

# Métodos moleculares para diagnóstico de RAM

## Estrategias basadas en PCR y otros métodos moleculares aplicados en la caracterización de la RAM

**Dr. Diego Faccone**

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

Lab. Nacional/Regional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos.

Centro Colaborador de OMS en Vigilancia de Resistencia a los 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



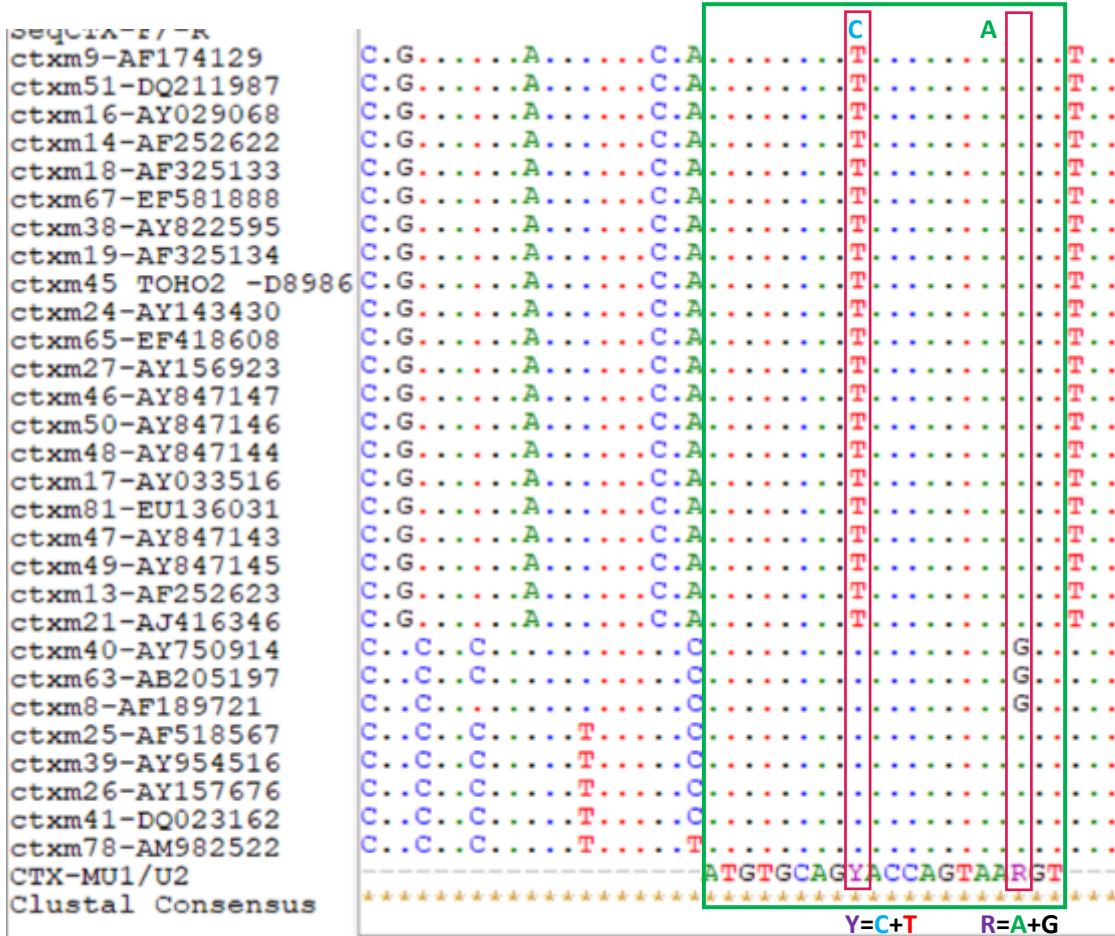
ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL  
*Proteger a los animales, preservar nuestro futuro*



Unión Europea

# Diseño de primers con bases degeneradas

## El caso de CTX-M → PRIMERS UNIVERSALES



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

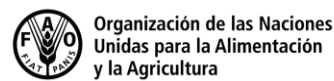
Pagani, et al, JCM 41(9):4264-4269, 2003

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

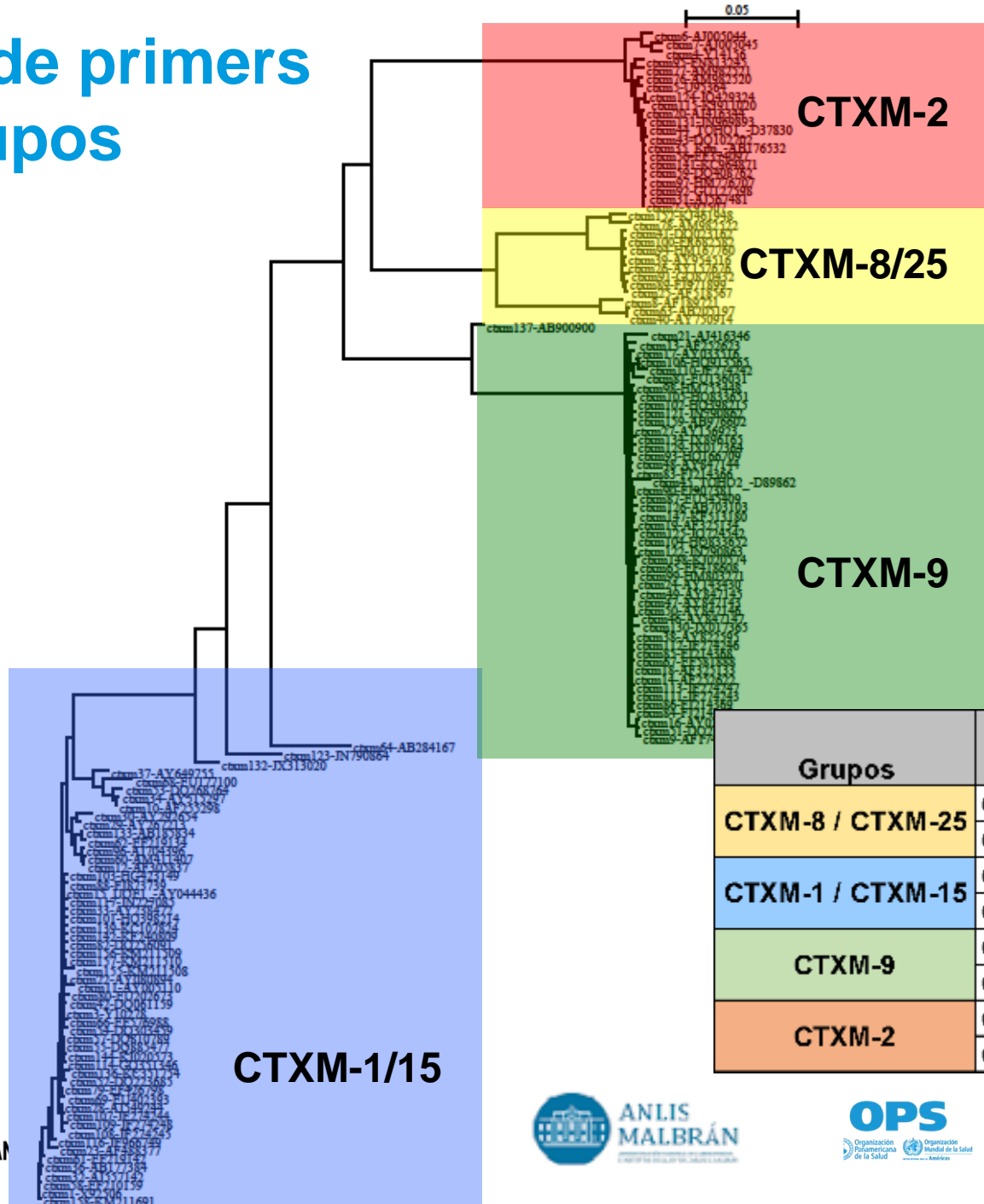
Reacción de PCR --> Vol. final = 25ul	
Reactivo	Volumen
ADN	2,5 ul
Buffer 10X	2,5 ul
MgCl2 (50 mM)	0,75 ul
dNTP's (10 mM)	0,5 ul
Tag pol (5U/ul)	0,15 ul
Primer Forward (10 µM)	1,5 ul
Primer Reverse (10 µM)	1,5 ul
H2O	15,6 ul
<b>Vol. Final</b>	<b>25 ul</b>

>> concentración de primers

TRABAJAN JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS



# Diseño de primers para grupos



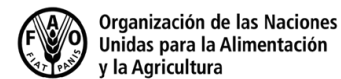
*bla*<sub>CTX-M</sub> = 159 alelos

El caso de 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

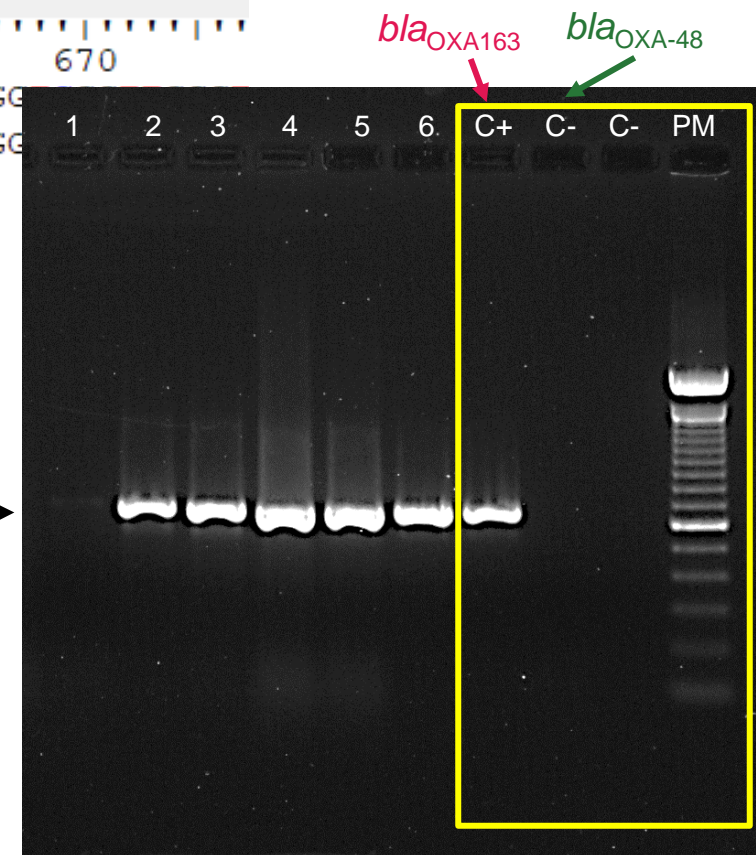
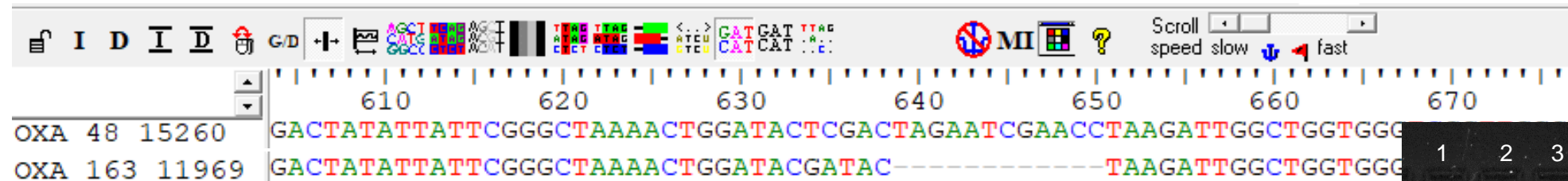
CTXM-1/15



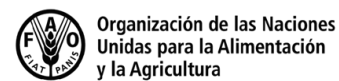


# Diseño de primers para discriminación de alelos

## Discriminación entre OXA-48 y OXA-163



TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



# Detección 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>

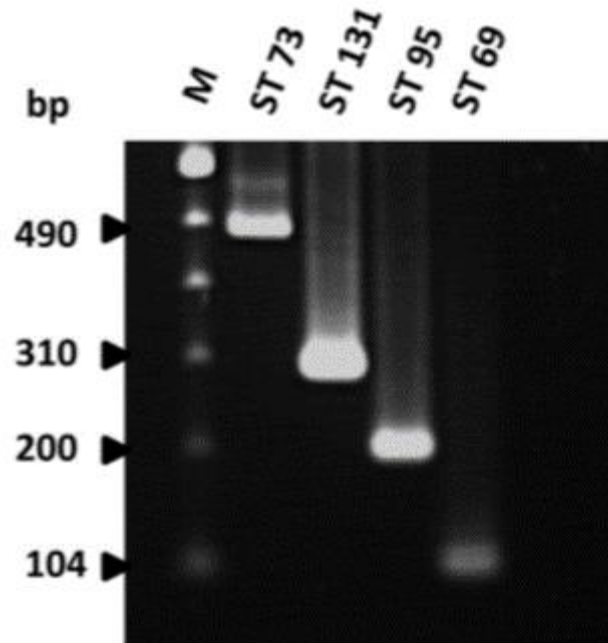


FIG 1 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments generated by the new multiplex PCR for the four major *E. coli* STs. Lane M, 100-bp ladder (Invitrogen, Paisley, United Kingdom).

### Rápida identificación de clones de relevancia clínica:

- ST73/ST95/ST69** sensibles a la mayoría de ATB  
→ Tratamiento óptimo
- ST131** resistente a múltiples drogas  
→ carbapenem para complicadas;  
→ fosfomicina o nitrofurantoina para ITU
- Ninguno de estos ST  
→ Tratamiento empírico según guías.

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

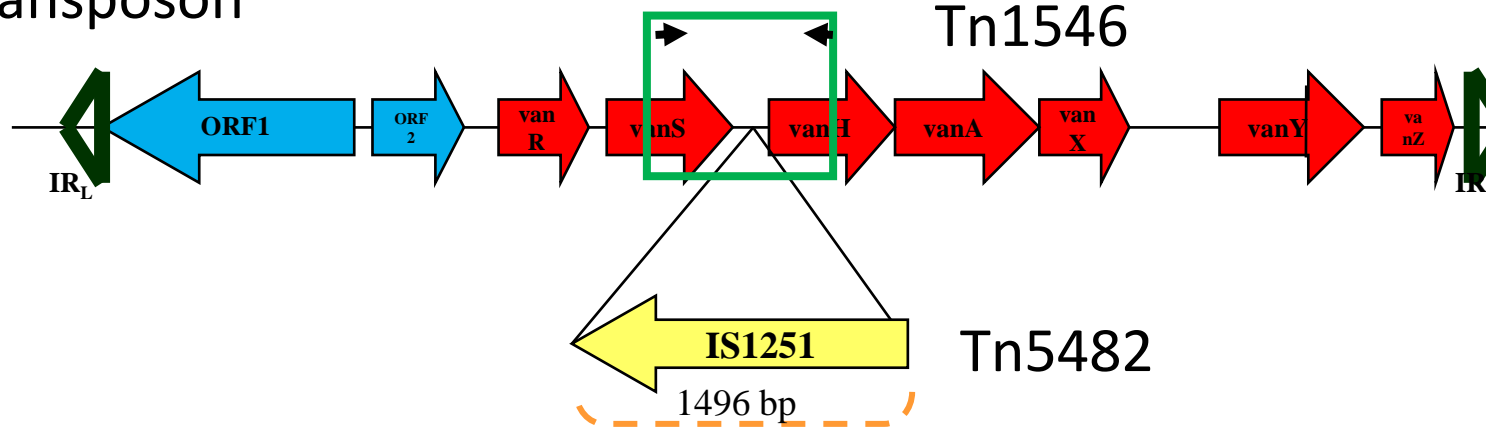


Unión Europea

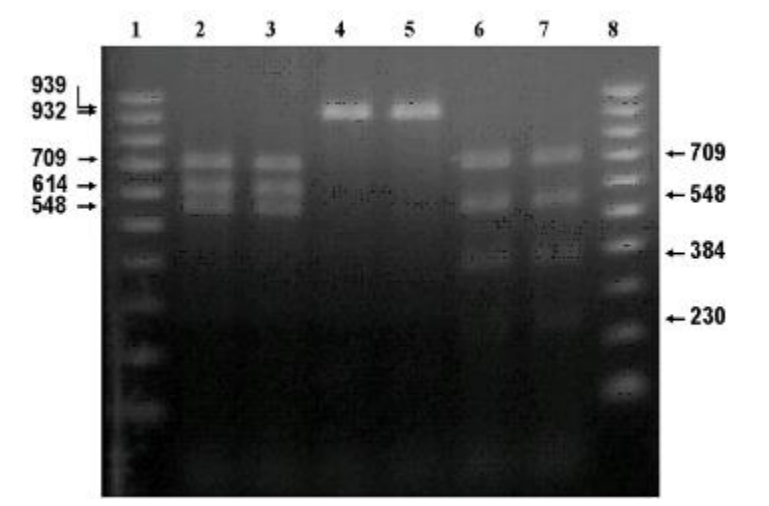
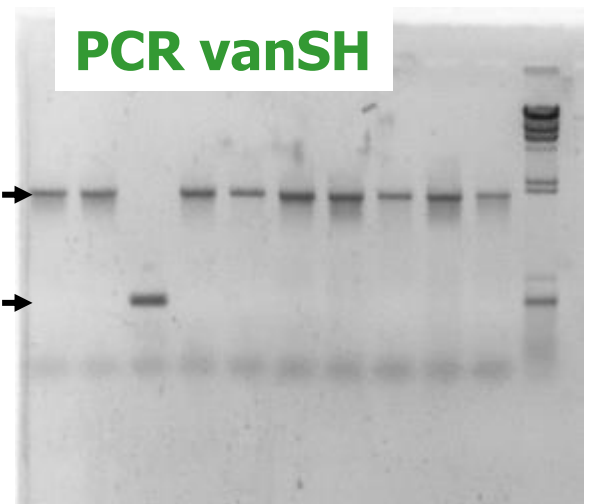
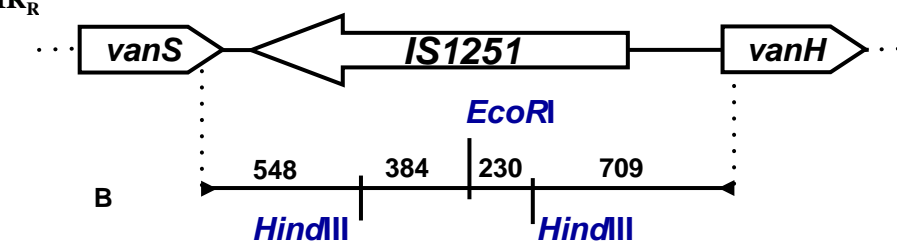
# Otras aplicaciones PCR de punto final

## Mapeo de plataformas

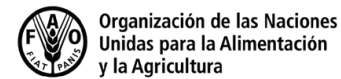
Transposon



A **PCR-RFLP vanSH**



TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



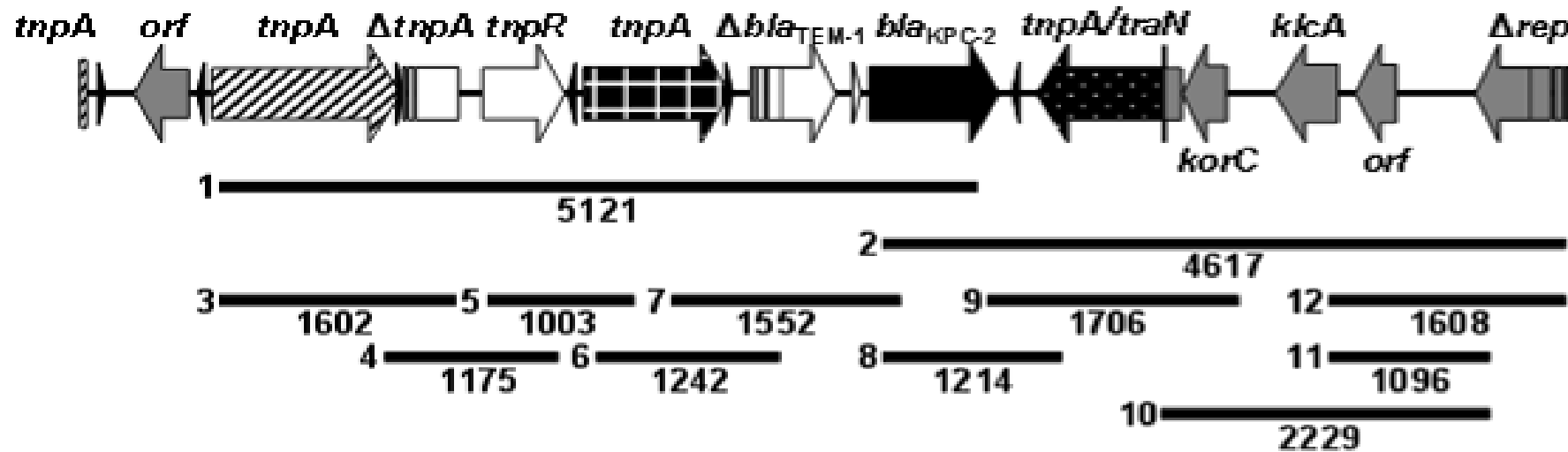
Corso A. et al. IJID. 11:69-75. 2007.



# Otras aplicaciones PCR de punto final

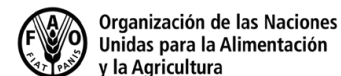
## Mapeo de plataformas

### Mapeo por PCR de variantes de *Tn4401*



Gomez, *Clin Microbiol Infect*, 2011

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

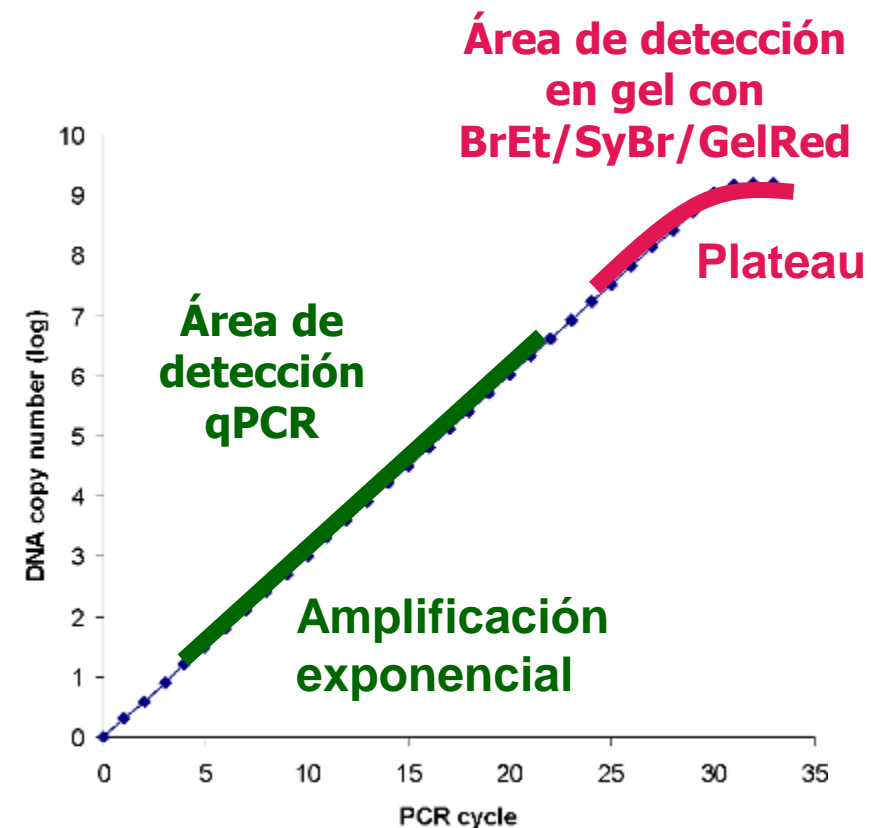




# PCR punto final

vs.

# PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en Tiempo Real



- Detección de genes en tiempo real
- Cuantificación de ácidos nucleicos
- > velocidad de resultados
- < contaminación
- > especificidad

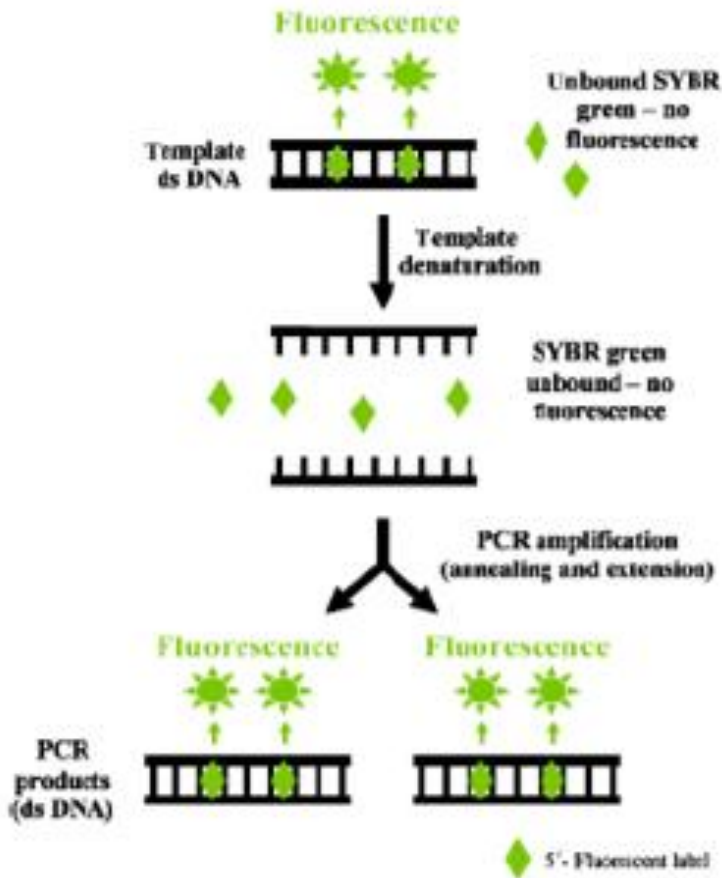
TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

# PCR cuantitativa (qPCR)

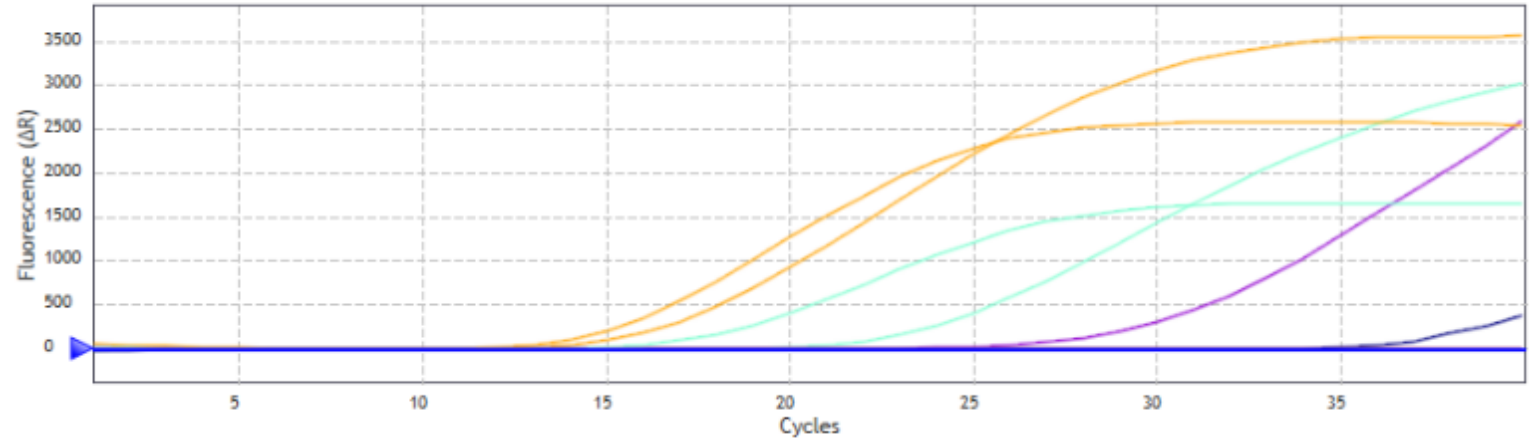
## SYBR-Green

- Económico
- Fácil de usar
- Sensibilidad
- Unión a doble cadena

(a) SYBR green assays



Amplification Plots

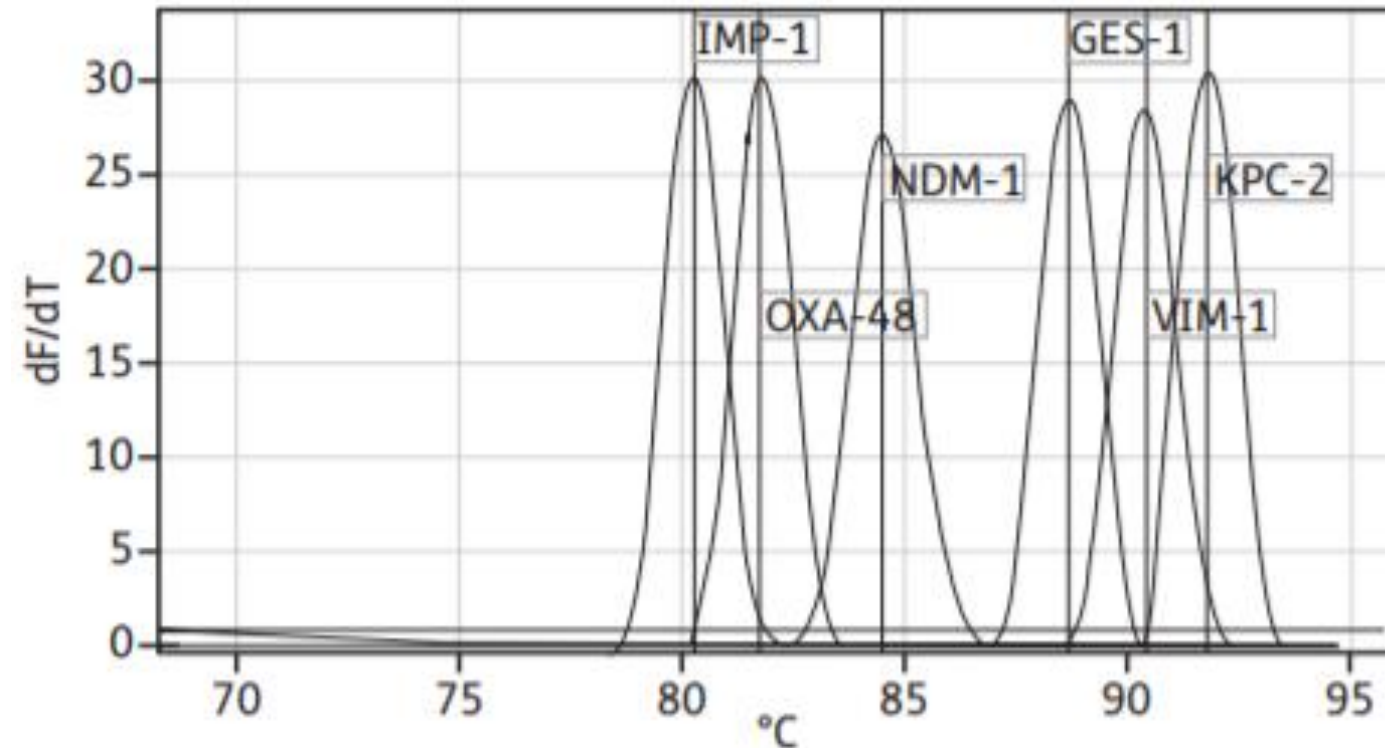


TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

## 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 cuantitativa (qPCR) con sonda

Específico  
Sensibilidad  
Multiplex

Costo

## Sistema Taqman

ADN molde

ACCTGTA CT CCGGCTAAG  
TGGACATGAGCCGATTC

Polimerasa



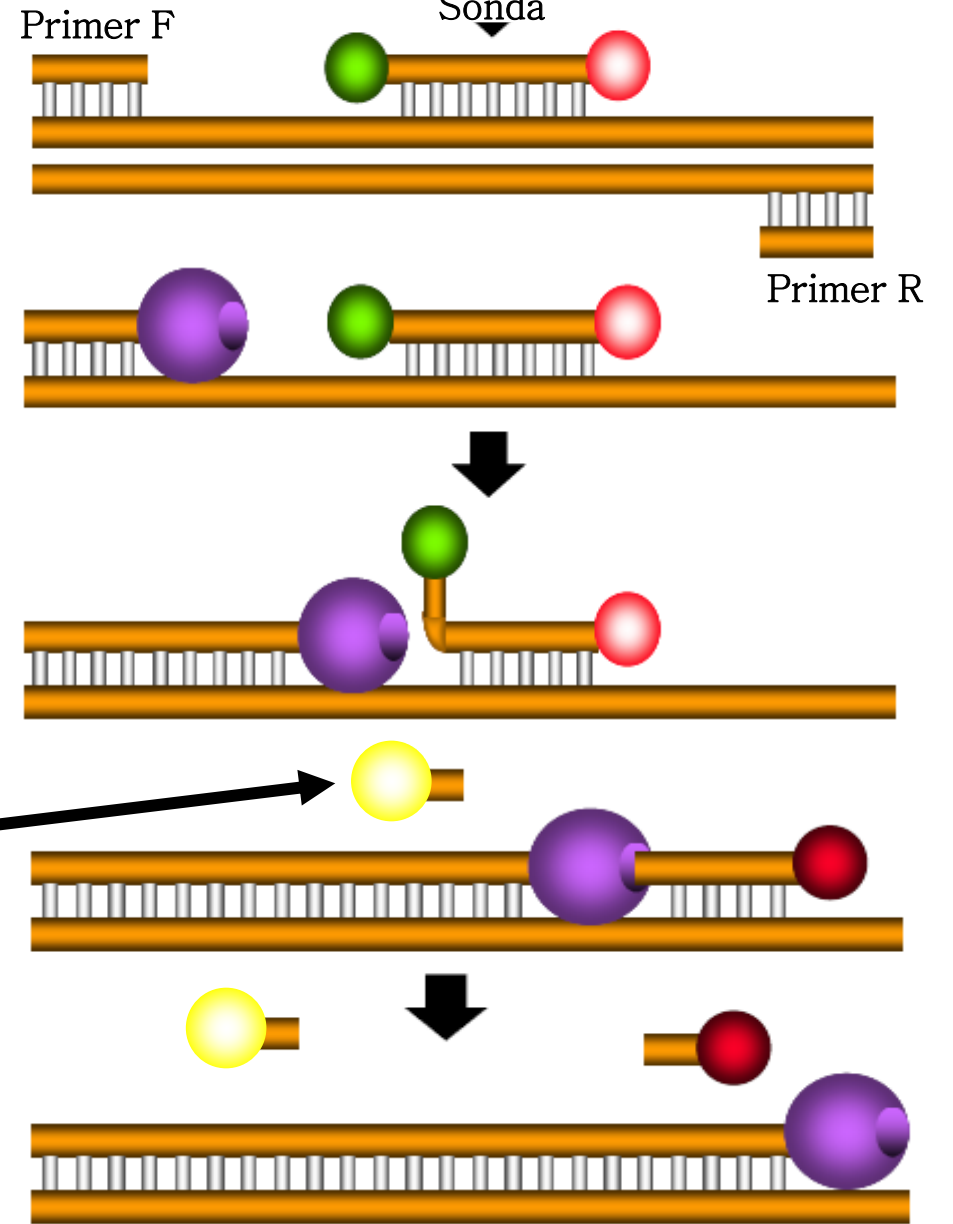
Primers



dNTPs

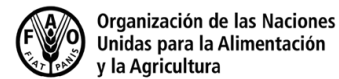
C A T G  
T T T T

TaqMan Probe



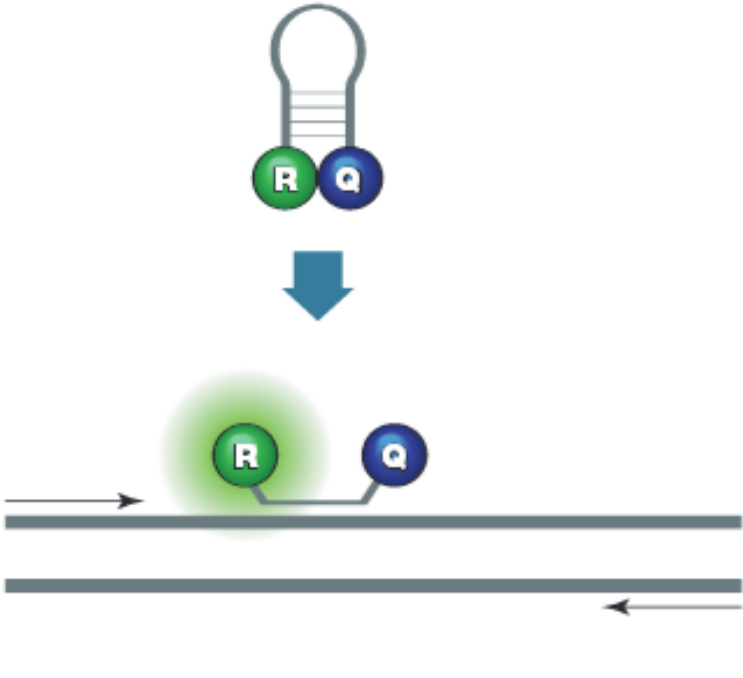
Emisión de fluorescencia  
(distintos fluoroforos →  
multiplex)

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



# PCR cuantitativa (qPCR) con sonda

## Molecular Beacons

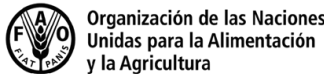


Molecular beacons are hairpin probes with reporter and quencher

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 cuantitativa (qPCR)

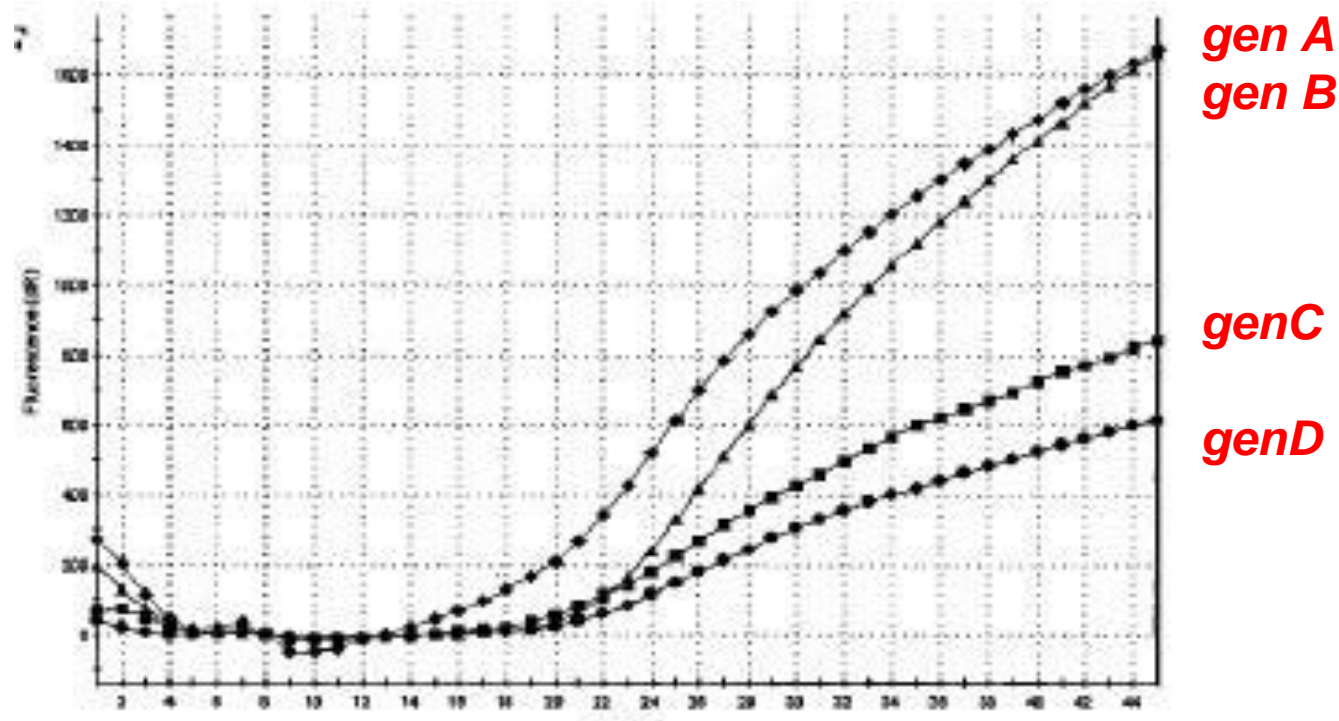
Sonda (ej. Taqman)

Específico

Costo

Sensibilidad

Multiplex



TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones  
Unidas para la Alimentación  
y la Agricultura



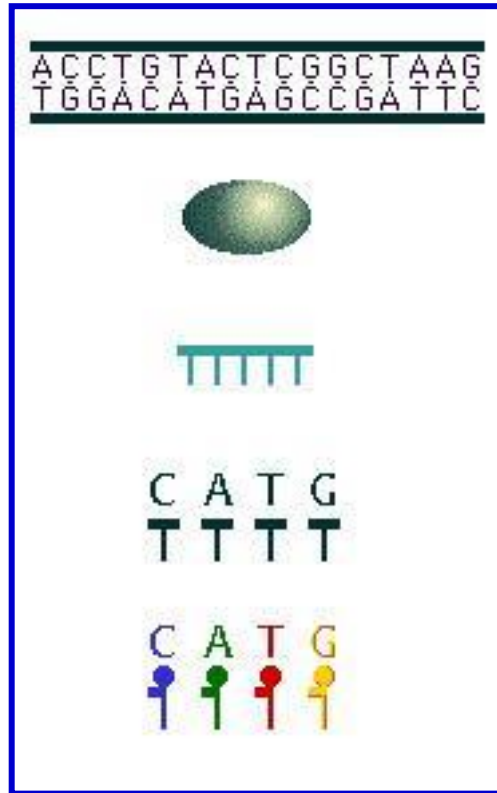
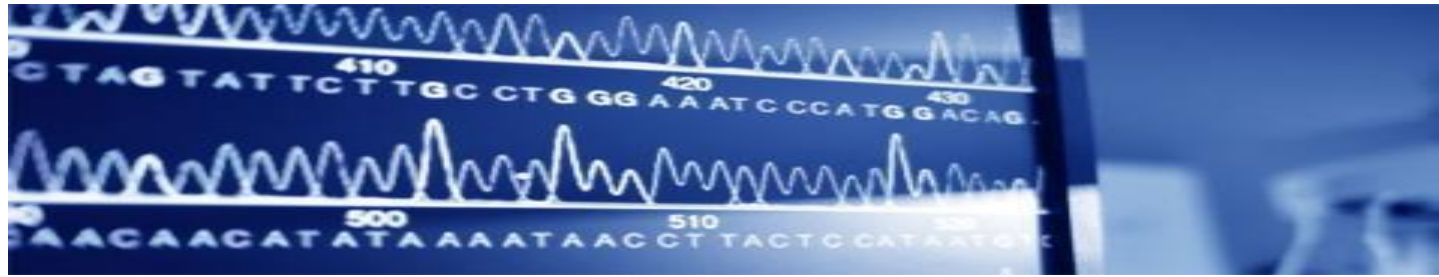
ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL  
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea

# Secuenciación de ácidos nucleicos

## Método de Sanger



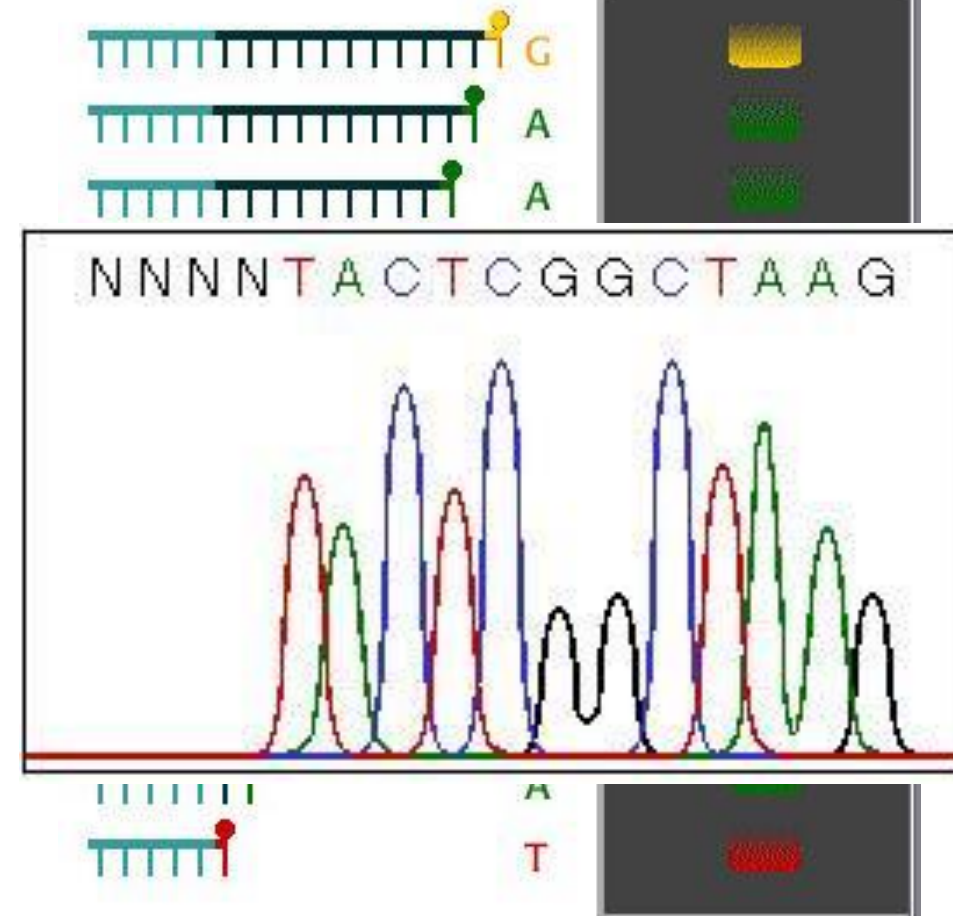
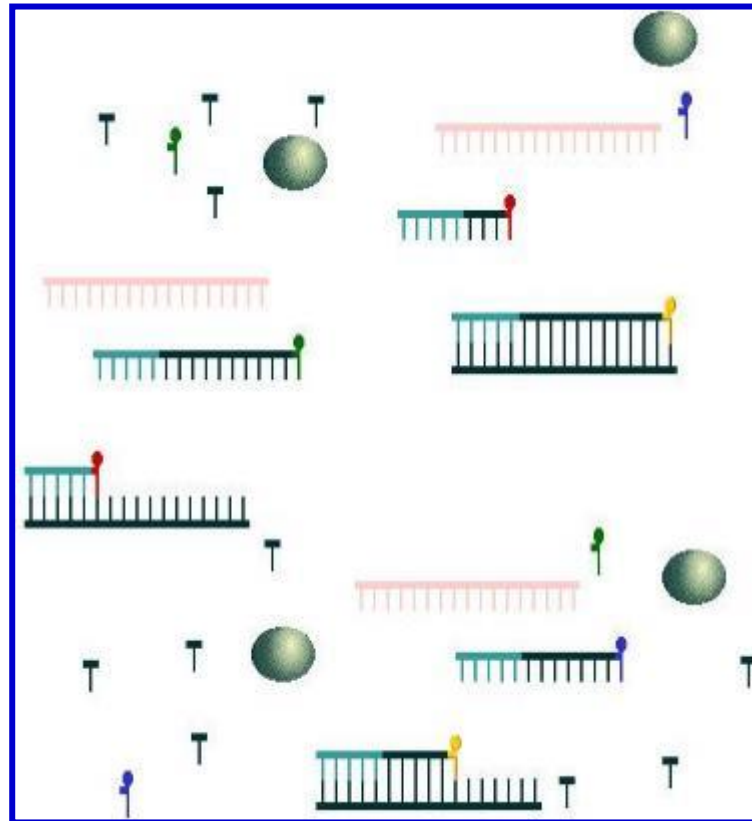
ADN molde

Polimerasa

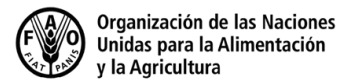
primer

dNTP's

dideoxi-dNTP's



TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



# Secuenciación 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	WT
5400	GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATAACAC	120
90400	GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATAACAC	120
90500	GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATAACAC	120
15400	GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATTACAC	120
42300	GGTAAATACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATTACAC	99
	*****	
GYRSAL	CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC	220
5400	CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC	175
90400	CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC	175
90500	CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC	175
15400	CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC	175
42300	CGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTC	154
	*****	



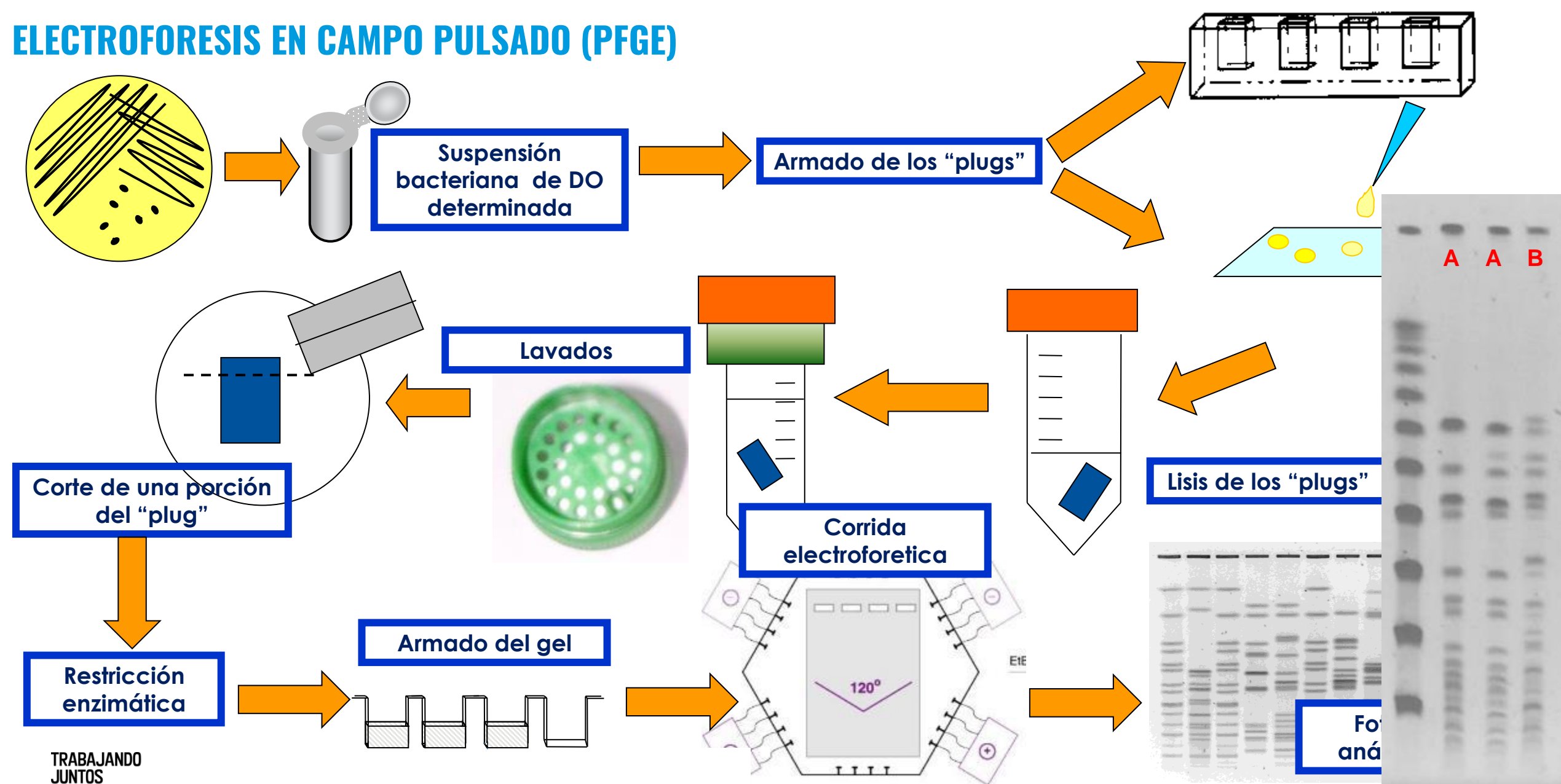
# Tipificación molecular bacteriana

## APLICACION CLINICA Y EPIDEMIOLOGICA

- Confirmación de brotes
- Determinación de reinfección o recidiva en un paciente
- Diseminación intra- e inter-hospitalaria de clones
- Vigilancia epidemiológica de clones geográfica y temporalmente
- Caracterización de Enfermedades Transmitidas por Alimentos
- Caracterización de Enfermedades Zoonóticas

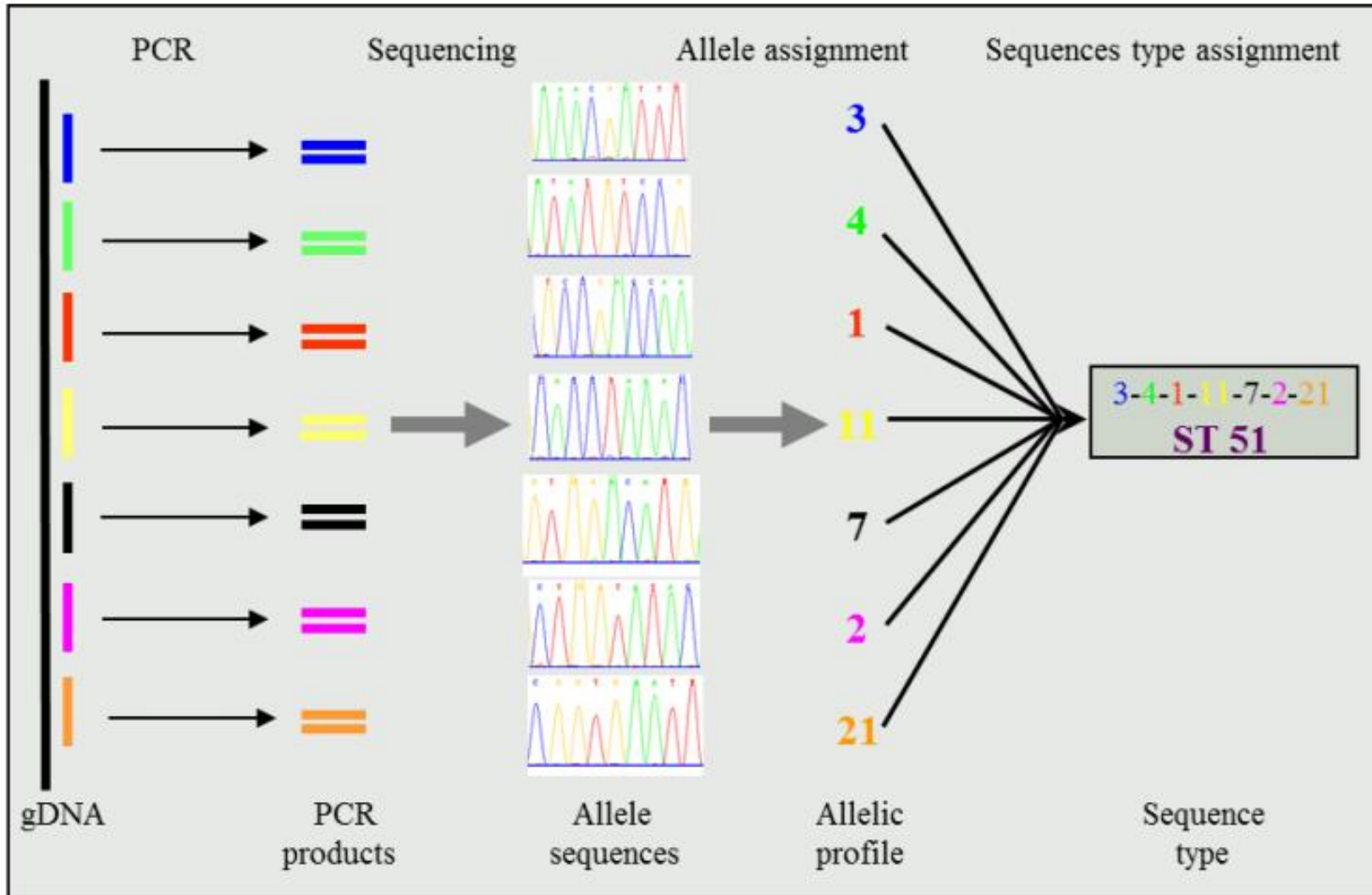
**Estas técnicas buscan confirmar hipótesis epidemiológicas, no son técnicas de uso rutinario!**

# ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE)



TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

# MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)



- Genes que codifican proteínas con funciones metabólicas centrales (*core*) / **housekeeping genes**
- **Conservados**
- **Transmitidos verticalmente**
- **Única copia**
- Los genes seleccionados deberían estar **distanciados físicamente** para minimizar posibles *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.



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

# 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

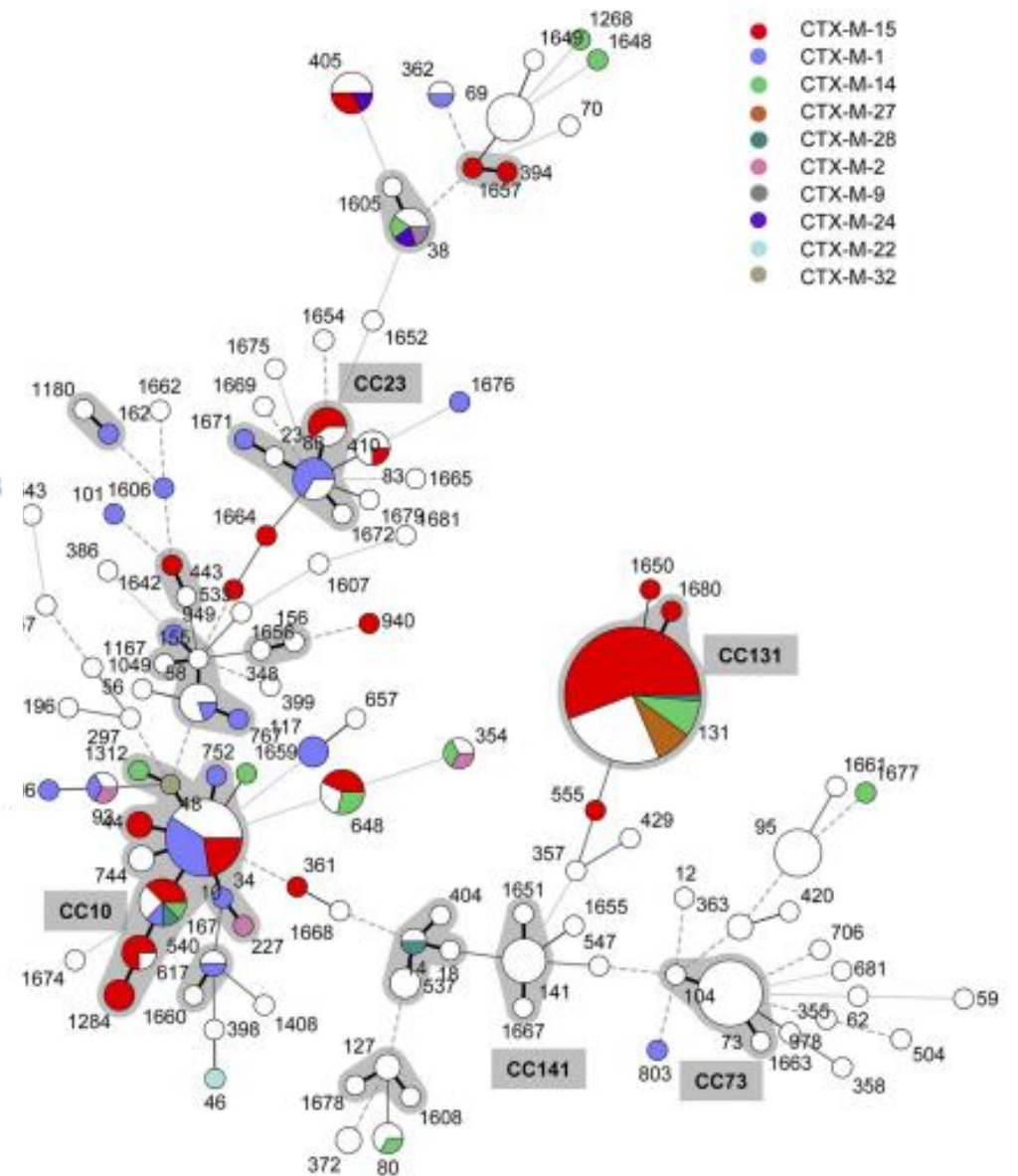
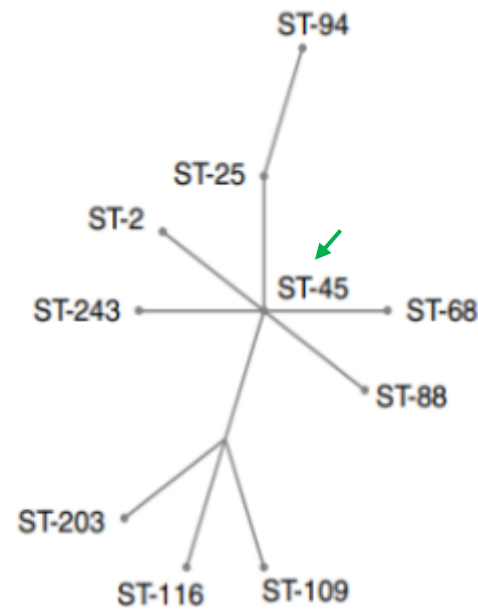


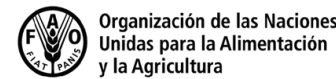
Figure 2

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



# Caracterización de *E. coli* de muestras fecales de cerdos de Argentina



## 20 perfiles de resistencia

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

10 (29%)  
24 (71%)

### 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>



34 *E. coli* de 31 muestras fecales de lechones con diarrea y cerdos sanos de dos granjas de San Luis y Entre Ríos.

Selección en agar Mac Conkey con 2 mg/mL colistina y/o 4 mg/mL de cefotaxima.

### PCR

➤ 28 *E. coli* resistentes a cefalosporinas de 3ra generación

*bla*<sub>CTX-M</sub> = 24  
*bla*<sub>CMY</sub> = 3  
*bla*<sub>PER-2</sub> = 1

➤ 12 *E. coli* resistentes a colistín

*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.

JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

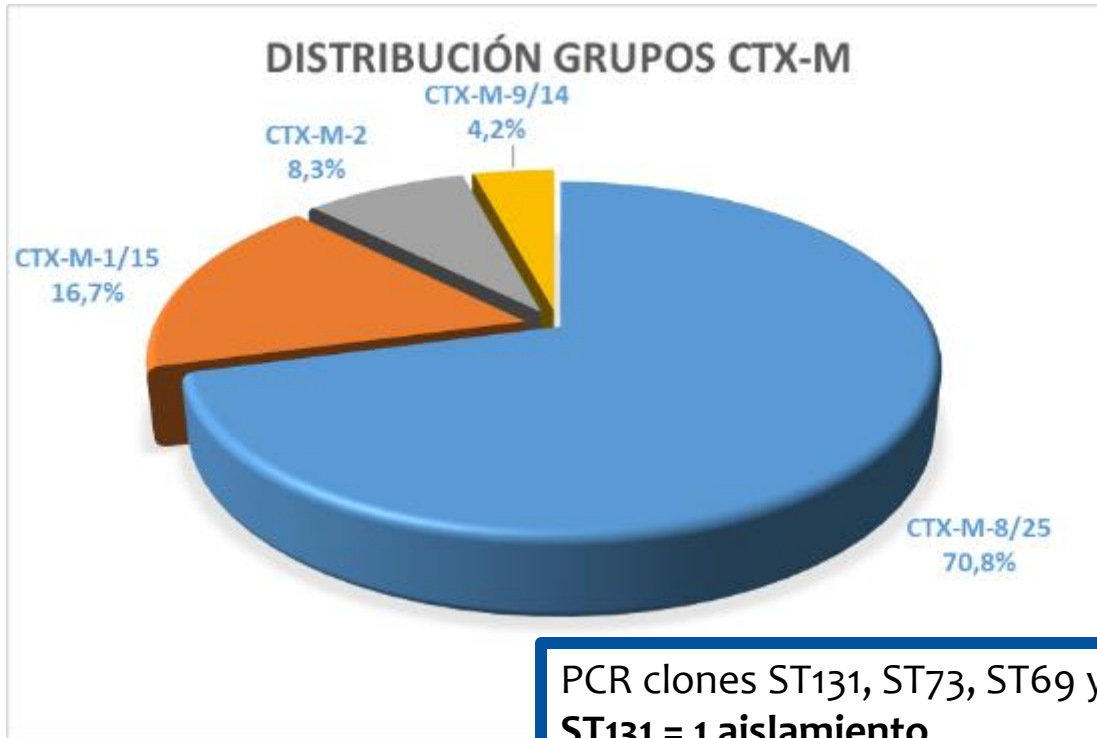


ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL  
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro

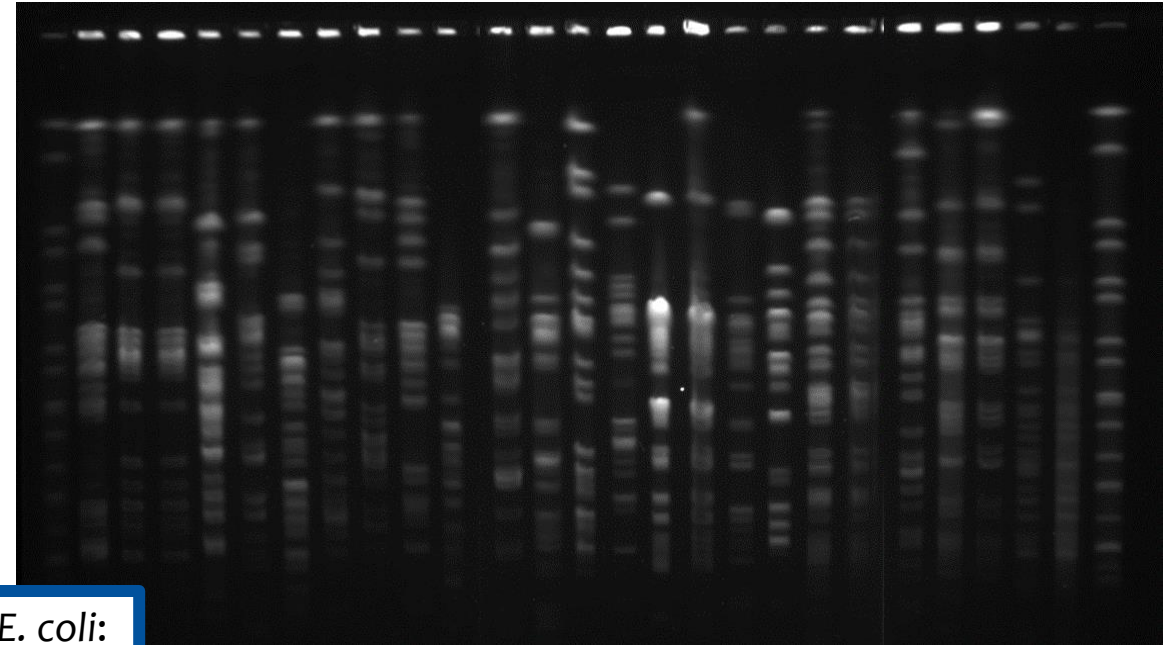


Unión Europea

# Caracterización de *E. coli* de muestras fecales de cerdos de Argentina



PCR clones ST131, ST73, ST69 y ST95 de *E. coli*:  
ST131 = 1 aislamiento  
ST95 = 2 aislamientos



Alta diversidad genética → 29 perfiles de PFGE

**CONCLUSIONES:** Los aislamientos de *E. coli* recuperados de lechones con diarrea y cerdos sanos portaban BLEE y/o genes *mcr-1*. La resistencia a cefalosporinas de 3ra generación estuvo asociada con la presencia de la BLEE tipo CTX-M, y en particular la variante CTX-M-8/25.

Se detectaron en cerdos clones de *E. coli* generalmente asociados a infecciones en humanos.

# Caracterización de *E. coli* productora de BLEE de pacientes sanos y cerdos

409 hisopados personas (223) y cerdos (186) sanos.  
 Selección en agar Mac Conkey con 4 mg/mL de ceftriaxona.  
 212 *E. coli* productores de BLEE: humanos (111) y cerdos (101).

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 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%

# Caracterización de *E. coli* productora de BLEE de pacientes sanos y cerdos

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
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



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



# Caracterización de *E. coli* productora de BLEE de pacientes sanos y cerdos

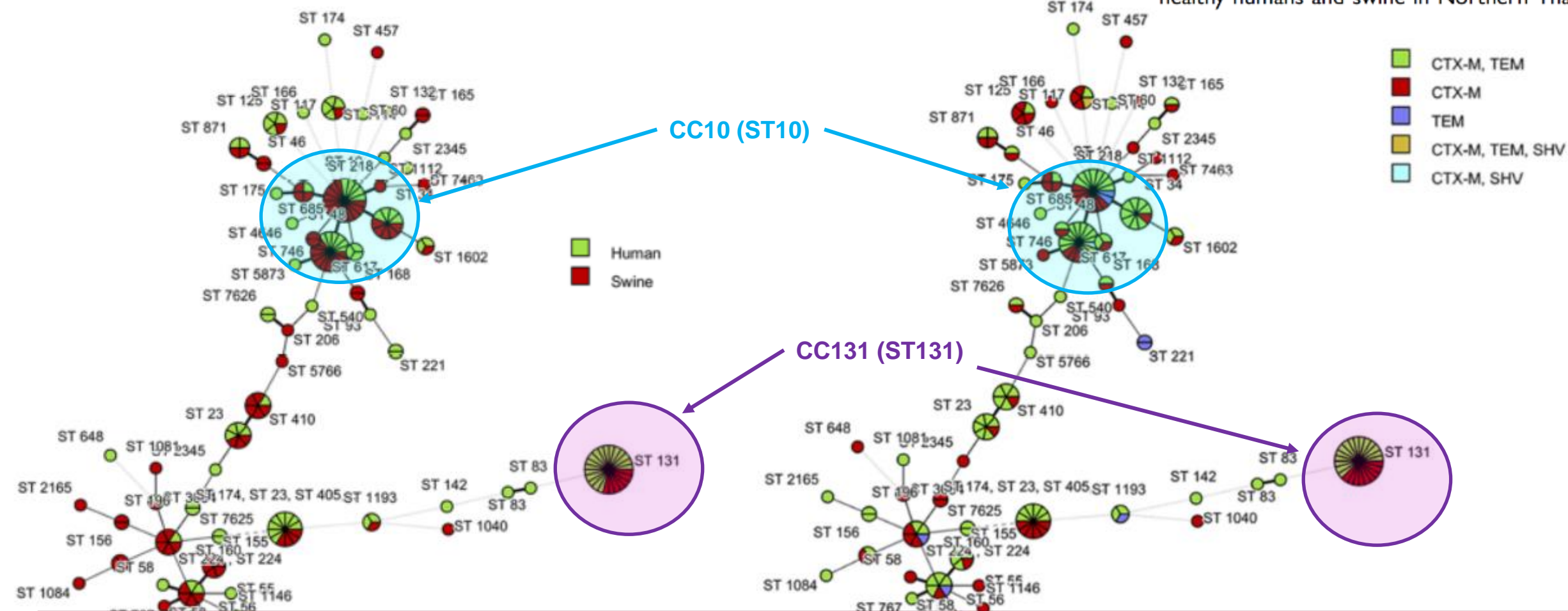
Chakkraphong Seenama<sup>1,2</sup>  
Visanu Thamlikitkul<sup>2</sup>  
Panan Ratthawongjirakul<sup>3</sup>

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



**CONCLUSIONES:** Los aislamientos de *E. coli* que portaban BLEE y provenían de personas sanas y cerdos compartían idénticos STs, lo que sugiere un posible nexo epidemiológico o transmisión entre estos huéspedes. Esto también indica que tanto las personas sanas como los cerdos de granja son reservorios de genes de resistencia.

# EJEMPLO DE SITUACIONES POSIBLES....

## Observación

## Pregunta

## Acción

### SITUACIÓN: VIGILANCIA

Resistencia a cefalosporinas de tercera generación

Es una beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE) o un AmpC?

- Diferenciar BLEE de AmpC del antibiograma inicial

### SITUACIÓN: INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA MOLECULAR

Actividad BLEE y/o AmpC positiva

Que gen esta presente?

- PCR para el gen *bla*<sub>CTX-M</sub> y/o *bla*<sub>CMY</sub>

PCR positiva para *bla*<sub>CTX-M</sub> y/o *bla*<sub>CMY</sub>

Que variante alélica está presente?

- Opcional: PCR de grupo o PCR y secuenciación Sanger

- Actividad BLEE positiva  
- PCR negativa para *bla*<sub>CTX-M</sub> y/o *bla*<sub>CMY</sub>

Que BLEE es?

- Derivar al LNR  
PCR genes adicionales / clonado y secuenciación Sanger / WGS

# EJEMPLO DE SITUACIONES POSIBLES....

## Observación

## Pregunta

## Acción

### SITUACIÓN: VIGILANCIA Y DETECCIÓN DE LA PRIMERA CARBAPENEMASA

Resistencia a cefalosporinas de tercera generación

El aislamiento es resistente a carbapenemes?

- Evaluar sensibilidad a los carbapenemes

Resistencia a carbapenemes

Es una carbapenemasa?

- Ensayos fenotípicos confirmatorios de actividad carbapenemasa

Actividad carbapenemasa positiva

Que gen esta presente?

Derivar al LNR:

- PCR para carbapenemasas más comunes

De que variante se trata?

- Secuenciación Sanger

Es un clon relevante?

- Tipificación molecular: PFGE / MLST / WGS

***MUCHAS GRACIAS!!!***

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

