco. Las tablas en versión extendida con los 3 primeros hits por read se anexan en formato electrónico.

VAGÓN (12 y 26 de Noviembre)				
Antibiótico (s)	Acceso (s)	Descripción	Valor E	% ID
Tigeciclina	OYU41740	30S ribosomal protein S10 , partial [Burkholderiales bacterium PBB4]	3.00E-08	100
Rifamicina y fidaxomicina	RRJ35347	DNA-directed RNA polymerase subunit beta , partial [Pseudomonas aeruginosa]	2.39E-06	100
	RAG62235	[Burkholderia multivorans]	4.58E-06	96
	HAI78800	[Ruminococcus sp.]	1.03E-09	100
	PKO82773	[Betaproteobacteria bacterium HGW]	6.69E-05	88
	TAK65817	[Betaproteobacteria bacterium]	1.68E-05	92
	OWQ82926	[Roseateles aquatilis]	2.27E-06	100
	ARJ68586	[Paracoccus contaminans]	8.81E-10	100
	WP_110206739	[Nocardioide daejeonensis]	2.29E-06	96
	KGJ08537	[Paracoccus sphaerophysae]	9.16E-10	100
	PWC02740	[Corynebacterium sp. 2189]	1.22E-07	100
	CPN27196	[Bordetella pertussis]	1.64E-09	100
	WP_080208661	[Salmonella enterica]	7.99E-09	100
	CDC20596	[Clostridium sp. CAG:306]	1.43E-08	96
	PBC42076	[Rhodococcus sp. ACPA4]	9.56E-09	100
	HAP78306	[Acidimicrobiaceae bacterium]	1.87E-06	96
	TYL61866	[Klebsiella pneumoniae]	2.78E-07	100
	AAY57914	[Tetrasphaera veronensis]	5.44E-07	100
	TCI20093	[Exiguobacterium sp. SL-9]	9.66E-07	96
	TML96156	[Actinobacteria bacterium]	4.30E-06	100
	AAW66720	[Lactobacillus hilgardii]	5.29E-07	96
	AWH12965	[Escherichia coli]	8.41E-08	100
	ACV89782	[Haemophilus parainfluenzae]	1.54E-07	100
	CIV45395	[Streptococcus pneumoniae]	4.99E-08	96
	AEF33331	[Nostoc sp. LCRNK.3]	6.60E-08	100
Beta-lactámicos	BBC91080	Beta-lactamase , partial [Shigella sonnei]	2.88E-07	100

	CEG38050	[Plasmopara halstedii]	1.09E-08	100
	ASR73647	[Escherichia coli]	1.71E-07	96
	AIE13831	[Escherichia coli]	1.69E-07	96
	VTQ19574	[Escherichia coli]	3.53E-07	100
	VDH22368	[Escherichia coli]	1.28E-07	100
	KQQ76615	[Acinetobacter sp. Leaf130]	3.42E-07	100
	ASK51726	[Proteus mirabilis]	1.09E-07	100
	ASK51727	[Proteus mirabilis]	9.53E-08	100
	APX42443	[Acinetobacter baumannii]	4.53E-05	96
	TBS16361	[Salmonella enterica subsp. enterica serovar	2.74E-08	100
	PAT70544	Typhimurium]	4.39E-10	100
	POK66377	[Klebsiella pneumoniae]	3.24E-08	100
	ASK51725	[Klebsiella pneumoniae]	1.21E-07	100
	KGJ08537	[Proteus mirabilis]	9.16E-10	100
	RHX33229	[Paracoccus sphaerophysae]	1.33E-07	96
	EPR90666	[Escherichia coli]	3.07E-06	96
	WP_141770691	[Acinetobacter haemolyticus MTCC 9819]	6.89E-08	100
	VGB04102	[Mycobacterium tuberculosis]	1.67E-08	100
	RAZ05866	[Klebsiella pneumoniae]	1.12E-06	100
	VDG47348	[Acinetobacter sp. SM1B]	3.74E-07	96
	RIN01049	[Escherichia coli]	1.16E-09	100
	AGM50433	[Staphylococcus warneri]	1.48E-09	100
	AHH01511	[Aeromonas hydrophila]	7.70E-08	100
	RQX17311	[Enterobacter cloacae]	2.27E-08	100
	ARI46018	[Aeromonas caviae]	2.59E-07	100
	VDH23349	[Enterobacter cloacae]	5.46E-09	100
	POL25992	[Escherichia coli]	5.55E-07	96
	AVI43254	[Klebsiella pneumoniae]	6.87E-09	100
	VFT07002	[Klebsiella pneumoniae]	4.13E-09	100
	TYK83119	[Escherichia coli]	2.64E-05	92
	SWN10357	[Streptococcus pyogenes]	2.95E-09	100
	AXH79648	[Klebsiella pneumoniae]	2.19E-05	92
	QCE31359	[Acinetobacter baumannii]	1.81E-06	96
	PTA52396	[Escherichia coli]	1.40E-09	100
	ANG27415	[Klebsiella pneumoniae]	3.80E-07	92
	ASK51728	[synthetic construct]	2.03E-08	100
	MDL75655	[Proteus mirabilis]	3.35E-08	100
	PWQ89125	[Escherichia coli]	3.02E-07	100
	PWF33181	[Enterococcus faecium]	0.0057359	80
	TWU81196	[Yersinia pestis]	7.50E-06	96
	ANG34405	[Haemophilus influenzae]	5.33E-07	100
	VDA51093	[synthetic construct]	1.02E-09	100
	AKE33366	[Escherichia coli]	3.07E-07	96
	RW72049	[Escherichia coli]	4.84E-10	100
	VCX09765	[Escherichia coli]	1.35E-09	100
		[Klebsiella pneumoniae]		
Kirromicina		Elongation factor Tu, partial		
	TPE46725	[Shewanella sp. LC2]	1.59E-08	100
	HBF75720	[Lactobacillus sp.]	1.10E-07	100
	MAG63813	[Candidatus Woesearchaeota archaeon]	3.58E-09	100

	SEO05046	[Maribius pelagius]	2.43E-07	100
	WP_027016404	[Comamonas composti]	5.36E-08	100
	VEB02968	[Klebsiella pneumoniae]	3.79E-07	79
	HAP98296	[Cutibacterium acnes]	3.37E-07	96
	OMO15620	[Xanthomonas oryzae pv. oryzae]	1.16E-07	100
	BAI53043	[Kocuria varians]	5.18E-10	100
	AMY27403	[uncultured cyanobacterium]	1.81E-07	100
	AWT39986	[Cyclotella pseudostelligera]	2.02E-08	96
	OLU14499	[Pseudomonas sp. PA1(2017)]	1.40E-06	96
	WP_017327002	[Synechococcus sp. PCC 7336]	1.10E-08	96
	RXW31932	[Propionibacteriaceae bacterium VG341]	4.00E-08	100
	KTA77604	[Aeromonas salmonicida]	3.48E-08	100
	BAI53008	[Kocuria rhizophila]	1.15E-09	100
	EJZ44603	[Fusobacterium ulcerans ATCC 49185]	2.83E-07	100
	OSJ92019	[Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport]	1.24E-06	100
	KTC68526	[Legionella birminghamensis]	1.45E-07	100
	EFD57207	[Mycobacterium tuberculosis T92]	1.10E-08	96
	BAK18972	[Fistulifera solaris]	1.01E-07	100
	RGD08312	[Lachnospiraceae bacterium AM25-11LB]	1.00E-05	100
	PMC77934	[Pseudoglutamicibacter albus]	1.36E-10	100
	ALO21451	[Lobochlamys culleus]	9.33E-06	96
	WP_040157898	[Nigerium massiliense]	2.67E-07	96
	RHS57744	[Blautia sp. AM46-3MH]	1.10E-06	96
	AKQ43695	[Codium cranwelliae]	1.24E-06	100
	AMY27388	[uncultured cyanobacterium]	1.69E-06	100
	OJX65843	[Micrococcales bacterium 73-13]	2.64E-10	100
	OTU86683	[Acinetobacter baumannii]	2.35E-08	96
	TKA93792	[Cereibacter changlensis]	2.90E-07	100
	TLN18800	[Acinetobacter baumannii]	6.24E-07	100
	SFX54886	[Paracoccus pantotrophus]	2.91E-05	96
	SDR13099	[Actinopolyspora saharensis]	1.06E-06	100
Tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolona s, glicilciclinas, diaminopirimidi nas, beta- lactámicos, aminoglucósido s, aminocumarina	TNF06621	MdtB/MuxB family multidrug efflux RND transporter permease subunit [Pseudomonadales bacterium]	2.34E-07	100
Fluoroquinolona s, quinolonas, qui nolinas	TCV38087 PJZ39295 HAN53401 SQH59552 KLV47732 ADQ42775 WP_026867086	DNA gyrase subunit A, partial [Pseudomonas sp. 460] [Leptospira kmetyi] [Pseudomonas sp.] [Aeromonas caviae] [Aeromonas caviae] [Acinetobacter baumannii] [Jeotgalicoccus marinus]	1.23E-08 1.19E-08 2.54E-06 1.32E-06 1.32E-06 0.0015059 1.90E-06	100 100 100 100 100 87 100

Quinolonas	RZV99317	DNA topoisomerase IV subunit A, partial	4.86E-08	100
	PZR44525	[Rhodobacteraceae bacterium]	7.67E-06	100
	WP_116585529	[Pseudomonas oleovorans]	1.86E-06	92
Quinolonas	TCZ92526	DNA topoisomerase IV subunit B	1.85E-07	100
	RZI87563	[Lysobacter sp. N42]	1.23E-07	100
	WP_122796542	[Pseudomonas sp.]	0.0002173	88
	SFO72819	[Pseudomonas sp. 286]	1.34E-06	100
Tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, glicilciclinas, diaminopirimidinas, beta-lactámicos, aminoglucósidos, aminocumarinas		Multidrug efflux RND transporter permease subunit, partial		
	TMZ96226	[Klebsiella pneumoniae]	1.19E-05	100
	EMW23816	[Escherichia coli 2848050]	1.88E-07	100
	VTN19343	[Klebsiella pneumoniae]	1.14E-07	96
	PIL76510	[Acinetobacter baumannii]	2.15E-07	100
	WP_035201218	[Agrobacterium tumefaciens]	0.0009426	92
	RAU33012	[Pantoea sp. RIT 413]	4.08E-07	96
	STL86553	[Escherichia coli]	1.02E-06	100
	MBO14945	[Herbaspirillum sp.]	6.14E-07	100
	TPE52536	[Amaricoccus sp. HB172011]	9.45E-05	96
	HBM66062	[Pseudomonas sp.]	2.21E-07	100
	EIB98868	[Pantoea sp. Sc1]	0.320082	71
	AUG02564	[Pseudomonas sp. 09C 129]	6.67E-06	96
	AVS94299	[Acidovorax avenae subsp. avenae]	1.10E-05	100
	HCL52100	[Pseudomonas sp.]	4.96E-08	100
	TRO32489	[Pseudomonas putida]	5.96E-05	100
	WP_070096026	[Pseudomonas sp. NBRC 111139]	2.01E-05	100
	TRO39656	[Pseudomonas mendocina]	4.32E-07	100
	RQM80542	[Aeromonas dhakensis]	1.15E-06	100
	WP_139463176	[Aeromonas veronii]	1.18E-06	100
	WP_142881776	[Klebsiella pneumoniae]	3.28E-09	96
	TGC93450	[Salmonella enterica subsp. enterica serovar]	1.02E-06	96
	WP_088148794	[Achromobacter denitrificans]	1.15E-07	100
	MEI34541	[Salmonella enterica]	1.27E-05	92
Aminoglucósidos: Estreptomycin	WP_141278156	30S ribosomal protein S12 methylthiotransferase RimO	0.0455563	95
	PZO97102	[Pseudonocardia hydrocarbonoxydans]	2.11E-05	91
	TDC57042	[Dermacoccus nishinomiyaensis]	1.61E-05	96
	WP_051705985	[Jiangella sp. KC603]	5.59E-06	100
	HAY06784	[Marmoricola aequoreus]	2.41E-07	100
	EUA92261	[Hyphomonas sp.]	8.58E-08	100
Fluoroquinolonas, quinolonas, quinolonas	ACO59159	Topoisomerase II subunit A, partial	3.71E-07	92
	ACO59162	[Vibrio vulnificus]	2.06E-07	96
Tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, glicilciclinas,	CDL25313	RND efflux system, inner membrane transporter CmeB	3.31E-08	100
		[Escherichia coli ISC7]		

diaminopirimidinas, beta-lactámicos, aminoglucósidos, aminocumarina				
Cicloserina	ANN80568 WP_042079362 RWT07335 HAT01592 HBV90486 WP_135444295 OXM26009 PTP85957 WP_042879419 PIB52511 KKD30258 GAM77656	Alanine--tRNA ligase [Bordetella flabilis] [Aeromonas sanarellii] [Aeromonas caviae] [Pantoea agglomerans] [Pantoea sp.] [Vibrio tasmaniensis] [Pantoea sp. AV62] [Vibrio splendidus] [Aeromonas sp. ZOR0002] [Pseudomonas sp. 2822-17] [Pantoea sp. 3.5.1] [Vibrio ishigakensis]	1.01E-06 1.70E-07 7.21E-07 1.10E-07 1.41E-08 1.25E-11 9.60E-10 1.25E-11 3.22E-07 1.05E-07 9.60E-10 1.22E-11	96 100 96 100 100 100 100 100 100 100 100 100
Tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, gliciliclinas, diaminopirimidinas, beta-lactámicos, aminoglucósidos, aminocumarina	GEQ76742	Resistance-nodulation-cell division (RND) efflux transporter [Comamonas testosteroni]	1.21E-06	100
Quinolonas	KFJ90551 PLM75890 TFI50344	Transcription-repair coupling factor [Pseudomonas sp. 1-7] [Klebsiella pneumoniae] [Micrococcus endophyticus]	1.60E-06 2.34E-08 1.84E-05	100 96 96
Diaminopirimidinas (Trimetoprim)	WP_080473016	Dihydrofolate reductase [Staphylococcus epidermidis]	1.34E-08	100
Tetraciclinas, fluoroquinolonas, gliciliclinas, beta-lactámicos, macrólidos, lincosamida, fenicoles, cloruro de benzalconio, rodamina, fosfomicina, oxazolidinona, diaminopirimidi	WP_146634857 WP_117266422 TGB54686	MFS transporter, partial [Salmonella enterica] [Klebsiella pneumoniae] [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis]	1.34E-06 1.41E-06 6.02E-07	100 100 100

na				
Desconocido	WP_139354302	Hypothetical protein, partial [Escherichia coli]	3.36E-07	96
Acirflavina	VFT32513	Multidrug efflux protein [Pseudomonas aeruginosa]	1.29E-07	100
Desconocido	TGW24845	Hypothetical protein E5P17_23355, partial [Escherichia coli]	1.98E-08	96
Carbapenem y ertapenem	WP_045048669	Two-component system sensor histidine kinase EnvZ [Rouxiella chamberiensis]	2.00E-08	100
Aminoglucósido s:Estreptomycin a	PMZ79919	MiaB/RimO family radical SAM methylthiotransferase, partial [Pseudomonas sp. FW215-T2]	6.07E-06	96
Desconocido	TFU95483	Hypothetical protein E0L31_15715, partial [Serratia marcescens]	1.88E-06	96
Beta-lactámicos	WP_027129601	Serine hydrolase, partial [Francisella tularensis]	1.06E-07	100
	WP_142762963	[Klebsiella pneumoniae]	6.24E-06	100
	ECN8698921	[Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis]	4.57E-10	100
Acirflavina	PZX21635	HAE1 family hydrophobic/amphiphilic exporter-1/multidrug efflux pump [Rhodobacter capsulatus]	0.0006434	92
	SUD35178	[Pseudomonas mendocina]	4.57E-08	100
Desconocido	WP_140425113	Hypothetical protein, partial [Escherichia coli]	1.33E-06	100
Acridina	EFV84297	Acridine efflux pump [Achromobacter xylosoxidans C54]	1.80E-07	100
Aminoglucósido s	EVO13528	Aminoglycoside 3'phosphotransferase, partial [Staphylococcus aureus M1031]	1.47E-07	100
Acirflavina	SUH14347	Acirflavine resistance protein F Protein envD [Salmonella enterica subsp. enterica]	2.73E-08	100
Desconocido	WP_124056680	Hypothetical protein [Klebsiella pneumoniae]	0.00187591	95
Desconocido	SYS47307	Transposase [Klebsiella pneumoniae]	4.03E-09	100
	KGB08004	[Enterobacter cloacae]	1.72E-08	100
	WP_142998457	[Klebsiella pneumoniae]	4.95E-08	96
	VFS78899	[Kluyvera cryocrescens]	1.26E-08	100
fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, beta-lactámicos, Acridina, rifamicina, nitroimidazol, pleuro mutilina	OHS52082 OHQ40779 EES37028	Multidrug ABC transporter ATP-binding protein [Staphylococcus sp. HMSC69H07] [Staphylococcus sp. HMSC069E09] [Staphylococcus epidermidis W23144]	0.0001636 10.001663 830.0001507	100 96 100
Tetraciclinas, cloruro de benzalconio, isoniazida, nitro	PLP38629 STD20831	CysB family transcriptional regulator, partial [Klebsiella pneumoniae] [Enterobacter asburiae]	5.91E-08 3.05E-08	100 100

midazol, glicilciclina, rodamina, rifamicina, Acridina, cefalosporina, lincosamida, macrólidos, fosfomicina, fluoroquinolonas				
Lincomicina, clindamicina	ESV13761	Lincosamide resistance protein, partial [Staphylococcus epidermidis W105]	1.47E-08	100
Desconocido	WP_147508205	Hypothetical protein, partial [Acinetobacter baumannii]	2.50E-07	100
Carbapenem y ertapenem	SPX09257 STM36504	Osmolarity sensor protein EnvZ [Escherichia coli] [Escherichia coli]	4.21E-09 4.57E-09	100 100
Tetraciclinas	SJN20567	SSU ribosomal protein S7p (S5e) [Micrococcus lylae]	5.90E-09	100
Péptidos antimicrobianos	ESK55395	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N-acetylglucosamine deacetylase [Acinetobacter tjernbergiae DSM 14971 = CIP 107465]	1.85E-06	100
Desoxicolato y novobiocina	RID27969 KOP98461	Multidrug transporter, partial [Escherichia coli] [Citrobacter amalonaticus]	3.22E-07 6.54E-09	100 96
Tetraciclinas, monobactam, aminocoumarin, beta-lactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, macrólidos, aminopirimidina, acridina, triclosán, glicilciclina, fenicol	EBQ4021499	Response regulator [Salmonella enterica]	1.42E-07	100
Tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, glicilciclinas, diaminopirimidinas, beta-lactámicos, aminoglucósidos, aminocumarina	VFT16783	Major intrinsic multiple antibiotic resistance efflux outer membrane protein [Pseudomonas aeruginosa]	5.55E-06	100
Desconocido	WP_142916932	Hypothetical protein, partial	1.81E-07	96

		[Klebsiella pneumoniae]		
Aminoglucósidos	SBA29916	Aminoglycoside/multidrug efflux system [Citrobacter sp. 92]	6.54E-09	96
Tetraciclinas, monobactam, aminocoumarin, beta-lactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, macrólidos,aminopirimidina,acridina, triclosán,glicilciclina,fenicol	STQ60660 STI96792	Two-component response regulator [Pseudomonas aeruginosa] [Escherichia coli]	1.31E-07 1.32E-06	100 96
Fluoroquinolonas	BAB96570	DNA gyrase subunit B, partial [Nocardia asteroides]	2.32E-07	100
Desoxicolato y novobiocina	STQ60655	Multidrug resistance protein [Pseudomonas aeruginosa]	4.21E-06	100
Tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, glicilciclinas, diaminopirimidinas, beta-lactámicos, aminoglucósidos, aminocumarina	TRO76563 AYP23291 TGX93896 QCA04488	Multidrug efflux RND transporter permease subunit OqxB [Pantoea agglomerans] [Pantoea agglomerans] [Pantoea agglomerans] [Pantoea vagans]	6.07E-08 1.21E-06 1.87E-07 0.0007996 2	100 96 96 80
Desoxicolato y novobiocina	WP_144817229 PND91934 GAL57463	Multidrug efflux RND transporter permease subunit MdtC [Enterobacter sp. DE0047] [Escherichia coli] [Pseudomonas aeruginosa]	1.43E-09 1.10E-05 4.56E-06	100 96 100
Tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, glicilciclinas, diaminopirimidinas, beta-lactámicos, aminoglucósidos, aminocumarina	PXC00849	Multidrug efflux RND transporter outer membrane channel subunit OprM, partial [Pseudomonas aeruginosa]	1.28E-05	100
Aminoglucósidos	VDZ80170 VUC88115	KDP operon transcriptional regulator [Salmonella bongori] [Salmonella sp. NCTC 11881]	1.01E-07 1.42E-07	100 100
Aminoglucósido	VDA78011	strB_3_AF024602	1.45E-07	100

s		[Klebsiella pneumoniae]		
Tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, glicilciclinas, diaminopirimidinas, beta-lactámicos, aminoglucósidos, aminocumarina	SUU12250	Efflux pump membrane transporter BepE [Achromobacter denitrificans]	1.13E-07	100
Tetraciclinas, cloruro de benzalconio, isoniazida, nitroimidazol, glicilciclina, rodamina, rifamicina, Acridina, cefalosporina, lincosamida, macrólidos, fosfomicina, fluoroquinolonas	VTN08385	Cys regulon transcriptional activator [Raoultella terrigena]	1.01E-08	100
Tetraciclinas, cloruro de benzalconio, isoniazida, nitroimidazol, glicilciclina, rodamina, rifamicina, Acridina, cefalosporina, lincosamida, macrólidos, fosfomicina, fluoroquinolonas	EXC35141 TCB70596	Bacterial regulatory helix-turn-helix, lysR family protein, partial [Acinetobacter baumannii 951631] [Acinetobacter sp. ANC 4177]	3.60E-09 1.98E-06	92 88
Desconocido	PHK64489	Hydrogenase expression protein HypA, partial [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae]	8.34E-07	96
Desconocido	KNV71111	Hypothetical protein AEX06_26385, partial [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg]	7.85E-07	96
Sulfonamidas	TEW51829 SWK20018 APW29218	Sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase Sul2, partial [Escherichia coli] [Klebsiella pneumoniae] [Klebsiella pneumoniae]	1.23E-06 0.172195 5.84E-09	100 94 100
Tetraciclinas,	ALV71759	Multidrug transporter MatE	1.24E-05	100

fluoroquinolonas, gliciliciclina, Acridina		[Acinetobacter johnsonii XBB1]		
Polimixina	PXV40825	Bifunctional UDP-glucuronic acid oxidase/UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose formyltransferase, partial [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport]	5.53E-08	100
Péptidos antimicrobianos	VEB51302	Two-component sensor kinase [Salmonella enterica subsp. enterica]	0.00689258	83
Desconocido	EAQ0847018	Hypothetical protein [Salmonella enterica]	1.09E-06	100
Lincomicina, clindamicina	RSA63306	Lincosamide nucleotidyltransferase Lnu(A), partial [Enterococcus faecium]	3.14E-08	100
Ciprofloxacina, metronidazol	ADC87195	Lipid A export ATP-binding/permease protein MsbA [Staphylococcus lugdunensis HKU09-01]	0.0001620	100
Desconocido	PQL74391	hypothetical protein CV948_003095, partial [Acinetobacter baumannii]	5.89E-07	92

Taquilla (12 y 26 de Noviembre)				
Antibiótico (s)	Acceso (s)	Descripción	Valor E	% ID
		Elongation factor Tu, partial		
	PJC95786	[Janthinobacterium sp. BJB1]	0.0391172	100
	RDE81129	[Haemophilus parahaemolyticus]	5.29E-08	100
	RFS35368	[Acinetobacter sp. SWAC5]	1.50E-07	100
	OKP76497	[Paenibacillus sp. P3E]	1.06E-07	100
	MHW36726	[Escherichia coli]	9.46E-09	100
	KFJ04966	[Bifidobacterium subtilis]	1.91055	100
	MCI34337	[Trifolium medium]	4.49E-06	100
	OJY73493	[Stenotrophomonas sp. 69-14]	4.83E-09	100
	SNV01850	[Megamonas hypermegale]	1.33E-07	100
	SSU04602	[Acinetobacter baumannii]	1.00E-06	92
	AMY27403	[uncultured cyanobacterium]	1.71E-06	100
	EFS75652	[Cutibacterium acnes HL086PA1]	5.03E-07	100
	HAM61059	[Psychrobacter sp.]	5.60E-08	100
	AMP43339	[Tetraselmis sp. CCMP 881]	1.02E-06	100
	AFN54981	[Codium pernambutensis]	1.78E-06	100
	AMY27292	[Tacanooosca uncinata]	1.09E-08	96
	TAL85977	[Rhodanobacter sp.]	4.95E-08	100
	ECD3788170	[Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kandla]	1.27E-06	96
	RTS60147	[Pseudomonas aeruginosa]	3.33E-08	96
	WP_073996032	[Arcanobacterium urinimassiliense]	2.72E-07	100
	ELJ80120	[Escherichia coli KTE94]	9.50E-09	100
	OAT44409	[Hafnia paralvei ATCC 29927]	2.70E-05	100
	MAF12958	[Candidatus Poribacteria bacterium]	1.07E-08	100
	ANE44275	[Deinococcus puniceus]	2.31E-06	100
	KGG95417	[Comamonas thiooxydans]	5.69E-07	100
	AMY27388	[uncultured cyanobacterium]	1.68E-07	100
	RHG11615	[Megamonas funiformis]	2.18E-06	100
	KTG59727	[Klebsiella pneumoniae]	2.08E-09	100
Kirromicina	AFF21495	[Corynebacterium pseudotuberculosis P54B96]	3.06E-09	100

	ALO21451	[Lobochlamys culleus]	2.67E-06	96
	OTG62891	[Acinetobacter sp. ANC 4999]	1.92E-07	96
	EGR53376	[Fusobacterium mortiferum ATCC 9817]	1.19E-08	100
	RYF11671	[Deltaproteobacteria bacterium]	1.95E-08	100
	RXW31932	[Propionibacteriaceae bacterium VG341]	5.55E-07	100
	PZQ16655	[Variovorax paradoxus]	1.65E-08	100
	RRJ17894	Pararheinheimera mesophila]	1.27E-06	100
	HCK28390	[Alcanivorax sp.]	3.13E-06	100
	KOZ34521	[Escherichia coli]	1.53E-07	91
	RAG67666	[Burkholderia multivorans]	2.43E-08	100
	EBK2398766	[Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky]	5.12E-07	100
	PNR01384	[Escherichia coli]	8.29E-05	100
	PNY58601	[Escherichia coli]	0.00029955	100
	ADI24196	[Staphylococcus haemolyticus]	3.76E-05	96
	RBO79764	[Marinomonas aquiplantarum]	3.47E-05	92
	WP_102005033	[Klebsiella pneumoniae]	4.98E-08	100
	PKQ32960	[Actinobacteria bacterium HGW-Actinobacteria-2]	0.00024808	83
	AYF60592	[Staphylococcus pseudolugdunensis]	1.13E-08	100
	EUA06891	[Mycobacterium xenopi 4042]	3.89E-08	96
	KOS65310	[Staphylococcus aureus]	3.13E-07	96
	WP_029211823	[Arsenicococcus bolidensis]	2.48E-06	100
	HAI04249	[Brevundimonas sp.]	2.32E-08	100
	AND95863	[Acutodesmus bajacalifornicus]	3.46E-06	88
	WP_034649074	[Corynebacterium vitaeruminis]	3.30E-05	96
	RGM95694	[Fusobacterium mortiferum]	1.24E-08	100
	SEN06987	[Megamonas sp. Calf98-2]	2.27E-06	100
	ORF45473	[Snodgrassella alvi]	1.95E-06	92
	PXB35930	[Pseudomonas aeruginosa]	3.41E-06	100
	OSJ69138	[Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport str]	1.17E-07	100
	ROQ96418	[Streptomyces sp. 2132.2]	2.63E-06	96
	SNX47000	[Acinetobacter puyangensis]	1.48E-09	100
	AKK04770	[Corynebacterium mustelae]	1.02E-07	96
	CBL06736	[Megamonas hypermegale ART12/1]	4.28E-07	96
		Beta-lactamase, partial		
	AGM50433	[Aeromonas hydrophila]	4.68E-09	100
	ASK51726	[Proteus mirabilis]	6.79E-08	100
	VTQ19566	[Escherichia coli]	2.12E-08	100
	TBS16361	[Salmonella. enterica serovar Typhimurium]	1.67E-08	100
	VTQ19565	[Escherichia coli]	1.18E-07	100
	RNX37941	[Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae]	1.17E-06	100
	QCE31360	[Escherichia coli]	4.80E-08	96
	VDH23349	[Escherichia coli]	5.58E-09	100
	PWS15170	[Klebsiella pneumoniae]	3.60E-08	100
	POL25992	[Klebsiella pneumoniae]	1.06E-07	100
	ASK51728	[Proteus mirabilis]	2.59E-06	96
	VFT07002	[Escherichia coli]	8.50E-09	100
	CEG38050	[Plasmopara halstedii]	3.94E-09	100
	APX42443	[Acinetobacter baumannii]	4.53E-05	96
	PWQ89125	[Enterococcus faecium]	3.02E-07	100
	TWU81196	[Haemophilus influenzae]	1.33E-06	100
	KLV86088	[Citrobacter sp. MGH109]	2.46E-07	100
	ARI46018	[Enterobacter cloacae]	5.40E-08	100
	AVP86640	[Aeromonas hydrophila]	1.17E-06	100
Beta-lactámicos	BBG87256	[Aeromonas hydrophila]	1.17E-06	100

	RHX39044 PHS83196 CAB57458 KHA57998 AHH01511 SWN10357 VCZ14615	[Escherichia coli] [Aeromonas dhakensis] [Proteus mirabilis] [Aeromonas hydrophila] [Enterobacter cloacae] [Klebsiella pneumoniae] [Escherichia coli]	1.41E-07 4.25E-06 4.47E-08 1.16E-06 1.67E-08 6.68E-09 5.09E-07	100 100 100 100 100 100 100
Macrólidos(Eritromicina, Azitromicina)	PQZ64538	23S RNAr (adenine(2058)-N(6))-methyltransferase Erm(B), partial [Bacillus sp. MYb78]	1.30E-07	100
Fusidic acid	APO35069	Elongation factor G C-terminus [uncultured bacterium]	6.09E-07	100
	OJU94009 WP_144791324 WP_024286952 HBV03448 BBI16619 PWE88117 ROZ63474 OLT12613 CCZ42368 OHF26852 AUS31196 OHB13458 KUF07359 SUK30819 ACA29581 ANQ33989	DNA-directed RNA polymerase subunit beta [Solirubrobacterales bacterium 67-14] [Kocuria palustris] [Cellulomonas sp. KRM CY2] [Staphylococcus sp.] [Neochlamydia sp. S13] [Streptomyces sp. SMS_SU21] [Kocuria sp. M5W7-7] [Kocuria sp. CNJ-770] [Clostridium sp. CAG:122] [Rhodococcus erythropolis] [Rhodococcus qingshengii] [Candidatus Zambryskibacteria bacterium] [Leucobacter sp. G161] [Staphylococcus aureus] [Streptococcus infantarius subsp. infantarius] [Rhodococcus pyridinivorans]	1.93E-08 3.04E-07 3.48E-07 1.92E-06 1.03E-06 3.57E-08 3.05E-06 0.00019492 2.32E-08 6.11E-08 1.01E-07 1.51E-09 1.47E-07 2.42E-07 4.48E-08 2.82E-08	100 100 100 100 100 100 96 92 100 96 92 100 100 100 96 100
Rifamicina y fidaxomicina				
Tetraciclinas,cloruro de benzalconio, isoniazida,nitroimidazol, glicilciclina, rodamina, rifamicina, Acridina, cefalosporina, lincosamida, macrólidos, fosfomicina, fluoroquinolonas	HAA06171 WP_117072545	LysR family transcriptional regulator [Acinetobacter schindleri] [Klebsiella pneumoniae]	1.11E-08 7.13E-07	100 96
Tigeciclina	HBS38390	30S ribosomal protein S10 [Rhodobacteraceae bacterium]	5.17E-05	100
Penicilina	QCT24437	Penicillin binding protein PBP2A, partial [Staphylococcus aureus]	2.83E-07	100
	OLT23533 PZU42326 SDJ42976	30S ribosomal protein S7 [Ornithinimicrobium sp. CNJ-824] [Arsenicococcus sp.] [Frankineae bacterium MT45]	1.21E-06 1.44E-06 0.247432	96 100 100
Tetraciclinas				
Desconocido	OOL76548	Hypothetical protein B1P95_18075, partial [Enterococcus faecium]	1.43E-07	100
Fluoroquinolonas	PMD99099 SUJ35907	DNA gyrase subunit A [Siphonobacter sp. BAB-5405]	6.44E-09 1.16E-09	100 100

	RNL60756 PQV58310 PZQ75865 TDA85962	[Staphylococcus aureus] [Marmoricola ginsengisoli] [Defluviimonas denitrificans] [Cutibacterium acnes] [Halomonas sp. 204]	1.52E-05 1.16E-07 4.07E-07 1.08E-08	96 96 100 100
Desconocido	VTQ60411	Protein of uncharacterised function (DUF1602) [Stenotrophomonas maltophilia]	7.20805	75
Desconocido	PAI87584	Hypothetical protein APW83_13710, partial [Staphylococcus aureus]	1.06E-09	100
Desconocido	PWZ94827	Hypothetical protein DD924_16645, partial [Staphylococcus pseudintermedius]	1.06E-08	100
Desconocido	WP_112901366	Hypothetical protein [Escherichia coli]	1.87E-08	100
Tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, gliciliclinas, diaminopirimidinas , beta- lactámicos(carbape- nemas y monobactam), aminoglucósidos, aminocumarina	AXF44813 RTY10394 ATR83172 PPQ45277	Hydrophobe/amphiphile efflux-1 family RND transporter [Acinetobacter johnsonii] [Pseudomonas] geniculata] [Pseudomonas sp. HLS-6] [Rhodopseudomonas palustris]	5.20E-07 5.33E-06 1.86E-05 0.286207	100 100 100 92
Tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, gliciliclinas, diaminopirimidinas , beta- lactámicos(carbape- nemas y monobactam), aminoglucósidos, aminocumarina	PIN63775 HAW44134 SDB90088	Multidrug transporter, partial [Klebsiella pneumoniae] [Klebsiella pneumoniae] [Acinetobacter boissieri]	3.42E-05 5.64E-06 0.00010743	96 100 92
Desconocido	SKN67917	Uncharacterised protein [Mycobacteroides abscessus subsp. massiliense]	0.0006015	76
Fluoroquinolona, rifamicina, Acridina,tetraciclina, macrólido, pleuromutilina, beta- lactámicos(cefalosporina, penam)nitroimidazol	OFJ75938	MacB family efflux pump subunit [Neisseria sp. HMSC072F04]	3.08E-06	100
Aminoglucósidos:E streptomycin	AVM81237	Ribosomal protein S12 [Cryptomonas curvata]	2.24E-07	96
Tetraciclinas, fluoroquinolonas, gliciliclinas, beta- lactámicos(penam,	WP_141745349 WP_140065363 TOD45054 WP_140245037	MFS transporter, partial [Staphylococcus sp. HMSC074A11] [Vibrio parahaemolyticus] [Vibrio parahaemolyticus]	5.58E-07 9.28E-09 5.54E-08 8.52E-09	100 100 100 100

cefalosporinas), macrólidos, lincosamida, fenicoles, cloruro de benzalconio, rodamina, fosfomicina,oxazoli dinona, diaminopirimidina		[Vibrio parahaemolyticus]		
Desconocido	OVE13730	Hypothetical protein UQ41_10860 [Salmonella enterica subsp. enterica]	2.72E-08	100
Fluoroquinolonas y cloranfenicol	EES34836	Putative antiseptic resistance protein, partial [Staphylococcus epidermidis W23144]	2.21E-07	100
Tetraciclinas	QBF53397	TetC, partial [Escherichia coli]	2.06E-07	100
Desconocido	AMR29909	Hypothetical protein A0256_24455 [Mucilaginibacter sp. PAMC 26640]	1.61E-06	100
Desconocido	EAZ9513651	Hypothetical protein [Salmonella enterica]	1.17E-07	100
Desconocido	WP_139375000	Hypothetical protein, partial [Salmonella enterica]	1.84E-07	100
Desconocido	VTU09192	Uncharacterised protein [Actinobacillus porcinius]	3.52E-05	96
Tetraciclinas	AFM31106 EST83058	Tetracycline resistance protein, partial [uncultured bacterium]	3.66E-06	100
		[Escherichia coli ECA-0157]	1.90E-07	100
Aminoglucósidos, Isoniazida	AZY95251 TJZ84026	Catalase/peroxidase HPI [Paracoccus sp. Arc7-R13]	7.88E-08	100
		[Paracoccus hibiscisoli]	7.21E-08	100
Tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, gliciliclinas, diaminopirimidinas , beta- lactámicos(carbape nemas y monobactam), aminoglucósidos, aminocumarina	ACF01930	Transporter, hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family [Rhodopseudomonas palustris TIE-1]	0.291882	92
Acriflavina	EAY66285	Acriflavin resistance protein [Burkholderia cenocepacia PC184]	1.81444	96

Hospital (12 y 26 de Noviembre)				
Antibiótico (s)	Acceso (s)	Descripción	Valor E	% ID
	CPN27196	DNA-directed RNA polymerase subunit beta (rpoB)	3.11E-08	100
	AVM61860		3.44E-07	100
	WP_026531233	[Bordetella pertussis]	1.28E-06	100

Rifamicina y fidaxomicina	TLP93507	[Actinomyces sp. oral taxon 897]	1.16E-07	100
	AKK07841	[Haematomicrobium sanguinis]	7.13E-09	100
	RAE58604	[Nesterenkonia sp. GY074]	5.93E-09	100
	CPN27196	[Corynebacterium testudinatoris]	3.11E-08	100
	AZA10073	[Burkholderia multivorans]	7.96E-08	100
	WP_103063291	[Bordetella pertussis]	2.20E-07	100
	AKK02253	[Corynebacterium pseudopelargi]	2.32E-06	100
	TYC48760	[Actinomyces]	1.53E-07	100
	TSJ71986	[Corynebacterium epidermidicis]	2.44E-07	100
	ALC98517	[Rhodobacterales bacterium]	2.76E-06	96
	VEI98285	[Corynebacterium godavarianum]	1.18E-05	96
	WP_040359493	[Actinomyces sp. oral taxon 414]	4.34E-09	100
	WP_026157123	[Corynebacterium matruchotii]	2.32E-06	100
	OCB81298	[Corynebacterium durum]	6.93E-08	100
	TAL27703	[Corynebacterium capitovis]	1.58E-08	100
	SUY84093	[Lactobacillus parabuchneri]	1.03E-08	100
	AOY56510	[Alphaproteobacteria bacterium]	2.29E-11	100
	TKV17320	[Clostridioides difficile]	5.74E-08	100
	TGV63014	[Candidatus Rhodoluna planktonica]	1.30E-08	100
	EFG48666	[Citrobacter sp. TBCS-11]	6.34E-09	100
	AAS89200	[Mesorhizobium sp. M00.F.Ca.ET.149.01.1.1]	1.52E-06	100
	ALM88242	[Brevibacterium mcbrellneri ATCC 49030]	2.10E-07	96
	AAS89209	[Corynebacterium matruchotii]	2.32E-06	100
	ALT66167	[Mycobacterium sp. QGD 101]	3.10E-06	96
	WP_084316474	[Corynebacterium capitovis]	1.02E-07	100
	OFT44523	[Mycobacterium intracellulare]	6.96E-05	91
	PIK72989	[Actinospica robiniae]	4.01E-10	100
	PND84718	[Brachybacterium sp. HMSC06H03]	1.62E-08	100
	RLY61904	[Methylobacterium frigidaeris]	1.15E-05	96
	ENV68652	[Escherichia coli]	5.16E-08	100
	WP_026437987	[Staphylococcus epidermidis]	1.51E-08	100
	RIL38802	[Acinetobacter towneri DSM 14962 = CIP 107472]	3.91E-08	100
	AUZ89342	[Acinetobacter sp. MDS7A]	1.40E-06	100
	EJP28463	[Staphylococcus fleurettii]	1.06E-08	100
		[Arthrobacter agilis]		
		[Haemophilus sputorum HK 2154]		
Desconocido	PMX28568	Hypothetical protein C1Y26_35020, partial [Pseudomonas sp. MPR-R2A7]	2.06E-06	96
Fluoroquinolonas		DNA gyrase subunit A		
	KGN37447	[Knoellia subterranea KCTC 19937]	4.36E-08	100
	RKW24398	[Corynebacterium sp.]	4.25E-05	100
	CCI83966	[Corynebacterium otitidis ATCC 51513]	1.61E-09	100
	KGN37447	[Knoellia subterranea KCTC 19937]	4.36E-08	100
	PKY95983	[Actinomyces naeslundii]	3.64E-07	100
	ERS79818	[Corynebacterium sp. KPL1859]	7.39E-09	100
	OFS23705	[Corynebacterium sp. HMSC04H06]	1.58E-05	100
	PKY95983	[Actinomyces naeslundii]	3.64E-07	100
	RKW24398	[Corynebacterium sp.]	4.25E-05	100
	VEH68760	[Pseudopropionibacterium propionicum]	8.68E-07	100
	OFP70179	[Corynebacterium sp. HMSC078C09]	6.45E-08	96

	PWB99313	[Corynebacterium sp. 2185]	1.02E-05	100
	RBY75897	[Blastococcus sp. TF02-9]	8.92E-08	100
	RDV45912	[Leifsonia sp. ku-ls]	0.0002313	88
	ACQ41842	[Burkholderia cenocepacia]	47.10E-08	100
	AFQ00594	[Neisseria gonorrhoeae]	5.23E-08	100
	EEG27589	[Corynebacterium matruchotii ATCC 33806]	6.11E-05	100
	BAF97662	[Corynebacterium macginleyi]	6.43E-09	100
	CCD32459	[Corynebacterium sp. MG-2011-70]	5.16E-08	100
	TGB52437	[Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis]	1.18E-07	100
	STU93771	[Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae]	2.02E-07	100
	WP_027684715	[Rhizobium leguminosarum]	3.02E-07	100
Fluoroquinolonas	EJF36785	DNA gyrase, B subunit, C-terminal domain protein [Actinomyces massiliensis F0489]	1.31E-05	96
	EJE35167	[Staphylococcus epidermidis NIH04008]	1.89E-07	100
Kirromicina		Elongation factor Tu GTP binding domain protein, partial		
	EMW16594	[Escherichia coli 2848050]	1.54E-07	100
	PQP73510	[Mycobacterium sp. ITM-2016-00317]	9.96E-08	100
	WP_136609106	[Paenibacillus sp. YH-JAE5]	6.68E-07	100
	PZM95877	[Actinobacteria bacterium]	1.54E-06	92
	EJN83412	[Actinomyces naeslundii str. Howell 279]	2.45E-08	100
	ELK99250	[Neisseria meningitidis NM126]	3.64E-08	100
	EBO3278279	[Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport]	1.57E-07	100
	TAG76607	[Betaproteobacteria bacterium]	0.0001840	100
	WP_122824928	[Georgenia]	4.12E-06	92
	RRD06025	[Pseudopropionibacterium propionicum]	2.07E-07	96
	VEI98226	[Corynebacterium matruchotii]	1.45E-05	100
	ABV56559	[Staphylococcus schleiferi subsp. schleiferi]	3.24E-08	100
	WP_030015048	[Curtobacterium sp. S6]	5.24E-10	100
	AKU17809	[Luteipulveratus mongoliensis]	3.45E-06	100
	TML27167	[Actinobacteria bacterium]	2.75E-06	96
	AMP43339	[Tetraselmis sp. CCMP 881]	2.42E-07	100
	HBI49746	[Moraxellaceae bacterium]	1.06E-07	100
	TAG76607	[Betaproteobacteria bacterium]	0.0001840	100
	TLF28374	[Microbacterium sp. 5K110]	0.0008840	87.5
	AHH21653	[Nocardia nova SH22a]	42.07E-06	96
	EBL6044127	[Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg]	4.73E-07	100
	ALO21451	[Lobochlamys culleus]	2.89E-06	96
	PXV96256	[Gilliamella apicola]	5.69E-09	100
	TWQ48527	[Xanthomonas vasicola]	3.99E-08	96
	EAE5917445	[Listeria monocytogenes]	1.38E-07	100
	PPT16878	[Xanthomonas arboricola]	2.70E-06	92
	ORC24391	[Rothia nasimurium]	3.52E-08	100
	AMY27388	[uncultured cyanobacterium]	1.69E-06	100
	WP_104472941	[Acinetobacter indicus]	4.27E-08	96
	PJG36134	[Enterobacter hormaechei]	5.16E-07	100
	RZG63634	[Acinetobacter wuhouensis]	2.65E-07	100
	SCT99712	[Staphylococcus aureus]	1.48E-07	96

	PXB35930 RLR69063 OTQ74921 RSE30721	[Pseudomonas aeruginosa] [Pseudomonas aeruginosa] [Gilliamella sp. N-G2] [Acinetobacter junii]	1.12E-07 0.0053206 56.39E-09 7.78E-08	82 100 100 100
Desconocido	EKJ43598	Hypothetical protein ECEC1870_2751 [Escherichia coli EC1870]	1.05E-06	100
Fluoroquinolonas	WP_038465504 PTU86454 WP_130875500	DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing) subunit B [Arthrobacter sp. PAMC 25486] [Staphylococcus pasteurii] [Pseudopropionibacterium sp. Marseille-P6184]	4.76E-07 1.25E-06 1.85E-07	96 100 100
Fluoroquinolonas	WP_067782575 WP_108832893 TQD43821 RRD51116	Type IIA DNA topoisomerase subunit B [Actinomyces vulturis] [Actinomyces sp. Marseille-P3109] [Actinomyces johnsonii] [Pseudopropionibacterium propionicum]	2.32E-09 2.89E-07 2.94E-07 1.40E-09	100 100 100 100
Aminoglucósidos:Est reptomicina	PUD65649 PYT50654 ALC98535 EGQ74458 EDM81979 MAK12273 QDE13074 VEG05094 RYZ31729	30S ribosomal protein S12, partial [Helicobacter pylori] [Acidobacteria bacterium] [Actinomyces sp. oral taxon 414] [Actinomyces sp. oral taxon 448 str. F0400] [Limnobacter sp. MED105] [Candidatus Pelagibacter sp.] [Picea neoveitchii] [Corynebacterium ulcerans] [Propionibacteriaceae bacterium]	1.72E-08 1.96E-07 1.78E-06 1.61E-06 3.87E-08 4.45E-06 1.19E-07 4.49E-07 1.37E-07	100 100 96 92 100 88 100 100 100
Desconocido	WP_124056680	Hypothetical protein [Klebsiella pneumoniae]	0.0031812 5	100
Mupirocina	OBY94105 WP_026409234 WP_043561529 RKW20051	Isoleucine--tRNA ligase [Actinomyces oris] [Actinomyces dentalis] [Actinomyces israelii] [Corynebacterium sp.]	1.15E-07 5.84E-07 2.76E-06 1.62E-08	100 100 92 100
Quinolonas	ALC99079 PMC92086 ALC99079 KQR81912	DNA topoisomerase IV [Actinomyces sp. oral taxon 414] [Actinomyces graevenitzii] [Actinomyces sp. oral taxon 414] [Arthrobacter sp. Leaf337]	1.93E-05 4.97E-09 1.93E-05 1.04E-08	96 96 96 100
Tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, gliciliclinas, diaminopirimidinas, beta-lactámicos(carbapenemas y monobactam), aminoglucósidos, aminocumarina	RRV43615 AQZ32995 TVT80550 WP_095163313 RTF20750 OLU29907 OLU27764 VUC89875 WP_142241175 STS84506	Multidrug efflux RND transporter permease subunit, partial [Pseudomonas stutzeri] [Pseudomonas sp. LPH1] [Pseudomonas sp. H3(2019)] [Pseudomonas sp. Irchel 3F5] [Serratia marcescens] [Pseudomonas sp. PA27(2017)] [Pseudomonas sp. PA15(2017)] [Salmonella sp. NCTC 7297] [Klebsiella pneumoniae] [Klebsiella pneumoniae]	1.84E-05 1.05E-05 9.03E-09 1.83E-06 1.52E-05 4.45E-07 4.54E-07 2.63E-06 1.90E-07 2.42E-08	100 100 100 100 100 96 96 96 100 100

	RRD51829 HBZ92964	[Escherichia coli] [Pseudomonas sp.]	2.39E-05 3.86E-06	100 100
Rifamicina y fidaxomicina	CEJ20909 AEW10509 ABE76533 AFI49438	RNA polymerase beta subunit, partial [Mycobacterium tuberculosis] [Bartonella taylorii] [uncultured bacterium] [Mycobacterium tuberculosis]	1.24E-07 2.29E-07 3.23E-07 1.50E-06	96 96 100 96
Beta-lactámicos	POL25992 POI90516 RXY52960 VTQ19588 TSB66648 ARI46018 ASK51727 EBK1426112 PQV71229 CEG38050 CAB57458 ANG19349 VTQ19566 EAU4570061 ASK51728 APX42443 EBK1426112 VTQ19574 QBQ34257 MKV39175 RBZ65438 RHX39044 OZZ62010 VDH22368 VDG47348	Beta-lactamase [Klebsiella pneumoniae] [Klebsiella pneumoniae] [Klebsiella pneumoniae] [Escherichia coli] [Escherichia coli] [Enterobacter cloacae] [Proteus mirabilis] [Salmonella enterica] [Cronobacter sakazakii] [Plasmopara halstedii] [Proteus mirabilis] [synthetic construct] [Escherichia coli] [Salmonella enterica] [Proteus mirabilis] [Acinetobacter baumannii] [Salmonella enterica] [Escherichia coli] [Acinetobacter baumannii] [Salmonella enterica subsp. enterica] [Klebsiella pneumoniae] [Escherichia coli] [Klebsiella pneumoniae] [Escherichia coli] [Escherichia coli]	1.97E-09 2.12E-08 3.59E-09 2.00E-08 1.76E-08 2.59E-07 1.28E-07 1.40E-09 2.69E-07 1.58E-07 1.74E-08 0.0233102 4.22E-08 6.43E-08 1.12E-07 4.53E-05 1.40E-09 7.36E-08 0.0046040 7 1.35E-07 4.41E-08 1.62E-08 1.21E-07 9.17E-08 0.0001874	100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 94 100 100 100 96 100 100 79 100 100 100 96 95
Tetraciclina, macrólidos, fluoroquinolonas, gliciliclinas, diaminopirimidinas, beta- lactámicos(carbapen emas y monobactam), aminoglucósidos, aminocumarina	EXA58378 EXU52120	RND transporter, hydrophobe/amphiphile efflux-1 family protein [Acinetobacter baumannii 1297549] [Acinetobacter baumannii 24845_3]	5.57E-08 6.26E-07	100 100
Rifamicina y fidaxomicina	EQG98664	RNA polymerase Rpb2, domain 7 family protein, partial [Clostridioides difficile DA00191]	1.34E-08	100
Cicloserina	HAW53962 WP_143491283	alanine--tRNA ligase [Hyphomonas sp.]	1.32E-09 3.62E-09	100 100

	PKN33123 SNW18165 TWR68821	[Pseudomonas sp. LAMO17WK12:I1] [Deltaproteobacteria bacterium HGW] [Mycolicibacterium thermoresistibile] [Pseudomonas panacis]	1.24E-08 1.03E-07 3.51E-09	100 100 100
Desconocido	ALC98982	Protein tyrosine phosphatase [Actinomyces sp. oral taxon 414]	3.14E-07	100
Desconocido	EXZ31133	Small GTP-binding domain protein, partial [Bacteroides fragilis str. S36L11]	5.74E-09	100
Pleuromutilina	PNP88163	Lsa family ABC-F type ribosomal protection protein [Gardnerella vaginalis]	2.32E-06	100
Tetraciclinas, fluoroquinolonas, gliciliclinas, beta- lactámicos(penam, cefalosporinas), macrólidos, lincosamida, fenicoles, cloruro de benzalconio, rodamina, fosfomicina,oxazolid inona, diaminopirimidina	TGR94558	MFS transporter, partial [Mesorhizobium sp. M1C.F.Ca.ET.188.01.1.1]	1.55E-06	100
Fluoroquinolones	WP_033130041	DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing) subunit A [Aeromonas aquatica]	1.56E-05	100
Aminoglucósidos, Isoniazida	WP_103036520	catalase/peroxidase HPI [Salinivenuus iranica]	8.96E-07	96
Acirflavina	EGI04289	Hydrophobe/amphiphile efflux-1 HAE1, partial [Pseudomonas coronafaciens pv. oryzae str. 1_6]	3.97E-09	100
Tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, gliciliclinas, diaminopirimidinas, beta- lactámicos(carbapen emas y monobactam), aminoglucósidos, aminocumarina	SNU15883	Multidrug-efflux transporter MexB [Acinetobacter johnsonii]	4.18E-08	100
Desconocido	RHK14776 WP_141757503	GTP-binding protein, partial [Bacteroides vulgatus] [Staphylococcus sp. HMSC058E01]	1.01E-07 8.88E-08	96 100
Tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, gliciliclinas, diaminopirimidinas, beta-	SHJ07065	Multidrug efflux pump [Aureimonas altamirensis DSM 21988]	1.35E-07	100

lactámicos(carbapenemas y monobactam), aminoglucósidos, aminocumarina				
Fosfomicina	WP_119473513 CSC97454 STT24641	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase [Vibrio cholerae] [Vibrio cholerae] [Klebsiella pneumoniae]	1.26E-05 1.25E-06 1.05E-08	96 100 100
Desconocido	HAN71721	Hypothetical protein [Actinobacteria bacterium]	2.53E-07	100
fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, beta-lactámicos(penam, cefalosporina) Acridina, rifamicina, nitroimidazol, pleuromutilina	EFM65113 WP_034469921	ABC transporter, ATP-binding protein [Peptostreptococcus stomatis DSM 17678] [Actinomyces dentalis]	2.84E-07 3.20E-07	100 100
Tetraciclinas, monobactam, aminocoumarin, beta-lactámicos(penam, carbapenem) aminoglucósidos, fluoroquinolonas, macrólidos, aminopirimidina, acridina, triclosán, glicilciclina, fenicol	RUP24956	Response regulator [Curvibacter sp.]	1.12E-07	100
Desconocido	WP_077577680	Hypothetical protein [Escherichia coli]	3.95E-08	100
Tetraciclinas	CRH83065	30S ribosomal protein S7 [Chlamydia trachomatis]	1.36E-07	100
Desconocido	KGS48724	Hypothetical protein X992_6284 [Burkholderia pseudomallei MSHR5492]	0.116108	83
Desconocido	HBQ34688	Hypothetical protein [Ochrobactrum anthropi]	1.06E-05	96
Tetraciclinas, beta-lactámicos (monobactam, carbapenem) fenicol, fluoroquinolonas, aminocoumarina, Acridina, diaminopirimidina, aminoglucósidos, ma	PXC09247	Transcriptional regulator Crp, partial [Pseudomonas aeruginosa]	1.21E-06	100

crólidos, triclosán,glicilciclina				
Tetraciclinas, fluoroquinolonas, glicilciclinas, beta- lactámicos(penam, cefalosporinas), macrólidos, lincosamida, fenicoles, cloruro de benzalconio, rodamina, fosfomicina,oxazolid inona, diaminopirimidina	PPJ75977	Quaternary ammonium compound efflux MFS transporter QacB, partial [Staphylococcus haemolyticus]	1.29E-06	100
Ácido Fusídico	EON83942	Fusidic acid resistance [Staphylococcus epidermidis 528m]	1.29E-07	100
daunorrubicina / doxorubicina	PZU29785	daunorubicin/doxorubicin resistance ABC transporter ATP-binding protein DrrA, partial [Actinomyces sp.]	2.67E-07	100
Aminoglucósidos	PQN27658	APH(3'&3') family aminoglycoside O-phosphotransferase, partial [Shigella flexneri]	1.08E-05	92
Análogos de Riboflavina	EBQ2227180	FMN/FAD transporter [Salmonella enterica subsp. enterica]	0.00614609	95
Macrólidos	STV75990	Macrolide-specific efflux protein MacA [Klebsiella pneumoniae]	4.42E-08	100
Fosfomicina	SQC63483	Glycerol-3-phosphate transporter [Klebsiella pneumoniae]	2.51E-07	100
Péptidos antimicrobianos	ODA12692 AMW78979 KXZ69563	Acyl-[acyl-carrier-protein]--UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase [Acinetobacter celticus] [Acinetobacter sp. TGL-Y2] [Acinetobacter venetianus]	6.64E-08 1.38E-08 5.81E-06	100 100 92
Beta-lactámicos	WP_142762963	Serine hydrolase, partial [Klebsiella pneumoniae]	1.43E-06	100
Desconocido	WP_147503157	Aminotransferase class III-fold pyridoxal phosphate-dependent enzyme, partial [Acinetobacter baumannii]	4.15E-08	100
Desconocido	KZJ97148	Hypothetical protein AWH00_20320 [Escherichia coli]	1.29E-08	100
Linezolid, eritromicina, rifampicina, cloranfenicol	EBA3554930	Multidrug efflux MFS transporter EmrD [Salmonella enterica]	1.69E-08	100
Mupirocina	SNW18165	Isoleucyl-tRNA synthetase	1.03E-07	96
Aminoglucósidos	KDX07683	Aminoglycoside phosphotransferase StrA domain protein, partial [Escherichia coli 2-210-07_S3_C3]	4.40E-08	100
Novobiocina	SUH36457	Efflux system protein [Salmonella enterica subsp. enterica]	1.57E-05	96
Novobiocina	SPW89583	Multidrug transporter MdtB [Escherichia coli]	1.90E-08	100

Desconocido	PLL86858	Putrescine aminotransferase, partial [Klebsiella michiganensis]	1.84E-08	100
-------------	----------	---	----------	-----

Anexo 4. Identificación de genes que codifican para factores de virulencia por BLASTx.

AIRE VAGÓN (12 y 26 de Noviembre)				
Tipo de FV (Función)	Acceso (s)	Descripción (Nombre y bacteria)	Valor E	% ID
Supervivencia intracelular y replicación		Excinuclease ABC subunit A UvrA		
	SCX57294	[Klenkia marina]	3.68E-06	100
	PZA23160	[Modestobacter versicolor]]	7.23E-06	100
	PBO30443	[Streptomyces albidoflavus]	7.23E-06	96
	TFV88589	[Blastococcus sp. CT_GayMR16]	5.98E-05	96
	WP_110183339	[Nocardioide solisilvae]	6.03E-10	100
	WP_081770610	[Comamonas aquatica]	4.12E-09	100
	WP_083215374	[Comamonas aquatica]	4.24E-09	100
	WP_127480941	[Nocardioide sp. X2025]	8.74E-09	96
Metabolismo celular		Tryptophan synthase subunit beta		
	PWS15201	[Klebsiella pneumoniae]	1.38E-08	100
	PSC95272	[Klebsiella pneumoniae]	2.19E-08	96
	PWS15201	[Klebsiella pneumoniae]	1.38E-08	100
	PWS15201	[Klebsiella pneumoniae]	1.38E-08	100
	RWT31757	[Aeromonas caviae]	2.37E-07	100
	PRM16189	[Haemophilus influenzae]	1.28E-06	100
	KTA76818	[Aeromonas salmonicida]	2.88E-06	100
Estrés		ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit		
	WP_010209412	[Pseudomonas sp. R81]	1.37E-08	100
	HCI07001	[Sulfitobacter sp.]	1.17E-06	96
	VKW85359	[Streptococcus pneumoniae]	3.86E-08	100
	SNR50147	[Paracoccus sediminis]	3.10E-07	100
	TJZ94159	[Paracoccus gahaiensis]	1.78E-07	96
	WP_103171203	[Paracoccus sp. SY]	1.22E-06	96
	TJZ94159	[Paracoccus gahaiensis]	2.00E-08	100
	SNR50147	[Paracoccus sediminis]	3.10E-07	100
	WP_048822015	[Morganella morganii ClpB]	2.30E-08	96
Regulación		RNA polymerase sigma factor AlgU, partial		
	ACN55009	[Escherichia coli]	1.97E-09	100
	EXF46189	[Pseudomonas sp. BAY1663]	2.20E-07	100
	KJK48909	[Streptomyces sp. NRRL F-4428]	2.55E-06	100
	KLF72103	[Klebsiella aerogenes]	1.26E-06	100
	KJK48909	[Streptomyces sp. NRRL F-4428]	2.55E-06	100
	PZO97642	[Dermacoccus nishinomiyaensis]	2.54E-06	100
	PTC34511	[Pseudomonas aeruginosa]	9.54E-07	96
	ACN55009	[Escherichia coli]	1.97E-09	100

	KJY31055	[Streptomyces katrae]	0.00050828	88
Supervivencia intracelular y replicación	HBT15607 TXI79972	Holliday junction branch migration DNA helicase RuvB [Firmicutes bacterium] [Flavobacteriales bacterium]	1.04E-06 4.06E-07	92 100
Adherencia	AFG40043	IS629 transposase orfB [Escherichia coli P12b]	1.03E-07	100
Regulación	KJT29816 TFT68995 ORM50835	glutaredoxin-4, Grx4 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar] [Proteus mirabilis] [Pantoea conspicua]	4.60E-08 5.89E-07 3.33E-07	100 92 100
Endotoxina	KRW66602 EJO92065 SFW22203	3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase [Pseudomonas sp. TTU2014-105ASC] [Pseudomonas mendocina DLHK] [Pseudomonas sp. NFACC19-2]	4.98E-07 4.22E-10 6.07E-09	100 100 96
Síntesis de LPS	WP_139499598 WP_122987421	NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein, partial [Escherichia coli] [Escherichia coli]	5.33E-08 2.56E-08	100 100
Endotoxina	WP_127360599 MAE10905 WP_034481200 TSA06992 PHX52573.1	GDP-mannose 4,6-dehydratase [Streptomyces sp. LAM7114] [Dehalococcoides bacterium] [Agrobacterium rhizogenes] [Comamonadaceae bacterium] [Pseudomonas syringae pv. syringae]	7.07E-07 2.48E-06 1.53E-05 6.95E-07 1.00E-06	100 96 100 96 100
Adherencia y motilidad	HBZ98603 HAR06465 WP_019407083	Flagellum-specific ATP synthase FlII [Pseudomonas sp.] [Pseudomonas sp.] [Pseudomonas stutzeri]	3.45E-05 1.06E-05 0.580415	100 100 90
Adherencia y motilidad	EJB74662	Sialic acid-binding adhesin SabA [Helicobacter pylori Hp A-16]	6.21E-05	100
Metabolismo celular	PIB64324 EBX2782510 PZW80447 SPZ10637 AHI23227	Glutamine synthetase [Pseudomonas sp. 2822-17] [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Hadar] [Pseudomonas sp. 2848] [Pseudomonas aeruginosa] [Corynebacterium vitaeruminis DSM 20294]	8.85E-06 3.13E-08 6.65E-07 1.61E-07 9.13E-07	100 100 100 96 100
Antifagocitosis	WP_090415999	UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)glucosamine N-acyltransferase [Pseudomonas jinjuensis]	4.71E-05	96
No clasificado	ORY18936	hypothetical protein BCR34DRAFT_595771 [Clohesyomyces aquaticus]	8.07837	62
Endotoxina	CWX37578	UDP-Gal--lipooligosaccharide galactosyltransferase [Haemophilus influenzae]	0.0181699	84
Estrés, Regulación	CRH32618 KEY60737	RNA polymerase-binding transcription factor DksA [Pantoea ananatis]	1.00E-06 1.26E-06	100 96

		[Serratia sp. DD3]		
No clasificado	TWW63987	Vascular endothelial growth factor C [Takifugu flavidus]	1.68625	85
Adherencia	SUB33592	Autotransporter adhesin [[Pasteurella] mairii]	0.367424	86
No clasificado	RZI60536	hypothetical protein EOP14_00790 [Pseudomonas sp.]	1.3661	92
Estrés	TBU82638	Carbon starvation protein A CstA [Pseudomonas dryadis]	4.06E-08	100
	KEY34115	[Cutibacterium acnes]	7.18E-08	100
	EAA3799266	[Salmonella enterica subsp. enterica]	3.89E-08	100
	TBU82638	[Pseudomonas dryadis]	4.32E-07	96
	GAE75834	[Cutibacterium acnes JCM 18918]	9.1E-06	92
	EFT15536	[[Propionibacterium] humerusii HL037PA3]	7.25E-08	100
	AEF23919	[Pseudomonas fulva 12-X]	4.06E-08	100
	HAP25282	[Achromobacter sp.]	2.89E-06	100
Adherencia y motilidad	TBW07129	PilT/PilU family type 4a pilus ATPase [Azotobacter chroococcum]	1.03E-06	100
	KFL37021	[Arenimonas donghaensis DSM 18148 = HO3-R19]	1.03E-06	100
	TQM17588	[Pseudoxanthomonas sp. 3HH-4]	1.15E-06	100
Sistema de secreción tipo VI	RQW65227	Type VI secretion system ATPase TssH, partial [Listeria sp. SHR_NRA_18]	5.03E-08	100
Antifagocitosis	<u>WP_146336541.1</u>	Glycosyltransferase family 25 protein [Haemophilus influenzae]	0.68	80.95
Endotoxina	WP_113247359	3-deoxy-8-phosphooctulonate synthase [Rhizobiales bacterium]	6.51E-07	100
	QBX34005	[Paracoccus sp. 2251]	6.43E-08	100
	WP_104069243	[Albidovulum inexpectatum]	5.47E-08	100
Antifagocitosis	RMC41135	Acyl carrier protein [Paracoccus siganidrum]	7.74E-06	100
Adherencia	RAN85532	ABC transporter substrate-binding protein, partial [Bacillus sp. SRB_28]	2.64E-07	92
Estrés	QAU51507	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP] [Corynebacterium pelargi]	7.77E-08	100
Sistema de secreción tipo VI	PPD31812	Type VI secretion system contractile sheath large subunit [Methylobacter sp.]	0.001474	100
Resistencia al ácido y Termoestabilidad	RVR28251	Homoserine O-succinyltransferase, partial [Escherichia coli]	3.12E-07	96
Metabolismo celular	WP_131577073	Maltose alpha-D-glucosyltransferase [Paracoccus sp. I-41R45]	5.38E-09	100
	AZY95675	[Paracoccus sp. Arc7-R13]	1.02E-09	100
	AVE03502	[Pseudomonas palleroniana]	1.12E-07	100
Regulación	OZB34044	RNA polymerase sigma factor RpoE [Pseudomonas sp. 34-62-33]	2.52E-08	100
	RRW47037	[Pseudomonas luteola]	2.00E-07	100

Antifagocitosis	PRA63806	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase/mannose-6-phosphate isomerase [Pseudomonas sp. MYb187]	9.03E-10	100
	WP_049874288	[Pseudomonas aeruginosa]	4.38E-08	96
	PJN94884	Amaricoccus sp. HAR-UPW-R2A-40]	3.84E-08	100
Transposasa	ENB40596	Transposase [Escherichia coli BCE032_MS-12]	1.37E-09	100
	WP_139120479	[Salmonella enterica]	1.18E-08	100
	VCZ64183	[Klebsiella pneumoniae]	1.44E-09	100
	POV85503	[Aeromonas sp. ASNIH8]	1.18E-06	100
Adherencia y motilidad	EAH7333500	Flagellar biosynthesis protein FlaG [Campylobacter jejuni]	3.01E-09	100
Adherencia y motilidad	PXC08545	Flagellar motor switch protein FliG, partial [Pseudomonas aeruginosa]	5.48E-06	96
	CCP06954	[Erwinia amylovora MR1]	1.41E-05	92
	ORM50788	[Pantoea conspicua]	3.32E-07	100
No clasificado	TWW57817	Glutamate-rich protein 3 [Takifugu flavidus]	0.200076	79
Metabolismo celular	WP_145173232	Acetolactate synthase large subunit [Rothia mucilaginosa]	1.31E-06	84
Sistema de secreción tipo IV	RFF99405	Type IV pilus secretin PilQ, partial [Pseudomonas aeruginosa]	1.33E-06	96
No clasificado	WP_140409817	Response regulator transcription factor, partial [Escherichia coli]	1.51E-07	100
Endotoxina	PPB82114	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase (KDO 8-P synthase) [Albidovulum inexpectatum]	5.42E-08	100
Invasión	SVJ78042	Methyl-accepting chemotaxis protein [Klebsiella pneumoniae]	3.10E-07	100
	TNF88588	[Gammaproteobacteria bacterium]	1.22E-06	96
	HAC69293	[Pseudomonas sp.]	3.85E-07	100
	CRQ78457	[Pseudomonas aeruginosa]	5.55E-07	100
Adherencia	EAI1453818	Flagellar protein FlaG [Campylobacter jejuni]	3.31E-09	100
Regulación	SPW56306	RNA polymerase sigma factor RpoS [Escherichia coli]	2.73E-07	100
	HBV38803	[Erwinia sp.]	0.0002042	100
	CHZ20287	[Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi]	33.30E-07	100
	EIS72204	[Yersinia pestis PY-65]	5.43E-06	100
	OUS30943	[Gammaproteobacteria bacterium 45_16_T64]	1.51E-05	92
	WP_042011738	[Aeromonas fluvialis]	1.08E-06	100
	SQK72800	[Tatumella ptyseos]	3.77E-06	96
	KFD09655	[Raoultella planticola ATCC 33531]	1.59E-05	100
Supervivencia intracelular y	SFO45515	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase [Pantoea sp. OV426]	4.14E-08	100
	AWP31364		3.43E-07	96

replicación		[<i>Pantoea vagans</i>]		
Receptor de exotoxinas	XP_027623116	Uncharacterized protein ZSWIM9 [<i>Tupaia chinensis</i>]	0.00964575	82
Regulación	EHN76972	RNA polymerase sigma factor RpoD , partial [<i>Streptomyces coelicoflavus</i> ZG0656]	1.14E-08	96
Sistemas de transporte de membrana	OWA52192	Trafficking protein particle complex subunit 9 [<i>Hypsibius dujardini</i>]	0.0150973	76
Chaperona	CXD04767 VFS22551	Survival protein SurA [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi] [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium]	2.00E-09 1.85E-09	100 100
Estrés	EHY77029	Catalase [<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 14405 = CCUG 16156]	1.25E-08	96
Metabolismo celular	RKP50220 KGM54814 TAH46738	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase [<i>Robbsia</i> sp. DHC34] [<i>Lysobacter daejeonensis</i> GH1-9] [<i>Gammaproteobacteria bacterium</i>]	1.80E-08 1.03E-08 1.56E-06	100 100 100
Transposasa	RIC35427 PQN25326	IS3 family transposase, partial [<i>Escherichia coli</i>] [<i>Shigella boydii</i>]	3.37E-08 1.40E-08	100 96
No clasificado	KXG31444	Hypothetical protein SORBI_3003G001000 [<i>Sorghum bicolor</i>]	1.97272	86
Estrés	PYG92412 PMX02950 RUZ32583 SFH08103	Cytochrome bo3 quinol oxidase subunit 1 apoprotein [<i>Acidovorax</i> sp. OV235] [<i>Pseudomonas</i> sp. FW215-L1] [<i>Mesorhizobium</i> sp. M7A.F.Ca.US.003.02.1.1] [<i>Pseudomonas</i> sp. NFACC45]	4.67E-07 5.15E-08 3.06E-06 2.99E-07	100 100 100 100
Antiapoptosis	ENW99433	NADH dehydrogenase (quinone), G subunit [<i>Acinetobacter</i> sp. ANC 3862]	1.14E-10	100
Formación de biofilms	WP_146641912	Molybdopterin-dependent oxidoreductase , partial [<i>Salmonella enterica</i>]	1.04E-08	96
No clasificado	WP_101022971	Hypothetical protein [<i>Helicobacter pylori</i>]	0.101065	91
Resistencia al ácido	WP_028751896 PST61764	Urease subunit alpha [<i>Rhizobium leucaenae</i>] [<i>Rhizobium</i> sp. SEMIA4064]	5.54E-07 8.09E-08	92 96
Metabolismo celular	PSG82987	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase , partial [<i>Escherichia coli</i>]	5.22E-07	100
Regulación	AWM61350 RRV18627 AZL74994 HCP30478	Sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator [<i>Pseudomonas stutzeri</i>] [<i>Pseudomonas</i> sp. p99-361] [<i>Pseudomonas entomophila</i>] [<i>Pseudomonas</i> sp.]	1.18E-08 2.19E-08 1.72E-07 3.53E-09	100 100 96 100
Regulación	PZO97642	RNA polymerase sigma factor , partial [<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>]	2.54E-06	100

	WP_072277429 KRW59438 KNP17001 KJY31055 HBD22662 WP_084622481	[Erwinia persicina] [Pseudomonas sp. TTU2014-080ASC] [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg] [Streptomyces katrae] [Dietzia sp.] [Demequina oxidasica]	0.0001215 41.27E-06 1.09E-07 3.26E-06 1.50E-05 2.21E-07	100 96 96 100 100 100
Estrés	EWM48708	Cytochrome C and Quinol oxidase polypeptide I family protein [Bordetella holmesii 41130]	2.78E-07	96
Antifagocitosis	<u>WP_116961862.1</u>	Glycosyl transferase [Haemophilus influenzae]	0.11	94
No clasificado	TRY84660	Hypothetical protein DNTS_004606, partial [Danionella translucida]	0.004905	75
Metabolismo celular	QCI20838 CSF36785 ACT06207	Chorismate synthase [Buchnera aphidicola (Hyperomyzus lactucae)] [Shigella sonnei] [Dickeya chrysanthemi Ech1591]	5.57E-08 1.73E-08 1.99E-08	100 100 100
Captura de Mg(2+)	HBQ80869 HAH13739	Magnesium-translocating P-type ATPase [Erwinia persicina] [Pantoea agglomerans]	4.30E-06 2.03E-06	92 100
No clasificado	WP_148164658	Sulfatase-like hydrolase/transferase, partial [Klebsiella pneumoniae]	1.69E-07	100
Metabolismo celular	POY68602	Pyruvate kinase PykF [Pantoea sp. PSNIH3]	2.58E-06	100
Regulación	WP_142915108	AMP-binding protein, partial [Klebsiella pneumoniae]	5.32E-08	100
Adherencia	WP_136682424 WP_017731675 SFA85328 GAE73057 VEI03508 SCC70952 AMW79448 GAE73057 PWC28906 AMW79448	Chaperonin GroEL [Rhodobacter sp. TJ48] [Nafulsella turpanensis] [Poseidonocella pacifica] [Cutibacterium acnes JCM 18916] [Acidipropionibacterium jensenii] [Acinetobacter albensis] [Acinetobacter sp. TGL-Y2] [Cutibacterium acnes JCM 18916] [Roseomonas aestuarii] [Acinetobacter sp. TGL-Y2]	4.62E-06 1.68E-06 1.40E-05 1.14E-06 1.47E-05 8.69E-06 1.34E-06 1.14E-06 4.56E-06 1.34E-06	100 100 100 100 96 96 100 100 100 100
No clasificado	RUS87792	Hypothetical protein EGW08_004457, partial [Elysia chlorotica]	0.0114651	88
Sistema de secreción	RZJ11932	AAA family ATPase, partial [Rubrivivax sp.]	2.14E-07	100
Supervivencia intracelular y replicación	KRC36288 KXU78603	DNA-binding protein [Acidovorax sp. Root219] [Aeromonas enteropelogenes]	0.0005049 27.30E-09	87 100

No clasificado	XP_025094203	LOW QUALITY PROTEIN: ionotropic receptor 25a-like [Pomacea canaliculata]	0.0005912 9	78
Endotoxina	PRJ00845	Lipooligosaccharide biosynthesis protein lex-1, partial [Haemophilus influenzae]	7.0035	77
Adherencia	PPA04122	Flagellar biosynthesis protein Flgl, partial [Pseudomonas sp. MWU12-2312b]	2.95E-06	100
Endotoxina	APU28689	Lipopolysaccharide core heptose(I) kinase RfaP [Pseudomonas alcaliphila JAB1]	8.00E-06	100
	ERH52971	[Pseudomonas chengduensis]	5.09E-05	100
Regulación	TNJ16759	U32 family peptidase [Aeromonas hydrophila]	1.73E-08	100
	WP_043762212	[Aeromonas taiwanensis]	1.92E-07	96
	TNI56639	[Aeromonas dhakensis]	1.03E-07	96
	OEE68992	[Enterovibrio norvegicus FF-33]	1.77E-07	92
	WP_039041124	[Aeromonas caviae]	3.82E-08	100
Adherencia	WP_146672512	Fimbria/pilus outer membrane usher protein, partial [Escherichia coli]	1.36E-07	100
Trasposón	CAO91755	Resolvase [Pseudomonas aeruginosa]	1.60E-08	100
Adherencia	ORO87360	Choline-binding protein [Streptococcus mitis]	3.47E-07	100
Invasión	SUH34456	Adenine-specific DNA-methyltransferase [Salmonella enterica subsp. enterica]	5.99E-07	100
	RPE01575	[Pantoea sp. RIT388]	3.38E-06	92
Endotoxina	TIR44370	3-deoxy-8-phosphooctulonate synthase, partial [Mesorhizobium sp.]	6.38E-09	96
Invasión	RWT36148	IMP dehydrogenase [Aeromonas caviae]	6.66E-05	96
	TNI53488	[Aeromonas veronii]	5.56E-06	100
	AUV12422	[Aeromonas sp. ASNIH3]	3.67E-05	92
	RAT17710	[Lonsdalea populi]	4.82E-08	100
Regulación	KAA5755490	CarD family transcriptional regulator, partial [Klebsiella pneumoniae]	1.11E-06	100
	KFC51952	[Micrococcus luteus]	6.69E-07	100
	TFI49523	[Micrococcus endophyticus]	9.34E-06	100
	RKH82095	[Corallococcus sp. CA031B]	3.02E-07	100
Metabolismo celular	WP_039040826	phosphoribosylamine--glycine ligase [Aeromonas caviae]	1.32E-05	100
	CDL45886	[Klebsiella pneumoniae ISC21]	1.49E-08	100
	PND82803	[Escherichia coli]	2.40E-08	100
Antifagocitosis	WP_130930924	Nucleotide sugar dehydrogenase, partial [Pseudomonas sp. Sample_24]	8.71E-07	100
Metabolismo celular	CSC61101	Carbamoyl phosphate synthase large subunit [Vibrio cholerae]	1.37E-09	100
	TNI61683	[Vibrio cholerae]	4.31E-06	100
	KIX23628	[Aeromonas media]	1.38E-06	100

	RDT62379 HAT07106	[Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida] [Klebsiella pneumoniae] [Aeromonas salmonicida]	2.27E-08 6.55E-06	92 96
Estrés	OXM25015	Heat-shock protein IbpA [Pantoea sp. AV62]	1.41E-07	100
Metabolismo celular	SQF65252	dTDP-glucose 4,6-dehydratase [Actinobacillus pleuropneumoniae]	2.08E-08	100
Endotoxina	EJN37242 ACA75338	Lipopolysaccharide heptosyltransferase II [Pseudomonas sp. GM84] [Pseudomonas putida W619]	2.03E-06 2.12E-05	100 96
Metabolismo celular	WP_038996247	MULTISPECIES: aspartate aminotransferase family protein [Pseudomonas]	2.24E-07	100
Síntesis de Biofilms	OKS72564 STT26342 ATI94035 ATI94035	Respiratory nitrate reductase subunit alpha [Escherichia coli] [Klebsiella pneumoniae] [uncultured bacterium] [uncultured bacterium]	2.09E-06 1.64E-07 1.43E-09 1.43E-09	96 100 100 100
Resistencia al ácido	CHF35840 PHP56670	Biosynthetic arginine decarboxylase [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi] [Staphylococcus aureus subsp. aureus]	2.02E-05 1.63E-06	96 100
Metabolismo celular	EKL05261 PVW89249 TKV09724 HAV04650 WP_077709645	Carbamoyl-phosphate synthase L chain, ATP binding domain protein, partial [Vibrio cholerae HC-17A1] [Klebsiella pneumoniae] [Citrobacter sp. TBCS-14] [Pseudomonas sp.] [Escherichia coli]	2.43E-08 3.43E-08 1.85E-08 2.31E-07 2.77E-08	100 100 100 96 100
Metabolismo celular	SDC49568 SDQ25627	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase beta subunit [Nocardioide lianchengensis] [Pseudoxanthomonas sp. CF125]	7.95E-07 6.98E-07	100 92
Metabolismo celular	OCJ30683 CNH31232 PHM25509	Formate acetyltransferase [Serratia sp. 14-2641] [Yersinia kristensenii] [Xenorhabdus budapestensis]	1.06E-08 2.65E-08 3.48E-08	100 96 96
Metabolismo celular	WP_149291543 PTM90343	Isocitrate lyase [Dietzia sp. ANT_WB102] [Dietzia psychrocaliphila]	3.47E-08 4.02E-08	100 100
Sistemas de secreción	AQZ35768 OWP51100	Type VI secretion system-associated protein [Pseudomonas sp. LPH1] [Pseudomonas nitroreducens]	8.45E-07 7.71E-07	100 100
Endotoxina	WP_042063660 KMK08935 EKB12474 TNJ15181	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase RfbA [Aeromonas allosaccharophila] [Pluralibacter gergoviae] [Aeromonas veronii AER39] [Aeromonas veronii]	1.45E-07 1.18E-07 3.54E-09 1.39E-08	100 100 100 100
Endotoxina	<u>WP_146168072.1</u> RFO52789	CMP-N-acetylneuraminate-beta-galactosamide-alpha-2, 3-sialyltransferase [Helicobacter pylori] [Haemophilus influenzae]	7.5 0.932882	86 83

Metabolismo celular	TXK82053	Transketolase [Pararheinheimera tangshanensis]	1.89E-09	100
Transposasa	WP_126313217	Tn3 family transposase [Delftia acidovorans]	1.08E-06	100
	STR67940	[Enterobacter cloacae]	1.12E-07	100
	HBV33779	[Delftia acidovorans]	3.82E-06	96
Estrés	SUB05729	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase slyD [Pantoea agglomerans]	3.02E-07	96
	TDY78228	[Pantoea allii]	3.22E-07	96
No clasificado	WP_020626693	Acetyl-CoA C-acyltransferase, partial [Pseudonocardia sp. P2]	2.71E-06	96
Adherencia	SUH01139	Autotransporter Misl [Salmonella enterica subsp. enterica]	1.31E-05	100
Estrés	HCP56235	RNA chaperone Hfq [Pseudomonas sp.]	1.89E-07	100
Metabolismo celular		Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring), homodimeric type		
	PAU91440	[Kocuria sp. WN036]	1.01E-08	96
	WP_129700559	[Kocuria carniphila]	3.33E-08	96
	PBB08347	[Kocuria sp. WRN011]	1.55E-06	96
Captura de hierro	<u>STV71588.1</u>	Iron aquisition versiniabactin synthesis enzyme (Irp2) [Klebsiella pneumoniae]	1.00E-06	100
Invasión	TSJ56889	GTP diphosphokinase [Atlantibacter subterranea]	1.91E-07	100
	RSE22102	[Atlantibacter subterranea]	2.81E-08	96
Endotoxina	KHL74662	ADP-heptose--LPS heptosyltransferase [Pseudomonas putida]	2.12E-05	96
Motilidad	STQ59166	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Pseudescherichia vulneris]	2.99E-06	96
	SAP75156	[Klebsiella oxytoca]	4.09E-09	100
Regulación	TCJ77266	UNVERIFIED_ORG: RNA polymerase nonessential primary-like sigma factor [Dietzia maris]	1.59E-05	100
Transposasa	<u>ABD94637.1</u>	Tn1721 resolvase [Pseudomonas aeruginosa]	2.00E-07	100
Adherencia y motilidad	RDC52508	Type IV pilus twitching motility protein PilT [Acinetobacter sp. RIT592]	2.69E-08	100
Metabolismo celular	WP_123928841	Type I glutamate--ammonia ligase [Corynebacterium choanis]	1.56E-07	100
	PWF24518	[Ancrocorticia populi]	2.56E-08	100
Regulación	STJ28848	DNA-binding transcriptional activator SdiA [Escherichia coli]	1.28E-07	100
Sistemas de secreción	RAR34102	Type II secretion system protein GspD [Pseudomonas sp. MDMC224]	1.88E-06	100
Transposasa	SAP71573	TnpA transposase [Klebsiella oxytoca]	0.00025786	92
Adherencia	STE86239	Fimbrial biogenesis outer membrane usher protein [Escherichia coli]	1.12E-07	100
Regulación	STJ79109	Formate hydrogenlyase transcriptional activator [Escherichia coli]	1.11E-06	100

Estrés	STS99616	Protein disaggregation chaperone [Klebsiella oxytoca]	5.18E-08	100
Supervivencia intracelular y replicación	TNI55781	Endopeptidase La [Aeromonas media]	7.30E-09	100
Supervivencia intracelular y replicación, escape del fagosoma,	STQ08234	Thiol:disulfide interchange protein DsbA [Enterobacter cloacae]	1.28E-07	100
Sistemas de secreción	KUE79875	Type II secretion system protein GspE [Aeromonas schubertii]	9.02E-05	96
Sistema toxina-antitoxina	STP16796	Putative RhuM-like cytoplasmic protein [Escherichia coli]	1.45E-05	96
Sistemas de secreción	EQM72583	General secretion pathway protein D [Pseudomonas stutzeri MF28]	0.00038021	96
Invasión	CCK16571	GTP pyrophosphokinase ppGpp synthetase II [Cronobacter universalis NCTC 9529]	4.89E-07	100
Estrés	EBP5694955	Peptidylprolyl isomerase [Salmonella enterica]	1.96E-06	96
Regulación	WP_149667072	Sigma-70 family RNA polymerase sigma factor, partial [Salmonella enterica]	4.74E-06	96
Captura de hierro	WP_051556746	Non-ribosomal peptide synthetase [Pseudomonas sp. CHM02]	9.72E-08	96
Sistema toxina-antitoxina	WP_032348249.1	Virulence RhuM family protein [Escherichia coli]	1.00E-05	96
Adherencia, Invasión	EBF1066957	Type 1 fimbriae D-mannose specific adhesin FimH [Salmonella enterica]	2.71E-07	100
Estrés	WP_146664569	AAA domain-containing protein, partial [Salmonella enterica]	3.48E-09	96
	WP_117260734	Klebsiella pneumoniae]	2.74E-08	92

AIRE TAQUILLA (12 y 26 de Noviembre)				
Tipo de FV (Función)	Acceso (s)	Descripción (Nombre y bacteria)	Valor E	% ID
Supervivencia intracelular y replicación	WP_115922952	Excinuclease ABC subunit UvrA [Calidifontibacter indicus]	1.90E-07	100
	GCE54474	[Capsulimonas corticalis]	4.79E-10	100
	KKO81850	[Corynebacterium xerosis]	7.91E-08	100
	AYJ33975	[Corynebacterium xerosis]	1.60E-06	96
	WP_114553383	[Cellulomonas sp. K42B]	1.57E-05	92
	WP_115922952	[Calidifontibacter indicus]	1.90E-07	100
	TNL99842	[Corynebacterium tapiri]	1.17E-05	100
	PWC01446	[Corynebacterium sp. 2189]	1.79E-05	100
Estrés	TAJ65329	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I [Variovorax sp.]	9.17E-07	100
	SUH39130	[Salmonella enterica subsp. enterica]	1.73E-07	100
	HCW59812	[Sphingobium sp.]	2.77E-06	100
	KIX16971	[Paracoccus sp. 228]	4.26E-07	100
Sistema de secreción	RZQ62673	Sec-independent protein translocase subunit TatB [Amycolatopsis sp. 8-3EHSu]	3.11E-05	91
	TDQ58468	[Actinomycetospira succinea]	1.18E-05	96

Sistema de secreción tipo VI	HBJ68418	Type VI secretion system contractile sheath small subunit [Alcaligenes faecalis]	2.09E-07	100
Supervivencia intracelular y replicación	WP_083798012 MBI28672	Endopeptidase La [Moritella sp. PE36] [Pelagibacteraceae bacterium]	1.37E-08 2.90E-08	100 100
Regulación y Adherencia	AIL96035	Crp/Fnr family transcriptional regulator [Corynebacterium ureicelerivorans]	2.83E-06	96
Adherencia	EIF37363	Endo-beta-N-acetylglucosaminidase domain protein [Streptococcus sp. SK643]	5.64E-07	96
Metabolismo celular	WP_146711480	Adenosylcobinamide-GDP ribazoletransferase, partial [Escherichia coli]	3.14E-07	100
Supervivencia intracelular y replicación	KNX36674 KYH45772	Dihydroxy-acid dehydratase [Luteipulveratus halotolerans] [Branchiobius sp. NY16-3462-2]	7.01E-07 2.33E-06	100 96
Transposasa	VGH00912 SWJ77120	Transposase TnpA, Tn21 [Klebsiella pneumoniae] [Klebsiella pneumoniae]	1.46E-09 1.02E-06	100 100
Adherencia	QBZ13357 COD31457	Teichoic acid phosphorylcholine esterase/choline binding protein E CbpE [Streptococcus mitis] [Streptococcus pneumoniae]	4.86E-07 4.96E-07	100 100
Formación de biofilms	WP_095171926 WP_087692834	MBOAT family protein [Pseudomonas sp. Irchel 3H3] [Pseudomonas sp. PE-S1G-1]	0.0001599 92.05E-05	96 100
Adherencia	ADV27330	Flagellar biosynthesis protein FlhA [Pseudoxanthomonas suwonensis 11-1]	1.61E-06	100
Regulación	STS84707 PLP18287 THD43795	RNA polymerase sigma factor RpoS [Klebsiella pneumoniae] [Klebsiella pneumoniae] [Enterobacteriaceae bacterium ML5]	0.0246688 0.0001061 82.39E-06	91 100 100
Supervivencia intracelular y replicación	POV92637	Two-component system response regulator OmpR [Aeromonas sp. ASNIH8]	2.46E-07	100
Metabolismo celular	ADR18917 AKC83213 EUA20454	Carbamoyl-phosphate synthase large subunit [Calditerrivibrio nitroreducens DSM 19672] [Verrucomicrobia bacterium IMCC26134] [Mycobacterium xenopi 4042]	7.00E-06 8.26E-06 1.05E-08	100 100 96
Sistema de secreción tipo VI	WP_068829935	Type VI secretion system tip protein VgrG [Xanthomonas translucens]	3.47E-06	96
Adherencia	SQD04559	Flagellum-specific ATP synthase [Escherichia coli]	9.96E-08	100
Metabolismo celular	WP_040216638	RdgB/HAM1 family non-canonical purine NTP pyrophosphatase [Haemophilus parahaemolyticus]	6.72E-06	100
Metabolismo celular	TBT84703	Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring), homodimeric type [Propionocyclava sinopodophylli]	4.19E-08	96
Adherencia	SAU93244	Uncharacterised protein [Klebsiella pneumoniae]	7.68651	89
Estrés	WP_112102711	Catalase	4.48E-07	100

	STO66682 ERI33000	[Haemophilus influenzae] [Haemophilus parahaemolyticus HK385] [Alcaligenes sp. EGD-AK7]	1.08E-06 3.92E-09	100 100
Adherencia	PQP74187 RZL55630 AGI18709 RMG25740 RAD65470 HBI46102 RAD65470	Molecular chaperone GroEL, partial [Mycobacterium sp. ITM-2016-00317] [Variovorax sp.] [uncultured bacterium] [Armatimonadetes bacterium] [Burkholderia multivorans] [Planctomycetales bacterium] [Burkholderia multivorans]	2.03E-07 7.52E-06 7.47E-07 0.0012241 3 5.41E-08 0.0045033 6 5.41E-08	100 96 100 83 96 83 96
Captura de Hierro	SAJ31053	Ferrienterobactin receptor [Enterobacter cloacae]	5.82E-08	100
Regulación	AXX27706 SJN15664 OYO24437	CarD-like transcriptional regulator [Actinosynnema pretiosum subsp. pretiosum] [Luteococcus japonicus LSP_Lj1] [Propionibacteriaceae bacterium NML 130396]	1.02E-05 2.66E-06 5.58E-07	96 92 96
No clasificado	TNN22434	Hypothetical protein EYF80_067452 [Liparis tanakae]	0.1149	74
Modulador de la respuesta inmune	RZU61487	GTP pyrophosphokinase [Zhihengliuella halotolerans]	6.68E-07	92
Resistencia al ácido	RZK37406	Urease subunit alpha, partial [Hymenobacter sp.]	2.81E-06	100
Resistencia al ácido	XP_020595694	Urease-like [Phalaenopsis equestris]	2.74E-06	96
No clasificado	OYU43274	Hypothetical protein CFE44_19315, partial [Burkholderiales bacterium PBB4]	0.0003826 5	87
Endotoxina	TCN41579	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase (KDO 8-P synthase) [Shinella granuli]	1.30E-07	100
Adherencia y motilidad	RZI70283 RJX83088 PZO92408	Type IV pilus twitching motility protein PilT [Pseudomonas sp.] [Pseudomonas sp. LS-2] [Acinetobacter johnsonii]	2.27E-05 1.25E-07 6.78E-07	92 100 100
Adherencia	PRL96445	Choline/ethanolamine kinase, partial [Haemophilus influenzae]	2.93053	85
Regulación	OLP82797	Protein NLRC3, partial [Symbiodinium microadriaticum]	0.327102	92
Metabolismo celular	ALC06392 KXO91125 AHI23227	Glutamine synthetase 1 [Corynebacterium deserti GIMN1.010] [Tsukamurella pseudospumae] [Corynebacterium vitaeruminis DSM 20294]	2.82E-08 2.53E-08 3.30E-08	100 100 100
Sistemas de transporte de membrana	OWA52192	Trafficking protein particle complex subunit 9 [Hypsibius dujardini]	0.0489224	82
Supervivencia intracelular y replicación	AWT25316 ALG83605 PZO99894	Isocitrate lyase [Corynebacterium provencense] [Gordonia phthalatica] [Corynebacterium urealyticum]	7.46E-07 3.02E-06 1.22E-06	100 100 96
Regulación	WP_130558855	ATP-dependent RNA helicase HrpA [Pasteurella multocida]	6.62E-09	100

	ABP80601 AQZ34425	[Pseudomonas stutzeri A1501] [Pseudomonas sp. LPH1]	4.40E-08 2.10E-05	100 100
Metabolismo celular	WP_068785137 EES72890	Formate C-acetyltransferase [Paenibacillus phocaensis] [Paenibacillus sp. oral taxon 786 str. D14]	3.56E-07 6.34E-07	100 100
Metabolismo celular	TNM62422	Proline—tRNA ligase [Streptomyces sp. NP160]	1.40E-05	100
Endotoxina	AUH33608 EBQ2452783	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase [Paracoccus sp. BM15] [Salmonella enterica]	4.25E-06 4.06E-07	100 96
No clasificado	COV57024	Uncharacterised protein [Mycobacterium tuberculosis]	8.9264	73
Regulación	OAY00218	DNA-binding response regulator [Cutibacterium acnes]	9.27E-08	100
Endotoxina	PRM59938 PRK49234	Lipooligosaccharide biosynthesis protein lex-1 , partial [Haemophilus influenzae] [Haemophilus influenzae]	0.338296 0.979879	78 79
Captura de Hierro	VTP64993	Ferric enterobactin transport system permease protein fepD [Leclercia adecarboxylata]	0.0002097 5	96
Captura de Hierro	HAF52443	Fe(3+)-siderophore ABC transporter permease [Leclercia adecarboxylata]	0.0001473	96
Regulación	PQN48368 STF44020	DNA polymerase IV , partial [Shigella dysenteriae] [Escherichia coli]	1.28E-09 3.87E-09	100 100
Metabolismo celular	KJK08426 RKT77716	Pyruvate dehydrogenase [Terrabacter sp. 28] [Terracoccus luteus]	1.49E-06 7.52E-07	96 100
Captura de Hierro	POW73179	Iron-enterobactin transporter [Leclercia sp. LSNIH4]	0.0002204 7	96
Antifagocitosis	HAG35371 RYG96623	Acyl carrier protein [Erythrobacter sp.] [Alphaproteobacteria bacterium]	1.31E-05 2.41E-05	96 96
Metabolismo celular	WP_068312983 WP 045388445	dTDP-glucose 4,6-dehydratase [Pseudoruegeria sabulilitoris] [Falsirhodobacter sp. alg1]	6.31E-07 7.30E-07	100 92
Metabolismo celular	KGN42799 KUG52992	Phosphoserine phosphatase [Knoellia aerolata DSM 18566] [Kocuria polaris]	0.0002825 9 5.41E-05	96 92
Metabolismo celular	VEH79403	6-phosphofructokinase [Corynebacterium kutscheri]	1.37E-06	100
Supervivencia intracelular y replicación	SMO46343	Two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase MprB [Dietzia schimae]	7.29E-08	100
Metabolismo celular	PAV48724	cobyrinic acid a,c-diamide synthase [Pseudomonas sp. HAR-UPW-AIA-41]	4.49E-06	100
No clasificado	TWW78006	hypothetical protein D4764_11G0001270 [Takifugu flavidus]	0.0007001 1	92
metalo peptidasa de zinc	PYG98229	zinc metallo peptidase RseP , partial [Arthrobacter stackebrandtii]	3.53E-09	96
Regulación	CDL33295 HBX05921	Glutaredoxin-like protein [Enterobacter cloacae ISC8] [Leclercia adecarboxylata]	1.16E-07 1.04E-06	100 92

Regulación	TWH19602	RNA polymerase nonessential primary-like sigma factor [Prauserella rugosa]	0.00015958	88
No clasificado	WP_122818161	MULTISPECIES: acetyl-CoA C-acetyltransferase [unclassified Nocardioide]	6.06E-06	92
No clasificado	TMS15648	Hypothetical protein E3U43_022110 [Larimichthys crocea]	3.88116	70
Captura de Hierro	WP_139323406	Polyketide synthase , partial [Roseomonas sp. TAS13]	2.37E-07	100
Regulación	WP_146738919 TFV53206 WP_084956158 GEL19627	Sigma-70 family RNA polymerase sigma factor , partial [Bacillus cereus] [Blastococcus sp. TF02A_35] [Thermoactinospira rubra] [Pseudonocardia asaccharolytica DSM 44247 = NBRC 16224]	2.84E-05 0.00032942 1.60E-05 0.00082654	96 92 96 88
Captura de Hierro	WP_042247534	SDR family oxidoreductase [Paracoccus sp. PAMC 22219]	7.31E-06	100
Sistemas de transporte de membrana	EHL97958	ABC 3 transport family protein [Acetobacteraceae bacterium AT-5844]	0.00260297	76
Metabolismo celular	VDY79618	Pyruvate kinase I [Escherichia coli]	1.11E-07	100
No clasificado	PAA50966	Hypothetical protein BOX15_Mlig000188g4 , partial [Macrostomum lignano]	0.0268619	83
Supervivencia intracelular y replicación	WP_027504160 TJV91222	AAA family ATPase [Rhodococcus sp. UNC23MFCrub1.1] [Mesorhizobium sp.]	1.02E-06 5.87E-07	96 100
Secuestro de antibióticos	STM39708	Dihydroorotate dehydrogenase 2 [Escherichia coli]	5.19E-08	100
Regulación	GAE71889	Phosphate regulon transcriptional regulatory protein PhoB [Cutibacterium acnes JCM 18916]	9.54E-09	100
Adherencia y motilidad	EXC32955	Twitching mobility domain protein [Acinetobacter sp. 869535]	1.68E-06	96
Metabolismo celular	WP_125569799	Acyl-CoA dehydrogenase [Nocardioide baekrodamisoli]	1.66E-05	83
Regulación	WP_033685510	LytR family transcriptional regulator [Streptococcus mitis]	5.15E-06	100
Captura de Hierro	ATR22361	Beta-ketoacyl synthase [Roseomonas sp. FDAARGOS_362]	1.43E-06	96
Antiapoptosis	STF40482	NADH-quinone oxidoreductase subunit G [Escherichia coli]	1.10E-08	100
Metabolismo celular	SZE95079	Prolyl-tRNA synthetase [Quadrifera granulorum]	0.00013397	96
No clasificado	TWW61068	Tenascin [Takifugu flavidus]	0.0934973	83
Invasión	STM10671	Outer membrane porin protein C [Escherichia coli]	7.14E-09	100
Evasión del sistema inmune	KYL19530	Glycosyl transferase family protein , partial [Mannheimia haemolytica]	0.130515	90
Transportador de membrana	RMI00328	maltose/maltodextrin ABC transporter ATP-binding protein MalK [Pseudomonas sp. GL14]	2.92E-07	100

Transportador de membrana	WP_034649075	Sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter ATP-binding protein UgpC [Corynebacterium vitaeruminis]	1.79E-06	96
	WP_018297398	[Corynebacterium lubricantis]	3.49E-06	88
	WP_034650966	[Corynebacterium vitaeruminis]	7.15E-06	100
	CBN86638	Putative LicA [Neisseria lactamica 020-06]	0.0819862	78
Adherencia	PZQ29915	Flagellum-specific ATP synthase Flil, partial [Pseudomonas oleovorans]	3.51E-07	100
	PXB93492	[Pseudomonas aeruginosa]	3.60E-08	100
No clasificado	XP_012562310	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105847340, partial [Hydra vulgaris]	0.438389	83
Regulación	SQB99188	Adenine specific DNA methyltransferase [Helicobacter fennelliae]	3.25921	82
No clasificado	WP_127782916	Proteasome ATPase [Rhodococcus sp. X156]	1.53E-08	100

Hospital 12 Noviembre (12 y 26 de Noviembre)				
Tipo de FV (Función)	Acceso	Descripción (Nombre y bacteria)	Valor E	% ID
Adherencia y motilidad	TSE36657	Flagellum-specific ATP synthase [Tepidimonas fonticaldi]	1.12E-07	100
		Type I glutamate--ammonia ligase [Roseomonas aerilata] [Ancrocorticia populi]	1.09E-08 3.83E-09	100 100
Metabolismo celular	WP_043837516 PWF24518	Fis family transcriptional regulator, partial [Pseudomonas lundensis] [Pseudomonas prosekii] [Pseudomonas syringae pv. actinidiae ICMP 19070] [Pseudomonas oleovorans]	1.27E-07 9.25E-07 3.68E-07 1.82E-06	100 100 96 100
		Tn3 family transposase, partial [Streptococcus pyogenes] [Klebsiella pneumoniae] [Escherichia coli]	1.32E-07 7.21E-07 5.49E-10	100 100 100
Transposasa	RJK92297 WP_142243509 WP_139497082	CFI/II fimbrial subunit C usher protein [Klebsiella pneumoniae] [Klebsiella pneumoniae]	1.00E-07 2.25E-07	100 100
		NADH-quinone oxidoreductase subunit G [Antriccoccus suffusus] [Pseudomonas dryadis] [Escherichia coli] [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Montevideo]	2.00E-09 3.87E-09 1.64E-06 1.83E-06 0.00082684	92 96 100 100 100

		[Escherichia coli]		
Metabolismo celular	WP_028033237 OMG25214	Maltose alpha-D-glucosyltransferase [Chelativorans sp. J32] [Actinomyces naeslundii]	3.57E-09 2.95E-06	100 100
Metabolismo celular	ORV87297	N-acetylglutamate synthase [Mycolicibacterium iranicum]	0.00011663	100
Sistema de secreción	TYN54106	EscU/YscU/HrcU family type III secretion system export apparatus switch protein, partial [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium]	5.57E-06	100
Metabolismo celular	AZD63489 RLZ62868 HBT58553 QBP88997 TKF22103	Transketolase [Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca] [Klebsiella pneumoniae] [Pseudomonas sp.] [Escherichia coli] [Vibrio kanaloae]	2.02E-08 1.79E-06 6.72E-08 0.00040963 4.01E-09	100 92 100 83 96
Regulación	TIT85125 HAF72017 WP_137781206 WP_134521552 WP_141551581 HAF72017	Sigma-70 family RNA polymerase sigma factor, partial [Mesorhizobium sp.] [Corynebacterium variabile] [Micromonosporaceae bacterium KJ-029] [Pseudomonas aeruginosa] [Bacillus] [Corynebacterium variabile]	1.96E-07 2.90E-08 1.20E-07 6.17E-07 1.10E-08 1.42E-07	100 100 100 100 100 100
Metabolismo celular	GEO40492 RIJ67414 AMD87927 ALC99277 PIP40819 RKV68609 CCH24767 RKV68609 BAO80593 RKV68609	Carbamoyl-phosphate synthase (glutamine-hydrolyzing) [Skermanella aerolata] [Brevundimonas sp. LPMIX5] [Actinomyces radidentis] [Actinomyces sp. oral taxon 414] [Candidatus Desantisbacteria bacterium] [Actinomyces sp.] [Corynebacterium glutamicum K051] [Actinomyces sp.] [Serpentinomonas raichei] [Actinomyces sp.]	8.27E-09 1.00E-06 3.41E-07 8.22E-07 4.15E-05 8.22E-07 1.06E-06 4.46E-06 4.34E-09 8.22E-07	100 100 100 100 96 100 100 100 100 100
Transposasa	ERB25598	Insertion element IS1 6 protein insB, partial [Escherichia coli UMEA 3151-1]	1.07E-09	100
Supervivencia intracelular y replicación	PMH78601 HBR83967 WP_114912642 RYH11485 RRJ19714 RVT45816 WP_108502872 TKW64157 HAI68087	Endopeptidase La [Vibrio sp. 10N.286.48.B7] [Erythrobacter sp.] [Acidibrevibacterium fodinaquatile] [Alphaproteobacteria bacterium] [Pararheinheimera mesophila] [Rheinheimera sp. YQF-1] [Paracoccus sp. IO390502] [Paracoccus denitrificans] [Gammaproteobacteria bacterium]	5.90E-06 3.64E-07 4.60E-07 1.52E-06 4.15E-05 1.72E-05 5.56E-06 5.56E-06 3.01E-09	100 100 96 100 96 96 100 100 100
Transporte de Zinc	PLL59106	Zinc ABC transporter ATP-binding protein ZnuC, partial [Klebsiella pneumoniae]	2.97E-08	100
Sistemas de transporte de membrana	OWA52192	Trafficking protein particle complex subunit 9 [Hypsibius dujardini]	4.99E-05	92

Estrés	PMC12547	Hypothetical protein CJ207_21910, partial [Klebsiella aerogenes]	1.80E-05	92
Captura de Hierro	CNT56645	Uncharacterised protein [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Bovismorbificans]	5.01E-07	100
Síntesis de Biofilms	VDZ99451 GDC36424	Colanic acid biosynthesis protein wcaM [Salmonella enterica subsp. enterica] [Escherichia coli]	1.12E-06 7.69E-07	96 100
Supervivencia intracelular y replicación	PZP24083 OLO71426 WP_111835971	RNA degradosome polyphosphate kinase [Cutibacterium granulosum] [Actinomyces oris] [Actinomyces]	5.73E-07 2.93E-09 4.67E-10	100 100 100
Metabolismo celular	EEG27515	Biotin synthase [Corynebacterium matruchotii ATCC 33806]	4.81E-08	100
Transportador transmembrana	TKW65621.1 WP_141748311	ATP-binding cassette domain-containing protein [Cutibacterium acnes] [Corynebacterium sp. HMSC071F07]	1.00E-06 1.11E-06	100 100
Adherencia	ECD1371618	Flagellar basal body rod protein FlgC [Salmonella enterica subsp. enterica]	8.86E-07	100
Transporte de Zinc	PLL59106 RCJ98647	zinc ABC transporter ATP-binding protein ZnuC, partial [Klebsiella pneumoniae] [Klebsiella pneumoniae]	2.97E-08 1.54E-05	100 92
Estrés	SFS05603 WP_026409528 OMG07177	Superoxide dismutase, Fe-Mn family [Dyella sp. OK004] [Actinomyces dentalis] [Actinomyces naeslundii]	1.64E-07 4.35E-06 6.25E-07	96 100 100
Supervivencia intracelular y replicación	STP79119 VED12718 VTM30240	DNA-binding ATP-dependent protease La [Escherichia coli] [Escherichia coli] [Klebsiella pneumoniae]	1.11E-05 5.25E-07 1.05E-06	96 100 96
Metabolismo celular	EKB20176 RKJ89860	dTDP-glucose 4,6-dehydratase [Aeromonas veronii AMC34] [Aeromonas veronii]	1.02E-07 1.43E-05	100 92
Supervivencia intracelular y replicación	WP_141453510 ADZ57047 TKV60652 TMJ17322 OED58899 TKV60652 WP_141751924 TMJ17322 WP_136193107 EJL71058 KQX37809	Excinuclease ABC subunit UvrA [Pseudoxanthomonas sp. z9] [Cutibacterium acnes subsp. defendens ATCC 11828] [Nakamurella sp. N5BH11] [Alphaproteobacteria bacterium] [Acholeplasma laidlawii] [Nakamurella sp. N5BH11] [Propionibacterium sp. HMSC069G10] [Alphaproteobacteria bacterium] [Actinomyces sp. dk752] [Variovorax sp. CF313] [Variovorax sp. Root434]	1.02E-07 1.20E-07 2.27E-07 4.38E-09 2.97E-06 2.27E-07 9.08E-07 4.38E-09 0.00068465 1.21E-09 1.19E-09	100 100 100 100 100 100 96 100 88 100 100
Adherencia	EAP3490736	Autotransporter outer membrane beta-barrel domain-containing protein [Salmonella enterica]	1.59E-05	100
Síntesis de Biofilms	SNR62320	Nitrate reductase alpha subunit [Paracoccus sediminis]	7.43E-08	100
Adherencia	TCI87322 AAK32145 MAL00533	Chaperonin GroEL [Arachidicoccus sp. B3-10] [Flavobacterium hydatis]	1.14E-06 6.37E-06 2.97E-08	100 100 100

	HBP66380	[Citromicrobium sp.] [Desulfosporosinus sp.]	6.01E-08	96
Metabolismo celular	RFC89077	Bifunctional pyruvate/2-ketobutyrate formate lyase, partial [Klebsiella pneumoniae]	2.40E-08	100
Captura de Hierro	VTO16942	TonB-dependent receptor [Klebsiella pneumoniae]	5.32E-07	100
Adherencia y motilidad	KJJ15251	Twitching motility protein [Neisseria sp. HMSC06F02]	5.14E-09	100
Regulación	STU62083	RNA polymerase sigma factor RpoS [Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae]	1.40E-08	100
Invasión	QDY41557	Porin OmpA [Pantoea dispersa]	6.41E-08	100
Invasión	OVE60043	Hypothetical protein B0E34_04555, partial [Chryseobacterium mucoviscidosis]	1.02E-07	100
Captura de Hierro	STV67980	Ferric enterobactin transport system permease FepD [Klebsiella pneumoniae]	3.53E-09	100
Metabolismo celular	RYX90144	Phosphomannomutase/phosphoglucomutase [Comamonadaceae bacterium]	2.18E-07	100
Sistema de secreción	TBU76034	Type VI secretion system baseplate subunit TssF [Pseudomonas daroniae]	1.20E-08	100
Regulación	PMH43855	RNA polymerase sigma factor RpoE [Vibrio sp. 10N.286.49.B3]	4.50E-09	100
	TYA91275	[Vibrio cholerae]	1.16E-07	92
	PMH43855	[Vibrio sp. 10N.286.49.B3]	1.34E-08	96
Estrés	WP_056415517.1	ATP-dependent ClpB protease ATP-binding subunit [Microbacterium sp. Root553]	4.00E-07	100
	OYQ65799	[Aerococcus sp. 1KP-2016]	2.51E-07	100
	AYA68290	[Acinetobacter sp. WCHA55]	4.09E-07	100
	KRO96669	[SAR86 cluster bacterium BACL1 MAG-120828-bin5]	7.17E-08	100
	EIK84127	[Gardnerella vaginalis 1500E]	4.25E-07	100
	CQR72659	[Sporomusa sp. An4]	3.03E-06	100
	OJX08772	[Burkholderiales bacterium 70-64]	2.28E-07	100
	TGH91149	[Escherichia coli]	8.59E-07	92
	CPW26158	[Mycobacteroides abscessus]	2.71E-06	96
Transportador transmembrana	WP_113260223	Sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter ATP-binding protein UgpC [Rhizobiales bacterium]	2.42E-05	96
	QDO87625	[Ornithinimicrobium sp. H23M54]	0.0074191	79
	OBJ70741	[Mycobacterium sp. 1274756.6]	1.09E-07	100
	WP_141748312	[Corynebacterium sp. HMSC071F07]	3.91E-06	96
	EEC56314	[[Bacteroides] pectinophilus ATCC 43243]	1.02E-06	100
Metabolismo celular	SQC42406	Formate acetyltransferase 3 [Klebsiella pneumoniae]	7.39E-09	100
	EJN83508	[Actinomyces naeslundii str. Howell 279]	1.02E-07	100
	VTR63499	[Actinobacillus pleuropneumoniae]	1.69E-07	100
Metabolismo celular	SCY24281	Chorismate synthase [Paracoccus tibetensis]	1.65E-07	100
Regulación	TIO99780	RNA polymerase sigma factor RpoD, partial [Mesorhizobium sp.]	2.06E-07	100
No clasificado	XP_025094203	LOW QUALITY PROTEIN: ionotropic receptor 25a-like	7.84E-05	87

		[Pomacea canaliculata]		
No clasificado	WP_146664324	YjbH domain-containing protein, partial [Escherichia coli]	1.49E-09	100
No clasificado	RGU35072	Acyltransferase [Ruminococcus sp. AF17-22AC]	0.0043157	82
Invasión	AUP76190	Hypothetical protein CWS02_00700 [Enterobacter sp. EA-1]	5.69E-08	100
No clasificado	PAA50966	Hypothetical protein BOX15_Mlig000188g4, partial [Macrostomum lignano]	0.0476648	79
Metabolismo celular	PLO63944	Pyruvate kinase, partial [Klebsiella michiganensis]	4.22E-07	100
Supervivencia intracelular y replicación	RVR17672	Two-component sensor histidine kinase BarA, partial [Escherichia coli]	8.74E-08	100
Transposasa	BAV17795	Mobile element protein [Klebsiella pneumoniae]	1.02E-06	92
Captura de Hierro	TFV78577	Iron ABC transporter permease [Blastococcus sp. CT_GayMR19]	1.32E-05	96
Transportador transmembrana	OAK70187	Sugar ABC transporter ATP-binding protein [Bacillus galactosidilyticus]	1.46E-06	100
	EJN85335	[Actinomyces naeslundii str. Howell 279]	5.15E-09	100
	RAF22019	[Burkholderia multivorans]	2.15E-07	100
Invasión	WP_122504383	HD domain-containing protein, partial [Bacillus velezensis]	4.26E-08	100
No clasificado	TXK81097	RidA family protein [Pararheinheimera tangshanensis]	8.02E-09	100
Endotoxina	PRK36737	Lipooligosaccharide biosynthesis protein lex-1 [Haemophilus influenzae]	0.0102651	92
Estrés	STD18361	Carbon starvation protein CstA [Enterobacter asburiae]	7.77E-06	100
Estrés	WP_141775277	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) [Cellulomonas sp. SLBN-39]	8.71E-05	96
	WP_029212831	[Arsenicicoccus bolidensis]	1.73E-08	100
	VEI99347	[Corynebacterium matruchotii]	1.06E-05	100
	ALC98409	[Actinomyces sp. oral taxon 414]	7.99E-08	100
	OMG22159	[Actinomyces naeslundii]	1.24E-07	100
Supervivencia intracelular y replicación	GDX59939	Lon protease [Nitrosomonadaceae bacterium]	0.00759345	83
No clasificado	OLP82576	Calcium-dependent protein kinase 13 [Symbiodinium microadriaticum]	0.86538	70
Estrés	MCI47637	Chaperone protein ClpB1-like [Trifolium medium]	2.13E-06	96
Estrés	SEP36484	Cytochrome bo3 quinol oxidase subunit 1 apoprotein [Rhodospirillales bacterium URHD0017]	3.64E-06	96
Estrés	VEG75662	Proteasomal ATPase [Actinomyces slackii]	5.75E-10	100
Supervivencia intracelular y replicación	KRN90324	Preprotein translocase subunit SecA [Lactobacillus ceti DSM 22408]	8.75E-08	100
	OTE88233	[Escherichia coli]	2.67E-06	100
Regulación	EUA24726	Bacterial regulatory s, gntR family protein [Mycobacterium xenopi 3993]	1.51E-06	96
Regulación	HCB03147	RNA polymerase sigma factor	6.59E-07	100

	HAF71720 BAM27640 WP_026377909 RSS91835 PZS16382 AAK59987	[Nocardioide bacterium] [Corynebacterium variabile] [Nocardioide litoris] [Aestuariimicrobium kwangyangense] [Streptomyces sp. WAC05950] [Pseudonocardiales bacterium] [Corynebacterium ammoniagenes]	1.25E-08 2.19E-05 3.68E-10 2.74E-06 1.26E-06 1.49E-06	100 100 100 100 100 100
Metabolismo celular	WP_051285571	Type I pantothenate kinase [Actinomyces dentalis]	4.15E-06	100
Adherencia	AQW44824 ESP63162	Autolysin, partial [Streptococcus pneumoniae] [Streptococcus pneumoniae BHN237]	6.88E-08 1.56E-07	100 96
Estrés	KRD45890 WP_026408622 TML95451	Proteasome ATPase [Oerskovia sp. Root918] [Actinomyces dentalis] [Actinobacteria bacterium]	3.23E-05 8.87E-07 1.00E-07	87 92 100
Regulación	HAQ25580	U32 family peptidase [Pseudomonas sp.]	1.25E-08	92
gen de resistencia a aminoglucósidos	CPR26156	Streptomycin 3'-O-adenylyltransferase @ Spectinomycin 9-O-adenylyltransferase [Vibrio cholerae]	1.37E-08	100
Regulación	WP_026409409 PFG19300	Signal recognition particle-docking protein FtsY [Actinomyces dentalis] [Serinibacter salmoneus]	4.56E-07 9.13E-07	100 96
Estrés	4MMK_L	Chain L, Protein Hfq [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	1.85E-08	100
Metabolismo celular	PZP02134	Inositol-3-phosphate synthase [Corynebacterium urealyticum]	1.89E-07	100
Estrés	KZO60129	Alkyl hydroperoxide reductase [Dietzia maris]	3.46E-06	100
No clasificado	RJF43192 TSD57822	DUF3117 domain-containing protein [Actinomyces sp. 2119] [Aeromicrobium sp. Co35]	1.40E-06 0.00037429	100 100
Conjugación	CYA66670	DNA segregation ATPase-like protein [Staphylococcus aureus]	1.31E-10	100
Síntesis de biofilms	WP_080462317	Serine/threonine protein kinase [Actinomyces gaoshouyii]	1.79E-07	100
Adherencia	RXV72118	Flagellar basal-body rod protein FlgF [Burkholderia stabilis]	2.07E-05	100
Supervivencia intracelular y replicación	WP_034995602	Accessory Sec system translocase SecA2 [Corynebacterium matruchotii]	0.0001133	100
Sistema de secreción tipo II	WP_054006543	Type II secretion system protein GspE [Pseudorhodobacter psychrotolerans]	3.48E-07	100
Invasión	WP_068830274 TXH95512 HCG40140 PKF70288	Flagellar motor stator protein MotA [Pseudomonas sp. BMS12] [Pseudomonas sp.] [Pseudomonas sp.] [Pseudomonas sp. ZYSR67-Z]	1.67E-06 1.63E-05 1.43E-06 1.38E-05	100 100 100 100
Metabolismo celular	KWX08766 AVM61434 RKW24434 EFM48978	Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring), homodimeric type [Streptomyces thermoautotrophicus] [Actinomyces sp. oral taxon 897]	1.30E-08 1.01E-09 1.00E-07 1.31E-08	100 100 100 100

	BAC18953	[Corynebacterium sp.] [Corynebacterium matruchotii ATCC 14266] [Corynebacterium efficiens YS-314]	2.31E-08	100 100
Adherencia	SUB33592	Autotransporter adhesin [[Pasteurella] mairii]	0.137643	83
Endotoxina	MBG20537	3-deoxy-8-phosphooctulonate synthase [Rhizobiales bacterium]	1.05E-08	100
Metabolismo celular	AEI09737	6-phosphofructokinase [Corynebacterium resistens DSM 45100]	1.24E-06	100
Regulación y Adherencia	VEI98726 OMG29961 PXC09247	CRP/Fnr family transcriptional regulator [Corynebacterium matruchotii] [Actinomyces naeslundii] [Pseudomonas aeruginosa]	5.66E-07 1.33E-05 1.21E-06	100 100 100
Síntesis de biofilms	RQX47324	Poly-beta-1,6 N-acetyl-D-glucosamine synthase [Staphylococcus capitis]	4.02E-07	100
Transposasa	CDI01129	Transposase (fragment) [Candidatus Competibacter denitrificans Run_A_D11]	1.28E-05	100
Regulación	PRC50123	RNA polymerase sigma factor SigE, partial [Mycobacterium sp. ITM-2017-0098]	6.22E-05	95
Metalloendopeptidasas	KJJ60204	O-sialoglycoprotein endopeptidase [Corynebacterium diphtheriae]	2.90E-06	100
Metabolismo celular	AVZ39941	Dolichyl-phosphate-mannose--protein mannosyltransferase [Dietzia sp. JS16-p6b]	1.58E-07	100
Estrés	CSO55163	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [Shigella sonnei]	0.32692	100
Estrés	WP_127956466	Transcription antiterminator/RNA stability regulator CspE [Yersiniaceae bacterium ZS-11]	8.09E-08	100
Metaloenzimas	GEO94331	Carbonate dehydratase [Kocuria turfanensis]	5.18E-07	100
Supervivencia intracelular y replicación	WP_138275065	Dihydroxy-acid dehydratase [Candidatus Rhodoluna limnophila]	2.88E-07	100
Captura de Hierro	ANE05035 AGG67838	Polyketide synthase [Corynebacterium crudilactis] [Corynebacterium callunae DSM 20147]	4.90E-06 1.15E-06	100 100
Metabolismo celular	EJF36761 BAV85560	Glutamine synthetase, type I [Actinomyces massiliensis F0489] [Actinomyces naeslundii]	9.70E-08 2.83E-08	100 96
No clasificado	OAE20002	Hypothetical protein AXG93_17s1010 [Marchantia polymorpha subsp. ruderalis]	7.7243	60
Adherencia y motilidad	HAC27986	Type IV-A pilus assembly ATPase PilB [Marinobacter hydrocarbonoclasticus]	3.01E-06	96
Defensa contra el sistema inmune del hospedero	QBR93938	Nucleoside-diphosphate kinase [Nocardioide sp. MMS17-SY117]	2.62E-09	100
Metabolismo celular	WP_123959019	MULTISPECIES: biotin synthase BioB [Corynebacterium]	2.00E-09	100
Regulación	VEG73986	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta nrdF2 [Actinomyces slackii]	5.52E-07	100
Antifagocitosis	STO61574	Glycosyltransferase (pseudogene)	0.211622	87

		[Haemophilus aegyptius]		
Metabolismo celular	KOU01274	Trehalose synthase, partial [Streptomyces sp. NRRL F-4711]	2.87E-09	92
No clasificado	WP_142994966	Hypothetical protein, partial [Klebsiella pneumoniae]	1.14E-06	100
No clasificado	PAA50966	Hypothetical protein BOX15_Mlig000188g4, partial [Macrostomum lignano]	0.0309594	88
Conjugación	WP_058439376.1	DEAD/DEAH box helicase [Dehalogenimonas alkenigignens]	4.00E-07	96
Estrés	VEI99766	Heat-inducible transcription repressor hrcA [Corynebacterium matruchotii]	3.35E-06	100
Transportador de membrana	VEB52508	C4-dicarboxylate transporter DctA [Salmonella enterica subsp. enterica]	7.15E-08	100
Endotoxina	WP_118793596	CMP-Neu5Ac--lipooligosaccharide alpha 2-3 sialyltransferase [Haemophilus influenzae]	0.197259	88
Estrés	AXX29628	Bacterial proteasome-activating AAA-ATPase (PAN) [Actinosynnema pretiosum subsp. pretiosum]	3.70E-07	100
Metabolismo celular	RKW24407	Acetolactate synthase large subunit [Corynebacterium sp.]	2.77E-06	100
Adherencia	PYD87681	Flagellar protein export ATPase Flil [Pseudomonas syringae pv. pisi]	1.63E-06	96
Metabolismo celular	EWY38891	Alpha-amylase [Skermanella stibiensis SB22]	1.14E-07	96