

ESTUDIO DEL RESISTOMA DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS EN EL CONDADO DE TURKANA (KENIA)

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL Y MICROBIOLOGÍA

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

Autor: Pablo Fiel Berbejal

Tutora: Consuelo Ferrer Rodríguez

Cotutores: M^a Francisca Colom Valiente y Mario López

Pérez Curso académico: 2023-2024

Convocatoria: ordinaria

Índice

1. Resumen y Palabras Clave	3
2. Introducción	4
3. Antecedentes, Hipótesis y Objetivos	9
4.1. Antecedentes	9
4.2. Hipótesis	10
4.3. Objetivos	10
4. Materiales y Métodos	11
4.1. Diseño del estudio	11
4.2. Consideraciones éticas	11
4.3. Procesado de las muestras y obtención de los aislamientos	11
4.4. Identificación microscópica y estudio de sensibilidad <i>in vitro</i> (SiV)	12
4.5. Identificación taxonómica de los aislados	12
4.6. Secuenciación y Análisis Bioinformático	14
5. Resultados	16
5.1. Calidad de la secuenciación e identificación genómica	16
5.2. Estudio del resistoma	17
5.3. Correlación entre el fenotipo y el resistoma	21
6. Discusión	21
7. Conclusiones	27
8. Proyección Futura	28
9. Bibliografía	28

1. Resumen y Palabras Clave

Introducción: La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una importante amenaza para la salud pública mundial, aunque su incidencia es mayor en regiones menos desarrolladas, como el condado de Turkana en Kenia. El objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de RAMs en microorganismos aislados en pacientes de Turkana. **Materiales y Métodos:** Se llevó a cabo un estudio observacional, multicéntrico y prospectivo. En primer lugar, los aislados se identificaron mediante aproximaciones fenotípicas y moleculares y se estudió su sensibilidad antimicrobiana *in vitro*. A continuación, se secuenció el genoma de cepas seleccionadas y se comparó con la base de datos CARD (*Comprehensive Antimicrobial Resistance Database*) para obtener el resistoma. **Resultados:** Se secuenciaron 13 cepas de 8 especies diferentes, revelando 211 genes de resistencia a antimicrobianos (ARGs) diferentes. Los ARGs frente a quinolonas, betalactámicos y tetraciclinas constituyeron más del 45% del total y el 65,35% estaban asociados al eflujo de antibióticos. Finalmente, la correlación entre el genotipo y el fenotipo varió notablemente en función del tipo de antibiótico estudiado. **Discusión:** Los resultados mostraron una alta presencia de múltiples genes de resistencia, lo que se traduce en un mayor potencial de transferencia génica horizontal a otros patógenos. Sin embargo, para obtener una imagen más precisa y establecer medidas para un uso correcto y eficaz de los antibióticos, es necesario ampliar el número de aislados estudiados.

Palabras clave: resistoma, resistencia, antibiótico, Turkana, secuenciación, genoma.

Abstract

Introduction: Antimicrobial resistance (AMR) is a significant threat to global public health, although its incidence is higher in less developed regions such as Turkana County in Kenya. The objective of this work was to study the molecular mechanisms involved in the development of AMRs in microorganisms isolated from patients in Turkana. **Materials and Methods:** A prospective, multicentre, observational study was carried out. Firstly, the isolates were identified through phenotypic and molecular approaches, and their antimicrobial sensitivity was studied *in vitro*. Next, the genome of selected strains was sequenced and compared with the Comprehensive Antimicrobial Resistance Database (CARD) to obtain the resistome. **Results:** A total of 13 strains belonging to 8 different species were sequenced, revealing 211 different antimicrobial resistance genes (ARGs). ARGs against quinolones, beta-lactams, and tetracyclines constituted more than 45% of the total and 65.35% were associated with antibiotic efflux. Finally, the correlation between genotype and phenotype varied significantly depending on the type of antibiotic studied. **Discussion:** The results showed a high presence of multiple resistance genes, which translates into a greater potential for horizontal gene transfer to other pathogens. However, to obtain a more accurate picture and establish measures for the proper and effective use of antibiotics, it is necessary to increase the number of isolates studied.

Keywords: resistome, resistance, antibiotic, Turkana, sequencing, genome.

2. Introducción

Los antibióticos son fármacos que se emplean para combatir una gran variedad de microorganismos, ya sea inhibiendo su crecimiento o provocando su muerte. Pueden ser de origen natural, sintético o semisintético, y ejercen su acción a través de diversos mecanismos, generando alteraciones tanto fisiológicas como metabólicas [1]. La resistencia a antimicrobianos (RAM) se desarrolla cuando un microorganismo deja de ser susceptible a un fármaco que inicialmente sí era efectivo contra dicho microorganismo [2].

A pesar de que la RAM es un proceso de evolución natural, este problema está considerado como una de las mayores amenazas de este siglo en cuanto a salud pública se refiere. Se estima que en el año 2019, las muertes causadas directamente por bacterias multirresistentes ascendieron a 1,27 millones en todo el mundo y se prevé que en el año 2050 esta cifra llegue hasta los 10 millones [2, 3].

La RAM es un problema global, no obstante, existen diferencias en cuanto a la distribución geográfica. La tasa de fallecimiento debida a la RAM en países de rentas altas se estima en 13 de cada 100.000 personas, mientras que en áreas de África sub-Sahariana esta alcanza las 23,7 personas por cada 100.000 (Figura 1) [4]. Estas diferencias se deben a que se trata de países donde el acceso a medicamentos esenciales sigue siendo un desafío y la distribución de antimicrobianos carece de control efectivo. El desconocimiento de la población sobre su uso conduce a su consumo de forma indebida tanto en humanos como en animales. Otros factores que agravan estas diferencias son la falta de acceso a agua limpia, saneamiento e higiene (ASH), la implementación inadecuada de medidas preventivas y

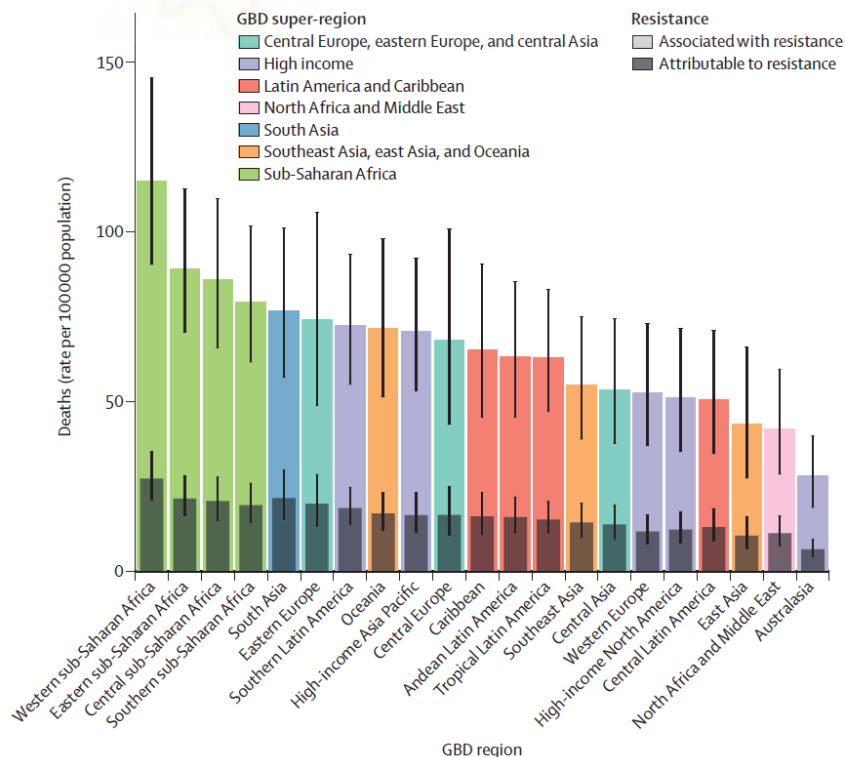


Figura 1. Tasas de muerte atribuibles y asociadas a la RAM por región GDB (*Global Burden Disease*) [4].

de control de enfermedades infecciosas, la limitada disponibilidad de métodos diagnósticos asequibles y el incumplimiento de la legislación. Además, la escasez de recursos e infraestructuras dificulta la recopilación de evidencia científica sobre la resistencia a los antibióticos en estas regiones [2, 4].

Tanto el sobreuso como la inadecuada utilización de los antibióticos conducen a una mayor presión de selección antibiótica, donde únicamente aquellas bacterias que sean resistentes podrán sobrevivir y multiplicarse, mientras que las bacterias susceptibles serán eliminadas [5]. Las bacterias resistentes a tres o más antibióticos de distintas familias se catalogan generalmente como multirresistentes y aquellas que resisten a todos los antibióticos disponibles en el mercado son clasificadas como panresistentes [2].

Mecanismos de resistencia a los antibióticos

La resistencia a antibióticos también puede definirse como la expresión fenotípica de los genes de resistencia a antibióticos (en inglés *Antibiotic Resistance Genes*; ARGs) presentes en las bacterias resistentes [6]. El conjunto de ARGs en un ambiente concreto, como una comunidad bacteriana, un entorno clínico o un ecosistema más amplio, es lo que se conoce como resistoma [7].

Los mecanismos génicos de resistencia a antibióticos están codificados en los ARGs y se clasifican en A) Modificación o inactivación enzimática, B) Disminución de la permeabilidad y eflujo y C) Alteración o protección de la diana (Figura 2) [1].

A) Modificación o inactivación enzimática del antibiótico

La modificación enzimática consiste en la adición de grupos químicos como acetilos, fosfatos o nucleótidos a sitios susceptibles de la molécula antibiótica por diferentes enzimas. De este modo, el antibiótico no puede unirse a su diana ya que se encuentra químicamente alterado. Los aminoglucósidos son especialmente susceptibles a este mecanismo debido a que son moléculas de gran tamaño con grupos amida e hidroxilo muy expuestos. En bacterias gramnegativas la N-acetiltransferasa AAC(6'), la O-nucleotidiltransferasa APH(3') y las O-fosfotransferasas ANT(2'') y ANT(3'') son las enzimas más frecuentes [1, 6, 8].

Por otro lado, existen otras enzimas que son capaces de romper directamente la molécula del antibiótico e inactivarlo. Este es el caso de las β -lactamasas, enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico de penicilinas, cefalosporinas, monobactamas o carbapenemas [6]. Se clasifican según su secuencia en cuatro clases: A, B, C y D. Las β -lactamasas de clase A, C y D llevan a cabo la hidrólisis por medio de un aminoácido serina de su sitio activo, mientras que las de clase B son metaloenzimas que requieren de al menos un ion zinc para romper el anillo [9]. Entre las β -lactamasas de clase A encontramos penicilinasas como TEM (*Temoneira*) o SHV (*Sulphydryl reagent variable*), β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) como CTX (*Active on cefotaxime*) o carbapenemasas como KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) [9]. Dentro de la clase B encontramos enzimas tipo IMP (*Active on imipenem*), VIM (*Verona integron-encoded metallo β -lactamase*) o NDM (*New Delhi Metallo β -lactamase*) [9]. Las β -lactamasas de clase C más importantes son las AmpC, que confieren

resistencia a penicilinas y cefalosporinas. Por último, las más representativas de la clase D son las enzimas OXA (*Active on oxacillin*), por su capacidad para degradar oxacilina, además de cefalosporinas de tercera generación y carbapenemas [8].

B) Disminución de la permeabilidad y eflujo del antibiótico

Existen dos métodos a través de los cuales las bacterias reducen la concentración de antibiótico en su citoplasma. Las porinas son proteínas de la membrana externa, a través de las cuales, diferentes antibióticos entran en las bacterias gramnegativas. Mediante la alteración estructural y la desregulación o deleción de sus genes, la penetración del agente antimicrobiano se ve afectada ya que la permeabilidad queda disminuida. Alteraciones en las porinas OmpF en *Escherichia coli* pueden conferir resistencia a tetraciclinas y β -lactámicos, mientras que si ocurren en porinas OmpD en *Pseudomonas aeruginosa*, la susceptibilidad a carbapenemas puede verse afectada [1].

El segundo mecanismo para reducir la concentración intracelular se basa en incrementar la salida del antibiótico al medio externo a través de bombas de eflujo. La mayoría de bacterias presentan bombas para transportar sustancias tóxicas generadas en su metabolismo, por lo que este mecanismo es uno de los más extendidos en el desarrollo de RAM. Pertenecen principalmente a cinco familias de transportadores distintas: *resistance-nodulation-cell division* (RND), *major facilitator superfamily* (MFS), *staphylococcal/small multidrug resistance* (SMR), *ATP-binding cassette* (ABC) y *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE). Las familias RND, SMR, MF y MATE llevan a cabo el eflujo de antibióticos utilizando antiporte secundario con protones o iones sodio. En cambio, las bombas ABC lo expulsan mediante transporte activo primario conducido por la hidrólisis de ATP [1, 10].

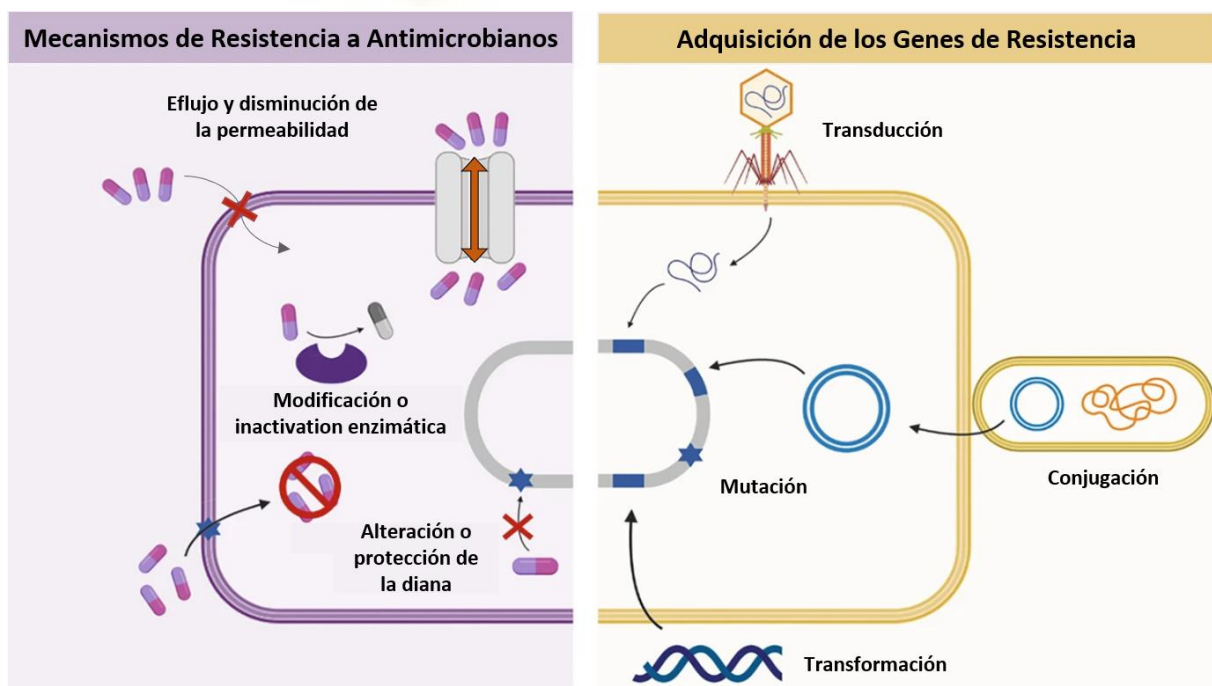


Figura 2. Principales mecanismos de resistencia a antibióticos en las bacterias (izquierda) y mecanismos de adquisición de genes de resistencia (derecha). [11]

A modo de ejemplo, los genes *tet* codifican para más de 20 bombas distintas que se encargan de expulsar tetraciclina. Estas bombas pertenecen a la superfamilia MSF y se encuentran principalmente en gramnegativas (excepto Tet(K) y Tet(L)) [8].

Otro tipo de bombas de eflujo de la familia RND, como la AcrAB-TolC o la MexAB-OprM, no solo son capaces de expulsar tetraciclinas sino que también exportan muchos tipos de antibacterianos. Son lo que se conoce como bombas de eflujo multiresistentes (bombas MDR). El sistema AcrAB-TolC es originario de enterobacterias y está formado por un transportador en la membrana interna (AcrB), una proteína de unión en el espacio periplásmico (AcrA) y un canal proteico ubicado en la membrana externa (Tol-C). Por otro lado, el sistema MexAB-OprM es un sistema homólogo pero que se encuentra presente en *P. aeruginosa* [6, 8].

C) Alteración y protección de la diana del antibiótico

Otro mecanismo de resistencia que han desarrollado las bacterias consiste en evitar la interacción entre el antibiótico y su diana mediante la protección o la modificación de esta última. La protección de la diana es un mecanismo importante en la resistencia a quinolonas. La proteína Qnr compite con la DNA girasa y topoisomerasa IV por el sitio de unión a DNA, lo que lleva a una reducción de la interacción entre el DNA y la girasa. De este modo, las fluoroquinolonas tienen menos posibilidades de estabilizar el complejo girasa-DNA-quinolona, el cual habría conducido a la muerte de las células [8].

Por otra parte, la modificación de la diana puede llevarse a cabo por mutaciones en aminoácidos del bolsillo de unión de la diana, alteraciones enzimáticas de este o por reemplazo completo de la diana, y todos ellos conducen a la reducción de la afinidad del fármaco por su diana [8].

La resistencia a rifampicina está mediada por mutaciones puntuales de varios aminoácidos en el gen *rpoB*, que codifica para la subunidad β de la polimerasa de RNA dependiente de DNA, diana del antibiótico. Así, la rifampicina no puede bloquear la polimerasa y, por tanto, la transcripción continúa. De hecho, la resistencia a quinolonas se produce principalmente a través de este mecanismo, al producirse mutaciones en los genes de la DNA girasa y topoisomerasa IV (*gyrA/gyrB* y *parC/parE*, respectivamente) [1, 8].

La causa principal de la resistencia a antibióticos del grupo MLS (macrólidos, lincosamidas, estreptogramina) en Europa y el sur de África es la modificación enzimática de su diana común, el ribosoma 23S [10]. Los genes *erm* (*erythromycin ribosome methylation*) codifican para enzimas que metilan una única adenina del ribosoma, confiriendo resistencia al todo el grupo al mismo tiempo [10]. El gen *Cfr* (*chloramphenicol-florfenicol resistance*) codifica para una S-adenosil-L-metionina metilasa que metila otra adenina diferente del rRNA 23S y confiere resistencia a anfenicoles, lincosamidas, pleuromutilinas y estreptogramina A [6].

Finalmente, las bacterias también son capaces de adquirir resistencia al reemplazar la diana original por una nueva diana resistente al antibiótico pero con la misma función bioquímica. Este es el caso de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. La bacteria adquiere el gen *mecA*, el cual codifica para una *Penicillin Binding Protein* (PBP) con baja afinidad por los betalactámicos, la PBP2a, que se encarga de la actividad transpeptidasa en la biosíntesis de la pared celular [6, 8]. Otro ejemplo importante es el de la resistencia a glucopéptidos como la vancomicina. Estos antibióticos se unen al dipéptido C-terminal D-Ala-D-Ala del precursor del peptidoglicano de la pared celular. Las agrupaciones de genes *van* codifican para diversas enzimas involucradas en modificar la síntesis del precursor mediante el cambio de la D-alanina terminal por D-serina (*vanC*, *vanE* y *vanG*) o por D-lactato (*vanA*, *vanB*, *vanD*). Además, otra dipeptidasa rompe el dipéptido D-Ala-D-Ala del precursor para impedir la unión de vancomicina [8, 10]. Por último, los genes *sul1*, *sul2* y *sul3* codifican para dihidropteroato sintasas resistentes a sulfonamidas, sin embargo, existen más de 20 determinantes de resistencia para el trimetoprim, llamados *dhfr*, que codifican para dihidrofolato reductasas resistentes al antibiótico [10].

Adquisición de la resistencia

Los mecanismos de resistencia que conducen a la insensibilidad al antibiótico pueden presentarse de forma intrínseca en géneros de bacteria específicos, es decir, se encuentran de forma natural en sus cromosomas [10]. Entre estos mecanismos pueden incluirse la ausencia de dianas para determinados antimicrobianos, la impermeabilidad de la membrana externa de bacterias gramnegativas o la formación de biofilms y de esporas [7].

Sin embargo, las bacterias también pueden adaptarse a la presencia de un antibiótico adquiriendo la resistencia mediante dos estrategias distintas: mutaciones en genes cromosómicos asociados al mecanismo de acción del fármaco o adquiriendo genes de resistencia de origen externo mediante eventos de transferencia génica horizontal (en inglés *Horizontal Gene Transfer*; HGT). Así mismo, las vías de HGT se dividen en transformación, conjugación y transducción (Figura 2) [8, 10].

La transformación supone la incorporación de material genético procedente del ambiente al cromosoma de la bacteria mediante recombinación. Por otro lado, la conjugación es un sistema mediante el cual los ARGs son transferidos de célula a célula mediante elementos genéticos móviles (en inglés *Mobile Genetic Elements*; MGEs) como plásmidos o transposones. Finalmente, la transducción es un proceso en el que los ARGs son transferidos de una bacteria a otra por medio de bacteriófagos [10].

Los MGEs más importantes que pueden contener ARGs son los plásmidos, los transposones y los integrones. Los plásmidos son pequeñas moléculas de DNA circulares. Una misma bacteria puede contener muchos plásmidos que se replican de forma independiente a su cromosoma al presentar orígenes de replicación propios. Los transposones son secuencias de DNA que se integran en el genoma del hospedador, en plásmidos o en otros transposones. Las regiones terminales de estos elementos codifican para recombinasas o transposasas que facilitan la recombinación en regiones específicas del

genoma. Por último, los integrones son elementos móviles que contienen grupos de genes (*gene cassettes*) y tienen la capacidad de integrarse en el genoma de manera estable mediante recombinación específica de sitio gracias a las proteínas integrasas. Las regiones del genoma de las que se tiene evidencia de haber sido originadas por HGT constituirán lo que se conoce como islas genómicas [8, 10].

Técnicas de detección de ARGs

Las técnicas más extendidas para detectar ARGs son las siguientes: en primer lugar, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el principal método para detectar genes específicos y describir así genotipos de resistencia y virulencia de las bacterias. En segundo lugar, destaca el uso de *microarrays*, mediante los cuales se puede detectar simultáneamente una gran cantidad de genes de resistencia mediante la hibridación del DNA de la bacteria con sondas específicas. Finalmente, la secuenciación del genoma completo es una técnica en auge que presenta varias ventajas. Además de identificar los genes de resistencia también es capaz de determinar con precisión mutaciones específicas de estos, localizarlos dentro del genoma y asociarlos elementos móviles que los transportan [12].

3. Antecedentes, Hipótesis y Objetivos

3.1. Antecedentes

Cirugía en Turkana (CeT) es un Proyecto de Cooperación Internacional que fundado en el año 2004. Su objetivo principal es asistir quirúrgicamente a la población de Turkana, situada en el Norte de Kenia, ya que se trata de una zona con un alto índice de pobreza y una importante falta de recursos sanitarios. Además de la asistencia quirúrgica, CeT también lleva a cabo labores docentes e investigadoras. Estas labores se realizan en el hospital de referencia del condado, el Lodwar County & Referral Hospital (LCRH) [13]. En el año 2019 se incorpora al proyecto la especialidad de microbiología con el objetivo de mejorar el manejo de infecciones autóctonas como el micetoma, realizar cultivos para el diagnóstico de infecciones de abordaje quirúrgico y para formar a los sanitarios locales en técnicas básicas.

Hasta ese momento, la situación relativa a la presencia de cepas RAM era desconocida en Turkana dada la falta de infraestructura para diagnóstico microbiológico. Sin embargo, a través del estudio microbiológico de infecciones de intervención quirúrgica se detectó una elevada frecuencia de cepas RAM (77,7%) y que prácticamente todas ellas eran multirresistentes. Con el objetivo de conseguir un conocimiento más preciso de la RAM en la región y de los mecanismos moleculares implicados en su desarrollo, a partir del año 2022 comienza el proyecto “Estudio de las resistencias antimicrobianas en Turkana (Kenia)”, financiado por la fundación para la investigación del Hospital Clínico San Carlos (HCSC) y en colaboración con la Universidad Miguel Hernández (UMH) y la ONG Cirugía en Turkana.

En el estudio de las RAM durante las campañas quirúrgicas de los años 2022-2023 se procesaron muestras de 46 pacientes y se obtuvieron 66 aislamientos bacterianos pertenecientes a 19 especies distintas. Los géneros predominantes fueron *Staphylococcus* (24,2%) y *Pseudomonas* (18,2%). El

52,30% de los aislamientos mostraron multirresistencia y las especies más resistentes fueron *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas* sp. Un 60,4% de los aislamientos presentó resistencia contra betalactámicos, porcentaje algo menor al descrito en otros estudios en diversas regiones de África. Finalmente, mediante otras pruebas fenotípicas se han encontrado genes de BLEEs CTX-M-15 y CTX-M-9, así como genes de carbapenemasas NDM [14].

El trabajo que aquí se expone se centra en la segunda parte del proyecto, el estudio de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de las RAM en Turkana.

3.2. Hipótesis

Detectada la presencia de resistencias antimicrobianas en el condado de Turkana (Kenia), el análisis del genoma completo de los aislamientos permitirá identificar los genes implicados en dichas resistencias y, potencialmente, detectar otras resistencias no evidenciadas.

3.3. Objetivos

Objetivo primario

Estudiar la correlación entre los genes de resistencia a antimicrobianos identificados y los datos obtenidos en los ensayos de sensibilidad *in vitro*.

Objetivos secundarios

- Obtener el genoma completo de las cepas bacterianas aisladas en el condado de Turkana.
- Detectar y analizar genes de resistencia de las bacterias aisladas, es decir, obtener el resistoma.
- Localizar islas genómicas de resistencia en el genoma de los aislamientos.
- Correlacionar la presencia de genes de resistencia a antimicrobianos identificados con los resultados obtenidos en los ensayos de sensibilidad *in vitro*.

4. Materiales y Métodos

4.1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio observacional, multicéntrico y prospectivo. El estudio se ha llevado a cabo con aislamientos bacterianos obtenidos de muestras de la población Turkana atendida en el hospital de referencia del condado, el Lodwar County & Referral Hospital (LCRH) y en el Hospital de la Misión de Kakuma, durante las campañas quirúrgicas realizadas en 2022 y 2023. Se tomó como criterio de inclusión pacientes del LCRH que firman un consentimiento informado sobre el estudio (Anexo 1). Mientras que, como criterios de exclusión, no se tomaron muestras a aquellos pacientes que se negaron, no firmaron el consentimiento o no comprendieron las explicaciones del intérprete.



Figura 3. Mapa de Kenia en el que se indica la localización de los hospitales de donde proceden los aislamientos estudiados.

4.2. Consideraciones éticas

Este estudio ha sido aprobado por los comités de ética tanto del Hospital Clínico San Carlos como de la Universidad Miguel Hernández (Anexo 2) y ha obtenido el Código de Investigación Responsable (COIR) (Anexo 3). Así mismo, el estudio cumple con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y respeta el Convenio sobre la Diversidad Biológica promovido por el protocolo de Nagoya.

4.3. Procesado de las muestras y obtención de los aislamientos

Las muestras fueron recogidas por el personal médico de CeT y transportadas al laboratorio del LCRH. Allí se realizó una tinción de Gram para su visualización microscópica. En función de este resultado, se inocularon en los medios de cultivo disponibles [medio general con agar nutritivo (AN), agar sangre (AS), agar MacConkey para enterobacterias (MCK), y agar cistina-lactosa deficiente en electrolitos (CLED) en caso de muestras de orina] con asa de siembra, en un entorno lo más estéril posible. Estos se incubaron durante 24-48 horas a 35-37°C y se observó el crecimiento de colonias. En caso de encontrar dos colonias distintas, se reaislaron en los medios pertinentes y se estudiaron por separado.

Por otro lado, en el LCRH se estudió de forma preliminar la sensibilidad de las cepas aisladas usando el método *Kirby-Bauer* o antibiograma disco-placa. Para ello la cepa se inoculó con un hisopo estéril en una placa de agar Müller-Hinton y se colocaron discos de papel filtro impregnados con diferentes antibióticos, se incubaron durante 18 horas a 37°C y se midieron los halos de inhibición. En función de esta medición se indicó como respuesta sensible (S), resistente (R) o de sensibilidad intermedia (I) de acuerdo a las tablas estandarizadas de interpretación de antibiogramas [15].

Finalmente, cada aislamiento se guardó impregnado en discos de papel de filtro para su transporte al Hospital Clínico San Carlos en Madrid, donde se realizaron otras investigaciones.

4.4. Identificación microscópica y estudio de sensibilidad in vitro (SiV)

Desde el HCSC, los aislamientos fueron trasladados al laboratorio de micología médica de la UMH, donde se volvieron a inocular en los medios pertinentes (AN, AS y MCK) de la misma manera. A continuación, se realizó tinción de Gram y observación microscópica de las colonias. Seguidamente se detallaron las características morfológicas, descartándose las bacterias cuyas características no coincidían con las visualizadas en el laboratorio del LCRH.

La SiV se volvió a estudiar en el laboratorio de la UMH de la misma forma que en el laboratorio del LCRH, mediante el método *Kirby-Bauer*. Los antibióticos testados fueron ampicilina (AMP; 10 µg), cefazolina (CZ; 30 µg), cefuroxima (CXM; 30 µg), ceftriaxona (CRO; 30 µg), amikacina (AK; 30 µg), gentamicina (CN; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg), levofloxacina (LEV; 5 µg), eritromicina (E; 15 µg), sulfametoxazol (SMX; 25 µg), tetraciclina (TE; 30 µg), clindamicina (CD; 2 µg) y nitrofurantoína (F 300 µg). Los resultados de este nuevo estudio de SiV se compararon con los obtenidos en Turkana y se descartaron las cepas que presentaron cambios radicales en la susceptibilidad.

4.5. Identificación taxonómica de los aislados

Extracción de DNA

Una vez seleccionadas las cepas se procedió a su identificación taxonómica. En primer lugar, se realizó la extracción del DNA bacteriano empleando el sistema comercial *DNeasy® Blood and Tissue Extraction Kit* (QIAGEN, Germantown, MD, Estados Unidos) siguiendo el protocolo de inicio rápido, que puede resumirse en los siguientes pasos:

1. Con un asa de siempre estéril depositar la colonia aislada en un tubo Eppendorf con 200 µL de PBS estéril y resuspender agitando con vórtex. A continuación, añadir 20 µL de proteinasa K.
2. Añadir 200 µL de tampón de lisis (AL), mezclar con vórtex y dejar incubar durante 10 minutos a 56°C.
3. Añadir 200 µL de etanol al 96% y volver a mezclar con vórtex.

4. Pipetear toda la mezcla en la columna de centrifugación proporcionada, colocada en un tubo de recogida de 2 mL. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto y descartar el eluido y el tubo de recogida.
5. Depositar la columna de centrifugación en un nuevo tubo de recogida. Añadir 500 µL de tampón AW1, centrifugar durante 1 min a 8000 rpm y desechar el eluido y el tubo de recogida.
6. Depositar la columna de centrifugación en un nuevo tubo de recogida. Añadir 500 µL de tampón AW2, centrifugar durante 3 min a 14000 rpm y desechar el eluido y el tubo de recogida.
7. Traspasar la columna de centrifugación a un nuevo Eppendorf de 1,5 mL. Añadir 100 µL de tampón de elución (AE), incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar durante 1 min a 8000 rpm.
8. Volver a repetir el paso 7 en el mismo Eppendorf de 1,5 mL.

Para cuantificar el DNA extraído se empleó el *Kit Qubit™ dsDNA Quantification Assay* y para la medición se utilizó el fluorímetro *Qubit 4* (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Una vez extraído el DNA se procedió a amplificar las regiones V1 a V3 del gen 16S rRNA. Estas regiones son consideradas regiones *barcode* para la identificación bacteriana puesto que su secuencia se encuentra muy conservada, lo que permite diferenciar entre muchas especies distintas [16]. Los cebadores empleados para la amplificación del DNA fueron el cebador *forward 27f-YM^b* (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') y el *reverse Bact-515R* (5'-TTACCGCGGCKGCTGGCAC-3') [17]. Se empleó agua destilada estéril como control negativo. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador siguiendo el protocolo descrito a continuación:

- 1 ciclo de 5' a 95°C
- 35 ciclos
 - 30' a 95°C
 - 1' a 55°C
 - 1' a 72°C
- 1 ciclo de 6' a 72°C

Visualización de los amplicones

Los productos de PCR se mezclaron con *GreenSafe Premium* y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón Tris - Ácido bórico + Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), durante 30 minutos a 100V. Los amplicones se visualizaron con el sistema de lectura de geles BIO-RAD y, si eran viables, se continuaba con el protocolo.

Purificación de los amplicones y reacción de secuenciación Sanger

Los cebadores y los nucleótidos no incorporados se eliminaron al mezclar 5 μL de amplicón con 1 μL de *illustraTM ExoProStarTM 1-Step*, durante 15 minutos a 37°C y después otros 15 minutos a 80°C. A continuación, a 3 μL de DNA purificado se le añadieron 4,5 μL de agua destilada estéril y 2,5 μL de cebador *forward*. Esta mezcla se envió a la empresa externa Stab Vida para realizar la secuenciación Sanger de los fragmentos amplificados.

Identificación de las especies

Utilizando el software CHROMAS se comprobó la integridad de la secuencia y se comparó mediante el programa BLAST con la base de datos de nucleótidos del NCBI. Si el porcentaje de identidad entre la secuencia obtenida y la secuencia de interés supera el 98%, la especie de la secuencia obtenida es asignada a la cepa de la que procede la secuencia de interés.

4.6. Secuenciación y Análisis Bioinformático

Si la calidad del amplicón del gen 16S rRNA observada era la adecuada y la especie obtenida era concordante con lo esperado, se enviaba un mínimo de 5 ng/ μL de DNA en un volumen final de 15 μL al Servicio de Secuenciación y Bioinformática de La Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (Fisabio) para la secuenciación del genoma completo mediante secuenciador NextSeq1000/2000 de Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA).

Los archivos *fastq* crudos obtenidos de la secuenciación fueron procesados con *Trimmomatic v.0.36* [18] para eliminar los adaptadores y otras secuencias de baja calidad de las lecturas cortas. A continuación, se realizó el ensamblaje de los contigs mediante el programa informático *SPAdes v.3.11.1* [19]. Para cada genoma, las secuencias de ADN codificantes (CDS) se predijeron con *Prodigal v2.6.3* [20]. Estas secuencias se cotejaron con la base de datos de secuencias proteínicas no redundantes del NCBI (NCBI nr) usando *DIAMOND v.2.0.6*. [21] para su anotación. Así mismo, se comprobó la calidad de las secuencias obtenidas mediante *CheckM v.1.1.3*. [22]. Para identificar los genes de resistencia se realiza un BLASTp de las proteínas obtenidas en la anotación frente a la base de datos CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) [23], estableciendo un umbral mínimo de porcentaje de identidad del 70% y un *e-value* de 10^{-5} . Por otro lado, para identificar los genes de virulencia el BLASTp se realiza frente a la base de datos VFDB (*Virulence Factor Database*) [24], con un umbral mínimo de porcentaje de identidad del 60% y un *e-value* de 10^{-5} .

La taxonomía genómica de los aislamientos se identificó al comparar los genomas con la base de datos GTDB (*Genome Taxonomy Database*) [25]. Con el fin de visualizar los genomas y los ARGs identificados se utiliza el servidor web *Proksee* [26]. Finalmente, para predecir la susceptibilidad o resistencia a un antibiótico en base al genotipo, se emplea la herramienta online *ResFinder v.4.5.0*. desarrollada por el Centro para la Epidemiología Genómica (*Center for Genomic Epidemiology* o CGE) [2727], aplicando un porcentaje de identidad y una cobertura mínima del 70% y 60% respectivamente.

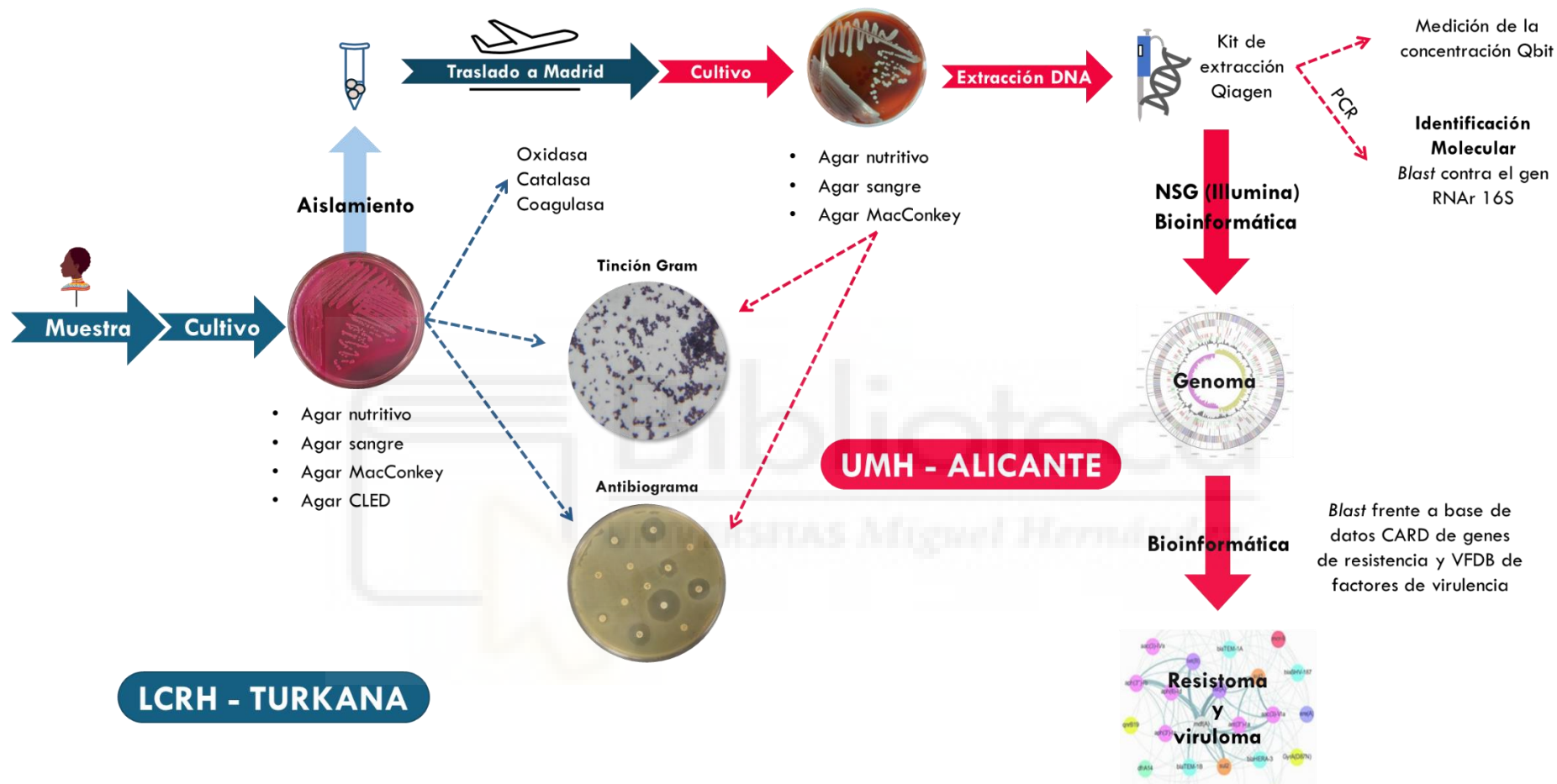


Figura 4. Esquema resumen de la metodología seguida en este estudio

5. Resultados

Del total de aislamientos obtenidos, se seleccionaron 13 cepas que no presentaban discrepancias significativas en la identificación ni en la susceptibilidad a los diferentes antibióticos testados entre el LCHR y la UMH. Seis aislamientos fueron obtenidos en la campaña quirúrgica del año 2022 y 7 en la del año 2023.

Los 13 aislamientos pertenecen a 8 especies diferentes: *E. coli* (3/13), *P. aeruginosa* (3/13), *Klebsiella pneumoniae* (2/13), *Enterobacter hormaechei* (1/13), *Acinetobacter haemolyticus* (1/13), *Escherichia flexneri* (1/13), *Enterococcus faecalis* (1/13) y *Staphylococcus capitis* (1/13). La mayoría de ellos proceden de osteomielitis (3/13) y heridas (3/13) (Tabla 1).

Tabla 1. Identificación y procedencia de los aislamientos bacterianos estudiados.

Cepa	Taxonomía basada en el gen 16S rRNA	Taxonomía basada en genoma completo	Patología de procedencia	Hospital de procedencia de la muestra
31	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fractura abierta	LCRH
48	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Osteomielitis	LCRH
55	<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Osteomielitis	LCRH
66	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Herida	LCRH
68	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Herida	LCRH
93	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Escherichia flexneri</i>	Infección generalizada	LCRH
L003	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	Infección por pie diabético	LCRH
L006	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Desconocida	LCRH
L012	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	*ITU	LCRH
L062	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	Herida	LCRH
L065	<i>Klebsiella variicola</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Osteomielitis	Kakuma
L066	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Desconocida	Kakuma
L067	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	*ITU	LCRH

*Infección del tracto urinario

5.1. Calidad de la secuenciación e identificación genómica

En la Tabla 2 se pueden observar diferentes parámetros relativos a la calidad de la secuenciación masiva del genoma de las bacterias así como relativos a la identificación genómica. La identidad nucleotídica media o *Average Nucleotide Identity* (ANI) del genoma completo es una medida de la similitud genómica entre las regiones codificantes de dos genomas diferentes. Si la ANI $\geq 95 \pm 0,5\%$ se asigna la especie de la cepa de la base de datos al aislamiento, sin embargo, si ANI $\geq 97\%$ se considera un sinónimo propio de la GTDB [28, 29]. Así mismo, se acepta que un genoma está completo cuando su integridad es $>95\%$ y la contaminación es $<5\%$ [22].

Tabla 2. Parámetros de la calidad de la secuenciación y de la identificación genómica de los aislamientos.

Cepa	Identificación Genómica	Tamaño de la construcción (Mb)	Número de contigs	%GC	*%ANI	Integridad / contaminación
31	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,49	71	65,44	95,00	99,68 / 0,23
48	<i>Escherichia coli</i>	5,29	134	51,51	96,95	99,97 / 0,04
55	<i>Enterobacter hormaechei</i>	4,63	66	55,34	95,13	99,47 / 0,15
66	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,23	33	66,46	95,00	99,68 / 0,43
68	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	3,32	95	38,57	95,00	100 / 0,55
93	<i>Escherichia flexneri</i>	4,87	144	50,89	97,00	99,97 / 0,27
L003	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,91	18	36,14	95,00	99,63 / 0,00
L006	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,28	33	57,87	95,00	100,00 / 0,07
L012	<i>Escherichia coli</i>	5,41	111	50,18	96,95	99,97 / 0,24
L062	<i>Staphylococcus capitis</i>	2,44	29	33,39	95,00	99,81 / 0,08
L065	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,75	50	57,04	95,00	99,70 / 0,52
L066	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,74	82	65,14	95,00	99,68 / 0,81
L067	<i>Escherichia coli</i>	5,22	77	49,69	96,81	99,97 / 0,08

*Identidad Nucleotídica Media o *average nucleotide identity*.

5.2. Estudio del resistoma

Tras obtener el genoma completo de los aislamientos y compararlo con la base de datos CARD identificamos un total de 623 ARGs, siendo 211 de ellos genes únicos. La cepa 55 (*E. hormaechei*) presenta el mayor número de genes con 89, seguido de la cepa 93 (*E. flexneri*) con 67. Por otro lado, al hacer la comparación de los genomas con la base de datos VFDB encontramos un total de 3480 genes de virulencia, 995 de ellos únicos (Tabla 3).

Tabla 3. Recuento de genes de resistencia a antibióticos y de genes de virulencia identificados.

Cepa	Identificación genómica	Genes de resistencia	Genes de virulencia
31	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51	444
48	<i>Escherichia coli</i>	59	269
55	<i>Enterobacter hormaechei</i>	89	207
66	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52	441
68	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	17	126
93	<i>Escherichia flexneri</i>	67	284
L003	<i>Enterococcus faecalis</i>	9	66
L006	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	46	192
L012	<i>Escherichia coli</i>	63	364
L062	<i>Staphylococcus capitis</i>	8	43
L065	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	46	216
L066	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55	457
L067	<i>Escherichia coli</i>	61	371
	Total	623	3480
	Genes únicos	211	995

En función de la clase de antibiótico sobre la que ejercen su acción, obtenemos los siguientes resultados (Figura 5). Los genes identificados están relacionados con la resistencia a 18 familias de antibióticos distintas. Cabe destacar que los genes de resistencia a quinolonas (16,72%), a betalactámicos (15,49%) y a tetraciclinas (13,35%) son los más prevalentes puesto que más del 45% de los genes identificados están involucrados en la resistencia a alguna de estas 3 familias. También observamos que las bacterias del mismo género presentan un patrón de resistencias muy similar entre ellas.

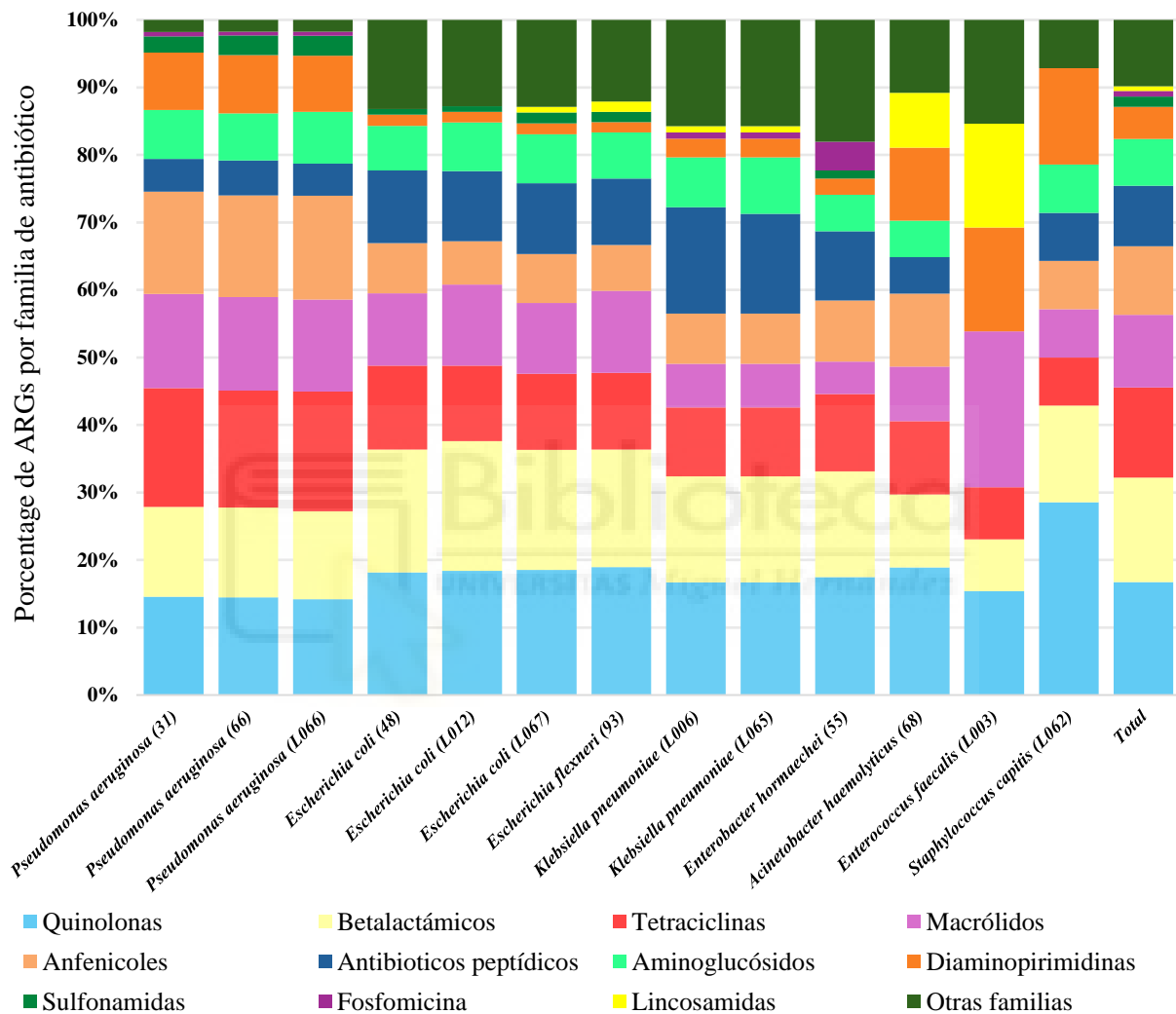


Figura 5. Porcentaje total de genes de resistencia en función de la clase de antibiótico.

Los genes de resistencia a quinolonas más importantes que hemos encontrado son genes con mutaciones tanto en la DNA girasa (*gyrA/gyrB*) como de la topoisomerasa IV (*parC/parE*). También destacan el gen de la proteína QnrS1 y las bombas de eflujo *oqxA*, *oqxB* y *emr*. Respecto a las betalactamasas, hemos identificado 18 genes que codifican para 9 tipos de betalactamasas distintas. En orden de prevalencia en los aislamientos encontramos *blaOXA* (4/13), *blaPDC* (3/13), *blaEC* (3/13), *blaCTX-M* (2/13), *blaSHV* (2/13), *blaTEM* (1/13), *blaACT* (1/13), *blaLAP* (1/13), *blaZ* (1/13). Todas

las cepas poseen al menos una betalactamasa distinta excepto la cepa L003 (*E. faecalis*) que no posee ninguna. Por otro lado, en la cepa 55 (*E. hormaechei*) encontramos una proteína de unión a penicilina mutante (PBP3) que también puede conferir resistencia a betalactámicos. En cuanto a los genes más relevantes en la resistencia a tetraciclinas, destacan las bombas de eflujo tet(A) y tet(D), así como la proteína de protección ribosomal resistente a la tetraciclina tet(M).

Finalmente, se han identificado otros genes de resistencia a macrólidos (*ErmB*, *mphA*, *emrE* y *Mrx*), anfenicoles (*catA*, *catB* y *floR*), aminoglucósidos (*ANT*, *APH* y *AAC*), trimetoprima (*dfpA*, *C*, *E* y *G*), sulfonamidas (*sul1* y *sul2*) y fosfomicina (*fosA*), entre otros. En la Tabla Suplementaria 1 se pueden ver todos los genes de resistencia encontrados por cada cepa.

Si atendemos al mecanismo de resistencia, los resultados obtenidos son los siguientes (Figura 6). El eflujo de antibióticos es el mecanismo predominante de los genes hallados, con un 65,31%. Dentro de este porcentaje se encuentran genes que codifican para diferentes subunidades que conforman las bombas de eflujo pero, además, podemos encontrar tanto reguladores positivos como reguladores negativos mutantes de su expresión génica. La alteración de la diana es el siguiente mecanismo más relevante con un 13,61% de los genes, seguido de la inactivación del antibiótico con un 7,92%.

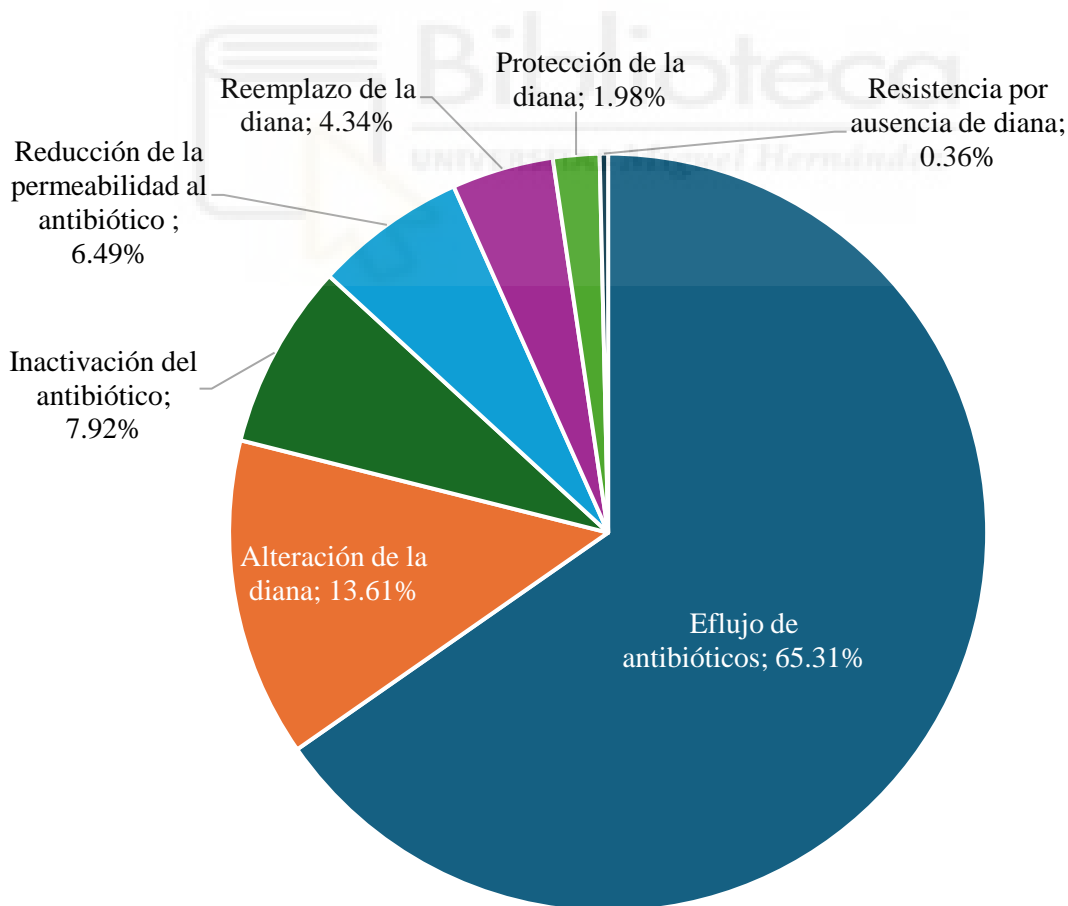


Figura 6. Porcentaje total de genes de resistencia en función del mecanismo de acción.

Muchos de los sistemas de eflujo MDR son característicos de familias de bacterias concretas y presentan sistemas homólogos en otras familias. En todas las cepas de enterobacterias encontramos los sistemas *AcrABDEF-TolC*, *mdfA* y *LptD*. En las cepas de *K. pneumoniae* encontramos adicionalmente los sistemas de bombas *Kpn*. En las 3 cepas de *P. aeruginosa* identificamos bombas de eflujo *Mex-Opr*, que son homólogos al sistema *Acr-TolC*. También es destacable la presencia del sistema *Mux-Opm* de esta especie. Por último, a modo de ejemplo de bomba de eflujo multirresistente de bacterias grampositivas, encontramos el sistema *EfrAB* en la cepa de *E. faecalis* o las bombas *norA* y *LmrS* en *S. capitis*.

Entre los reguladores génicos de la expresión de bombas MDR en enterobacterias encontramos los genes *AcrS*, *baeR/S*, *CRP*, *MarA/R*, *evgA/S*, *gadW/X*, *H-NS*, *kdpE*, *rsmA* y *sdiA*. En las cepas de *P. aeruginosa* encontramos reguladores *CpxR*, *cprR/S*, *ParR/S* y *soxR*. Finalmente, la cepa L062 (*S. capitis*), al ser grampositiva, posee otros reguladores como *arlR* o *mgrA* para sus bombas de eflujo.

Islas genómicas de resistencia (IGRs)

Una IGR puede definirse como una región del genoma que ha sido adquirida por transferencia horizontal y que contiene diversos determinantes de resistencia [30]. Hemos encontrado diferentes IGRs en todas las cepas de *Escherichia* (48, L012, L067 y 93) y en la cepa de *E. hormaechei* (55).

A modo de ejemplo, en la Figura 7 se puede observar una región del genoma que posee las características necesarias para ser una IGR. En primer lugar, podemos observar en color azul varios genes involucrados en la integración y escisión de transposones tipo Tn3, como *tnpA*, que codifican para enzimas transposasas y genes *tnpR*, que codifican para enzimas resolvasas [31]. Los genes *ins*, *gin* e *int* encontrados están también involucrados en la integración. En color fucsia se identifican genes relacionados con la replicación y recombinación (*umuC*, *parM*, *s071* y *repA*) y en color cian, genes de estabilidad (*stbB* y *korC*) [3232]. En segundo lugar, para comprobar que efectivamente se trataba de una región adquirida por transferencia horizontal, se realizó un alineamiento del genoma completo de la cepa con el genoma de referencia, que se puede visualizar en color verde. Como podemos observar, no hay solapamiento entre la IGR y el genoma de referencia, por lo que debe haberse producido un evento HTG. Finalmente, en color rojo encontramos los diferentes ARGs en la región: un gen de resistencia a tetraciclinas *tet(A)*, una betalactamasa de tipo *LAP-2*, el determinante de resistencia a quinolonas *QnrS1*, un gen de resistencia a sulfonamidas *sul2*, un gen de resistencia a trimetoprima *dfrA14* y dos genes de resistencia a anfenicoles *floR* y *catII*.

En las cepas analizadas del género *Escherichia* destaca la presencia del clúster de genes *sul2* – *APH(3'')-Ib* – *APH(6)-Id* en todas las cepas. Asimismo, la cepa L067 posee un integrón de clase 1 que contiene los genes *sull* de resistencia a sulfonamidas, *qacEΔ1* de resistencia a desinfectantes y *dfrA17* de resistencia a diaminopirimidinas.

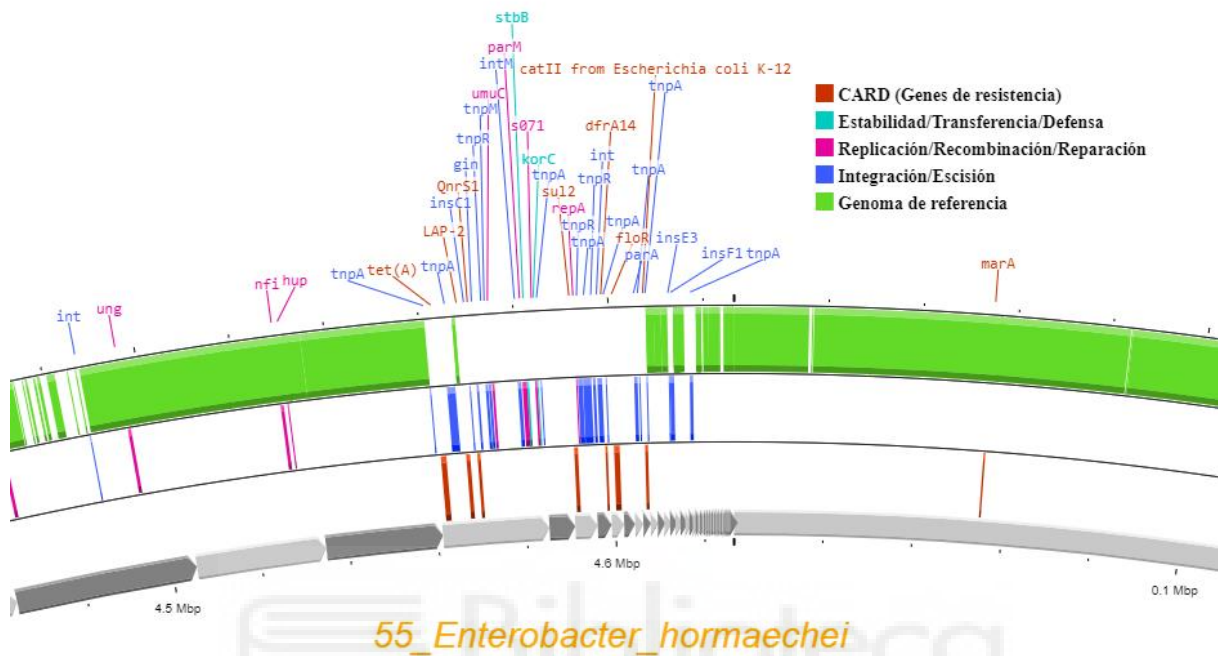


Figura 7. Isla genómica de resistencia encontrada en la cepa 55 (*E. hormaechei*). En color cian, fucsia y azul se observan genes relacionados con la transferencia horizontal de la región genómica. En verde se representa el alineamiento entre el genoma de la cepa y el genoma de referencia de la especie. En rojo se visualizan los genes de resistencia.

5.3. Correlación entre el fenotipo y el resistoma

La sensibilidad *in vitro* se determinó mediante el método *Kirby Bauer* de los aislamientos (Figura 8) y los resultados se muestran en la Figura 9. El criterio seguido para la interpretación de los antibiogramas se representa en la leyenda de la figura mediante un mapa de colores donde verde = sensibilidad; amarillo = sensibilidad intermedia o dosis dependiente y rojo = resistente.

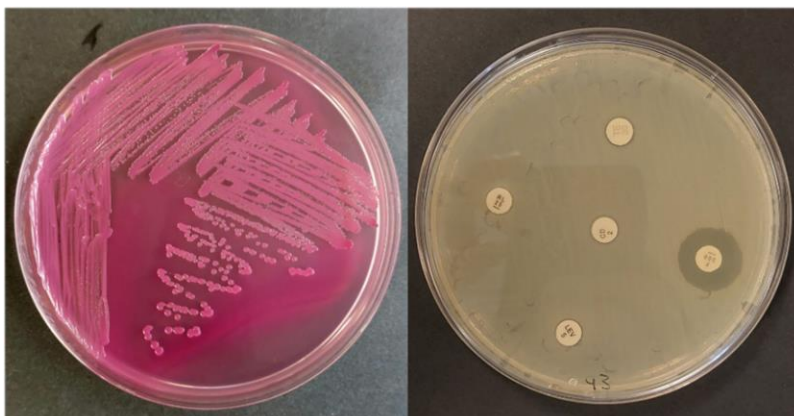


Figura 8. A la derecha se observa el crecimiento en agar MCK de la cepa 93 (*E. flexneri*) y a la izquierda un antibiograma con diferentes antibióticos para los que esta misma cepa presenta resistencia.

Los antibióticos que mostraron más resistencia fueron ampicilina (13/13 ; 100%), sulfametoxazol (13/13 ; 100%), cefazolina (12/13 ; 92,31%) y clindamicina (10/11 ; 90,91%). Todos los aislamientos, excepto la cepa L062, presentaron multiresistencia, es decir, mostraron resistencia a 3 o más antibióticos de clases distintas.

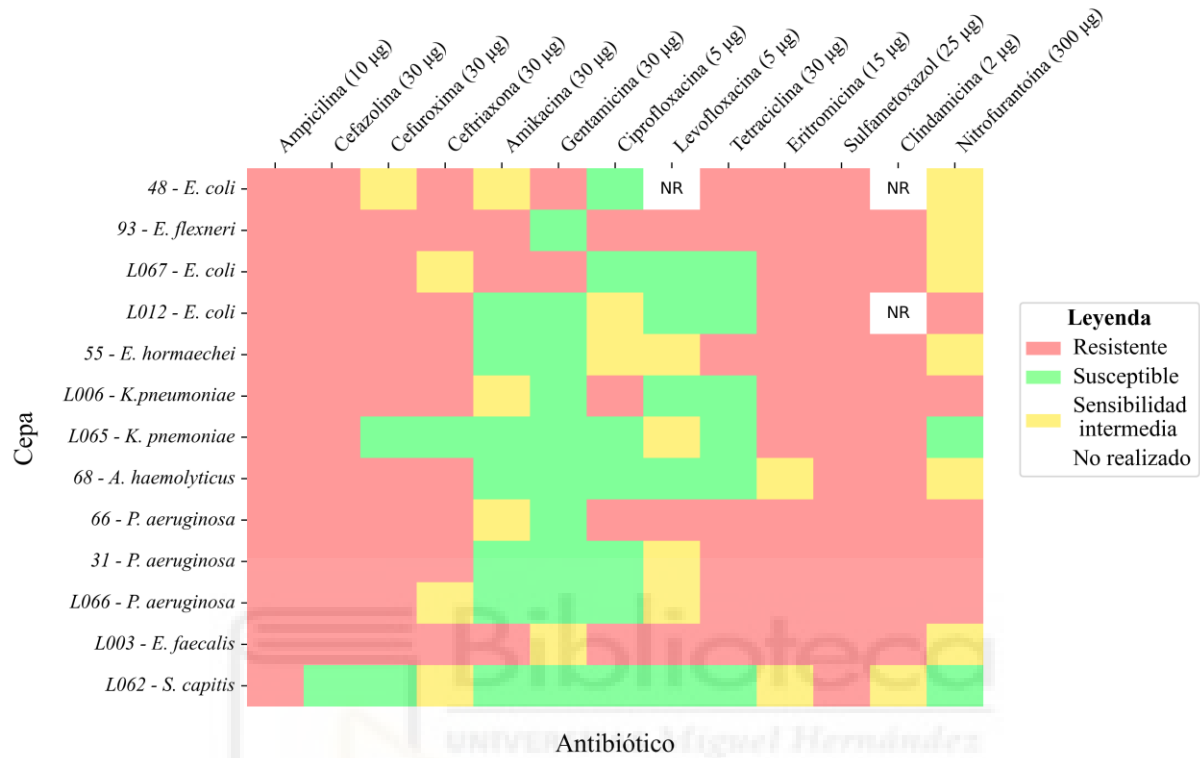


Figura 9. Mapa de calor en el que se representan los resultados de sensibilidad a antimicrobianos *in vitro* obtenidos mediante el método Kirby-Bauer.

La predicción de la susceptibilidad a un antibiótico en función del genoma del aislamiento se ha obtenido mediante el empleo de la herramienta online *ResFinder* (Figura 10). En este caso, el rojo representa que el programa predice que la cepa es resistente, en verde que es susceptible y *NP* indica que no ha sido posible realizar la predicción debido a la falta de suficientes datos [33].

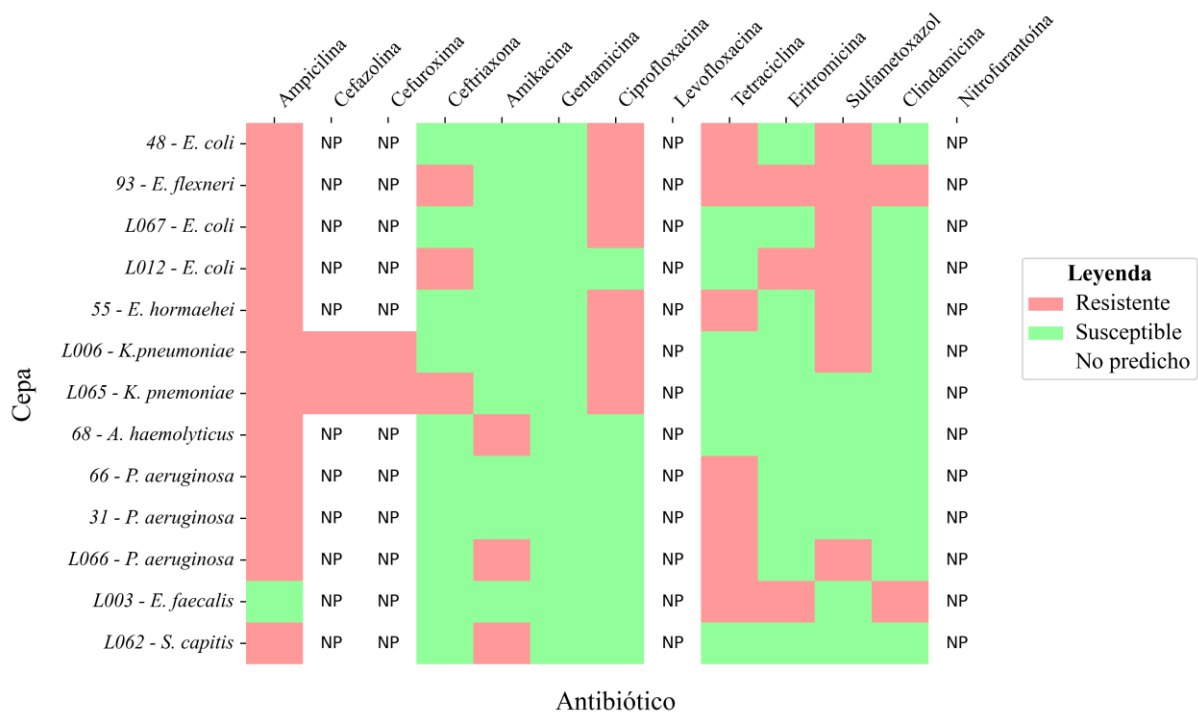


Figura 10. Mapa de calor en el que se representa la predicción de la susceptibilidad a diferentes antibióticos a partir del resistoma del aislamiento, realizado con la herramienta online *ResFinder*.

A continuación, a partir de los resultados expuestos previamente, elaboramos un mapa de calor que correlaciona la susceptibilidad *in vitro* y predicción de la susceptibilidad (Figura 11). Los antibióticos que presentan una predicción más acertada son la tetraciclina (100% de predicción correcta), la ampicilina (92,31%) y la gentamicina (80,77%). Mientras que los que presentan mayores discrepancias son la clindamicina (22,73%), la ceftriaxona (26,92%) y la eritromicina (30,77%). Si atendemos al porcentaje de clasificación correcta por clase de antibiótico y por cepa estos son del 65,35% y del 59,84% respectivamente. Finalmente, cabe destacar que la resistencia se predice correctamente en el 48,61% de las cepas resistentes y, por el contrario, la susceptibilidad se predice correctamente en el 83,87% de las cepas susceptibles.

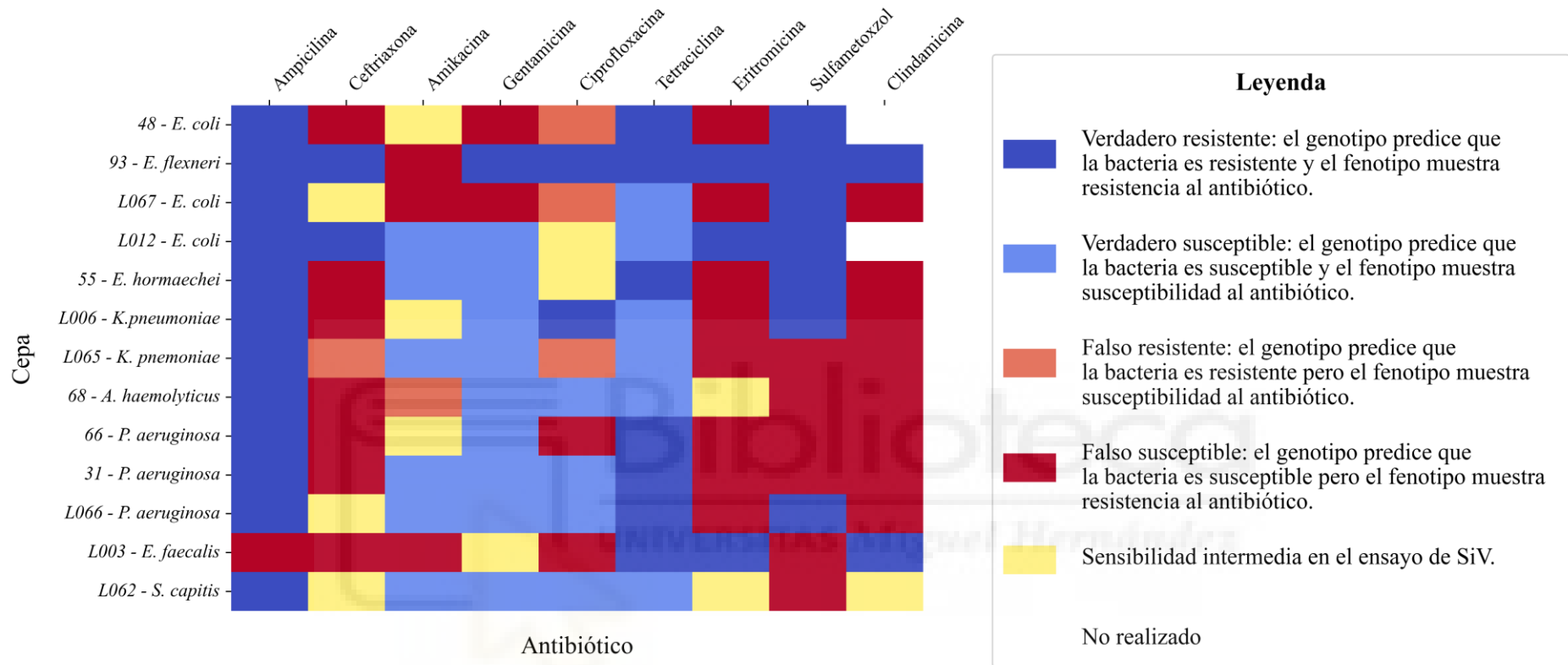


Figura 11. Mapa de calor el que se representan los resultados de la correlación entre los ensayos de sensibilidad *in vitro* y la predicción de la susceptibilidad a diferentes antibióticos a partir del resistoma del aislamiento.

6. Discusión

La identificación molecular y genómica de la taxonomía de los aislamientos reveló un mayor número de bacterias gramnegativas aunque encontramos algunas diferencias entre ambos métodos de identificación. Tomamos como referencia la identificación genómica ya que la identidad nucleotídica media (ANI) es un parámetro más preciso, al emplear la similitud genómica entre todas las regiones codificantes de dos genomas diferentes [28] y no únicamente la región V1-V3 del gen de rRNA 16S.

La bibliografía sobre la situación de la RAMs en Kenia es escasa, sin embargo, existen diversas publicaciones que describen la presencia de genes de resistencia en bacterias gramnegativas [34, 35, 36, 37]. En el resistoma de las bacterias aisladas en este estudio fueron predominantes los genes de resistencia a quinolonas, a betalactámicos y a tetraciclinas. Los genes de resistencia a quinolonas descritos en la bibliografía, como las mutaciones en los genes *gyrA*, *parC*, *qnr* o bombas de eflujo *oxqA* y *oxqB* [34, 35, 36] también han sido identificados en este trabajo. Sin embargo en la cepa 55 (*Enterobacter hormaechei*) encontramos además genes *gyrB* y *parE*, que no han sido descritos hasta ahora. Por otra parte, los genes *qnr* más abundantes encontrados fueron *qnrB*, *qnrS* y *qnrVC1* [34, 35, 36], pero en nuestro estudio solo encontramos del tipo *qnrS1*. A pesar de que los genes de resistencia a quinolonas eran los más prevalentes, solo 4 de las 13 cepas presentaron resistencia a ciprofloxacina o levofloxacina y la correlación entre los genes y la susceptibilidad *in vitro* resultó ser muy variable.

Respecto a las betalactamasas, las BLEE más prevalentes en Kenia son *bla_{CTX-M-15}* y *bla_{TEM}* [36] y ambos tipos han sido identificados en este análisis. El resto de betalactamasas encontradas han sido también identificadas en varios estudios de bacterias gramnegativas en Kenia [34, 35, 36, 37], exceptuando *blaZ* ya que es característica de *Staphylococcus* [38]. Sin embargo, en dos investigaciones realizadas en Mozambique y en Ghana con *Staphylococcus aureus* reveló una prevalencia de este gen del 91% [39] y del 100% respectivamente [40]. Por el contrario, no hemos podido detectar genes *bla_{NDM}*, una de las carbapenemasas preponderantes en Kenia [34, 35, 36, 37], a pesar de que en el trabajo de Natalia Casanueva, “Estudio de las resistencias antimicrobianas en Turkana (Kenia)”, sí se detectó una cepa de *E. coli* con este gen mediante test rápidos de carbapenemasas [14].

La elevada presencia de betalactamasas identificadas en este estudio es concordante con lo descrito en la bibliografía y con la resistencia observada a ampicilina y cefalosporinas. La resistencia a ampicilina se predijo correctamente mediante el resistoma, sin embargo, la ceftriaxona (cefalosporina de 3ª generación) presentó discrepancias en nuestros resultados, sobre todo falsos susceptibles. Esto se debe a que la herramienta *ResFinder* solo predijo resistencia a ceftriaxona cuando detectaba BLEEs CTX-M, pero no cuando detectaba OXA, PDC o ACT, betalactamasas que, teóricamente, sí degradan cefalosporinas de 3ª generación [23]. En el caso de las *bla_{OXA}*, las variantes identificadas (OXA-50, OXA-215 y OXA-494), justamente, no son capaces de hidrolizar cefalosporinas [23]. Sin embargo, para las variantes identificadas de *bla_{PDC}* y *bla_{ACT}* (PDC-8, PDC-14, PDC-374 y ACT-65) la eliminación

de cefalosporinas sí que se ha descrito [23]. Otra razón posible es que el mecanismo de resistencia de la ceftriaxona sea mediante su eflujo a través de bombas MDR, cuyos genes no son detectados mediante *ResFinder*. Lo más probable es que la producción de betalactamasas combinada con bombas de eflujo MDR y mutaciones en genes de porinas hayan contribuido al fenotipo resistente a este antibiótico [41].

Por otro lado, la tetraciclina es el antibiótico más empleado en los países de África Oriental, por ello es el antibiótico que más resistencia presenta en esta región [42]. Como la resistencia a tetraciclina está mediada principalmente por las bombas *tet*, la presencia de estos genes predijo correctamente la resistencia en el 100% de las cepas estudiadas.

Otros genes de resistencia a macrólidos, anfenícoles, aminoglucósidos, trimetoprima, sulfonamidas y fosfomicina descritos en este trabajo también se han detectado en diferentes investigaciones llevadas a cabo con bacterias aisladas de distintas regiones de Kenia [34, 35, 36, 43]. Todos estos resultados indican que los genes de resistencia a antibióticos se encuentran ampliamente distribuidos, por lo que existe un enorme potencial de que puedan ser adquiridos por otros patógenos a través de eventos de transferencia horizontal.

A modo de ejemplo, el clúster de genes *sul2 – APH(3'')-Ib – APH(6)-Id*, identificado en todas las cepas del género *Escherichia* estudiadas en este trabajo, también se ha hallado en el microbioma de abejas en China [44] y en núcleos de hielo de más de 1200 años de la Antártida [45]. Este ejemplo pone en relevancia el concepto *One Health* o “Una salud” ya que la resistencia a los antibióticos no se limita a un solo entorno, sino que los genes de resistencia pueden moverse entre humanos, animales y el medio ambiente.

En lo que concierne a la predicción de la susceptibilidad *in vitro* a partir del resistoma de las bacterias, esta predicción fue correcta en el 65% de los antibióticos. Las discrepancias en las predicciones pudieron deberse a varios factores. En primer lugar, los mecanismos involucrados en la resistencia a un determinado antibiótico no han sido detectados por *ResFinder*, como es el caso de genes que codifican para bombas de eflujo MDR, los cuales representan más del 65% de los genes. Esto podría explicar las discrepancias observadas en antibióticos como la eritromicina o la clindamicina. En segundo lugar, es posible que la resistencia esté mediada por mecanismos que se desconocen y que, por tanto, no pueden ser detectados. En tercer lugar, varios loci distintos pueden actuar de manera compleja para expresar un determinado fenotipo, es decir, que la resistencia dependa de más de un único gen [46]. Por último, la regulación génica juega un papel esencial en la expresión de los genes de resistencia y varía en función del ambiente en el que se encuentre la bacteria [46].

Otro estudio que sigue una metodología similar utilizando la herramienta *ResFinder*, obtuvo una concordancia entre fenotipo y genotipo del 96,4% [47], un porcentaje mucho más elevado que el obtenido en este trabajo. Sin embargo, en el estudio mencionado utilizaron un número mucho mayor de

muestras que el nuestro y, además, solo 3 antibióticos (gentamicina, amikacina y ciprofloxacina) coincidían con los utilizados en este análisis.

A pesar de la variabilidad observada en la correlación entre el genotipo y el fenotipo, la presencia de ARGs ha permitido obtener una visión local y preliminar de la situación de la RAM en el condado de Turkana. Sin embargo, el uso de uno u otro antibiótico vendrá determinado primeramente por su disponibilidad, ya que el acceso a estos medicamentos es un grave problema [4] y, en segundo lugar, dependerá de la eficacia *in vivo* del antibiótico.

En lo referente a las limitaciones del estudio, el número de aislamientos estudiados fue muy bajo en comparación con otras investigaciones similares puesto que han surgido numerosos problemas de contaminación durante los traslados de los aislamientos entre los distintos laboratorios. Consecuentemente, al tratar de reaislarlos en la UMH se produjeron graves discrepancias en la morfología, la susceptibilidad y la identificación entre lo observado en Turkana y en Alicante. Por otro lado, la cantidad de cepas secuenciadas también se ha visto notablemente limitada por el coste del estudio y por la disponibilidad de material de laboratorio de Turkana. Por último, el seguimiento de los pacientes en Turkana para obtener datos de eficacia *in vivo* de los antibióticos suministrados tampoco ha sido posible a causa de la dificultad de mantener la correspondencia con ellos.

7. Conclusiones

- La mayoría de las cepas resistentes aisladas fueron bacterias gramnegativas, concretamente de la familia *Enterobacteriaceae* y de la especie *Pseudomonas aeruginosa*.
- Las cepas estudiadas presentaron una mayor proporción de genes involucrados en la resistencia a quinolonas (16,72%), betalactámicos (15,49%) y tetraciclinas (13,35%).
- La mayoría de los genes de resistencia identificados codifican para bombas de eflujo de antibióticos y sus reguladores génicos (65,31%).
- Una gran proporción de genes descritos en este trabajo también se han detectado en diferentes investigaciones llevadas a cabo con bacterias gramnegativas en Kenia.
- La localización de islas genómicas de resistencia en todas las cepas del género *Escherichia* y en *Enterobacter hormaechei* es un indicativo de que la transferencia horizontal de genes de juega un papel determinante en la dispersión de los genes de resistencia identificados.
- La correlación entre genes de resistencia detectados y la susceptibilidad *in vitro*, es decir, entre el genotipo y el fenotipo, varía en función del tipo de antibiótico estudiado, siendo de más del

80% para el caso de la tetraciclina, la ampicilina y la gentamicina, y de menos del 31% para la clindamicina, ceftriaxona y eritromicina.

- Es importante que se tomen medidas para no seguir potenciando la aparición de resistencias teniendo en cuenta las condiciones socioculturales y económicas de la región de Turkana.

8. Proyección Futura

A día de hoy, el estudio RAM en Turkana continúa en proceso con el análisis de las nuevas muestras recogidas durante las campañas de 2023 y 2024. En esta nueva etapa se está consolidando y optimizando el estudio de los genes de resistencia y de virulencia para obtener una comprensión más profunda de su distribución y de su impacto en la salud pública. Por otro lado, sería interesante obtener los datos de eficacia *in vivo* de los antibióticos empleados. Sin embargo, esto es todo un reto debido a la dificultad de mantener el contacto con los pacientes tratados en las campañas quirúrgicas, pero supondrían un gran avance para tener una fotografía más precisa de la situación. También sería interesante realizar experimentos de transcriptómica para identificar los genes que verdaderamente se están expresando y así poder comprender mejor los mecanismos moleculares subyacentes en la resistencia.

9. Bibliografía

1. Abushaheen, M. A., Muzaheed, Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D. D., Jhugroo, C., Vellappally, S., Khan, A. A., Shaik, J., & Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-month : DM*, 66(6), 100971. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971>
2. World Health Organization: WHO. (2023, 21 noviembre). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
3. Review on Antimicrobial Resistance. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. Recuperado de https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
4. Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet (London, England)*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
5. Read, A. F., & Woods, R. J. (2014). Antibiotic resistance management. *Evolution, medicine, and public health*, 2014(1), 147. <https://doi.org/10.1093/emph/eou024>
6. Jian, Z., Zeng, L., Xu, T., Sun, S., Yan, S., Yang, L., Huang, Y., Jia, J., & Dou, T. (2021). Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *Journal of basic microbiology*, 61(12), 1049–1070. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100201>

7. Wright G. D. (2010). The antibiotic resistome. *Expert opinion on drug discovery*, 5(8), 779–788. <https://doi.org/10.1517/17460441.2010.497535>
8. Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
9. Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
10. Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037–1050. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
11. Álvarez-Martínez, F. J., Díaz-Puertas, R., Barrajón-Catalán, E., & Micol, V. (2024). Plant-Derived Natural Products for the Treatment of Bacterial Infections. *Handbook of experimental pharmacology*, 10.1007/164_2024_706. Advance online publication. https://doi.org/10.1007/164_2024_706
12. Anjum, M. F., Zankari, E., & Hasman, H. (2017). Molecular Methods for Detection of Antimicrobial Resistance. *Microbiology spectrum*, 5(6), 10.1128/microbiolspec.ARBA-0011-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0011-2017>
13. ¿Qué es? - Cirugía en Turkana. (2022, 4 febrero). Cirugía En Turkana. <https://www.cirugiaenturkana.com/que-es-cirugia-en-turkana/>
14. Casanueva Hernández, Natalia. (2024). *Estudio de las resistencias antimicrobianas en Turkana* [Trabajo de Fin de Grado]. Universidad Complutense de Madrid.
15. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. (s.f.). Interferences in clinical chemistry. Recuperado de <https://iaclld.com/UpFiles/Documents/672a1c7c-d4ad-404e-b10e-97c19e21cdce.pdf>
16. Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., & Böttger, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic acids research*, 17(19), 7843–7853. <https://doi.org/10.1093/nar/17.19.7843>
17. Kim, S. H., Jeong, H. S., Kim, Y. H., Song, S. A., Lee, J. Y., Oh, S. H., Kim, H. R., Lee, J. N., Kho, W. G., & Shin, J. H. (2012). Evaluation of DNA extraction methods and their clinical application for direct detection of causative bacteria in continuous ambulatory peritoneal dialysis culture fluids from patients with peritonitis by using broad-range PCR. *Annals of laboratory medicine*, 32(2), 119–125. <https://doi.org/10.3343/alm.2012.32.2.119>

18. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* (Oxford, England), 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
19. Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*, 19(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
20. Hyatt, D., Chen, G. L., Locascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, 11, 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>
21. Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature methods*, 12(1), 59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
22. Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome research*, 25(7), 1043–1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
23. Alcock, B. P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K. W., Raphenya, A. R., Wlodarski, M. A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S. A., Tsang, K. K., Baker, S. J. C., Dave, M., McCarthy, M. C., Mukiri, K. M., Nasir, J. A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., Kwong, M., ... McArthur, A. G. (2023). CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic acids research*, 51(D1), D690–D699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>
24. Liu, B., Zheng, D., Zhou, S., Chen, L., & Yang, J. (2022). VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic acids research*, 50(D1), D912–D917. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107>
25. Parks, D. H., Chuvochina, M., Rinke, C., Mussig, A. J., Chaumeil, P. A., & Hugenholtz, P. (2022). GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. *Nucleic acids research*, 50(D1), D785–D794. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab776>
26. Grant, J. R., Enns, E., Marinier, E., Mandal, A., Herman, E. K., Chen, C. Y., Graham, M., Van Domselaar, G., & Stothard, P. (2023). Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic acids research*, 51(W1), W484–W492. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad326>

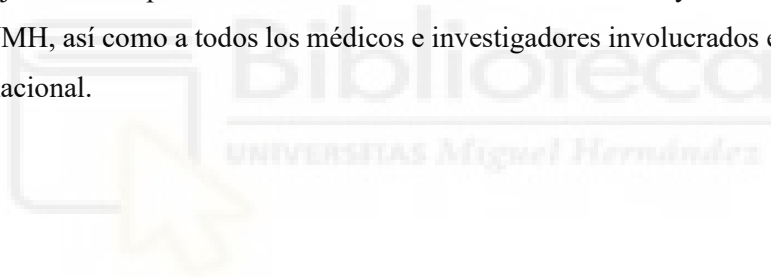
27. Florensa, A. F., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., Aytan-Aktug, D., & Aarestrup, F. M. (2022). ResFinder - an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microbial genomics*, 8(1), 000748. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000748>
28. Arahal, D. R. (2014). Whole-genome analyses: Average nucleotide identity. En M. Goodfellow, I. Sutcliffe, & J. Chun (Eds.), *Methods in Microbiology* (Vol. 41, pp. 103-122). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.07.002>
29. Genome Taxonomy Database (GTDB). (s.f.). FAQ. Recuperado de <https://gtdb.ecogenomic.org/faq>
30. Juhas, M., van der Meer, J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W., & Crook, D. W. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS microbiology reviews*, 33(2), 376–393. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x>
31. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
32. Mobile Organic Group Database. (August 17, 2022). Mobile Organic Group Database. Recuperado de <https://mobileogdb.flsi.cloud.vt.edu/>
33. Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., Malhotra-Kumar, S., ... Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 75(12), 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
34. Dinda, V., Kimang'a, A. N., Kariuki, D., Sifuna, A. W., O'Brien, T. J., Welch, M., & Reva, O. N. (2024). Whole genome sequencing and genotyping *Klebsiella pneumoniae* multi-drug resistant hospital isolates from Western Kenya. *Access microbiology*, 6(1), 000667.v4. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000667.v4>
35. Kiyaga, S., Kyany'a, C., Muraya, A. W., Smith, H. J., Mills, E. G., Kibet, C., Mboowa, G., & Musila, L. (2022). Genetic Diversity, Distribution, and Genomic Characterization of Antibiotic Resistance and Virulence of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Strains in Kenya. *Frontiers in microbiology*, 13, 835403. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.835403>
36. Muraya, A., Kyany'a, C., Kiyaga, S., Smith, H. J., Kibet, C., Martin, M. J., Kimani, J., & Musila, L. (2022). Antimicrobial Resistance and Virulence Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Kenya by Whole-Genome Sequencing. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 11(5), 545. <https://doi.org/10.3390/pathogens11050545>

37. Musila, L., Kyany'a, C., Maybank, R., Stam, J., Oundo, V., & Sang, W. (2021). Detection of diverse carbapenem and multidrug resistance genes and high-risk strain types among carbapenem non-susceptible clinical isolates of target gram-negative bacteria in Kenya. *PloS one*, *16*(2), e0246937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246937>
38. Red de Expertos en Microbiología Clínica. (2016). M4: Beta-lactámicos en Gram-ES. Recuperado de <https://redemc.net/campus/wp-content/uploads/2016/08/M4-Beta-lact%C3%A1micos-en-Gram-ES.pdf?x18977>
39. Vubil, D., Garrine, M., Ruffing, U., Acácio, S., Sigaúque, B., Alonso, P. L., von Müller, L., Herrmann, M., & Mandomando, I. (2017). Molecular Characterization of Community Acquired *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Young Children in Southern Mozambique, 2001-2009. *Frontiers in microbiology*, *8*, 730. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00730>
40. Egyir, B., Bentum, J., Attram, N., Fox, A., Obeng-Nkrumah, N., Appiah-Korang, L., Behene, E., Kumordjie, S., Yeboah, C., Agbodzi, B., Bentil, R. E., Tagoe, R., Kofi Adu Tabi, B., Owusu, F., Dayie, N. T. K. D., Donkor, E. S., Nsafu, J., Asah-Opoku, K., Nyarko, E., Asumanu, E., ... Letizia, A. G. (2021). Whole Genome Sequencing and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* from Surgical Site Infections in Ghana. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *10*(2), 196. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020196>
41. Jacoby G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, *22*(1), 161–182. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
42. Kimera, Z. I., Mshana, S. E., Rweyemamu, M. M., Mboera, L. E. G., & Matee, M. I. N. (2020). Antimicrobial use and resistance in food-producing animals and the environment: an African perspective. *Antimicrobial resistance and infection control*, *9*(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-0697-x>
43. Omar, K. M., Kitundu, G. L., Jimoh, A. O., Namikelwa, D. N., Lisso, F. M., Babajide, A. A., Olufemi, S. E., & Awe, O. I. (2024). Investigating antimicrobial resistance genes in Kenya, Uganda and Tanzania cattle using metagenomics. *PeerJ*, *12*, e17181. <https://doi.org/10.7717/peerj.17181>
44. Sun, H., Mu, X., Zhang, K., Lang, H., Su, Q., Li, X., Zhou, X., Zhang, X., & Zheng, H. (2022). Geographical resistome profiling in the honeybee microbiome reveals resistance gene transfer conferred by mobilizable plasmids. *Microbiome*, *10*(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01268-1>
45. Okubo, T., Ae, R., Noda, J., Iizuka, Y., Usui, M., & Tamura, Y. (2019). Detection of the sul2-strA-strB gene cluster in an ice core from Dome Fuji Station, East Antarctica. *Journal of global antimicrobial resistance*, *17*, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.11.005>

46. Su, M., Satola, S. W., & Read, T. D. (2019). Genome-Based Prediction of Bacterial Antibiotic Resistance. *Journal of clinical microbiology*, 57(3), e01405-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01405-18>
47. Ruppé, E., Cherkaoui, A., Charretier, Y., Girard, M., Schicklin, S., Lazarevic, V., & Schrenzel, J. (2020). From genotype to antibiotic susceptibility phenotype in the order Enterobacterales: a clinical perspective. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26(5), 643.e1–643.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.09.018>

Agradecimientos

Este proyecto ha sido financiado por la fundación para la investigación del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. También quisiera agradecer a mi tutora Consuelo Ferrer y a mis cotutores Kika Colom y Mario López, por darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de investigación que espero que pueda ser de utilidad para la población de Turkana frente al problema de la resistencia a los antibióticos. Agradezco el trabajo realizado por John L. Ekai en el laboratorio del LCRH y el de Javier Puentes en el laboratorio de la UMH, así como a todos los médicos e investigadores involucrados en este proyecto de cooperación internacional.





Anexo

- 1. Hoja de información a el/la participante**
- 2. Consentimiento informado**
- 3. Certificado Comité de Ética UMH**
- 4. Autorización COIR favorable**
- 5. Certificado de Capacitación del Procedimiento COIR TFG/TFM**
- 6. Tabla de genes encontrados por cepa**





HOJA DE INFORMACIÓN A EL/LA LA PARTICIPANTE

Número admitido a trámite (OIR UMH):	230103203228
Número Expediente:	
Título del proyecto:	ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN TURKANA (KENIA)
Investigador/a principal:	MARÍA FRANCISCA COLOM VALIENTE
Departamento/Instituto:	Dpto. Producción Vegetal y Microbiología

Nos dirigimos a usted para solicitar su consentimiento para participar en un proyecto de investigación. Este proyecto ha sido aprobado por el Comité de Ética e Integridad en la Investigación de la Universidad Miguel Hernández. El proyecto se llevará a cabo de acuerdo a la normativa vigente y a los principios éticos internacionales aplicables a la investigación médica (Declaración de Helsinki y su última revisión).

Con el fin de que pueda decidir si desea participar en este proyecto, es importante que entienda por qué es necesaria esta investigación, lo que va a implicar su participación, cómo se va a utilizar su información y sus posibles beneficios, riesgos y molestias. En este documento podrá encontrar información detallada sobre el proyecto. Por favor, tómese el tiempo necesario para leer atentamente la información proporcionada a continuación y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir. Cuando haya comprendido el proyecto se le solicitará que firme el consentimiento informado si desea participar en él.

Si decide participar en este estudio debe saber que lo hace voluntariamente y que podrá, así mismo, abandonarlo en cualquier momento. En el caso en que decida suspender su participación, ello no va a suponer ningún tipo de penalización ni pérdida o perjuicio en sus derechos y/o relación con los investigadores.

El proyecto se llevará a cabo en Turkana (Kenia) y Alicante y Madrid (España).

¿POR QUÉ SE REALIZA ESTE PROYECTO?

Existen estudios que demuestran que África es uno de los continentes en los que se acumulan un gran número de microorganismos que no responden a los tratamientos con antibióticos. Pero no se conocen estudios que demuestren cómo es la situación en el condado de Turkana ni en Kenia. En este estudio pretendemos evaluar la presencia de microorganismos resistentes a los antimicrobianos (RAM) en las infecciones que presentan los pacientes atendidos



en el Hospital de Referencia del Condado de Turkana en Lodwar (LCRH: *Lodwar County Referral Hospital*).

¿CUÁL ES EL OBJETIVO DEL PROYECTO?

El objetivo primario del proyecto es conocer la situación de la RAM en el condado de Turkana a través del estudio de los procesos infecciosos que afectan a pacientes quirúrgicos, y utilizar esta información para establecer medidas de control y prevención de las resistencias.

¿CÓMO SE VA A REALIZAR EL ESTUDIO?

Se recogerán todas las bacterias aisladas de muestras de pacientes del hospital (LCRH) y se estudiará su sensibilidad a los antibióticos. Para las que presenten resistencias se estudiará su genoma para conocer qué genes son los implicados en las resistencias.

La duración del estudio se prolongará durante un periodo de tiempo de 12 meses, pero este periodo podrá ser mayor o menor (en función del estudio).

¿QUÉ BENEFICIOS PUEDO OBTENER POR PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

Usted recibirá el mismo trato participe o no en el proyecto. En consecuencia, no obtendrá ningún beneficio directo con su participación. No obstante, la información que nos facilite, así como la que se obtenga de los análisis que se realicen, pueden ser de gran utilidad para mejorar el conocimiento que tenemos hoy día sobre las resistencias a los antimicrobianos en Turkana, también en Kenia y en el contexto de África Subsahariana, y ello permitirá idear formas de prevención, manejo y tratamiento mejores que las que poseemos en la actualidad.

Por su participación en el estudio no obtendrá compensación económica.

¿QUÉ RIESGOS PUEDO SUFRIR POR PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

Ninguno

¿QUÉ DATOS SE VAN A RECOGER?

No se utilizarán datos personales. Únicamente se recogerán los correspondientes a la enfermedad que padece y el microorganismo que esté implicado.

¿CÓMO SE TRATARÁN MIS DATOS PERSONALES Y CÓMO SE PRESERVARÁ LA CONFIDENCIALIDAD?



No se recogerán datos personales para la realización de este estudio. En cualquier caso, la UMH, como responsable del tratamiento de sus datos personales, le informa que, en caso de que los hubiera, serán tratados de conformidad con lo dispuesto en el Reglamento (UE) 2016/679 de 27 de abril (RGPD) y la Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre (LOPDGDD)

El acceso a su información personal si se precisara, quedará restringido a MARÍA FRANCISCA COLOM VALIENTE, para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente. El Investigador/a, cuando procese y trate sus datos tomará las medidas oportunas para protegerlos y evitar el acceso a los mismos de terceros no autorizados.

* Responsable del tratamiento: Universidad Miguel Hernández de Elche, Secretaria General; CIF: Q-5350015-C.

Contacto de la delegada de protección de datos de la UMH: dpd@umh.es

* Responsable interno del tratamiento: MARÍA FRANCISCA COLOM VALIENTE

* Contacto: Además de poder contactar con el investigador/a principal, puede contactar con la delegada de protección de datos de la UMH: dpd@umh.es

* Finalidad: Realizar el tratamiento de sus datos personales para poder participar en este proyecto de investigación

* Legitimación: Artículos 6.1.a) y 9.2.a del RGPD: El interesado da su consentimiento explícito para el tratamiento de sus datos personales para la realización del presente proyecto de investigación.

* Obligación o no de facilitar datos y consecuencias de no hacerlo: No aportar los datos solicitados imposibilita cumplir con la finalidad o finalidades del tratamiento.

* Decisiones automatizadas, perfiles y lógica aplicada:

* Destinatarios:

* Transferencia internacional de datos fuera de la UE:

* Conservación de los datos: Se conservarán entre 2 y 5 años para cumplir con la finalidad para la que se recabaron y para determinar las posibles responsabilidades que se pudieran derivar de dicha finalidad y del tratamiento de los datos. Una vez transcurrido el tiempo necesario se procederá a la eliminación de todos los datos.

* Derechos: El interesado podrá ejercitar sus derechos de acceso, rectificación, oposición, supresión, portabilidad y limitación del tratamiento, así como, a no ser objeto de decisiones basadas únicamente en el tratamiento automatizado de sus datos, para ello se deberá dirigir



mediante solicitud dirigida a la atención de Secretaria General de la UMH, Edificio Rectorado y Consejo Social, Avda. de la Universidad S/N, 03202, Elche-Alicante, o bien a través de sede electrónica <https://sede.umh.es/>. Para cualquier consideración adicional se puede poner en contacto con la delegada de protección de datos: dpd@umh.es. Asimismo, el interesado tiene derecho a presentar una reclamación ante la Autoridad de control (www.aepd.es) si considera que el tratamiento no se ajusta a la normativa vigente

- * Origen de los datos: Laboratorio de diagnóstico del Hospital Comarcal de Turkana (LCRH).
- * Categoría de datos de los interesados: Únicamente datos clínicos y de laboratorio
- * Observaciones:

¿CON QUIÉN PUEDO CONTACTAR EN CASO DE DUDA?

Si usted precisa mayor información sobre el estudio puede contactar con **María Francisca Colom Valiente**, Teléfono:+34 965919453; Correo electrónico: colom@umh.es





CONSENTIMIENTO INFORMADO

Número admitido a trámite (OIR UMH)	230103203228
Número Expediente:	
Título del proyecto:	ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN TURKANA (KENIA)
Investigador/a principal:	MARÍA FRANCISCA COLOM VALIENTE

Yo.....

(Nombre y apellidos manuscritos por el participante)

He leído esta hoja de información y he tenido tiempo suficiente para considerar mi decisión.
Me han dado la oportunidad de formular preguntas y todas ellas se han respondido satisfactoriamente.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones.

Después de haber meditado sobre la información que me han proporcionado, declaro que mi decisión es la siguiente:

Doy No doy

Mi consentimiento para la participación en el presente proyecto de investigación, así como para el acceso y utilización de mis datos personales en las condiciones detalladas en la hoja de información.

FIRMA DEL/DE LA PARTICIPANTE	FIRMA DEL INVESTIGADOR/A
NOMBRE:	NOMBRE:
FECHA:	FECHA:



REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D/Dña. _____ revoco el consentimiento prestado en fecha y no deseo continuar participando en el estudio "_____".

FIRMA DEL/DE LA PARTICIPANTE	FIRMA DEL INVESTIGADOR/A
NOMBRE:	NOMBRE:
FECHA:	FECHA:

EQUIPO INVESTIGADOR RESPONSABLE DEL PROYECTO

María Francisca Colom Valiente

Microbiología. Facultad de Medicina. UMH.

Miembro de Cirugía en Turkana

Tel. móvil: +34 650629196

Correo electrónico: colom@umh.es

Carmen Hernández Pérez.

Cirugía General. Hospital Clínico San Carlos. Madrid UCM.

Directora Médica de Cirugía en Turkana

Tel. móvil: 619 240 610

Correo electrónico: chp.hcsc@gmail.com

Stephen Omondi Onyango

Director del Laboratorio de Diagnóstico del Hospital de Referencia del Condado de Turkana

Tel. móvil: +254714352001

Correo electrónico: stephenonya1@gmail.com

John Lochuke Ekai

Responsable de Microbiología en el Laboratorio de Diagnóstico del Hospital de Referencia del Condado de Turkana

Tel. móvil: +254724682863

Correo electrónico: jloetash94@gmail.com



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Número admitido a trámite (OIR UMH)	230103203228
Número Expediente:	
Título del proyecto:	ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN TURKANA (KENIA)
Investigador/a principal:	MARÍA FRANCISCA COLOM VALIENTE

Yo.....

(Nombre y apellidos manuscritos por el participante)

He leído esta hoja de información y he tenido tiempo suficiente para considerar mi decisión.
Me han dado la oportunidad de formular preguntas y todas ellas se han respondido satisfactoriamente.

Comprendo que la participación de mi hijo/a o persona a mi cargo es voluntaria.

Comprendo que que mi hijo/a o persona a mi cargo puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones.

Después de haber meditado sobre la información que me han proporcionado, declaro que mi decisión es la siguiente:

Doy No doy

Mi consentimiento para la participación de mi hijo/a o persona a mi cargo en el presente proyecto de investigación, así como para el acceso y utilización de los datos personales de mi hijo/a o persona a mi cargo, en las condiciones detalladas en la hoja de información.

FIRMA DEL PADRE/TUTOR LEGAL	FIRMA DE LA MADRE/TUTOR LEGAL	FIRMA DEL INVESTIGADOR
NOMBRE:	NOMBRE:	NOMBRE:
FECHA:	FECHA:	FECHA:



REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D/Dña. _____ revoco el consentimiento prestado en fecha y no deseo continuar participando en el estudio "_____".

FIRMA DEL PADRE/TUTOR LEGAL	FIRMA DE LA MADRE/TUTOR LEGAL	FIRMA DEL INVESTIGADOR
NOMBRE:	NOMBRE:	NOMBRE:
FECHA:	FECHA:	FECHA:

Nota: Para la revocación del consentimiento será suficiente con la firma de uno de los progenitores/tutores legales.

EQUIPO INVESTIGADOR RESPONSABLE DEL PROYECTO

María Francisca Colom Valiente

Microbiología. Facultad de Medicina. UMH.
Miembro de Cirugía en Turkana
Tel. móvil: +34 650629196
Correo electrónico: colom@umh.es

Carmen Hernández Pérez.

Cirugía General. Hospital Clínico San Carlos. Madrid UCM.
Directora Médica de Cirugía en Turkana
Tel. móvil: 619 240 610
Correo electrónico: chp.hcsc@gmail.com

Stephen Omondi Onyango

Director del Laboratorio de Diagnóstico del Hospital de Referencia del Condado de Turkana
Tel. móvil: +254714352001
Correo electrónico: stephenonya1@gmail.com

John Lochuke Ekai

Responsable de Microbiología en el Laboratorio de Diagnóstico del Hospital de Referencia del Condado de Turkana
Tel. móvil: +254724682863
Correo electrónico: jloetash94@gmail.com



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Número admitido a trámite (OIR UMH)	230103203228
Número Expediente:	
Título del proyecto:	ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN TURKANA (KENIA)
Investigador/a principal:	MARÍA FRANCISCA COLOM VALIENTE

Yo.....

(Nombre y apellidos manuscritos por el participante)

He leído esta hoja de información y he tenido tiempo suficiente para considerar mi decisión.
Me han dado la oportunidad de formular preguntas y todas ellas se han respondido satisfactoriamente.

Comprendo que: mi participación / la participación de mi hijo/a o persona a mi cargo es voluntaria.

Comprendo: que puedo retirarme del estudio / que mi hijo/a o persona a mi cargo puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones.

Después de haber meditado sobre la información que me han proporcionado, declaro que mi decisión es la siguiente:

Doy No doy

Mi consentimiento para mi participación / la participación de mi hijo/a o persona a mi cargo en el presente proyecto de investigación, así como para el acceso y utilización de: mis datos personales / los datos personales de de mi hijo/a o persona a mi cargo, en las condiciones detalladas en la hoja de información.

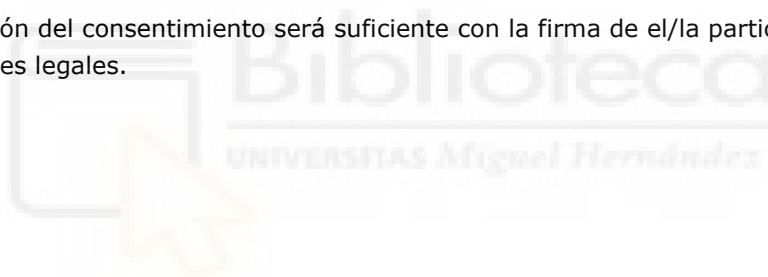
FIRMA DEL PARTICIPANTE (MENOR)	FIRMA DEL PADRE/TUTOR LEGAL	FIRMA DE LA MADRE/TUTOR LEGAL	FIRMA DEL INVESTIGADOR
NOMBRE:	NOMBRE:	NOMBRE:	NOMBRE:
FECHA:	FECHA:	FECHA:	FECHA:

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D/Dña. _____ revoco el consentimiento prestado en fecha y no deseo continuar participando en el estudio "_____".

FIRMA DEL PARTICIPANTE (MENOR)	FIRMA DEL PADRE/TUTOR LEGAL	FIRMA DE LA MADRE/TUTOR LEGAL	FIRMA DEL INVESTIGADOR
NOMBRE:	NOMBRE:	NOMBRE:	NOMBRE:
FECHA:	FECHA:	FECHA:	FECHA:

Nota: Para la revocación del consentimiento será suficiente con la firma de el/la participante o de uno de los progenitores/tutores legales.





EQUIPO INVESTIGADOR RESPONSABLE DEL PROYECTO

María Francisca Colom Valiente

Microbiología. Facultad de Medicina. UMH.
Miembro de Cirugía en Turkana
Tel. móvil: +34 650629196
Correo electrónico: colom@umh.es

Carmen Hernández Pérez.

Cirugía General. Hospital Clínico San Carlos. Madrid UCM.
Directora Médica de Cirugía en Turkana
Tel. móvil: 619 240 610
Correo electrónico: chp.hcsc@gmail.com

Stephen Omondi Onyango

Director del Laboratorio de Diagnóstico del Hospital de Referencia del Condado de Turkana
Tel. móvil: +254714352001
Correo electrónico: stephenonya1@gmail.com

John Lochuke Ekai

Responsable de Microbiología en el Laboratorio de Diagnóstico del Hospital de Referencia del Condado de Turkana
Tel. móvil: +254724682863
Correo electrónico: jloetash94@gmail.com

Dra. Dña. M^a Francisca Colom Valiente
Dpto. Producción Vegetal

Elche, 3 de marzo de 2023

Investigadora	M ^a Francisca Colom Valiente	
Tipo de actividad	Proyecto Nacional	
Título del proyecto	ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN TURKANA (KENIA)	
Códigos GIS estancias donde se desarrolla la actividad	Laboratorio de Micología Médica (S02P1072); Hospital Clínico San Carlos (Madrid); Hospital de Referencia del Condado de Turkana (Kenia)	
Evaluación riesgos laborales	Conforme condicionado	
Evaluación DNSH	No procede	
Evaluación ética uso muestras biológicas humanas	Favorable (Aprobado por el CEIm del Hospital Clínico San Carlos)	
Evaluación ética humanos	Favorable (Aprobado por el CEIm del Hospital Clínico San Carlos)	
Evaluación ética animales	No solicitado	
Registro	2023/4237	
Referencia	DPV.MCV.01.23	
Caducidad	5 años	

Una vez atendidas las observaciones/condiciones mencionadas en el informe adjunto del Servicio de Prevención de Riesgos Laborales, en caso de que las hubiera, se considera que el presente proyecto/contrato/prestación de servicios carece de riesgos laborales significativos para las personas que participan en el mismo, ya sean de la UMH o de otras organizaciones y, por tanto, es conforme.

No se ha evaluado el uso de muestras biológicas humanas porque no se ha solicitado, ni se ha considerado necesario en base a la información aportada.

No se ha evaluado el uso de animales en un proyecto de investigación porque no se ha solicitado, ni se ha considerado necesario en base a la información aportada.

La evaluación de la participación de voluntarios humanos en un proyecto de investigación, desde el punto de vista ético, ha sido evaluado por el CEIm del Hospital Clínico San Carlos, siendo este favorable.

Por todo lo anterior, el dictamen del CEII es **favorable**.

Atentamente,

Alberto Pastor Campos
Secretario CEII
Vicerrectorado Investigación

Domingo Orozco Beltrán
Presidente CEII
Vicerrectorado Investigación





Información adicional:

- En caso de que la presente actividad se desarrolle total o parcialmente en otras instituciones es responsabilidad del investigador principal solicitar cuantas autorizaciones sean pertinentes, de manera que se garantice, al menos, que los responsables de las mismas están informados.
- Le recordamos que durante la realización del proyecto debe cumplir con las exigencias en materia de prevención de riesgos laborales. En concreto: las recogidas en el plan de prevención de la UMH y en las planificaciones preventivas de las unidades en las que se integra la investigación. Igualmente, debe promover la realización de reconocimientos médicos periódicos entre su personal; cumplir con los procedimientos sobre coordinación de actividades empresariales en el caso de que trabaje en el centro de trabajo de otra empresa o que personal de otra empresa se desplace a las instalaciones de la UMH; y atender a las obligaciones formativas del personal en materia de prevención de riesgos laborales. Le indicamos que tiene a su disposición al Servicio de Prevención de la UMH para asesorarle en esta materia.

La información descriptiva básica de la presente actividad de investigación será incorporada al repositorio público de proyectos autorizados por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández. También se puede acceder a través de <https://oir.umh.es/solicitud-de-evaluacion/>



INFORME DE EVALUACIÓN DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE DE 1. TFG (Trabajo Fin de Grado)

Elche, a 9/11/2023

Nombre del tutor/a	Consuelo Ferrer Rodríguez
Nombre del alumno/a	Pablo Fiel Berbejal
Tipo de actividad	Adherido a un proyecto autorizado
Título del 1. TFG (Trabajo Fin de Grado)	Estudio del resistoma de microorganismos aislados de procesos infecciosos en pacientes del condado de Turkana (Kenia)
Evaluación de riesgos laborales	No solicitado/No procede
Evaluación ética humanos	No solicitado/No procede
Código provisional	231107090622
Código de autorización COIR	TFG.GBI.CFR.PFB.231107
Caducidad	2 años

Se considera que la presente actividad no supone riesgos laborales adicionales a los ya evaluados en el proyecto de investigación al que se adhiere. No obstante, es responsabilidad del tutor/a informar y/o formar al estudiante de los posibles riesgos laborales de la presente actividad.

La necesidad de evaluación ética del trabajo titulado: **Estudio del resistoma de microorganismos aislados de procesos infecciosos en pacientes del condado de Turkana (Kenia)** ha sido realizada en base a la información aportada en el formulario online: "TFG/TFM: Solicitud Código de Investigación Responsable (COIR)", habiéndose determinado que no requiere ninguna evaluación adicional. Es importante destacar que si la información aportada en dicho formulario no es correcta este informe no tiene validez.

Por todo lo anterior, **se autoriza** la realización de la presente actividad.

Atentamente,



Alberto Pastor Campos
Jefe de la Oficina de Investigación Responsable
Vicerrectorado de Investigación y Transferencia

Información adicional:

- En caso de que la presente actividad se desarrolle total o parcialmente en otras instituciones es responsabilidad del investigador principal solicitar cuantas autorizaciones sean pertinentes, de manera que se garantice, al menos, que los responsables de las mismas están informados.
- Le recordamos que durante la realización de este trabajo debe cumplir con las exigencias en materia de prevención de riesgos laborales. En concreto: las recogidas en el plan de prevención de la UMH y en las planificaciones preventivas de las unidades en las que se integra la investigación. Igualmente, debe promover la realización de reconocimientos médicos periódicos entre su personal; cumplir con los procedimientos sobre coordinación de actividades empresariales en el caso de que trabaje en el centro de trabajo de otra empresa o que personal de otra empresa se desplace a las instalaciones de la UMH; y atender a las obligaciones formativas del personal en materia de prevención de riesgos laborales. Le indicamos que tiene a su disposición al Servicio de Prevención de la UMH para asesorarle en esta materia.

La información descriptiva básica del presente trabajo será incorporada al repositorio público de Trabajos fin de Grado y Trabajos Fin de Máster autorizados por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández. También se puede acceder a través de <https://oir.umh.es/solicitud-de-evaluacion/tfg-tfm/>





CERTIFICADO DE CAPACITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO COIR TFG/TFM

Se otorga a:

Pablo Fiel Berbejal, con DNI: 51254043S

Por realizar la capacitación previa al inicio del procedimiento de obtención del
CÓDIGO DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE (COIR), con una puntuación de 8 / 10.

FIRMADO POR:
ALBERTO PASTOR CAMPOS
OFICINA DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y
TRANSFERENCIA
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

6/11/2023

Tabla Suplementaria 1. Genes de resistencia a antibióticos encontrados en cada cepa aislada

Cepa	Especie	Genes de resistencia a antibióticos
31	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>APH(3')-Iib, arnA, basS, bcr-1, cprR, cprS, FosA, MexA, MexB, MexC, MexD, MexE, MexF, MexG, MexH, MexI, MexJ, MexK, MexL, mexM, mexN, mexP, mexQ, MexV, MexW, mexX, mexY, MuxA, MuxB, MuxC, OpmB, OpmD, opmE, OpmH, OprJ, OprM, OprN, OXA-50, Paer_catB7, Paer_CpxR, Paer_emrE, Paer_soxR, ParR, ParS, PDC-8, PmpM, rsmA, TriA, TriB, TriC, YajC</i>
48	<i>Escherichia coli</i>	<i>acrB, acrD, AcrE, AcrF, AcrS, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, bacA, catA1, cpxA, CRP, dfrA7, EC-8, Ecol_acrA, Ecol_emrE, Ecol_mdfA, emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, eptB, evgA, evgS, gadW, gadX, H-NS, kdpE, Kpne_KpnE, Kpne_KpnF, Kpne_OmpK37, leuO, LptD, marA, mdtA, mdtB, mdtC, mdtE, mdtF, mdtG, mdtH, MdtK, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, OmpA, PmrF, rosA, rosB, rsmA, sdiA, sul2, TEM-1, tet(D), TolC, ugd, YojI</i>
55	<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>acrB, acrD, AcrE, AcrF, ACT-65, ArnT, bacA, baeR, baeS, cpxA, CRP, dfrA14, Ecol_acrA, Ecol_catII, Ecol_cyaA_FOF, Ecol_EFTu_ENC, Ecol_EFTu_ENC, Ecol_EFTu_ENC, Ecol_EFTu_ENC, Ecol_EFTu_ENC, Ecol_EFTu_ENC, Ecol_EFTu_PLV, Ecol_EFTu_PLV, Ecol_fabG_TRC, Ecol_fabI_MULT, Ecol_folP_SLF, Ecol_GlpT_FOF, Ecol_LamB, Ecol_MarR_MULT, Ecol_mdfA, Ecol_murA_FOF, Ecol_nfsA_NIT, Ecol_ompF_BLA, Ecol_parE_FLO, Ecol_PtsI_FOF, Ecol_rpoB_RIF, Ecol_soxR_MULT, Ecol_uhpA_FOF, Ecol_UhpT_FOF, emrB, emrR, eptB, floR, FosA2, H-NS, Kaer_acrR_MULT, kdpE, Kleb_PhoP_CST, Kpne_KpnE, Kpne_KpnF, Kpne_KpnG, Kpne_OmpK37, Kpne_PBP3_BLA, Kpne_PhoQ_CST, LAP-2, leuO, LptD, marA, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, MdtK, mlaD, mlaF, msbA, OmpA, oqxA, oqxB, PmrF, porin_OmpC, QnrS1, ramA, rosA, rosB, rpsJ, rsmA, sdiA, Sent_gyrA_TRC, Sent_parC_FLO, Sent_ramR, Sent_soxS_MULT, Sser_gyrB_FLO, sul2, tet(A), TolC, ugd, YojI</i>
66	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>APH(3')-Iib, ArmR, arnA, basS, bcr-1, cprR, cprS, FosA, MexA, MexB, MexC, MexD, MexE, MexF, MexG, MexH, MexI, MexJ, MexK, MexL, mexM, mexN, mexP, mexQ, MexV, MexW, mexX, mexY, MuxA, MuxB, MuxC, OpmB, OpmD, opmE, OpmH, OprJ, OprM, OprN, OXA-494, Paer_catB7, Paer_CpxR, Paer_emrE, Paer_soxR, ParR, ParS, PDC-374, PmpM, rsmA, TriA, TriB, TriC, YajC</i>
68	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>AAC(6')-Ig, Abau_gyrA_FLO, Abau_parC_FLO, abeM, adeI, adeJ, adeK, Ecol_EFTu_ENC, Ecol_EFTu_ENC, Ecol_rpoB_RIF, LpxA, LpxC, Mtub_rpsL_STR, OXA-215, qacE, rpsJ, rsmA,</i>
93	<i>Escherichia flexneri</i>	<i>aadA5, acrB, acrD, AcrE, AcrF, AcrF, AcrS, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, bacA, cpxA, CRP, CTX-M-15, dfrA17, EC-14, Ecol_acrA, Ecol_emrE, Ecol_mdfA, emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, eptB, ErmB, evgA, evgS, gadW, gadX, H-NS, kdpE, Kpne_KpnE, Kpne_KpnF, Kpne_OmpK37, leuO, LptD, marA, mdtA, mdtB, mdtC, mdtE, mdtF, mdtG, mdtH,</i>

		<i>MdtK, mdtM, mdtN, mdtO, mdtP, mphA, Mrx, msbA, OmpA, PmrF, qacEdelta1, QnrS1, rosA, rosB, rsmA, sdiA, sul1, sul2, tet(A), TolC, ugd, YojI</i>
L003	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>dfrE, dfrG, efrA, efrB, emeA, ErmB, IreK, lsaA, tet(M)</i>
L006	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>acrB, acrD, AcrE, AcrF, arnA, ArnT, bacA, cpxA, CRP, Ecol_mdfA, emrR, eptA, eptB, FosA6, H-NS, kdpE, Kpne_acrA, Kpne_KpnE, Kpne_KpnF, Kpne_KpnG, Kpne_KpnH, Kpne_OmpK37, leuO, LptD, marA, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, MdtK, mdtM, Mdtq, msbA, OmpA, oqxA, oqxB, PmrF, ramA, rosA, rosB, rsmA, SHV-11, TolC, ugd, YojI</i>
L012	<i>Escherichia coli</i>	<i>acrB, acrD, AcrE, AcrF, AcrF, AcrS, ANT(3'')-IIa, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, bacA, cpxA, CRP, CTX-M-14, dfrA1, EC-8, Ecol_acrA, Ecol_emrE, Ecol_mdfA, emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, eptB, evgA, evgS, gadW, gadX, H-NS, kdpE, Kpne_KpnE, Kpne_KpnF, Kpne_OmpK37, leuO, LptD, marA, mdtA, mdtB, mdtC, mdtE, mdtF, mdtG, mdtH, MdtK, mdtN, mdtO, mdtP, mphA, Mrx, msbA, OmpA, PmrF, rosA, rosB, rsmA, SAT-2, sdiA, sul2, TEM-1, TolC, ugd, YojI</i>
L062	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>arlR, dfrC, mgrA, norA, PCI_blaZ, Saur_LmrS, sdrM, sepA</i>
L065	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>acrB, acrD, acrD, AcrE, AcrF, ArnT, bacA, cpxA, CRP, Ecol_mdfA, emrR, eptA, eptB, FosA6, H-NS, kdpE, Kpne_acrA, Kpne_KpnE, Kpne_KpnF, Kpne_KpnG, Kpne_KpnH, Kpne_OmpK37, leuO, LptD, marA, mdtA, mdtB, mdtC, mdtG, mdtH, MdtK, mdtM, Mdtq, msbA, OmpA, oqxA, oqxB, PmrF, ramA, rosA, rosB, rsmA, SHV-27, TolC, ugd, YojI</i>
L066	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>APH(3')-Ia, APH(3')-IIb, arnA, basS, bcr-1, cprR, cprS, floR, FosA, MexA, MexB, MexC, MexD, MexE, MexF, MexG, MexH, MexI, MexJ, MexK, MexL, mexM, mexN, mexP, mexQ, MexV, MexW, mexX, mexY, MuxA, MuxB, MuxC, OpmB, OpmD, opmE, OpmH, OprJ, OprM, OprN, OXA-50, Paer_catB7, Paer_CpxR, Paer_emrE, Paer_soxR, ParR, ParS, PDC-14, PmpM, rsmA, sul2, tet(D), TriA, TriB, TriC, YajC</i>
L067	<i>Escherichia coli</i>	<i>AAC(6')-Ib8, acrB, acrD, AcrE, AcrF, AcrS, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, bacA, cpxA, CRP, dfrA7, EC-5, Ecol_acrA, Ecol_emrE, Ecol_mdfA, emrA, emrB, emrK, emrR, emrY, eptA, eptB, evgA, evgS, gadW, gadX, H-NS, kdpE, Kpne_KpnE, Kpne_KpnF, Kpne_OmpK37, leuO, LptD, marA, mdtA, mdtB, mdtC, mdtE, mdtF, mdtG, mdtH, MdtK, mdtM, mdtN, mdtO, mdtP, msbA, OmpA, PmrF, qacEdelta1, rosA, rosB, rsmA, sdiA, sul1, sul2, TEM-1, TolC, ugd, YojI</i>

