



## FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

### Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología

Curso 2024/2025

# MICROORGANISMOS RESISTENTES A LOS ANTIMICROBIANOS EN BIOAEROSOL DE AMBIENTES CLÍNICOS

Departamento de Producción Vegetal y Microbiología

**Autor:** Daniel Martí Quiles

**Modalidad:** Experimental

**Tutora:** Consuelo Ferrer Rodríguez

**Cotutoras:** María Francisca Colom Valiente y Noelia Gómez Sánchez

# Índice de Contenidos

## Contenido

<b>1. Introducción.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Resistencia a antimicrobianos.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1. Factores que aceleran la aparición y propagación de la resistencia a los antimicrobianos. ....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.2. Ambientes generadores de resistencia antimicrobiana .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.3. Mecanismos de generación y propagación .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.4. Mecanismos de resistencia .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2. Transferencia horizontal de material genético.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3. Elementos que participan en la transmisión horizontal.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1. Integrones.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4. Aerosoles.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5. Microbiota y organismos patógenos de las vías respiratorias.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Antecedentes, hipótesis y objetivos .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. Antecedentes .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2. Hipótesis .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3. Objetivos.....</b>	<b>14</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Diseño del estudio .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Consideraciones éticas.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3. Toma de muestras .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.1. Controles .....</b>	<b>16</b>
<b>3.4. Datos o variables del estudio.....</b>	<b>16</b>
<b>3.5. Procesado y cultivo de los filtros.....</b>	<b>17</b>
<b>3.6. Identificación de microorganismos .....</b>	<b>17</b>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2. Detección de microorganismos por cultivo.....</b>	<b>22</b>
<b>4.3. Estudio de resistencias .....</b>	<b>24</b>
<b>4.4. Detección integrones e identificación de cassettes .....</b>	<b>25</b>
<b>5. Discusión.....</b>	<b>26</b>
<b>6. Conclusiones y proyección futura.....</b>	<b>30</b>
<b>6.1. Conclusiones .....</b>	<b>30</b>
<b>6.2. Proyección futura.....</b>	<b>31</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>31</b>

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

- HUSJ: Hospital Universitario de San Juan
- RAM: Resistencia a antimicrobianos
- UMH: Universidad Miguel Hernández
- micras ( $\mu\text{m}$ ): micrómetros
- PM10: partículas de 10 micras
- PM2,5: partículas de 2,5 micras
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa-Polimerase Chain Reaction
- AN: agar nutritivo
- AS: agar sangre
- SDA: Sabouraud Dextrose Agar
- BHI: Brain Heart Infusion
- UBNI: Unidad de Broncoscopia y Neumología Intervencionista
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- RNA: Ácido ribonucleico
- rRNA: Ácido ribonucleico ribosómico
- ITS: Espaciador interno - Internal Transcribed Spacer
- MDR: Multirresistente a antibióticos - Multidrug resistance.
- TBE: Tris-Borato-EDTA
- ARGs: Genes de resistencia a antimicrobianos
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

## RESUMEN

Introducción: La resistencia a antimicrobianos es un fenómeno evolutivo en el cual los microorganismos desarrollan mecanismos que les permiten sobrevivir y proliferar en presencia de antimicrobianos, aumentando la mortalidad asociada a estos. El objetivo de este trabajo es detectar la presencia de resistencias antimicrobianas y su transmisión por vía aérea mediante el estudio de bioaerosoles expulsados por pacientes en ambientes clínicos. Materiales y Métodos: Este estudio se trata de un trabajo prospectivo y observacional. Se recolectaron muestras de aerosoles usando captadores de aire con filtros de cuarzo en salas de broncoscopias. Los aislamientos obtenidos a partir de los cultivos fueron evaluados para detectar resistencia a ampicilina. Aquellos resistentes fueron probados frente a otros cinco antibióticos de diferentes familias. Los aislados bacterianos además fueron analizados para la detección de integrones mediante PCR y secuenciación. Resultados: Se recogieron 34 filtros con un total de 123 aislamientos que correspondieron a 116 bacterianos y 7 fúngicos. De los aislamientos bacterianos, 31 (26,7%) fueron resistentes a ampicilina y 10 (8,6%) de ellas fueron multirresistentes. Finalmente, el estudio de integrones reveló la presencia de 11 integrones secuenciados. Discusión: Los resultados confirmaron la presencia de varios géneros asociados al microbioma humano y a enfermedades nosocomiales, también se observaron patrones de resistencias a diferentes antibióticos y la presencia de integrones.

Palabras clave: Resistencias antimicrobianas, bioaerosoles, broncoscopia, microbiota, patógenos, exposición ocupacional.

## ABSTRACT

Introduction: Antimicrobial resistance is an evolutionary phenomenon in which microorganisms develop mechanisms that allow them to proliferate in the presence of antimicrobials, increasing mortality associated with these microorganisms. The objective of this study was to detect the presence of antimicrobial resistance and its airborne transmission by studying bioaerosols expelled by patients in clinical settings. Materials and Methods: This is a prospective and observational study. Aerosol samples were collected using air collectors with quartz filters in bronchoscopy rooms. Isolates obtained from cultures were evaluated against ampicillin. Resistant ones were tested against five other antibiotics from different families. Bacterial isolates were also analyzed for integron detection by PCR and sequencing. Results: 34 filters were collected with a total of 123 isolates, 116 bacterial and 7 fungal. Of the bacterial isolates, 31 (26.7%) were resistant to ampicillin and 10 (8.6%) of them were multiresistant. Finally, the integron study revealed the presence of 11 sequenced integrons. Discussion: The results confirmed the presence of several genera of the human microbiome and bacteria associated with nosocomial diseases. Resistance patterns to different antibiotics and the presence of integrons were also observed. Keywords: Antimicrobial resistance, bioaerosols, bronchoscopy, microbiota, pathogens, occupational exposure.

# 1. Introducción

## 1.1. Resistencia a antimicrobianos

Los antimicrobianos usados para tratar las infecciones bacterianas son los antibióticos o antibacterianos. Su acción consiste en interferir con las funciones vitales de las bacterias, como la síntesis de la pared celular, proteínas o ácidos nucleicos. Según su mecanismo de acción, estos se pueden clasificar en diferentes categorías: inhibidores de la síntesis de la pared celular ( $\beta$ -lactámicos, glucopéptidos), inhibidores de la síntesis proteica (aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos), inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (quinolonas, rifamicinas) y finalmente aquellos que interfieren con las vías metabólicas (sulfonamidas) [1, 2].

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es el proceso por el cual los microorganismos desarrollan mecanismos que les permiten sobrevivir y proliferar en presencia de antimicrobianos, como antibióticos. Esta adaptación reduce la eficacia de estos fármacos, dificultando el tratamiento de infecciones y aumentando la morbilidad y mortalidad asociadas a estas [3].

### 1.1.1. Factores que aceleran la aparición y propagación de la resistencia a los antimicrobianos.

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno que aparece de forma natural con el tiempo, generalmente por modificaciones genéticas. Sin embargo, hay diversos factores que aceleran la aparición y propagación de estas resistencias, entre ellos destacan: el uso excesivo e indiscriminado de antimicrobianos, así como su uso indebido y abusivo en granjas o agricultura, provocando una presión selectiva a las bacterias que después se diseminan a otros entornos; factores socioeconómicos como la falta de acceso a agua potable, saneamiento adecuado y atención médica de calidad; y, por último, la transferencia horizontal de genes, siendo este último el principal mecanismo de diseminación de resistencias a antimicrobianos en bacterias [3, 4, 5].

### 1.1.2. Ambientes generadores de resistencia antimicrobiana

Los principales ambientes que contribuyen a la generación y propagación de la RAM incluyen:

Hospitales y centros de salud: Son los entornos de mayor uso de antibióticos y en estos también se suelen encontrar pacientes que a menudo sufren infecciones resistentes, de manera que se suelen generar residuos de medicamentos y microorganismos resistentes, los cuales se excretan a través de las heces, orina y otras secreciones, que se acumulan en el ambiente hospitalario y se dispersan desde él [6, 7].

Aguas residuales: Otra fuente importante de residuos de antibióticos y microorganismos resistentes son las aguas residuales de hogares, industrias farmacéuticas o plantas de producción de antibióticos. Muchas plantas de tratamiento de aguas residuales no eliminan o inactivan completamente estos compuestos, por lo que se realiza la liberación de estos residuos en el medio ambiente [8, 9, 13].

Agricultura y ganadería: El uso excesivo de antimicrobianos en la producción animal (ganado, acuicultura) y en agricultura, ya sea como promotores de crecimiento o para el control de enfermedades, contribuye significativamente a la carga de bacterias resistentes y genes de resistencia en el ambiente [10, 11,12].

### **1.1.3. Mecanismos de generación y propagación**

La resistencia antimicrobiana se genera y propaga a través de varios mecanismos en estos ambientes:

Presión selectiva: La presencia de antimicrobianos en el ambiente selecciona a las bacterias que ya poseen mecanismos de resistencia o que desarrollan nuevas mutaciones. Solo las cepas resistentes sobreviven y se multiplican.

Transferencia horizontal de genes (THG): Las bacterias pueden intercambiar genes de resistencia entre sí a través de plásmidos y otros elementos genéticos móviles. Este es un mecanismo clave para la rápida diseminación de la resistencia en diversos ambientes y entre diferentes especies bacterianas.

Mutaciones espontáneas: Los microorganismos pueden desarrollar mutaciones aleatorias en su DNA que les confieren resistencia a los antimicrobianos. Si estas mutaciones son ventajosas en un ambiente con antibióticos, la cepa mutante prosperará. [5]

### **1.1.4. Mecanismos de resistencia**

Esta resistencia a los antimicrobianos se ve producida debido a diferentes mecanismos de resistencias, siendo algunos más comunes que otros. Entre los principales se encuentra:

En primer lugar, la disminución de la permeabilidad de la membrana, que impide la entrada del antimicrobiano en la bacteria. Muchos antibióticos utilizados clínicamente tienen dianas bacterianas intracelulares o ubicadas en la membrana citoplasmática en el caso de las gramnegativas y es por esta misma razón, que este mecanismo tiene una mayor importancia en estas bacterias. Se han descrito varios tipos de porinas, las cuales pueden clasificarse según su estructura, selectividad y

la regulación de su expresión.

En segundo lugar, la producción de estructuras bacterianas complejas capaces de extrudir el compuesto antimicrobiano fuera de la célula, también conocidas como bombas de eflujo, puede resultar en un mecanismo de resistencia a los antimicrobianos bastante prevalente. Existen cinco familias principales de bombas de eflujo, las cuales difieren en su estructura y permiten afectar a un rango amplio de antimicrobianos diferentes.

Otra de las estrategias más comunes y eficaces para hacer frente a la presencia de antibióticos es la modificación enzimática del compuesto. En este caso, se producen enzimas que inactivan al fármaco, añadiendo fracciones químicas específicas al compuesto que permiten la inactivación o destrucción de la molécula al completo, haciendo que el antibiótico sea incapaz de interactuar con su objetivo.

Finalmente, las bacterias desarrollan otro sistema de protección que es evitar la acción del antibiótico interfiriendo en su sitio diana. Para lograrlo, se han desarrollado diferentes tácticas, como la protección del sitio diana, la cual funciona impidiendo que el antibiótico alcance su sitio de unión, o modificaciones puntuales del sitio diana que resultan en una menor afinidad por el antibiótico [14].

Todas estas estrategias están codificadas en genes, y esos genes son susceptibles de transmitírseles unas a otras.

## **1.2. Transferencia horizontal de material genético**

La transferencia horizontal de genes es un mecanismo encontrado en organismos procariontes que consiste en el intercambio de material genético entre organismos que no mantienen una relación progenitor-descendiente. Este es un mecanismo ampliamente reconocido por su importancia en la transferencia de genes de resistencia a antibióticos y patogenicidad microbiana [15]. Los mecanismos más comunes de transmisión horizontal de genes son (figura 1):

- **Transformación:**

La transformación ocurre cuando las bacterias naturalmente en un estado de competencia captan DNA extracelular que se encuentra libre en el medio y estabilizado, y posteriormente lo integran en su genoma mediante recombinación homóloga [16].

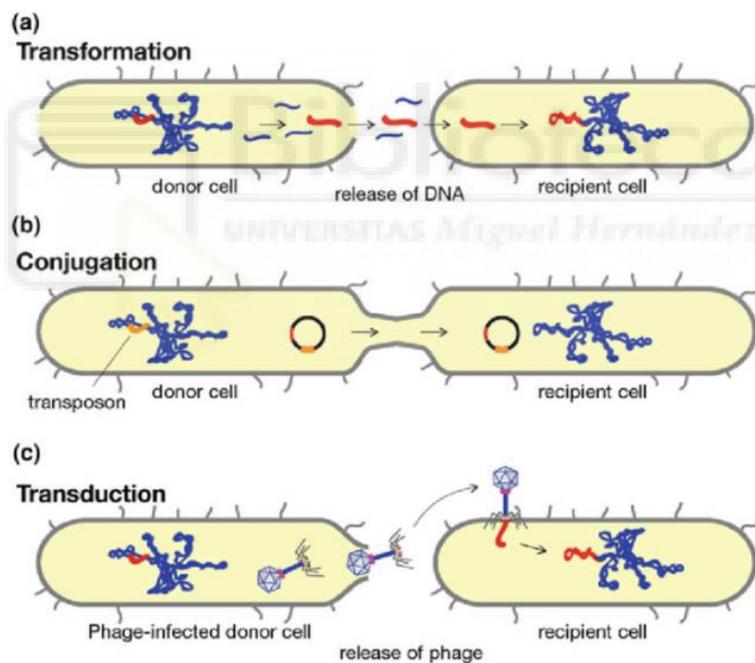
- **Transducción:**

La transducción se define como la transferencia de genes bacterianos producida y mediada por un bacteriófago en infecciones sucesivas. Ocurre cuando, después de una

primera infección, el DNA bacteriano es integrado erróneamente en la cápside del bacteriófago. Posteriormente, al infectar una segunda bacteria receptora, el bacteriófago inyecta en ella el DNA bacteriano. De esta forma, el proceso de transducción finaliza cuando el DNA bacteriano transferido se integra correctamente en el genoma de la célula receptora [16].

- Conjugación:

La conjugación es la transferencia de DNA de un plásmido a través de un proceso de múltiples pasos que requiere la interacción con el pili conjugativo y la maquinaria conjugativa, normalmente codificada en el plásmido [17]. Los plásmidos son elementos genéticos independientes del cromosoma principal que se replican de forma independiente de este. Son elementos que permiten la transferencia de una gran cantidad de genes, pero su permanencia mejora cuando portan genes que resultan de utilidad para la célula huésped, como por ejemplo los genes de resistencia a antimicrobianos donde están presentes [16].



**Figura 1.** Mecanismos de transmisión horizontal en bacterias, obtenida de *Evolutionary Biology: Genome Evolution, Speciation, Coevolution and Origin of Life* [18].

### 1.3. Elementos que participan en la transmisión horizontal

A parte de los mecanismos observados anteriormente, existen una amplia serie de elementos que intervienen en la transferencia horizontal de genes:

- Plásmidos:

Se tratan de moléculas de ADN extracromosómico generalmente circulares y que se replican de forma autónoma al cromosoma, estos son elementos genéticos móviles especialmente importantes en la transmisión horizontal por su capacidad de transferir una gran cantidad de genes y generalmente son transferidos mediante el mecanismo de conjugación.

- ICEs (Elementos Integrativos y Conjugativos):

Son elementos genéticos móviles que se pueden integrar en el cromosoma bacteriano. Estos requieren de otros mecanismos para transferirse. Empleando por ejemplo la conjugación, pueden transferirse y después integrarse en el cromosoma del receptor, de manera que pueden mantenerse permanentes o seguir transfiriéndose a otros organismos.

- Transposones:

Los transposones son elementos genéticos que pueden moverse y reinsertarse entre replicones mediante el uso de la enzima transposasa. Sin embargo, estos no son capaces de transferir DNA entre diferentes microorganismos, por lo que para hacerlo necesitan de otros mecanismos, como estar presentes en un plásmido conjugativo u otros elementos integrativos y conjugativos.

- Bacteriófagos:

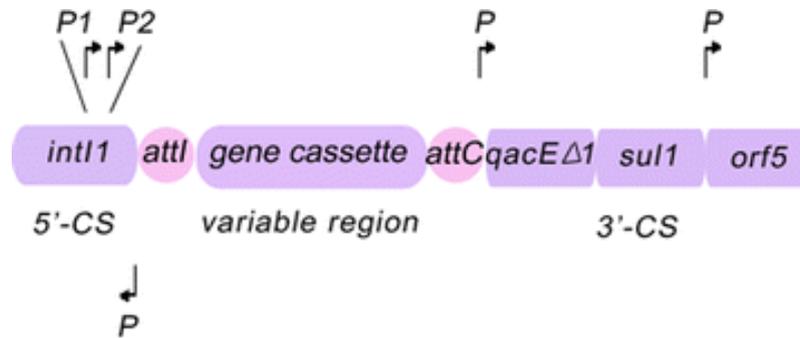
Los bacteriófagos son virus que infectan exclusivamente a organismos bacterianos. Como hemos mencionado en el apartado anterior, estos fagos son capaces de transmitir genes bacterianos durante su ciclo viral [19].

### 1.3.1. Integrones

Los integrones son elementos genéticos que presentan un sistema de reconocimiento y recombinación específico de sitio, de manera que le permite reconocer e integrar cassettes génicos en su estructura. Estas estructuras destacan especialmente por su participación en la transferencia de genes de resistencia a antimicrobianos entre diferentes colonias bacterianas. Sin embargo, los integrones no son móviles por sí mismos y requieren formar parte de otros elementos móviles que les sirvan como vehículos para su transmisión [19]. Estos presentan la siguiente estructura general (figura 2):

- Un gen que codifica una integrasa (*intI*), encargada de producir la recombinación específica, este además presenta un promotor (Pc) que permite la transcripción de los genes integrados, ya que carecen de un promotor propio.

- Un sitio de recombinación específico (*attI*), que identifica los cassettes génicos.
- Una región variable, la zona donde se insertarán los cassettes integrados. [20]



**Figura 2.** Estructura general de un integrón de tipo 1. Imagen obtenida de Deng, Y., Bao, X., Ji, L. et al. [21].

Se ha analizado en abundancia la presencia de integrones en diferentes familias bacterianas, principalmente de *Enterobacteriaceae* y otras bacterias gramnegativas como *Pseudomonas* y *Vibrio*, aunque también se han descrito en algunas bacterias grampositivas como por ejemplo *Corynebacterium* [22].

Existen integrones de diferentes clases, que se diferencian principalmente en la secuencia de la integrasa (*intI*). Los integrones de clase 1 son los más implicados en la diseminación de la resistencia a los antibióticos y más comunes en ambientes clínicos [22] y por lo tanto en los que se centra este estudio. Estos presentan en su estructura dos segmentos conservados, estos son el extremo 3'-CS (conserved segment) y 5'-CS los cuales incluyen los cassettes génicos en la región variable entre ellos [23]. La región 5'-CS codifica para el gen de la integrasa (*intI*) que reconoce las estructuras *attI* y *attC*. La secuencia *attI* permite a la integrasa identificar los posteriores cassettes génicos. Los cassettes génicos son regiones de tamaño y función variables, sin embargo, presentan una región conservada denominada *attC*, esta consiste en una secuencia codificante que presenta repeticiones invertidas imperfectas. La región *attC* tiene su importancia porque forma parte del proceso de integración y escisión de los cassettes mediado por la integrasa. En este, la integración se produce por un mecanismo de recombinación específica de sitio, en el que la integrasa reconoce el gen *attI* y el *attC* del cassette génico y realiza la recombinación entre ambas secuencias. [22]

Estos cassettes génicos suelen conferir resistencia a los antibióticos de los grupos de los  $\beta$ -lactámicos y los aminoglucósidos, aunque también codifican con elevada frecuencia genes relacionados con la resistencia a trimetoprima, cloranfenicol y las quinolonas [24].

Finalmente, la región 3'-CS del integrón de clase 1 contiene la información genética conservada de 3 marcos de lectura abiertos, un primero que codifica para el gen *qacE1*, que confiere resistencia a amonios cuaternarios, el segundo correspondiente al gen *sul1*, que confiere resistencia a las sulfonamidas y finalmente el tercer marco, *orf5*, el cual no presenta una función conocida hasta el

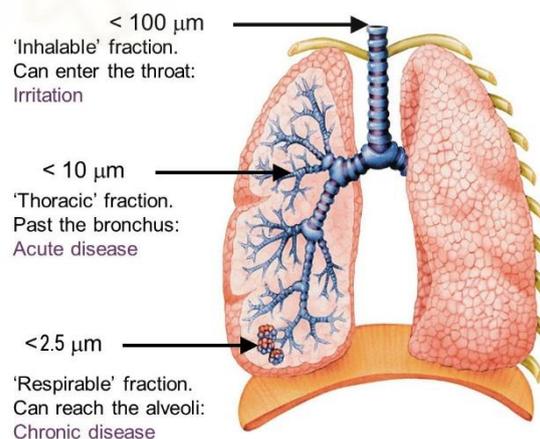
momento [22].

#### 1.4. Aerosoles

Una de las vías por las cuales las bacterias pueden diseminarse es a través del aire, desplazándose desde una fuente o reservorio hasta alcanzar nuevos nichos ecológicos. Este proceso ocurre mediante su incorporación en aerosoles, los cuales se definen como una suspensión de partículas sólidas o líquidas en fase gaseosa. Por lo general, estos pueden clasificarse según su naturaleza, tamaño y método de generación.

La naturaleza de los aerosoles depende de su origen, estos pueden proceder de la resuspensión de partículas del suelo, de los mares y océanos, incendios forestales, biogénicos o aerosoles secundarios que se producen al llevarse a cabo reacciones químicas [25].

Según su tamaño, los aerosoles en la naturaleza existen en un amplio espectro, estos pueden ser grandes ( $100\ \mu\text{m} > 10\ \mu\text{m}$ ) que duran poco tiempo en suspensión en el aire y quedan atrapados en las vías respiratorias altas, medianos o PM10 ( $10\ \mu\text{m} > a > 2,5\ \mu\text{m}$ ) los cuales se mantienen en el aire más tiempo y pueden llegar a la fracción torácica, o finos o PM2,5 ( $< 2,5\ \mu\text{m}$ ), los cuales pueden llegar a los alveolos y se mantienen mayor tiempo en suspensión [26]. Sin embargo, es difícil predecir el tamaño exacto de las partículas en un momento determinado, ya que su existencia depende de diferentes parámetros meteorológicos [25] (figura 3).



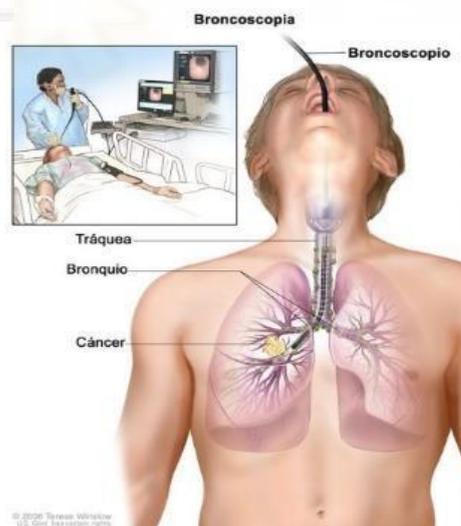
**Figura 3.** Clasificación de los aerosoles en función de su tamaño [26].

Finalmente, según su método de generación, los aerosoles pueden formarse de forma natural o mediante intervenciones antropogénicas. Los aerosoles naturales son el polvo, la niebla y la neblina. Por otra parte, los bioaerosoles son partículas de origen biológico transportadas por el aire, esto incluye hongos, bacterias, virus y polen, así como fragmentos de estos o sus productos metabólicos, como diferentes toxinas [25, 27].

Los bioaerosoles infecciosos son una subcategoría de los bioaerosoles, los cuales concretamente se componen por microorganismos patógenos, estos son un factor muy importante en la transmisión de enfermedades infecciosas y es uno de los principales causantes de morbimortalidad en el planeta [28, 29]. Esta exposición, además, se vuelve más peligrosa cuando los microorganismos presentes en estos aerosoles contienen elementos de resistencia y dificultan el tratamiento. Además de su presencia, estos elementos pueden transferirse de un microorganismo a otro mediante la transferencia horizontal de genes [25].

Estos bioaerosoles se generan en altas concentraciones en ciertos procedimientos médicos denominados “Procedimientos médicos generadores de aerosoles”. Algunos de estos procedimientos generadores de aerosoles son: la reanimación cardiopulmonar, la intubación y extubación endotraqueal, la ventilación no invasiva o manual y la broncoscopia, y son considerados como tales por la Organización mundial de la salud (OMS) y los centros para control y prevención de enfermedades (CDC) [30].

Este estudio se enfocará en el análisis de los aerosoles expulsados por pacientes durante el desarrollo de procedimientos de broncoscopias (figura 4). La broncoscopia es un procedimiento médico que permite visualizar y tomar muestras de las vías respiratorias para diagnosticar enfermedades pulmonares. Para este procedimiento se usa un broncoscopio, el cual es un dispositivo que consta de un tubo de 1,27 centímetros de ancho y aproximadamente 60 de largo que se introduce a través de la nariz o boca y permite observar el interior de las vías respiratorias y los pulmones [31].



**Figura 4.** Esquema de la broncoscopia. Imagen tomada de la página web del NIH [32].

### **1.5. Microbiota y organismos patógenos de las vías respiratorias**

Como se ha comentado anteriormente, durante la realización del procedimiento de broncoscopias, se provoca la expulsión de bioaerosoles, los cuales consistirán principalmente en

microorganismos de la microbiota del sistema respiratorio.

El microbioma pulmonar incluye diferentes géneros de bacterias, la mayor parte siendo aeróbica. Entre los géneros más presentes se encuentran *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Proteus* y *Haemophilus*. Aunque también se pueden encontrar géneros como *Clostridium*, *Veillonella* y *Porphyromonas*, que son anaerobios especializados [33].

Las poblaciones de hongos también son diversas, los taxones más comunes son *Malassezia*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Dictyostelium* y *Fusarium*, aunque también están presentes en menor medida *Aspergillus*, *Davidiellaceae* y *Eurotium*[33].

También es importante mencionar que cada paciente tiene un microbioma pulmonar único y de alta resiliencia, generalmente controlado por una o varias especies colonizadoras importantes, como *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* o *Achromobacter* [33].

En cuanto a las resistencias antimicrobianas encontradas en aerosoles, existen numerosos estudios donde se ha descrito su presencia [34, 35, 25]. Se ha encontrado que los microorganismos de las vías respiratorias muestran una alta abundancia de genes de resistencia a tetraciclinas y al grupo MLSB (macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B) [34]. Por su parte, cuando se estudiaron muestras ambientales de polvo y aire, se observó que presentaron una distribución similar de clases de ARGs, siendo comunes los genes de resistencia a aminoglucósidos y la presencia de varias cepas multirresistentes [25].

Finalmente, en diversos estudios también se ha podido confirmar que en muestras de aerosoles recogidas en entornos hospitalarios hay una gran carga de microorganismos con genes de resistencia a antimicrobianos, representando de esta forma un gran riesgo para la salud pública. El uso intensivo de los antibióticos para diferentes infecciones en estos entornos provoca una gran presión selectiva que después promueve la propagación de microorganismos resistentes que pueden ser posteriormente transmitidos por vía aérea, este efecto se puede amplificar si además hay una ventilación insuficiente o una alta densidad de pacientes en este entorno. En estos estudios se observó la presencia de genes que confieren resistencia a tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos y sulfonamidas [34, 35, 25].

## **2. Antecedentes, hipótesis y objetivos**

### **2.1. Antecedentes**

El laboratorio de Micología del departamento de Producción Vegetal y Microbiología de la Universidad Miguel Hernández (UMH), en colaboración con el departamento de Física Aplicada de la

UHM, empezó hace cinco años una línea de investigación para conocer el riesgo del personal sanitario a los bioaerosoles, comenzando con la detección de aerosoles de SARS-CoV-2 en entornos con pacientes COVID-19 [36]. Esta línea de estudio continuó en años posteriores con la medición del riesgo ocupacional en personal sanitario extrahospitalario, en concreto en clínicas odontológicas donde se valoraba la carga y diversidad microbiana a la que se enfrentan los profesionales odontológicos. En este se estudió la presencia de bacterias y hongos, así como la de los virus respiratorios Influenza A/B, VSR y SARS-CoV-2 en los aerosoles generados durante las prácticas odontológicas.

El año pasado se amplió el estudio para conocer el riesgo ocupacional en ambientes clínicos, para ello se contó con el Hospital Universitario de San Juan y el Hospital Universitario del Vinalopó. En este estudio se valoró la carga y diversidad microbiana (bacterias, hongos y virus respiratorios) a la que está expuesto el personal sanitario durante la realización de broncoscopias.

Dentro de esa línea de investigación, se plantea el presente trabajo, en el que se pretende estudiar si además de estar expuestos a microorganismos patógenos, en qué grado esta exposición es a microorganismos resistentes a antimicrobianos.

## **2.2. Hipótesis**

Los aerosoles generados durante la realización de broncoscopias en pacientes con enfermedades respiratorias contienen microorganismos portadores de genes de resistencia a antibióticos, lo que supone un riesgo de exposición tanto para los profesionales de la salud como para otros pacientes, y podría facilitar la transferencia horizontal de dichos genes en el entorno clínico.

## **2.3. Objetivos**

El objetivo principal es caracterizar la composición microbiana y las resistencias a los antimicrobianos presentes en bioaerosoles generados por las vías respiratorias humanas en entornos clínicos.

Y los objetivos secundarios son:

- Determinar la abundancia de microorganismos en bioaerosoles de pacientes generados durante las broncoscopias
- Identificar las resistencias a antimicrobianos mediante técnicas basadas en cultivo de los microorganismos aislados de bioaerosoles.

- Observar la presencia de genes de resistencia en cassettes génicos presentes en integrones en los microorganismos aislados de los bioaerosoles.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Diseño del estudio**

Este estudio es un trabajo prospectivo y observacional. En este se han obtenido muestras de bioaerosoles producidos durante la realización de broncoscopias en la Unidad de Broncoscopia y Neumología Intervencionista (UBNI) del Hospital Universitario de San Juan. La toma de muestras se realizó entre el 9 de diciembre del 2024 y el 15 de mayo del 2025. Se recogieron los aerosoles procedentes de aquellos pacientes que, a juicio clínico, necesitaban una broncoscopia por motivos ajenos al estudio. Se excluyeron del estudio aquellos aerosoles en los que la sospecha clínica del paciente fuera de tuberculosis, debido a que no se podía cumplir el nivel de bioseguridad necesario para trabajar con este tipo de muestras.

El análisis de las muestras se realizó en el laboratorio de Micología Médica del dpto. de Producción Vegetal y Microbiología de la UMH.

#### **3.2. Consideraciones éticas**

Este estudio ha sido aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario de San Juan y de la Universidad Miguel Hernández, código COIR: TFG.GBI.CFR.DMQ.250205. (Anexo 1). Todos los procedimientos han sido diseñados de acuerdo con los principios éticos para la investigación médica en seres humanos (declaración de Helsinki de la AMM; reglamento de la UE -UE2016/679 de 27 de abril- y ley española 3/2018 de 5 de diciembre- sobre investigación biomédica).

#### **3.3. Toma de muestras**

La captación de los bioaerosoles se realizó mediante el uso de filtros de cuarzo (Whatman 37mm) incorporados en un cabezal de fracción de aire PM<sub>10</sub>, el cual nos permitirá captar las partículas de un diámetro de 10 µm, conectado a un captador de aire con flujo de 10L/min modelo "personal impactors model 200" (figura 5).



**Figura 5.** A) Captador de aire “Personal Impactors Model 200”. B) Cabezal PM<sub>10</sub>. C) Filtros de cuarzo. Imagen de la web de Fisher Scientific [37].

El captador de aire se colocó enganchado a la altura del pecho en la solapa del uniforme del personal sanitario. Durante la realización de las broncoscopias, el sistema se mantenía con toma de flujo de aire a lo largo de la duración de estas (Figura 6). El captador fue reemplazado junto con el filtro para cada paciente al que se le realizaba la broncoscopia, por lo que cada filtro contenía la muestra de un único paciente. Terminado el procedimiento, el cabezal con el filtro se intercambiaba con uno nuevo y el recién tomado se colocaba en una bolsa cerrada en condiciones estériles mientras se transportaba al laboratorio.



**Figura 6.** Colocación del captador de aire para la toma de muestras.

### 3.3.1. Controles

Junto con la toma de muestras de filtros de broncoscopias también se realizó la toma de filtros de controles ambientales para garantizar la validez del estudio. Cada uno de estos se realizó en la sala de broncoscopia antes de la elaboración de la primera broncoscopia del día con la sala vacía, los filtros que se colectaron en este proceso se trabajaron idénticamente a los tomados de muestras de pacientes.

### 3.4. Datos o variables del estudio

Durante la toma de muestras se registraban las siguientes variables: duración del muestreo, la sospecha clínica del paciente, la temperatura, la humedad relativa de la sala y el volumen de aire total recogido.

### 3.5. Procesado y cultivo de los filtros

Una vez en el laboratorio de Micología Médica de la UMH, el filtro se dividió en 4 fragmentos: 2 de ellos se cultivaron para la detección de bacterias en medios de Agar Sangre (AS), y *Brain-Heart infusion* (BHI), uno para la detección de hongos en Agar Sabouraud (SDA) y el fragmento restante se almacenó a  $-18^{\circ}\text{C}$  por si fuera necesario realizar un estudio adicional (figura 7). Una vez colocado el 1/4 de filtro en el centro de la placa de Petri con el correspondiente medio, se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  en aerobiosis durante 48-72 horas.

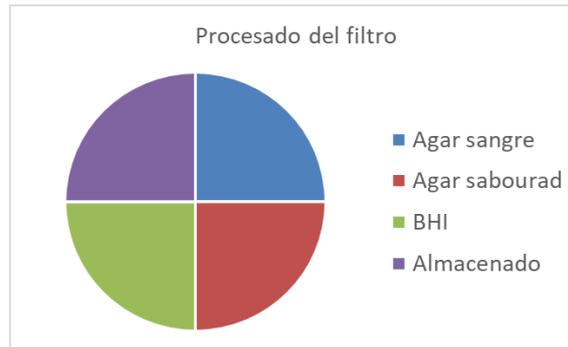


Figura 7. Esquema de procesado de filtros.

### 3.6. Identificación de microorganismos

Para identificar las poblaciones bacterianas y fúngicas, se observó el crecimiento de colonias en el filtro, analizando sus diferencias en color y forma, y se realizó un conteo de estas. Posteriormente, se realizó la extracción de DNA de todas las colonias bacterianas y fúngicas, mediante el uso de la matriz comercial *InstaGene™* de Bio-Rad y del sistema comercial *DNeasy blood and tissue kit®* de Qiagen, respectivamente.

- Extracción de DNA bacteriano.

Brevemente, el protocolo consiste en resuspender una colonia en  $150\mu\text{L}$  de matriz *Instagene™* en un tubo eppendorf estéril, posteriormente tras agitar se incubó a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos y después a  $100^{\circ}\text{C}$  durante otros 8 minutos. Finalmente se centrifuga a 6000rpm durante un minuto y se recoge el DNA, el cual se encuentra situado en el sobrenadante para su posterior amplificación[38].

- Extracción de DNA fúngico.

Para la extracción del DNA de los hongos aislados se utilizó el sistema comercial *DNeasy blood and tissue kit®* de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. El método se basa en columnas spin de sílice, el cual no emplea cloroformo ni formol. Este kit emplea varios sistemas de tampones de lisis e incluye las columnas de homogeneización que permitirán la purificación mediante filtración del lisado, finalmente se eliminan las impurezas

con diversos pasos de lavado y filtrado del kit para así obtener el DNA listo para su amplificación por PCR [39].

### 3.6.1. Amplificación de DNA bacteriano y fúngico

Con el objetivo de amplificar la región V1-V3 específica del gen rRNA 16S en el caso de bacterias y la región ITS1-5.8S-ITS2 en el de los hongos, se realizó una PCR convencional. Las regiones amplificadas y los primers utilizados se muestran en la Tabla 1 y figuras 8 y 9.

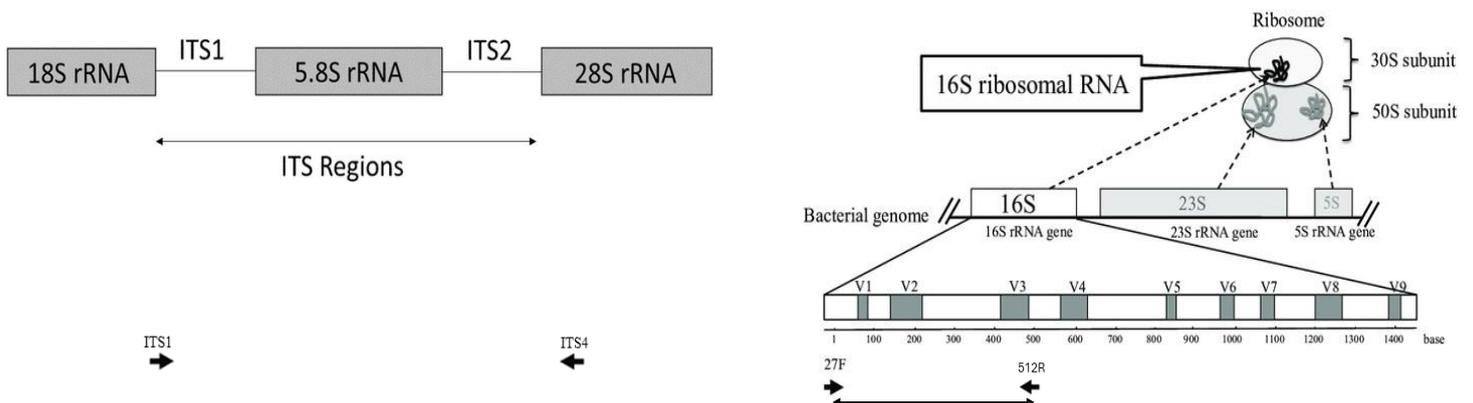
**Tabla 1.** Primers de la amplificación de las regiones seleccionadas de bacterias y hongos

Primer	Región hibridación	Secuencia	Referencia	Fragmento
Bac-F (27F)	16S rRNA	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	Kim et al. 2012	515 pb
Bac-R (512R)	16S rRNA	TTACCGCGGCKGCTGGCAC	Kim et al. 2012	
ITS1	18S RNA gene	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Ferrer et al. JCM 2001	500-850 pb
ITS4	28S RNA gene	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Ferrer et al. JCM 2001	

Las condiciones de la PCR en ambos casos fueron las mismas y se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Protocolo de amplificación por PCR llevado a cabo para la amplificación bacteriana

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo	Proceso
1	95 °C	5 min	Desnaturalización inicial
40	95 °C	30 seg	Desnaturalización
	55 °C	1 min	Hibridación sonda
	72 °C	1 min	Extensión
1	72 °C	5 min	Extensión final



**Figuras 8 y 9.** Región del genoma en el que se muestra dónde hibridan los primers y la región que amplifican. Fuente: Modificado de Fukuda et al. J UOEH 2016 (figura 8), Modificado de Krystin GenoHub blog 2023 (figura 9).

### 3.6.2. Electroforesis y secuenciación del DNA

Para confirmar que la PCR ha tenido éxito en la amplificación del DNA, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2 % en TBE con una duración de 30 minutos a 100 voltios. Si la

amplificación ha ocurrido correctamente, se debe observar un fragmento en la zona de  $\approx 500$  pb en el caso de bacterias y de entre 400-700 pb en el caso de Hongos.

La preparación del DNA para su posterior secuenciación consiste en eliminar el exceso de cebadores lineales y dNTPs no incorporados, esto se realizó mediante el *kit ExoProStar™* de Illustra™, el cual consiste en una exonucleasa de tipo I, que degrada el DNA monocatenario y una fosfatasa alcalina que elimina los dNTPs no incorporados [40].

Una vez se obtuvo el DNA limpio las muestras se enviaron a una empresa externa (STABVIDA) para realizar una secuenciación por el método Sanger.

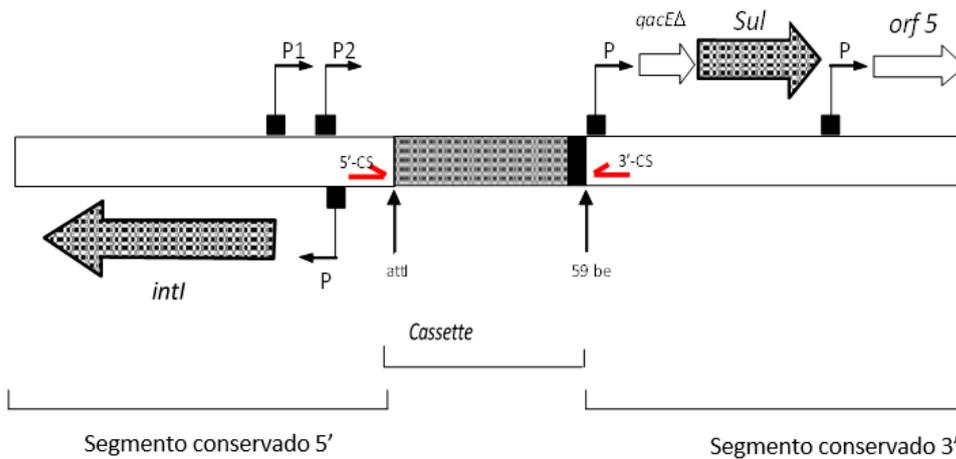
### **3.7. Detección de resistencias mediante difusión en placa**

La sensibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos puede ser valorada *in vivo* mediante el método de difusión en placa de Kirby-Bauer. En este se inocular la cepa en medio de Müller-Hinton y se colocan discos de antibióticos de concentración conocida; tras su incubación durante 24 horas a 37°C se procedió a la medición del diámetro de los halos de inhibición, que según criterios estandarizados de interpretación [41], pueden ser resistentes (R), sensibles (S) o con sensibilidad a dosis altas (SDA).

Todos los aislamientos fueron testados para la detección de resistencia a la ampicilina que pertenece a la familia de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Aquellas cepas que fueron resistentes se les realizó un estudio adicional para comprobar si presentaban multiresistencia. Se seleccionaron otros 5 antibióticos más pertenecientes a 5 familias diferentes: eritromicina (macrólidos, 15  $\mu$ g), amikacina (aminoglucósidos, 30  $\mu$ g), tetraciclina (30  $\mu$ g), trimetoprima-sulfametazol (sulfonamidas, 1,25/23,75  $\mu$ g) y ciprofloxacina (fluoroquinolonas, 1  $\mu$ g).

### **3.8. Detección de integrones**

La presencia de integrones se detectó mediante la amplificación por PCR de la región comprendida entre la integrasa y el extremo CS3', esta fue llevada a cabo sobre todos los aislados bacterianos identificados. En la figura 10 se representa la región amplificada, así como la zona donde hibridan los primers.



**Figura 10.** Estructura general de los integrones, marcadas en rojo se presenta la región amplificada. Editado de Ruiz L. [22]

Los primers utilizados para esta reacción fueron los descritos por Lévesque et al. [42], y están diseñados a partir de las secuencias de las regiones conservadas de los genes de la *Int11* y *Sul1* de los integrones de clase 1, de manera que únicamente se amplifican los cassettes génicos que están integrados. Estos proceden de Invitrogen (EE.UU). Las secuencias de los primers se pueden observar en la tabla 3:

**Tabla 3.** Primers utilizados para la PCR de integrones.

Primer	Secuencia (5'→3')
5'-CS	GGCATCCAAGCAGCAAG
3'-CS	AAGCAGACTTGACCTGA

Posteriormente la amplificación se llevó a cabo en un termociclador *Applied Biosystems*, modelo GeneAmp® PCR system 2700. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes (tabla 4):

**Tabla 4.** Condiciones de amplificación de la PCR de integrones.

Pre-desnaturalización:	1 min a 95 °C	
35 ciclos consistentes en:	0,5 min a 95 °C	(desnaturalización)
	1 min a 60 °C	(annealing)
	1 min a 72 °C	(extensión)

### 3.9. Electroforesis y secuenciación

Para comprobar la presencia de los amplicones se realizó un gel de agarosa al 2 % en TBE x 0,5. Las condiciones de la electroforesis fueron 100 voltios durante 30 minutos.

Finalmente, se realizó el mismo procedimiento de limpieza que el DNA del microorganismo, y una vez obtenido el DNA limpio, las muestras se enviaron a una empresa externa (STABVIDA) para realizar una secuenciación por el método Sanger.

#### 4. Resultados

Entre el 9 de diciembre de 2024 al 15 de mayo de 2025, se recogieron 34 filtros correspondientes a los aerosoles generados por 34 pacientes, y 5 muestras correspondientes al aire filtrado en una sala de bronoscopias vacía durante una media de 24 minutos. Las muestras se tomaron durante la realización de bronoscopias en la UBNI (Unidad de Broncoscopia y Neumología Intervencionista) del hospital de San Juan, los datos vienen recogidos en la tabla 5.

**Tabla 5.** Resumen muestras obtenidas

Hospital	Muestras	Pacientes	Unidad
HUSJ	34	34	UBNI
Control ambiente	5		UBNI

Durante la realización de las bronoscopias se reconocieron un total de 13 indicaciones clínicas diferentes, las más prevalentes fueron la presencia de nódulos y masas pulmonares seguido de neumonía como se puede observar en la tabla 6.

**Tabla 6.** Indicación clínica de los pacientes.

Indicación	N.º Pacientes
Nódulo y masa pulmonar	12
Neumonía	5
Adenopatías mediastínicas	3
Atelectasias	2
Cáncer de pulmón	2
Manejo secreciones	2
Bronquiectasias	2
EPID	2
EPOC	1
Vía aérea superior	1
Asma	1
Otros	1

Finalmente, sobre las cifras de los datos de duración del muestreo, volumen de aire total, la temperatura y humedad relativa de la sala, se pueden apreciar los valores medios de cada uno en la tabla 7.

**Tabla 7.** Datos del muestreo.

Datos	Valor medio
Duración de muestreo	15,6 ± 11

Volumen de aire total	156,34 ± 110,15
Temperatura	24,01 ± 2,68
Humedad relativa	50,16 ± 16,26

#### 4.1. Carga por filtro (UFC/filtro)

Con los resultados finales de las broncoscopias se ha podido observar un total de 123 microorganismos, el mayor número de aislamientos se observó en el medio de agar sangre, con un total de 77. La carga total microbiana por filtro se calculó dividiendo este valor por el número de filtros y multiplicándolo x4, esta fue de 9,05 UFC/filtro. Además, se calculó la carga microbiana por metro cúbico de aire tomando el valor medio del volumen captado durante las broncoscopias (156,34 Litros/filtro), esto dio un valor de carga de 57,94 UFC/m<sup>3</sup>.

Comparando estos datos con los de los controles negativos, en estos se ha observado una carga por filtro de 7,2 UFC/filtro, y contabilizando los valores de volumen totales, los cuales fueron de 244,66 Litros/filtro, nos da una media de 29,43 UFC/m<sup>3</sup>.

#### 4.2. Detección de microorganismos por cultivo

Del cultivo de los 34 filtros muestreados se han obtenido un total de 123 aislamientos que corresponden 53 a especies bacterianas y a 5 especies fúngicas.

##### 4.2.1. Identificación de los aislamientos bacterianos y fúngicos

Durante el desarrollo de este estudio se han podido identificar 116 aislamientos bacterianos, que pertenecen a 31 géneros (tabla 8), siendo los más comunes *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Chryseobacterium* y *Moraxella*.

**Tabla 8.** Géneros presentes en el estudio.

Género	Número de aislamientos
<i>Micrococcus sp</i>	28
<i>Staphylococcus sp</i>	14
<i>Chryseobacterium sp</i>	11
<i>Moraxella sp</i>	10
<i>Streptomyces sp</i>	7
<i>Corynebacterium sp</i>	6
<i>Pseudomonas sp</i>	6
<i>Bacillus sp</i>	4
<i>Nocardiosis sp</i>	3

<i>Mesobacillus sp</i>	2
<i>Terribacillus sp</i>	2
<i>Cytobacillus sp</i>	2
<i>Paenibacillus sp</i>	2
<i>Neobacillus sp</i>	2
<i>Brevundimonas sp</i>	1
<i>Epilithonimonas sp</i>	1
<i>Janibacter sp</i>	1
<i>Lentzea sp</i>	1
<i>Macrococcus sp</i>	1
<i>Propioniferax sp</i>	1
<i>Shouchella sp</i>	1
<i>Sphingobacterium sp</i>	1
<i>Niallia sp</i>	1
<i>Prescottella sp</i>	1
<i>Saccharopolyspora sp</i>	1
<i>Acinetobacter sp</i>	1
<i>Kaistella sp</i>	1
<i>Priestia sp</i>	1
<i>Kocuria sp</i>	1
<i>Kytococcus sp</i>	1
<i>Dermatococcus Sp</i>	1

Las 116 colonias pertenecían a un total de 53 especies diferentes, siendo la mayoría bacterias grampositivas (71,55 %) y el resto gramnegativas (28,46 %).

Por otra parte, en el estudio de los hongos predominó el género *Aspergillus*, presente en 5 de los 7 aislamientos.

#### 4.2.2. Controles

En los 5 filtros correspondientes a los controles de ambiente, se observó un total de 11 colonias bacterianas y ningún hongo. La tabla 9 muestra las especies aisladas.

**Tabla 9.** Microorganismos de los controles negativos.

Microorganismo
<i>Pseudomonas paralactis</i>
<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Metabacillus schmidteae</i>
<i>Pseudomonas paralactis</i>

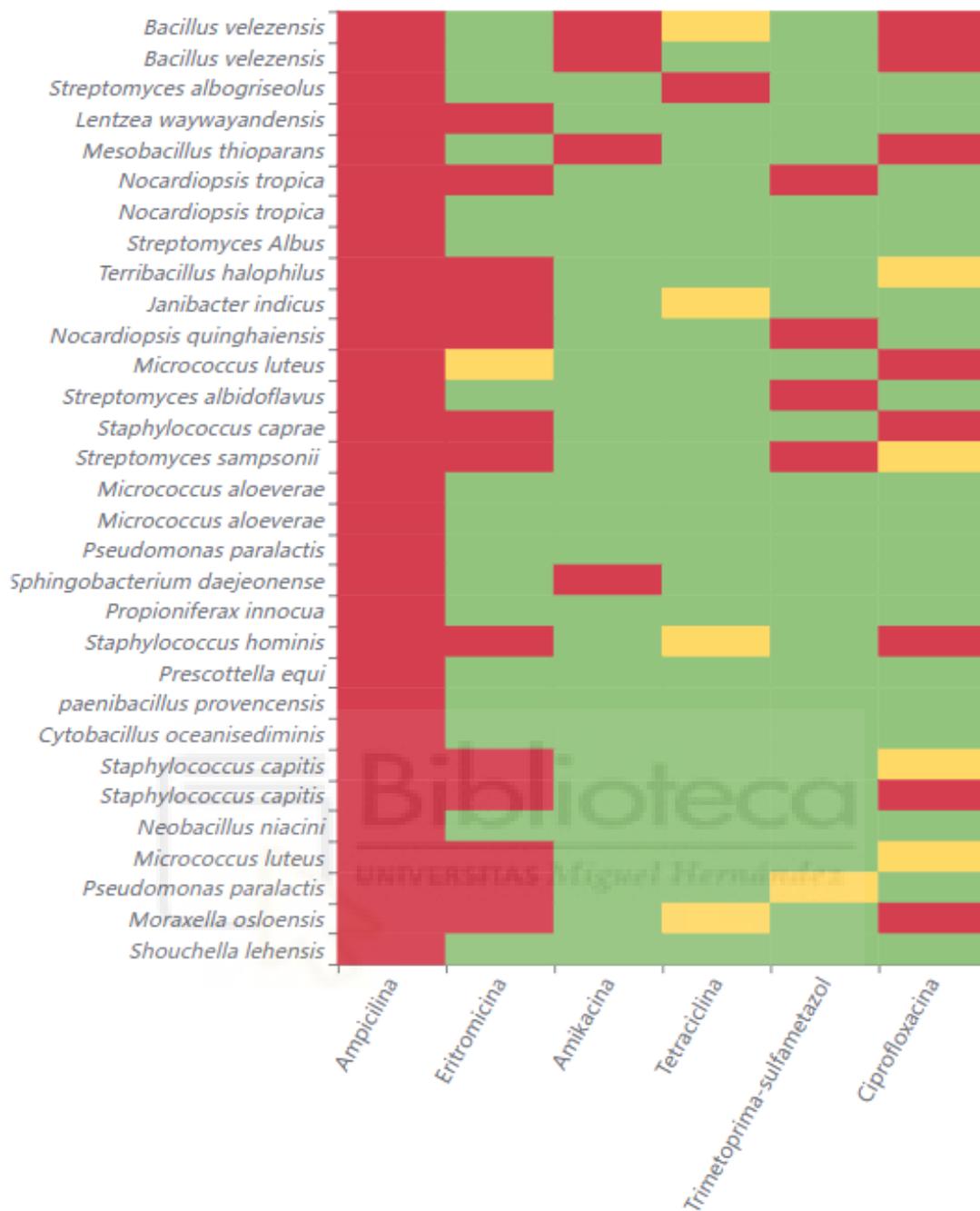
*Streptomyces atrovirens*  
*Demacoccus nishinomiyaensis*  
*Pseudarthrobacter siccitolerans*  
*Moraxella osloensis*

#### **4.3. Estudio de resistencias**

El análisis de susceptibilidad a los diferentes antimicrobianos reveló que 31 de los 116 aislados bacterianos resultaron ser resistentes a ampicilina (26,7 %), la mayoría correspondieron a bacterias grampositivas (28/31), y solo 3 aislados fueron gramnegativos. En los controles ambientales no se observó que ninguna de las bacterias presentase resistencia a ampicilina.

De las 31 cepas resistentes a la ampicilina 10 cepas (un 8,6 % del total de bacterias) fueron multirresistentes, es decir, con resistencia a  $\geq 3$  familias antimicrobianas (figura 11).

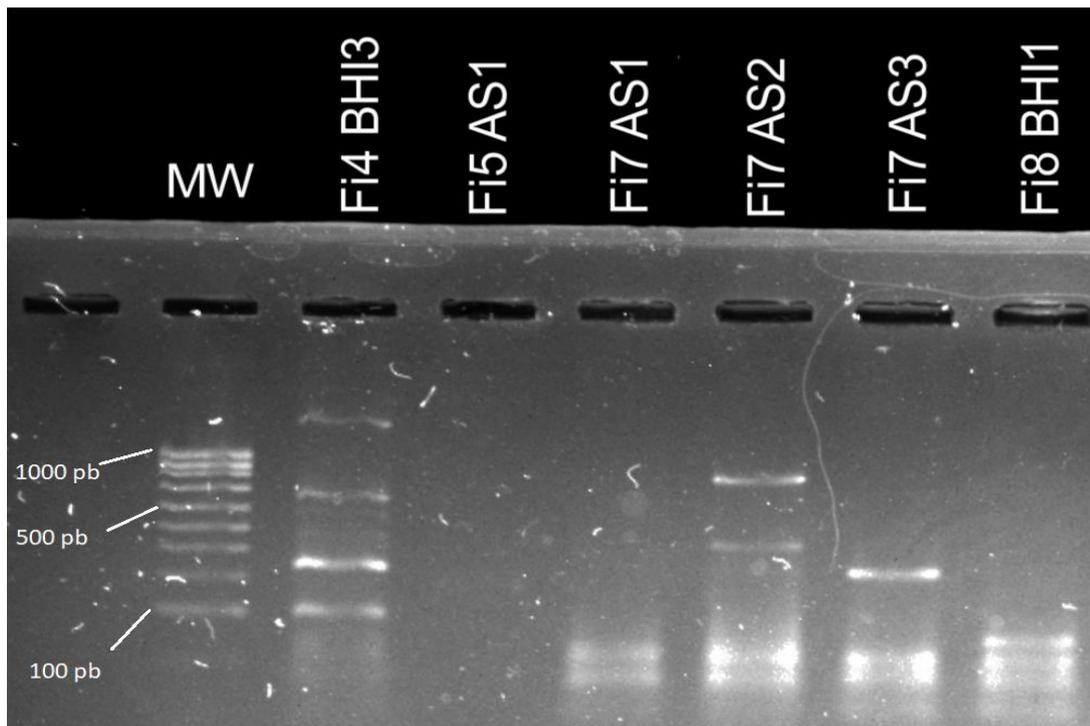




**Figura 11.** Mapa de calor con los resultados de susceptibilidad medidos por método Kirby-Bauer. En rojo se señala que la cepa es resistente, en amarillo sensibilidad intermedia o a altas dosis y en verde que es sensible al antibiótico.

#### 4.4. Detección integrones e identificación de cassettes

De los 116 aislamientos bacterianos, 15 (12,93 %) fueron positivos al realizar la amplificación de los integrones (figura 12).



**Figura 12.** Electroforesis de PCR para detección de integrones.

La secuencia de 11 de ellos mostró proteínas implicadas en la resistencia al estrés oxidativo (batD), al estrés ambiental (acyl-CoA Thioesterase, SigF) o con la fijación de nitrógeno (fixH), pero ninguno de ellos presentó genes que codificaran resistencia a antimicrobianos (tabla 10).

**Tabla 10.** Genes identificados en integrones.

Microorganismo	Gen identificado
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	BatD
<i>Lentzea waywayandensis</i>	XerC
<i>Janibacter indicus</i>	RecJ
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	ATP-binding protein
<i>Moraxella osloensis</i>	acyl-CoA Thioesterase
<i>Moraxella osloensis</i>	FixH family protein
<i>Moraxella osloensis</i>	ribonuclease R
<i>Chryseobacterium taklimakanense</i>	FixH family protein
<i>Chryseobacterium taklimakanense</i>	FAD-binding dehydrogenase
<i>Corynebacterium sanguinis</i>	SigF
<i>Neobacillus niacini</i>	bifunctional aldolase/short-chain dehydrogenase

## 5. Discusión

Durante el desarrollo de este estudio se detectó una carga microbiana de 57,94 UFC/ m<sup>3</sup>. Estos datos son coherentes con los detectados en una fase previa del estudio, en el que se trabajó con filtros expuestos durante sesiones completas de broncoscopia que podían incluir de 1 a 3 procedimientos.

En este caso el valor medio de la carga microbiana fue de 98,94 CFU/m<sup>3</sup> [43]. Nuestro estudio ha resultado más sensible, ya que cada filtro únicamente recogía los aerosoles de un procedimiento o paciente. En otros estudios en los que también se midieron los bioaerosoles generados por broncoscopias se observaron valores muy similares de UFC/m<sup>3</sup>, de entre 40–370 CFU/m<sup>3</sup> [43]. Estas diferencias probablemente se pudieran deber a diversos factores ajenos al estudio como las condiciones de salas, limpieza hospitalaria, contaminación o ventilación. Sin embargo, sí que se ha podido observar las diferencias esperadas entre la carga microbiológica durante el procedimiento de broncoscopia y los controles de ambiente tomados, ya que en estos últimos se observó un valor de 29,43 UFC/m<sup>3</sup>, luego una gran diferencia observable.

Los resultados confirmaron la presencia de una amplia variedad de géneros bacterianos en los bioaerosoles. En particular, se observó una clara prevalencia de bacterias grampositivas sobre las gramnegativas. Esta diferencia puede atribuirse tanto a la prevalencia de los géneros encontrados en el microbioma oral [44] como a las características estructurales que presentan sus paredes celulares: las bacterias grampositivas presentan una pared celular de peptidoglicano varias capas más gruesas que las gramnegativas [45], lo que le confiere una mayor resistencia a la desecación provocada por su suspensión en gotas pequeñas, así como una viabilidad prolongada en el aire [46, 47].

Al analizar más detenidamente estos resultados, entre los géneros más comunes que se han identificado están *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Micrococcus* y *Pseudomonas*, siendo los tres primeros grampositivos. Estos microorganismos son conocidos por formar parte del microbioma humano, presentes en la piel [48], pulmones [49], y nasofaringe [50]. Además, han sido reportados en varios estudios relacionados con resistencias antimicrobianas e infecciones transmitidas por aerosoles [51, 52]. Por otra parte, géneros como *Cryseobacterium*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas*, entre otros, son también reconocidos patógenos oportunistas responsables de infecciones nosocomiales, como neumonías, debido a su capacidad de resistir en ambientes hospitalarios. En estos entornos, se ha documentado la presencia de cepas resistentes a múltiples antimicrobianos pertenecientes a dichos géneros [53-56]. Otros géneros aislados en este estudio, como *Streptomyces*, han sido previamente identificados en entornos clínicos, donde se ha documentado su capacidad para causar infecciones oportunistas [57]. *Corynebacterium* es un género conocido por formar parte del microbioma pulmonar [49], sin embargo, su presencia en este estudio fue limitada.

En cuanto al estudio micológico, el género *Aspergillus* fue el más frecuentemente identificado. Su presencia en ambientes hospitalarios, así como su capacidad para transmitirse por vía aérea, ha sido ampliamente documentada en estudios previos [58, 59], lo que respalda su relevancia

clínica en el contexto de infecciones asociadas al aire.

En cuanto a los controles de ambiente, se ha podido observar también algunos géneros presentes en el microbioma humano como *Micrococcus*, *Moraxella* y *Demacoccus*. Estos son microorganismos bastante presentes en el microbioma humano y en su mayoría pertenecientes al microbioma de piel y mucosas [48, 50]. Además, como se ha mencionado anteriormente, algunos de los géneros encontrados como *Streptomyces* o *Pseudomonas* suelen estar presentes en entornos hospitalarios provocando enfermedades oportunistas [53, 56, 57]. Sin embargo, la principal diferencia con las muestras recogidas durante las broncoscopias es la ausencia de resistencias en los aislamientos recogidos del ambiente, esto contrasta con la presencia de un 26,7 % de microorganismos resistentes en los aerosoles exhalados durante el estudio de broncoscopias y podría indicar que las bacterias captadas en los controles no provienen de fuentes sometidas a una presencia importante de antimicrobianos, lo cual sea seguramente debido a un buen mantenimiento de la higiene de la sala o que esta se encuentre bien ventilada.

El estudio de las resistencias reveló la presencia de 31 aislamientos bacterianos con resistencia a ampicilina, de los cuales 28 correspondieron a bacterias grampositivas y 3 gramnegativas. Esta distribución puede explicarse por los mecanismos de resistencia más comunes frente a las penicilinas, como la inactivación enzimática por  $\beta$ -lactamasas y la modificación de las proteínas de unión a penicilinas (PBPs), siendo este último un mecanismo prácticamente exclusivo de bacterias grampositivas [60, 61]. Más concretamente, se observó resistencia en géneros como *Streptomyces* o *Nocardiosis*, ambos pertenecientes a los actinomicetos, un grupo de bacterias conocido por producir metabolitos secundarios con actividad antibiótica [62, 63]. En estos casos es frecuente el desarrollo de resistencia intrínseca frente a compuestos que ellos mismos sintetizan [64]. Por su parte, en *Staphylococcus* se ha documentado ampliamente la aparición de resistencias a ampicilina, tanto por la producción de  $\beta$ -lactamasas, como por la modificación de la diana [65].

Sumado a esto, 10 de los aislamientos resistentes presentaron multiresistencia a varios antibióticos. Al analizar en mayor detalle los perfiles de resistencia, se observó que el mayor número de estas correspondían a eritromicina (13 cepas), seguido de ciprofloxacina (8 cepas). En contraste, la mayor sensibilidad se detectó frente a tetraciclina, con solo una cepa resistente. La elevada proporción de resistencia a macrólidos, como la eritromicina, en microorganismos procedentes de las vías respiratorias, ya se había documentado previamente [34, 35, 25]. En el caso de las bacterias grampositivas, la resistencia a eritromicina se ha asociado con mecanismos de resistencia ampliamente distribuidos, incluyendo metilasas Erm, bombas de eflujo (msrA/msrB o mefA/E) y enzimas

inactivadoras (*ereA*, *ereB*, *mphA*) [66]. No obstante, los bajos niveles de resistencia observados frente a tetraciclina resultan llamativos, ya que en la literatura suelen reportarse tasas de resistencia más elevadas [34, 25]. Estos hallazgos refuerzan la evidencia previa sobre la capacidad de los bioaerosoles para vehicular bacterias resistentes en entornos clínicos [34, 25].

En cuanto a la detección de integrones en 15 de los 116 aislamientos testados, aunque los análisis de secuenciación mostraron 11 genes no relacionados directamente con resistencia a antimicrobianos, sí se detectaron genes asociados a otras funciones adaptativas relevantes, como *batD*, implicado en la resistencia al estrés oxidativo, *fixH*, relacionado con la fijación de nitrógeno o *SigF*, factor sigma de estrés (deseccación, temperatura, escasez de nutrientes). La presencia de estos genes en la estructura de integrones sugiere una ventaja evolutiva indirecta, al permitir una mayor tolerancia al estrés.

Una observación destacada fue la alta prevalencia de integrones en bacterias gramnegativas. Esta tendencia ha sido reportada previamente en otros estudios, donde además se les atribuye a los integrones ser la causa principal del fenotipo multirresistente (MDR) en bacterias gramnegativas [67, 68]. Esta mayor prevalencia puede explicarse por las diferencias estructurales entre bacterias grampositivas y gramnegativas: los integrones, al no ser móviles por sí mismos, requieren de su asociación con elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones para su diseminación. La eficiencia de los mecanismos de transferencia horizontal es mayor en gramnegativas, lo que facilita la propagación de integrones y, por ende, de genes asociados a resistencia u otras ventajas adaptativas [24, 43, 69].

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la importancia de considerar la transferencia horizontal de genes como un mecanismo clave en la propagación de resistencia, especialmente en entornos hospitalarios donde coexisten múltiples factores de presión selectiva.

En lo referente a las limitaciones del estudio, la toma de muestras se realizó únicamente en un centro hospitalario y sólo un procedimiento médico, esto puede haber provocado un sesgo en los resultados de las bacterias aisladas. Además, aunque el análisis por PCR y cultivo permite identificar las especies y resistencias *in vivo*, durante el estudio no se ha realizado un mayor estudio de los elementos genéticos móviles ni de genes de resistencia, ya que solo se evaluó la presencia de integrones, lo cual se podría resolver mediante la realización de un análisis completo del genoma o del resistoma. Finalmente, no se ha realizado una evaluación de susceptibilidad a todos los antibióticos a los microorganismos que no fueron resistentes a ampicilina, por lo que puede haber provocado un

sesgo en la presencia de resistencias y no se hayan considerado algunas resistencias.

## 6. Conclusiones y proyección futura

### 6.1. Conclusiones

- Este estudio reveló una notable prevalencia de bacterias grampositivas, lo que es coherente con la preponderancia de estas especies en las vías respiratorias altas y posiblemente relacionada con su mayor resistencia a la desecación. Se identificaron géneros bacterianos comunes al microbioma humano, como *Staphylococcus*, *Moraxella*, y *Micrococcus* así como patógenos oportunistas (*Cryseobacterium*) y ambientales potencialmente vinculados a infecciones nosocomiales.
- Los aerosoles exhalados por los pacientes suponen un riesgo potencial para el personal sanitario expuesto a estos durante la realización de broncoscopias.
- Detectamos una elevada prevalencia (26,7 %) de bacterias resistentes a ampicilina en los aerosoles, en su mayoría grampositivas.
- Un total de 10 aislamientos presentaron perfiles de multirresistencia, lo que refuerza la preocupación por la propagación de cepas resistentes en entornos clínicos.
- La detección de fenotipos resistentes en géneros que pueden provocar infecciones nosocomiales, como *Staphylococcus* y *Pseudomonas*, confirma el riesgo de infección que generan, particularmente en pacientes inmunodeprimidos.
- La detección de integrones en varios aislamientos, especialmente en bacterias gramnegativas, aunque no directamente asociados con genes de resistencia a antimicrobianos, evidenció la presencia de genes relacionados con la adaptación al estrés ambiental. Esto sugiere que los integrones podrían desempeñar un papel evolutivo más amplio, facilitando la adquisición de rasgos beneficiosos en ambientes hospitalarios.
- Estos hallazgos resaltan la importancia de los bioaerosoles como vehículos de dispersión de microorganismos resistentes y subrayan la necesidad de medidas de

control más estrictas en procedimientos médicos generadores de aerosoles.

## 6.2. Proyección futura

Para profundizar en los hallazgos obtenidos, futuras investigaciones deberían considerar la ampliación del tamaño y diversidad de la muestra, incluyendo múltiples centros hospitalarios y distintos procedimientos médicos generadores de aerosoles. Esto permitiría obtener una visión más representativa de la diversidad microbiana, de los perfiles de resistencia y del riesgo de exposición profesional.

Además, sería de gran interés realizar estudios más exhaustivos sobre los mecanismos de diseminación genética, incorporando análisis del genoma completo y del resistoma, con el objetivo de identificar no solo la presencia de integrones, sino también otros elementos implicados en la transferencia horizontal de genes.

También sería interesante evaluar la persistencia temporal de los microorganismos en el aire tras la realización de procedimientos médicos, así como su potencial impacto sobre la salud del personal sanitario expuesto. Estudiar la viabilidad de los microorganismos en el aire y su capacidad infecciosa en distintos contextos clínicos podría ofrecer información valiosa para implementar medidas de control más eficaces.

## 7. Bibliografía

- [1] Kapoor, Garima; Saigal, Saurabh; Elongavan, Ashok. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology* 33(3):p 300-305, Jul–Sep 2017. | [https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP\\_349\\_15](https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15)
- [2] Muteeb, G.; Rehman, M.T.; Shahwan, M.; Aatif, M. Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. *Pharmaceuticals* 2023, 16, 1615. <https://doi.org/10.3390/ph16111615>
- [3] World Health Organization: WHO. (2025, 24 abril). Resistencia a los antimicrobianos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- [4] Medlineplus, enciclopedia médica, (2025, 24 abril) Resistencia a los antibióticos , <https://medlineplus.gov/spanish/ency/patientinstructions/000957.htm>
- [5] Tao, Shuan, Chen, Huimin, Li, Na, Wang, Tong, Liang, Wei, The Spread of Antibiotic Resistance Genes In Vivo Model, *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2022, 3348695, 11 pages, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/3348695>

- [6] Zhang S, Huang J, Zhao Z, Cao Y, Li B. Hospital Wastewater as a Reservoir for Antibiotic Resistance Genes: A Meta-Analysis. *Front Public Health*. 2020 Oct 28;8:574968. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.574968>
- [7] Saadoun I, Jaradat ZW, Tayyar IAA, Nasser ZE, Ababneh Q. Airborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the indoor environment of King Abdullah University Hospital, Jordan. *Indoor and Built Environment*. 2014;24(3):315-323. doi:[10.1177/1420326X14526604](https://doi.org/10.1177/1420326X14526604)
- [8] Xu L, Ouyang W, Qian Y, Su C, Su J, Chen H. High-throughput profiling of antibiotic resistance genes in drinking water treatment plants and distribution systems. *Environ Pollut*. 2016 Jun;213:119-126. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.013>
- [9] Guo J, Li J, Chen H, Bond PL, Yuan Z. Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *Water Res*. 2017 Oct 15;123:468-478. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.002>
- [10] Y. Zhu, T.A. Johnson, J. Su, M. Qiao, G. Guo, R.D. Stedtfeld, S.A. Hashsham, & J.M. Tiedje, Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (9) 3435-3440, <https://doi.org/10.1073/pnas.1222743110> (2013).
- [11] Bougnom BP, Thiele-Bruhn S, Ricci V, Zongo C, Piddock LJV. Raw wastewater irrigation for urban agriculture in three African cities increases the abundance of transferable antibiotic resistance genes in soil, including those encoding extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs). *Sci Total Environ*. 2020 Jan 1;698:134201. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134201>
- [12] Han B, Ma L, Yu Q, Yang J, Su W, Hilal MG, Li X, Zhang S, Li H. The source, fate and prospect of antibiotic resistance genes in soil: A review. *Front Microbiol*. 2022 Sep 23;13:976657. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.976657>
- [13] World Health Organization: WHO. (2025, 12 mayo) New global guidance aims to curb antibiotic pollution from manufacturing. <https://www.who.int/news/item/03-09-2024-new-global-guidance-aims-to-curb-antibiotic-pollution-from-manufacturing>
- [14] 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>
- [15] Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature reviews. Genetics*, 16(8), 472–482. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>
- [16] Nicole A. Lerminiaux and Andrew D.S. Cameron. 2019. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*. 65(1): 34-44. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
- [17] von Wintersdorff, C. J., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H., & Wolffs, P. F. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial

Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in microbiology*, 7, 173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>

[18] Vernikos, G., Medini, D. (2014). Horizontal Gene Transfer and the Role of Restriction-Modification Systems in Bacterial Population Dynamics. In: Pontarotti, P. (eds) *Evolutionary Biology: Genome Evolution, Speciation, Coevolution and Origin of Life*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-07623-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-07623-2_8)

[19] Tokuda, M., & Shintani, M. (2024). Microbial evolution through horizontal gene transfer by mobile genetic elements. *Microbial biotechnology*, 17(1), e14408. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14408>

[20] Sabaté, M., & Prats, G. (2002). Estructura y función de los integrones. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 20(7), 341-345. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(02\)72813-9](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(02)72813-9)

[21] Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., & Yu, G. (2015). Resistance integrons: Class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0100-6>

[22] Tesis Doctoral, *Pseudomonas aeruginosa: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos*. Ruiz L. (2007) [https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2521/LRM\\_TESIS.pdf](https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2521/LRM_TESIS.pdf)

[23] Celejewski-Marciniak, P., Wolinowska, R., & Wróblewska, M. (2021). Molecular Characterization of Class 1, 2 and 3 Integrons in *Serratia* spp. Clinical Isolates in Poland - Isolation of a New Plasmid and Identification of a Gene for a Novel Fusion Protein. *Infection and drug resistance*, 14, 4601–4610. <https://doi.org/10.2147/IDR.S325943>

[24] Domingues, S., da Silva, G. J., & Nielsen, K. M. (2012). Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mobile genetic elements*, 2(5), 211–223. <https://doi.org/10.4161/mge.22967>

[25] Habibi, N., Uddin, S., Behbehani, M., Mustafa, A. S., Al-Fouzan, W., Al-Sarawi, H. A., Safar, H., Alatar, F., & Al Sawan, R. M. Z. (2024). Aerosol-Mediated Spread of Antibiotic Resistance Genes: Biomonitoring Indoor and Outdoor Environments. *International journal of environmental research and public health*, 21(8), 983. <https://doi.org/10.3390/ijerph21080983>

[26] *Physiology News Magazine: Air pollution and me* (2025, 6 abril) <https://www.physoc.org/magazine-articles/air-pollution-and-me/>

[27] Walser, S. M., Gerstner, D. G., Brenner, B., Bünger, J., Eikmann, T., Janssen, B., Kolb, S., Kolk, A., Nowak, D., Raulf, M., Sagunski, H., Sedlmaier, N., Suchenwirth, R., Wiesmüller, G., Wollin, K.-M., Tesseraux, I., & Herr, C. E. W. (2015). Evaluation of exposure–response relationships for health effects of microbial bioaerosols – A systematic review. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 218(7), 577-589. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.07.004>

[28] Tellier R. (2022). COVID-19: the case for aerosol transmission. *Interface focus*, 12(2), 20210072.

<https://doi.org/10.1098/rsfs.2021.0072>

[29] Erath, B. D., & Ferro, A. R. (2022). Infectious disease transmission from bioaerosols. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 32(5), 645–646. <https://doi.org/10.1038/s41370-022-00476-z>

[30] Leal, J., Farkas, B., Mastikhina, L., Flanagan, J., Skidmore, B., Salmon, C., Dixit, D., Smith, S., Tsekrekos, S., Lee, B., Vayalumkal, J., Dunn, J., Harrison, R., Cordoviz, M., Dubois, R., Chandran, U., Clement, F., Bush, K., Conly, J., & Larios, O. (2022). Risk of transmission of respiratory viruses during aerosol-generating medical procedures (AGMPs) revisited in the COVID-19 pandemic: a systematic review. *Antimicrobial resistance and infection control*, 11(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s13756-022-01133-8>

[31] Medlineplus, enciclopedia médica, (2025, 27 marzo) Bronchoscopy <https://medlineplus.gov/ency/article/003857.htm>

[32] National cancer institute (2025, 10 marzo) <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=7239>

[33] Li, R., Li, J., & Zhou, X. (2024). Lung microbiome: new insights into the pathogenesis of respiratory diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 9(1), 19. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01722-y>

[34] Zhou, Z.-C., Liu, Y., Lin, Z.-J., Shuai, X.-Y., Zhu, L., Xu, L., Meng, L.-X., Sun, Y.-J., & Chen, H. (2021). Spread of antibiotic resistance genes and microbiota in airborne particulate matter, dust, and human airways in the urban hospital. *Environment International*, 153, 106501. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106501>

[35] Khan, B.A., Roy, S., Tahsin, N. *et al.* Antibiotic resistance of bioaerosols in particulate matter from indoor environments of the hospitals in Dhaka Bangladesh. *Sci Rep* **14**, 29884 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-81376-0>

[36] Ferrer, Consuelo, Gómez-Sánchez, Noelia, López-Botella, Jaime, Esteban, Violeta, Ruíz, Paloma, Yubero, Eduardo, Crespo, Javier, Chiner, Eusebi, Colom, María Francisca, Detection of SARS-CoV-2 Virions and RNA in Aerosols From COVID-19 Environments, *Indoor Air*, 2025, 8861794, 20 pages, 2025. <https://doi.org/10.1155/ina/8861794>

[37] Cytiva Filtros para muestreo de aire de cuarzo Whatman (2025, 14 abril) <https://www.fishersci.es/shop/products/whatman-quartz-air-sampling-filters-grade-qm-a-circle/11363345>

[38] Matriz de Instagene de BioRad (2025, 14 abril) <https://www.bio-rad.com/es-es/product/instagene-matrix?ID=6c2be54f-6c95-43de-8ce3-e9aee8229eeb>

[39] DNeasy Blood and Tissue Kits for DNA Isolation (2025, 14 abril) <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna->

[purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit](#)

[40] Scientific, Cytiva ExoProStar™ de 1 paso (2025, 14 abril)

<https://www.fishersci.es/shop/products/illustra-exoprostar-1-step-1/11941411>

[41] International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. (s.f.). Interferences in clinical chemistry. <https://iaclcd.com/UpFiles/Documents/672a1c7c-d4ad-404e-b10e-97c19e21cdce.pdf>

[42] Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., & Roy, P. H. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(1), 185-191.

<https://doi.org/10.1128/AAC.39.1.185>

[43] RISK OF EXPOSURE TO BIOAEROSOLS IN CLINICAL ENVIRONMENTS: BRONCHOSCOPIES

Noelia Gómez-Sánchez, Lorena Alcalde, José N Sancho-Chust, Ignacio Boira, Beatriz Gálvez, Violeta Esteban, Eusebi Chiner, Eduardo Yubero, María Francisca Colom, Consuelo Ferrer. en redacción.

[44] Zawadzki PJ, Perkowski K, Padzik M, et al. Examination of Oral Microbiota Diversity in Adults and Older Adults as an Approach to Prevent Spread of Risk Factors for Human Infections. *Biomed Res Int*. 2017;2017:8106491. <https://doi.org/10.1155/2017/8106491>

[45] Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5), a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>

[46] Kramer, A., Schwebke, I., & Kampf, G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 6(1), 130. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-130>

[47] Kimura B. (2024) Survival Strategies of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria in Dry and Wet Environments. (2025, 26 Mayo) <https://foodmicrobe-basic.com/survival-strategies-of-gram-positive-and-gram-negative-bacteria-in-dry-and-wet-environments/>

[48] Li, M., Kopylova, E., Mao, J., Namkoong, J., Sanders, J., & Wu, J. (2024). Microbiome and lipidomic analysis reveal the interplay between skin bacteria and lipids in a cohort study. *Frontiers in microbiology*, 15, 1383656. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1383656>

[49] Natalini, J. G., Singh, S., & Segal, L. N. (2023). The dynamic lung microbiome in health and disease. *Nature reviews. Microbiology*, 21(4), 222–235. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00821-x>

[50] Hufnagl, K., Pali-Schöll, I., Roth-Walter, F., & Jensen-Jarolim, E. (2020). Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma. *Seminars in immunopathology*, 42(1), 75–93. <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00775-y>

[51] Huang, Y. J., Sethi, S., Murphy, T., Nariya, S., Boushey, H. A., & Lynch, S. V. (2014). Airway microbiome dynamics in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of clinical microbiology*, 52(8), 2813–2823. <https://doi.org/10.1128/JCM.00035-14>

[52] Yang, Y., Zhou, R., Chen, B., Zhang, T., Hu, L., & Zou, S. (2018). Characterization of airborne

antibiotic resistance genes from typical bioaerosol emission sources in the urban environment using metagenomic approach. *Chemosphere*, 213, 463-471.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.066>.

[53] Jean, S. S., Chang, Y. C., Lin, W. C., Lee, W. S., Hsueh, P. R., & Hsu, C. W. (2020). Epidemiology, Treatment, and Prevention of Nosocomial Bacterial Pneumonia. *Journal of clinical medicine*, 9(1), 275.

<https://doi.org/10.3390/jcm9010275>

[54] Brown, R. B., Phillips, D., Barker, M. J., Pleczarka, R., Sands, M., & Tares, D. (1989). Outbreak of nosocomial *Flavobacterium meningosepticum* respiratory infections associated with use of aerosolized polymyxin B. *American Journal of Infection Control*, 17(3), 121-125. [https://doi.org/10.1016/0196-6553\(89\)90197-1](https://doi.org/10.1016/0196-6553(89)90197-1)

[55] du Moulin G. C. (1979). Airway colonization by *Flavobacterium* in an intensive care unit. *Journal of clinical microbiology*, 10(2), 155–160. <https://doi.org/10.1128/jcm.10.2.155-160.1979>

[56] Gamazo, J. J., Candel, F. J., & González Del Castillo, J. (2023). Nosocomial pneumonia: Current etiology and impact on antimicrobial therapy. *Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia*, 36 Suppl 1(Suppl 1), 9–14.

<https://doi.org/10.37201/req/s01.03.2023>

[57] Liu, J., Xu, Z., Bai, Y., Feng, J., Xu, L., & Li, F. (2024). *Streptomyces albireticuli* lung infection managed as a pulmonary air cyst: A case report and literature review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1296491. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1296491>

[58] Martínez-Herrera, E. O., Frías De-León, M. G., Duarte-Escalante, E., Calderón-Ezquerro, M. D. C., Jiménez-Martínez, M. D. C., Acosta-Altamirano, G., Rivera-Becerril, F., Toriello, C., & Reyes-Montes, M. D. R. (2016). Fungal diversity and *Aspergillus* in hospital environments. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(2), 264-269. <https://doi.org/10.5604/12321966.1203888>

[59] Warris, A., Klaassen, C. H. W., Meis, J. F. G. M., De Ruyter, M. T., De Valk, H. A., Abrahamsen, T. G., Gaustad, P., & Verweij, P. E. (2003). Molecular Epidemiology of *Aspergillus fumigatus* Isolates Recovered from Water, Air, and Patients Shows Two Clusters of Genetically Distinct Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4101-4106. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4101-4106.2003>

[60] Rajesh, A. M., Pawar, S. S., Doriya, K., & Dandela, R. (2025). Combating antibiotic resistance: Mechanisms, challenges, and innovative approaches in antibacterial drug development. *Exploration of Drug Science*, 100887. <https://doi.org/10.37349/eds.2025.100887>

[61] Reygaert W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>

[62] Shi, T., Wang, Y. F., Wang, H., & Wang, B. (2022). Genus *Nocardiopsis*: A Prolific Producer of Natural Products. *Marine drugs*, 20(6), 374. <https://doi.org/10.3390/md20060374>

[63] Van Duijkeren, E., Schink, A.-K., Roberts, M. C., Wang, Y., & Schwarz, S. (2018). Mechanisms of

Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Microbiology Spectrum*, 6(2), 6.2.14. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0019-2017>

[64] Ogawara H. (2016). Self-resistance in Streptomyces, with Special Reference to  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(5), 605. <https://doi.org/10.3390/molecules21050605>

[65] Lade, H., & Kim, J. S. (2023). Molecular Determinants of  $\beta$ -Lactam Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): An Updated Review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(9), 1362. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091362>

[66] Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., & Wondrack, L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(11), 2562-2566. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.11.2562>

[67] Sabbagh, P., Rajabnia, M., Maali, A., & Ferdosi-Shahandashti, E. (2021). Integron and its role in antimicrobial resistance: A literature review on some bacterial pathogens. *Iranian journal of basic medical sciences*, 24(2), 136–142. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.48905.11208>

[68] Pormohammad, A., Pouriran, R., Azimi, H., & Goudarzi, M. (2019). Prevalence of integron classes in Gram-negative clinical isolated bacteria in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Iranian journal of basic medical sciences*, 22(2), 118–127. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2018.32052.7697>

[69] Khademi, F., Ashrafi, S. S., Neyestani, Z., Vaez, H., & Sahebkar, A. (2021). Prevalence of class I, II and III integrons in multidrug-resistant and carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Gene Reports*, 25, 101407. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101407>