

# Métodos moleculares para diagnóstico de RAM

## Estratégias baseadas em PCR e em outros métodos moleculares aplicados na caracterização de RAM

**Dr. Diego Faccone**

Serviço Antimicrobianos, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Lab. Nacional/Regional de Referência em Resistência aos Antimicrobianos.

Centro Colaborador da OMS em Vigilância da Resistência aos Antimicrobianos.

[www.antimicrobianos.com.ar](http://www.antimicrobianos.com.ar)

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



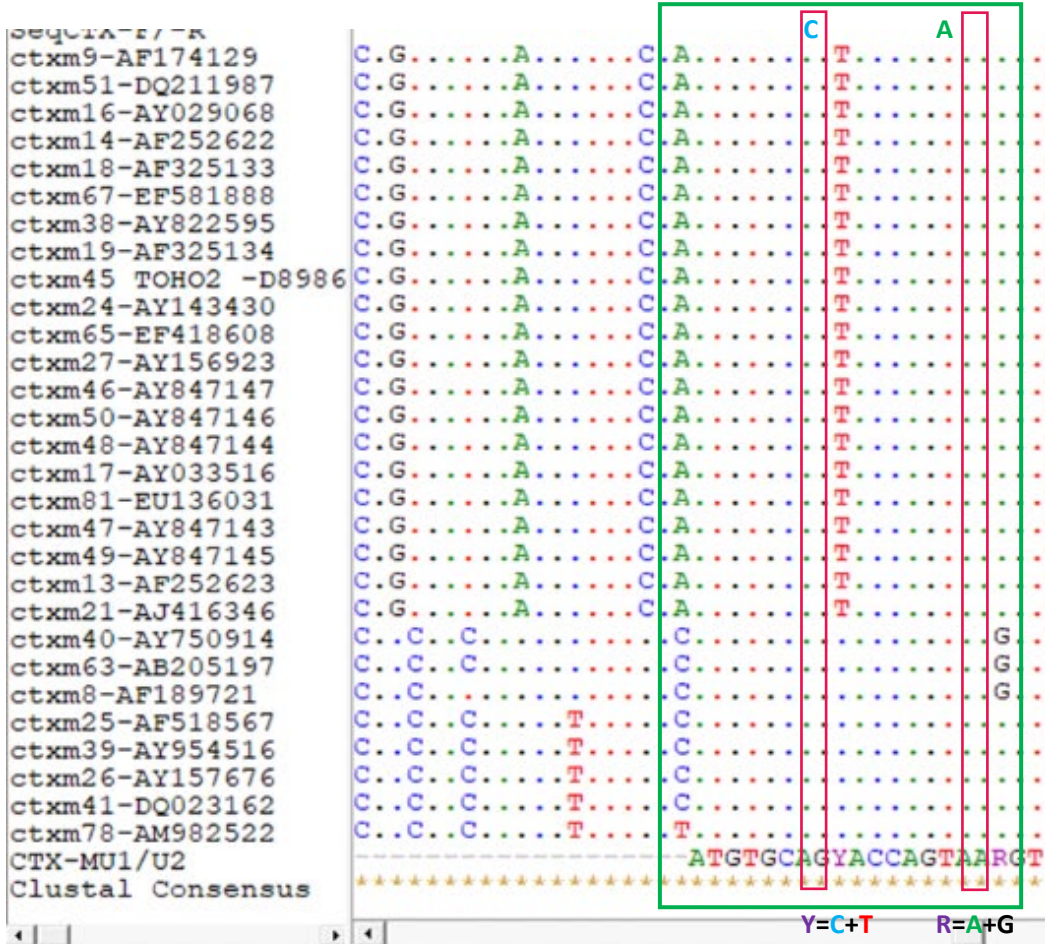
ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL  
*Proteger a los animales, preservar nuestro futuro*



Unión Europea

# Projeto de primers com bases degeneradas

## O caso do CTX-M → PRIMERS UNIVERSAIS



Nombre primer	Gen	Secuencia 5'--3'
CTX-MU1	ctx-m	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT
CTX-MU2		TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA

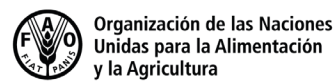
Pagani, et al, JCM 41(9):4264-4269, 2003

Tamaño amplicon	Ciclado
593 pb	Desnaturalización inicial = 94°C por 5min; Ciclado =30-35 ciclos de:94°C 30seg -- 52° 30seg -- 72°C 60seg; Extensión final = 72°C por 5min

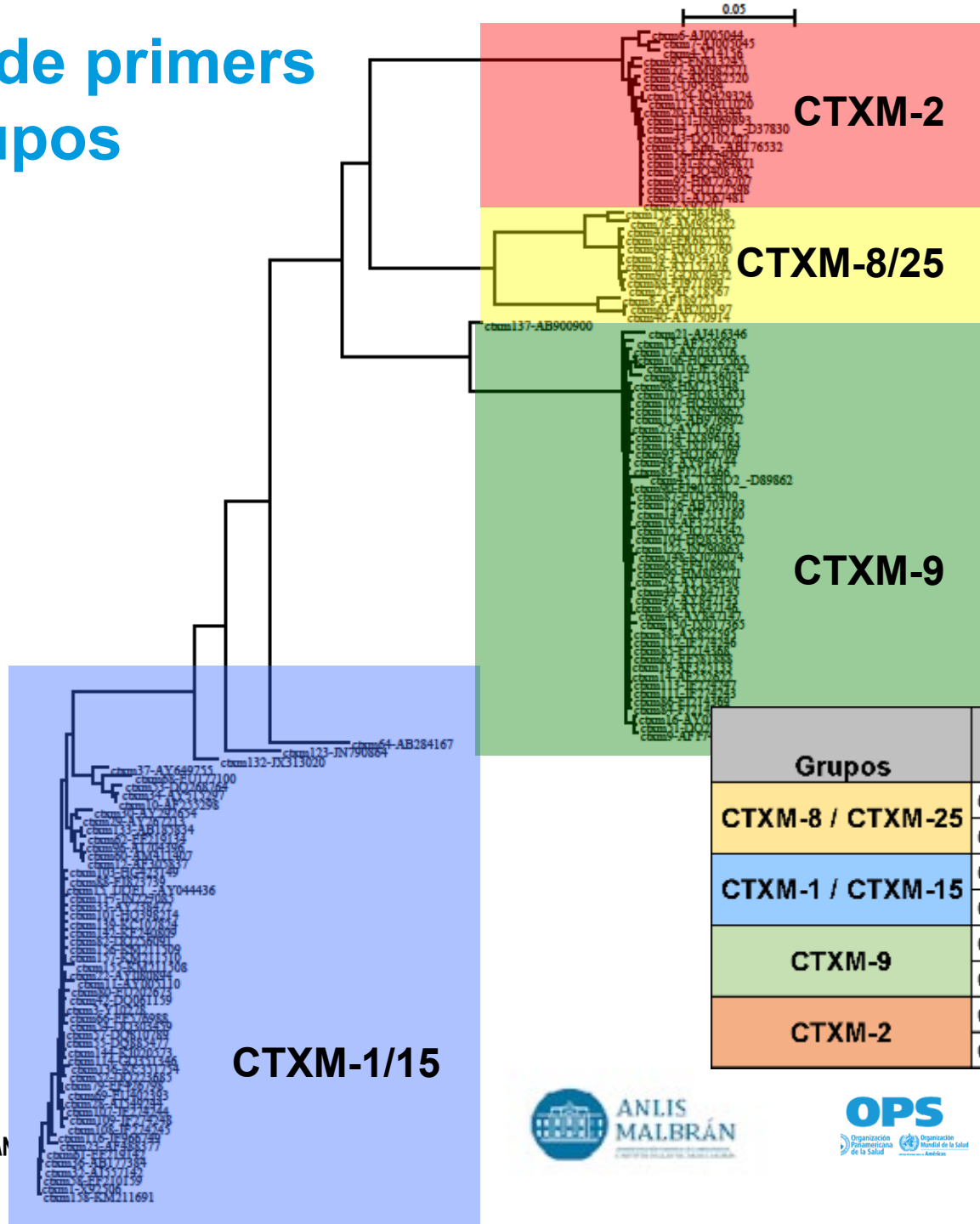
Reacción de PCR --> Vol. final = 25ul	
Reactivo	Volumen
ADN	2,5 ul
Buffer 10X	2,5 ul
MgCl2 (50 mM)	0,75 ul
dNTP's (10 mM)	0,5 ul
Tag pol (5U/ul)	0,15 ul
Primer Forward (10 µM)	1,5 ul
Primer Reverse (10 µM)	1,5 ul
H2O	15,6 ul
<b>Vol. Final</b>	<b>25 ul</b>

>> concentração de primers

TRABAJANDO JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS



# Projeto de primers para grupos



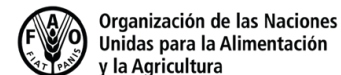
$bla_{CTX-M} = 159$  alelos

O caso do CTX-M →  
**PRIMERS POR GRUPO**

Grupos	primer	secuencia 5'-3'	amplicon
CTXM-8 / CTXM-25	CTXM8/25G-F	CTGGAGAAAAGCAGCGGGGG	604 pb
	CTXM8/25G-R	CGCTGCCGTTTTATCCCGAC	
CTXM-1 / CTXM-15	CTXM1/15G-F	CAGTTCACGCTGATGGCGACG	756 pb
	CTXM1/15G-R	CGGCGCACGATCTTTTGGCCA	
CTXM-9	CTXM9G-F	ATGGTGACAAAGAGAGTGCAACG	808 pb
	CTXM9G-R	GCGGCTGGGTAAAATAGGTCACC	
CTXM-2	CTXM2G-F	GCCGCTCAATGTTAACGGTGA	851 pb
	CTXM2G-R	ACCGTGGGTTACGATTTTCGC	

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIAN

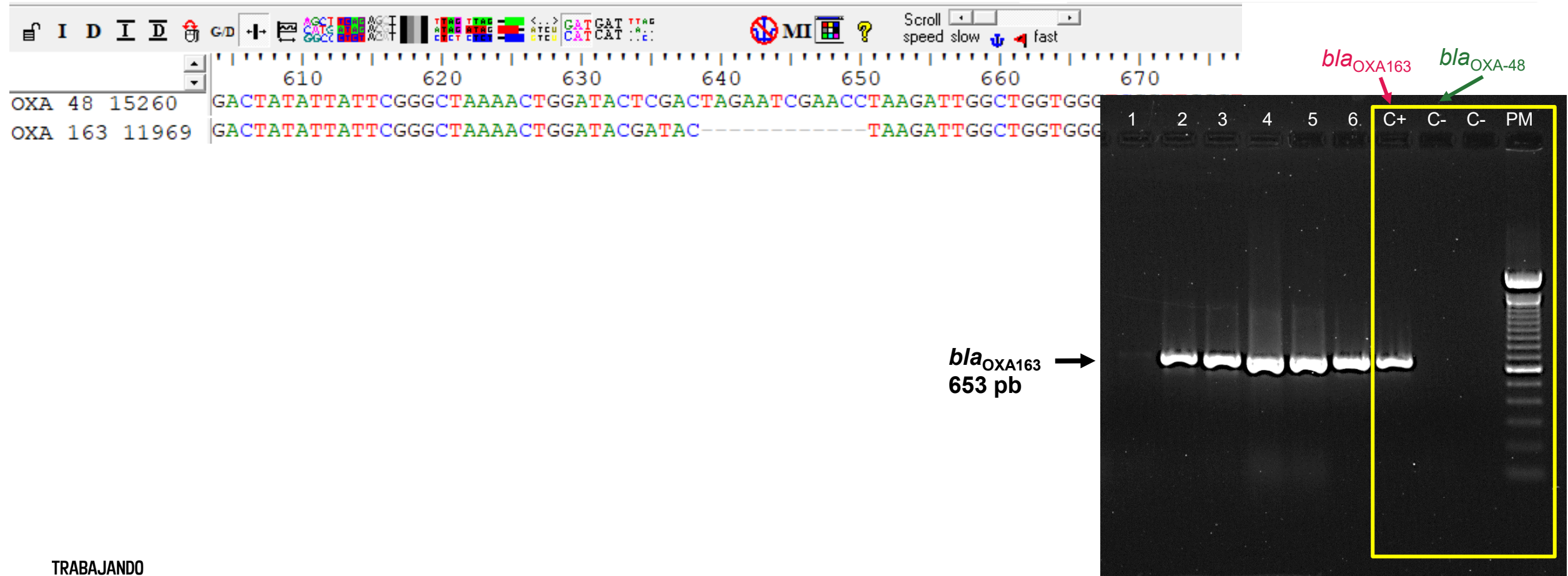
CTXM-1/15



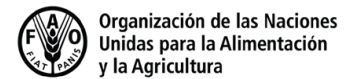


# Projeto de primers para discriminação de alelos

## Discriminação entre OXA-48 e OXA-163



TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



# Detecção de clones por PCR multiplex

## Rapid Identification of Major *Escherichia coli* Sequence Types Causing Urinary Tract and Bloodstream Infections

M. Doumith,<sup>a</sup> M. Day,<sup>a</sup> H. Ciesielczuk,<sup>a,b</sup> R. Hope,<sup>a</sup> A. Underwood,<sup>a</sup> R. Reynolds,<sup>c</sup> J. Wain,<sup>d</sup> D. M. Livermore,<sup>a,d</sup> N. Woodford<sup>a,b</sup>

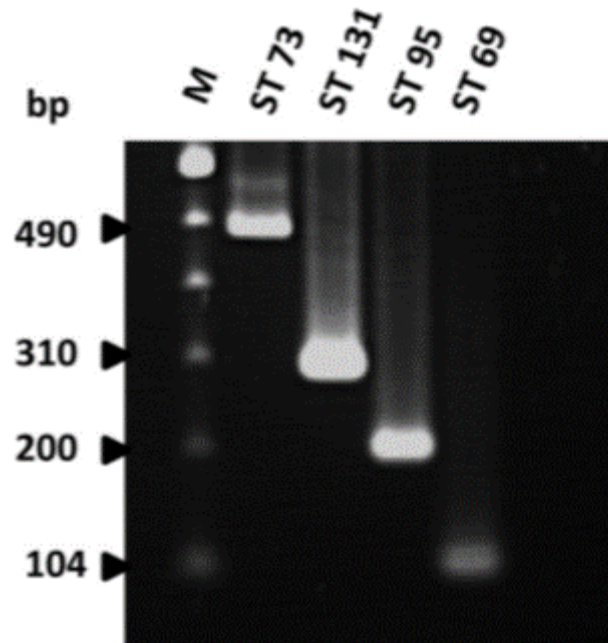


FIG 1 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments generated by the new multiplex PCR for the four major *E. coli* STs. Lane M, 100-bp ladder (Invitrogen, Paisley, United Kingdom).

### Identificação rápida de clones clinicamente relevantes:

- ST73/ST95/ST69** sensíveis à maioria dos ATB  
→ Tratamento ideal
- ST131** resistente a múltiplas drogas  
→ carbapenem para complicadas;  
→ fosfomicina o nitrofurantoina para ITU
- Nenhum destes ST  
→ Tratamento empírico conforme guias.

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones  
Unidas para la Alimentación  
y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL  
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro

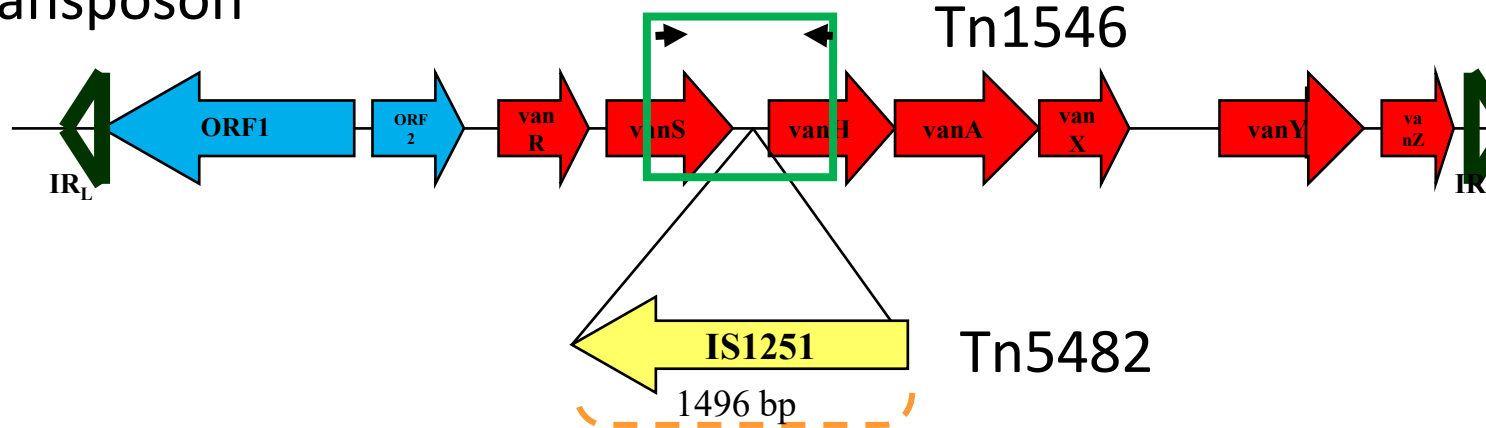


Unión Europea

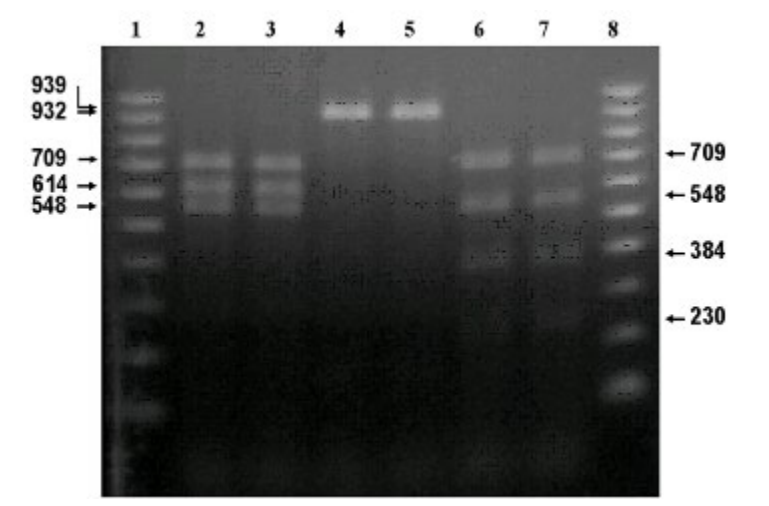
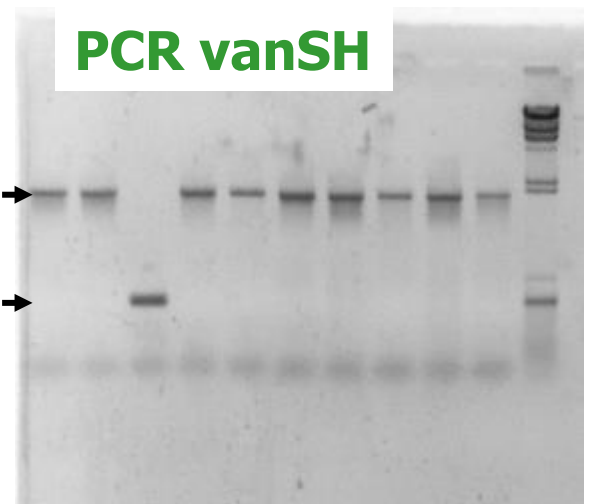
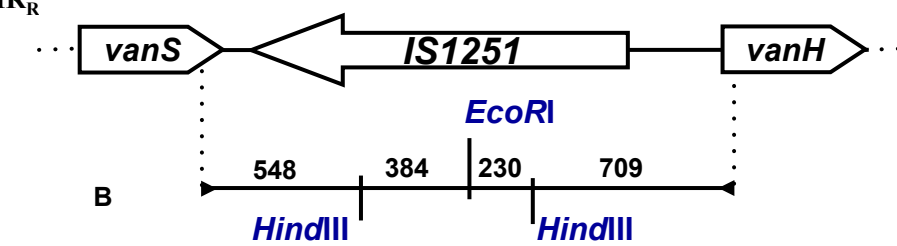
# Outras aplicacións PCR de ponto final

## Mapeamento de plataformas

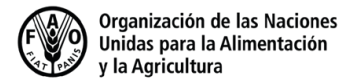
Transposon



A **PCR-RFLP vanSH**



TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



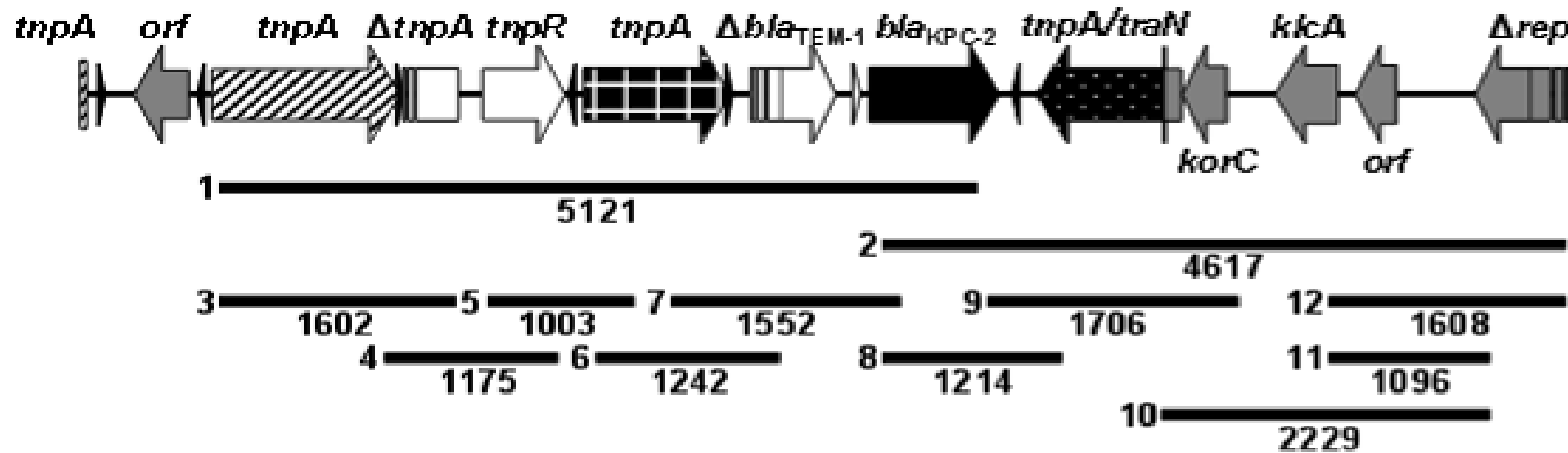
Corso A. et al. IJID. 11:69-75. 2007.



# Outras aplicacións PCR de ponto final

## Mapeamento de plataformas

### Mapeamento por PCR de variantes de *Tn4401*



Gomez, *Clin Microbiol Infect*, 2011

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

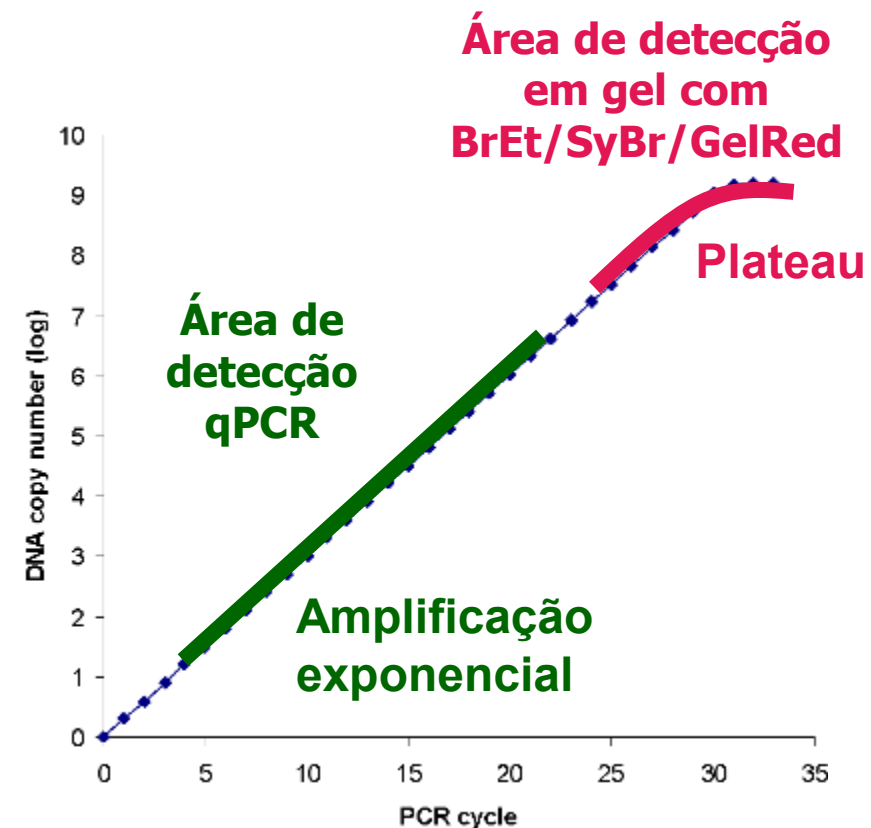




# PCR de ponto final

vs.

# PCR quantitativo (qPCR) ou PCR em Tempo Real



- Detecção de genes em tempo real
- Quantificação de ácido nucleico
- > velocidade dos resultados
- < contaminação
- > especificidade

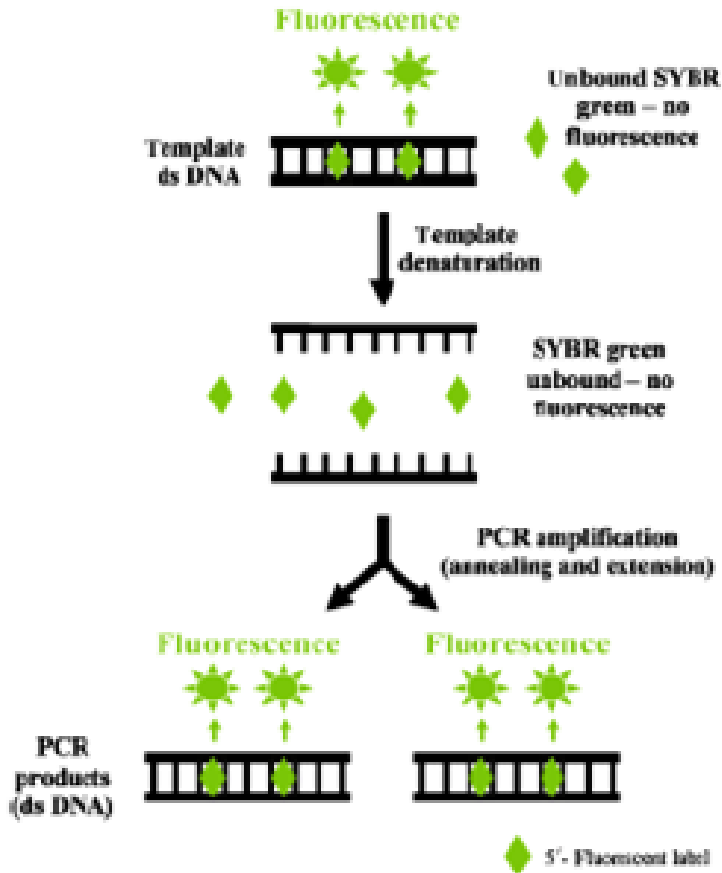
TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

# PCR quantitativo (qPCR)

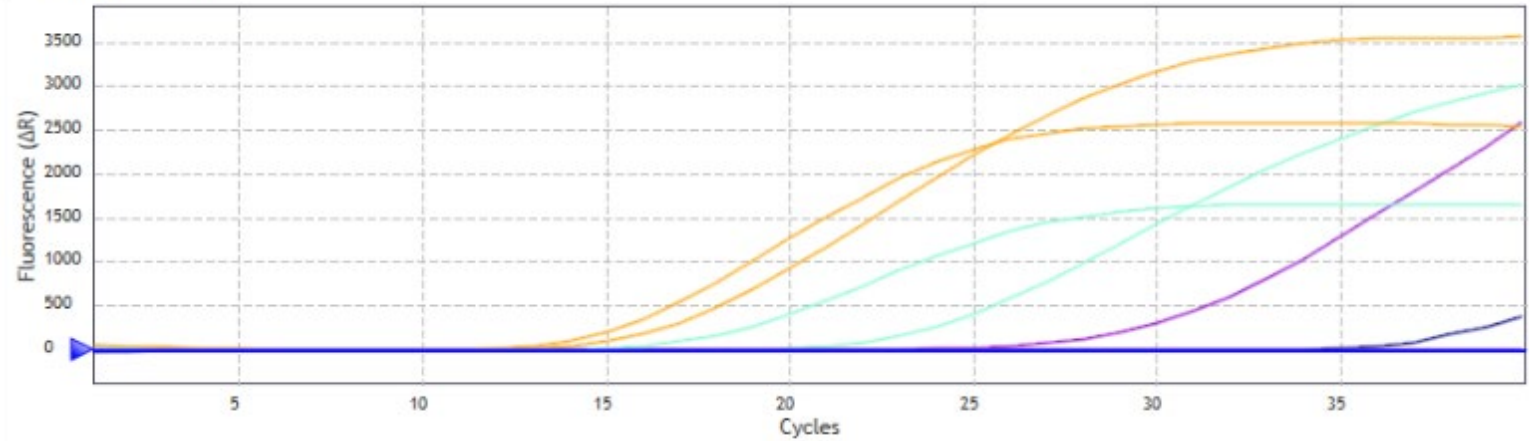
## SYBR-Green

- Econômico
- Fácil de usar
- Sensibilidade
- União à cadeia dupla

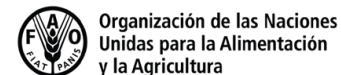
(a) SYBR green assays



Amplification Plots



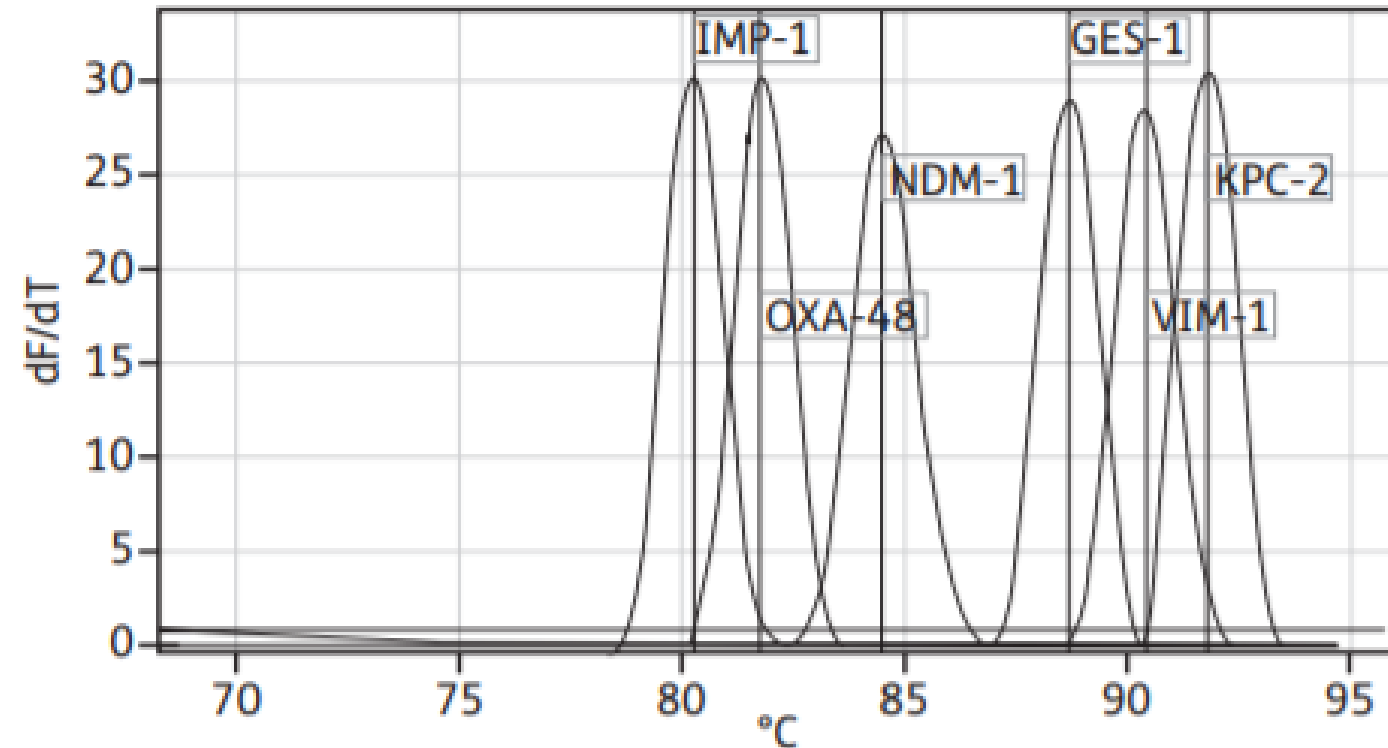
TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



## SYBR-Green

### Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR

Jussimara Monteiro<sup>1,2</sup>, Raymond H. Widen<sup>1</sup>, Antonio C. C. Pignatari<sup>2</sup>, Carly Kubasek<sup>1</sup> and Suzane Silbert<sup>1\*</sup>



**Figure 1.** Results from the real-time multiplex PCR melting curves of the amplicons generated by primers targeting the six carbapenemases types. The gene targets, from left to right, are as follows: *bla*<sub>IMP</sub> type ( $T_m$  80.1°C), *bla*<sub>OXA-48</sub> ( $T_m$  81.6°C), *bla*<sub>NDM-1</sub> ( $T_m$  84°C), *bla*<sub>GES</sub> type ( $T_m$  88.4°C), *bla*<sub>VIM</sub> type ( $T_m$  90.3°C) and *bla*<sub>KPC</sub> type ( $T_m$  91.6°C).

# PCR quantitativo (qPCR) com sonda

Específico  
Sensibilidade  
Multiplex

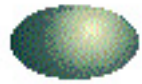
Custo

## Sistema Taqman

ADN molde

ACCTG TACTCGGCTAAG  
TGGACATGAGCCGATTC

Polimerasa



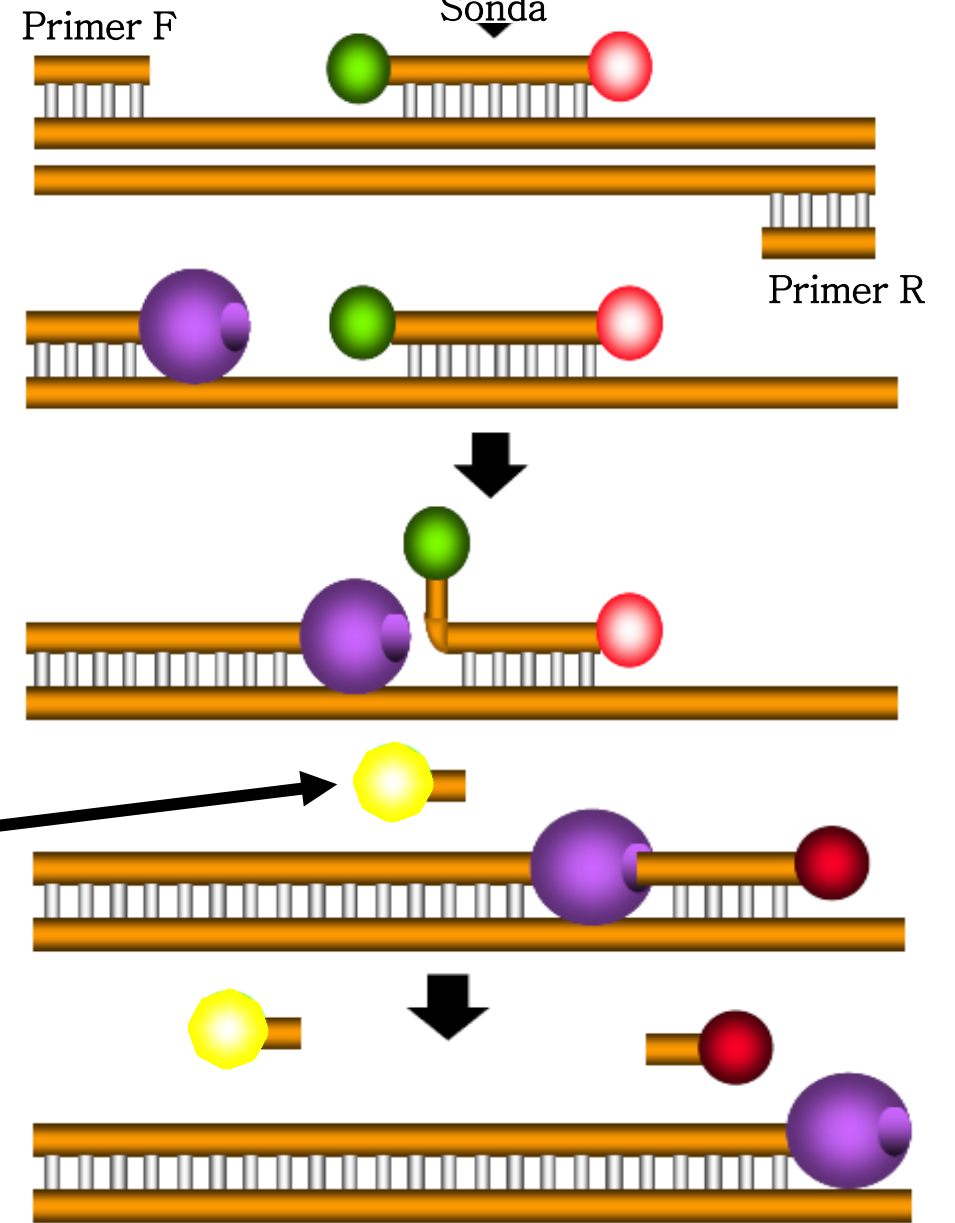
Primers



dNTPs

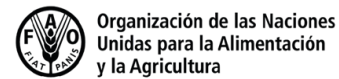
C A T G  
T T T T

TaqMan Probe



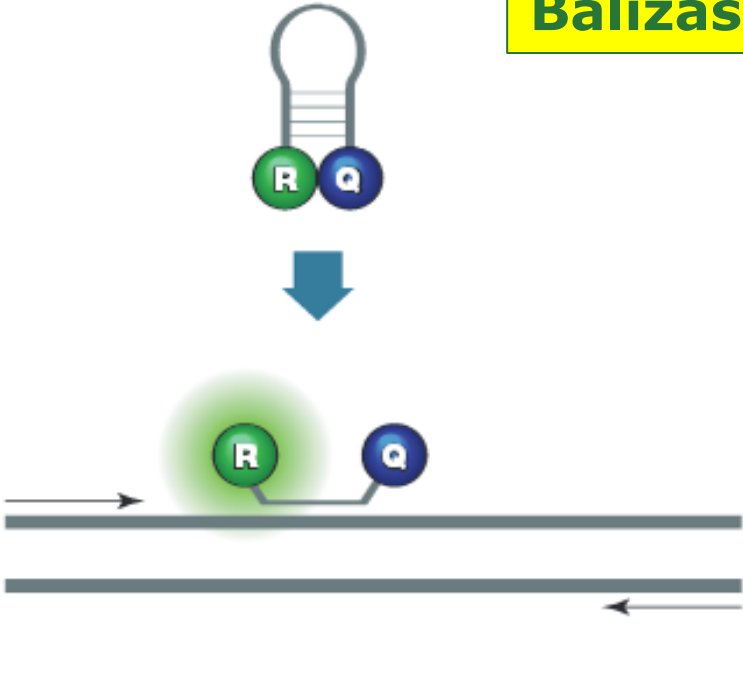
Emissão de fluorescência  
(diversos fluoróforos →  
multiplex)

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



# PCR quantitativo (qPCR) com sonda

## Molecular Beacons/ Balizas moleculares

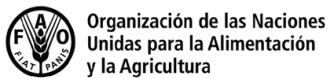


Molecular beacons are hairpin probes with reporter and quencher

During annealing, the probe binds to the target sequence to separate reporter and quencher. The reporter fluoresces

-  Reporter
-  Quencher

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



# PCR cuantitativo (qPCR)

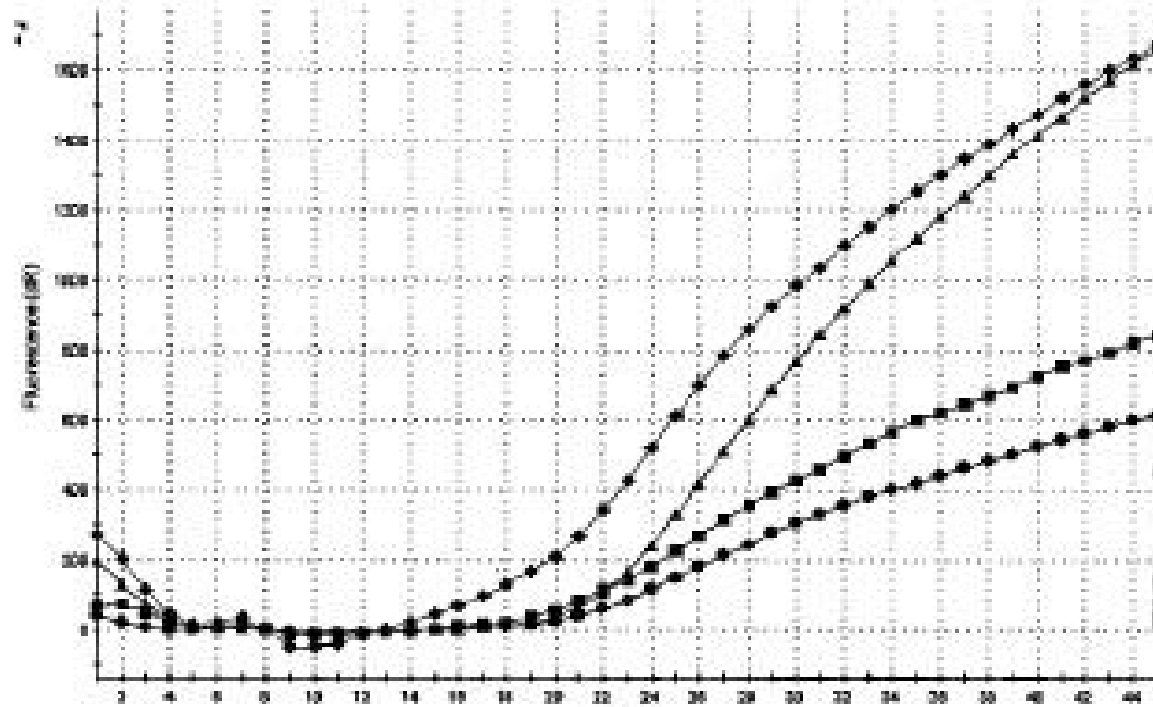
## Sonda (ex. Taqman)

Específico

Custo

Sensibilidad

Multiplex



gene A  
gene B

gene C

gene D

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones  
Unidas para la Alimentación  
y la Agricultura

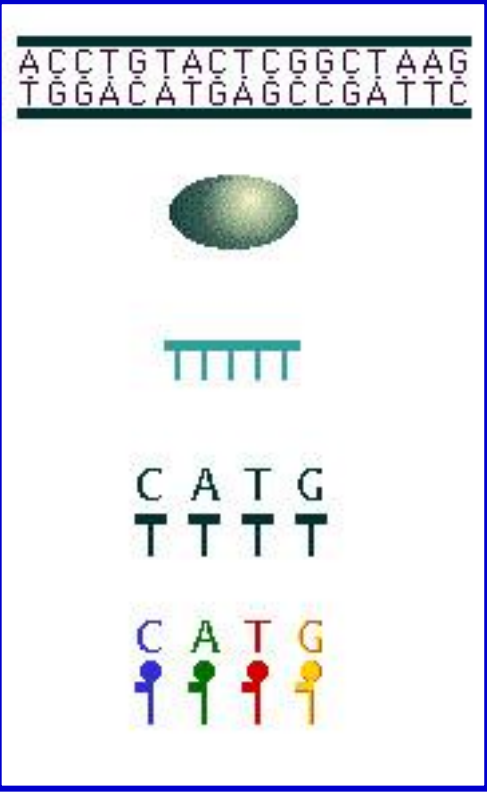
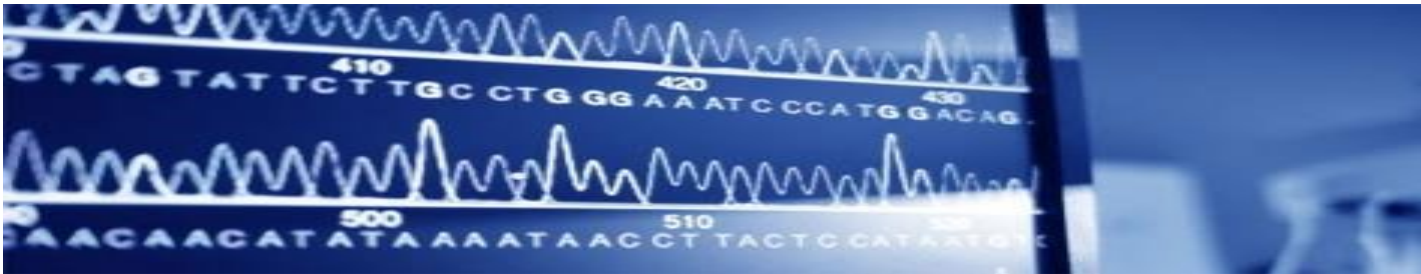


ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL  
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro

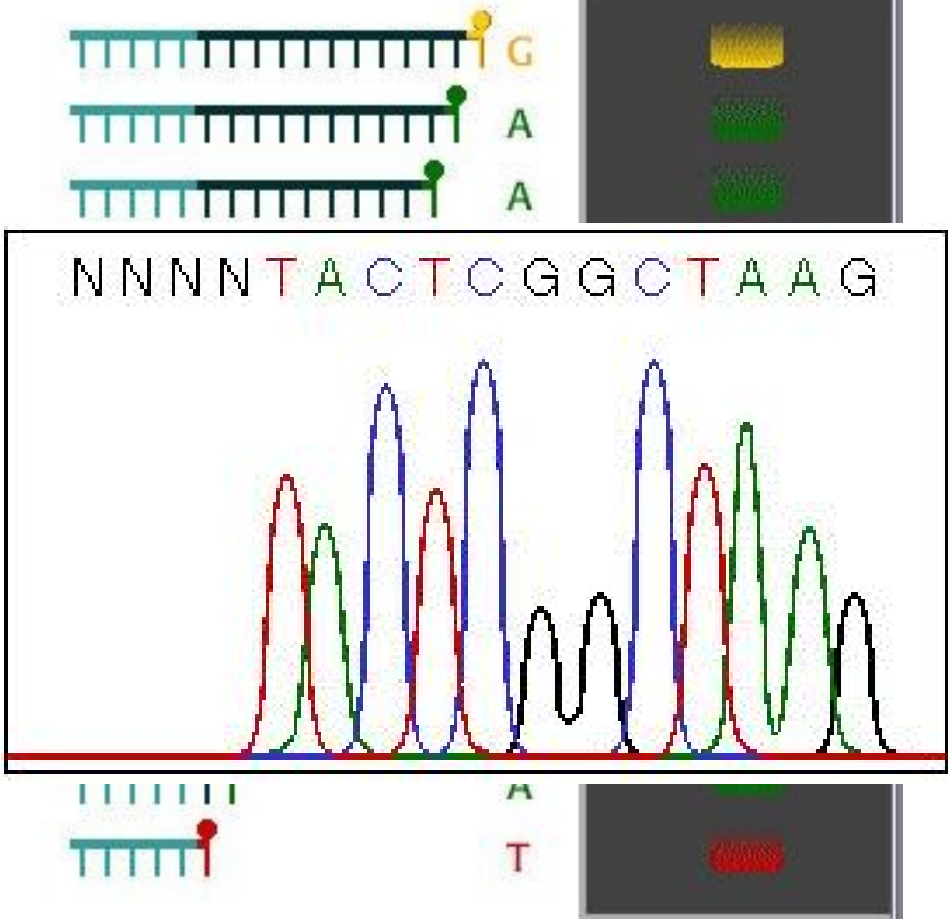
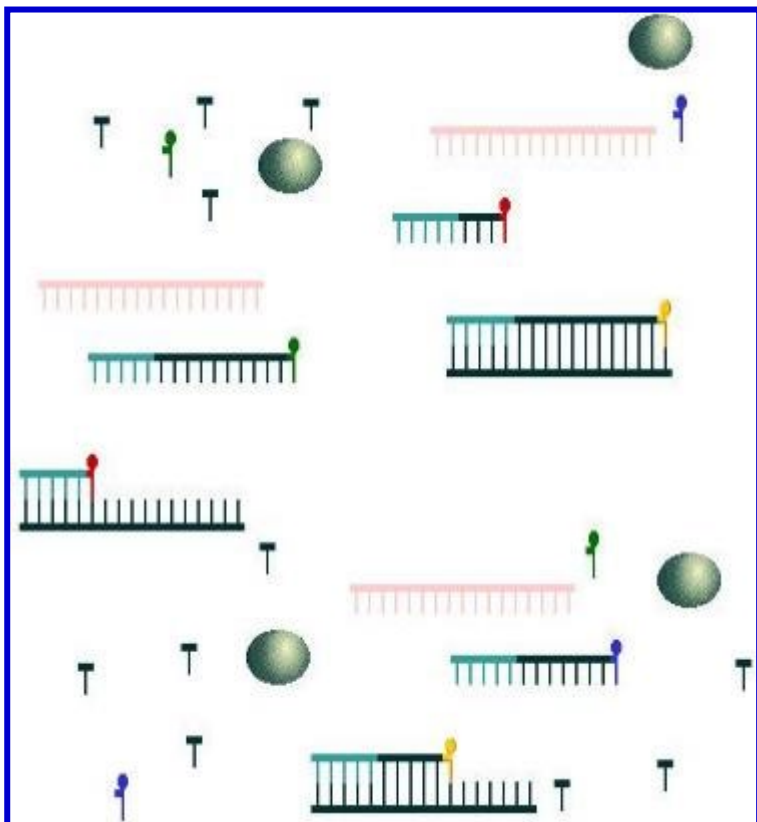


# Sequenciamento de ácidos nucleicos

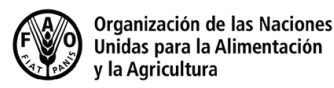
## Método de Sanger



ADN molde  
 Polimerasa  
 primer  
 dNTP's  
 dideoxi-dNTP's



TRABAJANDO JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS



# Sequenciamento de ácidos nucleicos Sanger

GYRSAL	CAATGACTGGAACAAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATC	110
5400	CAATGACTGGAACAAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATC	65
90400	CAATGACTGGAACAAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATC	65
90500	CAATGACTGGAACAAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATC	65
15400	CAATGACTGGAACAAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATC	65
42300	-----ACAAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATC	44
	*****	
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <span>Ser #3</span> <span>Codón 87</span> </div>	
GYRSAL	GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATGACAC	FCGTATGG
5400	GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATAACAC	FCGTATGG
90400	GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATAACAC	FCGTATGG
90500	GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATAACAC	FCGTATGG
15400	GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATACAC	FCGTATGG
42300	GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATACAC	FCGTATGG
	*****	
GYRSAL	CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC	220
5400	CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC	175
90400	CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC	175
90500	CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC	175
15400	CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC	175
42300	CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC	154
	*****	



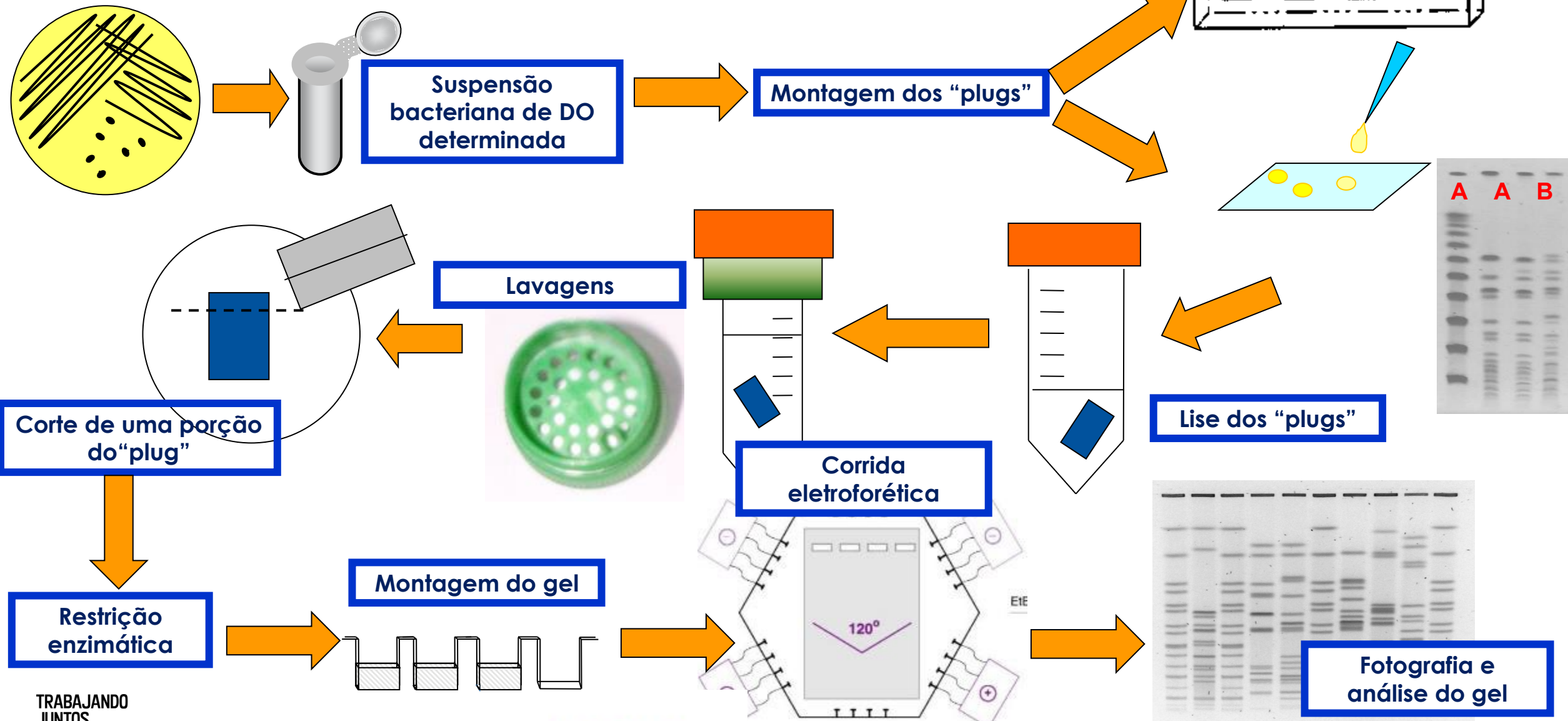
# Tipagem molecular bacteriana

## APLICACIÓN CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA

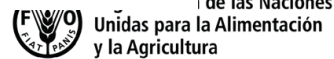
- Confirmação de surto
- Determinação de reinfecção ou recorrência em um paciente
- Disseminação intra e inter-hospitalar de clones
- Vigilância epidemiológica de clones geográfica e temporalmente
- Caracterização de Doenças Transmitidas por Alimentos
- Caracterização de Doenças Zoonóticas

**Essas técnicas buscam confirmar hipóteses epidemiológicas, não são técnicas de uso rotineiro!**

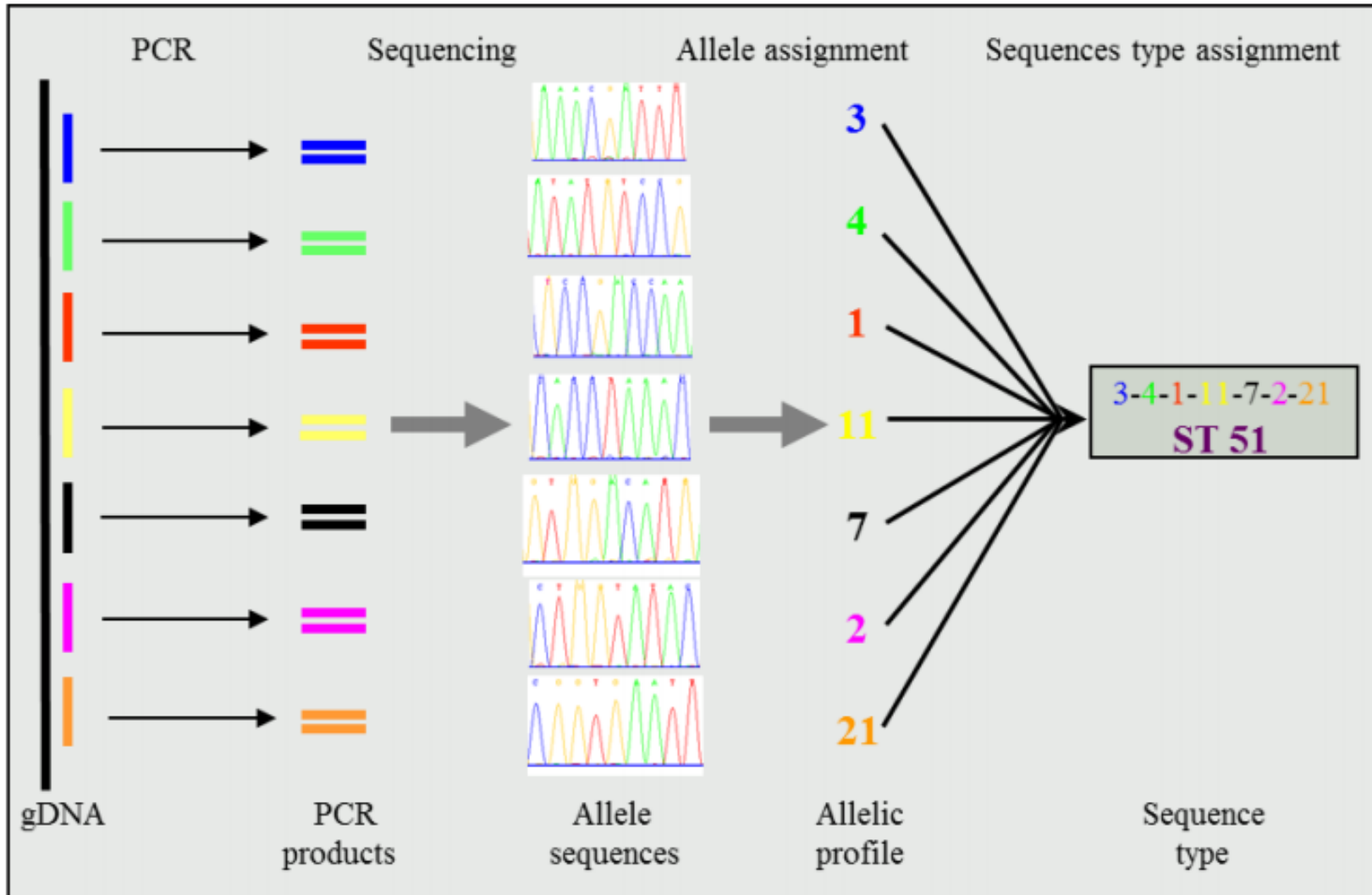
# ELETROFORESE DE CAMPO PULSADO (PFGE)



TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



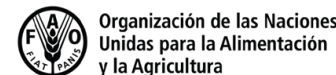
# MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)



- Genes que codificam proteínas com funções metabólicas centrais (*core*) / *housekeeping genes*
- **Conservados**
- **Transmitidos verticalmente**
- **Única copia**
- Os genes seleccionados devem ser **fisicamente distanciados** para minimizar possíveis *linkage* genético de locis.

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

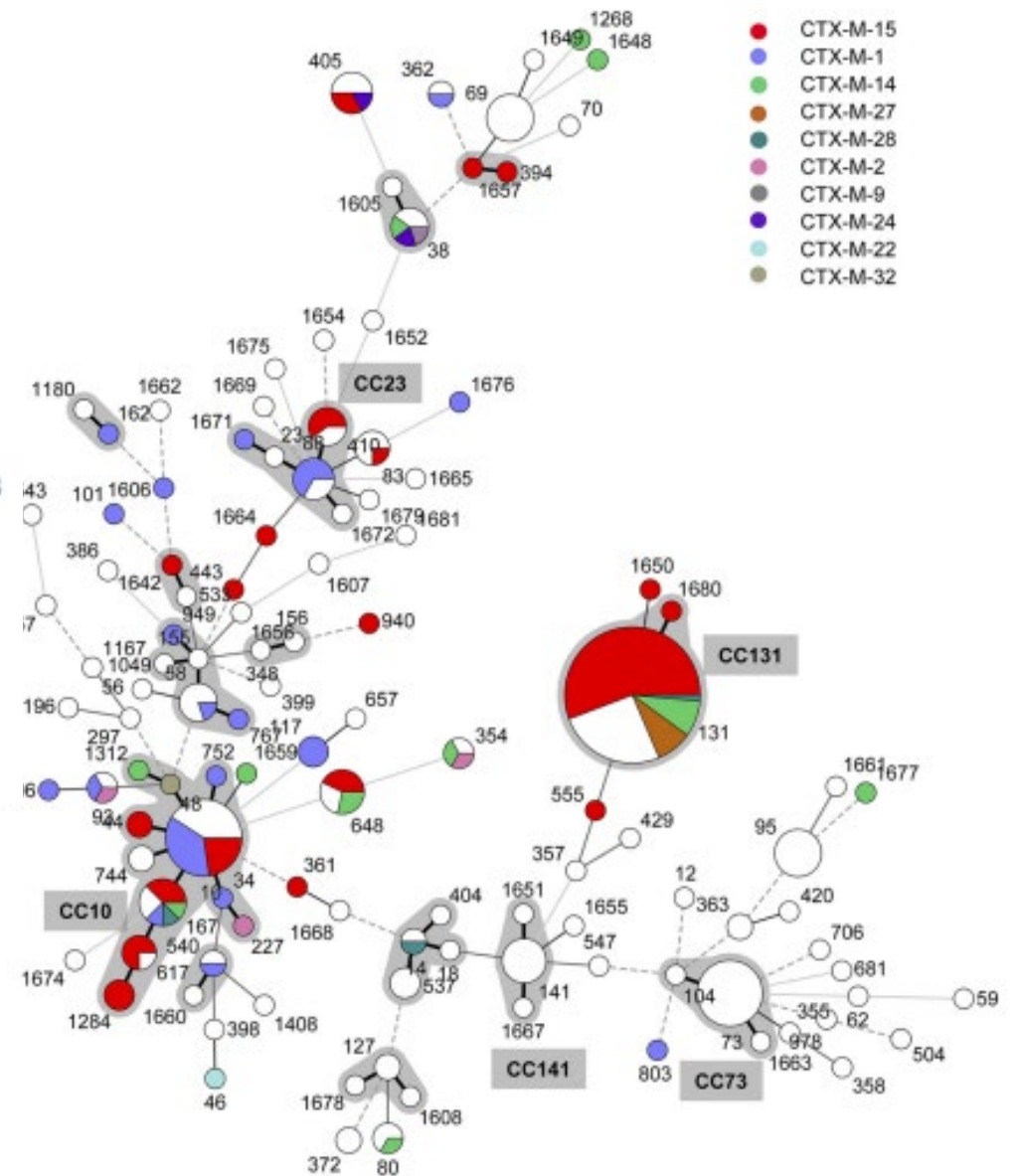
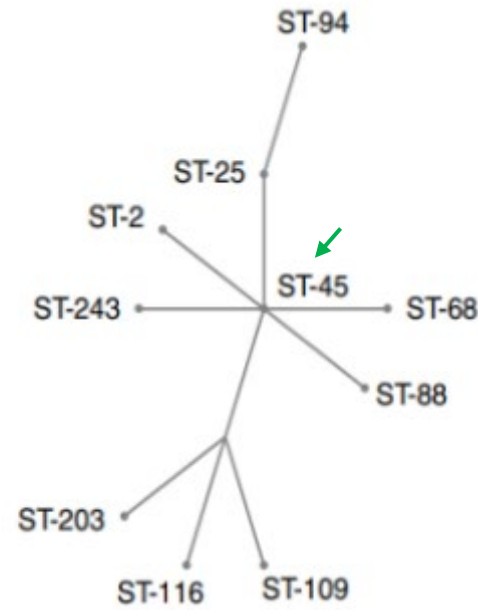
Ruppitsch, W. J. Land Manag., Food and Environm. 67: 199–224, 2016.



# MULTILOCUS SEQUENCE TYPING

## (MLST)

	aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkf	uncA
ST-45	4	7	10	4	1	7	1
ST-2	4	7	51	4	1	7	1
ST-25	4	7	10	1	1	7	1
ST-94	4	7	10	1	1	1	1
ST-68	4	7	10	4	32	7	6
ST-88	4	7	10	4	36	28	1
ST-243	4	7	10	3	42	7	1
ST-109	2	7	10	4	1	7	5
ST-116	26	7	10	5	1	7	21
ST-203	17	7	10	30	1	7	4



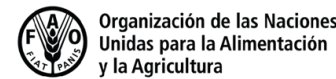
**Figure 2**

Clonal complex structures as revealed by MLST data. Clonal complexes are currently defined informally, by defining a central genotype and related genotypes, i.e., those that share up to four identical MLST loci. Identifying the central genotype depends on their frequency in samples of the population in question, their longevity, and a central position when analyzed by a variety of heuristic techniques. Once a central genotype is assigned, the MLSTdBN software can identify all members of a clonal complex automatically. The figure shows the allelic profiles of members of the *C. jejuni* ST-45 complex visualized by split decomposition.

Maiden. Annu. Rev. Microbiol. 2006. 60:561–88

Brisse. JCM.50:2974-81.2012

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



# Caracterização de *E. coli* de amostras fecais de suínos da Argentina

20 perfis de resistência

Profile of resistance								No. Isolates	MDR
C3G	TET	CMP	CIP	SXT	COL	GEN	FOS		
								5	NO
								3	NO
								2	NO
								3	YES
								2	YES
								2	YES
								2	YES
								2	YES
								2	YES
								1	YES
								1	YES
								1	YES
								1	YES
								1	YES
								1	YES
								1	YES
								1	YES
								1	YES
								1	YES
								1	YES
								1	YES
								1	YES
								1	YES

10 (29%)  
24 (71%)

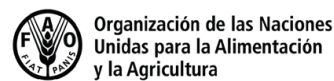
**34 *E. coli* de 31 amostras fecais de leitões** com diarreia e porcos saudáveis de duas fazendas em San Luis e Entre Ríos.  
Seleção em ágar Mac Conkey com 2 mg/mL colistina e/ou 4 mg/mL de cefotaxima.

**PCR**

- 28 *E. coli* resistentes às cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração
  - $bla_{CTX-M} = 24$
  - $bla_{CMY} = 3$
  - $bla_{PER-2} = 1$
- 12 *E. coli* resistentes à colistina
  - $mcr-1 = 12$

Fig. 1. Resistance profile of *Escherichia coli* (n=34) isolated from pigs. C3G, third-generation cephalosporin; TET, tetracycline; CMP, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; COL, colistin; GEN, gentamicin; FOS, fosfomycin; MDR, multidrug-resistant.

TRABAJANDO JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS



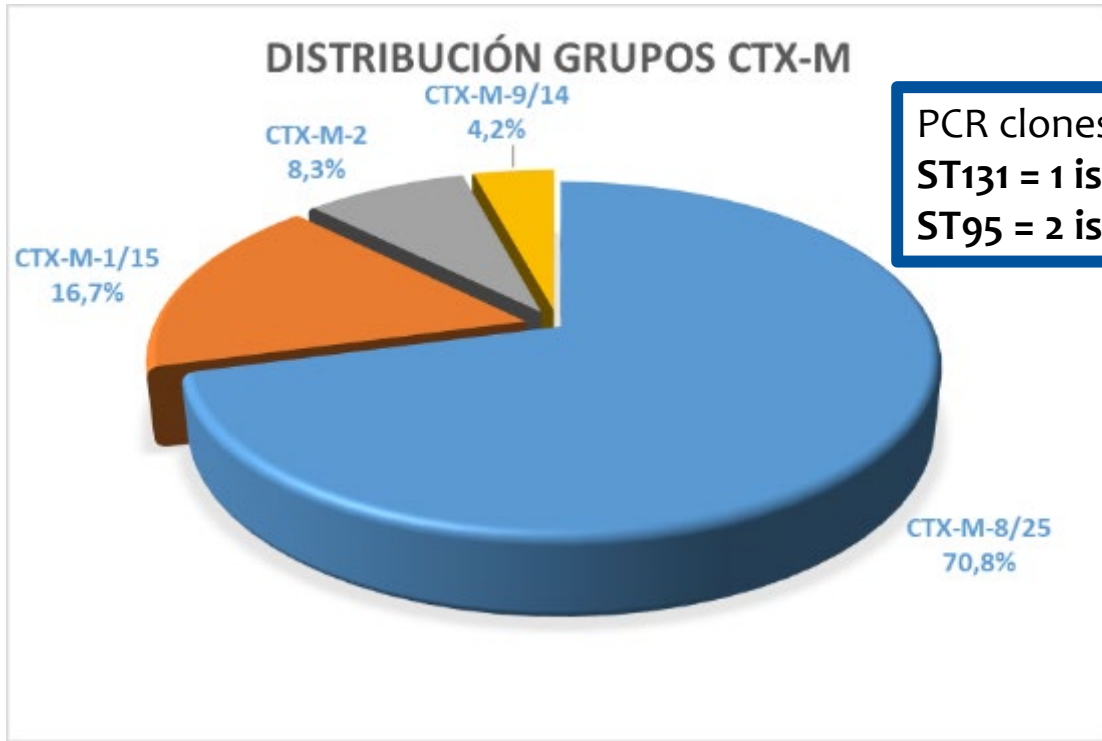
Short Communication

Multidrug-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes isolated from swine in Argentina

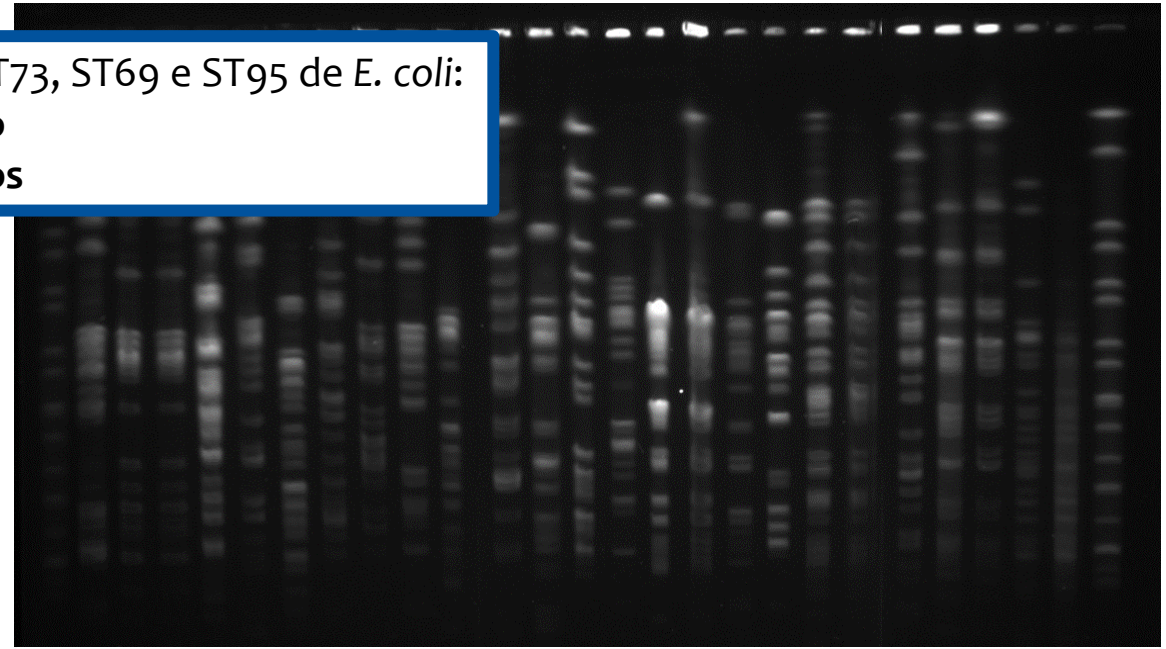
Diego Faccone<sup>a,b</sup>, Fabiana A. Moredo<sup>c</sup>, Gabriela I. Giacoboni<sup>c</sup>, Ezequiel Albornoz<sup>a</sup>, Laura Alarcón<sup>d</sup>, Victorio F. Nievas<sup>c</sup>, Alejandra Corso<sup>a,\*</sup>



# Caracterização de *E. coli* de amostras fecais de suínos da Argentina



PCR clones ST131, ST73, ST69 e ST95 de *E. coli*:  
ST131 = 1 isolamento  
ST95 = 2 isolamentos



Alta diversidade genética → 29 perfis de PFGE

**CONCLUSÕES:** Os isolamentos de *E. coli* recuperados de leitões com diarreia e suínos saudáveis portadores de ESBL e/ou genes *mcr-1*. A resistência às cefalosporinas de 3ª geração foi associada à presença de ESBL tipo CTX-M e, em particular, a variante CTX-M-8/25. Clones de *E. coli* geralmente associados a infecções humanas foram detectados em suínos.

TRABAJANDO JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

# Multilocus sequence typing and *bla*<sub>ESBL</sub> characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy humans and swine in Northern Thailand

## Caracterização de *E. coli* produtora de ESBL de pacientes e porcos saudáveis

409 exames de cotonetes pessoas (223) e suínos (186) saudáveis.

Seleção em ágar Mac Conkey com 4 mg/mL de ceftriaxona.

212 *E. coli* produtores de ESBL: humanos (111) e suínos (101).

**Table 3** Distribution of *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, and *bla*<sub>SHV</sub> in ESBL-*E. coli* isolated from healthy people (n=111) and swine (n=101)

<i>bla</i> genes	Number of isolates		
	Healthy humans (n=111)	Healthy swine (n=101)	Total (n=212)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	46	32	78
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	1	0	1
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	57	63	120
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	3	1	4
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	4	5	9

203  
95,8%

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

# Caracterização de *E. coli* produtora de ESBL de pacientes e porcos saudáveis

Chakkrachong Seenama<sup>1,2</sup>  
 Visanu Thamlikitkul<sup>2</sup>  
 Panan Rattawongjirakul<sup>3</sup>

Infection and Drug Resistance

Dovepress  
 open access to scientific and medical research

Open Access Full Text Article

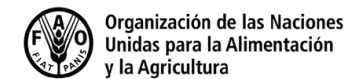
ORIGINAL RESEARCH

Multilocus sequence typing and *bla*<sub>ESBL</sub> characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy humans and swine in Northern Thailand

**Table 6** Distribution of the clonal complexes and their sequence type members detected in ESBL-*E.coli* isolates from humans and swine

	Clonal complex	Number of isolates				
		Sequence types	Healthy humans (n=59)	Sequence types	Healthy swine (n=73)	Total (n=132)
CC10 (ST10)	CC 10	ST 10, 34, 48, 617	18	ST 10, 34, 48, 218	30	48
	CC 14	ST 1193	2	ST 1193	1	3
	CC 23	ST 23, 410	5	ST 23, 410	9	14
	CC 38	-	-	ST 38	4	4
	CC 46	-	-	ST 46	2	2
	CC 86	ST 86	1	ST 86	1	2
	CC 95	ST 142	1	-	-	1
	CC 101	ST 101	8	ST 101	1	9
CC131 (ST131)	CC 131	ST 131	17	ST 131	7	24
	CC 155	ST 55, 56, 58	5	ST 58, 155	9	14
	CC 156	-	-	ST 156	3	3
	CC 165	-	-	ST 165	2	2
	CC 168	ST 93	1	ST 168	2	3
	CC 206	-	-	ST 206	1	1
	CC 405	-	-	ST 405	1	1
	CC 648	ST648	1	-	-	1

TRABAJANDO  
 JUNTOS  
 PARA COMBATIR  
 LA RESISTENCIA  
 A LOS ANTIMICROBIANOS





# Caracterização de *E. coli* produtora de ESBL de pacientes e porcos saudáveis

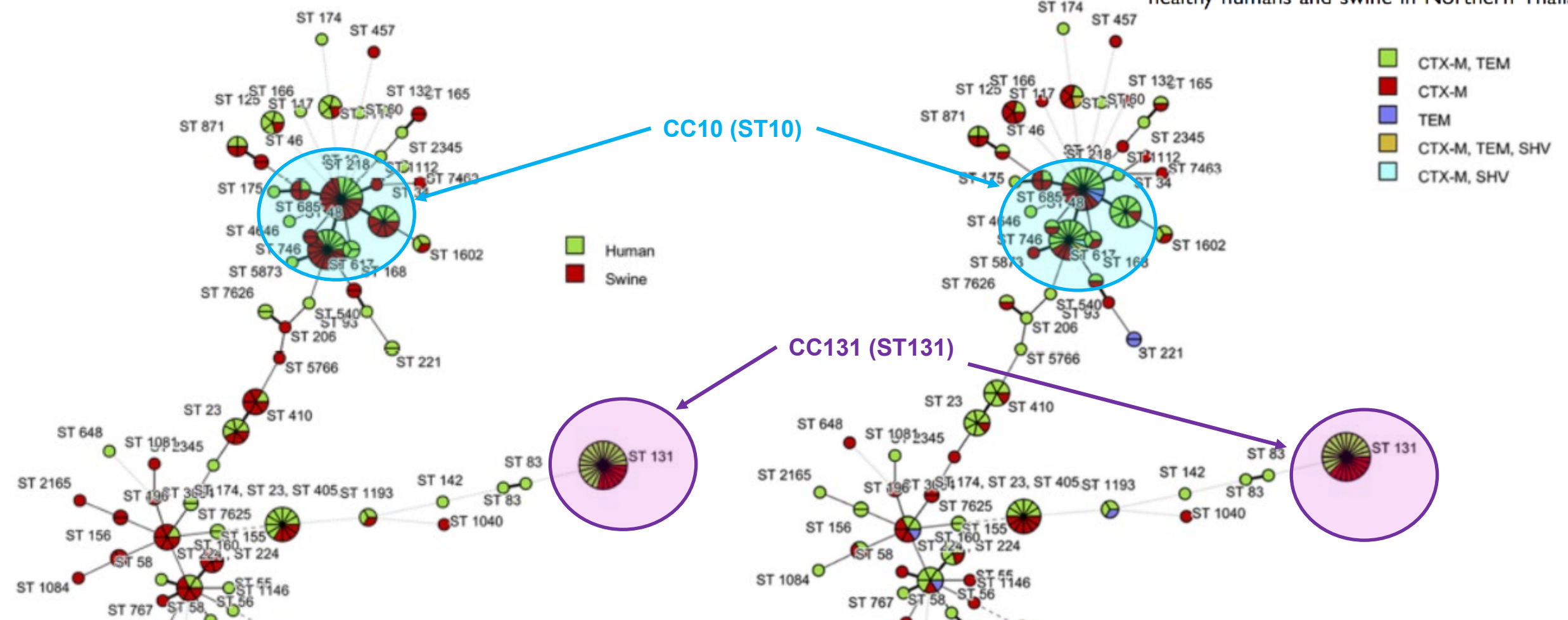
Chakkrachong Seenama<sup>1,2</sup>  
Visanu Thamlikitkul<sup>2</sup>  
Panan Ratthawongjirakul<sup>3</sup>

Infection and Drug Resistance

Dovepress  
open access to scientific and medical research

ORIGINAL RESEARCH

Multilocus sequence typing and *bla*<sub>ESBL</sub> characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy humans and swine in Northern Thailand



**CONCLUSÕES:** Os isolamentos de *E. coli* portadores de ESBL de pessoas saudáveis e suínos compartilhavam STs idênticos, sugerindo uma possível ligação epidemiológica ou transmissão entre esses hospedeiros. Isso também indica que pessoas saudáveis e porcos de fazenda são reservatórios de genes de resistência.

# EXEMPLO DE SITUAÇÕES POSSÍVEIS....

## Observação

## Pergunta

## Ação

### SITUAÇÃO: VIGILÂNCIA

Resistência às cefalosporinas de terceira geração

É uma beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) ou um AmpC?

- Diferencie ESBL de AmpC do antibiograma inicial

### SITUAÇÃO: PESQUISA EPIDEMIOLÓGICA MOLECULAR

Atividade positiva de ESBL e/ou AmpC

Qual gene está presente?

- PCR para o gene *bla*<sub>CTX-M</sub> e/ou *bla*<sub>CMY</sub>

PCR positivo para *bla*<sub>CTX-M</sub> e/ou *bla*<sub>CMY</sub>

Qual variante alélica está presente?

- Opcional: PCR de grupo ou PCR e sequenciamento Sanger

- Atividade ESBL positiva  
- PCR negativo para *bla*<sub>CTX-M</sub> e/ou *bla*<sub>CMY</sub>

Qual ESBL é?

- Consulte o LNR  
PCR Genes adicionais /clonado e sequenciamento Sanger/WGS

# EXEMPLO DE SITUAÇÕES POSSÍVEIS....

## Observação

## Pergunta

## Ação

### SITUAÇÃO: VIGILÂNCIA E DETECÇÃO DA PRIMEIRA CARBAPENEMASE

Resistência às cefalosporinas de terceira geração

O isolamento é resistente aos carbapenêmicos?

- Avaliar a sensibilidade aos carbapenêmicos

Resistência aos carbapenêmicos

É uma carbapenemase?

- Ensaios fenotípicos confirmatórios da atividade da carbapenemase

Atividade positiva de carbapenemases

Qual gene está presente?

Derivar ao LNR:

- PCR para carbapenemases mais comuns

Que variante é?

- Sequenciamento Sanger

Ele é um clone relevante?

- Tipagem molecular: PFGE / MLST / WGS

***MUITO OBRIGADO!!!***

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

