

Súper-bacterias y análisis genómico de la resistencia antimicrobiana

Superbugs and Genomic Analysis of Antimicrobial Resistance

Mendieta Condado, E. R.^{*1}, Márquez Aguirre, A. L.²

¹Laboratorio de Biotecnología y Biocomputación, Unidad de Desarrollo Tecnológico e Investigación Molecular, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). Secretaría de Salud. México. ²Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Mendieta Condado, E. R., Márquez Aguirre, A. L. (2022). Superbugs and AMR Genomics Analysis. *Revista Bio Ciencias* 9, e1088. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.09.e1088>



Why is it essential to disseminate this topic and which is the objective?

The dissemination of this topic will allow the general population and the scientific community to consider the relevance of the culture of rational and responsible use of antibiotics, to reduce the generation of superbugs. This article aims to give an uncomplicated presentation of complex terms such as antimicrobial resistance and the latest bioinformatics tools for its analysis, to make science accessible to the public, thus bringing the advantages of scientific knowledge.

¿Por qué es importante difundir este tema y cuál es el objetivo?

La difusión de este tema permitirá a la población general y a la comunidad científica hacer una reflexión de la importancia de la cultura del uso racional y responsable de los antibióticos, con la finalidad de reducir la generación de súper-bacterias. El objetivo de este artículo es presentar de una manera sencilla términos complejos como la resistencia antimicrobiana y las nuevas herramientas bioinformáticas para su análisis, a fin de hacer accesible la ciencia al público aportando con ello beneficios del conocimiento científico.

ABSTRACT

After a century after the discovery of penicillin, the indiscriminate use of antibiotics in human and animal health has favored the emergence and spread of antimicrobial resistance, thereby generating “superbugs” capable of resisting antibiotics. In this article, the origin of antibiotics, the concepts of superbugs and the

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: October 28th 2020.

Accepted/Aceptado: August 08th 2021.

Available on line/Publicado: February 02th 2022.

RESUMEN

A casi un siglo del descubrimiento de la penicilina, el uso indiscriminado de los antibióticos en la salud humana y animal, ha favorecido la aparición y propagación de la resistencia antimicrobiana, generando con ello las “súper-bacterias”, capaces de resistir a los antibióticos. En este artículo se abordará de una manera sencilla el origen de los antibióticos, los conceptos de súper-bacterias y la generación de la resistencia antimicrobiana (AMR), así como el análisis genómico de la resistencia antimicrobiana, como una nueva herramienta bioinformática para su identificación.

*Corresponding Author:

Edgar Rubén Mendieta Condado. Laboratorio de Biotecnología y Biocomputación, Unidad de Desarrollo Tecnológico e Investigación Molecular, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). Secretaría de Salud. México. E-mail: emendiet76@gmail.com

generation of antimicrobial resistance (AMR), as well as the genomic analysis of antimicrobial resistance, as a new bioinformatics tool for its identification, will be addressed in a simple way.

KEY WORDS

Superbugs; Antimicrobial Resistance; Genomic Analysis.

Lucky accidents and the discovery of the first antibiotic

Part of the history of science has always stated that Alexander Fleming, the Scottish physician, working at St Mary's Hospital in Paddington, London, accidentally discovered one of the greatest pillars of modern medicine. An event so significant that it would change our health forever: the discovery of **antibiotics**. We know these drugs as a group of drugs that kill bacteria. But, they are more than that, they are diverse and can be classified according to their origin as natural, semi-synthetic or synthetic. If they prevent bacterial growth without destroying the bacteria they are called **bacteriostatic**, if it destroys (killing) them it is known as **bacteriolytic** (where most of them are grouped). They can also be grouped by their mechanism of action, or by their chemical structure (**Table 1**). For example, if we take the 100 most common antibiotics today, we could group them into about 16 different families. On the other hand, if we consider the number of microorganisms on which they apply their effect, there are broad-spectrum, medium-spectrum, and short or specific spectrum antibiotics. If we consider their duration in the body, some take weeks to be disposed of and others only a few hours. This count could be overwhelming, so let's start from the beginning (Goodman *et al.*, 2008).

Initially isolated from the fungus *Penicillium notatum*, 6-aminopenicillanic acid reached mass production from the method developed by Ernst Boris Chain and Howard Walter Foley, who, together with Alexander Fleming, would be awarded the Nobel Prize in Medicine in 1945. The effectiveness of penicillin as an antibiotic allowed its frequent use in clinical practice and its demand increased during the twenty years after its discovery (Lobanovska & Pilla, 2017). A cure had been found for dozens of infectious diseases simultaneously. In the context of the Second World War, the wounds inflicted on soldiers were no longer lethal. Hundreds

PALABRAS CLAVE

Súper-bacterias; Resistencia Antimicrobiana; Análisis Genómico.

Accidentes afortunados y el descubrimiento del primer antibiótico

La historia de la ciencia siempre ha dicho que Alexander Fleming descubrió accidentalmente uno de los mayores pilares de la medicina moderna. Un hecho tan significativo, que cambiaría nuestra salud para siempre: el descubrimiento de los **antibióticos**. Conocemos estas drogas como un grupo de medicamentos que matan a las bacterias, pero son algo más que eso, son diversos y se pueden clasificar acorde a su origen en naturales, semi-sintéticos o sintéticos. Si evitan el crecimiento bacteriano sin destruir a la bacteria se les llama **bacteriostático**, si las destruye es un **bacteriolítico** (donde se agrupa la mayoría). También pueden agruparse por su mecanismo de acción, o por su estructura química (Tabla 1). Por ejemplo, si tomamos a los cien antibióticos más comunes actualmente, podríamos agruparlos en unas 16 familias diferentes. Por otro lado, si consideramos al número de microorganismos sobre los que ejercen su efecto, hay antibióticos de amplio espectro, de espectro medio y de espectro corto o específico. Si consideramos su duración en el organismo, hay algunos que tardan semanas en desecharse y otros solo unas cuantas horas. Podría resultar abrumador este recuento, así que empezaremos con el primero de todos ellos (Goodman *et al.*, 2008).

Aislado inicialmente del hongo *Penicillium notatum*, el ácido 6-aminopenicilánico alcanzó la producción masiva a partir del método desarrollado por Ernst Boris Chain y Howard Walter Foley, quienes, junto con Alexander Fleming, obtendrían el premio Nobel de Medicina algunos años más tarde. La efectividad de la penicilina como antibiótico permitió su uso frecuente en la práctica clínica y su demanda se fue incrementando durante los veinte años posteriores a su descubrimiento (Lobanovska & Pilla, 2017). Se había encontrado una cura para decenas de enfermedades infecciosas de forma simultánea. En el marco de la Segunda Guerra Mundial, las heridas producidas en los soldados ya no eran letales. Cientos de vidas alrededor del mundo eran salvadas diariamente, gracias a la investigación básica y la inversión farmacéutica en estos proyectos. Como resultado de esta sinergia, poco tiempo más tarde aparecieron las penicilinas sintéticas con vías de administración oral

Table 1.
Classification of Penicillins

Tabla 1.
Clasificación de Penicilinas

Appearance	Type	Characteristics	Name
First Generation	Natural penicillin	Sensitive to gastric acids	Penicillin G. Benzylpenicillin, as a final product of therapeutic interest, and isolable intermediates such as isopenicillin N or penicillin N.
			Penicillin V (Phenoxymethylpenicillin). It is the only orally active penicillin. It has a lower activity than benzylpenicillin, so it is administered when it is not required to reach a high concentration in the tissues.
		Resistant to gastric acids	Pheneticillin Propicillin
Second Generation	Semi-synthetic penicillins.	Resistant to β -lactamases	Methicillin Nafcillin Oxacillin Cloxacillin Dicloxacillin Flucloxacillin
Third Generation			Aminopenicillins
Fourth Generation		Carboxypenicillin (antipseudomonas). Carboxypenicillins are susceptible to degradation by beta-lactamases, but tend to be more resistant than ampicillin.	Piperacillin Ticarcillin Apalcilin Carbenicillin Carfecillin Carindacillin Mezlocillin Azlocillin

Penicillins and antibiotics in general usually have a first, second and even third line prescription, but the choice is determined by the bacteria rather than by the structural component of the antibiotic. It is possible that a drug is the first choice in some infections and the second or is ruled out in others. Few fourth-generation penicillins are available outside of Piperacillin, due to widespread resistance to beta-lactamases

Las penicilinas y en general los antibióticos suelen tener una prescripción de primera, segunda y hasta tercera línea, pero la elección está determinada por la bacteria más que por el componente estructural del antibiótico. Es posible que un fármaco sea de primera elección en algunas infecciones y de segunda ó quede descartado en otras. Hay pocas penicilinas de cuarta generación disponibles fuera de la Piperacilina, debido a la resistencia generalizada por las betalactamasas

of lives around the world were saved daily, thanks to basic research and pharmaceutical investment in these projects.

As a result of this synergy, synthetic penicillins with oral routes of administration (the most easily accessible) such as penicillin V, ampicillin, flucloxacillin, cloxacillin and

(la de más fácil acceso) como la penicilina V, ampicilina, flucloxacilina, cloxacilina y amoxicilina, inaugurando así la era de los antibióticos.

Alexander Fleming no era conocido por su inmaculado orden dentro del laboratorio. De hecho, se había ido de

amoxicillin appeared shortly afterwards, thus inaugurating the era of antibiotics.

Alexander Fleming was not known for his immaculate order within the laboratory. In fact, he had gone on vacation to Scotland, leaving several culture plates on the workbench. Upon his return, on the morning of Friday, September 28, 1928, he began to discard them. It had been about a month since he had performed those bacterial cultures, and they had all been contaminated by a mold-like fungus that grows on damp bread. They were beyond useless! In the first instance, he put some of these plates in a basket to throw them away, but was interrupted by a colleague, then when he showed him his work in the cultures, he realized that the fungus that had grown inside the plate had formed a halo of inhibition in the bacterial culture ... in other words, the fungus secreted something that had destroyed all the bacteria around it. This observation was what led him to isolate the microorganism and look for this antibiotic substance in it ... the rest, as they say, is history, which ninety years later begins to be rewritten, since many bacteria silently began an adaptation process that allowed them to survive and grow in the presence of these first antibiotics. This innocent **antimicrobial resistance (AMR)**, today constitutes one of the greatest threats that threatens the current and future world population: infection by pathogenic bacteria with AMR or also called **superbugs**, which are resistant to most antibiotics (WHO, 2020).

While penicillin was the first antibiotic to be developed, it was not the only one known at the time. The bactericidal activity of lysozyme (a protein with the ability to break down other proteins) was already well known, and which by the way was also discovered by Alexander Fleming in 1922, curiously after his nasal fluids reached a culture of bacteria. One day, he was checking a culture plate, and then accidentally sneezed at it ... but he did not throw it! And this is perhaps what made Fleming a great researcher, not his disorder, but his curiosity and great observation skills. This explains why years later when he saw the fungus growing in those agar plates full of bacteria, he would not throw them right away. His experience with lysozyme had made her reasonably curious to know what was going on in those culture plates.

Years later, lysozyme was discovered to be part of the defense systems of many animals. It is very efficient at keeping bacteria away and therefore is secreted in tears and saliva, however, because its way of action

vacaciones sin culpa alguna, dejando varias placas de cultivo en la mesa de trabajo. A su regreso, la mañana del viernes 28 de septiembre de 1928 comenzó a desecharlas. Ya había pasado cerca de un mes desde que realizó aquellos cultivos bacterianos, y todos se habían contaminado por un hongo parecido al moho que crece en el pan húmedo ¡Eran más que inservibles! En una primera instancia, puso algunas de éstas placas en una cesta para tirarlas, pero fue interrumpido por un colega, entonces al enseñarle su trabajo en los cultivos, se percató que el hongo que había crecido dentro de la placa había formado un halo de inhibición en el cultivo bacteriano... en otras palabras, el hongo secretaba algo que había destruido a todas las bacterias alrededor. Esta observación fue lo que lo llevo a aislar el microorganismo y buscar en él esta sustancia **antibiótica**... el resto como dicen, es una historia, que a noventa años de distancia comienza a reescribirse, ya que muchas bacterias silenciosamente iniciaron un proceso de adaptación que les permitió sobrevivir y crecer en presencia de estos primeros antibióticos. Esta inocente **resistencia a los antimicrobianos (AMR)**, por sus siglas en inglés, al día de hoy constituye una de las amenazas más grandes que acecha la población mundial actual y futura: la infección por bacterias patógenas con AMR o también denominadas **súper-bacterias**, las cuales son resistentes a la mayoría de los antibióticos (WHO, 2020).

Si bien, la penicilina fue el primer antibiótico en desarrollarse, no fue el único que se conoció en aquel momento. La actividad bactericida de la lisozima (una proteína con capacidad para romper otras proteínas) ya era bien conocida, y que por cierto también fue descubierta por Alexander Fleming en 1922, curiosamente a partir de que sus fluidos nasales alcanzaron un cultivo de bacterias. Ya que mientras revisaba la caja de cultivo, le estornudó accidentalmente... ¡pero no la tiro!, y esto es quizás lo que hizo a Fleming un gran investigador, no su desorden, sino su curiosidad y gran capacidad de observación. Esto explica por qué años más tarde cuando vio el hongo que crecía en aquellas cajas de bacterias no las tiraría de inmediato. Su experiencia con la lisozima le había generado una razonable curiosidad por saber que pasaba en aquellas cajas de cultivo.

Años más tarde, se descubrió que la lisozima forma parte de los sistemas de defensa de muchos animales. Es muy eficiente para mantener a raya a las bacterias y por ello se secreta en las lágrimas y la saliva, sin embargo, debido a que actúa rompiendo literalmente "bacteria por bacteria" su eficiencia es menor que la de la penicilina (Fortoul, 2019).

and efficiency are less effective than that of penicillin (Fortoul, 2019).

Colors under the microscope: first identification tool

Antibiotics such as penicillin act very fast, but to talk about their mechanism we must first talk about bacteria. We can differentiate the millions of bacteria into two large groups: **Gram-positive (+) and Gram-negative (-) bacteria**. This name is due to Han Christian Gram, who made a blue-violet dye, which penetrated some bacteria, staining them a blue-violet color. So he could easily classify them as positive, those bacteria that stained, and negative those that did not. The key to this was the bacterial envelope, since the negative or Gram (-) had what is known as a cell wall, a rigid protective envelope that does not allow the passage of the dye. In this group, we can find many of the bacteria that make us sick, such as *Neisseria gonorrhoeae*, which causes gonorrhea - a sexually transmitted disease (STD), *Neisseria meningitidis* that causes meningitis or *Moraxella catarrhalis*, whose infection causes respiratory symptoms, among others. Some of them mainly cause respiratory diseases (*Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*), urinary diseases (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*) and gastrointestinal diseases such as *Helicobacter pylori* and *Salmonella*. Other members of this group are opportunists and attack when your body is weak, which is why they are associated with nosocomial infections such as *Acinetobacter baumannii*.

On the other hand, positive or Gram (+) bacteria do not have a protective covering like the cell wall, instead, they have a pair of semi-permeable membranes that provides protection from the external environment, so their membrane allows the passage of the dye and they stain blue-violet when viewed under the microscope. This group includes both mobile (via flagella) and immobile species with bacillus (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Listeria*) or cocoon (*Staphylococcus*, *Streptococcus*) shape (Whitman et al., 2012).

Colores bajo el microscopio: primera herramienta de identificación

Los antibióticos como la penicilina actúan muy rápido, pero para hablar de su mecanismo debemos hablar primero de las bacterias. Podemos diferenciar a los millones de bacterias en dos grandes grupos: las bacterias **Gram positivas (+) y Gram negativas (-)**. Este nombre se debe a Han Christian Gram, quien fabricó un colorante azul-violeta, mismo que penetraba en algunas bacterias tiñéndolas de un color azul. Por lo que fácilmente pudo clasificarlas como positivas, a aquellas bacterias que se teñían y como negativas a las que no. La clave de esto, era la envoltura bacteriana, ya que las negativas o Gram (-) tenían lo que se conoce como pared celular, una envoltura protectora rígida y que no permite el paso del colorante. En este grupo, podemos encontrar a muchas de las bacterias que nos enferman como *Neisseria gonorrhoeae*, que ocasiona la gonorrea -una enfermedad de transmisión sexual (STD), a *Neisseria meningitidis* que causa la meningitis o a *Moraxella catarrhalis*, cuya infección provoca síntomas respiratorios, entre otros. Algunas de ellas causan principalmente enfermedades respiratorias (*Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*), enfermedades urinarias (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*) y enfermedades gastrointestinales como *Helicobacter pylori* y *Salmonella*. Otros miembros de este grupo son oportunistas y atacan cuando tu cuerpo está débil, por lo cual están asociadas a infecciones nosocomiales como *Acinetobacter baumannii*.

Por otro lado, las bacterias positivas ó Gram (+), no tienen una cubierta protectora como la pared celular, en cambio, tienen un par de membranas semipermeables que les brinda protección del medio externo, por lo que su membrana permite el paso del colorante y se tiñen de azul violeta cuando se observan al microscopio. En este grupo se incluyen especies tanto móviles (vía flagelos) como inmóviles con forma bacilo (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Listeria*) o de coco (*Staphylococcus*, *Streptococcus*) (Whitman et al., 2012).

El contrataque bacteriano: la primera resistencia

La pared celular es un componente esencial de protección bacteriana que se encuentra compuesta principalmente de cadenas de azúcares alternando con

The bacterial counterattack: the first resistance

The cell wall is an essential component of bacterial protection that is mainly composed of sugar chains alternating with other molecules. The antibiotic activity of penicillin is conferred by the ability to block cell wall synthesis in Gram negative bacteria. When this drug reaches the place where the wall is made, it binds to the protein responsible for placing it on the wall (that is, it sticks to an enzyme, but can no longer be detached), therefore, it disables the enzyme that makes the cell wall.

Penicillin mimics the structure of the last two D-alanine residues present in all these peptides, in such a way that the transpeptidase enzyme binds covalently to penicillin and is irreversibly blocked in its catalytic site. Bacteria, left without the protection of the wall, are very susceptible to degradation by changes in the osmotic composition or pH, and die. This inhibition of proteoglycan synthesis leads to penicillins being generally more active against Gram-positive bacteria, since it is in them where the activity of **DD-transpeptidase** is the highest than against Gram-negative bacteria (Lobanovska & Pilla, 2017). This is because Gram-negative bacteria have an additional protection called the outer membrane, which acts as a selective barrier that blocks the permeability of penicillin. In addition, Gram-negative bacteria have evolutionarily acquired the coding genes to synthesize enzymes called penicillinases or beta-lactamases, which hydrolyze (break) the beta-lactamic ring of this drug, rendering it inactive (Lobanovska & Pilla, 2017).

With the use of the first penicillins, the first bacterial counterattack occurred: the appearance of resistant Gram-positive strains. Therefore, the pharmaceutical synthesis focused on semi-synthetic penicillins that had penicillinase-resistant beta-lactamic rings. An example of these are oxacillin, methicillin and dicloxacillin, which were considered second generation penicillins. However, their spectrum of action was too narrow, therefore, in the mid-1960s, third-generation aminopenicillins or penicillins appeared, such as amoxicillin and ampicillin, which had a broader spectrum, acting on Gram-positive bacteria and Gram-negative. Even in the late 1970s, a fourth generation known as carboxypenicillins began to be synthesized (Table 1). Parallel to the development of penicillin, the search for antibiotics in other organisms such as *Cephalosporium acremonium*, resulted in

otras moléculas. La actividad antibiótica de la penicilina la confiere la capacidad para bloquear la síntesis de la pared celular en bacterias Gram negativas. Cuando este fármaco llega a el lugar donde se fabrica la pared, se une a la proteína encargada de colocarla en la misma (es decir, se pega a una enzima, pero ya no se puede despegar), por lo tanto, inhabilita a la enzima que fabrica la pared celular.

La penicilina mimetiza la estructura de los dos últimos residuos de D-alanina presentes en todos estos péptidos, de tal forma que la enzima transpeptidasa se une covalentemente a la penicilina y queda bloqueada en su sitio catalítico de forma irreversible. Las bacterias, al quedar sin la protección de la pared, son muy susceptibles a degradarse por los cambios en la composición osmótica o pH, y mueren. Esta inhibición en la síntesis del proteoglicano, conlleva a que en general las penicilinas sean más activas contra bacterias Gram-positivas, ya que es en ellas donde está la más alta la actividad de la **DD-transpeptidasa** que contra Gram-negativas (Lobanovska & Pilla, 2017). Esto se debe a que, las bacterias Gram-negativas cuentan con una protección adicional llamada membrana externa, que actúa como una barrera selectiva que bloquea la permeabilidad de la penicilina. Además, las bacterias Gram-negativas evolutivamente han adquirido los genes codificantes para sintetizar unas enzimas llamadas penicilinasas o beta-lactamasas, mismas que hidrolizan (rompen) el anillo beta-lactámico de este fármaco, haciéndolo inactivo (Lobanovska & Pilla, 2017).

Con el uso de las primeras penicilinas se dio el primer contrataque bacteriano: la aparición de cepas Gram-positivas resistentes. Como consecuencia, la síntesis farmacéutica se enfocó en penicilinas semi-sintéticas que tenían anillos beta-lactámicos resistentes a penicilinasas. Un ejemplo de ellas son la oxacilina, metilcilina y dicloxacilina, que se consideraron penicilinas de segunda generación. Sin embargo, su espectro de acción era demasiado estrecho, por tanto, a mediados de los años 60's aparecieron las aminopenicilinas o penicilinas de tercera generación como la amoxicilina y la ampicilina, que eran de amplio espectro, actuando sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Incluso a finales de los 70's comenzó a sintetizarse una cuarta generación conocida como carboxipenicilinas (Tabla 1). Paralelamente al desarrollo de la penicilina, la búsqueda de antibióticos en otros organismos como el *Cephalosporium acremonium*, dio como resultado el descubrimiento de las cefalosporinas, cuya química combinatoria ha dado cinco generaciones de medicamentos, en parte desarrollados por la adquisición de resistencia a las primeras generaciones (Whitman *et al.*, 2012).

the discovery of cephalosporins, whose combinatorial chemistry has given five generations of drugs, partly developed by the acquisition of resistance to the first generations (Whitman *et al.*, 2012).

The origin of resistance

The causes of antimicrobial resistance (AMR) are multifactorial in nature, but the indiscriminate use of **low-quality or expired drugs** and **lack of supervision** by health authorities mainly have been recognized as the most common in enterobacteria and respiratory pathogens. In addition, the conditions of poor hygiene, the inappropriate use of antibiotics and medical malpractice, as well as the lack of regulation in pharmaceutical marketing or the lack of adherence to regulations. Almost all of these conditions are entrenched in developing countries, and it is currently here where the greatest number of microorganisms resistant to ampicillin, tetracycline and sulfonamides are found (Hang-Wei *et al.*, 2016).

The circulation of strains resistant to the latter is not only due to human interaction, since the abuse in the prescription of sulfadiazine in pigs has promoted the establishment of genes involved in the degradation of sulfonamides (resistance genes) found in bacteria that make up the microbiota in the **rhizosphere** (part of the soil located immediately below the living roots) of maize (Kopmann *et al.*, 2013). In recent years this group of genes has been called ARG (*Antibiotic Resistance Genes*), of the which have been counted up to 52 ARGs present in the soil microbiota regularly exposed to fertilization with manure from cattle treated with antibiotics. **Most of the bacteria present in the soil are not pathogenic.** However, an issue of concern is the development and expression of AMR genes in free-living bacteria and their subsequent horizontal transfer to surrounding bacteria caused by supplementation with antibiotics in pig feed. It has been proven that soil bacteria maintain high ARGs for several months when said soil is fertilized with manure from these animals, even when a sub-therapeutic dose is handled (Kopmann *et al.*, 2013; Hang-Wei *et al.*, 2016). Under these conditions, the arrival of a human pathogen and its interaction with these microorganisms is catastrophic. Finally, irrigation with sewage or treated (poorly) water ends up providing the ideal microenvironment to generate super pathogenic bacteria.

El origen de la resistencia

Las causas de la resistencia a los antimicrobianos (AMR) son de índole multifactorial, pero se han reconocido como las más comunes en enterobacterias y patógenos respiratorios al uso indiscriminado de **medicamentos de baja calidad** o caducados y **falta de supervisión** por parte de las autoridades sanitarias principalmente. Se suman las condiciones de poca higiene, el uso inadecuado de antibióticos y la mala práctica médica, así como la falta de regulación en la comercialización farmacéutica ó la falta de apego a las normativas. Casi la totalidad de estas condiciones se encuentran arraigadas en países en vías de desarrollo, y actualmente es aquí donde se encuentran el mayor número de microorganismos resistentes a ampicilina, tetraciclina y sulfonamidas (Hang-Wei *et al.*, 2016).

La circulación de cepas resistentes a estos últimos no sólo se debe a la interacción humana, ya que el abuso en la prescripción de sulfadiazina en cerdos ha promovido el establecimiento de genes involucrados en la degradación de sulfonamidas (genes de resistencia) encontrados en las bacterias que conforman la microbiota en la **rizosfera** -parte del suelo localizada inmediatamente debajo de las raíces vivas— del maíz (Kopmann *et al.*, 2013). En los últimos años se ha denominado a este grupo de genes como ARG (*Antibiotic Resistance Genes*, por sus siglas en inglés), de los cuales se han contabilizado hasta 52 ARGs presentes en la microbiota del suelo expuesto regularmente la fertilización con estiércol proveniente de ganado tratado con antibióticos. La mayoría de las **bacterias presentes en el suelo no son patógenas**, sin embargo, un aspecto preocupante es el desarrollo y expresión de genes de AMR en bacterias de vida libre y su posterior transferencia horizontal a las bacterias circundantes causado por la suplementación con antibióticos en el alimento porcino. Se ha comprobado que las bacterias del suelo mantienen elevados los ARGs por varios meses cuando dicho suelo es fertilizado con el estiércol proveniente de estos animales, incluso cuando se maneja una dosis subterapéutica (Kopmann *et al.*, 2013; Hang-Wei *et al.*, 2016). Bajo estas condiciones, la llegada de un patógeno humano y su interacción con estos microorganismos resulta catastrófico. Finalmente, el riego con aguas negras ó tratadas (deficientemente) terminan por propiciar el microambiente idóneo para generar súper-bacterias patógenas.

Pláticas entre bacterias: transferencia de información genética

Actualmente se conoce como **mobiloma** al conjunto de genes localizados en elementos móviles

Talks between bacteria: transfer of genetic information. Bacterial gatherings

Currently known as *mobilome* is the set of genes located in bacterial mobile elements (MGE), such as plasmids, IS elements, transposons, islands of pathogenicity and integron-associated gene cassettes (IAGC) (Da Silva & Dominguez, 2016). These genes are often referred to as flexible in composition and can encode virulence factors, secretory toxins such as cholera, and antibiotic resistance. Horizontal transfer of MGE between bacteria is well documented, and therefore MGE genes may be subject to continuous evolution and environmental changes, which can be induced or significantly accelerated by human activities.

Until a few years ago, the genus *Psycrobacter* was classified as an opportunistic pathogen in humans, however, this bacterium was recently identified as the cause of severe meningitis that had a fatal outcome. The antimicrobial profile found in this bacterium was quite broad (Ortiz-Alcántara *et al.*, 2016), evidencing the presence of a **superbug**. Another worrying example is the case of *Acinetobacter baumannii* (Kopmann *et al.*, 2013) with resistance to carbapenems, since this drug is perhaps the most powerful that currently exists, making it also one of the last existing therapeutic options, so the appearance of pathogenic strains with the ability to inactivate it severely limits the ability to combat and eradicate these organisms. However, it is even more worrying to find that extended-spectrum beta-lactamase enzymes (or **ESBL**) confer **resistance to all penicillins**, and also to third and fourth generation **cephalosporins**, as well as **carbapenems**, generating multidrug-resistant bacteria or superbugs, which once established within nosocomial environments, as the *Acinetobacter* or *Pseudomonas* genus inhabit, produce almost uncontrollable outbreaks (Morfin-Otero & Rodríguez-Noriega, 1999).

On the other hand, the number of circulating strains of *Mycobacterium tuberculosis* with resistance to multiple antibiotics is increasing (Mbelele *et al.*, 2018). Derived from these interactions between bacteria and human activities, a scenario not previously foreseen with the exception of Fleming himself is developing: the combination of plasticity in the genetic

bacterianos (MGE, por sus siglas en inglés), tales como plásmidos, elementos IS, transposones, islas de patogenicidad y los casetes de genes asociados a integrones (IAGC) (Da Silva & Dominguez, 2016). Estos genes a menudo están referidos como de composición flexible y pueden codificar factores de virulencia, toxinas de secreción como en el caso del cólera y la resistencia a antibióticos. La transferencia horizontal de MGE entre bacterias se encuentra bien documentado, y por lo tanto es posible que los genes MGE sean sujetos a una evolución continua y cambios medioambientales, mismos que pueden ser inducidos o significativamente acelerados por las actividades humanas.

Hasta hace pocos años, se tenía catalogado al género *Psycrobacter* como patógeno oportunista en humanos, sin embargo, recientemente se identificó a esta bacteria como causante de un cuadro de meningitis grave que tuvo un desenlace fatal. El perfil de antimicrobianos encontrado en esta bacteria fue bastante amplio (Ortiz-Alcántara *et al.*, 2016) evidenciando la presencia de una **superbacteria**. Otro ejemplo preocupante es el caso de *Acinetobacter baumannii* (Kopmann *et al.*, 2013) con resistencia a carbapenémicos, este fármaco es quizás el más poderoso que existe actualmente, pero por lo tanto, también es una de las últimas opciones terapéuticas existentes, así que la aparición de cepas patógenas con la capacidad de inactivarlo, limita gravemente la capacidad de maniobra ante estos organismos. Sin embargo, es más preocupante aún encontrar que las enzimas betalactamasas de espectro extendido (ó **ESBL**) confieren resistencia a **todas las penicilinas**, y también a **cefalosporinas** de tercera y cuarta generación, así como a **carbapenémicos**, generándose bacterias multidrogo-resistentes ó superbacterias, que una vez establecida dentro de ambientes nosocomiales, tal cual habitan los géneros *Acinetobacter* ó *Pseudomonas*, producen brotes casi incontrolables (Morfin-Otero & Rodríguez-Noriega, 1999).

Por otro lado, el número de cepas circulante de *Mycobacterium tuberculosis* con resistencia ha múltiples antibióticos va en incremento (Mbelele *et al.*, 2018). Derivado de estas interacciones entre las bacterias y las actividades humanas, se está desarrollando un escenario no previsto anteriormente con excepción del propio Fleming: la combinación de la plasticidad en el intercambio genético entre microorganismos de vida libre (quienes cuentan con múltiples mecanismos en la transferencia horizontal de información), con los mecanismos de resistencia antimicrobiana derivados de la presión selectiva al crecer la concentración de antibióticos y derivados dentro del medio ambiente. Este escenario a obligado a cambiar las

exchange between free-living microorganisms (which have multiple mechanisms in horizontal transfer of information), with the antimicrobial resistance mechanisms derived from the selective pressure as the concentration of antibiotics and derivatives within the environment increases. This scenario has forced a change in priorities in health policies around the world (Mbebele *et al.*, 2018; WHO, 1997).

The new tool to identify pathogens

Research on resistance to carbapenems by *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*, as well as the incorporation of new antibiotics against them, is considered the most critical level in the **WHO** (World Health Organization) priority list. This is followed by the resistance reported for *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Neisseria* and *Enterococcus* (WHO, 2020).

The ability of whole genome sequencing of an organism, (WGS) is a high technology tool that allows the identification of these pathogens. In the 1970s and 1980s, considering obtaining the complete genome of any organism was not only overwhelming, but practically impossible and unaffordable. Back then, the technology allowed to advance to 160 base pairs per week. The sequence of a 1600 bp gene could be completed in no less than 10 weeks. But a 5 million base pair bacterial genome was impractically time consuming and expensive. The improvement brought by automated sequencers based on the Sanger method, which led to the start of the human genome sequencing project in the 1990s, incorporating 67 laboratories from around the world. It took about 13 years to sequence the 3.4 billion base pairs that our genome has, roughly at the cost of one dollar a base (Hernández *et al.*, 2020).

Currently, massive sequencers can obtain the genome of 96 bacteria in one working day. However, leaving behind the laboratory and the refinement of the molecular methods that were developed for this type of technology, it is in the development of software to analyze the genome, where the most important advances in this fight against pathogens are recorded day by day (Hernández *et al.*, 2020).

prioridades en las políticas de salud de todo el Mundo (Mbebele *et al.*, 2018; WHO, 1997).

La nueva herramienta para identificar patógenos

La investigación sobre la resistencia a carbapenémicos por *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*, así como la incorporación de nuevos antibióticos contra ellos, es considerado como el nivel más crítico en la lista de prioridades de la **WHO** (Organización Mundial de la Salud). A ello le siguen las resistencias reportadas para *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Neisseria* y *Enterococcus* (WHO, 2020).

La capacidad de secuenciación de genoma completo de un organismo, (abreviado WGS del inglés *Whole Genome Sequencing*) es una herramienta de alta tecnología que permite la identificación de estos patógenos. En los años setentas y ochentas, considerar obtener el genoma completo de cualquier organismo era no solamente abrumador, sino prácticamente imposible e incosteable. La tecnología de entonces permitía avanzar exageradamente a 160 pares de bases por semana. La secuencia de un gen de 1600 pb podría completarse en no menos de 10 semanas. Pero un genoma bacteriano de 5 millones de pares de bases resultaba imprácticamente tardado y costoso. La mejora que trajeron los secuenciadores automatizados basados en el método de Sanger, logró que en los años 90tas se iniciara el proyecto de la **secuenciación del genoma humano**, incorporando 67 laboratorios de todo el mundo. Se tardaron cerca de 13 años en secuenciar 3400 millones de pares de bases que tiene nuestro genoma, aproximadamente al costo de un dólar la base (Hernández *et al.*, 2020).

Actualmente los secuenciadores masivos pueden obtener el genoma de 96 bacterias en un día de trabajo. Sin embargo, dejando atrás el laboratorio y el refinamiento de los métodos moleculares que se desarrollaron para este tipo de tecnología, es en el desarrollo de software para analizar el genoma, donde día a día se registran los avances más importantes en esta lucha contra los patógenos **multidrogos-resistentes** (Hernández *et al.*, 2020).

Si bien es cierto que la tecnología computacional ha sido un parteaguas en la vida de la humanidad desde hace varias décadas, han sido en los últimos 20 años cuando se

While it is true that computer technology has been a breaking point in the life of humanity for several decades, it has been in the last 20 years when a significant improvement in hardware has been achieved to think about the organization of **massive data**, at the same time the improvement of software for the genomic analyses has grown significantly. Current programs allow the distribution, analysis and storage of data from the complete genomes of bacteria, viruses, plants and even the human genome. The abundance of data is what marks this era, and what it demands is the efficient organization of our tools to extract information. It is in this niche where **bioinformatics** was born, which involves biological, chemical, statistical and mathematical elements focused on the analysis of DNA and/or protein sequences. The comparison of sequences, the identification of patterns, the ordering of variations and mutations in regions and domains of these sequences, are capable of predicting a phenotype based on statistical estimates; that is, the sequence of the complete bacterial genome can tell us how the bacterium is going to behave during an infection, and therefore how to attack it.

The first achievement was the consolidation of international databases, such as that of the National Center for Biotechnology Information or NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), which has been concentrating information for several decades and its main contribution is to have public data collections where we can find scientific articles of all kinds, genome sequences, genomic profiles, genes, point mutations, and genomic references. Indeed, we can find genes identified as responsible for antimicrobial resistance. It offers the reference materials, but the analysis is at the user's own expense (WHO, 2020).

The new platforms allow users with minimal training to perform complex analysis of DNA or protein sequences, with the option for the analyzed data to be viewed by other researchers around the world and the circulation route of a microorganism can be established. For example, the **Comprehensive Antibiotic Resistance Database o CARD** (<https://card.mcmaster.ca/>), site is a database specialized in housing **resistance genes**, their products and associated phenotypes, it contains 3146 reference sequences, 1782 single nucleotide polymorphisms (SNPs), 2756 publications. On this basis, predictions of "packages" of resistance genes (or *resistome*) of about 221 pathogens

logró un mejoramiento significativo del hardware como para pensar en la organización de **datos masivos**, hecho al que siguió el mejoramiento del software. Los programas actuales, permiten la distribución, análisis y almacenamiento de datos provenientes de genomas completo de bacterias, virus, plantas e inclusive el genoma humano. La abundancia de datos es lo que marca esta era, y lo que demanda es la organización eficiente de nuestras herramientas para extraer información. Es en este nicho donde nace la **bioinformática**, que involucra elementos biológicos, químicos, estadísticos y matemáticos enfocados al análisis de secuencias de DNA y/o proteína. La comparación de secuencias, la identificación de patrones, el ordenamiento de variaciones y mutaciones en regiones y dominios de estas secuencias, son capaces de predecir un fenotipo en base a estimaciones estadísticas; es decir, la secuencia del genoma completo bacteriano, nos puede decir cómo se va a comportar la bacteria durante una infección, y por lo tanto la forma de atacarla.

El primer logro fue la consolidación de las bases de datos internacionales, como la del National Center for Biotechnology Information abreviada NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), misma que lleva concentrando información desde hace varias décadas y su principal aportación son las colecciones públicas de datos donde podemos encontrar desde artículos científicos de toda clase, secuencias de genomas, perfiles genómicos, genes, mutaciones puntuales, referencias genómicas y un largo etcétera, donde destaca la incorporación de genes identificados como responsables de la resistencia a antimicrobianos. Ofrece los materiales de referencia, pero el análisis va por cuenta del usuario (WHO, 2020).

Las nuevas plataformas, permiten que usuarios con entrenamiento mínimo puedan realizar análisis complejos de secuencias, tanto de DNA como de proteínas, con opción a que los datos analizados sean vistos por otros investigadores en el mundo y se pueda establecer la ruta de circulación de un microorganismo en particular. Por ejemplo, el sitio **Comprehensive Antibiotic Resistance Database o CARD** (<https://card.mcmaster.ca/>), que es una base de datos especializada en albergar **genes de resistencia**, sus productos y fenotipos asociados. Contiene 3146 secuencias de referencia, 1782 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), 2756 publicaciones. En esta base se han realizado predicciones de "paquetes" de genes de resistencia (ó resistoma) de unos 221 patógenos, y se han identificado unos 10272 cromosomas, 1872 islas genómicas, 22,692 plásmidos y 213,809 alelos, datos que se encuentran disponibles para compararlos con la bacteria de interés y con opción a ser tan estricto (ó laxo) en la comparación como el usuario decida (WHO, 2020).

have been made, and about 10272 chromosomes, 1872 genomic islands, 22692 plasmids and 213809 alleles have been identified, data that are available for comparison with the bacteria of interest and with the option to be as strict (or lax) in the comparison as the user decides (WHO, 2020). At the next level of analysis is the **pathogenwatch** (<https://pathogen.watch>), platform sponsored by the Sanger Institute in England. The site can analyze several microorganisms simultaneously, obtaining in a few minutes **the identification, typing, prediction of resistance factors, and virulence**. This is achieved because the platform is interconnected with several specialized databases and in a short time it can consolidate the genomic profile of a bacterium and even establish the quality with which it was sequenced (WHO, 2020).

The last level of analysis is not yet available for bacteria, but in viruses we can find the genome **detective platform** (Vilsker *et al.*, 2019). The difference with the previous ones is that it directly accepts the files with the sequencer data (*fastq*** format), simplifying half of the analysis. In a few minutes it analyzes the sequence of the virus, compares, typifies and characterizes. At the moment they are only available for a few viruses, but it allows a rapid, automatic and homogeneous analysis of arboviruses, influenza and SARS-COV2, speeding up the information available in cases of outbreaks and pandemics. technological developments. These types of platforms will likely be ready for bacteria and eukaryotes in a short time.

Conclusions

In the last twenty years, the World Health Organization has issued numerous alerts for the appearance of bacteria with resistance and multi-resistance to antimicrobials, especially in pathogenic organisms considered of importance in public health. If international conditions do not change significantly, it is estimated that the number of people dying in 2050 from infections of these organisms will be greater than the sum of deaths from cancer, which in 2020 amounted to 10 million people.

Worldwide, antibiotics, antiparasitics and some antivirals are losing their effect. Investment in the development of new antimicrobials is **insufficient**, in the same way that **diagnostic tests** are found to detect and isolate resistant organisms, against which, in addition, there is **no vaccine** in most cases.

En un siguiente nivel de análisis se encuentra la plataforma **pathogenwatch** (<https://pathogen.watch>), auspiciada por el Instituto Sanger, en Inglaterra. El sitio tiene la capacidad de analizar varios microorganismos de manera simultánea, obteniendo en pocos minutos **la identificación, tipificación, predicción de factores de resistencia, y virulencia**. Esto se logra, porque la plataforma esta interconectada con varias bases especializadas y en corto tiempo puede consolidar el perfil genómico de una bacteria e incluso establecer la calidad con la cual fue secuenciada (WHO, 2020).

El ultimo nivel de análisis aún no se encuentra disponible para bacterias, pero en virus podemos encontrar la plataforma **genome detective** (Vilsker *et al.*, 2019). La diferencia con las anteriores consiste en que acepta directamente los archivos con los datos del secuenciador (formato *fastq***), simplificando la mitad del análisis. En pocos minutos analiza la secuencia del virus, compara, tipifica y caracteriza. De momento solo se encuentran disponibles para pocos virus, pero permite analizar de forma rápida, automática y homogénea a los arbovirus, influenza y SARS-COV2, acelerando la información disponible en los casos de brotes y pandemias, lo cual permite pasar rápidamente a los desarrollos tecnológicos. Es muy probable que este tipo de plataformas estén listas para bacterias y eucariotas en poco tiempo.

Conclusiones

En los últimos veinte años, la Organización Mundial de la Salud ha emitido numerosas alertas por la aparición de bacterias con resistencia y multiresistencia a los antimicrobianos, especialmente en organismos patógenos considerados de importancia en salud pública. Si las condiciones internacionales no cambian significativamente, se calcula que el número de personas fallecidas en 2050 por infecciones de estos organismos será más grande que la suma de los fallecimientos por cáncer, que en 2020 ascendió a 10 millones de personas.

A nivel mundial, los antibióticos, antiparasitarios y algunos antivirales, están perdiendo su efecto. La inversión en el desarrollo de nuevos antimicrobianos es **insuficiente**, de la misma forma que resultan **las pruebas diagnósticas para detectar** y aislar los **organismos resistentes**, contra los cuales, además no se tienen en la mayoría de los casos una vacuna.

Se espera que el fortalecimiento en la identificación y diagnóstico de la resistencia por WGS, así como los

It is expected that the strengthening in the identification and diagnosis of resistance by WGS, as well as the bioinformatics advances, can, together with the appropriate medical practice, health surveillance and the regulation of pharmaceutical marketing policies, stop and reverse the global trend that is taking place. has shown at the moment, at least in the medium term.

In the long term, advances in combinatorial chemistry, research on antimicrobial peptides of marine origin, and the use of natural bacteriophages are expected to offer new perspectives in the control of diseases caused by **superbugs**.

Explanatory notes

* The term *semi-synthetic* is defined as a drug that has a fermentative origin, from which it is purified and subsequently continues to be chemically modified to make structural variations.

** This is a format that is generated when bulk sequencing ends. It is a work file that requires analytical processing with different tools, however, more and more platforms prefer to use this format as the start of the analysis.

avances bioinformáticos, puedan junto con la apropiada *praxis médica*, la vigilancia sanitaria y la regulación de políticas de comercialización farmacéutica, detener y revertir la tendencia mundial que se ha mostrado al momento, al menos en el mediano plazo.

En el largo plazo se espera que los avances en química combinatoria, la investigación sobre péptidos antimicrobianos de origen marino, y el uso de bacteriófagos naturales, oferten nuevas perspectivas en el control de enfermedades causadas por **súper-bacterias**.

Notas Aclaratorias

* El término *semi-sintético* se define como un fármaco que tiene un origen fermentativo, del cual es purificado y posteriormente se continúa modificándolo químicamente para hacer variaciones estructurales del mismo.

** Este es un formato que se genera cuando termina la secuenciación masiva. Es un archivo de trabajo que demanda un procesamiento analítico con diferentes herramientas, sin embargo, cada vez son más las plataformas que prefieren usar este formato como inicio del análisis.

References

- Da Silva, G. J., & Dominguez, S. (2016). Insights on the Horizontal Gene Transfer of Carbapenemase Determinants in the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*, 4(3), 29. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4030029>
- Fortoul, G. T. I. (2019). Las otras habilidades de Alexander Fleming. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 62(4), 57-58. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2019.62.4.09>
- Goodman, L., Gilman, A. & Brunton, L., 2008. Manual of pharmacology and therapeutics. New York: McGraw-Hill Medical.
- Hang-Wei, Hu, Xue-Mei, Han, Xiu-Zhen, Shi, Jun-Tao, Wang, Li-Li, Han, Deli, Chen, & Ji-Zheng, He. (2016). Temporal changes of antibiotic-resistance genes and bacterial communities in two contrasting soils treated with cattle manure. *FEMS microbiology ecology*, 92(2), fiv169. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv169>
- Hernández, M., Quijada, N., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros J. M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 150-161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>
- Kopmann, C., Jechalke, S., Rosendahl, I., Groeneweg, J., Krögerrecklenfort, E., Zimmerling, U., Weichelt, V., Siemens, J., Amelung, W., Heuer, H., & Smalla, K. (2013). Abundance and transferability of antibiotic resistance as related to the fate of sulfadiazine in maize rhizosphere and bulk soil. *FEMS microbiology ecology*, 83(1), 125-134. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01458.x>
- Lobanovska, M. & Pilla, G.(2017). Focus: Penicillin 's Discovery and antibiotic resistance: Lesson for the future. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 90(1), 135. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5369031/>
- Mbelele, P. M., Mohamed, S. Y., Sauli, E., Mpolya, E. A., Mfinanga, S. G., Addo, K. K., Heysell, S. K., & Mpagama, S. G. Meta-narrative review of molecular methods for diagnosis and monitoring of multidrug-resistant tuberculosis treatment in adults. *International journal of mycobacteriology*, 7(4), 299. https://dx.doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_135_18
- Morfín, O.R., & Rodríguez-Noriega, E. (1999). Enterobacterias con betalactamasas de espectro extendido: su importancia como patógenos nosocomiales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 19(3),116.
- National Center for Biotechnology Information [NCBI]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Ortiz-Alcántara, J. M., Segura-Candelas, J. M., Garcés-Ayala, F., Gonzalez-Durán, E., Rodríguez-Castillo, A., Alcántara-Pérez, P., Wong-Arámbula, C., González-Villa, M., León-Ávila, G., García-Chéquer, A. J., Diaz-Quifonez, J.

- A., Méndez-Tenorio, A., & Ramírez-González, J. E. (2016). Fatal *Psychrobacter* sp. infection in a pediatric patient with meningitis identified by metagenomic next-generation sequencing in cerebrospinal fluid. *Archives of microbiology*, 198(2), 129-135. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1168-2>
- Pathogenwatch. A Global Platform for Genomic Surveillance. <https://pathogen.watch/>
- The Comprehensive Antibiotic Resistance Database [CARD]. <https://card.mcmaster.ca/>
- Vilsker, M., Moosa, Y., Nooij, S., Fonseca, V., Ghysens, Y., Dumon, K., Pauwels, R., Alcantara, L. C., Vanden E. E., Vandamme, A.M., Deforche, K., & de Oliveira T. (2019). Genome Detective: an automated system for virus identification from high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 35(5), <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty695>
- Whitman, W. B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Ludwig, W., & Suzuki, K. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 5, parts A and B, Springer-Verlag, New York, NY.
- World Health Organization [WHO]. (2020). Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2020. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332081>
- World Health Organization [WHO]. (1997). Global Tuberculosis Programme. Tratamiento de la tuberculosis: directrices para los programas nacionales, 2a ed. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/64119>