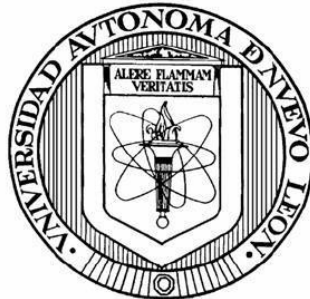


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



MICROBIOTA DE INSECTOS SINANTRÓPICOS: POTENCIALES VECTORES
DE INFECCIONES NOSOCOMIALES

POR

ADRIANA KARELY ORTEGA MARTÍNEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA Y VETERINARIA

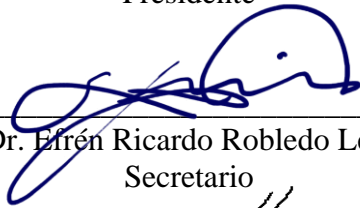
2022

MICROBIOTA DE INSECTOS SINANTRÓPICOS:
POTENCIALES VECTORES DE INFECCIONES
NOSOCOMIALES

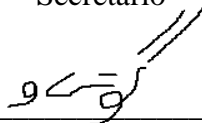
Comité de Tesis



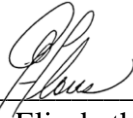
Dr. Pedro César Cantú Martínez
Presidente



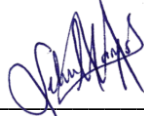
Dr. Efrén Ricardo Robledo Leal
Secretario



Dr. Gustavo Ponce García
Vocal



Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez
Vocal



Dra. Selene Marysol García Luna
Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado

MICROBIOTA DE INSECTOS SINANTRÓPICOS:
POTENCIALES VECTORES DE INFECCIONES
NOSOCOMIALES

Dirección de Tesis



Dr. Pedro César Cantú Martínez
Director



Dra. María Asunción Lago Lestón
Director externo

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT, UANL, con clave No. CN1613-21 y el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACYT como parte del proyecto “Alteraciones de la microbiota intestinal del mosquito *Aedes aegypti* y su efecto en el nivel de susceptibilidad a insecticidas” con clave No. A1-S-15485.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gustavo Ponce y a la Dra. Adriana Flores quienes siempre estuvieron dispuestos a darme sus consejos y opiniones y por permitir el desarrollo de este proyecto en el laboratorio de Entomología Médica de la FCB.

Al Dr. Efrén Robledo por creer en mi y siempre impulsar a todos sus alumnos a no darse por vencidos.

A la Dra. Asunción Lago jefe del Laboratorio de Metagenómica del CICESE y a la Maestra Yamne Ortega lab manager de este, por sus enseñanzas, paciencia y disponibilidad para resolver todas mis dudas.

A la Dra. Selene García por su entusiasmo, consejos y apoyo para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Pedro Cantú por sus palabras de aliento, atenciones, conocimientos y aceptar la dirección del proyecto.

A CONACYT por el apoyo económico brindado durante los dos años de este proyecto.

Al personal del Hospital Regional de Alta Especialidad Materno Infantil, en especial a quienes colaboran en el departamento de Epidemiología la Dra. Gabriela y la Dra. Ileana Moya; al equipo de Servicios Generales el Ing. Freddy y el Sr. Juan; y al Dr. Adrian Patton del departamento de enseñanza por el gran apoyo y facilidades brindadas para el desarrollo de esta investigación en las instalaciones del hospital.

Al Q.C.B. Eleazar Vera Puente por su entusiasta participación en el control de calidad bacteriológico de este estudio.

A mis padres Noelia Martínez Droauillet y José Isidro Ortega Salazar quienes con su amor y apoyo incondicional me han ayudado a alcanzar todas mi metas.

A mis hermanas Mayté Darceth y Amanda Briseida por siempre escucharme, reír conmigo e impulsarme a hacer más.

A mi novio Alan Esteban Juache Villagrana por su paciencia, apoyo, perseverancia y enseñanzas, pero sobretodo por el amor que me da siempre.

A mi amigo Pedro Alberto Vallejo Cerda quien nunca ha dejado de estar a mi lado en todos los momentos de necesidad y felicidad. Y a mis amigos Gaby, Marycruz, Lucy, Jona, Eder y Armando por estar siempre en mi vida y brindarme muchos momentos de alegría.

Y a Dios porque sigue poniendo en mi camino a muchas personas dispuestas a darme su apoyo para cumplir mis metas.

DEDICATORIA

A mis padres, a mis hermanas y a mi Alan, por ser y estar siempre.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. ANTECEDENTES	5
4.1 Etiología de las plagas	5
4.2 Principales insectos sinantrópicos	6
4.2.1 Cucarachas	6
4.2.2 Moscas domésticas y carroñeras	8
4.2.3 Hormigas	10
4.3 El rol de las Infecciones Asociadas a la Atención Sanitaria	11
4.4 Resistencia microbiana a los fármacos.....	12
4.5 Implicaciones en salud pública.....	12
5. JUSTIFICACIÓN	14
6. HIPÓTESIS	15
7. OBJETIVOS	16
7.1 Objetivo general	16
7.2 Objetivos específicos.....	16
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
8.1 Descripción del área de estudio.....	17
8.1.1 Hospital en estudio.....	17
8.2 Material biológico	17
8.2.1 Recolección e identificación de insectos.....	17
8.3 Preparación del material biológico.....	18
8.4 Análisis microbiológico	18
8.4.1 Análisis parasitológico	18
8.4.2 Análisis de hongos dimórficos y levaduriformes.....	19
8.4.3 Identificación molecular de hongos	19
8.5 Aislamiento de ADN para la secuenciación de la microbiota bacteriana y el análisis de genes de resistencia a fármacos	20
8.6 Análisis de la microbiota.....	21
8.6.1 Amplificación de la región V4 del gen 16s del ARNr de los insectos recolectados	21
8.6.2 Preparación dirigida de la biblioteca y secuenciación del 16S rRNA.....	22
8.7 Identificación de los genes de resistencia.....	22

8.8	Análisis de datos.....	24
9.	RESULTADOS	25
9.1	Insectos colectados	25
9.2	Identificación de parásitos de importancia médica	27
9.3	Identificación molecular de hongos.....	28
9.4	Análisis de microbiota bacteriana	29
9.5	Identificación de los genes de resistencia.....	34
10.	DISCUSIÓN	37
10.1	Insectos colectados	37
10.2	Identificación de parásitos de importancia médica	39
10.3	Identificación molecular de hongos.....	40
10.4	Análisis de microbiota bacteriana	41
10.5	Identificación de los genes de resistencia.....	44
11.	CONCLUSIONES	46
12.	PERSPECTIVAS.....	47
13.	BIBLIOGRAFÍA	48

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers utilizados en este estudio.	23
Tabla 2. Condiciones de PCR mezcla 1 y 2.	23
Tabla 3. Condiciones de PCR simplex.	23
Tabla 4. Asociación de macerados positivos a parásitos e insectos colectados.	27
Tabla 5. Cantidad de secuencias, ASV observados, y ASV más abundante en las muestras analizadas.	29
Tabla 6. Comparación múltiple de medias de abundancia por secuencias de bacterias patógenas.	34
Tabla 7. Comparación de abundancia de secuencias de especie bacterianas patógenas por especie de insecto.	34

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de transmisión microbiana entre humanos y animales a través de moscas sinantrópicas.	9
Figura 2. Diseño de cebadores para la estrategia de secuenciación de un solo paso	21
Figura 3. Riqueza de moscas, cucarachas y hormigas colectadas.	26
Figura 4. Especies de moscas de baja abundancia colectadas por área hospitalaria.....	27
Figura 5. Número de aislamientos por especie de hongo identificado.	28
Figura 6. Abundancia de hongos por especie de insecto colectado.	29
Figura 7. Curva de rarefacción del número de ASV detectados en las muestras analizadas.	30
Figura 8. Abundancia de filos en las muestras analizadas.	31
Figura 9. Abundancia de especies patógenas en las muestras analizadas.....	32
Figura 10. Análisis electroforético de los productos de amplificación del gen 16s.....	35
Figura 11. Análisis electroforético de los productos de amplificación multiplex para el mix 1(<i>blaTEM</i> , <i>mexR</i> , y <i>mecA</i>) y mix 2 (<i>blaOXA</i> , <i>mexA</i> , y <i>blaSHV</i>).	35
Figura 12. Frecuencia de los genes de resistencia a fármacos.	36

1. RESUMEN

Las moscas, cucarachas y hormigas juegan un rol importante en el transporte y dispersión de microorganismos en ambientes naturales y urbanos, además, se ha sugerido que los insectos sinantrópicos son vectores mecánicos de diversos patógenos resistentes a fármacos. En México, no existen investigaciones relacionadas con insectos sinantrópicos que predominan en los hospitales. El objetivo de este estudio fue determinar la biodiversidad microbiana presente en insectos recolectados en un hospital del área metropolitana de Nuevo León. De las moscas recolectadas la especie más frecuente fue *Musca domestica* (74%), seguida de *Chrysomya rufifacies* (11.6%), moscas de la familia Psychodidae (5.3%), *Tricharaea* sp. (3.9%) e individuos de la familia Hippoboscidae (3.2%). Del grupo de las hormigas, el 95.9% fueron de la especie *Paratrechina longicornis* y el 4.1% de *Tetramorium* sp. Por último, solo se capturaron tres cucarachas; una ninfa de *Blatella germanica* y dos adultos de *Periplaneta americana*. El análisis parasitológico reveló la presencia de huevos de *Ascaris* sp y ooquistes de *Cryptosporidium* sp en *C. rufifacies*; quistes de *Entamoeba coli* en *Fannia* sp; quistes de *Endolimax nana*, *E. coli*, *Blastocystis* sp, huevos de *Hymenolepis diminuta* y larvas y huevos de *Strongyloides* sp asociados a *M. domestica*. Por último, se identificaron quistes de *E. histolytica* en un macerado de *Tetramorium* sp. Se aislaron 8 especies de hongos de importancia clínica: *Wickerhamomyces anomalus* (19%), *Filobasidium* sp (12%), *Aureobasidium* sp (15%), *Rhodotorula mucilaginosa* (8%), *Rhodotorula* sp (8%) y aislamientos únicos de *Candida glabrata*, *Cystobasidium minutum* y *Cryptococcus albidus*, a partir de 11 especies de insectos. A partir de la secuenciación del gen 16s rRNA de 8 especies de insectos recolectados se identificaron diversos géneros de bacterias de importancia clínica como *Proteus*, *Escherichia-Shigella*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium* y *Staphylococcus*, entre otras. Por último, la prevalencia de los genes de resistencia a fármacos presentes en la microbiota bacteriana de los insectos analizados fué *blaCTX-M* (47.6%), *blaOXA* (19%), *MexA* (9.5%), *blaTEM* (4.8%) y *blaSHV* (4.8%).

2. ABSTRACT

Flies, cockroaches, and ants play an important role in the transport and dispersal of microorganisms in natural and urban environments, however, the knowledge about their impact on public health remains limited. Synanthropic insects have been suggested to be mechanical vectors of various drug-resistant pathogens, but they have rarely been associated with any specific medical conditions, which has prevented further studies targeting mechanical vectors. In Mexico, there are no investigations related to synanthropic insects that predominate in hospitals, so their possible participation as carriers of nosocomial infections is completely unknown. The objective of this study was to determine the microbial biodiversity present in insects collected in hospitals in the metropolitan area of Nuevo León. Of the flies collected, the most frequent species was *Musca domestica* (74%), followed by *Chrysomya rufifacies* (11.6%), flies of the Psychodidae family (5.3%), *Tricharaea* sp. (3.9%) and individuals of the Hippoboscidae family (3.2%). Of the group of ants, 95.9% were of the *Paratrechina longicornis* species and 4.1% of *Tetramorium* sp. Finally, only three cockroaches were captured: a nymph of *Blattella germanica* and two adults of *Periplaneta americana*. Parasitological analysis revealed the presence of *Ascaris* sp eggs and *Cryptosporidium* sp oocysts in *C. rufifacies*; *Entamoeba coli* cysts in *Fannia* sp; *Endolimax nana* cysts, *E. coli*, *Blastocystis* sp, *Hymenolepis diminuta* eggs, and *Strongyloides* sp larvae and eggs associated with *M. domestica*. Finally, *E. histolytica* cysts were identified in a *Tetramorium* sp. 8 species of fungi of clinical importance were isolated: *Wickerhamomyces anomalus* (19%), *Filobasidium* sp (12%), *Aureobasidium* sp (15%), *Rhodotorula mucilaginosa* (8%), *Rhodotorula* sp (8%) and single isolates of *Candida glabrata*, *Cystobasidium minutum* and *Cryptococcus albidus*, from 11 species of insects. From the sequencing of the 16s rRNA gene of 8 species of insects collected, various genera of bacteria of clinical importance were identified, such as *Proteus*, *Escherichia-Shigella*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium* and *Staphylococcus*, among others. Finally, the prevalence of drug resistance genes present in the bacterial microbiota of the insects analyzed was *blaCTX-M* (47.6%), *blaOXA* (19%), *MexA* (9.5%), *blaTEM* (4.8%) and *blaSHV* (4.8%).

3. INTRODUCCIÓN

Cuando los humanos modificamos el ambiente natural que nos rodea, para el desarrollo de una actividad, generamos lo que se conoce como ambiente antrópico. En este ambiente se crean recursos aprovechables por especies animales oportunistas que se adaptan a estos cambios. La acción de adaptación de estos animales se le llama domiciliación o sinantropía. Las especies sinantrópicas pasan a interactuar con el ser humano aprovechando los residuos que genera dando pie a un ambiente idóneo para el incremento la densidad de estas especies.

Se ha demostrado que los insectos son vectores altamente eficientes de diversos agentes patógenos. En el caso de los insectos sinantrópicos, se ha observado su amplia participación en la propagación de microorganismos a través de sus heces, la regurgitación de fluidos del tracto alimentario o por la diseminación a través de sus patas. Esta propagación puede afectar a la salud humana, convirtiéndolos en un grave problema de salud pública (Boiocchi et al., 2019; Teixeira et al., 2009).

Las infecciones asociadas a la atención sanitaria (IAAS), también conocidas como infecciones nosocomiales u hospitalarias, son infecciones producidas por patógenos microbianos adquiridas por un paciente ambulatorio u hospitalizado que se encuentra en constante contacto con los sistemas sanitarios y que además no presentaba ni estaba incubando la infección en el momento de su ingreso (OMS, 2018). Se estima que a nivel mundial más de 1,4 millones de personas contraen infecciones en el hospital y cerca del 5% al 10% de los pacientes se encuentran en hospitales de países desarrollados, sin embargo, en los países en desarrollo como México este número es de 2 a 20 veces mayor. Se calcula que anualmente en nuestro país existen alrededor de 450.000 casos de IAAS que causan 32 muertes por cada 100.000 habitantes generando un costo de 1.500 millones de pesos (Castañeda Martínez & Valdespino Padilla, 2015).

En el ambiente hospitalario, la Norma Oficial Mexicana 005-SSA3-2010 en su punto número 5.5 establece como obligatorio el control de la fauna nociva mediante la fumigación de todas las áreas por lo menos una vez al año. Sin embargo, a pesar de la implementación de los controles sanitarios correspondientes existen reportes alrededor

del mundo que muestran la persistencia de los insectos (De Castro et al., 2015; Machado Oliveira et al., 2017; Menasria et al., 2014; Schouest et al., 2017).

Adicional a esto, la Norma Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005 establece que se deberá realizar la vigilancia epidemiológica de la infecciones nosocomiales en cada centro de atención médica del país lo que posibilitará comprender cómo se comportan estas infecciones, los microorganismos que prevalecen, sus mecanismos de resistencia a los fármacos antimicrobianos, así como los factores que permiten la colonización y desarrollo en los pacientes (Secretaría de Salud, 2019).

El conocimiento acerca de la relación que existe entre las bacterias comensales de los insectos y el impacto que tienen en la salud pública sigue siendo limitado. Las moscas, cucarachas y hormigas juegan un rol importante en el transporte y dispersión de microbios en ambientes naturales y urbanos. Se ha sugerido que son vectores mecánicos de diversos patógenos resistentes a fármacos, pero rara vez se han relacionado con alguna condición médica específica, lo que ha impedido la generación de más estudios específicos de vectores mecánicos.

Por ello el objetivo principal de este trabajo es determinar la diversidad microbiana de los insectos sinantrópicos recolectados en un centro hospitalario, y de esta manera generar información acerca de la capacidad que tienen los insectos para la diseminación de esos microorganismos que pudieran provocar infecciones nosocomiales.

4. ANTECEDENTES

Los insectos se encuentran colonizados por una gran cantidad de microorganismos que incluso, pudieran encontrarse en mayor número que sus propias células representando entre el 1 al 10% de su biomasa (Dillon & Dillon, 2004) formando relaciones simbióticas que pueden llegar a ser necesarias para su supervivencia (Douglas, 2015). Sin embargo, poco se conoce acerca de cómo estas asociaciones simbióticas podrían afectar en la salud humana (Allen et al., 2009).

Es sabido que insectos como las moscas o las cucarachas son vectores mecánicos de microorganismos patógenos como el virus de la influenza aviar, quistes de helmintos y enterobacterias resistentes a antibióticos (Chen et al., 2017; Pai, 2013; Salamatian et al., 2019), pues usualmente son encontradas en materia en estado de putrefacción y heces, en las cuales comen, se desarrollan y depositan sus huevos (Amendt et al., 2004; Pai et al., 2004).

Las hormigas en cambio no son comúnmente relacionadas por la población en general como un problema para la salud pública (Simothy, et al., 2018), sin embargo, algunos investigadores han encontrado que son portadoras de bacterias y hongos patógenos para el ser humano (Rodríguez et al., 2016; Teixeira et al., 2009).

4.1 Etiología de las plagas

A nivel mundial los desplazamientos masivos de personas, el comercio internacional, el cambio climático, la disposición inadecuada de los desechos o los asentamientos humanos crecientes o irregulares influyen en gran medida a la proliferación de plagas y en consecuencia la transmisión de enfermedades asociadas a éstas.

Las plagas urbanas definidas en 1988 por la (Organización Mundial de la Salud/OMS, 1988) como aquellos organismos vivos cuya existencia permanece en el tiempo y superan los límites tolerables para una convivencia sana con el ser humano, provocando enfermedades, deterioro del hábitat, del bienestar del hombre o que pueden implicar pérdidas económicas y se encuentran por encima de los niveles que se

consideran como normalidad, refiriéndose a “normalidad” como la densidad de población de una especie cuya presencia representa un riesgo sanitario, de confort o de seguridad para el ser humano que puede tener implicaciones económicas (Pinto, 2017)

4.2 Principales insectos sinantrópicos

4.2.1 Cucarachas

Las cucarachas que conforman el orden *Blattodea* son insectos paurometábolos de comportamientos gregarios y ampliamente distribuidos a nivel mundial, con mayor abundancia en zonas tropicales. Su tamaño oscila entre 1 y 7 cm, usualmente son de color ocre, pardo o negro. Poseen patas largas y ágiles que les permiten correr rápidamente. Su régimen alimenticio es omnívoro y muestran mayor actividad en temperaturas de 20°C, son especies lucífugas y generalmente higrófilas (Torres, 2015), son mejor conocidas por ser vectores mecánicos de diversos microorganismos que usualmente se encuentran en su exoesqueleto y secreciones y son patógenos para el hombre y los animales (Vazirianzadeh et al., 2009).

Sin embargo, de las 4000 especies descritas en el mundo solo 30 han sido relacionadas como plagas urbanas de importancia sanitaria (Johnson & Triplehorn, 2005). En México se han reportado 156 especies autóctonas, de las cuales 11 son de importancia sanitaria y de éstas *Blatta orientalis*, *Periplaneta americana* y *Blattella germanica* son las especies de mayor relevancia por su amplia distribución mundial (César Estrada-Álvarez, 2013; Tetteh-Quarcoo et al., 2013).

Las cucarachas de la especie *P. americana* se encuentra usualmente en alcantarillas y sótanos, especialmente alrededor de tuberías y desagües, mientras que *B. germanica* se encuentra en cocinas y áreas de almacenamiento, especialmente donde se preparan o almacenan alimentos. Es por ello que la falta de higiene, el mal estado y el desorden contribuyen al aumento de la población de cucarachas en los hábitats humanos y en consecuencia a la contaminación de los alimentos con las heces y partes del cuerpo de las cucarachas (Bouamama et al., 2010).

Diversos investigadores han detectado cucarachas portadoras de una gran variedad de microorganismos patógenos, incluyendo bacterias resistentes a fármacos lo que podría tener consecuencias graves para la salud (Aurjun et al., 2016; Menasria et al., 2014; Pai, 2013). Dentro de algunos hospitales se han logrado detectar cucarachas en las habitaciones designadas para la recuperación de los pacientes, las unidades de cuidados intensivos, quirófanos y cocinas y de estos individuos recolectados el 98% portaba patógenos microbianos en sus cutículas y partes externas del cuerpo o en sus intestinos (Zarchi & Vatani, 2009). Las cucarachas se alimentan de flema, saliva, vómito, excrementos y muchas fuentes de alimentos diversas lo que las hace un foco importante de diseminación de patógenos nosocomiales (Kassiri & Kazemi, 2012).

Se ha encontrado que las cucarachas son vectores importantes de bacterias como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* y *Proteus vulgaris*, sin diferencia significativa entre la abundancia o la riqueza de las bacterias y el sitio anatómico del insecto (Memona et al., 2018; Menasria et al., 2014; Pai, 2013). Además, esas bacterias presentan resistencia a algunos antibióticos de primera línea como cotrimoxazol, tetracycline y cefotaxima y adicionalmente algunas de ellas mostraron patrones de resistencia a múltiples familias de fármacos, en especial *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *P. vulgaris*, *E. cloacae* y *E. coli* (Pai, 2013; Tetteh-Quarcoo et al., 2013).

Otros microorganismos como los hongos *Aspergillus niger*, *Candida* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. son comúnmente aislados en las cucarachas además de los parásitos *Ancylostoma duodenale*, *Taenia* spp. *Hymenolepis nana*, *Toxocara* spp, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Schistosoma haematobium*, *Balantidium coli* y *Entamoeba histolytica* (Atiokeng Tatang et al., 2017; Isaac et al., 2014; Tetteh-Quarcoo et al., 2013).

4.2.2 Moscas domésticas y carroñeras

Los dípteros son un grupo de insectos que incluyen de manera general a las moscas y mosquitos, su principal característica es que poseen solo un par de alas, aunque no es exclusiva de ellos pues incluso algunas especies son ápteras. Otra característica distintiva del orden Díptera es la transformación de las alas posteriores en halterios, también llamados balancines, que les permiten mantener la estabilidad durante el vuelo. Son holometábolos y la mayoría de hábitos diurnos y conforman el grupo animal con mayor diversidad ecológica pues se les puede encontrar asociados con una gran cantidad de organismos vivos, entre ellos el hombre (Tolrá Hjorth-Andersen, 2015).

Algunas especies pertenecientes al orden Díptera se han adaptado a vivir en zonas urbanas, principalmente las moscas de las familias Muscidae, Calliphoridae y Sarcophagidae que en inglés se conocen como “filth flies” (Stafford, 2008; Tolrá Hjorth-Andersen, 2015). Son los primeros organismos que llegan a los cadáveres, materia orgánica en descomposición y heces de las que se alimentan, se reproducen y ponen huevos por lo que tienen una relación muy estrecha con la transmisión fecal-oral de una gran variedad de microorganismos patógenos (Amendt et al., 2004; Boiocchi et al., 2019; Graczyk et al., 2001; Salamatian et al., 2019). La capacidad de las moscas de volar distancias de hasta 5 a 7 km y moverse libremente entre diferentes nichos les brinda una gran posibilidad de contribuir en la diseminación de microorganismos e incluso en la propagación de bacterias resistentes a los fármacos ente animales y humanos y la transferencia horizontal de genes de resistencia entre las mismas (Fukuda et al., 2016; Winpisinger et al., 2005).

Al igual que las cucarachas, los mecanismos por los cuales las moscas pueden adquirir y transmitir mecánicamente diversos patógenos es a través de la superficie contaminada de su cuerpo, principalmente sus patas y aparato bucal, por la regurgitación del alimento y la ingestión y defecación de patógenos (Figura 1) (Davies, 2014). Reportes a nivel mundial han demostrado en su mayoría la presencia de constante de los parásitos *Ascaris* sp., *Entamoeba* sp., *Ancylostoma* sp. y *Trichiuris* spp. y los hongos *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., y *Candida* sp. (Khamesipour et al., 2018)

Las características de los microorganismos aislados de las moscas pueden variar dependiendo del sitio de colecta, pues se ha identificado que aquellas capturadas en ambientes donde el uso de antimicrobianos es común, como en los hospitales o centros de cría de ganado, es habitual encontrar cepas bacterianas y de hongos con resistencia a diversos fármacos, lo que implica un papel importante en la transmisión de IAAS (Doud & Zurek, 2012; Hamoo & Alnuri, 2019; Wang, 2013; Zurek & Ghosh, 2014).

Bacterias como *E. coli* y *Providencia stuartii* aisladas de moscas recolectadas en la comunidad mostraron ser portadoras de genes móviles de resistencia a la colistina (Fukuda et al., 2016; Usui et al., 2015; J. Zhang et al., 2017). Otro estudio encontró que las tasas de resistencia a los antimicrobianos de *E. coli*, derivadas de las moscas domésticas recolectadas en granjas, reflejaban los de las heces del ganado en los mismos lugares, demostrando que estos insectos tienen la capacidad de actuar como un vector biológico para la diseminación de genes de resistencia y la aparición de nuevos a través de la transferencia horizontal de los mismos (Onwugamba et al., 2018)

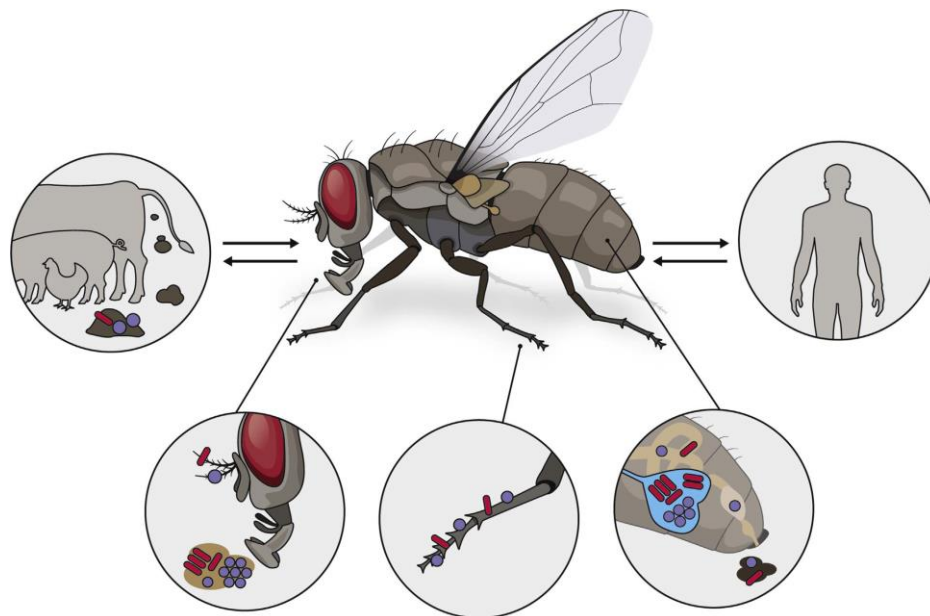


Figura 1. Mecanismos de transmisión microbiana entre humanos y animales a través de moscas sinantrópicas (Onwugamba, 2018).

4.2.3 Hormigas

Las hormigas (*Hymenoptera: Formicidae*) son un grupo de insectos sociales, ubicuos y hemisinantrópicos pues su relación con el ser humano puede ser variable (Šrámová et al., 1992). En México se encuentran ampliamente distribuidas y se estima que existen cerca de 937 especies de las cuales en Nuevo León se han identificado 116 (Ríos-Casanova, 2014). Las hormigas obreras abandonan el nido en busca de comida, generalmente cualquier alimento orgánico como azúcares o almidones por ello es común encontrarlas en cocinas, panaderías o restaurantes caminando por los suelos o los basureros hasta llegar a la fuente de alimento (Smith, 1965; Voeller et al., 2008). Su capacidad como vectores de microorganismos que pueden afectar la salud humana es muy importante, sin embargo, a diferencia de las moscas y las cucarachas, existe muy poca información acerca de las hormigas como portadoras de microorganismos peligrosos para la salud (Simothy et al., 2018).

En el sector salud, las hormigas han representado alrededor del mundo un serio problema pues su control es muy complicado, su presencia en hospitales puede ser favorecida por el tipo de edificación, por la proximidad a zonas residenciales, su entrada a través de cajas con insumos que provienen del exterior, así como al número de personas que transitan por el hospital y que pudieran portar a estos insectos en su ropa u objetos personales (Eug, 2002; Ríos-Casanova, 2014). Dentro de los nosocomios, la hormigas son encontradas usualmente en las cocinas y comedores, pero pueden llegar hasta los pacientes al ser atraídas por las migajas de comida que pudiera esparcirse en sus habitaciones, llegando incluso a ser vistas mordisqueando la comida alrededor de la boca de los pacientes; también se alimentan de pus expuesto y sangre seca, o en las bandejas de comida de los pacientes (Voeller et al., 2008). Existen reportes que ubican a las hormigas dentro de dispositivos médicos como goteros intravenosos o apósitos estériles o de sitios que pueden ser fuente de agua como desagües del piso, urinarios, frascos de agua para pacientes, orinales sin vaciar, vendajes para heridas, máquinas de hielo, goteos de plomería, etcétera (Beatson, 1972, 1973).

Brasil es uno de los países que han contribuido en mayor medida al conocimiento acerca de las hormigas como vectores mecánicos de infecciones intrahospitalarias al

aislar del exoesqueleto de estos insectos microorganismos patógenos en prácticamente cualquier entorno hospitalario, calificándolas como agentes potencialmente importantes en la diseminación de infecciones en las instalaciones médicas (Pesquero et al., 2008; Rodríguez et al., 2016). Los resultados obtenidos por estos investigadores han identificado que las hormigas son portadoras de bacterias coliformes, *Bacillus* sp., *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., y *Enterococcus* sp. y en su mayoría de hongos filamentosos y levaduras. Adicionalmente las bacterias que fueron aisladas en esos estudios mostraron patrones de resistencia a antibióticos como la penicilina, cefalotina, cloranfenicol, amikacina y aztreonam (Machado Oliveira et al., 2017; Rodríguez et al., 2016; Simothy et al., 2018; Teixeira et al., 2009).

4.3 El rol de las Infecciones Asociadas a la Atención Sanitaria

Las infecciones intrahospitalarias son atribuidas a los gérmenes presentes en el área hospitalaria, adquirido por los pacientes dentro de las primeras 48-72 horas de haber sido ingresados y que pueden comenzar a presentar síntomas clínicos hasta 30 días posteriores al alta hospitalaria (Vásquez Avedaño et al., 2013).

En 2017 la Organización Mundial de la Salud reporta un listado de las bacterias con mayor nivel de resistencia a antibióticos a nivel global que incluye las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana, para impulsar la investigación y desarrollo de nuevos fármacos más efectivos contra ellas. Estas bacterias se encuentran agrupadas bajo el acrónimo “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp), acuñado en el 2009 por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA, por sus siglas en inglés). Dicho acrónimo hace referencia su potencial de “escapar” de la acción biocida de los antibióticos y representar mutuamente nuevos paradigmas en patogénesis, transmisión y resistencia (Ghadiri et al., 2014; Pendleton et al., 2013; Santos Zonta et al., 2020; WHO, 2017). Estas bacterias son especialmente peligrosas cuando se relacionan con la atención hospitalaria o IAAS pues provocan la mayor parte de las infecciones asociadas a la atención de la salud (Sosa et al., 2019).

En México la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica o RHOVE publicó en el 2016 un informe acerca de las IAAS más frecuentemente aisladas, reporte en el cual se observó que las bacterias del grupo ESKAPE son el principal agente etiológico de los centros sanitarios en el país (Secretaría de Salud, 2016).

4.4 Resistencia microbiana a los fármacos

La resistencia a los antibióticos puede producirse como consecuencia del cambio genético (mutaciones) o por la adquisición de genes de resistencia a través de la transferencia horizontal de genes. Este último mecanismo es el de mayor importancia debido a la maquinaria que el microorganismo utiliza a través de elementos genéticos móviles, promoviendo el desarrollo de cepas resistentes a múltiples tipos de fármacos, las conocidas como superbacterias, que presentan resistencia a todas las clases de antibióticos conocidas (Loera-Valenzuela et al., 2016)

La resistencia a los fármacos antimicrobianos en los países en desarrollo representa un reto adicional, ya que se observa en forma creciente entre los patógenos adquiridos en la comunidad, en comparación con los países ricos, en los que la resistencia está limitada a microorganismos que afectan a pacientes hospitalizados. Además, diversos reportes muestran que existe una considerable variación en la resistencia general a los fármacos entre países desarrollados y los países en desarrollo pues en estos últimos va a la alza (Amabile-Cuevas, 2010; Foxman, 2010; Serra Valdés, 2017).

Las infecciones intrahospitalarias por bacterias MDR (*multi drug resistance*) han ido en incremento, debido a una inadecuada higiene de manos por parte del personal de salud, la poca eficiencia de la limpieza del ambiente hospitalario y la presencia de vectores como, por ejemplo: mosquitos, moscas, ratas y otros (Sosa et al., 2019; Vásquez Avedaño et al., 2013).

4.5 Implicaciones en salud pública

Los insectos sinantrópicos como vectores albergan un sinúmero de especies y sus asociaciones con el ser humano, sus actividades y edificaciones han estado presentes a lo

largo de la historia y han irrumpido, y seguirán irrumpiendo, en el ambiente antrópico con un fuerte impacto en la salud pública, ya que se constituyen en agentes etiológicos promotores de diversas enfermedades humanas (Blazar et al., 2011; Gupta et al., 2014). Lo anterior puede generar problemas más graves en entornos hospitalarios, pues al ser sitios donde la búsqueda de tratamiento y recuperación por parte de las personas que ahí acuden y su vulnerabilidad, debido al mayor riesgo de adquirir infecciones que empeoren su estado, implican que la potencial propagación de patógenos sea razón suficiente para que los insectos sinantrópicos no sean tolerados en estos entornos. Sin embargo, las instituciones de atención sanitaria como parte del entorno metropolitano también son colonizadas por estos insectos de manera similar que el resto de las edificaciones urbanas (Anbazhagan et al., 2011; Gliniewicz et al., 2006).

Por último, hay que señalar la capacidad que tienen los insectos sinantrópicos como los responsables de diversos daños a la salud humana como alergias, miasis o como reservorios de agentes infecciosos con el potencial patogénico de propagar infecciones resistentes a fármacos. Esto último se ha demostrado en investigaciones realizadas tanto en comunidades rurales y como urbanas observándose que representan un riesgo importante para la salud pública (Abdolmaleki et al., 2019; Bogdanova, 2008; Shahi et al., 2017).

5. JUSTIFICACIÓN

Los insectos como vectores mecánicos son responsables de diseminar numerosas enfermedades infecciosas, tienen la capacidad de contaminar grandes cantidades de alimentos que deberán ser destruidos para evitar la potencial difusión de enfermedades, con el consiguiente perjuicio económico. La prevalencia de los insectos varía año con año dependiendo de las condiciones ambientales y su control básicamente se enfoca en reducir la fuente de donde provienen y el contacto que pudieran tener con el ser humano. En los centros de atención a la salud el alto flujo de personal sanitario, administrativo, familiares y pacientes con sus respectivas pertenencias además del sinnúmero de equipos, suministros, alimentos, entre otros, permiten el establecimiento y conservación de diferentes plagas asociadas a los humanos como cucarachas, moscas y hormigas.

Debido a que quiénes acuden a las instituciones hospitalarias se encuentran críticamente enfermos, la transmisión de diferentes infecciones constituye un problema de salud intrahospitalario que puede afectar el desempeño y calidad en la atención de quienes se encuentran sumamente susceptibles a adquirir infecciones secundarias durante su estadía, como resultado de su estado anímico, procedimientos invasivos o el uso de altas dosis de medicamentos. Estas infecciones oportunistas se presentan en uno de cada diez pacientes hospitalizados incrementando el tiempo de internamiento y recuperación, generando pérdidas económicas millonarias alrededor del mundo (European Centre for Disease Prevention and Control, 2016).

En México no existen investigaciones y/o reportes relacionados con insectos sinantrópicos que predominan en los hospitales, por lo que se desconoce por completo los microorganismos a los que se encuentran asociados y por ende su posible participación como portadores de enfermedades nosocomiales. Este estudio permitiría generar información acerca del riesgo que representan estos insectos dentro de las instalaciones, dando pautas para la elaboración de protocolos más estrictos para su monitoreo y control.

6. HIPÓTESIS

Existen microorganismos patógenos y genes de resistencia a antibióticos en las comunidades microbianas en insectos que habitan en instalaciones hospitalarias.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Determinar la biodiversidad microbiana presente en insectos sinantrópicos recolectados en instalaciones hospitalarias.

7.2 Objetivos específicos

1. Determinar las especies de insectos que habitan en instalaciones hospitalarias
2. Caracterizar la microbiota de los insectos recolectados (bacterias, hongos y parásitos)
3. Determinar la presencia de la microbiota de importancia clínica
4. Determinar la presencia de genes de resistencia a fármacos

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Descripción del área de estudio

8.1.1 Hospital en estudio

El sitio de colecta corresponde a un hospital de alta especialidad perteneciente al Estado de Nuevo León. En este hospital se ofrecen servicios médicos integrales de neonatología, pediatría, ginecología y oncología ginecológica y pediátrica, entre otros padecimientos complejos de la población infantil y femenil. Cubre los servicios de salud materno-infantil de personas que carecen de alguna afiliación a los servicios médicos de la seguridad social en la zona noreste del país, especialmente de los habitantes del área metropolitana de Monterrey.

El Comité de Investigación y el Comité de Ética en Investigación del hospital aprobaron el desarrollo de este protocolo el 3 de Julio del 2020, que quedó registrado ante la Dirección de Enseñanza, Investigación en Salud y Calidad de la Secretaría de Salud del Gobierno de Nuevo León con el folio DEISC-19 01 20 019.

8.2 Material biológico

8.2.1 Recolección e identificación de insectos

Se colocaron 3 tipos diferentes de trampas: para la colecta de cucarachas, se emplearon trampas con pegamento a nivel del suelo con un atrayente no tóxico como cebo. La recolección de hormigas se realizó con tubos de 50 mL estériles con 10 g de azúcar como cebo colocadas a nivel del suelo o en los marcos de las ventanas. Por último, las moscas se colectaron mediante tiras pegajosas suspendidas en el techo a aproximadamente 2 metros del suelo y cerca de fuentes artificiales de luz. Estas trampas fueron colocadas en la cocina, sala de espera, área de pediatría, adultos, ginecología, cuidados intensivos adultos y pediátricos además de los baños de cada una de las áreas mencionadas. El periodo de colecta de los insectos sinantrópicos corresponde a los meses de agosto 2020 a julio 2021, mismo que fue autorizado por las autoridades sanitarias.

Las trampas fueron desinfectadas o esterilizadas previamente a su colocación y se reemplazaron cada 72 horas. Las trampas pegajosas con moscas o cucarachas fueron dispuestas dentro de bolsas plásticas estériles y los tubos para centrífuga con hormigas fueron cerrados para su transporte. Todos los contenedores con insectos fueron transportados al laboratorio bajo cadena de frío a una temperatura de 4°C para su posterior identificación taxonómica y aislamiento del ADN.

La identificación taxonómica de las familias de las cucarachas se realizó utilizando las claves taxonómicas para artrópodos de importancia en salud pública, difundidas por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) (Dodge, 1966; Pratt & Littig, 1969). En la identificación de las familias de moscas se utilizaron las claves dicotómicas publicadas por (De Carvalho & De Mello-Patiu, 2008) y una vez que se conocía a que familia pertenecía la mosca en estudio, se utilizaron las claves específicas para cada una de ellas (Amat et al., 2008; Buenaventura et al., 2009). Para la identificación de las especies de hormigas se utilizaron las claves publicadas por Mackay y Mackay (1989).

8.3 Preparación del material biológico

Para realizar el análisis microbiológico de los insectos recolectados fueron colocados un máximo de 25 mg de moscas, cucarachas u hormigas de la misma especie en un tubo adicionado con 3ml de solución salina estéril al 0.9 %. Los insectos fueron homogenizados mecánicamente con un pistilo estéril. Posteriormente, se centrifugo a 190 rpm por 5 min y se transfirió 500 µL del sobrenadante a un tubo con 4.5 mL de solución salina estéril al 0.9 %. A partir de esta solución se realizaron los análisis microbiológicos descritos a continuación.

8.4 Análisis microbiológico

8.4.1 Análisis parasitológico

Para el análisis parasitológico se utilizaron 1.5 mL de la solución anterior. Esta solución fue centrifugada a 3000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se analizó el sedimento con ayuda de un microscopio de campo claro

bajo el objetivo de 10X y 40X para la identificación de parásitos empleando como colorante una solución de yodo-lugol.

El análisis se realizó a un total de 55 macerados que corresponden a 36 *pools* de moscas de la especie *M. domestica*, 5 de *Chrysomya rufifacies*, 4 de hormigas *P. longicornis*, 2 de cucarachas *P. americana* y macerados únicos de cucarachas *B. germanica*, de moscas de los géneros; *Tricharaea* sp, *Fannia* sp y *Lucilia* sp y de las familias Psychodidae e Hippobocidae, además de un macerado de hormigas del género *Tetramorium* sp.

8.4.2 *Análisis de hongos dimórficos y levaduriformes*

Los lavados obtenidos a partir de los insectos recolectados fueron considerados como la solución madre a partir de la cual se prepararon diluciones seriadas en base 10, transfiriendo 1 mL a un tubo con 9 mL de solución salina. Esta mezcla fue agitada para obtener la dilución 10^{-1} ; se repitió este paso hasta llegar a la dilución 10^{-4} . De las diluciones elaboradas, se depositaron 20 μ L en cajas Petri conteniendo medio Papa Dextrosa Agar (PDA) acidificado (adicionando 200 μ L de ácido láctico por cada litro de medio de cultivo) y posteriormente se expandieron en la superficie con la ayuda de una varilla Drigalsky. Este procedimiento se realizó por triplicado por muestra y dilución. Una vez absorbida la humedad en el agar, las cajas Petri fueron selladas, incubadas a 25 °C y monitoreadas de manera constante hasta el quinto día. Durante la incubación, se realizaron observaciones al microscopio para reconocer aquellas colonias conformadas por levaduras, hifas, o una mezcla de ambas (hongos dimórficos).

Al reconocer colonias fúngicas, estas eran aisladas en nuevas cajas con PDA acidificado y fueron contabilizadas en las tres repeticiones de la misma dilución para posteriormente realizar la extracción de ADN de los hongos dimórficos o levaduriformes y realizar la secuenciación de la región ITS.

8.4.3 *Identificación molecular de hongos*

Un subgrupo de 31 muestras correspondientes a cucarachas, moscas y hormigas colectados en el periodo agosto 2020 a octubre 2020 fue utilizado para realizar la

identificación a nivel especie de los hongos aislados. Para ello se realizó una extracción de DNA utilizando el kit de extracción DNeasy Blood Tissue Kit de Qiagen siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente la identificación molecular de los hongos aislados se realizó por la secuenciación de productos de PCR específicos de las regiones ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) en las condiciones descritas por White et al. (1990). El método de secuenciación empleado corresponde al de determinación por didesoxinucleotidos marcados en el sistema Genetic Analyzer 3500 y 3130 llevado a cabo en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas en R utilizando el paquete sangeranalyzer (Chao et al., 2021). El análisis de las secuencias incluyó la limpieza de estas por medio del algoritmo modificado de Mott a un valor phred de 0.5 y un punto de corte de señalización de 0.33. La identificación de especies fúngicas se realizó por una búsqueda de similitudes en secuencias utilizando la herramienta de *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul et al. 1990) del NCBI.

8.5 Aislamiento de ADN para la secuenciación de la microbiota bacteriana y el análisis de genes de resistencia a fármacos

Para el estudio molecular de la microbiota bacteriana en un tubo de microcentrífuga con 150 µL de PBS se colocaron un máximo de 50 mg de moscas, cucarachas u hormigas de la misma especie y se maceraron con un pistilo estéril, se obtuvieron un total de 21 macerados; 7 de *M. domestica*, 4 de *Lucilia* sp., 3 de *C. rufifacies*, 3 de *Tricharaea* sp y macerados únicos para las especies *P. americana*, *P. longicornis*, *Tetramorium* sp. así como también un macerado de la familia de moscas Hippoboscidae. Posteriormente, para extraer el ADN a partir de dicha suspensión se utilizó el sistema DNeasy Blood Tissue Kit 69506 de Qiagen® de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El ADN obtenido se mantuvo en congelación a -20 °C hasta su utilización. La integridad del ADN se visualizó en un gel de agarosa al 1% además de la evaluación de la relación 260/280 y 260/230 utilizando un espectrofotómetro Nanodrop®.

8.6 Análisis de la microbiota

8.6.1 Amplificación de la región V4 del gen 16s del ARNr de los insectos recolectados

Para la amplificación de la región V4 del gen 16s del ARNr y la preparación de las metalibrerías se siguió el protocolo de un solo paso descrito por Kozich et al., (2013). Este método permite realizar al mismo tiempo el indexado dual de las muestras y laligación de los adaptadores indispensables para la secuenciación. Los cebadores empleados (figura 2) amplifican la región variable V4 del gen 16S que codifica para el ARN ribosomal procarionta. Los oligonucleótidos específicos del gen 16S que codifica para el ARNr utilizados en este estudio fueron los descritos por Caporaso et al. (2011) y sintetizados por SIGMA-ALDRICH[®]. La reacción de PCR se llevó a cabo usando 20 µl de volumen final con aproximadamente 15 ng/µl de DNA templado, 20 µM de cada oligonucleótido, 0.125 µl de enzima MyTaq[™] DNA Polymerase (Bioline), 4 µl de buffer de reacción 5x MyTaq[™] (Bioline) y agua grado molecular para completar el volumen final. El protocolo de amplificación utilizado para la obtención de los productos de PCR constó de una desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, luego 30 ciclos de 95 °C por 20 s, 55 °C por 15 s y 72 °C por 2 m, seguidos de una extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Región V4 del gen 16S del ARNr			
.....CTTCCACTTAAATGAGACTT	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA.....	ATTAGAWACCCBDGTAGTCC	ATACAGGTGAGCACCTTGTA... +Strand
.....GAAGGTGAATTTACTCTGAA	CACGGTCGKCGGCCATT.....	TAATCTWTGGGVHCATCAGG	TATGTCCACTCGTGGAACAT... -Strand
Oligonucleótido de la secuencia sentido			
.....GAAGGTGAATTTACTCTGAA	CACGGTCGKCGGCCATT.....	TAATCTWTGGGVHCATCAGG	TATGTCCACTCGTGGAACAT... -Strand
<u><p5 adapter></u>	<u><i5></u>	<u><padF></u>	<u><linkF></u>
GTGCCAGCMGCCGCGGTAA->			
Oligonucleótido de la secuencia antisentido			
.....CTTCCACTTAAATGAGACTT	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA.....	ATTAGAWACCCBDGTAGTCC	ATACAGGTGAGCACCTTGTA... +Strand
		<u><-TAATCTWTGGGVHCATCAGG</u>	<u><linkR></u>
		<u><padR></u>	<u><i7></u>
		<u><p7 adapter></u>	
Amplión V4			
<u>AAATGATACGGCGACACCGAGATCTACAC</u>	<u>NNNNNNNN</u>	<u>TATGGTAATTGT</u>	<u>GTGCCAGCMGCCGCGGTAA.....</u>
<u>TTACTATGCCGCTGGTGGCTCTAGATGTG</u>	<u>NNNNNNNN</u>	<u>TACCATTAAC</u>	<u>CACGGTCGKCGGCCATT.....</u>
			<u>ATTAGAWACCCBDGTAGTCCGGCTGACTGACT</u>
			<u>NNNNNNNN</u>
			<u>ATGACGTATGCCGCTCTCTGCTTG</u>
			<u>TAGAGCATACGGCAGAGACGAAC</u>

Figura 2. Diseño de cebadores para la estrategia de secuenciación de un solo paso. Los cebadores están compuestos de oligonucleótidos específicos del gen 16S que codifica para el ARNr (texto negro en negrita), los conectores conformados por una secuencia de 2 nucleótidos no complementarios al gen 16S (azul), el *pad* que consta de 10 nucleótidos y cuya función es la de evitar la formación de estructuras secundarias no deseadas (verde), la región índice que permite la identificación de la muestra durante la secuenciación (rojo) y los adaptadores para Illumina están subrayados (Modificado de Kozich et al., 2013).

8.6.2 Preparación dirigida de la biblioteca y secuenciación del 16S rRNA

Por cada una de las muestras estudiadas el paso anterior se realizó por triplicado para optimizar la concentración y eficiencia de la reacción de secuenciación, posteriormente los productos de amplificación (~500 pb) fueron visualizados en geles de agarosa al 1% en un transiluminador Chemi Doc® (Bio Rad™) y cuantificados usando un espectrofotómetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific™). Enseguida, los triplicados de los productos fueron mezclados, purificados y normalizados usando el kit SequalPrep Normalization Plate® de Invitrogen según las indicaciones del fabricante. Después, los productos de dichas reacciones se cuantificaron a través de un ensayo de fluorometría en el equipo Qubit HS® (Invitrogen™).

Por último, la normalización del metapool se llevó a cabo igualando los *pools* generados con anterioridad a la concentración mas baja tomando en cuenta un tamaño de fragmento de 500 pb para realizar los cálculos correspondientes. A continuación, metapool fue desnaturalizado con NaOH a 200 mM y concentrado de 5-6 pM en un volumen final de 1 mL en una placa micro de secuenciación. Lo anterior se realizó también con la librería PhiX usada como control de calidad en la secuenciación. Después, se preparó la solución de carga con 1 mL del metapool generado y 5% de PhiX. Esta solución se incubó en un Termoblock® (TermostatPlus™) por 2 min a 96 °C y después se dejó en hielo por 5 min. Finalmente, se colocaron 650 µL de la solución carga en la placa de secuenciación en una celda estándar de 300 ciclos. La secuenciación se realizó desde los dos extremos del amplicón (*paired end*). (16S Metagenomic Sequencing Library, 2013). La preparación de las librerías y la secuenciación se realizó en el Laboratorio de Metagenómica del CICESE, utilizando la plataforma MiSeq de Illumina.

8.7 Identificación de los genes de resistencia

Para identificar la presencia o ausencia de los genes asociados a la virulencia se realizaron pruebas de PCR múltiplex punto final utilizando los oligonucleótidos enlistados en la tabla 1. Los productos de amplificación fueron visualizados por medio de un gel de agarosa al 2.5 % con condiciones de corrida de 90 V durante 15 minutos y

80 V por 120 minutos. Las bandas de interés fueron analizadas por medio de un transiluminador de luz UV.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 μ L, para ello se colocaron 10 μ L de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 0.5 μ L de cada primer (20 μ M), 3 μ L de ADN (5 ng/ μ L) y agua grado molecular hasta completar el volumen final. Las condiciones utilizadas para la realización de la PCR múltiplex se muestran en las tablas 2 y 3.

Tabla 1. Primers utilizados en este estudio.

Mezcla	Gen blanco	Secuencia	Tamaño de amplicón (bp)	Referencia
1	<i>mecA</i>	F: TCCAGATTACAACCTCACCAGG R: CCACTTCATATCTTGTAACG	162	Navidinia, 2015
	<i>Mex-R</i>	F: GAACTACCCCGTGAA TC R: CACTGGTCGAGGAGATGC	411	Arabestani, 2014
	<i>blaTEM</i>	F: ATCAGCAATAAACCCAGC R: CCCCGAAGAACGTTTTTC	516	Abrar, 2019
2	<i>blaSHV</i>	F: AGGATTGACTGCCTTTTTG R: ATTTGCTGATTCGCTCG	392	Abrar, 2019
	<i>Mex-A</i>	F: CTCGACCCGATCTACGTC R: GTCTTCACCTCGACACCC	503	Arabestani, 2014
	<i>blaOXA</i>	F: ATATCTCTACTGTTGCATCTCC R: AAACCCTTCAAACCATCC	619	Abrar, 2019
Simplex	<i>blaCTX-M</i>	F: GACGATGTCACTGGCTGAGC R: AGCCGCCGACGCTAATACA	500	Abrar, 2019

Tabla 2. Condiciones de PCR mezcla 1 y 2.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	5 minutos	1
94	30 segundos	
52	30 segundos	35
68	40 segundos	
72	7 minutos	1

Tabla 3. Condiciones de PCR simplex.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	5 minutos	1
94	30 segundos	
58	30 segundos	35
68	40 segundos	
72	7 minutos	1

8.8 Análisis de datos

Se evaluó la diversidad alfa de las especies de insectos recolectados por medio de los índices de Simpson, inverso de Simpson y Shannon-Weaver utilizando la librería Vegan ver. 2.5-7 en R ver. 4.1.1. De igual forma, se realizó una prueba de t para comparar la abundancia de insectos recolectados entre áreas comunes y restringidas. Para evaluar la diversidad bacteriana se utilizó el software QIIME-2. Además, se comparó la cantidad de secuencias detectadas pertenecientes a géneros o familias de bacterias patógenas entre especies de insectos a través de una prueba de Kruskal-Wallis (H) y una comparación múltiple de rango de medias. Este mismo procedimiento se realizó para comparar la abundancia de secuencias de bacterias patógenas y determinar que especies presentan mayor abundancia.

9. RESULTADOS

9.1 Insectos colectados

Al término del periodo de colecta se colocaron un total de 337 trampas; 239 para moscas, 45 para cucarachas y 53 para coleccionar hormigas, trampas en las cuales en 126 se encontró por lo menos 1 individuo perteneciente a las familias de insectos estudiadas.

De las 239 trampas colocadas para la captura de moscas 118 se situaron en áreas restringidas como quirófanos o unidades de cuidados intensivos y de éstas en el 42.4 % de los casos se encontraron moscas, el resto de las 121 trampas fueron instaladas en áreas comunes como comedores, consultorios, habitaciones de cuidados mínimos u oficinas obteniendo un 46.3 % de trampas positivas. La colecta de hormigas y cucarachas solo se llevó a cabo en áreas comunes del hospital siendo efectivas 17 trampas para hormigas y 3 para cucarachas.

La riqueza de los órdenes de insectos colectados durante el periodo de estudio se describe en la figura 3. Las especies de moscas colectadas con mayor frecuencia fueron *Musca domestica* (76.4 %), seguida de *Chrysomya rufifacies* (9.4%), moscas de la familia Psychodidae (4.3 %), *Tricharaea* sp. (3.4 %), individuos de la familia Hippoboscidae (2.8 %), moscas del género *Lucilia* sp. (2 %) y en menor proporción moscas del género *Fannia* sp. (1.7 %). Del grupo de las hormigas, el 95.9% fueron de la especie *Paratrechina longicornis* y el 4.1% de *Tetramorium* sp (figura 3). Por último, solo se capturaron tres cucarachas; una ninfa de *Blatella germanica* y dos adultos de *Periplaneta americana*, las cuales fueron capturadas en áreas comunes del hospital.

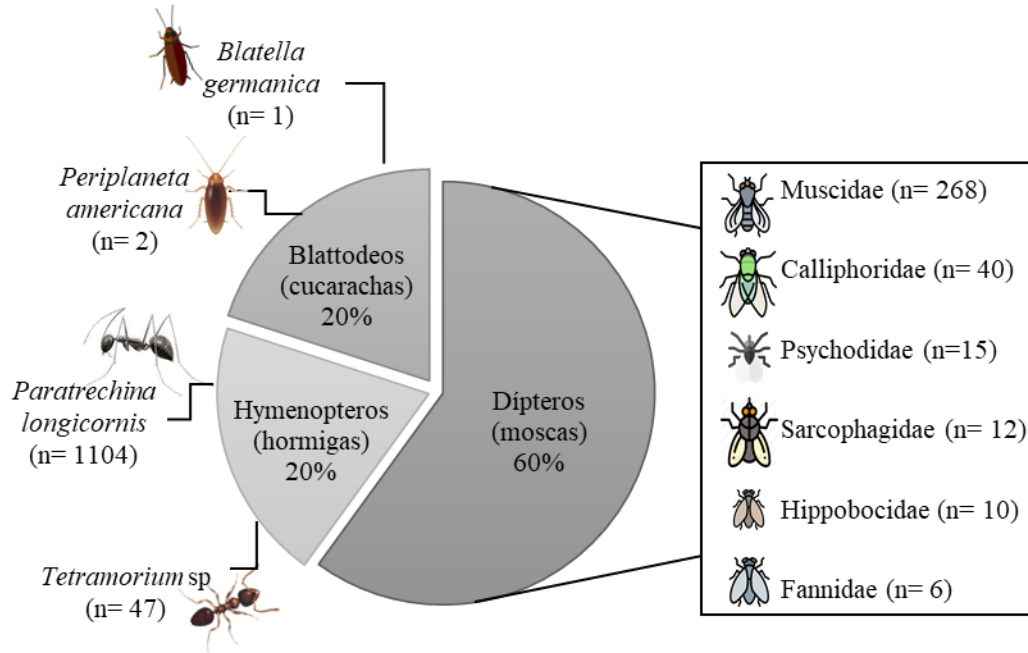


Figura 3. Riqueza de moscas, cucarachas y hormigas colectadas.

Dentro del hospital fueron colectadas un total de 11 especies de insectos tomando en cuenta tanto áreas comunes como restringidas. El análisis de diversidad alfa para la instalación hospitalaria a través del índice de Simpson (D) arrojó un valor de 0.42. La estandarización del índice de Simpson a los límites del número de especies, es decir, el inverso del índice de Simpson (1/D o N2 de Hill), arrojó un valor de 1.7. Por último, la diversidad alfa medida a través del índice de Shannon-Weaver (H) resultó en un valor de 0.9. La comparación de la abundancia total de individuos por especie entre áreas comunes y restringidas por medio de la prueba de t mostro que no existe diferencia entre la abundancia media entre ambas áreas hospitalarias ($p > 0.05$) (figura 4).

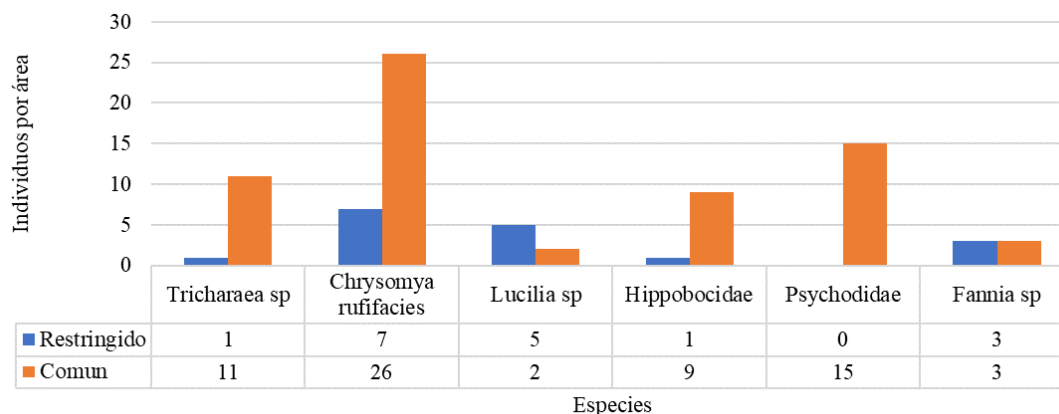


Figura 4. Especies de moscas de baja abundancia colectadas por área hospitalaria.

9.2 Identificación de parásitos de importancia médica

El análisis por microscopia de los 55 macerados reveló la presencia de huevos de *Ascaris* sp y ooquistes de *Cryptosporidium* sp en *C. ruffacies*, quistes de *Entamoeba coli* en *Fannia* sp, quistes de *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Blastocystis* sp, huevos de *Hymenolepis diminuta* y larvas y huevos de *Strongyloides* sp asociados a *M. domestica*. Por último, se identificaron quistes de *E. histolytica* en hormigas del género *Tetramorium* sp. La relación de los macerados de los insectos colectados y las especies de parásitos observados se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Asociación de macerados positivos a parásitos e insectos colectados.

Especie de insecto	<i>Ascaris</i> sp. (%)	<i>Cryptosporidium</i> sp. (%)	<i>Entamoeba coli</i> (%)	<i>Strongyloides</i> sp. (%)	<i>Endolimax nana</i> (%)	<i>Blastocystis</i> sp. (%)	<i>Hymenolepis diminuta</i> (%)	<i>Entamoeba histolytica</i> (%)
<i>Chrysomya ruffacies</i>	1/5 (20)	1/5 (20)						
<i>Fannia</i> sp.			1/1 (100)					
<i>Musca domestica</i>			1/36 (2.7)	2/36 (5.5)	1/36 (2.7)	1/36 (2.7)	1/36 (2.7)	
<i>Tetramorium</i> sp.								1/1 (100)

9.3 Identificación molecular de hongos

Del análisis de las 31 muestras de insectos que se utilizaron para el estudio de hongos se realizaron un total de 27 aislamientos fúngicos que corresponden a 11 especies distintas tal y como fue revelado por el análisis de secuenciación (figura 5). Las especies de hongos con mayor número de aislamientos corresponden a *Wickerhamomyces anomalus* y *Yarrowia lipolytica*, ambas especies con cinco registros. Estos hongos identificados fueron aislados de seis especies de insectos diferentes (figura 6). Las especies de insectos con mayor cantidad de hongos recuperados fue *M. domestica*, seguido de *Chrysomya rufifacies*.

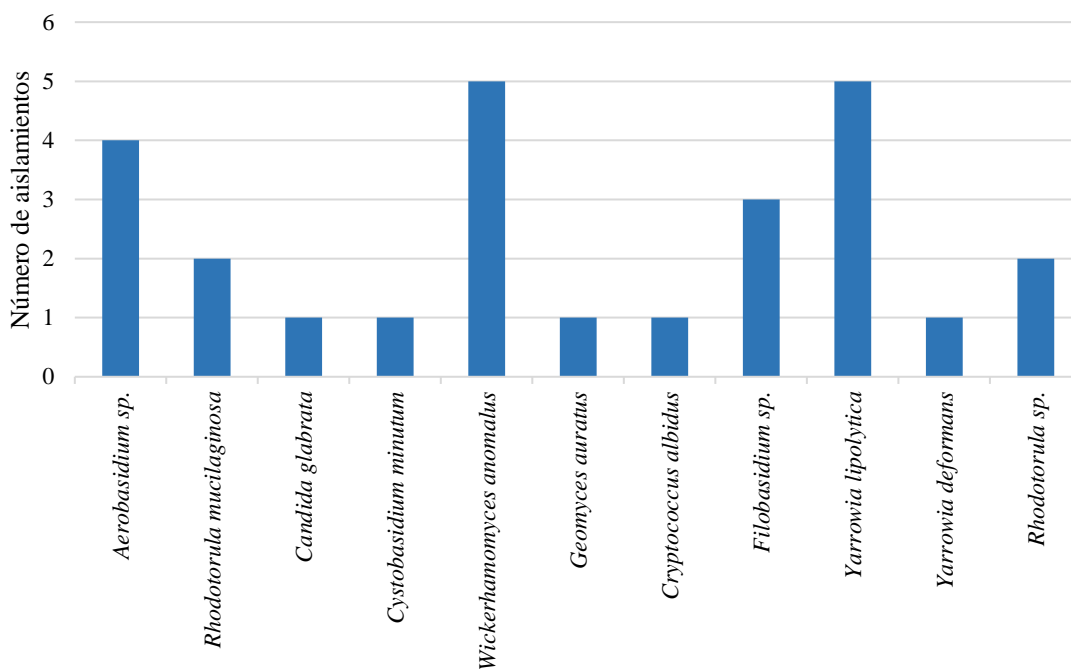


Figura 5. Número de aislamientos por especie de hongo identificado.

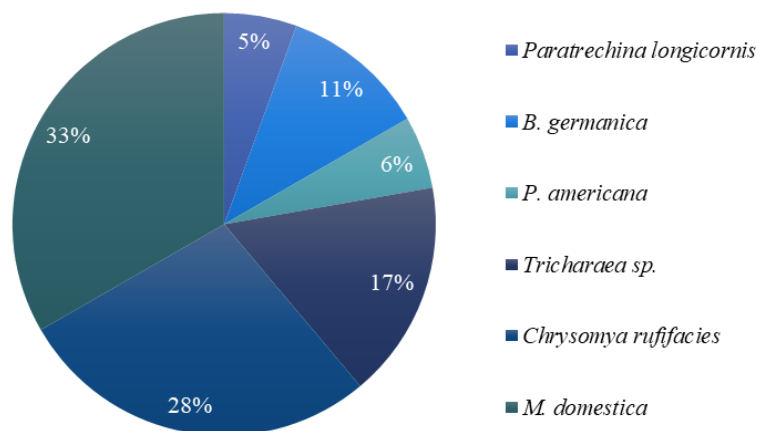


Figura 6. Abundancia de hongos por especie de insecto colectado.

9.4 Análisis de microbiota bacteriana

El análisis de los datos obtenido por medio de secuenciación de la region V4-16S del RNAr en la plataforma Illumina MiSeq se llevó a cabo en tres pools de *C. rufifacies*, tres pools de *Tricharaea sp*, cuatro pools de *Lucilia sp*, siete pools de *M. domestica*, y pools únicos de Hippoboscidae, *P. americana*, *P. longicornis*, y *Tetramorium sp*. En total se obtuvieron 1 141 246 secuencias las cuales fueron asignadas a un total de 864 989 ASV. La tabla 5 describe la cantidad de secuencias totales obtenidas para cada especie de insecto y la cantidad de ASV encontradas al comparar con la base de datos SILVA 138.1

Tabla 5. Cantidad de secuencias, ASV observados, y ASV más abundante en las muestras analizadas.

Especie	Secuencias totales	ASV observados	ASV más abundante				
			Filo	Clase	Orden	Familia	Género
<i>C. rufifacies</i>	135888	119101	P	G	E	Y	Serratia
Hippoboscidae	37589	33764	P	G	E	Mor	-
<i>Lucilia sp</i>	220915	196080	P	G	P	M	Psychrobacter
<i>M. domestica</i>	357942	265954	P	G	E	Mor	Proteus
<i>P. americana</i>	46024	22819	P	G	E	-	-
<i>P. longicornis</i>	65317	61804	P	A	R	A	Wolbachia
<i>Tetramorium sp</i>	153949	50670	F	B	Ex	Ex	Exiguobacterium
<i>Tricharaea sp.</i>	123622	114797	P	G	E	E	-

Filo: P: Proteobacteria, F: Firmicutes; Clase: A: Alphaproteobacteria, B: Bacilli, G: Gammaproteobacteria; Orden: E: Enterobacterales, Ex: Exiguobacterales, R: Rickettsiales, P: Pseudomonadales; Familia: A: Anaplasmataceae, E: Enterobacteriaceae, Ex: Exiguobacteraceae, M: Moraxellaceae, Mor: Morganellaceae, Y: Yersiniaceae.

A fin de determinar si se extrajo la mayor cantidad de información de las muestras analizadas, es decir, si se identificó el máximo de especies bacterianas en los pools de insectos se realizó una curva de rarefacción (figura 7). Todas las curvas muestran que se alcanzó un estado estable (asíntota) lo que revela que el número de ASV identificados en las muestras no es influenciado por la cantidad de secuencias analizadas por muestra.

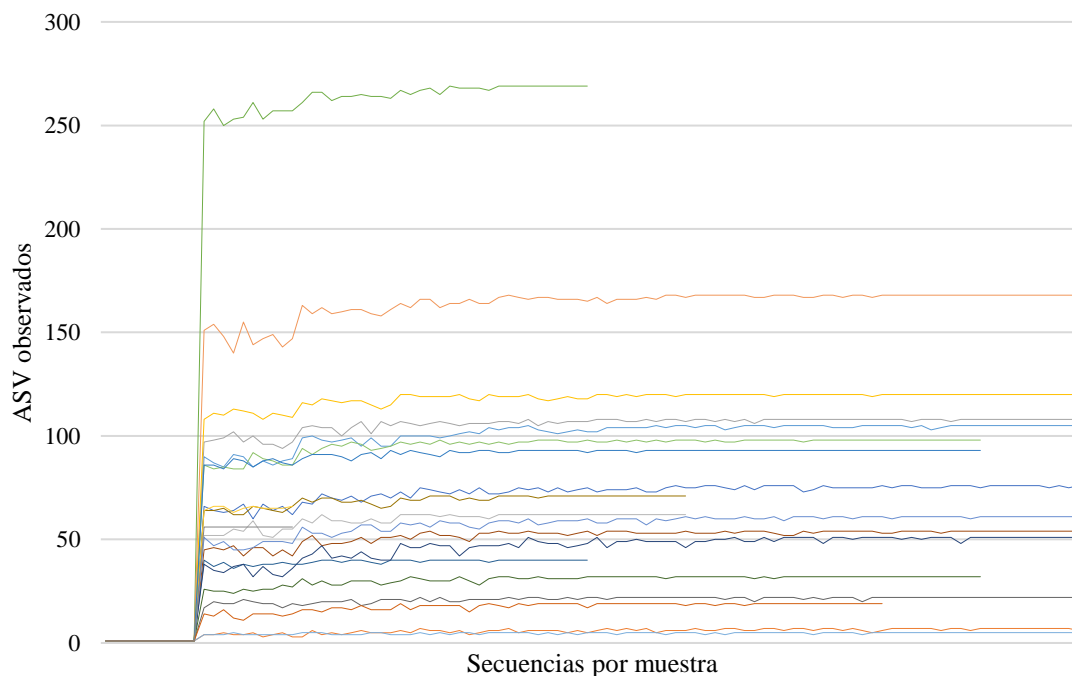


Figura 7. Curva de rarefacción del número de ASV detectados en las muestras analizadas.

Se registraron en total 32 filos bacterianos presentes en los insectos recolectados, además de 2 filos del dominio Archea. La figura 8 muestra la abundancia relativa de cada filo por muestra de insectos. Los resultados indican que el filo con mayor prevalencia en las muestras es el de las Proteobacterias (67.77 %), seguido de los filos Firmicutes (14.83 %), Bacteroidota (11.56 %), y Actinobacteriota (4.27 %). Los filos restantes obtuvieron menos de 1 % de representación en las muestras analizadas.

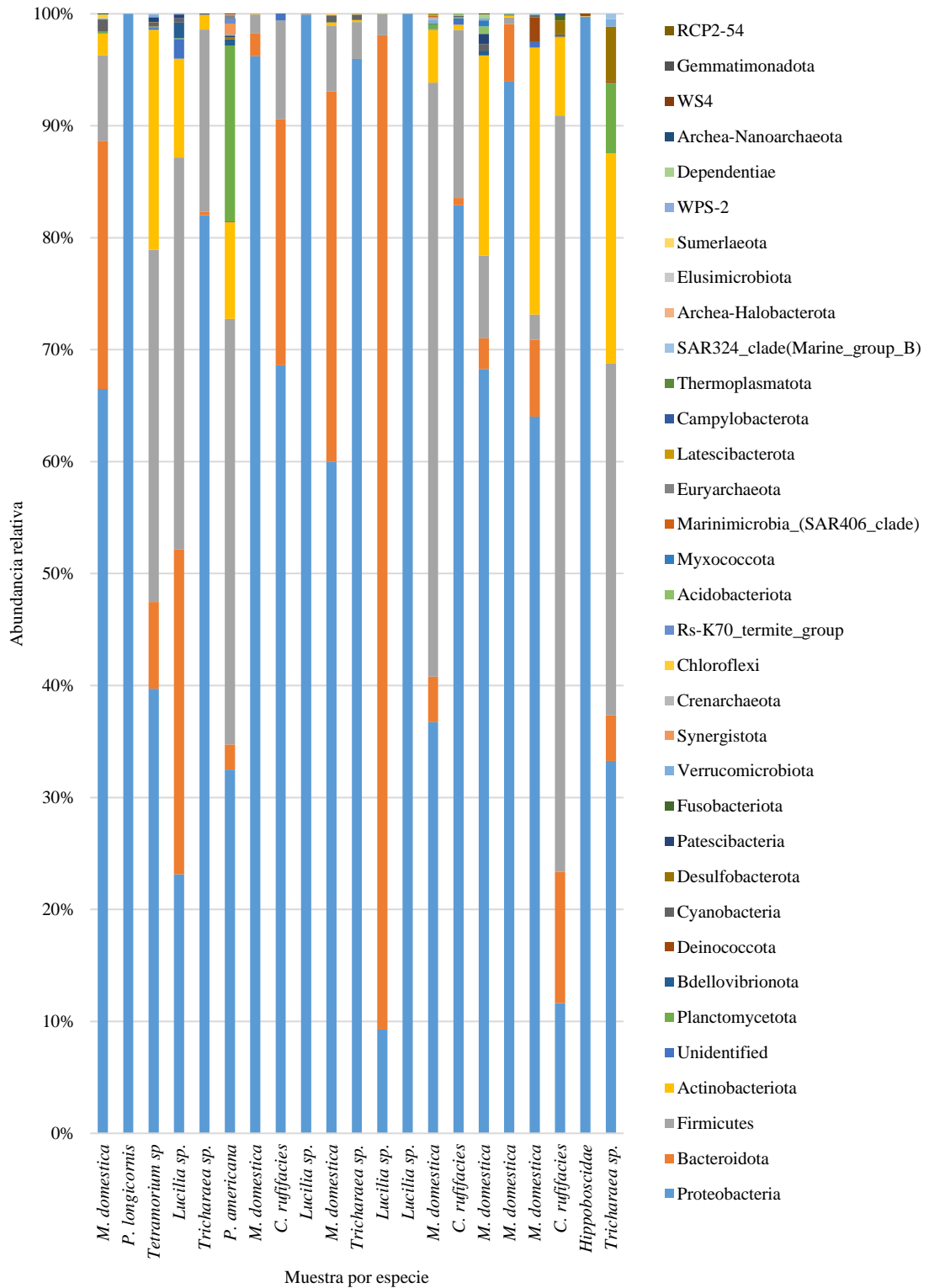


Figura 8. Abundancia de filas en las muestras analizadas.

El análisis de los géneros y especies de bacterias patógenas aislados de los insectos sinantrópicos demostró la presencia de organismos de relevancia para la salud pública (figura 9). Se determinó la presencia de los géneros *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Corynebacterium*, *Escherichia-Shigella*, *Enterococcus*, *Haemophilus*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus*, y *Streptomyces*. De igual forma, se identificó a nivel especie a: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, y *Pseudomonas fluorescens*. Otro grupo de particular interés asociado a los insectos recolectados fue la familia Enterobacteriaceae.

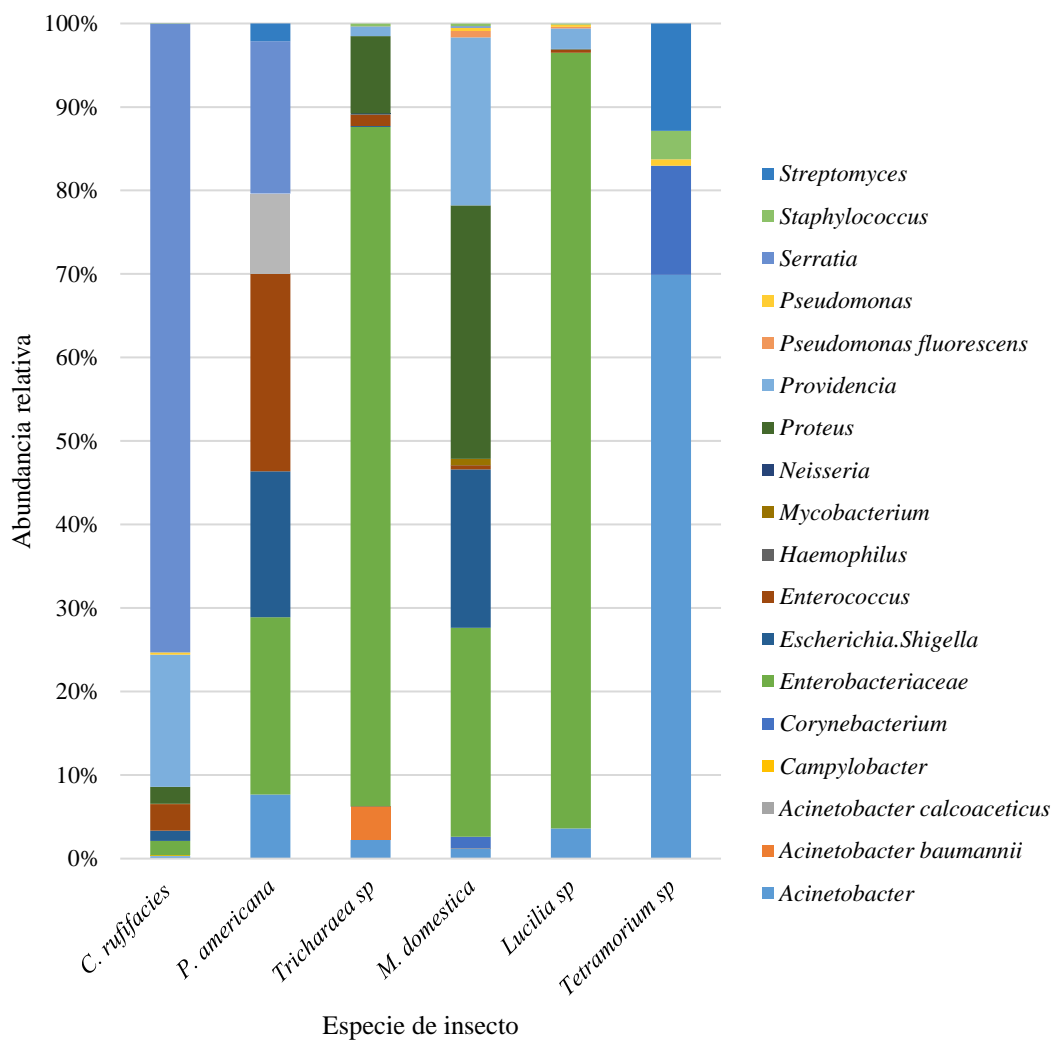


Figura 9. Abundancia de especies patógenas en las muestras analizadas.

Las bacterias con mayor abundancia en los insectos recolectados corresponden a la familia Enterobacteriaceae (42.36 %), y a los géneros *Proteus* (16.27 %), *Providencia* (12.60 %), *Serratia* (11.36 %), *Escherichia-Shigella* (9.55 %), *Acinetobacter* (3.12 %), *Enterococcus* (1.33 %). El resto de los géneros y especies tienen una abundancia menor al 1 %. Cabe resaltar que no se encontraron especies de bacterias patógenas en el pool de la mosca de la familia Hippoboscidae ni en *P. longicornis*.

La prueba de Kruskal-Wallis determinó que existe diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la cantidad de secuencias de cada especie de bacteria patógena ($H = 40.515$, $p < 0.05$). La comparación múltiple de medias de la abundancia de bacterias patógenas muestra que los géneros *Neisseria* y *Campylobacter* y la especie *Acinetobacter calcoaceticus* presentan menor abundancia a comparación de *Acinetobacter*, Enterobacteriaceae, *Enterococcus*, *Providencia* y *Proteus*. Por otro lado, *Pseudomonas* presenta menor abundancia que los mismos géneros que *Neisseria* con excepción de *Proteus*; *Acinetobacter baumannii* con excepción de *Proteus* y *Providencia* y *Mycobacter* presenta menor abundancia que *Acinetobacter* y Enterobacteriaceae (tabla 6). De igual forma, se encontró diferencia estadísticamente significativa en la abundancia de bacterias patógenas por especie de insecto estudiada ($H = 12.431$, $p < 0.05$). La comparación múltiple de medias de rango muestra que *M. domestica* presenta solo mayor cantidad de secuencias de especie de bacterias patógenas a comparación de *Tetramorium* sp, *P. americana*, y *Lucilia* sp (tabla 7) mientras que no existe diferencia estadística en la abundancia de secuencias entre las demás especies.

Tabla 6. Comparación múltiple de medias de abundancia por secuencias de bacterias patógenas.

Especie 1	Media	Especie 2	Media	Valor P
<i>Neisseria</i> sp	33.75	Enterobacteriaceae	91.42	<0.05
		<i>Acinetobacter</i>	93.17	<0.05
		<i>Enterococcus</i>	79.33	<0.05
		<i>Providencia</i>	75.83	<0.05
		<i>Proteus</i>	71.75	<0.05
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	34.25	<i>Acinetobacter</i>	93.17	<0.05
		Enterobacteriaceae	91.42	<0.05
		<i>Providencia</i>	75.83	<0.05
		<i>Proteus</i>	71.75	<0.05
		<i>Enterococcus</i>	79.33	<0.05
<i>Campylobacter</i> sp	34.25	<i>Acinetobacter</i>	93.17	<0.05
		Enterobacteriaceae	91.42	<0.05
		<i>Enterococcus</i>	79.33	<0.05
		<i>Proteus</i>	71.75	<0.05
		<i>Enterococcus</i>	79.33	<0.05
<i>Pseudomonas</i> sp	37.25	<i>Acinetobacter</i>	93.17	<0.05
		Enterobacteriaceae	91.42	<0.05
		<i>Enterococcus</i>	79.33	<0.05
		<i>Providencia</i>	75.83	<0.05
		<i>Enterococcus</i>	79.33	<0.05
<i>Acinetobacter baumannii</i>	40.75	<i>Acinetobacter</i>	93.17	<0.05
		Enterobacteriaceae	91.42	<0.05
<i>Mycobacterium</i> sp	45.17	<i>Acinetobacter</i>	93.17	<0.05
		Enterobacteriaceae	91.42	<0.05

Tabla 7. Comparación de abundancia de secuencias de especie bacterianas patógenas por especie de insecto.

Especie 1	Media	Especie 2	Media	Valor P
<i>Tetramorium</i> sp	43.53	<i>M. domestica</i>	75.89	0.001
<i>P. americana</i>	49.87	<i>M. domestica</i>	75.89	0.01
<i>Lucilia</i> sp	53.87	<i>M. domestica</i>	75.89	0.029

9.5 Identificación de los genes de resistencia

Previo a la identificación de los genes de resistencia a fármacos, *blaTEM*, *blaCTX-M*, *blaOXA*, *mecA*, *mex-R*, *blaSHV* y *mex-A*, a través de su amplificación por PCR, se analizó la presencia de DNA bacteriano por medio de la amplificación del gen

16s ARNr presente en procariontes. Se confirmó la presencia de dicho gen en las 21 muestras utilizadas anteriormente (figura 10).

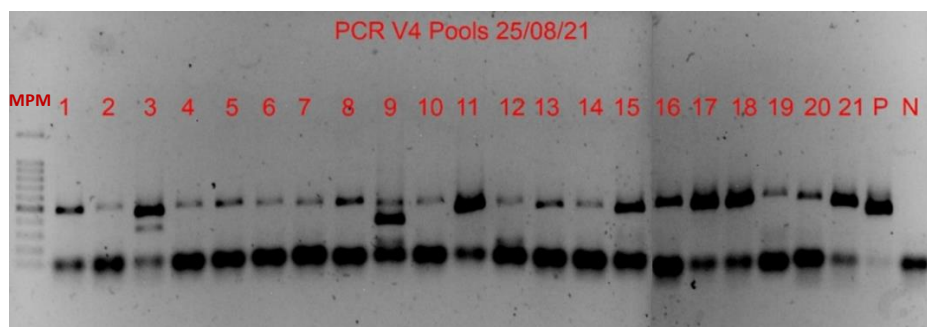


Figura 10. Análisis electroforético de los productos de amplificación del gen 16s (500 pb). Carriles: MPM, marcador de peso molecular 100pb, 1-21, muestras analizadas, P: control positivo, N: control negativo.

La figura 11 muestra un gel electroforético compuesto de agarosa al 2 % representativo donde se muestran los patrones de amplificación de los controles y una muestra positiva para *blaTEM* (carril 5).

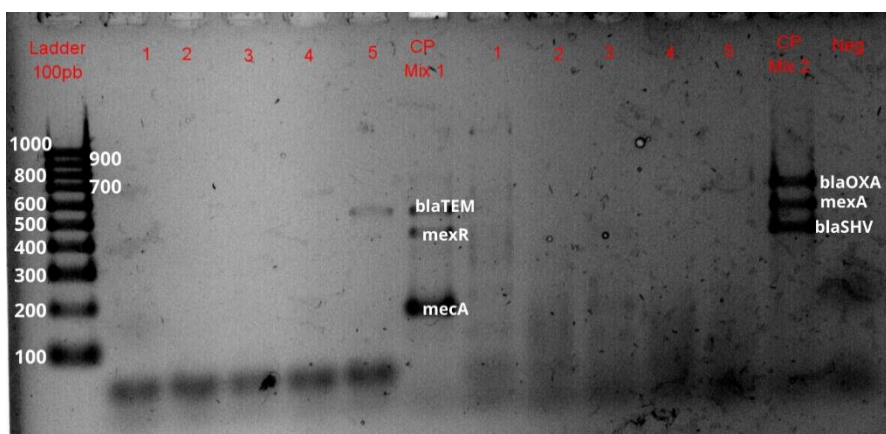


Figura 11. Análisis electroforético de los productos de amplificación multiplex para el mix 1(*blaTEM*, *mexR*, y *mecA*) y mix 2 (*blaOXA*, *mexA*, y *blaSHV*). Carriles: Ladder, marcador de peso molecular de 100 pb, 1-4, muestras negativas para mix 1, 5, muestra positiva para *blaTEM*, CPmix1, control positivo para mix1 (*blaTEM*: 516 pb, *mexR*: 411 pb, *mecA*: 162 pb), 1-5 muestras negativas para mix 2, CPmix2, control positivo para mix 2 (*blaOXA*: 619 pb, *mexA*: 503 pb, *blaSHV*: 392 pb).

La prevalencia de los genes de resistencia a fármacos presentes en la microbiota bacteriana de los insectos analizados fue de 47.6 % (10/21) para *blaCTX-M*, 19 % (4/21) para *blaOXA*, 9.5 % (2/21) para *MexA*, 4.8 % (1/21) para *blaTEM*, y 4.8 % (1/21) para *blaSHV*. La especie de insecto que presentó genes de resistencia en mayor cantidad y

frecuencia fue la mosca *Lucilia* sp (figura 12). Finalmente, en ninguna de las 21 muestras analizadas se encontró la presencia de los genes *mexR* y *mecA*. Igualmente, en la microbiota bacteriana asociada a las especies *C. rufifacies* y *Tetramorium* sp. no se detectó ninguno de los genes de resistencia a fármacos analizados en este estudio.

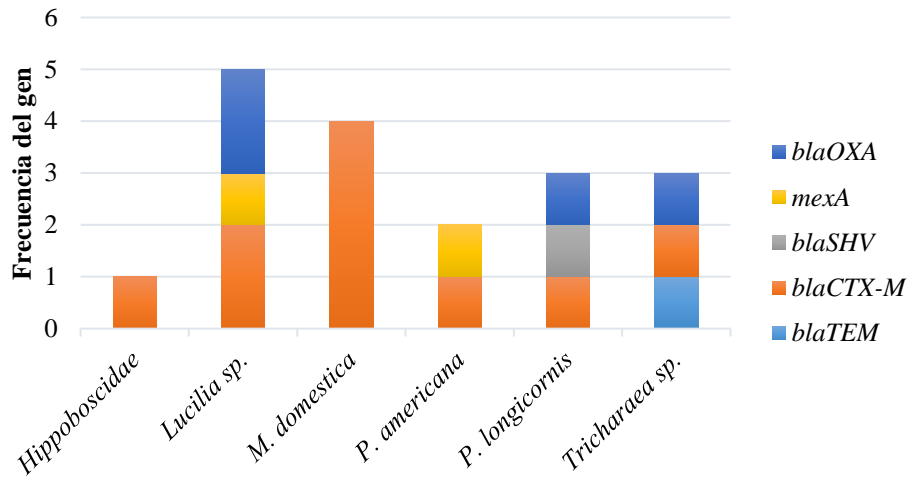


Figura 12. Frecuencia de los genes de resistencia a fármacos.

10.DISCUSIÓN

10.1 Insectos colectados

En el mundo, se ha reportado la presencia constante de insectos que habitan en las diferentes áreas hospitalarias, tanto en zonas que requieren condiciones estrictas de esterilidad, así como áreas de uso común. Boiocchi et al. (2019), a través de trampas pegajosas, colectó insectos voladores durante un año en 7 hospitales del Reino Unido, encontrando que el orden díptera representó el 73 % del total de los insectos recolectados. Kappel et al. (2013) llevó a cabo un estudio similar en un hospital público de Brasil cuyo objetivo fue coleccionar insectos voladores no hematófagos en diferentes áreas del hospital. Los resultados de este estudio en Brasil señalan que los diferentes ordenes de insectos voladores se distribuyen en todas las áreas de colecta, sin embargo, los dípteros se presentaron con mayor frecuencia (40 %) que el resto de los insectos voladores (Hymenoptera, Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera, Homoptera y Trichoptera). Estas cifras son similares a los resultados obtenidos en nuestro estudio, sin embargo, la familia de dípteros de mayor abundancia en el hospital fue Muscidae a diferencia de Boiocchi et al. (2019) que menciona a la familia Calliphoridae como la predominante. Asimismo, este es el primer trabajo en el que se reporta la presencia de dípteros de la familia Hippoboscidae como habitantes de un centro de atención sanitaria pues estos dípteros, mejor conocidos como “moscas piojo”, son parásitos obligatorios de aves y algunos mamíferos y por ello no es usual encontrarlos fuera de su hospedero (Graciolli & Carvalho, 2003).

Otros insectos estudiados mundialmente, por representar constantes problemas en hospitales, son las hormigas. En Brasil existen más investigaciones acerca de estos insectos y su presencia en el ambiente hospitalario, con estudios desde la década de los 90. Entre las principales especies reportadas a lo largo de estos 20 años se encuentran *Tupinoma melanocephalum* y *Paratrechina longicornis*, siendo esta última especie la que se encontró con mayor frecuencia en nuestro estudio (De Castro et al., 2015). Esta hormiga, conocida también como hormiga loca, es uno de los animales en su género que se encuentran más ampliamente distribuidos a nivel mundial y que además, tiene la capacidad de deteriorar diversos ambientes de importancia económica debido a su alto

potencial invasivo por la facultad para vivir en interiores (Wetterer & Hugel, 2008) lo que las convierte en un problema importante, porque se encuentran en grandes cantidades, su difícil control y sus habilidades de adaptación a diferentes ambientes. Además de *P. longicornis* también encontramos en menor abundancia hormigas del género *Tetramorium* sp que al igual que *P. longicornis* es considerada una especie introducida (De Castro et al., 2015). La baja prevalencia de *Tetramorium* sp. (4.1 %) coincide con otros reportes en Brasil e Irán donde resalta la captura de esta especie en áreas de uso común con acceso poco restringido (Do Nascimento et al., 2020; Shahi et al., 2017).

A diferencia de las moscas y las hormigas colectadas en esta investigación, la abundancia de las cucarachas capturadas fue de solo 3 individuos. Esta cifra puede significar una baja infestación de este orden de insectos en el hospital de estudio. Investigaciones como la realizada por Wang et al. (2019) muestran que factores como las condiciones de higiene, la tolerancia a los blátidos y la frecuencia con la que se busca prevenir la aparición de éstos, con el uso de medidas de manejo de vectores, influye en la frecuencia y abundancia con la que se presentan las infestaciones de cucarachas.

Dicho lo anterior, cabe resaltar que, en lo que respecta al control y prevención de la aparición de animales rastreros, el hospital cuenta con un proveedor externo que se dedica al control exclusivo de estos a través de la aplicación mensual de insecticidas y rodenticidas, además del monitoreo de las poblaciones y la rotación de los químicos utilizados para el control de estas plagas.

Por último, el análisis de la biodiversidad de las especies de insectos que fueron capturados en el hospital se calculó con el índice de Simpson (D), el cual representa la probabilidad menor al 50 % de seleccionar dos individuos aleatoriamente y que estos pertenezcan a especies diferentes. Los valores aproximados de este índice abarcan desde 0, indicando baja diversidad de especies, hasta un valor máximo cercano a 1 ($1/S$, donde S es el número de especies registradas) (Krebs, 1999). Estableciendo una escala arbitraria donde 0 es baja diversidad y 0.9 es una diversidad alta ($1-1/11$), puede estimarse que existe una diversidad moderada a baja dado el valor de 0.4 obtenido en el ambiente hospitalario. Por otro lado, el índice recíproco de Simpson ($1/D$) es resultado

de la estandarización del índice D en unidades de número de especies. Su intervalo abarca desde 1 hasta S, el número total de especies en la muestra analizada. Este índice representa el número de especies igualmente comunes necesarias para observar la heterogeneidad presente en la muestra (Krebs, 1999). En este trabajo el valor de esta índice abarca desde 1 a 11, el valor calculado para el hospital fue de 1.7 lo que muestra una baja diversidad de especies. Por último, el índice de Shannon-Weaver (H) mide la cantidad de incertidumbre que existe en la comunidad. En cuanto mayor sea este índice la cantidad de incertidumbre es mayor y con ello la cantidad-abundancia de especies. El intervalo de esta función abarca desde el logaritmo natural de 1 (igual a 0) hasta el logaritmo de S (2.39) (Krebs, 1999). El resultado de este índice para la comunidad bajo estudio fue de 0.9 lo que indica una diversidad moderada a baja. Es importante señalar que, como detallo Pielou (1966), este índice solo debe utilizarse en muestras obtenidas totalmente al azar en una comunidad grande en donde se conoce el número total de especies. Por lo tanto, la interpretación de este índice debe de ser cuidadosa tomando en cuenta estos supuestos. No obstante, la interpretación de estos tres índices arroja conclusiones similares mostrando que existe una diversidad moderada a baja, con mayor tendencia a esto último.

10.2 Identificación de parásitos de importancia médica

También se ha encontrado que los insectos que habitan en los hospitales pueden propagar parásitos. Algunos autores mencionan que estos animales pueden estar colonizados por protozoarios como *Entamoeba histolytica*, *E. coli* y *Giardia lamblia* o nemátodos y cestodos como *Fasciola hepática* y especies del género *Taenia* o *Ascaris*, algunos de ellos aislados en dos especies de moscas en nuestro estudio (Hamoo & Alnuri, 2019).

Además, se observaron quistes de *E. histolytica* en hormigas del género *Tetramorium* sp. hallazgo poco reportado con anterioridad. Aunado a esto, otros reportes muestran también una alta prevalencia de parásitos en cucarachas (El-Sherbini, 2011), sin embargo, en esta investigación los análisis realizados a los 3 individuos colectados fueron negativos. La baja prevalencia de parásitos en insectos que hemos reportado pudiera deberse a las condiciones de higiene que existe en sitios como los hospitales en

los cuales el uso constante de químicos para la limpieza afecta en gran medida al desarrollo y supervivencia de protozoarios o gusanos pues su resistencia a la degradación por agentes químicos es mucho menor que la de otros microorganismos (Atiokeng Tatang et al., 2017; Hamoo & Alnuri, 2019).

10.3 Identificación molecular de hongos

Otros microbios reportados constantemente en insectos sinantrópicos son los hongos. Kassiri et al. (2015) encontraron que de 190 individuos de mosca doméstica colectados en 3 hospitales de diferentes ciudades de Irán las levaduras de mayor prevalencia fueron del género *Candida* sp., y *Rhodotorula* sp, similar a estudios realizados en Brasil en hormigas del género *Tapinoma* sp. y *Pheidole* sp. (Pantoja et al., 2009). Estas observaciones contrastan con nuestros resultados pues la mayor prevalencia de hongos se presentó en moscas. Sin embargo, cabe resaltar que el aislamiento de la levadura *C. glabrata* derivó del macerado de *B. germanica*, insecto ampliamente reconocido como vector de este género de levaduras con alto potencial infeccioso (Memona et al., 2018).

Por otro lado, el hongo *W. anomalus* (estadio anamorfo *Candida pelliculosa*), una de las especies aisladas con mas frecuencia en los insectos analizados, ha sido relacionada con infecciones renales, queratitis fúngica y fungemia en recién nacidos (Kurtzman, 2011). Asimismo, recientemente, se le ha asociado como agente causal de brotes importantes de infecciones fúngicas en áreas de cuidados intensivos neonatales, donde la higiene de manos ha sido deficiente; por ello esta levadura se ha clasificado como un hongo patógeno emergente por diversos autores (Dutra et al., 2020; Pradeep et al., 2020; L. Zhang et al., 2021). Sin embargo, *W. anomalus* también se ha aislado del intestino de diferentes insectos, como moscas de la arena o algunas especies de mosquitos, por lo que se ha sugerido su papel como simbionte de dípteros (Cappelli et al., 2021; Malassigné et al., 2021). Al igual que *W. anomalus*, los hongos patógenos oportunistas *Aureobasidium* spp y *Rhodotorula* spp han sido asociados como simbiontes de algunos mosquitos (Malassigné et al., 2021; Reyes Martínez et al., 2013) y además se han encontrado en moscas domésticas y hormigas capturadas en hospitales de países como Irán y Brasil (Kassiri et al., 2015; Pantoja et al., 2009). También se ha encontrado

en el intestino de cucarachas y moscas hongos del género *Filobasidium* spp (*Cryptococcus* spp) (Gurung et al., 2019; Nguyen et al., 2007; Stefanini, 2018), aislados en este estudio de las moscas *Tricharaea* sp., *C. rufifacies* y *M. domestica*, dichos hongos se han reportado en México como patógenos oportunistas en pacientes VIH positivos y en el mundo ocasionando infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Castañón-Olivares et al., 2000; Morales-López & Garcia-Effron, 2021).

10.4 Análisis de microbiota bacteriana

El análisis de secuenciación Ilumina demostró la presencia de diversas familias, géneros y especies de bacterias asociadas a insectos sinantrópicos; algunos de estos organismos de relevancia en salud pública debido a su virulencia. A nivel filo, nuestros resultados indican que existe una mayor prevalencia del grupo de las Proteobacterias en bacterias asociadas a insectos (67.77 %). En segundo término, especies como *Tetramorium* sp, presentan mayor abundancia de otro filo de bacterias como Firmicutes (14.83 %) y de manera global bacteroidetes corresponde al tercer filo mejor representado en nuestras muestras. Un patrón similar al reportado en esta investigación es descrito por (Junqueira et al., 2017), en donde la microbiota bacteriana asociada a *Chrysomya megacephala* y *M. domestica* recae dentro del filo Proteobacteria, seguido de Bacteroidetes y, por último, a Firmicutes. En un nivel taxonómico inferior, los resultados de Junqueira et al. (2017) concuerdan con lo reportado en esta investigación demostrando que la alta frecuencia del filo Proteobacteria es dada por la abundancia de géneros como *Enterobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Providencia*, *Serratia*, y *Psychrobacter*. Cabe resaltar que, a la fecha de elaboración de esta tesis, la identificación de bacterias patógenas asociadas a insectos es comúnmente llevada a cabo a través de microbiología clásica, y solo en Junqueira et al. (2017) y en esta investigación fue llevada a cabo usando una aproximación metagenómica.

Uno de los objetivos de esta investigación es la determinación de la microbiota de importancia clínica asociada a insectos sinantrópicos. Las bacterias con potencial patogénico asociadas a los insectos colectados incluyen a los géneros *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Corynebacterium*, *Escherichia-Shigella*, *Enterococcus*, *Haemophilus*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Serratia*,

Staphylococcus, y *Streptomyces*, además de las especies *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, y *Pseudomonas fluorescens*. Existen diversos reportes que señalan la presencia de patógenos asociados a hormigas, insectos colectados dentro de las instalaciones hospitalarias. Simothy et al. (2018), utilizando métodos de microbiología clásica demostraron que en hormigas *Technomyrmex difficilis* y *Solenopsis geminata* existe una mayor abundancia de coliformes (familia Enterobacteriaceae), géneros y especies como *Bacillus* sp, *Escherichia coli*, probable *Salmonella* y *Listeria monocitogenes*. Dentro de nuestros resultados la hormiga *Tetramorium* sp contiene principalmente a los géneros *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, y *Pseudomonas*. Nuestros resultados contrastan con lo reportado por Simothy et al. y esto puede estar dado a que los sitios de colecta son diferentes, mientras en esta investigación se colectó dentro de un hospital el estudio comparativo fue llevado a cabo en cocinas de viviendas. No obstante, estudios en *Paratrechina longicornis* y *Tetramorium bicarinatum* colectados en hospitales revelan similitudes a nuestros resultados destacando la presencia de *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus* (Do Nascimento et al., 2020; Machado Oliveira et al., 2017; Máximo et al., 2014).

En el caso de la cucaracha *P. americana* la familia Enterobacteriaceae y el género *Enterococcus* presentaron mayor abundancia. Sin embargo, también se detectó a los géneros *Acinetobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Streptomyces*. Estudios similares muestran que *P. americana* se asocia directamente a patógenos de relevancia epidemiológica como los encontrados en esta investigación además de otros no identificados tales como *Klebsiella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Pasteurella* (Bouamama et al., 2010). Zarchi & Vatani, (2009) evaluaron la abundancia de bacterias en cucarachas *P americana*, *Blattella germánica*, y *Blatta orientalis* demostrando que no existe diferencia entre la abundancia de bacterias por especie de cucaracha y que las especies mas comunes a blatodeos corresponden a *E. coli*, *Streptococcus*, *Bacillus* spp, *Klebsiella pneumoniae*, y *Proteus vulgaris*. Si bien a nivel especie, nuestros resultados no presentan las mismas especies bacterianas, tanto *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus vulgaris* pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, familia de mayor abundancia en la muestra analizada. Los géneros *Acinetobacter* y *Serratia* han sido previamente aislados de cucarachas en conjunto con otros patógenos

como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *E. coli*, *Klebsiella*, y *Staphylococcus* (Oliva et al., 2010). *Pseudomonas* y *Serratia* han sido detectados como especies abundantes en cucarachas (Menasria et al., 2014), y si bien, en esta investigación no fueron las especies más abundantes, ambas fueron encontradas brindando evidencia de su asociación.

En el caso de los insectos voladores del orden diptera, la mayor parte de las investigaciones están sesgadas a *M. domestica*. La revisión sistemática elaborada por Khamesipour et al. (2018) muestra que existe una diversidad bacteriana importante asociada a la mosca doméstica. Se ha identificado a las bacterias de los géneros *Helicobacter*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Aeromonas*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Chronobacter*, *Listeria*, *Streptococcus*, *Alternaria*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Edwardsiella*, *Providencia*, *Vibrio*, *Morganella*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Yersinia*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*. En esta investigación se reportan géneros presentes en estudios previos tales como: organismos de la familia Enterobacteriaceae, *Escherichia-Shigella*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Proteus*, *Providencia*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas*. Aunque en la revisión no se reporta la presencia de *Mycobacterium* en *M. domestica*, Pai et al. (2003), logro el aislamiento de 6 especies de esta bacteria en *P. americana*. Al igual que en *P. americana*, *M. domestica* presenta alta abundancia de bacterias de la familia Enterobacteriaceae, pauta descrita por Boiocchi et al. (2019) además de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Enterobacter* sp. No obstante, otras investigaciones señalan a *Bacillus* spp como el género de bacterias predominante en *M. domestica* colectada en hospitales (Nazari et al., 2017), o *Proteus* y *Staphylococcus* en áreas residenciales (Bouamama et al., 2010).

Estudios llevados a cabo en *Chrysomya megacephala* y *M. domestica* colectados en casas resultaron en la presencia de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Bacillus*, y *Pseudomonas*, en donde *C. megacephala* presento una mayor abundancia que *M. domestica* (Chaiwong et al., 2014). A diferencia de estos resultados, *M. domestica* solo presentó mayor abundancia de patógenos en comparación con *P. americana* y *Lucilia* sp (Calliphoridae) pero no así con *C. rufifacies* o *Trichararea*

sp (Sarcophagidae). *C. rufifacies* presento los géneros *Serratia*, *Providencia*, *Enterococcus*, *Escherichia-Shigella*, y *Proteus*. Junqueira et al. (2017) Muestra que al igual que *M. domestica*, *C. megacephala* es portadora de *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella*, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, y *Providencia*. Si bien, nuestros resultados indican que existe una ligera variación en cuanto a géneros encontrados en *C. rufifacies* y *M. domestica*, no existe una diferencia significativa entre estas dos especies en cuanto a la abundancia de bacterias.

10.5 Identificación de los genes de resistencia

Por último, otro factor importante en las comunidades microbianas de los insectos sinantrópicos es su capacidad para sobrevivir a la exposición a uno o más fármacos a los cuales eran susceptibles. Schaumburg et al. (2016) encontró que las moscas domésticas y califóridas colectadas en áreas urbanas y rurales de Alemania portaban bacterias con genes de resistencia a fármacos beta-lactámicos. Este estudio incluyó la comparación de la microbiota bacteriana de personas que habitaban cerca del sitio de colecta de las moscas y al contrastarlos observaron que ambos compartían cepas de bacterias entéricas resistentes a fármacos; el gen *blaCTX-M* fue el más prevalente en las muestras analizadas (77.3 %), prevalencia similar a la observada en nuestros hallazgos. Otro estudio realizado en Taiwán observó que los patrones de resistencia a fármacos obtenidos de cepas de *E. coli* aisladas de *M. domestica* y *Lucilia sericata* eran significativamente similares a los encontrados en las bacterias aisladas de heces de cerdos ubicados en el mismo sitio que las moscas. Además, observó que también compartían patrones similares de genes de resistencia a tetraciclina, concluyendo que las moscas pueden participar como vectores mecánicos de bacterias multidrogosresistentes así como su capacidad para la diseminación de plásmidos con genes de resistencia a fármacos (Usui et al., 2015). Posteriormente, otro trabajo realizado por el mismo grupo de investigadores comprobó que *M. domestica* tiene la capacidad de actuar no solo como vector mecánico de bacterias resistentes a antibióticos, sino que también puede participar como vector biológico promoviendo la aparición de bacterias resistentes a través de la transferencia horizontal (Fukuda et al., 2016). Por ello, a pesar de que en *C.*

rufifacies y *Tetramorium* sp no se haya detectado genes de resistencia a antimicrobianos, o en las moscas Hippoboscidae y *Paratrechina longicornis* no se hayan identificado bacterias patógenas, cabe la posibilidad de que al compartir el mismo nicho ocurra el intercambio de bacterias portadoras de mecanismos de resistencia fármacos.

11.CONCLUSIONES

Existen especies de moscas, cucarachas y hormigas distribuidas en el hospital que son de importancia para la salud pública.

Se identificaron patógenos de importancia sanitaria asociados a los insectos sinantrópicos que habitan en el hospital en estudio.

Se requiere el refuerzo de las medidas de contención de insectos que habitan en dicho hospital para evitar la propagación potencial de infecciones en pacientes susceptibles.

Existen bacterias de relevancia epidemiológica, incluso aquellas vigiladas por la OMS debido a la resistencia farmacológica.

Por último, dentro de las comunidades bacterianas existen genes de resistencia a fármacos que, en conjunto con la relación insecto-microbiota patógena, incrementa el riesgo a la salud pública.

12.PERSPECTIVAS

Derivado de este proyecto de tesis las perspectivas que se contemplan para estudios posteriores deben incluir:

- Monitoreo y control de la entomofauna nociva que representa un riesgo directo o indirecto en diversas instalaciones hospitalarias.
- Capacitación y concientización de todo el personal hospitalario para la detección y manejo de insectos vectores.
- Elaborar planes de control de entomofauna por medio de la Secretaría de Salud.
- Demostración experimental de la transmisión de los patógenos encontrados por los insectos a huéspedes dentro del hospital y sus alrededores.
- Realizar actividades de vigilancia epidemiológica activa para el monitoreo de resistencia a fármacos relacionada a la microbiota asociada a insectos.
- Realizar estudios retrospectivos sobre la ocurrencia de brotes infecciosos y su relación con los patógenos asociados a los insectos sinantrópicos.

13.BIBLIOGRAFÍA

- Abdolmaleki, Z., Mashak, Z., & Safarpour Dehkordi, F. (2019). Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance in the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospital cockroaches. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0505-7>
- Allen, H. K., Cloud-Hansen, K. A., Wolinski, J. M., Guan, C., Greene, S., Lu, S., Boeyink, M., Broderick, N. A., Raffa, K. F., & Handelsman, J. (2009). Resident microbiota of the gypsy moth midgut harbors antibiotic resistance determinants. *DNA and Cell Biology*, 28(3), 109–117. <https://doi.org/10.1089/dna.2008.0812>
- Amabile-Cuevas, C. (2010). Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *The Journal of Infection in Developing Countries*.
- Amat, E., Vélez, M. C., & Wolff, M. (2008). Clave ilustrada para la identificación de los géneros y las especies de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de Colombia. *Caldasia*, 30(1), 231–244.
- Amendt, J., Krettek, R., & Zehner, R. (2004). Forensic entomology. *Naturwissenschaften*, 91(2), 51–65. <https://doi.org/10.1007/s00114-003-0493-5>
- Anbazhagan, D., Mui, W. S., Mansor, M., Yan, G. O. S., Yusof, M. Y., & Sekaran, S. D. (2011). Development of conventional and real-time multiplex PCR assays for the detection of nosocomial pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 448–458. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000200006>
- Atiokeng Tatang, R. J., Tsila, H. G., & Wabo Poné, J. (2017). Medically Important Parasites Carried by Cockroaches in Melong Subdivision, Littoral, Cameroon. *Journal of Parasitology Research*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7967325>
- Aurjun, Nath, D., Abdullah, Faruq, A., Mohammad, Hassan, M., Muhammad, Hossain, B., Hassan, M. M., Islam, A., Islam, K., Islam, S., Chakma, S., Hossain, M. B., & Al-Faruq, A. (2016). Isolation, identification and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* in Cockroaches (*Periplaneta americana*) A periodical of the Network for the Veterinarians of Bangladesh (BDvetNET) <http://bdvets.org/javar>. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 3(3), 221–228. <https://doi.org/10.5455/javar.2016.c153>
- Beatson, S. H. (1972). Pharaoh'S Ants As Pathogen Vectors in Hospitals. *The Lancet*, 299(7747), 425–427. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(72\)90869-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(72)90869-0)
- Beatson, S. H. (1973). Pharaoh'S Ants Enter Giving-Sets. *The Lancet*, 301(7803), 606. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(73\)90751-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(73)90751-4)

- Blazar, J., Allard, M., & Lienau, E. K. (2011). Insects as vectors of foodborne pathogenic bacteria. *Terrestrial Arthropod Reviews*, 4(1), 5–16. <https://doi.org/10.1163/187498311x543989>
- Bogdanova, E. (2008). *Medically Important Synanthropic Arthropods of Russia and Neighboring Countries*. 355–360.
- Boiocchi, F., Davies, M. P., & Hilton, A. C. (2019). An Examination of Flying Insects in Seven Hospitals in the United Kingdom and Carriage of Bacteria by True Flies (Diptera: Calliphoridae, Dolichopodidae, Fanniidae, Muscidae, Phoridae, Psychodidae, Sphaeroceridae). *Journal of Medical Entomology*, 56(6), 1684–1697. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz086>
- Bouamama, L., Sorlozano, A., Laglaoui, A., Lebbadi, M., Aarab, A., & Gutierrez, J. (2010). Antibiotic resistance patterns of bacterial strains isolated from *Periplaneta americana* and *Musca domestica* in Tangier, Morocco. *Journal of Infection in Developing Countries*, 4(4), 194–201. <https://doi.org/10.3855/jidc.336>
- Buenaventura, E. R., Camacho, G. C., García, A. G., & Wolff, M. E. (2009). Sarcophagidae (Diptera) of forensic importance in Colombia: Taxonomic keys, notes on biology, and distribution. *Revista Colombiana de Entomología*, 35(2), 189–196.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Cappelli, A., Favia, G., & Ricci, I. (2021). *Wickerhamomyces anomalus* in Mosquitoes: A Promising Yeast-Based Tool for the “Symbiotic Control” of Mosquito-Borne Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 11(January), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.621605>
- Castañeda Martínez, F. Cain., & Valdespino Padilla, M. G. (2015). Prevalencia de infecciones nosocomiales en un hospital de segundo nivel de atención en México. Prevalence of nosocomial infections in a secondary care hospital in Mexico. *Aportaciones Originales Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 53(6), 686–690.
- Castañón-Olivares, L. R., Arreguín-Espinosa, R., Ruiz-Palacios Y Santos, G., & López-Martínez, R. (2000). Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in México and their comparison with some Latin American Countries. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(1), 35–40.
- César Estrada-Álvarez, J. (2013). Primera Lista De Las Cucarachas De México (Dictyoptera: Blattodea). *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 53, 267–284.

- Chaiwong, T., Srivoramas, T., Sueabsamran, P., Sukontason, K., Sanford, M. R., & Sukontason, K. L. (2014). The blow fly, *Chrysomya megacephala*, and the house fly, *Musca domestica*, as mechanical vectors of pathogenic bacteria in Northeast Thailand. *Tropical Biomedicine*, 31(2), 336–346.
- Chao, K. H., Barton, K., Palmer, S., & Lanfear, R. (2021). sangeranalyseR: Simple and Interactive Processing of Sanger Sequencing Data in R. *Genome Biology and Evolution*, 13(3). <https://doi.org/10.1093/gbe/evab028>
- Chen, Z. Z., Wu, X. M., Shen, Y. M., Li, C. G., Xu, K. G., Zhu, F., Zhang, C. G., & Li, Y. (2017). Study of *Periplaneta Americana* Microbial Community Structure and Diversity by 16S rRNA High-Throughput Sequencing. *Sustainability in Environment*, 2(4), 350. <https://doi.org/10.22158/se.v2n4p350>
- Davies, M. P. (2014). *Isolation and characterisation of bacteria associated with flying insects in hospitals, with particular emphasis on Clostridium difficile*. Aston University.
- De Carvalho, C. J. B., & De Mello-Patiu, C. A. (2008). Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia*, 52(3), 390–406. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262008000300012>
- De Castro, M. M., Prezoto, H. H. S., Fernandes, E. F., Bueno, O. C., & Prezoto, F. (2015). The ant fauna of hospitals: Advancements in public health and research priorities in Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 59(1), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2015.02.011>
- Dillon, R. J., & Dillon, V. M. (2004). The Gut Bacteria of Insects: Nonpathogenic Interactions. *Annual Review of Entomology*, 49(1), 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123416>
- Do Nascimento, L. E., Amaral, R. R., Dos Anjos Ferreira, R. M., Trindade, D. V. S., Do Nascimento, R. E., Da Costa, T. S., & Souto, R. N. P. (2020). Ants (hymenoptera: formicidae) as potential mechanical vectors of pathogenic bacteria in a public hospital in the eastern Amazon, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 57(5), 1619–1626. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa062>
- Dodge, H. R. (1966). Diptera: Pictorial key to principal families of public health importance. In *US Department of Health, Education, and Welfare*.
- Doud, C. W., & Zurek, L. (2012). *Enterococcus faecalis* OG1RF:pMV158 survives and proliferates in the house fly digestive tract. *Journal of Medical Entomology*, 49(1), 150–155. <https://doi.org/10.1603/ME11167>
- Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal Insects: Diversity and Function of Resident Microorganisms. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 17–34. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020822>

- Dutra, V. R., Silva, L. F., Oliveira, A. N. M., Beirigo, E. F., Arthur, V. M., da Silva, R. B., Ferreira, T. B., Andrade-Silva, L., Silva, M. V., Fonseca, F. M., Silva-Vergara, M. L., & Ferreira-Paim, K. (2020). Fatal case of fungemia by *wickerhamomyces anomalus* in a pediatric patient diagnosed in a teaching hospital from Brazil. *Journal of Fungi*, 6(3), 1–7. <https://doi.org/10.3390/jof6030147>
- El-Sherbini, G. T. (2011). The role of insects in mechanical transmission of human parasites. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 13(9), 573–574. <https://doi.org/10.5812/kowsar.20741804.2253>
- Eug, A. (2002). Distribuição de formigas urbanas em um hospital da região sudeste do Brasil. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 69(1), 85–87.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2016). Annual epidemiological report 2016- Surgical site infections. 2016, April, 4–12.
- Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol*, 7(12), 653–660. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.190>
- Fukuda, A., Usui, M., Okubo, T., & Tamura, Y. (2016). Horizontal Transfer of Plasmid-Mediated Cephalosporin Resistance Genes in the Intestine of Houseflies (*Musca domestica*). *Microbial Drug Resistance*, 22(4), 336–341. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0125>
- Ghadiri, H., Vaez, H., Razavi-Azarkhiavi, K., Rezaee, R., Haji-Noormohammadi, M., Rahimi, A. A., Vaez, V., & Kalantar, E. (2014). Prevalence and Antibiotic Susceptibility Patterns of Extended-Spectrum β -Lactamase and Metallo- β -Lactamase-Producing Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates. *Laboratory Medicine*, 45(4), 291–296. <https://doi.org/10.1309/LMHEP4VQHEY2POOK>
- Gliniewicz, A., Sawicka, B., & Mikulak, E. (2006). Pest control and pesticide use in hospitals in Poland. *Indoor and Built Environment*, 15(1), 57–61. <https://doi.org/10.1177/1420326X06062235>
- Gracioli, G., & Carvalho, C. J. B. de. (2003). Hippoboscidae (Diptera, Hippoboscoidea) no Estado do Paraná, Brasil: chaves de identificação, hospedeiros e distribuição geográfica. *Revista Brasileira de Zoologia*, 20(4), 667–674. <https://doi.org/10.1590/s0101-81752003000400019>
- Graczyk, T. K., Knight, R., Gilman, R. H., & Cranfield, M. R. (2001). The role of non-biting flies in the epidemiology of human infectious diseases. *Microbes and Infection*, 3(3), 231–235. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01371-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01371-5)
- Gupta, A. K., Rastogi, G., Nayduch, D., Sawant, S. S., Bhonde, R. R., & Shouche, Y. S. (2014). Molecular phylogenetic profiling of gut-associated bacteria in larvae and adults of flesh flies. *Medical and Veterinary Entomology*, 28(4), 345–354. <https://doi.org/10.1111/mve.12054>

- Gurung, K., Wertheim, B., & Falcao Salles, J. (2019). The microbiome of pest insects: it is not just bacteria. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167(3), 156–170. <https://doi.org/10.1111/eea.12768>
- Hamoo, R. N., & Alnuri, A. I. (2019). Isolation and Identification of Parasites From Housefly (*Musca domestica*) in Mosul City, Iraq. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 7(8), 711–714. <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2019/7.8.711.714>
- 16S Metagenomic Sequencing Library, Illumina.com 1 (2013). http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf
- Isaac, C., Orue, P. O., Iyamu, M. I., Ehiaghe, J. I., & Isaac, O. (2014). Comparative analysis of pathogenic organisms in cockroaches from different community settings in Edo State, Nigeria. *Korean Journal of Parasitology*, 52(2), 177–181. <https://doi.org/10.3347/kjp.2014.52.2.177>
- Johnson, N. F., & Triplehorn, C. A. (2005). *Borror and DeLong's introduction to the study of insects* (Edn. Brooks/Cole. Belmont, Ed.; 7th ed.).
- Junqueira, A. C. M., Ratan, A., Acerbi, E., Drautz-Moses, D. I., Premkrishnan, B. N. V., Costea, P. I., Linz, B., Purbojati, R. W., Paulo, D. F., Gaultier, N. E., Subramanian, P., Hasan, N. A., Colwell, R. R., Bork, P., Azeredo-Espin, A. M. L., Bryant, D. A., & Schuster, S. C. (2017). The microbiomes of blowflies and houseflies as bacterial transmission reservoirs. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16353-x>
- Kappel, H. B., Oliveira, A. G., da Silva, P. R., & Pelli, A. (2013). Non-biting flying insects as carriers of pathogenic bacteria in a Brazilian hospital. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(2), 234–236. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-1173-2013>
- Kassiri, H., & Kazemi, S. (2012). Cockroaches [*periplaneta americana* (L.), dictyoptera; blattidae] as carriers of bacterial pathogens, khorranshahr County, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 5(1), 320–322. <https://doi.org/10.5812/kowsar.20083645.2434>
- Kassiri, H., Zarrin, M., Veys-Behbahani, R., Faramarzi, S., & Kasiri, A. (2015). Isolation and Identification of Pathogenic Filamentous Fungi and Yeasts From Adult House Fly (Diptera: Muscidae) Captured From the Hospital Environments in Ahvaz City, Southwestern Iran. *Journal of Medical Entomology*, 52(6), 1351–1356. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv140>

- Khamesipour, F., Lankarani, K. B., Honarvar, B., & Kwent, T. E. (2018). A systematic review of human pathogens carried by the housefly (*Musca domestica* L.). *BMC Public Health*, *18*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12889-018-5934-3>
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(17), 5112–5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
- Krebs, C. J. (1999). Ecological Methodology. In *Benjamin Cummings, Menlo Park*. <https://doi.org/10.1017/9781139026949.020>
- Kurtzman, C. P. (2011). *Wickerhamomyces Kurtzman, Robnett & Basehoar-Powers* (2008). In *The Yeasts* (Vol. 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00080-X>
- Loera-Valenzuela, P., López-Ortiz, C., Luévanos-Escareño, M., Romero-Vela, C., & Balagurusamy, N. (2016). Mecanismos De Resistencia Intrínseca y Adquirida a Antibióticos En Bacterias. *Medicina De Torreón*, *8*(2), 67–76.
- Machado Oliveira, B. R., Ferreira de Sousa, L., Chalá Soares, R., César Nascimento, T., Silva Madureira, M., & Luiz Fortuna, J. (2017). Ants as Vectors of Bacteria in Hospital Environments. *Journal of Microbiology Research*, *7*(1), 1–7. <https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20170701.01>
- Mackay, W. P., & Mackay, E. E. (1989). CLAVE DE LOS GENEROS DE HORMIGAS EN MEXICO (HYMENOPTERA: FORMICIDAE). In *Memorias del II simposio nacional de insectos sociales*. Sociedad Mexicana de Entomología.
- Malassigné, S., Minard, G., Vallon, L., Martin, E., Moro, C. V., & Luis, P. (2021). Diversity and functions of yeast communities associated with insects. *Microorganisms*, *9*(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081552>
- Máximo, H. J., Felizatti, H. L., Ceccato, M., Cintra-Socolowski, P., & Beretta, A. L. R. Z. (2014). Ants as vectors of pathogenic microorganisms in a hospital in São Paulo county, Brazil. *BMC Research Notes*, *7*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-554>
- Memon, H., Manzoor, F., & Anjum, A. A. (2018). Cockroaches (Blattodea: Blattidae): A Reservoir of Pathogenic Microbes in Human-Dwelling Localities in Lahore. *Journal of Medical Entomology*, *54*(2), 435–440. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw168>
- Menasria, T., Moussa, F., El-Hamza, S., Tine, S., Megri, R., & Chenchouni, H. (2014). Bacterial load of German cockroach (*Blattella germanica*) found in hospital environment. *Pathogens and Global Health*, *108*(3), 141–147. <https://doi.org/10.1179/2047773214Y.00000000136>

- Morales-López, S. E., & Garcia-Effron, G. (2021). Infections due to rare *Cryptococcus* species. A literature review. *Journal of Fungi*, 7(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/jof7040279>
- Nazari, M., Mahrabi, T., Hosseini, S. M., & Alikhani, M. Y. (2017). Bacterial contamination of adult house flies (*Musca domestica*) and sensitivity of these bacteria to various antibiotics, captured from Hamadan City, Iran. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(4), DC04–DC07. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/23939.9720>
- Nguyen, N. H., Suh, S. O., & Blackwell, M. (2007). Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects. *Mycologia*, 99(6), 842–858. <https://doi.org/10.3852/mycologia.99.6.842>
- Oliva, G. R., Díaz, C., Fuentes González, O., Martínez, M. D., Fernández, C., Cordoví, R., Lago, P. M., & Herrera, N. (2010). *Blattella germanica* as a possible cockroach vector of micro-organisms in a hospital. *Journal of Hospital Infection*, 74(1), 93–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.09.002>
- Onwugamba, F. C., Fitzgerald, J. R., Rochon, K., Guardabassi, L., Alabi, A., Kühne, S., Grobusch, M. P., & Schaumburg, F. (2018). The role of ‘filth flies’ in the spread of antimicrobial resistance. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 22(December 2017), 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2018.02.007>
- Organización Mundial de la Salud/OMS. (1988). *Lucha contra vectores y plagas urbanos*.
- Pai, H. H., Chen, W. C., & Peng, C. F. (2003). Isolation of non-tuberculous mycobacteria from hospital cockroaches (*Periplaneta americana*). *Journal of Hospital Infection*, 53(3), 224–228. <https://doi.org/10.1053/jhin.2002.1355>
- Pai, H.-H. (2013). Multidrug resistant bacteria isolated from cockroaches in long-term care facilities and nursing homes. *Acta Tropica*, 125(1), 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.016>
- Pai, H.-H., Chen, W.-C., & Peng, C.-F. (2004). Cockroaches as Potential Vectors of Nosocomial Infections. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 25(11), 979–984. <https://doi.org/10.1086/502330>
- Pantoja, L. D. M., Filho, R. E. M., Brito, E. H. S., Aragão, T. B., Brilhante, R. S. N., Cordeiro, R. A., Rocha, M. F. G., Monteiro, A. J., Quinet, Y. P., & Sidrim, J. J. C. (2009). Ants (Hymenoptera: Formicidae) as carriers of fungi in hospital environments: An emphasis on the genera *Tapinoma* and *Pheidole*. *Journal of Medical Entomology*, 46(4), 895–899. <https://doi.org/10.1603/033.046.0423>
- Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 11(3), 297–308. <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>

- Pesquero, M. A., Elias Filho, J., Carneiro, L. C., Feitosa, S. B., Oliveira, M. A. C., & Quintana, R. C. (2008). Formigas em ambiente hospitalar e seu potencial como transmissoras de bactérias. *Neotropical Entomology*, 37(4), 472–477. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2008000400017>
- Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 13(C), 131–144. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90013-0)
- Pradeep, P., Pandey, N., Gupta, M. K., Kumar, D., & Tilak, R. (2020). A Case series of *Wickerhamomyces anomalus*: An emerging fungal pathogen and an entity of concern for neonatal intensive care unit. *International Journal of Medical Reviews and Case Reports*, 4(Reports in Neurology, Neurosur), 1. <https://doi.org/10.5455/ijmrcr.wickerhamomyces-anomalus-290>
- Pratt, H. D., & Littig, K. S. (1969). Cockroaches: Pictorial key to some common species. Introduction to arthropods of public health importance. In *US Department of Health, Education and Welfare*. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000300017>
- Reyes Martínez, I., Pérez Morales, L., Morffi García, M., & Barletta Castillo, J. (2013). Aislamiento de *Rhodotorula*. Presentación de un caso en paciente con leucemia mieloide aguda. *MediSur*, 11(5), 542–545.
- Ríos-Casanova, L. (2014). Biodiversidad de hormigas en Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(SUPPL.), 392–398. <https://doi.org/10.7550/rmb.32519>
- Rodríguez, P. L. C., Flórez, C. V. M., Russo, A., Domínguez, H. Y., Valencia, J. A., Arboleda, V. J. W., & Valle-Molinares, R. H. (2016). The ghost ant *Tapinoma melanocephalum* (Formicidae) as mechanical vector of clinically important bacteria. *Pharmacologyonline*, 2016(2), 185–191.
- Salamatian, I., Moshaverinia, A., Razmyar, J., & Ghaemi, M. (2019). In vitro Acquisition and Retention of Low-Pathogenic Avian Influenza H9N2 by *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, X, 1–5. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz175>
- Santos Zonta, F. D. N., Da Silva Roque, M., Soares da Silva, R. G., Gabrieli Ritter, A., & Tondello Jacobsen, F. (2020). Colonização por ESKAPES e características clínicas de pacientes críticos. *Enfermería Global*, 19(3), 214–254. <https://doi.org/10.6018/eglobal.406691>
- Schaumburg, F., Onwugamba, F. C., Akulenko, R., Peters, G., Mellmann, A., Köck, R., & Becker, K. (2016). A geospatial analysis of flies and the spread of antimicrobial resistant bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(7), 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.06.002>

- Schouest, J. M., Heinrich, L., Nicholas, B., & Drach, F. (2017). Fly rounds: Validation and pilot of a novel epidemiologic tool to guide infection control response to an infestation of Sarcophagidae flies in a community hospital's perioperative department. *American Journal of Infection Control*, 45(9), e91–e93. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.02.037>
- Secretaría de Salud. (2016). Dirección General de Epidemiología. Informe anual 2015. *Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE)*, 1, 1–61.
- Secretaría de Salud. (2019). *Manual Para La Implementación de los paquetes de acciones para prevenir y vigilar las Infecciones Asociadas a La Atención De La Salud (IAAS): Vol. primera ed.*
- Serra Valdés, M. Á. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 16(3), 402–419.
- Shahi, M., Davoodian, P., Ansari, M., Ghazi, F., & Akbarzadeh, K. (2017). Synanthropic ants as vectors of pathogens in hospitals of Iran. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 24(6), 498–504.
- Simothy, L., Mahomoodally, F., & Neetoo, H. (2018). A study on the potential of ants to act as vectors of foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 4(2), 319–333. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.2.319>
- Smith, M. R. (1965). *House-infesting ants of the eastern United States*.
- Sosa, O., Matías, B., González, J., Juárez, R., & Estrada, A. (2019). *Infecciones asociadas a la atención de la salud por bacterias del grupo eskape en un hospital de la Ciudad de México 2013-2017 Introducción* (Vol. 39, Issue 2).
- Šrámová, H., Daniel, M., Absolonová, V., Dědičová, D., Jedličková, Z., Lhotová, H., Petráš, P., & Subertová, V. (1992). Epidemiological role of arthropods detectable in health facilities. *Journal of Hospital Infection*, 20(4), 281–292. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(92\)90006-8](https://doi.org/10.1016/0195-6701(92)90006-8)
- Stafford, K. C. (2008). Fly Management Handbook: A Guide to Biology, Dispersal, and Management of the House Fly and Related Flies for Farmers, Municipalities, and Public Health Officials. *The Connecticut Agricultural Experiment Station*, May, 38.
- Stefanini, I. (2018). Yeast-insect associations: It takes guts. *Yeast*, 35(4), 315–330. <https://doi.org/10.1002/yea.3309>
- Teixeira, M. M., Pelli, A., Santos, V. M. dos, & Reis, M. das G. (2009). Microbiota associated with tramp ants in a Brazilian University Hospital. *Neotropical Entomology*, 38(4), 537–541. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2009000400017>
- Tetteh-Quarcoo, P. B., Donkor, E. S., Attah, S. K., Duedu, K. O., Afutu, E., Boamah, I., Olu-Taiwo, M., Anim-Baidoo, I., & Ayeh-Kumi, P. F. (2013). Microbial Carriage

- of Cockroaches at a Tertiary Care Hospital in Ghana. *Environmental Health Insights*, 7(May 2014). <https://doi.org/10.4137/EHI.S12820>
- Tolrá Hjorth-Andersen, M. C. (2015). Orden Diptera. In *Revista IDE@-SEA* (Vol. 63, pp. 1–22).
- Torres, F. P. (2015). Clase Insecta - Orden Blattodea. *Revista IDE@-SEA*, 48, 1–13.
- Usui, M., Shirakawa, T., Fukuda, A., & Tamura, Y. (2015). The role of flies in disseminating plasmids with antimicrobial-resistance genes between farms. *Microbial Drug Resistance*, 21(5), 562–569. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0033>
- Vásquez Avedaño, E., Márquez Blanco, N., Amador de Alvarino, M., & Cataño González, A. (2013). Insectos Como Posibles Factores De Riesgo De Infecciones Intrahospitalaria En La Áreas Quirúrgicas De Tres Instituciones Prestadoras De Servicios De Salud En El Distrito De Barranquilla. *Universidad Libre Seccional Barranquilla*, 8, 61–67.
- Vazirianzadeh, B., Mehdinejad, M., & Dehghani, R. (2009). Identification of bacteria which possibly transmitted by *Polyphaga aegyptica* (Blattodea: Blattidae) in the region of Ahvaz, SW Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2(1), 36–40.
- Voeller, J. G., Zurek, L., & Gorham, J. R. (2008). Insects As Vectors Of Foodborne Pathogens. *Wiley Handbook of Science and Technology for Homeland Security*, 1–15. <https://doi.org/10.1002/9780470087923.hhs365>
- Wang, C., Bischoff, E., Eiden, A. L., Zha, C., Cooper, R., & Graber, J. M. (2019). Residents Attitudes and Home Sanitation Predict Presence of German Cockroaches (Blattodea: Ectobiidae) in Apartments for Low-Income Senior Residents. *Journal of Economic Entomology*, 112(1), 284–289. <https://doi.org/10.1093/jee/toy307>
- Wang, W. (2013). *Houseflies as potential vectors for antibiotic resistant bacteria*.
- Wetterer, J. K., & Hugel, S. (2008). Worldwide spread of the ant cricket *Myrmecophilus americanus*, a symbiont of the longhorn crazy ant, *Paratrechina longicornis*. *Sociobiology*, 52(1), 157–165.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In *PCR Protocols* (Issue January, pp. 315–322). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- WHO. (2017). *Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics*.
- Winpisinger, K. A., Ferketich, A. K., Berry, R. L., & Moeschberger, M. L. (2005). Spread of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), from two caged layer facilities to neighboring residences in rural Ohio. *Journal of Medical Entomology*, 42(5), 732–738. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.5.732>

- Zarchi, A. A. K., & Vatani, H. (2009). A survey on species and prevalence rate of bacterial agents isolated from cockroaches in three Hospitals. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(2), 197–200. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0230>
- Zhang, J., Wang, J., Chen, L., Yassin, A. K., Kelly, P., Butaye, P., Li, J., Gong, J., Cattley, R., Qi, K., & Wang, C. (2017). Housefly (*Musca domestica*) and Blow Fly (*Protophormia terraenovae*) as Vectors of Bacteria Carrying Colistin Resistance Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(1), 1–8. <https://doi.org/10.1128/AEM.01736-17>
- Zhang, L., Xiao, M., Arastehfar, A., Ilkit, M., Zou, J., Deng, Y., Xu, Y., Liao, W., Zhao, J., Fang, W., & Pan, W. (2021). Investigation of the Emerging Nosocomial *Wickerhamomyces anomalus* Infections at a Chinese Tertiary Teaching Hospital and a Systemic Review: Clinical Manifestations, Risk Factors, Treatment, Outcomes, and Anti-fungal Susceptibility. *Frontiers in Microbiology*, 12(October), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.744502>
- Zurek, L., & Ghosh, A. (2014). Insects represent a link between food animal farms and the urban environment for antibiotic resistance traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(12), 3562–3567. <https://doi.org/10.1128/AEM.00600-14>