

## Trabajo Fin de Máster

Máster Oficial Universitario en Salud Pública 2012-2013

Universidad de Zaragoza



# CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE DETERMINANTES GENÉTICOS DE RESISTENCIA A MACRÓLIDOS Y LINCOSAMIDAS EN BACTERIAS GRAM POSITIVAS POR PCR A TIEMPO REAL

---

Cristina Escolar Miñana

**Tutores:**

Dra. Dña M. Carmen Rota García

Dr. D. Antonio Herrera Marteache

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

Facultad de Veterinaria

Diciembre 2013

## AGRADECIMIENTOS

---

Al gobierno de Aragón y Fondo Social Europeo 2007-2010, a través del Grupo Consolidado de Investigación “Análisis y evaluación de la Seguridad Alimentaria” (A01).

También agradecer en primer lugar a las profesoras Carmina Rota y Pilar Conchello por su orientación, ayuda y paciencia prestada durante todo el trabajo y al profesor Antonio Herrera por darme la oportunidad de realizarlo.

A todas las personas que forman parte del área de Nutrición y Bromatología del departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos por el buen ambiente que se respira, que hace que el trabajo sea más agradable.

Muchas gracias a la Dra. Carmen Torres por compartir sus conocimientos, sin sus cepas este trabajo no hubiera podido realizarse.

A M<sup>a</sup> José Rabanaque y Juan Pablo Alonso, por su gran dedicación, gracias a vosotros este máster continua en marcha.

Finalmente a ti, yayo, porque siempre te sentiste orgulloso de tener una nieta veterinaria.

**INDICE:**

<b>1 RESUMEN</b>	.....	<b>5</b>
<b>2 INTRODUCCIÓN</b>	.....	<b>7</b>
<b>2.1 Macrólidos y Lincosamidas</b>		
<b>2.2 Resistencia antimicrobiana</b>		
<b>2.3 Detección de resistencia a antibióticos</b>		
<b>2.3.1 Detección fenotípica de resistencia a Macrólidos y Lincosamidas</b>		
<b>2.3.2 Nuevas técnicas moleculares/Detección genotípica</b>		
<b>2.4 Problemática de la transmisión de genes de resistencia</b>		
<b>2.4.1 Importancia de la transmisión de genes de resistencia en la cadena alimentaria</b>		
<b>2.5 <i>Listeria</i> spp. y Listeriosis</b>		
<b>2.5.1 Resistencia en <i>Listeria</i> spp. aislada de alimentos</b>		
<b>3 OBJETIVO</b>	.....	<b>24</b>
<b>4 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	.....	<b>25</b>
<b>4.1 Cepas bacterianas</b>		
<b>4.1.1 Cepas de referencia</b>		
<b>4.1.2 Cepas de <i>Listeria</i> spp. estudiadas</b>		
<b>4.1.3 Revivificación</b>		
<b>4.2 Test de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana y test de Inducción “<i>in vitro</i>”</b>		
<b>4.2.1 Antibióticos ensayados</b>		
<b>4.2.2 Test de difusión en disco</b>		
<b>4.2.3 Protocolo</b>		
i. Preparación del medio de cultivo y del inóculo		
ii. Estandarización del inóculo		
iii. Siembra de las placas		
iv. Aplicación de los discos antibióticos		
v. Lectura e interpretación de resultados		
<b>4.3 Aislamiento del ADN bacteriano total y plasmídico</b>		
<b>4.3.1 Protocolo de aislamiento del ADN total</b>		
• Método 1: Extracción con <i>PrepMan<sup>®</sup> Ultra</i>		
• Método 2: Extracción con Lisostafina y Proteinasa K		
<b>4.3.2 Protocolo de aislamiento del ADN plasmídico</b>		
<b>4.3.3 Evaluación por espectrofotometría del ADN bacteriano aislado</b>		

<b>4.4 Optimización de la reacción de PCR para cada uno de los genes de resistencia ensayados</b>	
<b>4.4.1 Cebadores seleccionados</b>	
<b>4.4.2 Protocolo PCR</b>	
<b>4.4.3 Optimización de las condiciones de amplificación para cada grupo de cebadores</b>	
<b>4.4.4 Evaluación de la especificidad de los cebadores seleccionados: curva de fusión</b>	
<b>4.5 Detección del producto amplificado</b>	
<b>4.5.1 PCR convencional</b>	
<b>4.5.2 Electroforesis horizontal en gel de agarosa</b>	
i. Preparación del gel	
ii. Carga de las muestras	
iii. Preparación de la cubeta de electroforesis	
iv. Tinción y visualización del gel en transiluminador de luz UV	
<b>4.5.3 Purificación del ADN amplificado</b>	
<b>4.6 Confirmación de las secuencias genéticas</b>	
<b>4.7 Aplicación de la técnica RT-PCR optimizada para la detección del gen <i>Inu A</i> en cepas de <i>Listeria</i> spp. aisladas de alimentos.</b>	

<b>5 RESULTADOS</b>	.....	<b>45</b>
<b>5.1 Test de difusión en disco</b>		
<b>5.2 Evaluación del ADN total y plasmídico aislado por espectrofotometría</b>		
<b>5.3 Optimización de la reacción de PCR para cada uno de los genes de resistencia ensayados:</b>		
<b>5.3.1 Optimización de la temperatura de hibridación y concentración de los cebadores en la reacción</b>		
<b>5.3.2 Determinación del rango dinámico de la concentración de ADN molde en la reacción de amplificación</b>		
<b>5.4 Detección del producto amplificado</b>		
<b>5.4.1 Electroforesis horizontal en gel de agarosa</b>		
<b>5.5 Confirmación de las secuencias genéticas</b>		
<b>5.6 Correlación entre fenotipo y genotipo</b>		
<b>5.7 Caracterización genética del patrón de resistencia antibiótica a clindamicina en cepas de <i>Listeria</i> spp. aisladas de alimentos</b>		
<b>6 CONCLUSIONES</b>	.....	<b>69</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA</b>	.....	<b>70</b>

## 1 RESUMEN

---

El empleo generalizado de antimicrobianos en el sector de los animales productores de alimentos y la aparición de cepas resistentes en seres humanos ha puesto de manifiesto una gran preocupación debido a los problemas que esto conlleva en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. La presencia de bacterias resistentes en los alimentos destinados al consumo humano supone un riesgo potencial, no solo por la transferencia de genes de resistencia que tiene lugar entre los microorganismos, sino también por la adquisición de esta resistencia por parte de agentes patógenos que pueden transmitirse al hombre por medio de alimentos.

En los últimos años, se ha visto incrementada la resistencia a Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas (MLS). Esta resistencia puede ser debida a varios mecanismos, y su expresión fenotípica varía en función de la presencia de ciertos genes de resistencia. Una incorrecta detección fenotípica puede llevar al fracaso terapéutico, por lo que la técnica molecular RT-PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a tiempo real, sirve de herramienta rápida y precisa para detectar secuencias de genes específicos que codifican la resistencia antibiótica.

El objetivo del presente trabajo ha sido optimizar la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR) para evaluar la aplicación de este procedimiento de cara al diagnóstico rápido de la resistencia a eritromicina y clindamicina en bacterias Gram positivas, así como caracterizar genéticamente la resistencia a clindamicina en cepas de *Listeria* spp. aisladas de alimentos.

Para ello se han seleccionado 5 cepas de referencia de las cuales se conocía la presencia de ciertos genes que codifican resistencia a antibióticos del complejo MLS (*mef A*, *msr A*, *erm A*, *erm B* y *Inu A*). Se ha evaluado el aislamiento de ADN total y plasmídico mediante tres procedimientos de extracción, y se ha utilizado la herramienta RT-PCR a tiempo real para la optimización de la reacción de amplificación de este ADN, confirmándose posteriormente las secuencias de los fragmentos amplificados.

Por otra parte, se han aplicado las condiciones optimizadas para el gen *Inu A* (resistencia a Lincosamidas), en 23 cepas de *Listeria* spp. aisladas de alimentos que en estudios previos mostraron fenotipo resistente a este antibiótico.

Los resultados obtenidos muestran la idoneidad de la técnica molecular RT-PCR para la detección de genes de resistencia a antibióticos. Además, se ha podido comprobar que la resistencia a clindamicina observada *“in vitro”* en estas 23 cepas de *Listeria* spp. puede estar determinada por otros genes de resistencia diferentes al gen *Inu A* o bien por mutación.

## 2 INTRODUCCIÓN

---

### 2.1 Macrólidos y Lincosamidas

Los Macrólidos constituyen un grupo de antibióticos caracterizados desde el punto de vista estructural por poseer un anillo macrocíclico. El mecanismo de acción de este grupo de antibióticos es la unión a la subunidad 50 S del ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis proteica.

Existen otro grupo de antibióticos, que son las Lincosamidas, que aunque poseen diferencias estructurales con los Macrólidos, presentan un mecanismo de acción similar y están muy relacionados en sus mecanismos de resistencia (Portillo *et al.*, 2000).

Los antibióticos que conforman el grupo de los Macrólidos, se diferencian entre sí por el número de átomos que conforman el anillo macrocíclico, lo que permite clasificarlos en Macrólidos de 14, 15 o 16 átomos.

La eritromicina es el antibiótico de referencia de esta familia y fue descrita por primera vez en 1952 por McGuire *et al.* (Weisblum *et al.*, 1998). Su uso en el hombre es cada vez más frecuente, sobre todo por ser una de las alternativas terapéuticas en infecciones estreptococicas, cuando la penicilina no es efectiva; bien porque el agente etiológico presenta mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos, o bien por presentar los pacientes problemas de alergia a la penicilina (Portillo *et al.*, 2000).

El grupo de las Lincosamidas, incluye tanto antibióticos compuestos por productos naturales, como es el caso de la lincomicina, como derivados semisintéticos, siendo el caso de la clindamicina o la pirlimicina. Esta clase de antibióticos fue caracterizada por primera vez en 1960, y hoy en día es usada para el tratamiento de un amplio espectro de infecciones en humanos (Rezanka *et al.*, 2007).

Dentro de este grupo, la clindamicina es uno de los antibióticos de elección para el tratamiento de las infecciones de piel y tejidos blandos por estafilococos debido a su buena absorción oral, excelente penetración y a que no necesita ajustarse la dosis en insuficiencia renal. También se usa frente a anaerobios gram-negativos y

protozoos y en el tratamiento alternativo en pacientes alérgicos a penicilina. (Marita morar *et al.*, 2009). Además, es una opción terapéutica por vía oral en pacientes ambulatorios así como para la continuación de una terapia intravenosa (Merino-Díaz *et al.*, 2006).

Tanto Macrólidos como Lincosamidas, no sólo se usan en medicina humana, sino que también se emplean en veterinaria con fines terapéuticos y profilácticos. Sin ir más lejos, estos antibióticos han sido recomendados para el tratamiento de las infecciones cutáneas en los animales de compañía (Mueller *et al.* 2008), y en la actualidad se aplican en ganado lechero ya sea para controlar y prevenir mamitis subclínicas o para el tratamiento de infecciones bacterianas en lactantes (Lüthje *et al.*, 2006).

Tampoco hay que olvidar que hasta 2006, se permitía en la Unión Europea el uso de antimicrobianos en animales productores de alimentos a fin de aumentar su tasa de crecimiento y el rendimiento de la producción.

De hecho, tilosina y espiramicina, antibióticos del grupo de los Macrólidos con estructura similar a la eritromicina, fueron de los últimos antibióticos prohibidos como promotores del crecimiento animal (Torres *et al.* 2002).

Asimismo, tanto Macrólidos como Lincosamidas son algunos de los antibióticos que la Organización Mundial de la Salud incluyó en la lista de medicamentos esenciales para un sistema básico de atención de salud de marzo de 2011 (WHO, 2011).

## 2.2 Resistencia antimicrobiana

Desde la aparición de la penicilina; hasta nuestros días, se han descrito diversos agentes antimicrobianos, ya sean naturales o sintéticos, con diferentes mecanismos de acción y con un espectro cada vez más amplio.

El descubrimiento de cada fármaco antimicrobiano nuevo ha venido acompañado, años más tarde, de la aparición de microorganismos resistentes. Se trata de un fenómeno natural por el cual los microorganismos se vuelven resistentes al efecto de los medicamentos que deberían destruirlos (INFOSAN 2008).

Las bacterias son resistentes intrínsecamente a uno o más agentes antimicrobianos cuando no presentan sensibilidad al antibiótico de manera natural. También se puede adquirir la resistencia, bien por cambios puntuales en el DNA

(mutación) o bien por la adquisición de genes de resistencia por intercambio de material genético (plásmidos, trasposones e integrones) entre especies relacionadas o no relacionadas (Becerra *et al.* 2009). De hecho, muchos de los determinantes genéticos de resistencia que ahora se encuentran en plásmidos pueden tener su origen en el cromosoma de otras especies (Livermore, 2003).

La resistencia adquirida se debe fundamentalmente a tres mecanismos:

- Inactivación enzimática del antibiótico.
- Alteración del sitio blanco impidiendo la unión del antibiótico a su diana ribosomal.
- Modificación de la barrera de permeabilidad a través del eflujo activo del antibiótico.

En el caso de los Macrólidos y las Lincosamidas, al poseer un mecanismo de acción similar, se les agrupa junto a las Estreptograminas en el complejo de antibióticos Macrolidos-Lincosamidas-Estreptograminas (MLS). La razón de esta agrupación se basa originalmente en observaciones empíricas de la bacteriología clínica donde la resistencia a una clase de antibióticos a menudo involucra resistencia a las otras dos clases (Weisblum, 1995).

La resistencia bacteriana a este grupo de antibióticos puede ser tanto intrínseca como adquirida.

La resistencia intrínseca se ha descrito en bacterias Gram-negativas de la familia *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp, y se debe principalmente a la baja permeabilidad de la membrana externa ya que estos antibióticos tienen un comportamiento hidrofóbico (Mao *et al.*, 1968, Fluit *et al.*, 2001).

En cuanto a la resistencia adquirida, a lo largo de los años han sido detectados gran variedad de genes de resistencia frente a las tres clases de antibióticos del complejo MLS, confiriendo resistencia a Macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas simultáneamente; y otros, que tan solo confieren resistencia a uno o dos antibióticos de este complejo (Roberts *et al.*, 1999). Aunque en todas las especies bacterianas no han sido encontrados todos estos mecanismos de resistencia adquiridos, está claro

que en la naturaleza existen reservorios de los mismos, y que puede tener lugar una diseminación horizontal de éstos entre distintas especies (Wondrack *et al.*, 1996).

Los primeros aislados clínicos de *Staphylococcus* resistente a los Macrólidos se describieron en Francia, Inglaterra, Japón y los Estados Unidos poco después de la introducción de la eritromicina en la práctica clínica en 1953. Esta resistencia fue atribuida a una modificación del ARNr 23S por una metilasa específica, originando un cambio conformacional en la subunidad 50S del ribosoma, dando lugar a la disminución de la afinidad con el antibiótico. En general, los genes que codifican estas metilasas llevan el nombre de *erm* (erythromycin ribosome methylation) (Weisblum 1995, 1998) y dan lugar al fenotipo MLS, que confiere resistencia cruzada a los antibióticos del complejo MLS. Este fenotipo puede ser de expresión constitutiva (MLS<sub>BC</sub>) o inducible (MLS<sub>Bi</sub>).

Posteriormente, fueron descubriendose diferentes genes de resistencia que codifican ciertas proteínas de transporte también denominadas bombas de eflujo, capaces de transportar el antibiótico fuera de la célula. En este caso, la resistencia consiste en mantener concentraciones intracelulares del antibiótico por debajo de las requeridas para unirse a los ribosomas (Roberts *et al.*, 1999).

En concreto, en 1981, fue descrito el fenotipo de resistencia a eritromicina y estreptogramina tipo B, conocido como MS<sub>B</sub>. Esta resistencia se asocia principalmente a los genes *msr* (*macrolide streptogramin resistance*), que codifican estas bombas de eflujo capaces de reducir la permeabilidad celular a los Macrólidos de 14 y 15 átomos y a las Estreptograminas tipo B. Este fenotipo, se diferencia del fenotipo MLS en que no hay resistencia a Lincosamidas ni a Macrólidos de 16 átomos (Reynolds *et al.*, 2003).

Existe otro sistema de bomba eflujo bastante común, codificado por el gen *mef* A (*macrolide efflux*). En este caso, solo se ven afectados los Macrólidos de 14 y 15 átomos, permaneciendo las cepas sensibles a Macrólidos de 16 átomos, Lincosamidas y Estreptograminas tipo B. Este fenotipo de resistencia se denomina fenotipo M (Roberts *et al.*, 1999).

Tanto el gen *msr* como el *mef*, codifican para un mismo mecanismo de resistencia; no obstante, el gen *msr* se asocia a especies de *Stahpylococcus* mientras que el gen *mef* se ha encontrado en aislados clínicos de *Streptococcus* (Leclercq, 2002).

Posteriormente, se han descrito otros genes de resistencia capaces de inactivar los antibióticos MLS debido a la acción de diferentes enzimas. Entre ellos destacan los genes *Inu*, anteriormente conocidos como *lin*, capaces de inactivar únicamente a las Lincosamidas debido a la acción de la enzima Lincosamida O-nucleotidiltransferasas (Brisson *et al.*, 1988, Leclercq *et al.*, 1991, Bozdogan *et al.*, 1999). El fenotipo de resistencia asociado a estos genes es el fenotipo L. Este fenotipo es bastante inusual, ya que a menudo los genes *Inu* son enmascarados por la coexistencia con diferentes determinantes *erm* (Leclercq, 2002), aunque recientemente se ha visto aumentado entre cepas de estafilococos de origen animal (Lozano *et al.*, 2012).

**Tabla 1: Fenotipos y genotipos de resistencia a Macrólidos y Lincosamidas debido a la metilación ribosómica, bomba eflujo e inactivación del antibiótico en bacterias Gram positivas (Leclercq, 2002)**

Species, mechanism	Gene class	Phenotype designation	Phenotype of resistance		
			14- or 15-Md	16-Md	Cli
<i>Staphylococcus</i> species					
Ribosomal methylation	<i>erm</i>	MLS <sub>B</sub> inducible	R	s	s
		MLS <sub>B</sub> constitutive	R	R	R
Macrolide efflux	<i>msr</i> (A)	MS <sub>B</sub>	R	S	S
Lincosamide inactivation	<i>Inu</i> (A)	L	S	S	S <sup>a</sup>
<i>Streptococcus</i> and <i>Enterococcus</i> species					
Ribosomal methylation	<i>erm</i>	MLS <sub>B</sub> inducible	R or I	R or I or s	R or I or s
		MLS <sub>B</sub> constitutive	R	R	R
Efflux	<i>mef</i> (A)	M	R or I	S	S
<i>Enterococcus faecium</i>					
Lincosamide inactivation	<i>Inu</i> (B)	L	S	S	S <sup>a</sup>

**NOTE.** Cli, clindamycin; 14-Md, 14-membered ring macrolides (clarithromycin, dirithromycin, erythromycin, and roxithromycin); 15-Md, 15-membered macrolide (azithromycin); I, intermediate resistance; MLS<sub>B</sub>, macrolides, lincosamides, and streptogramins B; L, lincosamides; MS<sub>B</sub>, macrolides and streptogramins B; M, 14–15-membered macrolides; Md, membered; R, resistant; S, susceptible; s, susceptible *in vitro* but risk of selection of constitutive mutants *in vivo*; 16-Md, 16-membered ring macrolides (Josamycin and spiramycin).

<sup>a</sup> Diminished bactericidal activity.

De todos estos mecanismos de resistencia descritos, es importante destacar la importancia clínica que tiene conocer la expresión fenotípica, sobretodo en el caso de la resistencia cruzada a los antibióticos del complejo MLS, ya que como se ha comentado anteriormente, este fenotipo puede ser inducible o constitutivo.

Como se observa en la tabla 1, el fenotipo constitutivo MLS<sub>BC</sub>, presenta elevado nivel de resistencia a cualquier antimicrobiano del grupo MLS, a diferencia del fenotipo inducible MLS<sub>Bi</sub> que presenta únicamente resistencia a estos antimicrobianos en presencia de eritromicina (Steward *et al.*, 2005, Fiebelkorn *et al.*, 2003).

Por ello, si se estudia la sensibilidad a Macrólidos de 16 átomos y Lincosamidas en ausencia de eritromicina, las cepas aparecen falsamente sensibles a estos antibióticos, presentando susceptibilidad “*in vitro*” (Schreckenberger *et al.*, 2004, Torres *et al.*, 2010).

## 2.3 Detección de resistencia a antibióticos

La detección de la resistencia antimicrobiana se realiza mediante las pruebas de sensibilidad/resistencia o antibiograma. Esta prueba, tiene como principal objetivo evaluar la actividad “*in vitro*” de uno o varios antimicrobianos frente a un microorganismo determinado, reflejando la capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana (García *et al.*, 2000).

El resultado obtenido se traduce, en una primera aproximación, como factor predictivo de la eficacia clínica (Jorgensen y Hindler, 2007).

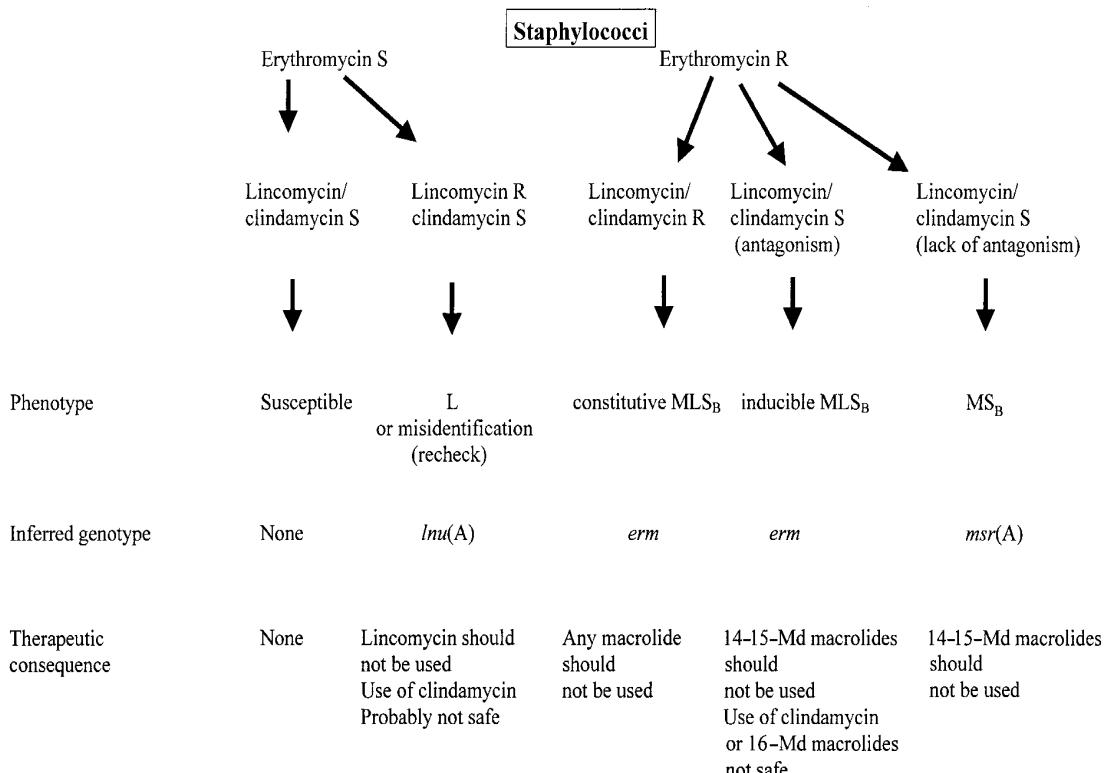
### 2.3.1 Detección fenotípica de resistencia a Macrólidos y Lincosamidas

Hoy en día, en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica, la sensibilidad a los antibióticos está semiautomatizada basándose en métodos de microdilución en caldo que no permiten detectar la resistencia inducible a clindamicina (Merino-Díaz *et al.*, 2007).

Son muchos los trabajos que describen casos clínicos en los que se estudia la sensibilidad a los Macrólidos de 16 átomos, a las Lincosamidas y a las Estreptograminas B en ausencia del disco de eritromicina y las cepas han aparecido como sensibles a estos antimicrobianos cuando en realidad son resistentes, ya que poseen el mecanismo que se ha inducido “*in vivo*” y ha conducido a fracasos terapéuticos (Siberry *et al.*, 2003, Rao *et al.*, 2000, Levin *et al.*, 2005, Drinkovic *et al.*, 2001, Morosini *et al.*, 2012).

El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda el método de difusión con doble disco (D-test) para la detección de este fenotipo. En la siguiente figura se observa la relación entre el fenotipo y el genotipo en los diferentes casos de resistencia a Macrólidos y Lincosamidas en *Staphylococcus* así como las alternativas terapéuticas.

**Figura 1: Detección de la resistencia a Macrólidos y Lincosamidas en *Staphylococcus*. Fenotipos de resistencia identificados mediante las pruebas de susceptibilidad a eritromicina y clindamicina/lincomicina y sus implicaciones clínicas. L: Lincosamidas, MLSB: Macrólidos y Estreptograminas tipo B, R: Resistente, S: Sensible (Leclercq, 2002)**



### 2.3.2 Nuevas técnicas moleculares/Detección genotípica

Tradicionalmente, la amplificación del ADN se ha realizado “*in vivo*”, mediante un proceso conocido de forma genérica como clonación, hasta que a mediados de los años 80, cuando Kary Mullis desarrolló la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) o reacción en cadena de la polimerasa.

Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN, por lo que esta técnica se ha convertido en una herramienta esencial para la detección exacta y rápida de cualquier segmento de ADN.

La técnica de PCR se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa, que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio, ya que son las materia base

para fabricar el ADN, así como una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva de cebador o también llamado “primer”.

Para que tenga lugar la reacción, es necesario que se repita cíclicamente el siguiente proceso:

- Una etapa inicial de desnaturalización a temperaturas superiores a 90ºC para que la cadena doble de ADN se separe y quede accesible a los cebadores.
- Una etapa de alineamiento donde los cebadores hibridan con la secuencia complementaria.
- Una última etapa de extensión, donde la enzima ADN polimerasa va agregando nucleótidos utilizando el ADN diana como molde.

Esta amplificación se incrementa de forma exponencial a medida que se repite el numero de ciclos, por lo que al terminar la reacción, tendríamos una gran cantidad de ADN amplificado que puede ser cuantificado. La figura 2 muestra de forma esquemática el proceso de amplificación del ADN por la PCR.

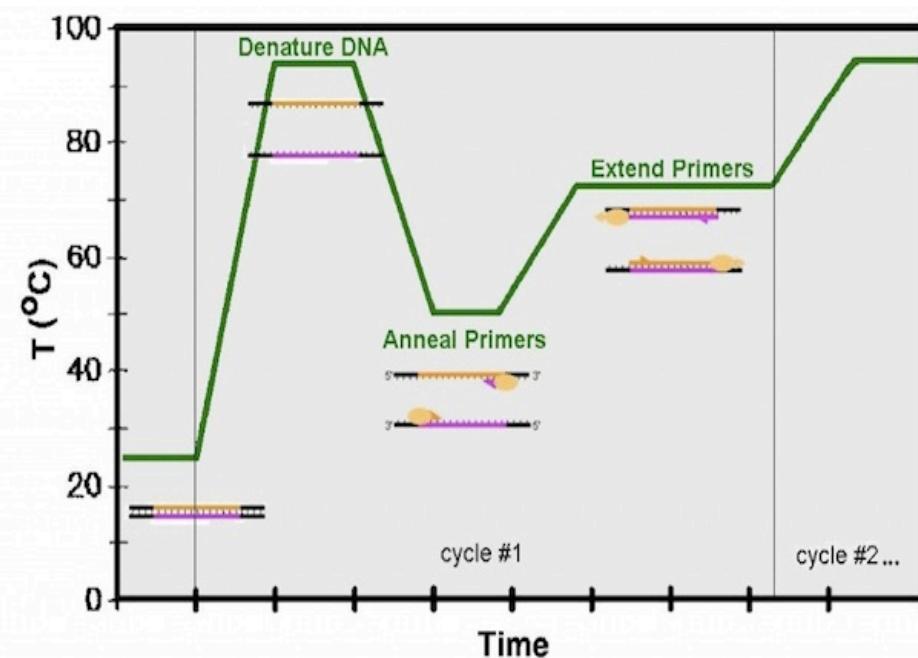


Figura 2: Imagen esquemática del proceso de amplificación del ADN

La PCR en tiempo real o RT-PCR, es una técnica que permite monitorizar en tiempo real la reacción de amplificación y por lo tanto permite cuantificar la cantidad de ADN diana inicial, así como evaluar el producto amplificado durante toda la reacción (figura 3).

Para ello, es necesario el uso de un fluoróforo que se une al ADN de doble cadena, produciendo un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto amplificado. Así pues, uno de los parámetros fundamentales en una PCR en Tiempo Real y en función del cual se realizan todos los cálculos analíticos, es el denominado Ciclo Umbral (Threshold Cycle o Ct), que se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo (background).

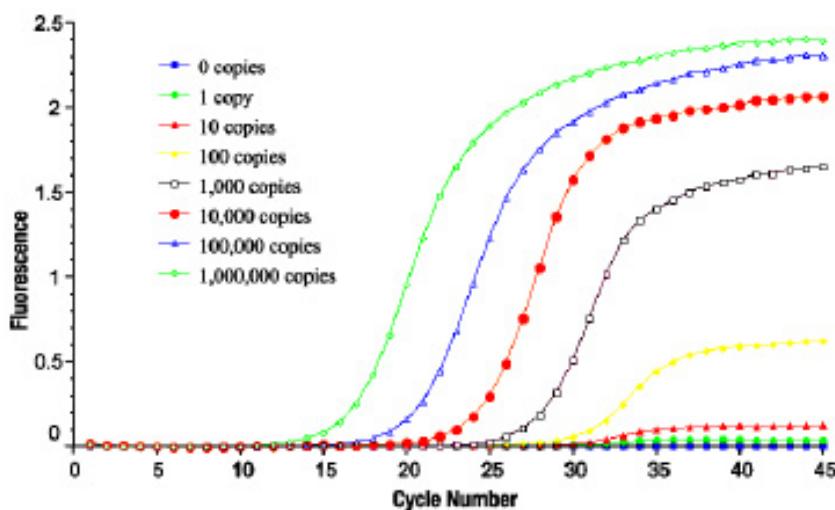


Figura 3: Monitorización del proceso de amplificación del ADN mediante la técnica de RT-PCR

Cuando se utilizan fluoróforos inespecíficos, es necesario discriminar si las muestras con curva de amplificación positiva corresponden a productos específicos o a dímeros de primers o productos inespecíficos, para ello, se realiza una curva de desnaturación (“melting curve”) al final de la reacción, incrementando la temperatura de 50°C a 95°C y monitorizando continuamente la fluorescencia. La temperatura a la cual el DNA se desnaturiza se observa como una drástica caída de la fluorescencia debido a la disociación del fluoróforo.

Los productos de PCR de diferente longitud y diferentes secuencias se desnaturizan a diferentes temperaturas, observándose diferentes picos cuando se representa la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura frente a la temperatura (figura 4).

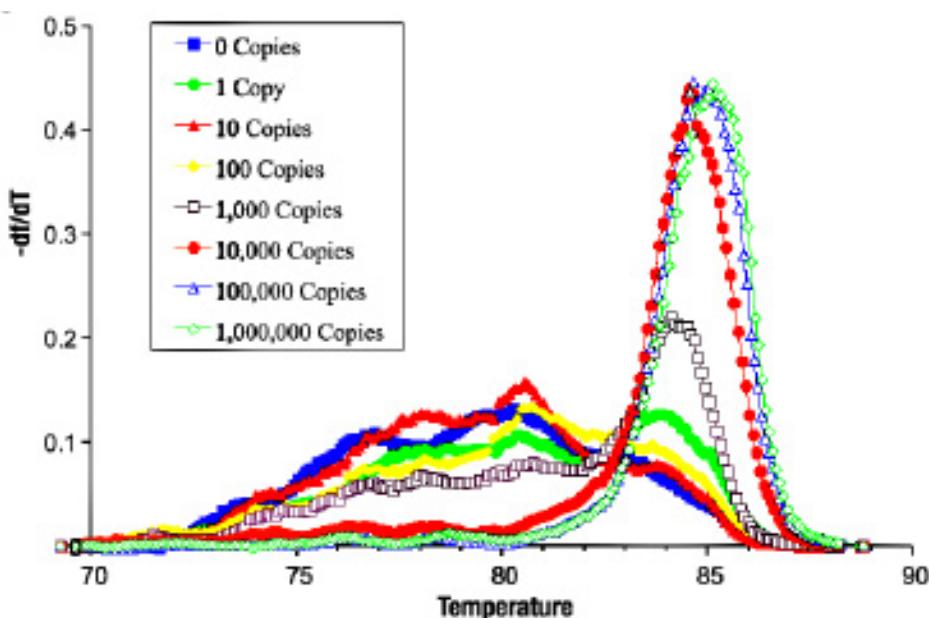


Figura 4: Esquema de la curva de fusión tras RT-PCR, para diferentes cantidades de ADN

La temperatura de fusión también llamada “melting temperatura” ( $T_m$ ), es aquella en la que se desnaturaliza el 50% del ADN, por lo que cada fragmento amplificado tiene una  $T_m$  característica. Esto permite diferenciar distintos fragmentos, ya que incluso los amplicones que difieren en un solo nucleótido, pueden desnaturalizarse a diferentes temperaturas y pueden detectarse por sus picos de desnaturalización.

De esta manera, se pueden detectar diferentes fragmentos amplificados siempre y cuando el valor  $T_m$  sea distinto entre ellos.

Esto, unido al hecho de que la RT-PCR se adapta para la evaluación de un número grande de muestras al mismo tiempo, hace de esta técnica una herramienta útil para detectar los genes que codifican ciertas resistencias a antibióticos y permite seleccionar el tratamiento más adecuado en infecciones causadas por microorganismos multirresistentes, sobre todo en los casos de resistencia cruzada a los antibióticos del complejo MLS en los que los métodos de detección “*in vitro*” puede dar lugar a falsos negativos (Merino-Díaz *et al.*, 2007, Rodríguez-Herrera *et al.*, 2009).

A pesar de todas estas ventajas, es importante tener en consideración algunos factores que afectan a esta técnica.

En primer lugar, es necesario llevar a cabo la optimización de la reacción. Para ello se deben ensayar diferentes concentraciones de cebadores así como

temperaturas de hibridación hasta elegir aquellas condiciones que maximicen la eficiencia de la reacción.

Por otra parte también hay que tener en cuenta la calidad y cantidad del ADN extraído. Por ello, la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra juega un papel crítico y fundamental ya que se requiere una técnica que permita romper la pared bacteriana, preservando el ADN diana.

Hoy en día existen numerosos métodos de extracción y productos comerciales dirigidos a la extracción de ADN en diferentes tipos de muestras. Todos ellos llevan a cabo una lisis celular por medio de diferentes buffers de extracción, así como la inactivación de nucleasas celulares y la separación de los ácidos nucleicos de los restos de células (Somma M., WHO 2006).

## **2.4 Problemática de la transmisión de genes de resistencia**

Aunque la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico natural, se convierte en un problema significativo para la salud pública cuando se ve exacerbado por el abuso y el mal empleo de los antibióticos en el tratamiento de las enfermedades humanas, así como su uso indiscriminado en la ganadería o la agricultura.

La resistencia antimicrobiana hace que se reduzca la eficacia del tratamiento, puesto que los microorganismos resistentes no responden a los tratamientos habituales, con lo que los enfermos persisten infectados por más tiempo, hecho que a su vez propicia la propagación de estos microorganismos resistentes a otras personas (WHO 2012).

Como ya se ha comentado anteriormente, la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno antiguo codificado por genes que se transmiten bien de forma vertical de una generación de microorganismos a otra, o bien de forma horizontal a otras bacterias que pueden ser de distinta especie e incluso género mediante la transferencia del material genético que codifica esa resistencia. Esta última es la forma más común de transmisión de resistencias.

Afortunadamente, la mayoría de los microorganismos sensibles no se vuelven resistentes fácilmente. La resistencia que se observa hoy en la práctica clínica suele

haberse desarrollado en otra persona, animal o reservorio medioambiental en alguna otra parte del mundo muchos años antes (WHO 2013). En el último decenio, la OMS ha emprendido muchas iniciativas para estudiar la resistencia a los antimicrobianos y hacerle frente, particularmente en relación con algunas de las enfermedades más mortíferas en el mundo (WHO, 2011).

A nivel Europeo, existe una red de sistemas nacionales de vigilancia (EARS-Net) coordinada y financiada por el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), que proporciona datos de referencia sobre la resistencia a los antimicrobianos con el fin de mitigar el riesgo de que sigan apareciendo resistencias y preservar la eficacia de todos los antimicrobianos.

#### **2.4.1 Importancia de la transmisión de genes de resistencia en la cadena alimentaria**

En los últimos 10 años, numerosas publicaciones científicas, han destacado la posible relación entre el uso de antibióticos en animales y el incremento de resistencias a dichos compuestos en bacterias de importancia en patología humana y animal (Torres *et al.*, 1998).

Una Comisión mixta de la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) celebrado en Ginebra en 2003 llegó a la conclusión de que existen pruebas claras de que la aparición de microorganismos resistentes a raíz del uso no humano de antimicrobianos tiene consecuencias adversas para la salud humana (INFOSAN 2008).

En 2011, la Autoridad Europea de Seguridad alimentaria (EFSA) publicó una evaluación sobre el riesgo de resistencia antimicrobiana transmitida por los alimentos y por los animales destinados a la producción de alimentos. El panel de Peligros biológicos (BIOHAZ) de EFSA concluyó que el uso de antimicrobianos en piensos para animales productores de alimentos es un factor de riesgo para la extensión de estas cepas bacterianas resistentes (EFSA 2011).

En el sector de la producción animal se utilizan antimicrobianos para el tratamiento de infecciones en animales de forma individual o colectiva. En muchas ocasiones se administran tratamientos profilácticos y metafilácticos para prevenir la

propagación de infecciones de animales enfermos a sanos. Además, anteriormente, se empleaban antimicrobianos en dosis subterapéuticas, con el objetivo de promover el crecimiento animal (INFOSAN 2008).

Los agentes antimicrobianos utilizados en Europa para animales productores de alimentos son con frecuencia los mismos, o pertenecen a las mismas clases que los utilizados en la medicina humana (EFSA 2013).

De una forma o de otra, la exposición prolongada a dosis bajas de antimicrobianos ha dado lugar a una presión selectiva de bacterias resistentes en la microbiota, ya sean patógenas, comensales o bacterias del medio ambiente (Torres *et al.*, 2002).

Además, esta resistencia que tiene lugar en los animales destinados a la producción de alimentos, se puede propagar al humano no sólo a través de los alimentos y el agua sino también a través de la contaminación del medio ambiente o del contacto directo con los animales (EFSA 2013).

En el último informe científico de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) sobre la resistencia antimicrobiana basado en datos recogidos a lo largo del 2011, tanto las cepas de *Salmonella* como de *Campylobacter* aisladas a partir de casos humanos, así como de animales productores de alimentos y de alimentos en la Unión Europea, presentaban resistencia de forma regular. Este hecho también se observa en bacterias indicadoras/comensales como *Escherichia coli* y *Enterococos* aislados de animales y alimentos. Por todo ello, es motivo de preocupación la reciente aparición de resistencias antimicrobianas en bacterias transmitidas por alimentos, y más aun si se trata de microorganismos patógenos que puedan causar enfermedades en humanos. (EFSA 2013).

La participación de la OMS en cuestiones relacionadas con la resistencia a los antimicrobianos transmitida por los alimentos se remonta a 1990, y su interés creció a partir de 1997, cuando se identificaron problemas médicos derivados del uso de antimicrobianos en la producción de ganado (INFOSAN, 2008). Ya en 2001, la OMS publicó los principios mundiales para la contención de la resistencia a los antimicrobianos en los animales destinados al consumo, fijando un marco de recomendaciones para reducir el uso excesivo o indebido de antimicrobianos en

animales productores de alimentos con miras a proteger la salud humana (WHO, 2001).

Durante los últimos diez años, la FAO, la OIE y la OMS han abordado conjuntamente la cuestión del riesgo de aparición y propagación de microorganismos resistentes asociados al uso de antimicrobianos en animales, elaborado directrices para el uso responsable y prudente de los antimicrobianos en animales productores de alimentos (INFO SAN, 2008).

En Europa, a raíz de las conclusiones de diversos informes y dictámenes científicos, se ha adoptado una decisión que establece una serie de normas detalladas para la vigilancia y la notificación de la resistencia a los antibióticos en bacterias zoonóticas (*Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*) y comensales (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*). El objetivo es llevar a cabo un seguimiento armonizado a partir de muestras de animales destinados a la producción de alimentos así como directamente de distintos alimentos, dando prioridad a los más implicados desde el punto de vista de la salud pública. (Decisión 2013/652/UE)

## **2.5 *Listeria* spp. y Listeriosis**

En las últimas tres décadas, la listeriosis se ha convertido en los países desarrollados en una de las principales zoonosis emergentes de transmisión alimentaria. Según indica el último informe de fuentes y tendencias de zoonosis y agentes zoonóticos de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2013), en el 2011 se confirmaron en la Unión Europea 1476 casos de listeriosis en humanos. En ese mismo año, había tenido lugar 3 brotes de listeriosis de origen alimentario. Uno de ellos, fue un brote en el hogar que afectó a 11 personas, todas fueron hospitalizadas y de todas ellas, 4 fallecieron. El alimento vehículo identificado fue un queso de elaboración casera. Los otros dos brotes de listeriosis afectaron a 5 personas en total, (todas fueron hospitalizadas) y fueron vinculadas a productos de panadería y mezcla de alimentos (EFSA 2013).

El género *Listeria* comprende un grupo de bacterias Gram positivas que lo forman diez especies, aunque es *Listeria monocytogenes* la única especie patógena para el hombre, responsable de producir listeriosis.

*Listeria spp.* está ampliamente extendida en el ambiente, especialmente en el suelo, plantas y forrajes, aunque también se puede encontrar en personas y animales (domésticos y salvajes). La principal vía de transmisión a los seres humanos y los animales es a través del consumo de alimentos y piensos contaminados respectivamente, (el 99% de las infecciones por *Listeria* son atribuidas a la ingestión de alimentos contaminados, Ruiz Bolívar *et al.*, 2008). También se puede transmitir directamente del animal a las personas así como de persona a persona, aunque estos casos son menos frecuentes. Este microorganismo se caracteriza por la capacidad que tiene de multiplicarse a temperaturas de refrigeración 2-4°C, lo que hace vulnerables aquellos alimentos listos para el consumo así como los que presentan una larga vida útil (fiambres y productos cárnicos, quesos blandos, pescados ahumados...).

La listeriosis afecta principalmente a personas vulnerables como son inmunodeprimidos, personas mayores, embarazadas y recién nacidos. Los síntomas varían desde una leve diarrea a graves infecciones caracterizadas por septicemia y meningoencefalitis pudiendo causar la muerte (OIE, 2004; OMS, 2004).

Aunque es una enfermedad relativamente poco común, su gravedad y el hecho de que esté muy fuertemente asociada a alimentos, la sitúan actualmente entre las enfermedades transmitidas por alimentos de mayor relevancia social y económica.

De todas las zoonosis bajo vigilancia en la Unión Europea, listeriosis fue la enfermedad más severa con un 93,6% de casos hospitalizados y 134 fallecidos (tasa de mortalidad 12,7%) (EFSA 2013).

Actualmente, el tratamiento de referencia para la listeriosis se basa en una asociación sinérgica de altas dosis de aminopenicilinas (ampicilina o amoxicilina) y gentamicina, aunque la rifampicina, vancomicina, Linezolid, y carbapenemes se han propuesto como posibles alternativas, también trimetoprim es generalmente utilizado en caso de intolerancia a los beta-lactámicos (Morvan *et al.*, 2010).

### 2.5.1 Resistencia a antibióticos en *Listeria spp.* aislada de alimentos

Ya desde 1988, numerosos estudios han revelado la existencia de cepas de *Listeria spp.* aisladas de humanos, cadenas de producción de alimentos o del medio ambiente resistentes a uno o más antibióticos mediante test “*in vitro*” (Morvan *et al.*, 2010).

Años antes, ya se habían publicado trabajos acerca de plásmidos móviles en este género (Pérez-Díaz J.C. *et al.*, 1982), pero fue con la aparición de estas cepas multirresistentes, cuando se empezó a estudiar la transferencia de elementos móviles que codifican resistencia a varios antibióticos (Vicente M.F. *et al.*, 1988).

De hecho, varios trabajos, muestran que esta transferencia horizontal de material genético es relativamente común, y no solo entre especies de *Listeria* sino también con otras bacterias Gram-positivas relacionadas evolutivamente como *Enterococcus spp.* o *Streptococcus spp.* (Poyart-Salmeron *et al.* 1990, Slade *et al.*, 1990, Facinelli *et al.* 1991, Roberts *et al.*, 1996, Tsakaris *et al.*, 1997, Charpentier *et al.*, 1999).

Con el paso de los años, se han descritos varios tipos de plásmidos y transposones así como diversos genes que codifican resistencia a antibióticos; sobre todo a tetraciclinas, puesto que es la resistencia más frecuente en *Listeria monocytogenes* aislada de humanos (Charpentier *et al.*, 1999).

Existen numerosos estudios acerca de la sensibilidad y resistencia “*in vitro*” a antibióticos como clindamicina o eritromicina, pero sólo un número limitado de trabajos se han centrado en los determinantes genéticos de resistencia a Macrólidos y Lincosamidas en *Listeria spp.*, especialmente en aislados no humanos.

En 1996 se describió por primera vez el gen *erm C* en cepas de *L. innocua* y *L. monocytogenes* aisladas de alimentos que presentaron un MIC de eritromicina elevado (256 mg/ml) (Roberts *et al.* 1996).

En 2005, se realizó un estudio de genes de resistencia en cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas del ambiente de 4 granjas de vacuno lechero, en las que se analizó el gen *erm B* como determinante genético de resistencia a eritromicina. Todas las cepas analizadas eran susceptibles a este antibiótico, y ninguna presentó este gen (Srinivasan *et al.*, 2005).

En otro estudio llevado a cabo entre 1996 y 2006, en cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de alimentos y medio ambiente en Francia, se detectó el gen

*erm B* en las dos únicas cepas que presentaron resistencia a eritromicina “*in vitro*”. En este mismo estudio también se analizó la presencia de los genes *erm A*, *erm C*, *erm TR*, *mef A* y *msr A*, pero ninguno fue detectado (Granier *et al.*, 2011).

Aunque la resistencia adquirida en cepas de *Listeria* spp. no implica antibióticos clínicamente importantes, la posibilidad de transferencia de genes de resistencia en este género tan ubicuitario, refuerzan la necesidad de una vigilancia epidemiológica de los patrones de resistencia.

Además, siendo que la listeriosis es una enfermedad con tasas de hospitalización muy elevadas, es conveniente llevar a cabo una vigilancia continuada de la resistencia emergente de este patógeno, para así poder contribuir a la garantía de seguridad en el tratamiento eficaz de la listeriosis humana, sobre todo en los casos en los que la resistencia puede estar enmascarada.

### 3 OBJETIVOS

---

- 3.1 Optimización del método PCR a tiempo real para la detección de determinantes genéticos de resistencia a Macrólidos y Lincosamidas en bacterias Gram positivas.
- 3.2 Evaluación de la aplicación de la técnica PCR a tiempo real para el diagnóstico rápido de resistencia a Macrólidos y Lincosamidas
- 3.3 Caracterización genética de la resistencia a clindamicina en cepas de *Listeria spp.* aisladas de alimentos.

## 4 MATERIAL Y MÉTODOS

El material utilizado en este trabajo aparece reseñado con cada una de las metodologías utilizadas.

### 4.1 Cepas bacterianas

#### 4.1.1 Cepas de referencia

Para la detección de los genes de resistencia a Macrólidos (eritromicina) y Lincosamidas (clindamicina), se han utilizado 5 cepas bacterianas: 3 *Staphylococcus aureus*, 1 *Staphylococcus pseudintermedius* y 1 *Streptococcus agalactiae*, cedidas amablemente por la Dra. Carmen Torres, del área de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad de la Rioja, y que contienen los siguientes genes de resistencia:

Tabla 2: Cepas de referencia, genes y resistencia antibiótica

CEPA BACTERIANA	GEN	ANTIBIOTICO RESISTENTE
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>mef A</i>	-Eritromicina
<i>Staphylococcus aureus C2548</i>	<i>erm A</i>	-Eritromicina -Inducción a Clindamicina
<i>Staphylococcus pseudintermedius C2381</i>	<i>erm B</i>	-Eritromicina -Inducción a Clindamicina
<i>Staphylococcus aureus C2929</i>	<i>msr A</i>	-Eritromicina
<i>Staphylococcus aureus C5425</i>	<i>Inu A</i>	-Clindamicina

Estas cepas fueron enviadas en diferentes medios de cultivo: Agar Mueller Hinton y Mueller Hinton suplementado con 5% de sangre desfribinada.

Una vez en nuestro laboratorio, se procedió a su revivificación e identificación bioquímica del siguiente modo:

1) Resuspensión de una colonia en 10 ml de caldo BHI (Brain Heart Infusion, MERCK) estéril, homogeneización e incubación a 37°C 12-24 horas.

2) Homogeneización de los tubos BHI incubados y siembra por agotamiento en TSA (Trypticase Soy Agar, OXOID) e incubación a 37°C 12-24 horas.

A partir de una colonia, se realizó la identificación mediante la galería API 20 strep y API Staph (Biomerieux®), que permiten hacer una identificación bioquímica de especies de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus*.

Estas cepas fueron conservadas en congelación, en viales de criocongelación a -80 °C (Vibackstore S.L.), compuestos por bolitas de vidrio poroso y de líquido criogénico. Estas bolitas facilitan la adherencia de los microorganismos y aseguran la supervivencia del máximo número de bacterias posibles durante su conservación a temperatura de congelación.

#### 4.1.2 Cepas de *Listeria spp.* estudiadas

Para la realización del estudio genético de antibiorresistencia, se han utilizado 23 cepas de *Listeria spp.*, 5 identificadas como *L. monocytogenes* y 18 como *L. innocua*, aisladas previamente de diferentes grupos de alimentos (productos cárnicos: longaniza fresca, semicurada y curada y productos lácteos: queso fresco y madurado).

Estas cepas fueron analizadas en estudios previos para determinar el patrón de sensibilidad y resistencia “*in vitro*” y se han conservado en crioviales a -80°C hasta el momento de su análisis.

En la siguiente tabla se muestran los resultados del estudio de sensibilidad a eritromicina y clindamicina determinados mediante el test de microdilución en placa; método que permite establecer el patrón de sensibilidad y resistencia en función de la Cantidad Mínima Inhibitoria (MIC).

**Tabla 3: Susceptibilidad y Concentración mínima inhibitoria de eritromicina y clindamicina en las cepas de *Listeria spp.* analizadas**

	CEPA	CLINDAMICINA		ERITROMICINA	
		MIC	SUSCEPTIBILIDAD	MIC	SUSCEPTIBILIDAD
<i>L. innocua</i>	1	8	RESISTENTE	0,5	SENSIBLE
<i>L. innocua</i>	2	8	RESISTENTE	0,5	SENSIBLE
<i>L. monocytogenes</i>	3	8	RESISTENTE	0,5	SENSIBLE
<i>L. innocua</i>	5	8	RESISTENTE	0,25	SENSIBLE
<i>L. innocua</i>	8	16	RESISTENTE	1	INTERMEDIA
<i>L. monocytogenes</i>	9	16	RESISTENTE	0,25	SENSIBLE
<i>L. innocua</i>	11	16	RESISTENTE	4	INTERMEDIA
<i>L. innocua</i>	12	8	RESISTENTE	4	INTERMEDIA
<i>L. innocua</i>	13	16	RESISTENTE	2, 4	INTERMEDIA
<i>L. innocua</i>	16	8	RESISTENTE	2	INTERMEDIA
<i>L. innocua</i>	17	8	RESISTENTE	2	INTERMEDIA
<i>L. innocua</i>	18	8	RESISTENTE	2	INTERMEDIA

<i>L. innocua</i>	19	16	RESISTENTE	2	INTERMEDIA
<i>L.monocytogenes</i>	22	8	RESISTENTE	2	INTERMEDIA
<i>L.monocytogenes</i>	23	8	RESISTENTE	2	INTERMEDIA
<i>L. innocua</i>	14	8	RESISTENTE	2	INTERMEDIA
<i>L.monocytogenes</i>	25	4	RESISTENTE	2	INTERMEDIA
<i>L. innocua</i>	27	8	RESISTENTE	2	INTERMEDIA
<i>L. innocua</i>	66	16	RESISTENTE	0,25	SENSIBLE
<i>L. innocua</i>	68	8	RESISTENTE	1	INTERMEDIA
<i>L. innocua</i>	70	8	RESISTENTE	0,5	SENSIBLE
<i>L. innocua</i>	71	8	RESISTENTE	0,5	SENSIBLE
<i>L. innocua</i>	72	8	RESISTENTE	0,5	SENSIBLE

#### 4.1.3 Revivificación

Para la revivificación de todas las cepas incluidas en este estudio y preparación de las muestras para la extracción del ADN se han seguido los siguientes pasos:

- De cada uno de los crioviales, se pasa una bolita, en condiciones de esterilidad a un tubo con 10ml de caldo BHI previamente esterilizado. Se homogeneíza en rotatubos y se incuba a 37°C durante 24 horas.
- Pasado este tiempo se homogeneíza el tubo y se siembra en superficie por agotamiento en medio TSA y se incuba a 37°C durante 24 horas para obtener un cultivo puro.
- Por último se siembra una colonia de cada una de las placas identificadas en un tubo con 10 ml de BHI y se incuba a 37°C entre 10/12 horas (overnight), con el fin de alcanzar la fase estacionaria del crecimiento bacteriano.

#### 4.2 Test de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana y test de Inducción “*in vitro*”

Este paso se llevó a cabo en las 5 cepas de referencia con el fin de corroborar la relación entre el fenotipo obtenido tras el test “*in vitro*”, con los resultados obtenidos en la caracterización genética.

#### **4.2.1 Antibióticos ensayados**

Hemos utilizado los sensidiscos (Biodisc, Oxoid) con una carga de 15µg de eritromicina y 2µg de clindamicina respectivamente.

#### **4.2.2 Test de difusión en disco**

- i. Test de susceptibilidad antimicrobiana
- ii. Test de inducción

Se ha llevado a cabo el test de susceptibilidad antimicrobiana con el objetivo de evaluar la actividad “in vitro” de los antibióticos ensayados, así como el test de inducción o también denominado D-test, para el estudio de la resistencia inducible a clindamicina por la presencia de eritromicina.

Para ello, se ha seguido el método de referencia para difusión en disco recomendado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio Clínico (CLSI, 2011) y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST, 2011).

#### **4.2.3 Protocolo**

##### **i. Preparación del medio de cultivo y del inóculo**

El medio de cultivo para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos ha sido Agar Mueller-Hinton (Oxoid), suplementado con 5% de sangre desfibrinada de caballo (Oxoid).

Para la preparación del inóculo, se seleccionan al menos 3 colonias bien aisladas y del mismo tipo de morfología del agar de cultivo TSA. Estas colonias se transfieren a un tubo estéril de 10ml de caldo BHI y se incuban a temperatura de 30-37°C durante una noche.

##### **ii. Estandarización del inóculo**

Es necesario seguir el método de suspensión directa de colonias para obtener una densidad de 0,5 de la escala de McFarland que se corresponde aproximadamente con  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml. Un inóculo más denso podrá dar lugar a halos de inhibición más

pequeños y un inóculo más diluido tendrá el efecto contrario. Así pues, tras las 12 horas de incubación de los tubos de 10ml de BHI, se procede al ajuste de la densidad de la suspensión.

- En primer lugar se transfiere 0,5 ml de nuestro inóculo en un tubo con 10 ml de caldo BHI estéril

- A continuación, vamos ajustando la densidad de la suspensión, añadiendo poco a poco más cantidad del microorganismo y utilizando como referencia un estándar equivalente al 0,5 de la escala McFarland. En este paso es importante agitar la suspensión estándar en un agitador vortex antes de utilizarla, así como nuestro inóculo.

La suspensión debe ser utilizada en los 15 minutos siguientes a su preparación y siempre dentro de los 60 minutos.

### **iii. Siembra en placa**

Tras haber ajustado la densidad de cada inóculo, se introduce un hisopo estéril en la suspensión y se siembran las placas de agar Mueller-Hinton por extensión con el hisopo sobre toda la superficie.

Este procedimiento es repetido realizando estrías muy próximas hasta tres veces girando la placa 60º cada vez, para asegurar una distribución constante del inóculo. Como paso final se pasa sobre los bordes del agar.

### **iv. Aplicación de los discos de antibiótico**

Tras haber sembrado las placas, se colocan los discos de antibiótico estudiados con ayuda de unas pinzas estériles sobre la superficie del agar.

Para el estudio individual de antibiorresistencia de Eritromicina y Clindamicina, colocamos cada sensidico en placas diferentes previamente sembradas con el microorganismo que queremos estudiar.

Para la realización del D-test, se coloca un disco de Eritromicina y otro de Clindamicina separados a una distancia de 15 a 20 mm sobre la superficie de la placa inoculada.

En ambos casos cada disco debe ser presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar.

A continuación se incuban las placas durante 24 horas a 37 °C

#### v. Lectura e interpretación de resultados

Para la determinación de la resistencia o sensibilidad de las cepas a cada antibiótico, se mide el diámetro del halo de inhibición en milímetros con un pie de rey, incluyendo el diámetro del disco.

Es necesario comprobar que la placa ha tenido un correcto crecimiento bacteriano y que las zonas de inhibición resultantes son uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento.

Las medidas de los halos de inhibición son interpretadas siguiendo las recomendaciones del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST, 2013). Aunque también se tuvieron en cuenta otros organismos como el Comité del Antibiograma de la Sociedad Francesa de Microbiología (CA-SFM, 2011), y el Instituto de Estándares Clínico y de Laboratorio (CLSI, 2011), que, pese a no ser coincidentes, si son similares.

El resultado es cualitativo y se expresa dependiendo de la medida del halo. Para ello, las cepas que tengan un halo de inhibición superior al establecido, serán sensibles, aquellas que estén por debajo serán resistentes y las que estén dentro del rango, intermedias.

En la Tabla 4 se muestran los antibióticos estudiados con la carga de antibiótico así como los criterios de referencia en cuanto al rango (mm) de sensibilidad y resistencia para todas las especies de *Staphylococcus* y *Streptococcus* según el EUCAST.

**Tabla 4. Carga de antibiótico de cada disco y valores críticos de los diámetros (mm) de la zona de inhibición según el EUCAST**

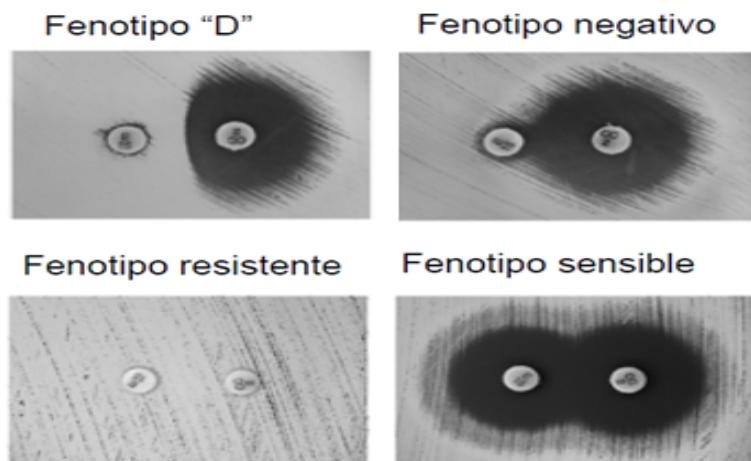
Antibiótico	Carga disco (μg)	<i>Staphylococcus</i> spp.		<i>Streptococcus</i> spp.	
		Sensible ≥	Resistente <	Sensible ≥	Resistente <
Diámetro (mm) Eritromicina	15	21	18	21	18
Diámetro (mm) Clindamicina	2	22	19	17	17

Para los resultados del D-test, se tomaron como referencia los fenotipos recomendados por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

En la tabla 5 y Figura 5, se muestran los diferentes fenotipos de resistencia en función de la forma de la zona de inhibición entre ambos discos.

**Tabla 5. Fenotipos de resistencia para los diferentes resultados del test de susceptibilidad y D-test**

Disco de ERY	Disco de CLI	D-Test	Descripción del test de inducción	Fenotipo de resistencia
R	S	-	Zonas de inhibición en la categoría "sensible" para CLI	MS <sub>B</sub>
R	S	+	Achatamiento del halo de CLI en la proximidad del disco de ERY	iMLS <sub>B</sub> (inducible)
R	R	-	No hay halos de inhibición	cMLS <sub>B</sub> (constitutivo)
S	S	-	Zonas de inhibición en la categoría "sensible" para ERY y CLI	Ninguno
S	R	-	Zonas de inhibición en la categoría "sensible" para ERY	L



**Figura 5. Fenotipos de resistencia**

#### 4.3 Aislamiento del ADN bacteriano total y plasmídico

La extracción de ADN genómico y plasmídico se puede realizar de acuerdo a las diferentes metodologías, o usando una variedad de kits de extracción de ADN disponibles en la actualidad. En nuestro caso, se han ensayado dos métodos de

extracción de ADN genómico total para la detección de genes de resistencia en las distintas cepas de referencia.

En primer lugar se utilizó el método *PrepMan<sup>®</sup> Ultra Sample Preparation Reagent Protocol* en todas las cepas; y posteriormente, se probó el método de extracción con Lisostafina y proteinasa K en aquellas pertenecientes al género *Staphylococcus*.

Por otra parte, se ha utilizado un único método de extracción para el ADN plasmídico, *Plasmid MiniPrep Kit<sup>®</sup>*.

#### **4.3.1 Protocolo de aislamiento del ADN total**

- **Método 1: Extracción con *PrepMan<sup>®</sup> Ultra***

Para la extracción de ADN se utilizó el producto comercial *PrepMan<sup>®</sup> Ultra Sample Preparation Reagent Protocol* siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (*Applied Biosystem*).

- A partir de 1 ml de cultivo bacteriano homogenizado en eppendorf estéril de 1,5 ml, se centrifuga a 13000 rpm durante 3 minutos en un equipo *Beckman coulter TM*.
- Tras la centrifugación se elimina el sobrenadante con micropipeta esteril y se añaden 200 µl de *PrepMan<sup>®</sup> Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems)*, resuspendiéndose el “pellet” cuidadosamente.
- Se homogeniza en vortex durante 30 segundos, y se mantiene a 100°C durante 10 minutos en un termoblock (*Block Heater/SBH 130/Stuart*<sup>®</sup>).
- Posteriormente se lleva a temperatura ambiente durante 2 minutos, tras lo cual se procede a una nueva centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos.
- Se recoge el sobrenadante que contiene la solución de ADN, se alicuota en eppendorf estéril de 0,2 ml marcado adecuadamente y se conserva en congelación a -20°C hasta su amplificación por PCR.

Para el control negativo de la extracción se utiliza 1 ml de caldo BHI estéril sometiéndolo al mismo proceso de extracción.

- **Método 2: Extracción con Lisostafina y Proteinasa K**

Para la extracción de ADN en cepas del género *Staphylococcus* se utilizaron varios reactivos:

- *Lysostaphin* obtenida de *Staphylococcus staphylocyticus* a una concentración de 1mg/ml (Sigma-Aldrich®)
- Proteinasa K a una concentración de 2mg/ml (Bioron®).
- Tampón Tris-HCl 0,1M pH8.
- Agua miliQ estéril.

El protocolo llevado a cabo, fue el recomendado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica para *Staphylococcus* spp.

A partir de una colonia aislada en medio TSA, se resuspende en un eppendorf estéril de 1,5ml con 45μl de agua miliQ y 5μl de lisostafina.

- Se homogeneiza en vortex para dejar incubando a 37°C durante 10 minutos en un termoblock (*Block Heater/SBH 130/Stuart*®).
- Posteriormente se añaden 45μl de agua miliQ, 5μl de proteinasa K y 150μl de Tris-HCl.
- Se homogeneiza en vortex y se incuba a 60°C durante 10 minutos y posteriormente a 100°C durante 5 minutos en el termoblock.
- Tras la incubación, se centrifuga a 12000rpm durante 3 minutos en un equipo *Beckman coulter*™.
- Por último, se recoge el sobrenadante, (aproximadamente 200μl) en un eppendorf estéril de 0.2ml marcado adecuadamente. Esta solución de ADN se conserva en congelación a -20°C hasta su amplificación por PCR.

Para el control negativo de la extracción se realiza el mismo procedimiento sin resuspender ninguna colonia en el primer paso.

#### **4.3.2 Protocolo de aislamiento del ADN plasmídico**

Para la extracción de ADN plasmídico se empleó el kit *comercial Plasmid MiniPrep Kit*® que incluye los siguientes componentes:

- Buffer Resuspensión (contiene RNase)
- Lysis Solución
- Binding Solución
- Wash Solución
- Buffer elución
- Micro spin columns

- Tubos de elución (1,7ml)

El protocolo que se ha seguido, es el recomendado por el fabricante (*Norgen Biotek Corporation*):

- A partir de 1,5ml de cultivo bacteriano homogeneizado en eppendorf estéril de 1,5ml, se centrifuga a 14000rpm durante 30 segundos en un equipo *Beckman coulter TM*.
- Tras la centrifugación, se elimina el sobrenadante cuidadosamente con micropipeta estéril y se añaden 200μl del buffer para resuspender el pellet.
- Se homogeneíza en vortex y se deja a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Se añaden 250μl de lysis Solución que permite la lisis de las células bacterianas y se mezcla el contenido por inversión de los tubos sin usar vortex. En este paso la solución debe quedar clara y viscosa y no se debe sobrepasar los 5 minutos ya que el ADN puede desnaturizarse.
- Posteriormente se añaden 350μl de binding Solución, y se mezcla inmediatamente por inversión. En este paso la solución debe adquirir turbidez, y en él se produce la precipitación de las proteínas y del ADN genómico.
- Una vez mezclado el contenido, se centrifuga 10 minutos a 14000 rpm.
- El sobrenadante obtenido tras la centrifuga, se transfiere a las columnas unidas a los tubos de los que dispone el kit, y se centrifuga 1 minuto a 14000 rpm. En este paso, el ADN plasmídico se unirá a las columnas.
- El líquido que queda en el tubo tras la centrifuga se desecha y se colocan las columnas en un nuevo tubo.
- Se añaden 600μl de Wash Solución a las columnas, permitiendo limpiar nuestra solución de ADN de aquellos componentes que anteriormente han precipitado, y se centrifuga 1 minuto a 14000rpm.
- El líquido que queda en el tubo se desecha y se vuelve a centrifugar la columna en el mismo tubo durante 2 minutos a 14000rpm.
- Finalmente se desecha el tubo con el líquido centrifugado y se guarda la columna junto con el tubo de elución (1.7ml) que incluye el kit.

- La elución del ADN que se encuentra en la columna se realiza añadiendo 50 $\mu$ l de buffer elución al centro de la columna evitando tocar la pared y se deja 1 minuto a temperatura ambiente.
- Se centrifuga la columna junto con el tubo de elución 2 minutos a 14000rpm.
- El sobrenadante se recoge en un eppendorf estéril de 0.2ml marcado adecuadamente. Esta solución de ADN se conserva en congelación a -20°C hasta su amplificación por PCR.

Para el control negativo de la extracción se utiliza 1,5 ml de caldo BHI estéril sometiéndolo al mismo proceso de extracción.

#### **4.3.3 Evaluación por espectrofotometría del ADN bacteriano aislado**

Una vez extraído el ADN, se mide su concentración y pureza en un espectofotómetro *NanoDrop™ 2000 UV-Vis* que utiliza una fracción mínima de la cantidad de muestra. Los resultados de la absorbancia se analizan con el software *Nanodrop 2000/2000c Versión 1.3.1*.

Antes de iniciar la lectura de las muestras, es necesario calibrar el equipo. Para ello se limpia el pedestal (punto de medición) con agua milliQ y papel y se cargan 2  $\mu$ l de agua milliQ para que sean medidos. Como blanco, se emplea el buffer donde se encuentra el ADN para cada método:

- Método 1: *PrepMan® Ultra Sample Reagent*
- Método 2: Tris HCl 0,1M pH 8
- Extracción ADN plasmídico: Buffer elución.

El protocolo seguido para medir la absorbancia consistió en agregar un volumen de 2  $\mu$ l de solución de ADN bien homogeneizada con micropipeta, en el pedestal del nanodrop, repitiendo el procedimiento para cada muestra.

La concentración del ADN viene expresada en  $\mu$ g/ml, y su cuantificación se ha realizado midiendo la absorbancia a 260 nm (absorbancia máxima del ADN).

$$[\text{ADN}] \text{ } \mu\text{g/ml} = A_{260} \times 50 \times \text{Factor Dilución}$$

Teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia (UA) corresponde aproximadamente a 50  $\mu$ g/ml de ADN de doble cadena.

La pureza de la muestra se determinó a partir de la relación A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>. La calidad óptima de ADN tiene lugar cuando esta relación se encuentra entre 1,7-2,0. Valores por encima de 2,0 indican contaminación con ARN; mientras que, resultados por debajo de 1,7, indican contaminación con proteínas u otros contaminantes que absorben fuertemente cerca de los 280nm.

#### 4.4 Optimización de la reacción de PCR para cada uno de los genes de resistencia ensayados

##### 4.4.1 Cebadores seleccionados

Para la amplificación del ADN molde se han seleccionado las secuencias de cebadores de la bibliografía consultada, que amplifican diferentes genes de resistencia para los antibióticos objeto de estudio (eritromicina y clindamicina).

La tabla 6 muestra las secuencias de los oligonucleótidos utilizados que han sido obtenidas de la bibliografía consultada.

Tabla 6. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes de resistencia

GEN	SECUENCIA	pb <sup>1</sup>	FUENTE
<b><i>mef A</i></b> ( <i>Macrolide Efflux</i> )	(F) AGTATCATTAATCACTAGTGC (R) TTCTTCTGGTACTAAAGTGG	345	-Morvan <i>et al.</i> , 2010
<b><i>msr A</i></b> ( <i>Macrolide Streptogramin Resistance</i> )	(F) GCAAATGGTAGGTAAAGACAAC (R) ATCATGTGATGTAAACAAAT	401	-Morvan <i>et al.</i> , 2010
<b><i>erm A</i></b> ( <i>Erytromycin Ribosome Methylase</i> )	(F) CTTCGATAGTTTATTAAATTAGT (R) TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA	645	-Morvan <i>et al.</i> , 2010
<b><i>erm B</i></b> ( <i>Erytromycin Ribosome Methylase</i> )	(F) GAAAAGGTACTCAACCAAATA (R) AGTAACGGTACTAAATTGTTAC	636	-Morvan <i>et al.</i> , 2010
<b><i>Inu A</i></b> ( <i>Lincomycin Nucleotidyl-tranferasa</i> )	(F) GGTGGCTGGGGGTAGATGTATTAAGTGG (R) GCTTCTTTGAAATACATGGTATTTCGATC	323	-Lina <i>et al.</i> , 1999.

<sup>1</sup>pb: pares de bases

##### 4.4.2 Protocolo PCR

Para la amplificación del ADN diana mediante la reacción en cadena de la polimerasa, se preparó una mezcla de reacción en un volumen final de 25 µl, en la que se incluyen:

- 12,5  $\mu$ l de FastStart SYBR Green Master (*Roche Applied Science*)
- 0,5  $\mu$ l de cada uno de los cebadores (reverso e inverso)
- 9  $\mu$ l de agua milliQ estéril
- 2,5  $\mu$ l de solución de ADN diana.

La concentración óptima de cada grupo de cebadores y de ADN molde, fue establecida experimentalmente.

Para comenzar con la reacción de amplificación es necesario realizar el cálculo del volumen correspondiente para el número de reacciones que van a tener lugar, incluyendo controles negativos tanto de la extracción de ADN, como de la PCR.

A continuación se mezclan todos los componentes de la reacción para obtener un "master mix" en un eppendorf estéril de 1,5ml, y posteriormente se distribuyen 22,5 $\mu$ l en cada tubo de reacción. Se utilizaron tiras de 8 tubos de 0.2ml específicos para PCR a tiempo real, con tapa óptica (*Ibian*<sup>®</sup>).

El ADN diana se adiciona en el último momento a cada tubo preparado y se homogeneíza en vortex. En el caso del control negativo de la PCR, se incluye agua milliQ estéril.

Este proceso se lleva a cabo en una cabina de flujo laminar vertical (*Mini-V/PCR, Telstar*). Una vez preparados todos los tubos, se colocan en el termociclador previamente programado.

La amplificación se lleva a cabo en un Termociclador de ADN (*Mini Opticon<sup>TM</sup> Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad*), con un programa de proceso optimizado experimentalmente para cada grupo de cebadores objeto de estudio.

Para evitar la formación de productos inespecíficos durante el tiempo que se tarda en preparar la reacción antes de poner los tubos en el termociclador y durante el primer ciclo de calentamiento, se ha utilizado el protocolo "Hot Start". En este protocolo, la enzima taq polimerasa está desactivada, por lo que el programa por defecto comienza con el calentamiento a 94°C durante 5 minutos que permite la activación de ésta. Un calentamiento equivocado en este paso, puede resultar en un fracaso para la técnica de PCR.

Posteriormente comienza el ciclo de reacciones caracterizado por los pasos de:

- Desnaturalización a 94°C durante 1 min

- Hibridación = gradiente de 50 a 65ºC durante 1 minuto, en este paso la Tº ha sido ensayada experimentalmente.
- Extensión a 72ºC durante 2 min.

Este ciclo se repite 35 veces, dando lugar a  $2^{35}$  copias de la región de ADN que deseamos amplificar siempre y cuando la reacción se realice en las condiciones más óptimas.

Finalmente tiene lugar una incubación adicional durante 10 min a 72ºC para completar la extensión del cebador después del último ciclo. El último paso, es la llamada “melting curve” donde se incrementa la temperatura de 50ºC a 95ºC con lectura cada 0,5ºC durante 2 segundos. En este paso se obtiene la temperatura de fusión (Tm), a la que se desnaturaliza el 50% del ADN.

#### 4.4.3 Optimización de las condiciones de amplificación para cada grupo de cebadores

La temperatura de hibridación, la concentración de oligonucleótidos y la concentración de ADN molde para cada grupo de cebadores se ha determinado experimentalmente.

Para evaluar la concentración de cada cebador en la reacción se han ensayado tres concentraciones diferentes, 1  $\mu$ M, 0,4  $\mu$ M y 0,2  $\mu$ M.

Los cebadores adquiridos (TIB MOLBIOL) vienen deshidratados, por lo que ha sido necesario resuspender cada uno en agua milliQ al volumen señalado por el fabricante, para obtener la concentración de 100 $\mu$ M.

A partir de aquí, se han hecho alícuotas de cada cebador a diferentes concentraciones como se puede observar en la siguiente tabla.

Tabla 7. Diluciones realizadas para cada concentración ensayada.

Concentración inicial	Dilución	Relación cebador + agua milliQ	Concentración final	Concentración en la reacción (25 $\mu$ l)
100 $\mu$ M	1:2	7,5 $\mu$ l cebador + 7,5 $\mu$ l agua milliQ	50 $\mu$ M	1 $\mu$ M
	1:5	3 $\mu$ l cebador + 12 $\mu$ l agua milliQ	20 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M
	1:10	1,5 $\mu$ l cebador + 13,5 $\mu$ l agua milliQ	10 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M

La temperatura óptima de hibridación para cada grupo de cebadores se ha determinado con la ayuda de la herramienta *Gradient calculator* del programa *Supports Opticon Monitor™ Version 3.1*.

El rango de temperatura de hibridación ensayado para cada grupo de cebadores fue en función de la temperatura sugerida por el fabricante (tabla 8).

Para la selección de los valores óptimos de temperatura de hibridación y concentración de cebadores se ha utilizado el criterio de mayor producto final (*Endpoint*), menor valor de Ct (*Threshold cycle*) y no formación de productos inespecíficos.

**Tabla 8. Temperaturas recomendadas para cada grupo de cebadores y rango ensayado.**

		<i>mef A</i>	<i>msr A</i>	<i>erm B</i>	<i>erm A</i>	<i>Inu A</i>
<i>Tº sugerida</i>	Forward	51,4°C	64°C	56,6°C	55,2°C	72,1°C
	Reverse	57,3°C	54,1°C	57,8°C	52,1°C	69,9°C
Rango ensayado		<b>50-60°C</b>	<b>55-65°C</b>	<b>50-60°C</b>	<b>50-60°C</b>	<b>50-60°C</b>

Para evaluar la eficiencia de la amplificación (capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de ADN o ADNc en cada ciclo) se han calculado las eficiencias a partir de la pendiente de la curva estándar obtenida después de realizar diluciones seriadas del ADN molde de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$E=10^{[-1/\text{pendiente}]}-1$$

Así mismo se evaluó el intervalo dinámico y el coeficiente de correlación lineal  $r^2$  de la curva estándar obtenida.

Los intervalos de concentraciones de ADN ensayadas fueron diluciones seriadas de 1/2 a partir del ADN aislado.

#### **4.4.4 Evaluación de la especificidad de los cebadores seleccionados: curva de fusión**

Cada sistema de PCR optimizado se ha aplicado a todas las cepas de referencia para comprobar su sensibilidad y especificidad. El producto amplificado de cada una de ellas se evaluó mediante el análisis de la curva de fusión programada al final del proceso de amplificación.

En este paso, la caída de la fluorescencia indica la desnaturización del 50% del producto final, que difiere en función de la secuencia. Este paso, permite diferenciar los fragmentos de ADN amplificado, en función de la temperatura de fusión (Tm) a la que éste se desnaturiza.

## 4.5 Detección del producto amplificado

### 4.5.1 PCR convencional

Las condiciones de amplificación optimizadas, han sido utilizadas para la amplificación del ADN aislado de cultivo puro de cada una de las cepas de referencia mediante PCR convencional.

En este caso, a diferencia de la PCR a tiempo real, se usan 12,5  $\mu$ l de FastStart Taqman® Probe Master (*Roche Applied Science*) y el protocolo incluye los mismos pasos a excepción de la desnaturación final (melting curve).

En cada ensayo se incluyen control negativo de la extracción y control negativo de la PCR (agua milliQ estéril).

El producto amplificado fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm de acuerdo con el protocolo previamente descrito y mantenidos a -20°C hasta su análisis por electroforesis horizontal en gel de agarosa.

### 4.5.2 Electroforesis horizontal en gel de agarosa

Después de la amplificación del ADN mediante PCR convencional, se verificó el amplicón generado para cada gen y su peso (pb) mediante electroforesis en gel de agarosa.

La electroforesis se realiza en geles de agarosa de separación hasta 1500 pares de bases en una cubeta de electroforesis (*Wide-mini Subcell GT base, Bio-Rad*). Se ha utilizado una fuente de alimentación (*PowerPac Basic Power Supply 100-120/220V, Bio-Rad*).

Las muestras de ADN almacenadas en congelación a -20°C se prepararan en el momento previo a la carga en el gel de agarosa.

#### i. Preparación del gel

Se disuelven 1,5 gr. de agarosa, (*Molecular Biology Grade, Bioron*), en 100ml de Buffer TBE 1x (tampón tris Borato EDTA 10x diluido, Bio-Rad) con una concentración final de 1,5%. El preparado se calienta con un hornillo eléctrico hasta llevar a su punto de ebullición y se deja enfriar.

Una vez atemperado a 65ºC, se vierte en el molde y se deja polimerizar la agarosa a temperatura ambiente. Posteriormente, se agrega el buffer de electroforesis TBE 1x en la cubeta y se vierte el gel de agarosa de tal manera que quede cubierto con el buffer, y que los pocillos queden situados próximos al cátodo. Todos los geles de electroforesis utilizados son de 10 cm x 15 cm x 1cm y con capacidad para 15-20 muestras.

#### **ii. Carga de las muestras**

En un segmento de lámina de parafina se coloca 1 $\mu$ l de tinte de carga (Gel Loading Buffer II 2x, *Bioron*), por cada muestra que vamos a cargar. Cada una de las muestras de ADN se mezcla con el tinte en proporción 5:1 (v/v), mezclando 5 $\mu$ l de ADN con 1 $\mu$ l de tinte.

Posteriormente se carga cada muestra preparada en cada uno de los pocillos del gel, dejando el pocillo central libre para cargar en último lugar 7 $\mu$ l del marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder, *Bioron*), que nos permite determinar el tamaño de los amplicones de ADN entre 100 y 1000 bp.

#### **iii. Preparación de la cubeta de electroforesis**

Posteriormente se prepara la cubeta de electroforesis y se programa la fuente con un voltaje de 90V de acuerdo al peso molecular de nuestras secuencias de ADN amplificadas (entre 300 y 700pb). El tiempo de electroforesis fue de entre 30 y 40 minutos de acuerdo a la posición adoptada por el indicador de azul de bromofenol/xylene cianol.

#### **iv. Tinción y visualización del gel en transiluminador de luz UV**

Finalizada la electroforesis, se desensambla el gel y se tiñe en una solución de SYBR Green 10.000x (Sigma). Para ello se diluyen 40 $\mu$ l de SYBR Green en 400ml de tampón TBE 1x obteniendo una concentración final de 1x en la que se sumerge el gel durante 40 minutos en agitación constante. Las bandas se visualizan bajo luz ultravioleta en un analizador de imágenes *Gel Doc 2000* (BIO-RAD) empleando el software de adquisición de imágenes *Quantity One v.4.4.0*, Bio-Rad.

#### 4.5.3 Purificación del ADN amplificado

Una vez confirmada la amplificación de los genes estudiados, es necesario realizar su purificación para eliminar los restos celulares y proteínas que disminuyen la calidad del ADN e interfieren en el proceso de secuenciación.

Para ello, debemos elegir aquella dilución de ADN de cada amplicón, que amplificada mediante PCR a tiempo real, nos haya dado mayor cantidad de producto final. De esta manera, estaremos seguros que la amplificación mediante PCR convencional dará cantidades suficientes de ADN, que una vez purificado, se pueda ser secuenciado.

Para la purificación, se empleó el kit comercial *Dye Cleanup IBIAN®* que incluye los siguientes componentes:

- Buffer Binding
- Spin filter
- Tubos eppendorf 1,5 y 2ml (Receiver tuve)
- Buffer Elución

El protocolo que se ha seguido, es el recomendado por el fabricante:

- En primer lugar, se pipetean 250 $\mu$ l de Buffer binding con 20  $\mu$ l del producto amplificado que se desea purificar en un tubo eppendorf estéril de 1.5ml y se homogeneíza con micropipeta o vortex.
- Se colocan los filtros que incluye el kit, en tubos eppendorf de 2 ml y se transfiere la mezcla, para centrifugarse a 12000 rpm durante 3 minutos en un equipo *Beckman coulter TM*.
- Una vez centrifugado, se saca el filtro y se coloca sin invertir en un nuevo eppendorf de 1,5ml.
- Se pipetean 20  $\mu$ l de Buffer de elución directamente en el centro del filtro, y se deja incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
- Posteriormente se centrifugar a 10000 rpm durante 1 minuto.
- Por último, se desecha el filtro, y el sobrenadante se marca adecuadamente.

Esta solución contiene el ADN purificado, por lo que se lee la absorbancia con el espectrofotómetro a 260 nm y se anota, ya que será la concentración que se enviará a secuenciar. Para su conservación, se almacena en congelación a -20ºC.

En este paso, también es necesario realizar una electroforesis horizontal en gel de agarosa para confirmar que se ha realizado correctamente la purificación y que conservamos nuestras secuencias de ADN.

#### **4.6 Confirmación de las secuencias genéticas**

Para determinar la secuencia de bases de los fragmentos de ADN amplificados, las muestras fueron enviadas tras la purificación, al Servicio de Análisis de ADN, del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC).

Posteriormente, los resultados obtenidos se comparan con la base de datos *online* del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) usando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Con esta herramienta, podemos comparar nuestra secuencia con otras depositadas en esta base, y así confirmar que las secuencias analizadas corresponden con los genes de resistencia objeto de estudio.

#### **4.7 Aplicación de la técnica RT-PCR optimizada para la detección del gen *Inu A* en cepas de *Listeria* spp. aisladas de alimentos.**

Los resultados previos de sensibilidad y resistencia antimicrobiana obtenidos “*in vitro*” a eritromicina y clindamicina en las 23 cepas de *Listeria* spp., muestran patrones sensibles o intermedios a eritromicina y resistencia a clindamicina; por este motivo se ha estudiado la presencia del gen *Inu A* (resistencia a Lincosamidas) por RT-PCR en dichas cepas de *Listeria*.

El ensayo se ha realizado extrayendo ADN mediante el método 1 de extracción de ADN total con *PrepMan<sup>®</sup> Ultra Sample* de cada una de las cepas de *Listeria* spp.

El ADN extraído de todas las cepas se analiza por espectrofotometría, y se diluye hasta alcanzar la concentración de ADN que se ha normalizado al evaluar el intervalo dinámico para el ADN total.

Todas las muestras de ADN de cada una de las cepas, se analizan por duplicado incluyendo un control positivo para el gen *Inu A* (*Staphylococcus aureus* C5425), un control negativo de la reacción de amplificación y un control negativo de la extracción.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Test de difusión en disco

En este estudio se evaluó la susceptibilidad de 4 cepas de *Staphylococcus* y 1 cepa de *Streptococcus* frente a los antibióticos eritromicina y clindamicina mediante el test de sensibilidad y resistencia a antimicrobianos para conocer la actividad “*in vitro*” de estos antibióticos.

Así mismo, se realizó el test de inducción (D-test), con el fin de conocer el fenotipo de resistencia de las cepas ensayadas, obteniéndose los siguientes resultados (tabla 9):

**Tabla 9. Diámetro de la zona de inhibición, resultados del test de inducción y fenotipos de resistencia en las cepas ensayadas para los antibióticos eritromicina y clindamicina**

Cepas Bacterianas	Halo ERI <sup>(1)</sup> (mm)		Halo CLI <sup>(2)</sup> (mm)		D-test	Fenotipo
<i>Streptococcus agalactiae</i> (figura 2)	17	R <sup>(3)</sup>	26	S <sup>(4)</sup>	-	<i>MS<sub>B</sub></i> <sup>(5)</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>C2548</i> (figura 3)	0	R	28	S	+	<i>iMLS<sub>B</sub></i> <sup>(6)</sup>
<i>Staphylococcus</i> <i>pseudintermedius C2381</i> (figura 4)	0	R	22	S	+	<i>iMLS<sub>B</sub></i> <sup>(6)</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>C2929</i> (figura 5)	0	R	26	S	-	<i>MS<sub>B</sub></i> <sup>(5)</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>C5425</i> (figura 6)	22	S	0	R	-	L <sup>(7)</sup>

(1) ERI: eritromicina

(2) CLI: clindamicina

(3) R: Resistente

(4) S: Sensible

(5) Fenotipo *MS<sub>B</sub>* (Macrólidos-Streptogramina B): resistencia a macrólidos y Streptogramina B y sensibilidad a Lincosamidas.

(6) Fenotipo *iMLS<sub>B</sub>* (macrolídos-Lincosamidas-Streptogramina B): resistencia a las tres categorías de antimicrobianos.

(7) Fenotipo L (Lincosamida): resistencia a Lincosamidas.

Todas las cepas a excepción, *S. aureus* C5425, presentan resistencia a eritromicina y sensibilidad a clindamicina “*in vitro*” (figura 6, 7, 8, 9 y 10), ya que los diámetros del halo de inhibición de eritromicina son inferiores a 18 mm, y los halos de inhibición de clindamicina son superiores a 22mm para las cepas de *Staphylococcus* y 17mm para la cepa de *Streptococcus* (tabla 9).

La cepa *S. aureus* C5425, muestra resistencia total a clindamicina y sensibilidad a eritromicina “*in vitro*” (figura 10), ya que no se observa halo de inhibición entorno al disco de clindamicina, y en el caso de la eritromicina el halo es superior a 21 mm (tabla 9).



Figura 6. *Streptococcus agalactiae*, A) Sensibilidad a Clindamicina B) D-test NEGATIVO, fenotipo  $MS_B$

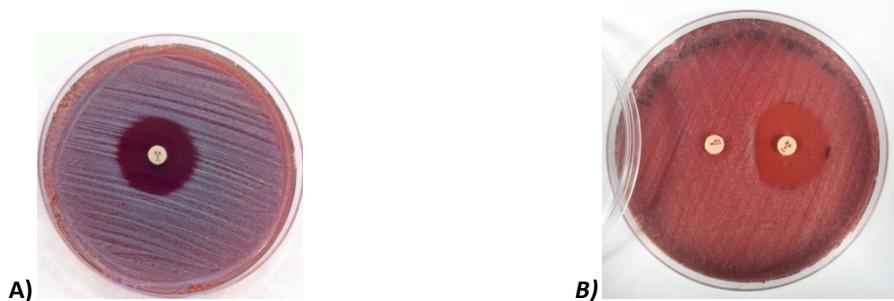


Figura 7. *Staphylococcus aureus* C2548, A) Sensibilidad a Clindamicina B) D-test POSITIVO, Resistencia inducible a Clindamicina, fenotipo  $iMLS_B$



**Figura 8. *Staphylococcus pseudintermedius* C2381, A) Sensibilidad a Clindamicina, B) D-test POSITIVO, Resistencia inducible a Clindamicina, fenotipo *iMLS<sub>B</sub>***



**Figura 9. *Staphylococcus aureus* C2929, A) Sensibilidad a Clindamicina, B) D-test NEGATIVO, fenotipo *MS<sub>B</sub>***



**Figura 10. *Staphylococcus aureus* C5425, A) Resistencia a Clindamicina, B) D-test NEGATIVO**

En cuanto a los resultados del test de inducción, sólo *S. aureus* C2548 y *S. pseudintermedius* C2381, presentan un D-test positivo y fenotipo *iMLS<sub>B</sub>* (figura 7B y 8B); es decir, en presencia de eritromicina, estas cepas son resistentes a clindamicina mientras que si se estudia la sensibilidad a clindamicina en ausencia de eritromicina, las cepas aparecen como sensibles a este antimicrobiano.

Por otra parte, las cepas *Streptococcus agalactiae* y *S. aureus* C2929 presentan un D-test negativo y fenotipo *MS<sub>B</sub>* (figura 6B y 9B); es decir, resistencia a eritromicina y sensibilidad a clindamicina independientemente de que se analicen estos antibióticos juntos o de forma individual.

Por último, la cepa *S. aureus* C5425 presenta fenotipo L (figura 10B), es decir, resistencia a Lincosamidas y susceptibilidad a Macrólidos, que aunque es inusual y raramente se detecta en cepas de origen humano, recientemente se ha visto aumentado entre cepas de *Staphylococcus* de origen animal (Lozano *et al.*, 2012).

Además, se observa que esta cepa presenta un D-test negativo, por lo que en este caso no hay inducción de clindamicina sobre eritromicina, posiblemente porque clindamicina, a diferencia de eritromicina, es un débil inductor de resistencia (Steward *et al.*, 2005).

## 5.2 Evaluación del ADN total y plasmídico aislado por espectrofotometría

En las tablas 10, 11 y 12 se muestran los valores de absorbancia obtenidos tras la lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nm, así como el cálculo del ratio  $A_{260}/A_{280}$  y la concentración estimada de ADN a partir de dichos valores para cada método de extracción ensayado.

**Tabla 10. Concentración de ADN y pureza estimada por espectrofotometría para cada cepa ensayada con el método 1 de extracción de ADN total: PrepMan® Ultra**

CEPA BACTERIANA	$A_{260}^{(1)}$	$A_{280}^{(2)}$	$A_{260}/A_{280}$	[ADN] μg/ml
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3,212	1,720	1,9	164
<i>Staphylococcus aureus</i> C2548	3,349	1,579	2,1	167
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> C2381	3,279	1,747	1,9	164
<i>Staphylococcus aureus</i> C2929	3,959	2,011	2,0	198
<i>Staphylococcus aureus</i> C5425	3,695	1,835	2,0	185

<sup>(1)</sup>  $A_{260}$  = Absorbancia a 260 nm

<sup>(2)</sup>  $A_{280}$  = Absorbancia a 280 nm

ND = No Determinado

**Tabla 11. Concentración de ADN y pureza estimada por espectrofotometría para cada cepa ensayada con el método 2 de extracción de ADN total: Lisostafina y Proteinasa K**

CEPA BACTERIANA	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	[ADN] μg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> C2548	0,723	0,416	1,7	36
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> C2381	0,308	0,175	1,8	16
<i>Staphylococcus aureus</i> C2929	0,733	0,418	1,8	367
<i>Staphylococcus aureus</i> C5425	0,215	0,118	1,8	11

En este caso, la cepa de *Streptococcus agalactiae* no ha sido extraída por este método, ya que es específico para el género *Staphylococcus*.

**Tabla 12. Concentración de ADN y pureza estimada por espectrofotometría para cada cepa ensayada con el método de extracción de ADN plasmídico**

CEPA BACTERIANA	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	[ADN] μg/ml
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,185	0,104	1,8	9
<i>Staphylococcus aureus</i> C2548	0,297	0,150	2,0	15
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> C2381	0,078	0,046	1,7	4
<i>Staphylococcus aureus</i> C2929	0,146	0,089	1,6	7
<i>Staphylococcus aureus</i> C5425	0,286	0,150	1,9	14

En todos los casos se puede observar que los ratios A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> calculados para cada método de extracción y cepa, están comprendidos aproximadamente entre 1,7 y 2,0, indicando la buena pureza del ADN extraído. También se puede ver que la cantidad de ADN extraído es suficiente para llevar a cabo la reacción de amplificación.

### 5.3 Optimización de la reacción de PCR para cada uno de los genes de resistencia ensayados:

#### 5.3.1 Optimización de la temperatura de hibridación y concentración de los cebadores en la reacción

Las tablas 13, 14, 15 16 y 17 muestran los resultados de la optimización de la temperatura de hibridación y la concentración de cada cebador en la reacción de amplificación del ADN bacteriano de las 5 cepas de referencia.

Ambos parámetros se seleccionaron en función del valor Ct menor y Endpoint mayor determinados a partir de la curva de amplificación obtenida por PCR

a tiempo real. Con estos criterios, se seleccionó la concentración 0,4  $\mu$ M para los cebadores de los genes *mef A*, *msr A*, *erm B* e *Inu A* y 1  $\mu$ M para los cebadores del gen *erm A*.

En cuanto a la temperatura de hibridación, se seleccionó 51°C en el caso del gen *erm A*, 54°C para los genes *msr A* y *erm B*, 58°C para el gen *mef A* y 59°C para el gen *Inu A*.

**Tabla 13. Gradiente de temperatura de hibridación ensayado y resultados obtenidos en la amplificación del ADN de la cepa *Streptococcus agalactiae* con los cebadores para el gen *mef A* a distintas concentraciones**

	<i>mef A</i> (1 $\mu$ M)		<i>mef A</i> (0,4 $\mu$ M)		<i>mef A</i> (0,2 $\mu$ M)	
Gradiente de temperatura (°C)	Ct <sup>(1)</sup>	Endpoint <sup>(2)</sup>	Ct <sup>(1)</sup>	Endpoint <sup>(2)</sup>	Ct <sup>(1)</sup>	Endpoint <sup>(2)</sup>
60,0	19,66	0,211	20,65	0,1993	26,77	0,1262
59,3	17,9	0,25025	18,88	0,25995	23,62	0,19685
58,0	17,62	0,29125	17,95	0,31875	21,52	0,2953
56,2	18,0	0,249	18,245	0,2857	20,79	0,3015
54,0	18,05	0,2805	18,33	0,34145	21,26	0,3162
52,1	18,75	0,2609	18,745	0,3358	20,71	0,3924
50,8	18,22	0,30705	19,685	0,31625	21,81	0,3158
50,0	19,02	0,25005	19,46	0,2937	21,8	0,277

<sup>(1)</sup> Ct: ciclo umbral o *Threshold cycle*

<sup>(2)</sup> Endpoint: punto final de la reacción de amplificación

**Tabla 14. Gradiente de temperatura de hibridación ensayado y resultados obtenidos en la amplificación del ADN de la cepa *Staphylococcus aureus* C2929 con los cebadores para el gen *msr A* a distintas concentraciones**

	<i>msr A</i> (1 $\mu$ M)		<i>msr A</i> (0,4 $\mu$ M)	
Gradiente de temperatura (°C)	Ct <sup>(1)</sup>	Endpoint <sup>(2)</sup>	Ct <sup>(1)</sup>	Endpoint <sup>(2)</sup>
65,0	-	-	-	-
64,0	-	-	-	-
62,0	-	-	-	-
59,3	21,78	0,1295	22,145	0,163
55,9	15,44	0,2503	15,23	0,2463
53,1	17,62	0,2128	15,245	0,3029
51,1	18,33	0,224	15,895	0,3392
50,0	24,12	0,158	19,755	0,242

- No amplificación

**Tabla 15. Gradiente de temperatura de hibridación ensayado y resultados obtenidos en la amplificación del ADN de la cepa *Staphylococcus pseudintermedius* C2381 con los cebadores para el gen *erm B* a distintas concentraciones**

Gradiente de temperatura (ºC)	<i>erm B</i> (1µM)		<i>erm B</i> (0,4µM)		<i>erm B</i> (0,2µM)	
	Ct <sup>(1)</sup>	Endpoint <sup>(2)</sup>	Ct <sup>(1)</sup>	Endpoint <sup>(2)</sup>	Ct <sup>(1)</sup>	Endpoint <sup>(2)</sup>
60,0	-	-	-	0,0212	-	-
59,3	27,52	0,1385	23,63	0,1609	-	-
58,0	20,68	0,257	19,77	0,2422	32,61	0,0688
56,2	20,15	0,22	18,59	0,2451	26,42	0,1629
54,0	19,57	0,317	17,82	0,30	27,57	0,2006
52,1	21,49	0,28	18,09	0,298	30,08	0,1481
50,8	23,59	0,262	18,75	0,2509	29,19	0,16613
50,0	26,53	0,0953	21,3	0,255	31,47	0,1001

**Tabla 16. Gradiente de temperatura de hibridación ensayada y resultados obtenidos en la amplificación del ADN de la cepa *Staphylococcus aureus* C2548 con los cebadores para el gen *erm A* a distintas concentraciones**

Gradiente de temperatura (ºC)	<i>erm A</i> (1µM)		<i>erm A</i> (0,4µM)	
	Ct <sup>(1)</sup>	Endpoint <sup>(2)</sup>	Ct <sup>(1)</sup>	Endpoint <sup>(2)</sup>
60,0	-	-	-	-
59,3	-	-	-	-
58,0	26,69	0,1029	-	-
56,2	18,36	0,1554	21,23	0,149
54,0	15,75	0,2082	17,45	0,193
52,1	15,68	0,2675	16,83	0,269
50,8	15,97	0,2972	19,35	0,1893
50,0	20,26	0,193	20,82	0,1947

**Tabla 17. Gradiente de temperatura de hibridación ensayado y resultados obtenidos en la amplificación del ADN de la cepa *Staphylococcus aureus* C5425 con los cebadores para el gen *Inu A* a distintas concentraciones**

	<i>Inu A (1μM)</i>	<i>InuA (0,4μM)</i>		
<b>Gradiente de temperatura (ºC)</b>	<b>Ct<sup>(1)</sup></b>	<b>Endpoint<sup>(2)</sup></b>	<b>Ct<sup>(1)</sup></b>	<b>Endpoint<sup>(2)</sup></b>
<b>60,0</b>	12,9	0,2854	12,78	0,2678
<b>59,3</b>	12,36	0,378	<b>11,65</b>	<b>0,52175</b>
<b>58,0</b>	12,35	0,3868	11,92	0,47755
<b>56,2</b>	12,32	0,3444	12,6	0,34985
<b>54,0</b>	12,55	0,4595	13,17	0,2934
<b>52,1</b>	13,25	0,26925	12,75	0,4738
<b>50,8</b>	13,43	0,32675	13,14	0,3151
<b>50,0</b>	13,66	0,23775	12,99	0,3233

### 5.3.2 Determinación del rango dinámico de la concentración de ADN molde en la reacción de amplificación

La tabla 18 muestra el intervalo de concentración de ADN ensayado de cada cepa obtenido mediante diluciones seriadas 1/2.

**Tabla 18. Intervalo de concentraciones (ng/reacción) ensayadas de cada cepa y método de extracción**

Método de extracción	<i>Streptococcus agalactiae mef A</i>	<i>Staphylococcus aureus C2929 msr A</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius C2381 erm B</i>	<i>Staphylococcus aureus C2548 erm A</i>	<i>Staphylococcus aureus C5425 Inu A</i>
ADN total met 1: PrepMan <sup>®</sup> Ultra	411 – 1.605	494.8 - 0.96	400.75 – 0.37	ND	462 – 0.451
ADN total met 2: Lisostafina	ND	91.5 – 0.09	40 - 0.078	90.25 - 0.088	31.25 – 0.0305
ADN Plasmídico	22.5 – 0.088	18.25 - 0.0712	9.75 - 0.019	ND	36 – 0.035

ND: NO DETERMINADO

El intervalo dinámico de ADN molde para la amplificación de cada gen de resistencia antimicrobiana se estableció a partir de la eficiencia y coeficiente de correlación lineal determinados a partir de la recta construida con diluciones seriadas de ADN molde, las cuales se muestran en las figuras 11, 12, 13, 14 y 15.

En el caso de la cepa *S. aureus* C2548, sólo se consiguió amplificar el gen *erm A* extrayendo el ADN con el método 2 de extracción de ADN total, por lo que sólo se pudo establecer el rango dinámico con el ADN obtenido por este método.

El análisis de las curvas estándar tomando como intervalo todo el rango de concentraciones ensayadas, revelaron en algunos casos coeficientes de correlación lineal algo bajos y valores de eficiencia por debajo de 70%. Para alcanzar valores más altos de  $r^2$  y eficiencias de entre 70 y 120%, se han eliminado del rango algunas concentraciones como se muestra en las figuras 11, 12, 13, 14 y 15, donde los puntos rojos representan las concentraciones de ADN que no han sido consideradas, mientras que los puntos negros indican las concentraciones de ADN que determinan el rango dinámico.

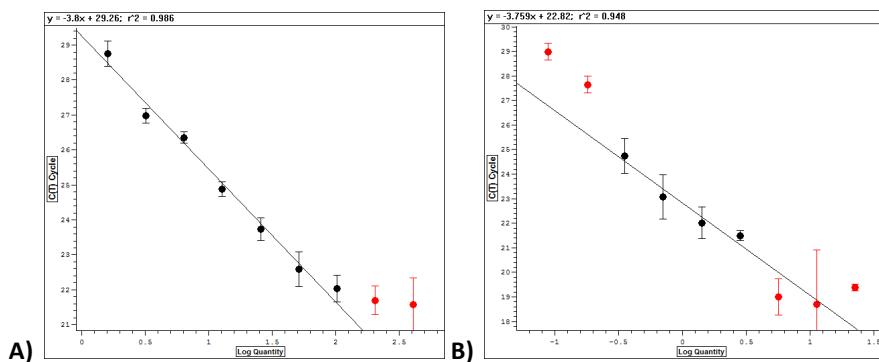


Figura 11. Curvas estándar obtenidas de la amplificación del gen de resistencia *mef A* en la cepa *Streptococcus agalactiae*. A) ADN total met 1: PrepMan® Ultra, B) ADN plasmídico

En la figura 11 A y B, se muestra la curva estándar obtenida tras la amplificación del gen *mef A* en la cepa *Streptococcus agalactiae* con los dos métodos de extracción ensayados para esta cepa.

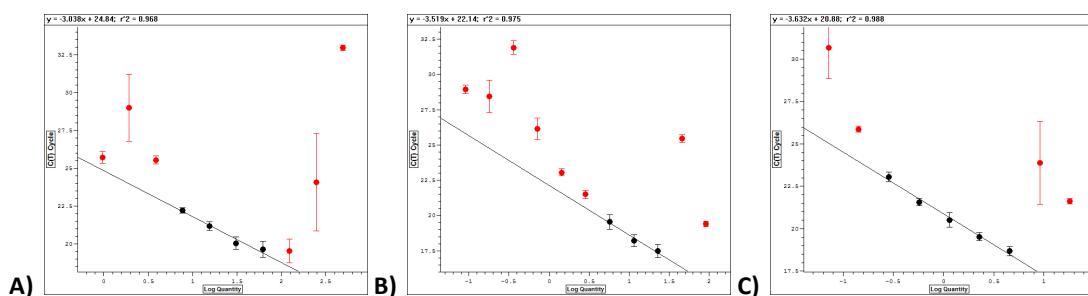
El intervalo dinámico se establece entre 103 y 1,6 ng/reacción para el ADN total y entre 2,8 y 0,35 ng/reacción para el ADN plasmídico.

Los valores de  $r^2$  y eficiencias obtenidas en este caso, se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 18. Rango dinámico determinado en la reacción de amplificación optimizada para el gen *mef* A a partir de ADN aislado de la cepa *Streptococcus agalactiae***

Cepa/gen	<i>Streptococcus agalactiae mef A</i>		
Método de extracción	ADN total met 1: PrepMan <sup>®</sup> Ultra	ADN total met 2: Lisostafina	ADN Plasmídico
Intervalo dinámico	103 – 1,6 ng/reacción	ND	2,8 – 0,35 ng/reacción
$r^2$	0,986	ND	0,948
Eficiencia (%)	81%	ND	84,5%

ND: NO DETERMINADO



**Figura 12. Curvas estándar obtenidas de la amplificación del gen de resistencia *msr A* en la cepa *Staphylococcus aureus* C2929, A) ADN total met 1: PrepMan<sup>®</sup> Ultra, B) ADN total met 2: Lisostafina C) ADN plasmídico**

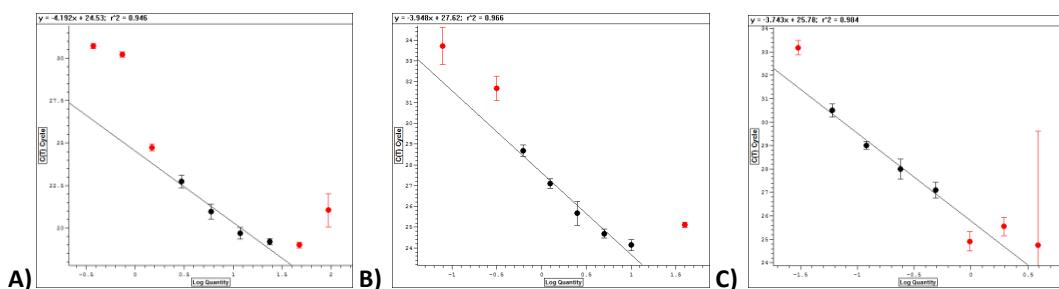
En la figura 12 A, B y C, se muestra la curva estándar obtenida tras la amplificación del gen *msr A* en la cepa *S. aureus* C2929 con los tres métodos de extracción ensayados.

El intervalo dinámico se establece entre 61,8 y 7,7 ng/reacción para el ADN total con el primer método de extracción, entre 22,9 y 7,7 ng/reacción para el segundo método de extracción, y entre 4,6 y 0,29 ng/reacción para el ADN plasmídico.

Los valores de  $r^2$  y las eficiencias para cada curva estándar establecida se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 19. Rango dinámico determinado en la reacción de amplificación optimizada para el gen *msr A* a partir del ADN aislado de la cepa *Staphylococcus aureus* C2929**

Cepa/gen	<i>Staphylococcus aureus C2929 msr A</i>		
Método de extracción	ADN total met 1: PrepMan <sup>®</sup> Ultra	ADN total met 2: Lisostafina	ADN Plasmídico
Intervalo dinámico	61,8 – 7,7 ng/reacción	22,9 – 7,7 ng/reacción	4,6 – 0,29 ng/reacción
$r^2$	0,968	0,975	0,988
Eficiencia (%)	97,8%	92,39%	88,5%



**Figura 13.** Curvas estándar obtenidas de la amplificación del gen de resistencia *erm B* en la cepa *Staphylococcus pseudintermedius* C2381, A) ADN total met 1: PrepMan® Ultra, B) ADN total met 2: Lisostafina C) ADN plasmídico

En la figura 13 A, B y C, se muestra la curva estándar obtenida tras la amplificación del gen *erm B* en la cepa *S. pseudintermedius* C2381 con los tres métodos de extracción ensayados.

En el caso de la extracción del ADN total con PrepMan Ultra®, se ha partido de la dilución 1:4 como concentración más alta, ya que no hay amplificación por encima de 100 ng/reacción.

Para la extracción del ADN total con lisostafina, también se ha partido de la dilución 1:4 como concentración más alta, debido a que la amplificación del ADN sin diluir y de la dilución 1:2 tuvo lugar en ciclos tardíos y apenas se obtuvo producto amplificado, por lo que no se han tenido en cuenta en la curva estándar.

El intervalo dinámico para este gen se ha establecido entre 23,7 y 3 ng/reacción para el ADN total con el primer método de extracción, entre 10 y 1,3 ng/reacción para el segundo método de extracción, y entre 1,2 y 0,15 ng/reacción para el ADN plasmídico.

Los valores de  $r^2$  y eficiencia se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 20.** Rango dinámico determinado en la reacción de amplificación optimizada para el gen *erm B* a partir del ADN aislado de la cepa *Staphylococcus pseudintermedius* C2381

Cepa/gen	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> C2381 <i>erm B</i>		
Método de extracción	ADN total met 1: PrepMan® Ultra	ADN total met 2: Lisostafina	ADN Plasmídico
Intervalo dinámico	23,7 – 3 ng/reacción	10 – 1,3 ng/reacción	1,2 – 0,15 ng/reacción
$r^2$	0,946	0,961	0,986
Eficiencia (%)	73,2%	96,41%	84%

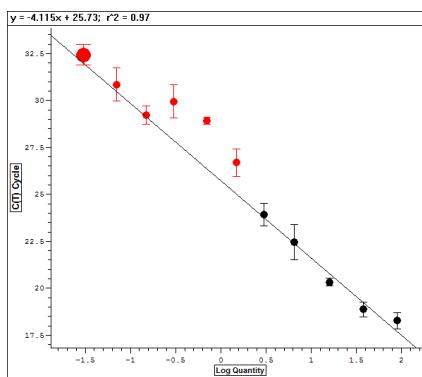


Figura 14. Curva estándar obtenidas de la amplificación del gen de resistencia *erm A* en la cepa *Staphylococcus aureus C2548*, extracción ADN total met 2: Lisostafina

En la figura 14, se muestra la curva estándar obtenida tras la amplificación del gen *erm A* en la cepa *Staphylococcus aureus C2548* con el método de extracción ensayado para esta cepa.

El intervalo dinámico establecido para este gen ha sido de entre 90,3 y 5,6 ng/reacción. En este caso, las dos concentraciones más altas no se han tenido en cuenta en la curva estándar debido a que la amplificación de estas muestras tuvo lugar en ciclos tardíos y apenas se obtuvo producto amplificado.

Los valores de  $r^2$  y la eficiencia obtenida para el gen *erm A*, se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 21. Rango dinámico determinado en la reacción de amplificación optimizada para el gen *erm A* a partir del ADN aislado de la cepa *Staphylococcus aureus C2548*

Cepa/gen	Staphylococcus aureus C2549 <i>erm A</i>		
Método de extracción	ADN total met 1: PrepMan® Ultra	ADN total met 2: Lisostafina	ADN Plasmídico
Intervalo dinámico	ND	90,3 – 5,6 ng/reacción	ND
$r^2$	ND	0,97	ND
Eficiencia (%)	ND	74,99%	ND

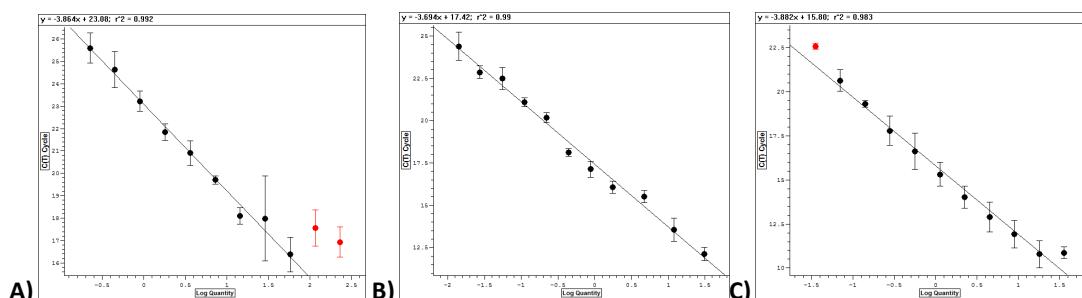


Figura 15. Curvas estándar obtenidas de la amplificación del gen de resistencia *Inu A* en la cepa *Staphylococcus aureus C5425*, A) ADN total met 2: Lisostafina B) ADN plasmídico

Por último, en la figura 15 A, B y C, se muestra la curva estándar obtenida tras la amplificación del gen *Inu A* en la cepa *S. aureus C5425* con los tres métodos de extracción ensayados.

En el caso de la extracción del ADN total con PrepMan Ultra®, se ha partido de la dilución 1:4 como concentración más alta, ya que no hay amplificación por encima de 100 ng/reacción. El intervalo dinámico establecido ha sido de 23,1 a 0,09 ng/reacción con unos valores de  $r^2$  y eficiencia de 0,992 y 81,47% respectivamente.

En el caso de la extracción del ADN total con lisostafina, se obtiene un valor de  $r^2$  de 0,99 y una eficiencia de 86,51% para todo el intervalo de concentraciones estudiadas de 31,3 a 0,0305 ng/reacción.

Para el ADN plasmídico, se obtiene una  $r^2$  de 0,983 y una eficiencia de 80,9%, quedando por tanto establecido el intervalo dinámico entre 36 y 0,0703 ng/reacción.

En la siguiente tabla se muestran los valores de  $r^2$  y las eficiencias en cada curva estándar para el gen *Inu A* con los diferentes métodos de extracción.

**Tabla 22. Rango dinámico determinado en la reacción de amplificación optimizada para el gen *Inu A* a partir del ADN aislado de la cepa *Staphylococcus aureus C5425***

Staphylococcus aureus C5425 <i>Inu A</i>			
	ADN total met 1: PrepMan® Ultra	ADN total met 2: Lisostafina	ADN Plasmídico
<b>Intervalo dinámico</b>	23,1 – 0,09 ng/reacción	31,3 – 0,031 ng/reacción	36 – 0,07 ng/reacción
<b><math>r^2</math></b>	0,992	0,99	0,983
<b>Eficiencia (%)</b>	81,47%	86,51%	80,9%

De esta manera, a partir de todos los intervalos dinámicos establecidos para cada gen y método de extracción, y con el objetivo de normalizar la cantidad de ADN en la reacción de amplificación, se ha seleccionado la concentración de 10 ng/reacción cuando trabajamos con ADN total, y 1 ng/reacción cuando lo hacemos con ADN plasmídico.

Además, se ha observado en algún caso (*erm B* e *Inu A*), que el ADN extraído con este método, no se ha amplificado cuando la concentración de ADN ha sido mayor de 100ng en la reacción. Esto, ha podido deberse a que la pureza del ADN no es absoluta, y puede que existan contaminantes inhibidores de la reacción. Por lo que sólo se ha podido llevar a cabo la reacción de amplificación cuando la muestra de ADN

se ha diluido lo suficiente como para que estos inhibidores no hayan afectado a la reacción.

Por último, se ha evaluado la curva de fusión generada a partir del producto amplificado de cada cepa.

En las siguientes figuras (16, 17, 18, 19 y 20) se muestra el perfil de la curva de fusión para cada gen amplificado con cada pareja de cebadores y para cada método de extracción. En él se comprueba la no amplificación de los controles negativos; y además, se puede ver únicamente un producto de amplificación específico. Esto último, unido al hecho de que no existan productos inespecíficos de amplificación como por ejemplo dímeros, corrobora la idoneidad de la reacción de amplificación optimizada en este estudio.

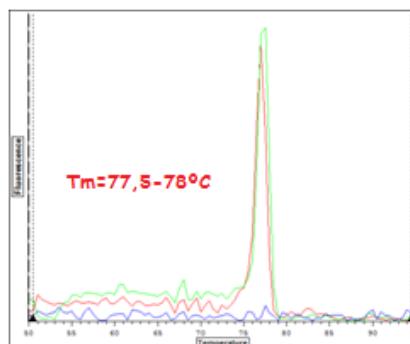


Figura 16. Curvas de fusión del gen *mefA* amplificado en la cepa *Streptococcus agalactiae*: rojo ADN total met 1: PrepMan® Ultra, verde ADN Plasmídico, azul Control negativo.

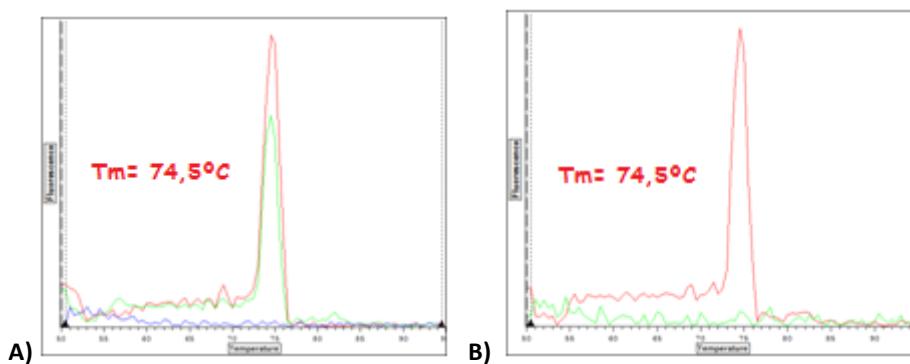


Figura 17. Curvas de fusión del gen *msrA* amplificado en la cepa *Staphylococcus aureus* C2929: A) rojo ADN total met 1: PrepMan® Ultra, verde ADN Plasmídico, azul Control negativo B) rojo ADN total met 2: Lisostafina, azul control negativo

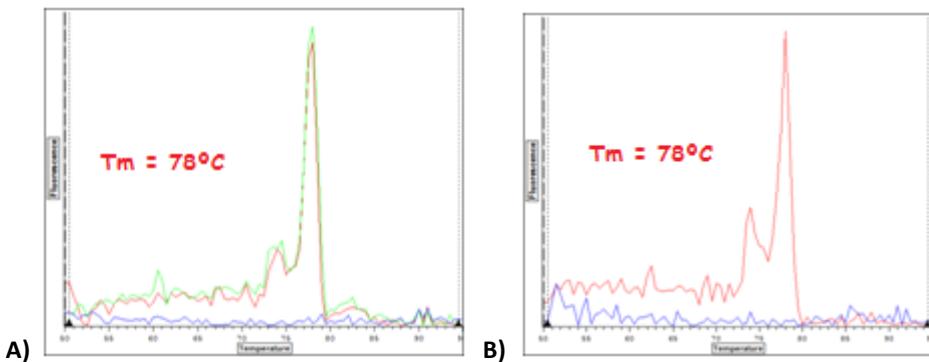


Figura 18. Curvas de fusión del gen *erm B* amplificado en la cepa *Staphylococcus pseudintermedius* C2381: A) rojo ADN total met 1: PrepMan® Ultra, verde ADN Plasmídico, azul Control negativo B) rojo ADN total met 2: Lisostafina, azul control negativo

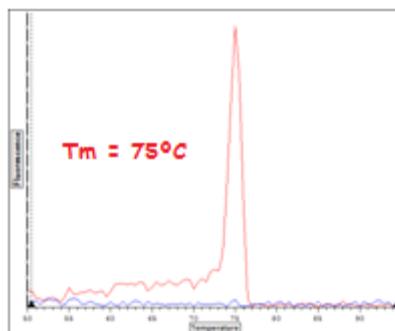


Figura 19. Curvas de fusión del gen *erm A* amplificado en la cepa *Staphylococcus aureus* C2548: rojo ADN total met 2: Lisostafina, azul control negativo

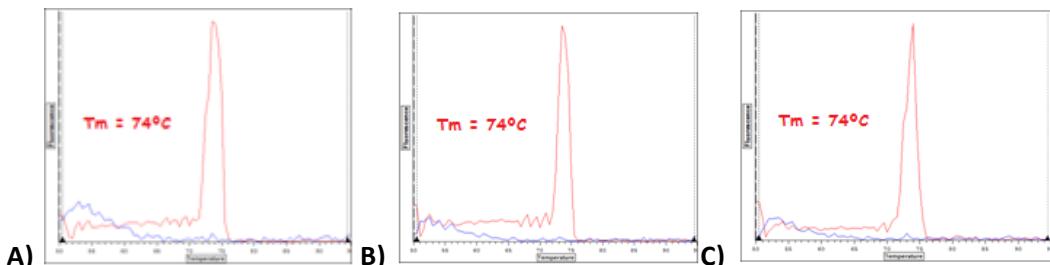


Figura 20. Curvas de fusión del gen *Inu A* amplificado en la cepa *Staphylococcus aureus* C5425: A) rojo ADN total met 1: PrepMan® Ultra B) rojo ADN total met 2: Lisostafina, azul control negativo B) rojo ADN plasmídico, azul control negativo

El análisis de la temperatura de fusión (Tm) de cada amplicón tras los ensayos de PCR a tiempo real muestra valores de Tm distintos entre algunos de los genes (tabla 23). Por lo tanto, es interesante considerar esta técnica de PCR a tiempo real como método válido para confirmar la amplificación de la diana específica en base al valor de Tm característico de cada gen de resistencia siempre y cuando los genes analizados muestren valores de Tm distintos. Esto, unido a la baja probabilidad de contaminación,

a la exactitud de los resultados y a la sencillez y rapidez del método, hace de la RT-PCR una técnica con posibles aplicaciones para el diagnóstico y permite una mejor elección del tratamiento de infecciones causadas por microorganismos multirresistentes.

Tabla 23. Valores de Tm para cada uno de los genes ensayados

GEN	<i>mef A</i>	<i>msr A</i>	<i>erm B</i>	<i>erm A</i>	<i>Inu A</i>
Tm <sup>(1)</sup> (ºC)	77,5-78	74,5	78	75	74

<sup>(1)</sup>Tm: Temperatura de fusión

## 5.4 Detección del producto amplificado

### 5.4.1 Electroforesis horizontal en gel de agarosa

Para llevar a cabo la PCR convencional, se utilizaron aquellas concentraciones de ADN incluidas dentro del rango dinámico con mayor Endpoint.

En la tabla 24 se muestran las cantidades (ng/reacción) analizadas de cada una de las cepas.

Tabla 24. Cantidad y diluciones de ADN extraído con cada método de extracción para cada cepa bacteriana y producto final obtenido

CEPA BACTERIANA	EXTRACCIÓN	DILUCIÓN	CANTIDAD ADN (ng/reacción)	END POINT
<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>mef A</i>	Método 1: PrepMan® Ultra	1:16	25	0,266
	ADN Plasmídico	1:32	0,7	0,182
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>C2929</i> <i>msr A</i>	Método 1: PrepMan® Ultra	1:32	15,5	0,292
	Método 2: Lisostafina	1:16	5,7	0,259
	ADN Plasmídico	1:32	0,57	0,329
<i>Staphylococcus</i> <i>pseudintermedius</i> <i>C2381</i> <i>erm B</i>	Método 1: PrepMan® Ultra	1:32	12	0,330
	Método 2: Lisostafina	1:32	1,25	0,302
	ADN Plasmídico	1:32	0,3	0,292
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>C2548</i> <i>erm A</i>	Método 2: Lisostafina	1:16	5,6	0,276
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>C5425</i> <i>Inu A</i>	Método 1: PrepMan® Ultra	1:16	11,6	0,617
	Método 2: Lisostafina	1:16	1,95	0,619
	ADN Plasmídico	1:512	0,07	0,65

Los fragmentos amplificados se visualizaron en el gel de agarosa, de tal manera que, en los carriles donde había ADN, se observó una banda definida a la altura correspondiente del marcador de peso molecular, revelando que el tamaño de los productos amplificados coinciden con el tamaño de cada gen estudiado: *mef A* (345pb), *msr A* (401pb), *erm B* (636pb), *erm A* (645pb) e *inu A* (323pb), figura 21, 22, 23 y 24.

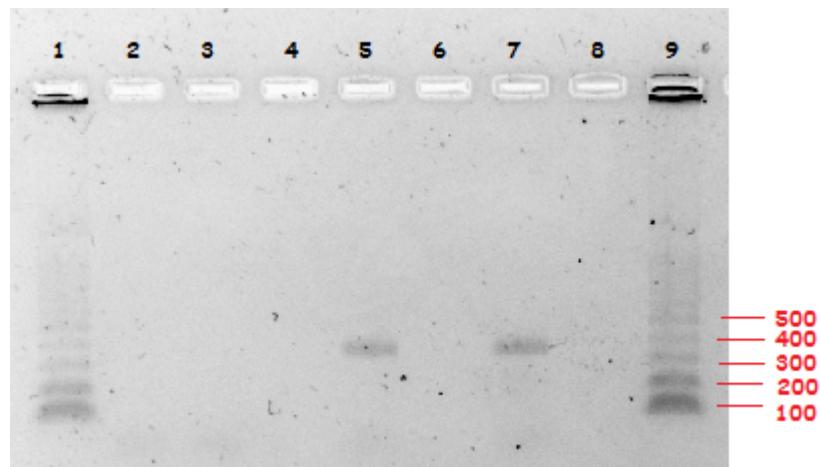


Figura 21. Gen *mef A* (*Streptococcus agalactiae*).

Carriles 5 y 7: ADN total extraído con el método 1 PrepMan® y ADN plasmídico respectivamente.

Carriles extremos (1 y 9): marcador de peso molecular 100bp.

Carril 3: control negativo de la PCR, carriles 4 y 6: Controles negativos de las dos extracciones.

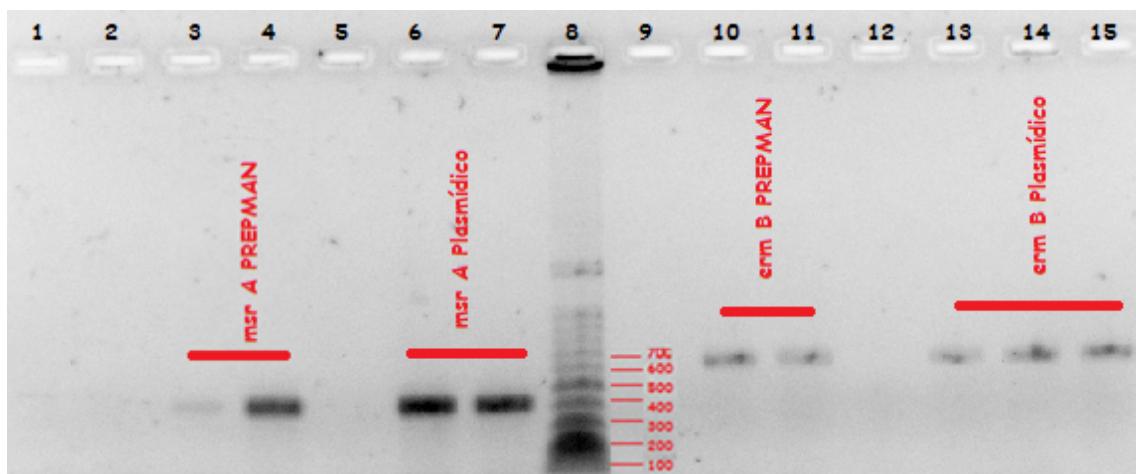


Figura 22. Genes *msr A* (*S. aureus* C2929) y *erm B* (*S. pseudintermedius* C2381).

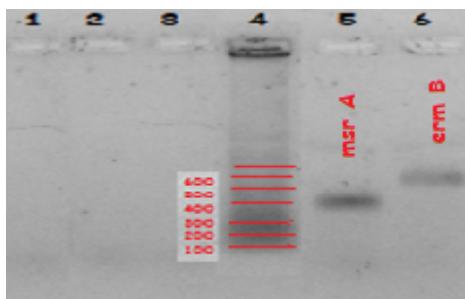
Carriles 3 y 4: ADN total extraído con el método 1 PrepMan®, gen *msr A*.

Carriles 10 y 11: ADN total extraído con el método 1 PrepMan®, gen *erm B*.

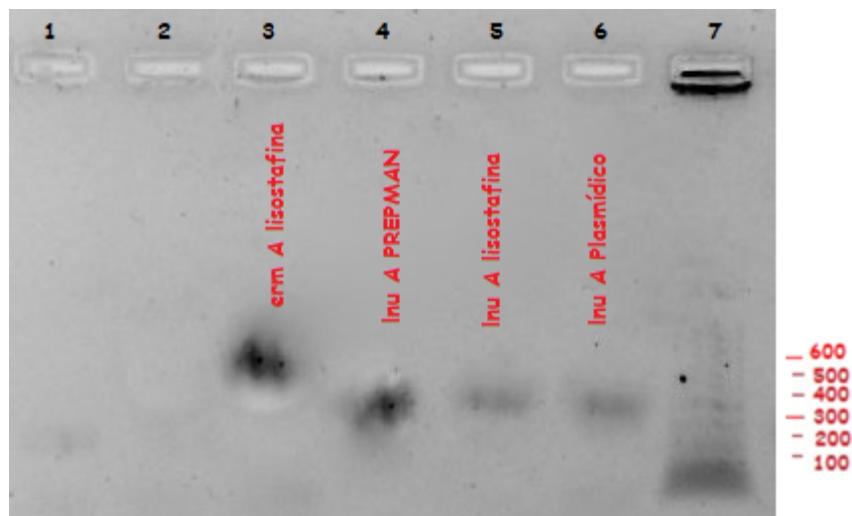
Carriles 6 y 7: ADN plasmídico, gen *msr A*.

Carriles 13, 14 y 15: ADN plasmídico, gen *erm B*.

Carril 8: marcador de peso molecular 100bp, carriles 1, 2, 5, 9 y 12: Controles negativos (PCR y extracción)



**Figura 23. Genes *msr A* (*S. aureus* C2929) y *erm B* (*S. pseudintermedius* C2381).**  
 Carriles 5 y 6: ADN total extraído con lisostafina, gen *msr A* y *erm B* respectivamente,  
 Carril 4: marcador de peso molecular 100bp, carriles 1, 2 y 3: controles negativos (PCR y extracción)



**Figura 24. Genes *erm A* (*S. aureus* C2548) y *Inu A* (*Staphylococcus aureus* C5425).**  
 Carriles 3 y 5: ADN total extraído con lisostafina, gen *erm A* y *Inu A* respectivamente.  
 Carril 4 y 6: ADN total extraído con el método 1 PrepMan® y ADN plasmídico gen *Inu A*.  
 Carril 7: marcador de peso molecular 100bp, carriles 1, 2: controles negativos PCR.

Las figuras 21, 22, 23 y 24 muestran las bandas de ADN esperadas para cada uno de los genes con cada método de extracción ensayado.

En los carriles correspondientes a los controles negativos, no se visualiza ninguna banda debido a que contienen todos los reactivos a excepción del ADN diana.

Los resultados de la cuantificación de los fragmentos purificados se muestran en la tabla 25. En ella se puede observar que la concentración de ADN obtenido tras la purificación se encuentra entre 9,6 y 52,2 µg/ml, así como la pureza de ADN entre 1,6 y 2,1.

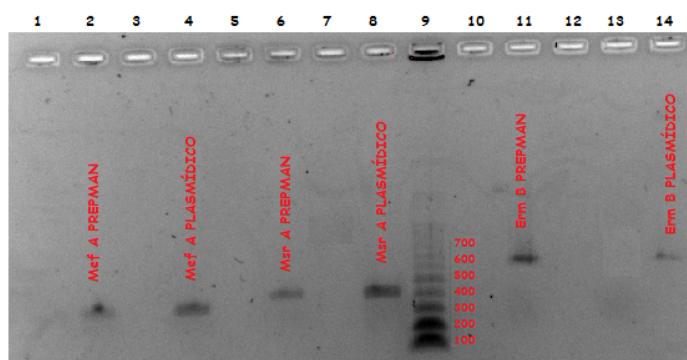
**Tabla 25. Resultado de la lectura de la absorbancia y la pureza por espectrofotometría de las muestras purificadas**

CEPA BACTERIANA	METODO EXTRACCION	$A_{260}/A_{280}^{(1)}$	[ADN] $\mu\text{g/ml}^{(2)}$
<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>mef A</i>	Método 1: PrepMan® Ultra	2,1	16,3
	ADN Plasmídico	2,0	30
<i>Staphylococcus aureus C2929</i> <i>msr A</i>	Método 1: PrepMan® Ultra	1,9	19,2
	Método 2: Lisostafina	1,7	10,7
	ADN Plasmídico	2,1	31,1
<i>Staphylococcus pseudintermedius C2381</i> <i>erm B</i>	Método 1: PrepMan® Ultra	2,0	41,6
	Método 2: Lisostafina	1,6	9,6
	ADN Plasmídico	2,0	29
<i>Staphylococcus aureus C2548</i> <i>erm A</i>	Método 2: Lisostafina	2,1	20,9
<i>Staphylococcus aureus C5425</i> <i>Inu A</i>	Método 1: PrepMan® Ultra	2,0	40,1
	Método 2: Lisostafina	2,0	52,2
	ADN Plasmídico	2,0	44,5

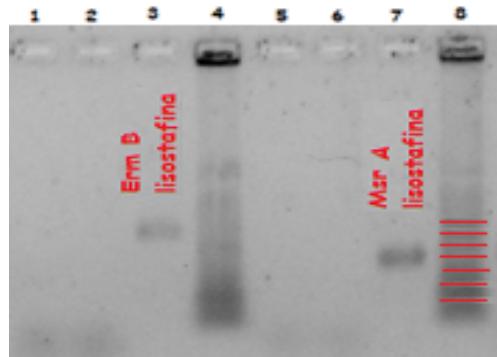
<sup>(1)</sup>  $A_{260}/A_{280}$  = Relación absorbancia 260 nm/absorbancia 280 nm

<sup>(2)</sup> [ADN]  $\mu\text{g/ml}$  = Concentración de ADN

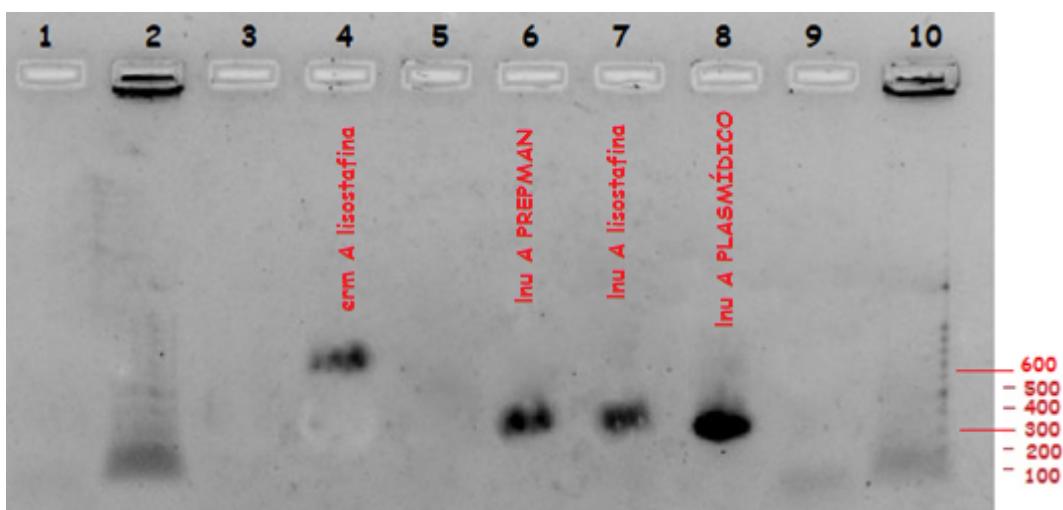
Los resultados de la electroforesis de los amplicones tras la purificación se muestran en la figura nº 25, 26 y 27.



**Figura 25. Genes *mef A*, *msr A*, *erm B*, extracción ADN total método 1: PrepMan® y ADN plasmídico.**  
**Carriles 2 y 4: *mef A*, carriles 6 y 8: *msr A*, carriles 11 y 14: *erm B*.**



**Figura 26. Genes *msr A* y *erm B*, Extracción ADN total método 2: lisostafina.**  
**Carril 3: *erm B*, carril 7: *msr A*.**



**Figura 27. Genes *erm A* y *Inu A*.**  
**Carril 4: *erm A* Extracción ADN total método 2: lisostafina.**  
**Carriles 6, 7 y 8: *Inu A* Extracción ADN total método 1: PrepMan<sup>®</sup>, Extracción ADN total método 2: lisostafina y ADN plasmídico respectivamente**

La figura 25, 26 y 27 muestran las bandas de ADN para el peso molecular esperado de los genes *mef A*, *msr A*, *erm B*, *erm A* y *Inu A* tras su purificación.

### 5.5 Confirmación de las secuencias genéticas

La tabla 26 muestra los resultados de la secuenciación para cada amplicón. Estas secuencias de bases nitrogenadas fueron comparadas con las depositadas en la base de datos del NCBI a través de la herramienta BLAST.

**Tabla 26. Resultados del análisis de las secuencias de bases nitrogenadas obtenidas a partir de la secuenciación de cada uno de los amplicones**

GEN	SECUENCIA	IDENTIDAD	EXPECT
<i>mef A</i> PrepMan® Ultra	GAGCGATATTTTACTTACAGAAAACAGGATCTCGATGGCTTGTCTATGGCTCTATTAGGTTTTACCTATCGATTTGGGACCTGCCATTGGTGTCTAGTGGATCGTCATGATAGGAAGAAGATAATGATTGGTCCGATTTAATTATCGCAGCAGCTGTTGCACTGCTTGTCTATTGTCATTCTGTATGGAGCTACCTGTCTGGATGATTATGATAGTATTGTTATCCGTAGCATGGAACAGCTTTCATACCCAGCACTCAATGCGGTTACACCACCTTTATACCC	300/305 98%	2e-147
<i>mef A</i> Plasmídico	TATCGATATTTTACCTACAGAAAACAGGATCTCGATGGCTTGTCTATGGCTTCATTAGTAGGTTTTACCTATCGCATTGGGACCTGCCATTGGTGTCTAGTGGATCGTCATGATAGGAAGAAGATAATGATTGGTCCGATTTAATTATCGCAGCAGCTGGTCAGTGTCTATTGTCATTCTGTATGGAGCTACCTGTCTGGATGATTATGATAGTATTGTTATCCGTAGCATGGAACAGCTTTCATACCCAGCACTCAATGCGGGTTACACCACCTTTATACCCAGAAGAA	307/312 98%	2e-151
<i>msr A</i> PrepMan® Ultra	GSKRCTTGWACCGATAGAGGGATTGWTGTTCTCTAAAGTCAAATGGCATACTATCGCAACTTGCCTTGAAGCYWYCGTGACGTTTCAATTGCAATATTAATGGATGAAACGGATTCATCAGAACATTCACTAGTAGAGCTATTTAAATAACTTGGGTTTAAATGAAGCACTTGATCCTTGTAAATGTTGAGTGGTGGGGAAAGAACGAAAATTATCGTTAGCAGTATTATTTCAACGAAAGCGAACATGTTAATTGGATGAACCAACTAATTTTAGATATTAACATTAGAACGATTAGAACATGTTATGAATAAATATCCTGGAAATCATTTGTTACATCACATGATA	335/342 98%	6e-168
<i>msr A</i> Lisostafina	TGACATTACACCAATAGAGGGATTGATTGTTCTCTAAAGTCAAATGGCATACTATCGCAACTTGCCTTGAAGACATCGTGACGTTTCAATTGCAATATTAATGGATGAAACGGATTCATCAGAACATTCACTAGTAGAGCTATTTAAATAACTTGGGTTAAATGAAGCACTTGATCCTTGTAAATGTTGAGTGGTGGGGAAAGAACGAAATTATCGTTAGCAGTATTATTTCAACGAAAGCGAACATGTTAATTGGATGAACCAACTAATTTTAGATATTAACATTAGAACGATTAGAACATGTTATGAATAAATATCCTGGAAATCATTTGTTACATCACATGATA	364/367 99%	0,0
<i>msr A</i> Plasmídico	TKRCATTACACCGATAGAGGGATTGATTGTTCTCTAAAGTCAAATGGCATACTATCGCAACTTGCCTTGAAGACATCGTGACGTTTCAATTGCAATATTAATGGATGAAACGGATTCATCAGAACATTCACTAGTAGAGCTATTTAAATAACTTGGGTTAAATGAAGCACTTGATCCTTGTAAATGTTGAGTGGTGGGGAAAGAACGAAATTATCGTTAGCAGTATTATTTCAACGAAAGCGAACATGTTAATTGGATGAACCAACTAATTTTAGATATTAACATTAGAACGATTAGAACATGTTATGAATAAATATCCTGGAAATCATTTGTTACATCACATGATA	353/356 99%	1e-179
<i>erm B</i> PrepMan® Ultra	AGCATGAACAGTAACCGATACCGAGKGAATTGATTGKTCYCKCAAGTGRMATTGKMATACYATCACCGRCTTGTCTATGAGAATGCAWGACGTTGTTATTGACAGATTTCWAGCTGAAACKCATTCRACAAATCATTCAAGAACAGCTATGTYAMATAACTGGTTGAATGAAGCACTTGATCTTGTGWMATGYTAGAGAGRWTGGATTGAAGAAAGAAATCCTYACYATTWRAGYWTCTTWCWTWAAGCAAGTGKTTTTKAAGCCTKGCCCCWSACATCTATCAGAGTAAAGAAGGATTCCATAGAAACATGTTATGAATWCATATCCTGCAATCATTGCTTGTGMYCCCATGATCTCGATTCAAGAACATTGCTTAAGTGCAGCGGGATGCTTCTACCTAAACAAAAGTAACACAGTGTCTTAATAAAACCTTACCCGCCATACACAGATGTTCCAGATAATATTGGAAGCTATACGTACTTTGTTCAAAATGGTCAATCGAGAATATGTCAACTGTTACTAAAATCAGTTCATCAAGCAATGAAACACGCCAAGTAAACATTAAGAACCGTTACT	236/237 99%	1e-117
<i>erm B</i> Lisostafina	CAAATAAAAGAACCGATACCGTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGCTTAAACGACGAAACTGGCTAAATAAGTAAACAGGTAACGTCATTGAAATTAGACAGTCATCTATTCACCTATCGTCAGAAAAATTAAAAGTAACACATTGCTGTCACCTTAATTCAACAGATATTCTACAGTTCAATTCCCTAACAAACAGAGGTATAAAATTGTTGGAGTATTCTTACCATTTAACGACACAAATTATTTAAAAAGTGGTTTGTAAAGGCCATGCGTCTGACATCTATGTTGAAGAAGGATTCTACAGCGTACCTGGATATTCAACGAAACACTAGGGTGCTTGCACACTCAAGTCGATTCAAGCAATTGCTTAAGCTGCCAGCGGAATGCTTCTACCTAAACAAAAGTAACACAGTGTCTTAATAAAACTTACCCGCCATACACAGATGTTCCAGATAATATTGGAAGCTATACGTACTTTGTTCAAAATGGTCAATCGAGAATATGTCAACTGTTACTAAAATCAGTTCATCAAACGAAACACGCCAAGTAAACATTAAGAACCGTTACT	602/604 99%	0,0

<i>erm B</i> Plasmídico	AGAAATTCAAAGAACCGATACCGTTACGAATTGGAACAGGTAAAGGGCATTAA CGACGAAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTACGTATTGAATTAGACAGTCAT CTATTCACCACTTACCGTCAGAAAAATTAAAAGTAAACAGGTACGTGTCACTTTAACAC CAAGATATTCTACAGTTCAATTCCCTAACAAACAGAGGTATAAAATTGTTGGGAG TATTCTTACCATTTAACACAAATTATTTAAAAGTGGTTTCAAGGCATGC GTCTGACATCTATCTGATTGTAAGAAGGATTCTACAAGCGTACCTGGATATTCA CCGAACACTAGGGTCTCTGCACACTCAAGTCTCGATTCAAGCTTAAGCT GCCAGCGGAATGCTTCATCTAACCAAAAGTAAACAGTGTCTTAATAAAACTTA CCCGCCATACACAGATGTCCAGATAAAATATTGGAAGCTATACGTACTTTGTTT CAAAATGGGCAATCGAGAATATCGTCAACTGTTACTAAAAATCAGTTCAAA GCAATGAAACACGCCAAAGTAAACAATTAAAGTACCGTTAC	602/606 99%	0,0
<i>erm A</i> Lisostafina	TTGGAAAAAAAGAAACAACGTATTACGGGTTACCCACTTATAACAAAAAAA AAGGGTACTTTGTAGTCCTTCTTGAATCAATGTTCCGATGTCGTTCAAGAAC AATCAATACAGAGTCTACACTGGCTTAGGATGAAATATAGTGGTGGTACTTTT GAGCATTTTATATCCATCTCCACCATTAATAGTAAACCCAAGCTCGTTGAGATT TTGCAATCTTCGCAAATCCCTCTAACGATAAGATAGCTATATTAGCTGACTT TCAAAGGTAATTCTTTGACAATACCGTACTGATGTTATAAGGAATATTACCATAT ATCTTATAGTTATGTTGGAGGAAAATTAAATATCGTGGATCCCT TTTAAATTCTCGGGGGGTTAACGTTCTAGGCCCTGAAATAAGCCTCCATT CATTCTAAAGCGGAACGTATCCAATTTGGATAGGTCTTGGAAAAATGGCC TTTCTGAACCCAATCCAATAAGTGGCTGTTATGGAATTTCGGGGAGTCA AAAATTCTTTAAATCCTTAAAAAA	515/575 90%	0,0
<i>Inu A</i> PrepMan® Ultra	ACCCAAGGAGGACACAGAGATATAGATAGATTGACGCTAACACACTCAA AAGTTATACAAAATTAGAAGATATCGGATACAAATAGAAGTTGATGGATGCCT TCACGTATGGAACCTAACGATGAAGAATATGGGTATTAGATATTCTCTATAAA TCTAAATGATGATGGATCAATTACCAAGCAGAACCCAGAAGGTGTAATTATGTT TCCAAAATGACTGGTTTCAGAAACTAATTACAAAGGTGAAAAATACCATGTATT TCAAAAGAAC	99%	4e-144
<i>Inu A</i> Lisostafina	GAAAAATTGGGTTAGGAGAGGCCAGAGAAAAGAGATTAGATATAGATTGACG CTCACACACTCAAAAGTTATACAAAATTAGAAGATATCGGATACAAATAGAAG TTGATGGATGCCTTCACGTATGGAACCTAACGATGAAGAATATGGGTATTAGAT ATTCTCTATAAACTAAATGATGATGGATCAATTACCAAGCAGAACCCAGAAGG TGGTAATTATGTTCCAAATGACTGGTTTCAGAAACTAATTACAAAGGTGAA AAATACCATGTATTCAAAAGAAC	99%	2e-136
<i>Inu A</i> Plasmídico	CCCCAAGGAGAAACAGAGATATAGATAGATTGACGCTAACACACTCAA GTTATACAAAATTAGAAGATATCGGATACAAATAGAAGTTGATGGATGCCCT ACATGGAACTAACGATGAAGAATATGGGTATTAGATATTCTCTATAAAATC TAAATGATGATGGATCAATTACCAAGCAGAACCCAGAAGGTGTAATTATGTTT CAAAATGACTGGTTTCAGAAACTAATTACAAAGGTGAAAAATACCATGTATT AAAAGAAC	99%	1e-143

El alineamiento de las secuencias obtenidas con las depositadas en la base de datos, produjo numerosas alineaciones con una similitud de entre 90% y 99% como se puede observar en la tabla 26. Estas secuencias corresponden a fragmentos del genoma que codifican los genes de resistencia objeto de este estudio.

Por otra parte, el valor de “expect”, informa del número de alineamientos que han podido deberse al azar, por lo que en este caso, con valores de entre 0.0 y 1e-117, podemos decir que todos los alineamientos son debidos a una relación biológicamente significativa y por tanto se confirma la identidad de nuestros amplicones.

## 5.6 Correlación entre fenotipo y genotipo

Al relacionar los resultados obtenidos en el test “*in vitro*” con los resultados obtenidos mediante RT-PCR en las 5 cepas de referencia, se observa que sí existe una relación entre ambos.

La cepa de *Staphylococcus aureus* C5425, posee el gen *Inu A* responsable de la inactivación de Lincosamidas (Morar *et al.*, 2009), y a su vez, es la única cepa que presenta resistencia a clindamicina y sensibilidad a eritromicina. El resto de cepas presentan genes que confieren resistencia a eritromicina, y los resultados del test “*in vitro*” muestran sensibilidad a clindamicina y resistencia a eritromicina.

En cuanto a los resultados del test de inducción, sólo las cepas *Staphylococcus aureus* C2548 y *Staphylococcus pseudintermedius* C2381 portadores de los genes *erm A* y *erm B* respectivamente, responsables de la resistencia a clindamicina inducida por eritromicina mediante el mecanismo de metilación ribosomal, presentan un D-test positivo y fenotipo *iMLS<sub>B</sub>*, mientras que las cepas *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* C2929 presentan D-test negativo y fenotipo *MS<sub>B</sub>* ya que los genes *mef A* y *msr A* respectivamente, confieren resistencia a Macrólidos de 14 y 15 átomos (eritromicina) mediante el mecanismo de expulsión activa (Leclercq *et al.*, 2002, Roberts *et al.*, 1999).

## 5.7 Caracterización genética del patrón de resistencia antibiótica a clindamicina en cepas de *Listeria* spp. aisladas de alimentos

En la tabla 27 se muestran los valores de absorbancia obtenidos tras la lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nm, así como el cálculo del ratio  $A_{260}/A_{280}$  para cada una de las cepas analizadas.

**Tabla 27. Concentración de ADN y pureza estimada por espectrofotometría para cada cepa ensayada con el método 1 de extracción de ADN total: *PrepMan<sup>®</sup> Ultra***

CEPA	[ADN] $\mu\text{g/ml}$ <sup>(1)</sup>	$A_{260}/A_{280}$ <sup>(2)</sup>
<i>L. innocua</i>	1	198,6
<i>L. innocua</i>	2	165,4
<i>L. monocytogenes</i>	3	157,1
<i>L. innocua</i>	5	152,3
<i>L. innocua</i>	8	210,8

<i>L.monocytogenes</i>	9	173,7	1,8
<i>L. innocua</i>	11	125,2	1,9
<i>L. innocua</i>	12	123,8	2,0
<i>L. innocua</i>	13	150,1	1,9
<i>L. innocua</i>	16	155,5	2,0
<i>L. innocua</i>	17	163,3	1,9
<i>L. innocua</i>	18	179,6	1,9
<i>L. innocua</i>	19	151,4	1,9
<i>L.monocytogenes</i>	22	173,0	1,9
<i>L.monocytogenes</i>	23	158,0	1,9
<i>L. innocua</i>	14	218,0	1,8
<i>L.monocytogenes</i>	25	177,4	1,8
<i>L. innocua</i>	27	204,6	1,8
<i>L. innocua</i>	66	162,7	1,9
<i>L. innocua</i>	68	206,6	1,9
<i>L. innocua</i>	70	150,5	2,0
<i>L. innocua</i>	71	180,0	1,9
<i>L. innocua</i>	72	142,0	2,0

<sup>(1)</sup> [ADN] µg/ml = Concentración de ADN

<sup>(2)</sup> A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> = Relación absorbancia 260 nm/absorbancia 280 nm

Podemos comprobar que en todas las cepas se obtiene cantidad suficiente de ADN para su posterior amplificación (123,4 a 218 µg/ml) y de buena calidad (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> = 1,7 – 2,0).

El gen de resistencia a clindamicina *lnu A*, no ha sido detectado en ninguna de las 23 cepas estudiadas. En todos los casos se comprobó el buen funcionamiento de la técnica con amplificación de los controles positivos.

La resistencia demostrada “*in vitro*” a este antibiótico por estas cepas, podría ser debida a la adquisición de otros genes de resistencia o bien producida por mutación.

## 6 CONCLUSIONES

---

- Los métodos de extracción ensayados han permitido extraer ADN total y plasmídico, de forma sencilla, rápida y eficiente, a partir de distintos microorganismos que presentan diferencias en su pared celular.
- El método optimizado de PCR a tiempo real permite la detección y diferenciación de determinantes genéticos de resistencia a Macrólidos y Lincosamidas (genes: *mef A*, *msr A*, *erm A*, *erm B*, *Inu A*); en base a la temperatura de fusión (*Tm*), con mayor sensibilidad, rapidez, y menos riesgo de contaminación que las técnicas moleculares convencionales.
- La buena correlación entre los resultados obtenidos mediante los métodos fenotípicos (D-test) y genotípicos permiten deducir el mecanismo de resistencia a los antibióticos del complejo MLS, contribuyendo a seleccionar el tratamiento antimicrobiano más adecuado sobre todo en los casos en los que el antibiograma limita su interpretación.
- Los resultados obtenidos demuestran que la resistencia “*in vitro*” a clindamicina en 23 cepas de *Listeria* spp. aisladas de alimentos, puede estar determinada por otros mecanismos de resistencia diferentes al producido por el gen *Inu A* o por mutación; por ello sería conveniente evaluar otros determinantes genéticos de resistencia a este antimicrobiano.
- La técnica RT-PCR puede constituir una herramienta muy útil que permite estudiar la distribución de los determinantes genéticos de resistencia a los antibióticos tanto en bacterias zoonóticas como en comensales aisladas de alimentos, facilitando el seguimiento y la vigilancia de la aparición de resistencias a los antibióticos en la medida en que supongan una amenaza para la salud pública.
- Los resultados obtenidos pueden ser útiles para que la herramienta multiplex RT-PCR permita la detección simultánea de varios de estos genes de resistencia en una misma reacción de amplificación, y por lo tanto puede servir como herramienta para la detección de resistencias antimicrobianas como parte del diagnóstico microbiológico.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

---

- CA-SFM 2011. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de microbiologie, Recommandations 2011.
- CLSI 2011. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-First informational supplement. M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
- Becerra G., Plascencia A., Luévanos A., Dominguez M., Hernandez I. Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enf Inf Microbiol* 2009, 29 (2):70-76.
- Bülent Bozdogan, Latifa Berrezouga, Ming-shang Kuo, David A. Yurek, Kathleen A. Farley, Brian J. Stockman, and Roland Leclercq (1999). A New Resistance Gene, *linB*, Conferring Resistance to Lincosamides by Nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Apr. 1999, p. 925–929.
- Charpentier E, Courvalin P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrob Agents Chemot*. 1999;43:2103-2108.
- Decisión de Ejecución de la Comisión 2013/652/UE, de 12 de Noviembre de 2013 sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos
- Domínguez M.A., Coll P., Coque M. T., Vázquez J., Vila J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. Recomendación de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2005.
- Drinkovic, D., E. R. Fuller, K. P. Shore, D. J. Holland, and R. Ellis-Pegler. 2001. Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 48:315–316.
- EFSA 2011. Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals, EFSA Journal 2011; 9(8):2322.

- EFSA 2013. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. Scientific Report of EFSA and ECDC, EFSA Journal 2013; 11(5):3196
- EFSA 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011, SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC, EFSA Journal 2013,11(4):3129.
- EUCAST 2011. European Committee on antimicrobial susceptibility testing. Estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, método de difusión en disco. Versión 1.1, 8 de julio de 2010.
- Facinelli, B., E. Giovanetti, P. E. Varaldo, P. Casolari, and U. Fabio. 1991. Antibiotic resistance in foodborne listeria. Lancet 338:1272.
- Fiebelkorn K, Crawford S, McElmeel M, Jorgensen J. Practical disk diffusion methods for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci*. J. Clin. Microbiol. 2003;41(10): 4740-4744.
- Fluit C., Maarten R. Visser and Franz-Josef Schmitz, Resistance Molecular Detection of Antimicrobial, *Clin. Microbiol. Rev.* 2001, 14(4):836.
- García, J., Cantón, R., García, E., Gómez-Lus M. L. and Martínez, L. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Granier S.A., Moubareck C., Colaneri C., Lemire A., Roussel S., Dao T., Courvalin P., Brisabois A. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from food and environment in France over a 10 year period. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011 Apr;77(8):2788-90.
- INFOSAN 2008, Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos, Resistencia a los antimicrobianos transferida por animales productores de alimentos, Nota Informativa nº 2/2008.

- Jorgensen, J. and Hindler, J., (2007). New Consensus Guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 44:280–6.
- Levin TP, Suh B, Axelrod P, Truant AL, Fekete T. Potential clindamycin resistance in clindamycin-susceptible, erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*: Report of a clinical failure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:1222-4.
- Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis*. 2002;34:482-92.
- Lina G, Quaglia A, Reverdy ME *et al.* Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1062–6.
- Livermore, D. M. (2003): Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* 33 (Suppl 1): S11-23.
- Lozano C., Aspiroz C., Rezusta A. *et al.*, Identification of novel vga(A)-carrying plasmids and Tn5406-like transposon in MRSA and *S. epidermidis* from human and animal origin. *Int J Antimicrob Agents* 2012; in press.
- Lozano C., Aspiroz C., Sáenz Y., Ruiz-García M., Royo-García G., Gómez-Sanz E. Ruiz-Larrea F., Zarazaga M., Torres C. Genetic environment and location of the Inu(A) and Inu(B) genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci of animal and human origin . *J Antimicrob Chemother* 2012;67: 2804-2808.
- Lüthje P, Schwarz S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *Antimicrob Chemother* 2006;57:966–9.
- Mao, J.C.H., and Putterman, M. (1968). Acumulation in Gram-positive and Gram-negative bacteria as a mechanism of resistance to erythromycin. *J. Bacteriol.* 96:111-117.

- Merino-Díaz L., Cantos de la Casa A., Torres-Sánchez M.J. y Aznar-Martín J. Detección de resistencia inducible a clindamicina en aislados cutáneos de *Staphylococcus* spp. por métodos fenotípicos y genotípicos. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2007;25(2):77-81.
- Morar M., Bhullar K., Hughes DW. *et al.* Structure and mechanism of the lincosamide antibiotic adenylyltransferase LinB. *Structure* 2009; 17: 1649–59.
- Morosina M.I., Cercenado E., Ardanuy C., Torres C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2012;30(6):325-332
- Morvan A., Moubareck C., Leclercq A., Hervé-Bazin M., Bremont S., Lecuyi M., Courvalin P. and Le Monnier A. Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Humans in France. *Antimicrobial Agents chemother.* 2010, 54(6):2728-2731.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information).
- OIE 2004. *Listeria Monocytogenes*, Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004.
- OMS 2004. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el Consumo. Resumen interpretativo. OMS 2004.
- Pérez-Díaz J.C., Vicente M.F., Baquero F., Plasmids in Listeria. *Plasmid* 1982; 8:112-18.
- Portillo, A.; Lantero, M.; Zarazaga, M.; Gastañares, M.J.; Olarte, I.; Undabeitia, E.; Ruiz-Larrea, F.; Torres, C. 2000. Resistencia a antibióticos macrólidos-Lincosamidas-estreptograminas y mecanismos implicados en cepas clínicas de *Streptococcus* spp. en la rioja. *Zubía monográfico.* 12:11-26.
- Poyart-Salmeron, C., C. Carlier, P. Trieu-Cuot, A.-L. Courtieu, and P. Courvalin. 1990. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet* 335:1422–1426.
- Ralf S. Mueller, Eric Guaguère. Tratamiento de infecciones cutáneas. Terapia antimicrobiana sistémica. Argos nº 104, diciembre 2008.

-Rao, G. G. 2000. Should clindamycin be used in treatment of patients with infections caused by erythromycin-resistant staphylococci? *J. Antimicrob. Chemother.* 45:715–716.

-Rezanka T., Spizek J., and Sigler K. (2007). Medicinal use of lincosamides and microbial resistance to them. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* 6, 133–144.

-Reynolds E., Jeremy I. Ross, Jonathan H. Cove (2003). Msr(A) and related Macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters?. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22 (2003) 228-236.

-Rodríguez-Herrera R., Aguilar-González C. N. , Ayala-Labarrios L. A., Rocha-Revilla J.C., Padilla-García V., y Espinosa-Hernández T.C. Detección de microorganismos mediante métodos moleculares. Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila .Saltillo Coahuila. México. AQM 2009, nº1.

<http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/AQMmicroorganismos.html>

-Roberts MC, Facinelli B, Giovanetti E, Varaldo E. Transferable erythromycin resistance in *L.monocytogenes* isolated from food. *Appl Env Microbiol.* 1996;62:269-270.

-Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. Nomenclature for macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:2823-30.

-Roland Leclercq and Patrice Courvalin. Intrinsic and Unusual Resistance to Macrolide, Lincosamide, and Streptogramin Antibiotics in Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, July 1991, p. 1273-1276.

-Ruiz-Bolívar Z., Poutou-Piñales R.A., Carrascal-Camacho A.K., Resistencia antimicrobiana y a desinfectantes de *Listeria* spp. Publicación Científica EN CIENCIAS BIOMÉDICAS - Vol.6 No. 10 JULIO - DICIEMBRE DE 2008:101-236, ISSN:1794-2470.

-Schreckenberger P, Ilendo E, Ristow K. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci* in a community and a tertiary care hospital. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(6): 2777-2779.

- Siberry, G. K., T. Tekle, K. Carroll, and J. Dick. 2003. Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance in vitro. *Clin. Infect. Dis.* 37:1257–1260.
- Srinivasan V., Nam H.M., Nguyen L.T., Tamilselvam B., Murinda S.E. and Oliver S.P. Prevalence of Antimicrobial Resistance Genes in *Listeria monocytogenes* Isolated from Dairy Farms. *Foodborne Pathogens and Disease*. Volume 2, Number 3, 2005
- Slade, P. J., and D. L. Collins-Thompson. 1990. Listeria, plasmids, antibiotic resistance, and food. *Lancet* 336:1004.
- Somma M. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos, User manual, edición 2006, Sesión nº4, Extracción y Purificación de ADN. Institute for Health and Consumer Protection, European Commission, World Health Organization Regional Office for Europe.
- Steward C.D., Raney P.M., Morrel A.K., Williams P.P., Mcdougal L.K., Jevitt L., McGowan J.E., Tenover F. and Jr., J. *Clin. Microbiol.* 2005, 43(4):1716.
- Torres C., Zarazaga M. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales ¿Vamos por el buen camino? *Gaceta Sanitaria* 2002; 16(2):109-12.
- Torres C., Cercenado E., Lectura interpretada del antibiograma de cocos gran positivos. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2010;28(8):541-553.
- Torres C., Zarazaga M. Repercusiones en el hombre del consumo de antibióticos por animales. *Rev Esp Quimioterapia* 1998;11:29-35.
- Tsakaris, A., A. Papa, J. Doubovas, and A. Antoniadis. 1997. Neonatal meningitis due to multi-resistant *Listeria monocytogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.* 39:553–554.
- Vela AI, Fernandez-Garayzabal JF, Latre MV, Rodriguez AA, Dominguez L, Moreno MA. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from meningoencephalitis in sheep. *Int J. Antimicrob Age.* 2001;17:215-220.

- Vicente M.F., Baquero F., Pérez-Díaz J.C. Conjugative acquisition and expression of antibiotic resistance determinants in *Listeria* spp. *J. Antimicrob. Chemother* 1988;21:309-18.
- Weisblum, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:577-585.
- Weisblum, B. 1998. Macrolide resistance. *Drug Resist. Update* 1:29-41.
- WHO Model List of Essential Medicines. 17<sup>th</sup> list (March 2011).  
[http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95053\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95053_eng.pdf)
- WHO, Farmacorresistencia, Aparición y propagación de la resistencia a los antimicrobianos, el origen de la resistencia a los antimicrobianos. Programas y proyectos 2003.
- WHO Resistencia a los antimicrobianos (RAM), Nota descriptiva nº 194, Marzo 2012.
- WHO 2011, Comunicado de prensa, abril 2011. Urge actuar para salvaguardar el tratamiento con antibióticos.
- WHO 2001, Estrategia Mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos.