



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Validación de técnicas de PCR cuantitativa (qPCR) para la cuantificación de genes de resistencia a antibióticos

Trabajo de Titulación, modalidad de Proyecto de Investigación , previa la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

El estudio es parte del proyecto: “**Evaluación de la diseminación de genes de resistencia a antibióticos por medio del estiércol de gallina**” aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por La Dirección de investigación y Desarrollo DIDE de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución, 1568-CU-P-2017.

Autora: María Judith Valle Ramos

Tutor: Quím. William Ricardo Calero Cáceres, Ph.D.

Ambato – Ecuador

Diciembre - 2019

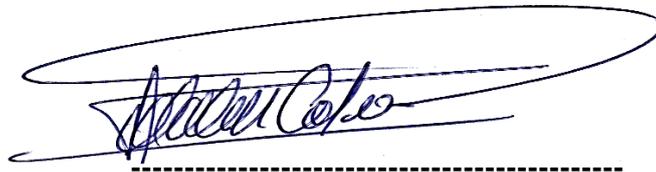
APROBACIÓN DEL TUTOR

Quím. William Ricardo Calero Cáceres, PhD

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que corresponde a las normas establecidas en el Reglamento de Titulación y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 30 de septiembre de 2019

A handwritten signature in blue ink, enclosed within a large, hand-drawn oval. The signature is cursive and appears to read 'William Ricardo Calero Cáceres'. Below the signature is a horizontal dashed line.

Quím. William Ricardo Calero Cáceres, PhD
C.I. 171434885-9
TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, María Judith Valle Ramos, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'María Judith Valle Ramos', is written over a horizontal dashed line.

Srta. María Judith Valle Ramos
C.I. 185010266-4
AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Lcdo. M.Sc. Paulo S. Baquero Icaza
C.I. 180323354-1



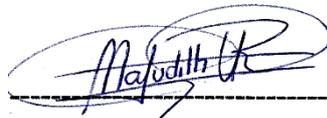
David Andrés Terán Mera, PhD
C.I. 171656972-6

Ambato, 14 de noviembre de 2019

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Srta. María Judith Valle Ramos
C.I. 185010266-4
AUTORA

DEDICATORIA

A Dios por darme las fuerzas necesarias y las ganas de salir adelante cuando he estado a punto de rendirme.

A mis padres Judith y Jorge que han sabido formarme con buenos sentimientos y valores, lo cual me ha ayudado a superar los momentos más difíciles de la vida, siempre han estado junto a mí y muchos de mis logros se los debo a ustedes.

A mi hermano Jorge Luis que siempre me ha brindado su apoyo incondicional y a Julián que ha llegado ser mi hermanito menor que con sus ocurrencias nos alegra a todos.

Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar quiero agradecer a Dios y a la Virgencita María por ayudarme a culminar satisfactoriamente este trabajo de titulación, quien me dio aciertos para empezar, dirección al progresar y perfección en acabar.

A mis padres y hermanos por ser una parte fundamental de mi vida, siempre sentí su apoyo y creyeron en mí, son mi motor y mi mayor inspiración para alcanzar todos mis sueños.

A mi tutor, Dr. William Calero por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación “UTA RAM One Health” por compartir sus conocimientos, por el tiempo, paciencia y la ayuda que me ha brindado en la realización de este proyecto de investigación. A mis compañeros y amigos tesistas Andrés, David y Ely, por su apoyo y por las experiencias agradables en el laboratorio.

A la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, y a todos sus docentes quienes me impartieron sus grandes conocimientos y a la Facultad de Ciencias Agropecuarias por permitirme realizar la parte experimental de mi trabajo en los laboratorios del Centro de Investigaciones Agropecuarias.

A mis amigas y amigos Dianita, Damaris, Belita, Ely, Negrita, Andrés, Luchito y Alex con quienes he compartido buenos y malos momentos que solo se vive en la Universidad, siempre tendrán un lugar en mi corazón.

Gracias por todo.

INDICE GENERAL DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos.....	1
1.2. Objetivos	8
1.2.1. Objetivo General	8
1.2.2. Objetivos Específicos	8

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

2.1. Materiales	9
2.1.1. Materiales de laboratorio	9
2.1.2. Equipos.....	10
2.1.3. Reactivos	10
2.1.4. Insumos	11
2.1.5. Materiales de escritorio	11
2.2. Métodos	12
2.2.1 Protocolo de Extracción de Plásmidos por el Método de Centrifugado	12
2.2.2. Medición de la Concentración de ADN en Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).	13
2.2.3. Diseño del Estándar Plasmídico del gen <i>tetW</i>	14
2.2.4. Elaboración de Estándares de qPCR.....	14
2.2.5. Elaboración de Estándares del 16S rDNA	15
2.2.6. Protocolo de Purificación de Productos de Amplificación por PCR	16
2.2.7. Reacciones de PCR Y qPCR.....	16
2.2.8. Condiciones de reacción de PCR y qPCR.....	19
2.2.9. Amplificación de Genes de Resistencia mediante PCR	21
2.2.10. Oligonucleótidos usados en este estudio	21
2.2.11. Diagrama de la estrategia experimental	24

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados.....	25
3.1.1. Diseño del estándar del gen de resistencia a tetraciclina <i>tetW</i>	25
3.1.2. Extracción, purificación y cuantificación de los plásmidos.....	26
3.1.3. Eficiencia y linealidad del método	28
3.1.3.1. Elaboración de las curvas estándar en qPCR en tiempo real, empleando la técnica TaqMan.....	28
3.1.3.2. Elaboración de las curvas estándar en qPCR en tiempo real, empleando la técnica Sybr Green.....	35
3.1.4. Ecuaciones de las rectas	37
3.1.5. Línea base (Thresholds).....	39
3.1.6. Límite de cuantificación del método	39
3.1.7. Especificidad del método.....	40
3.1.8. Reproducibilidad del método	43
3.1.9. Evaluación de la validación de la PCR en tiempo Real	47

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones	51
4.2. Recomendaciones	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXOS.....	60

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Materiales de Laboratorio	9
Tabla N° 2.. Equipos de Laboratorio.....	10
Tabla N° 3. Reactivos de Laboratorio	10
Tabla N° 4. Insumos de Laboratorio	11
Tabla N° 5. Materiales de Escritorio	11
Tabla N° 6. Reacciones de PCR convencional	17
Tabla N° 7. Reacción de PCR 16S rDNA	17
Tabla N° 8. Reacción de qPCR TaqMan.....	18
Tabla N° 9. Reacción de qPCR Sybr Green	18
Tabla N° 10. Cepas control usados para la amplificación de los genes de resistencia	21
Tabla N° 11. Oligonucleótidos usados para la amplificación mediante qPCR	22
Tabla N° 12. Concentración de los estándares purificados y ratios de pureza	27
Tabla N° 13. Línea de threshold de los diferentes genes	39
Tabla N° 14. Límite de cuantificación de Ct de los diferentes genes	40
Tabla N° 15. Reproducibilidad del método de PCR a tiempo real del gen <i>bla</i> _{TEM} ..	44
Tabla N° 16. Reproducibilidad del método de PCR a tiempo real del gen <i>qnrS</i>	44
Tabla N° 17. Reproducibilidad del método de PCR a tiempo real del gen <i>sul 1</i>	45
Tabla N° 18. Reproducibilidad del método de PCR a tiempo real del gen 16S rDNA.....	45
Tabla N° 19. Reproducibilidad del método de PCR a tiempo real del gen <i>tetW</i>	46
Tabla N° 20. Reproducibilidad del método de PCR a tiempo real del gen <i>ermB</i> ...	46
Tabla N° 21. Resultados del desempeño de los oligonucleótidos de la PCR en tiempo Real	50

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Condiciones de reacción de PCR para el gen 16S rDNA.....	19
Figura 2. Condiciones de reacción de PCR convencional	19
Figura 3. Condiciones de reacción de Real- Time qPCR (TaqMan)	20
Figura 4. Condiciones de reacción de Real- Time qPCR (Sybr).....	20
Figura 5. Diagrama de flujo del proceso de la qPCR	24
Figura 6. Obtención de la secuencia del gen <i>tetW</i> en la base de datos CARD	25
Figura 7. Reporte de especificidad del NCBI del Gen <i>tetW</i>	26
Figura 8. Curva estándar de <i>bla</i> _{TEM}	29
Figura 9. Curva estándar de <i>qnrS</i>	30
Figura 10. Curva estándar de <i>sulI</i>	32
Figura 11. Curva estándar de 16S rDNA.....	33
Figura 12. Curva estándar de <i>tetW</i>	35
Figura 13. Curva estándar de <i>ermB</i>	36
Figura 14. Ecuaciones de las rectas.....	38
Figura 15. Reporte de especificidad del NCBI del Gen <i>bla</i> _{TEM}	41
Figura 16. Reporte de especificidad del NCBI del Gen <i>qnrS</i>	41
Figura 17. Reporte de especificidad del NCBI del Gen <i>sul I</i>	42
Figura 18. Reporte de especificidad del NCBI del Gen <i>ermB</i>	42
Figura 19. Reporte de especificidad del NCBI del Gen 16 rDNA.....	43

RESUMEN

En la actualidad, es necesario contar con técnicas debidamente validadas para el desarrollo de investigaciones relacionadas en biología molecular, con la finalidad de obtener resultados confiables y reproducibles al momento de realizar las pruebas experimentales. El presente trabajo tuvo como objetivo validar técnicas de PCR en tiempo real, empleando técnicas TaqMan y Sybr Green. Para llevar a cabo la cuantificación en el termociclador 7500 Fast Real- Time PCR System, se utilizó estándares puros de los diferentes plásmidos recombinantes (*bla*_{TEM}, *sul1*, *qnrS*, *ermB* y 16S rDNA) y en el caso del gen *tetW* se diseñó un estándar plasmídico sintético, para elaborar las curvas estándar a partir de un banco de diluciones seriadas de cada gen. En el análisis de resultados, las curvas estándar presentaron eficiencias altas del 97,4 al 109,8%, así como correlaciones lineales mayores a 0,99 y límites de cuantificación entre Ct 34,4 a 34,8. Por ende, se demostró que las técnicas de qPCR tienen un rendimiento aceptable, pues los valores obtenidos se encuentran dentro de los rangos óptimos. Estas técnicas de qPCR validadas se utilizarán como una herramienta de control para evaluar la diseminación ambiental de genes de resistencia a antibióticos en diferentes matrices ambientales.

Palabras clave: qPCR, validación, primers específicos, TaqMan, Sybr Green, linealidad, eficiencia, coeficiente de correlación, límite de cuantificación.

ABSTRACT

The increment in the usage of genomic techniques applied to diagnosis and research demands to have validated techniques, in order to obtain reliable and reproducible results during the experimental tests. This work aimed to validate real-time PCR (qPCR) techniques, using both TaqMan and Sybr Green methods. The applied equipment was 7500 Fast Real-Time PCR System thermal cyclers. Pure standards of the different recombinant plasmids (*bla*_{TEM}, *sulI*, *qnrS*, *ermB*, and 16S rDNA) were used. Additionally, a synthetic plasmid standard was designed for *tetW* gene. The results indicate that the standard curves presented high efficiencies (between 97.4 to 109.8%), as well as linear correlations greater than 0.99 and limits of quantification between Ct 34.4 to 34.8. Therefore, it was demonstrated that the qPCR techniques have acceptable performances since the values obtained are within the optimal ranges. These validated qPCR techniques will be used as a control tool to evaluate the dissemination of antibiotic resistance genes from environmental samples, obtaining truthful data in a short time.

Keywords: qPCR, validation, specific primers, TaqMan, Sybr Green, linearity, efficiency, correlation coefficient, quantification limit.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

Para identificar la expresión genética y secuencias específicas de los ácidos nucleicos, se han desarrollado varias técnicas de biología molecular, siendo la más utilizada la PCR convencional (**Calero et al., 2014; Rodríguez et al., 2015**). Sin embargo, esta técnica tiene algunos inconvenientes, puesto que al ser un método cualitativo, no permite cuantificar el producto de la PCR ni estimar sus densidades iniciales (**Barrera et al., 2016**).

Con la finalidad de evaluar el avance de la síntesis del DNA durante la reacción de PCR, a los ingredientes habituales de la misma (desoxirribonucleótidos: dNTPs, ADN polimerasa, cebadores o primers, tapón de reacción), se adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo (técnica TaqMan), o sustancias fluorescentes intercalantes de DNA (Método Sybr Green) que permiten cuantificar la tasa de generación de los productos de PCR específicos. Esta variante es conocida como PCR cuantitativa (qPCR) o en tiempo real (**Biassoni & Raso, 2014**).

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), es una técnica moderna capaz de amplificar y cuantificar moléculas de ADN y ARN de una forma precisa. De igual manera ayuda a detectar más de un producto específico en una misma reacción (**Camaró & Olmos, 2013**). Las dos variantes más usadas son la técnica TaqMan y la técnica Sybr Green.

La técnica TaqMan se caracteriza por utilizar una sonda fluorogénica que permite la detección de productos de PCR específicos a medida que se acumulan durante los

ciclos de PCR (**Applied Biosystems, 2010**), por lo que brinda mayor especificidad, alto nivel de cuantificación, reproducibilidad y posibilidad de multiplexación (identificación de varios genes de manera simultánea) (**Chirinos et al., 2015**). Por otro lado, la técnica Sybr Green se caracteriza por utilizar un colorante fluorescente verde que se une al ADN de doble cadena, lo cual permite detectar productos de PCR a medida que se acumulan durante los ciclos de PCR (**Applied Biosystems, 2010**). Esta técnica es muy económica y se emplea un solo fluoróforo en diferentes ensayos. Sin embargo, presenta varios inconvenientes, puesto que no es posible realizar reacciones multiplex, y la señal emitida no es específica, debido a que el fluoróforo se une a cualquier amplicón del ADN (**Aguilera, Ruiz, & Chánez, 2015**).

La validación de los métodos moleculares cuantitativos permiten la cuantificación del ácido nucleico diana presente en la muestra, teniendo presente la exactitud, precisión, límite de cuantificación, eficiencia y linealidad de la reacción (**Torre et al., 2007**). Al validar este método se logrará obtener resultados verídicos y reproducibles en poco tiempo y fáciles de analizar, debido a que esta técnica se caracteriza por tener una alta sensibilidad y especificidad (**Bustin et al., 2009**).

La aplicación de esta técnica es de considerable utilidad en el desarrollo de investigaciones relacionadas en biología molecular aplicada, como por ejemplo en la detección de la diseminación de genes de resistencia a antibióticos en diferentes muestras ambientales (ríos, lagos, suelos, estiércol de animal entre otros), considerados en la actualidad como contaminantes emergentes (**Calero et al., 2016**). Actualmente, la PCR en tiempo real permite estudiar secuencias específicas de ADN de interés para la investigación aplicada en la medicina, la conservación medio ambiental y la industria (**Garrido et al., 2013**).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), considera a la evolución y diseminación descontrolada de elementos de resistencia a antibióticos a nivel mundial como de elevada prioridad sanitaria (**WHO, 2017**). Con el objetivo de contrarrestar esta emergencia, ha diseñado un Plan de Acción Global, el cual incluye acciones integradas

en los sectores de investigación, desarrollo, políticas públicas y sociales, en el cual participen de manera activa los sectores relacionados a medicina humana y animal, agricultura, finanzas, ambiental y de los consumidores (**Queenan, Hasler, & Rushton, 2016; Wieland & Kreuter, 2018; World Health Organization, 2015**).

Los sectores veterinario y agrícola representan unos de los principales responsables de la evolución y diseminación de determinantes de resistencia a antibióticos, en donde son usados para la prevención de enfermedades y como promotores de crecimiento (**Laxminarayan et al., 2013**). Existen una vasta evidencia que relaciona el uso de abono proveniente de estiércol animal con la diseminación de antibióticos, bacterias resistentes a antibióticos y genes de resistencia a antibióticos (ARGs, del inglés *Antibiotic resistance genes*) (**Q. Chen et al., 2016; Heuer, Schmitt, & Smalla, 2011; Huijbers et al., 2015; Marti et al., 2013; Pikkemaat, Yassin, Fels-Klerx, & Berendsen, 2016**).

Motivo por el cual, es necesario evaluar el impacto ambiental que podría tener el uso de estos residuos animales en los campos de cultivo. En Ecuador, el uso de abonos de origen avícola en campos de cultivo es habitual, así como el uso de antibióticos como promotores de crecimiento y con efecto terapéutico (**Braykov et al., 2016; Guo et al., 2018**). En base a este fundamento, el proyecto “Evaluación de la diseminación ambiental de genes de resistencia a antibióticos por medio del estiércol de gallina” analizará la potencial transferencia de ARGs, desde campos de cultivo suplementados con gallinaza a hortalizas. Parte de los objetivos de este proyecto es la detección y cuantificación de ARGs por medio de PCR cuantitativa. Para estos fines, es imprescindible contar con técnicas validadas para obtener resultados reproducibles.

Para la elección de los genes diana en esta investigación, fueron seleccionados genes que codifican mecanismos de resistencia para las principales clases de antibióticos usadas en el tratamiento de infecciones por enterobacterias, y que han sido utilizados ampliamente en estudios relacionados (β -lactámicos, quinolonas, macrólidos, tetraciclinas y sulfonamidas) (**Wax, Lewis, Salyers, & Taber, 2007**). Los genes

seleccionados para esta validación son: el gen *bla*_{TEM} de resistencia a β -lactámicos, el gen *qnrS* de resistencia a quinolonas, el gen *sulI* de resistencia a sulfonamidas, el gen *ermB* de resistencia a macrólidos, el gen *tetW* de resistencia a tetraciclinas y el 16S ARNr como gen normalizador de la abundancia bacteriana en cada muestra.

El ARG *bla*_{TEM} forma parte de los genes más extendidos que ofrecen resistencia a β -lactámicos entre bacterias Gram-negativas patógenas (Coque et al., 2008; Patterson, 2000; Rodríguez-Baño et al., 2008). El ARG a quinolonas *qnrS* fue seleccionado debido a su creciente prevalencia en aislamientos de origen clínico y su versatilidad, ya que han sido detectados a nivel cromosómico y en elementos genéticos móviles (Colomer-Lluch et al., 2014; Hooper, 2001; Paterson, 2006). El ARG *sulI* que representa la más prevalente de los genes de resistencia a sulfonamidas en muestras ambientales (Du et al., 2014; Z. Wang et al., 2013). El ARG *tetW* codifica mecanismos de protección ribosomal de resistencia a tetraciclinas, el cual fue seleccionado considerando su creciente prevalencia del mismo en bacterias de origen clínico y animal (Rodríguez et al., 2015; Sabri et al., 2018; Walsh et al., 2011). El ARG *ermB* de resistencia a macrólidos, fue seleccionado debido a su elevada prevalencia en microorganismos entéricos como *Enterococcus* y *Shigella* (McArthur et al., 2013; Ramos, Duarte, Díaz, & Moreno, 2013). Por último el ARN ribosomal 16S (16S ARNr) fue seleccionado con la finalidad de considerar los potenciales cambios en las densidades bacterianas entre muestras y normalizar las abundancias de ARGs (Pei, Kim, Carlson, & Pruden, 2006).

En la actualidad, el uso de técnicas debidamente validadas en los sectores de aseguramiento de calidad e investigación es imprescindible; siendo importantes para la investigación clínica, industrial, biológica y biomédica, con el fin de garantizar que los resultados obtenidos tengan fiabilidad al momento de realizar los ensayos (Mora, Ascón, & Hung, 2016).

Según Fondevila, Compaired, Maradei, & Duffy (2014), se validó una técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección del virus de fiebre aftosa (VFA) en la

infección aguda de bovinos vacunados e infectados experimentalmente con virus A Argentina/2001 y A24 Cruzeiro, a fin de evaluar su desempeño en muestras de líquido esófago-faríngeo (LEF). La factibilidad del método fue demostrada por los resultados, que detectaron los 7 tipos del VFA, y su validación que se demostró mediante los parámetros de repetibilidad, reproducibilidad, sensibilidad y especificidad analítica.

En el análisis anterior, la sensibilidad diagnóstica en líquido esófago-faríngeo (LEF) fue 93,1% y la especificidad diagnóstica fue 100%. De esta manera la aplicación de la técnica validada permitió demostrar que la RT-PCR en tiempo real no solo tiene valor diagnóstico para confirmar la presencia del VFA, sino que también es importante para detectar la infección temprana en los animales expuestos, aun cuando no presenten signos clínicos.

Para el estudio de la diatomea del género *Pseudo-nitzschia*, responsable de producir la toxina amnésica, que afectan a la salud humana, al ecosistema marino y a las actividades económicas relacionadas, donde según **Mora, Ascón, & Hung (2016)**, se realizó una validación de la técnica qPCR en tiempo real basándose en la técnica SYBR Green, en el que se utilizó como referencia la observación de las muestras mediante el microscopio óptico invertido. Para la identificación y cuantificación de *Pseudo-nitzschia* en las bahías de Guaynuna y Salinas ubicadas en Lima- Perú se usó la región ITS-5.8S. La curva estándar se elaboró utilizando ADN extraído de las muestras de agua de mar y se realizó mediante diluciones decimales seriadas 1:10, en el cual presentó unos valores de eficiencia de amplificación entre el 88% al 98%, unas pendientes de -3.64 y - 3.37, y un coeficiente de correlación de 0,99. Se logró detectar 6.3×10^1 células L^{-1} de *Pseudo-nitzschia*, con una sensibilidad de la prueba de 100% y 89% de especificidad.

En el anterior estudio, la sensibilidad y especificidad del método validado fueron medidas por medio de la tabla de contingencia a partir de los resultados cualitativos (positivo o negativo) obtenidos por la prueba de microscopía y el análisis de qPCR para la detección de *Pseudo-nitzschia*. De este modo los resultados obtenidos por qPCR

fueron comparados con el recuento bajo microscopía, donde ambos métodos se correlacionaron significativamente en cuanto al recuento celular, sin embargo el método de qPCR fue capaz de detectar células de *Pseudo-nitzschia* en concentraciones no detectadas por el microscopio, el cual se deduce que este método validado posee una mayor sensibilidad, especificidad y no requiere pericia taxonómica.

En el estudio de **Balcázar (2007)**, se desarrolló un ensayo de PCR en tiempo real, en el cual se utilizaron primers fluorogénicos para la detección cuantitativa de *Aeromonas salmonicida* en tejido de pescado. La *A. salmonicida* es una enfermedad que afecta a las especies de peces y ocasiona pérdidas económicas en la acuicultura de truchas y salmones. La especificidad de la especie se confirmó mediante la amplificación de los 16 aislamientos de cepas de *A. salmonicida* y por la falta de un producto de PCR con 26 cepas que no son de *A. salmonicida* y se observó una sensibilidad similar en el ADN extraído de una mezcla de *A. salmonicida* y tejido de pescado.

En este estudio, la curva estándar demostró un valor de C_t de alrededor de 15 para 50 ng de ADN ($\log 6.9 \text{ ufc ml}^{-1}$) con una pendiente de -3.53 , lo que indica una buena sensibilidad y un coeficiente de correlación de 0,99. Este alto coeficiente indicó una fuerte correlación entre las concentraciones de ADN de aislamiento que va desde 0,5 pg hasta 50 ng y la señal ΔR_n , lo que se demuestra que el ensayo es útil para las mediciones cuantitativas de *A. salmonicida*. El límite de detección de qPCR para el ADN de *A. salmonicida* derivado del cultivo puro fue de 0.5 pg de mezcla de PCR μl^{-1} , o 80 ufc (cultivo de ml^{-1}). Por ende se evidencia que el método de primer fluorogénica es una herramienta útil para la detección precisa y sensible de *A. salmonicida* en el tejido de los peces.

Estudios realizados por la Universidad de Nebraska – Lincoln, acerca del destino y transporte de antimicrobianos y genes de resistencia a antibióticos (ARG) en el suelo y en agua de lluvias después de la aplicación en tierra de lodos de estiércol de cerdo. En el cual según **Joy, Bartelt, & Snow (2013)**, los parámetros de qPCR utilizados para los genes de resistencia a la tetraciclina *tetQ* y *tetX* y para los genes de resistencia

a la tilosina *ermB* y *ermF* fueron los siguientes: *tetQ* tuvo un rango lineal de 10^2 - 10^9 copias genómicas en 20 μ l, con un coeficiente de correlación de 0.996 y una eficiencia de 104.4%; *tetX* tuvo un rango lineal de 10^1 - 10^9 copias genómicas en 20 μ l, con un R^2 de 0.997 y una eficiencia de 81,8%; *ermB* tuvo un rango lineal de 10^2 - 10^9 copias genómicas en 20 μ l, con un R^2 de 0.978 y una eficiencia de 111.1% y *ermF* tuvo un rango lineal de 10^2 - 10^9 copias genómicas en 20 μ l, con un R^2 de 0.978 y una eficiencia de 89,4%. El límite de detección para cada qPCR se determinó como la concentración mínima en la curva estándar dentro del rango lineal.

Los indicadores de eficiencia que serán considerados en la obtención de las curvas estándar son: una pendiente ideal de -3.3 (100% de eficiencia) y con un coeficiente de correlación (r^2) mayor o igual a 0.98. La eficiencia de la PCR dependerá del ensayo, el rendimiento de la mezcla de reactivos y la calidad de la muestra; normalmente una eficiencia entre 90 y 110% se considera aceptable (**Applied Biosystems, 2010; Biassoni & Raso, 2014**)

Para realizar la validación de las técnicas de PCR cuantitativa (qPCR) se usarán las técnicas Sybr Green para el gen *ermB* y TaqMan® para los genes *bla*_{TEM}, *sull*, *qnrS*, *tetW* y 16S rDNA, por cuestiones de disponibilidad de reactivos y estándares del proyecto. En la técnica Sybr Green, la magnitud de la fluorescencia aumenta proporcionalmente a la concentración del ADN de doble cadena. Mientras que, en la técnica TaqMan, al cortar los nucleótidos de la sonda por la actividad 5' exo nucleasa, los fluoróforos (un reportero unido al extremo 5' y un apagador en el extremo 3') se separan y se observa la señal de fluorescencia (**Aguilera et al., 2015**).

Estos sistemas de detección (Sybr Green y TaqMan) serán utilizados en la PCR en Tiempo Real, debido a que, Sybr Green es relativamente económico (**Garrido, 2013**). Según **Torre (2007)**, en ensayos de cuantificación que requieren de una elevada especificidad resulta recomendable en empleo de las sondas TaqMan. Ambas técnicas han sido utilizadas en estudios con matrices ambientales (**Calero & Muniesa, 2016; Colomer et al., 2014; Rodriguez et al., 2015**).

1.2.Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Validar técnicas de PCR cuantitativa (qPCR) para la cuantificación de genes de resistencia a antibióticos

1.2.2. Objetivos Específicos

Diseñar un estándar plasmídico para el gen *tetW* y purificar estándares a partir de bacterias portadoras de plásmidos recombinantes para los genes *bla*_{TEM}, *sulI*, *qnrS*, *ermB* y 16S rDNA

Realizar los experimentos de obtención de las curvas estándar en el termociclador en tiempo real, utilizando los métodos Sybr Green para el gen *ermB* y TaqMan para los genes *bla*_{TEM}, *sulI*, *qnrS*, *tetW* y 16S rDNA

Obtener las ecuaciones, líneas base (thresholds), límite de cuantificación, eficiencia y especificidad para los genes *bla*_{TEM}, *sulI*, *qnrS*, *tetW*, *ermB* y 16S rDNA

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Materiales de laboratorio

Tabla N° 1. Materiales de Laboratorio

Detalle	Cantidad
Frasco tapa rosca azul en vidrio 500 ml	4
Frasco tapa rosca azul en vidrio 100 ml	2
Asa de inoculación	2
Cajas Petri de plástico	50
Tubos Eppendorf 1.5 ml	400
Tubos Falcon 50ml	50
Gradilla	3
Micropipetas 0,5 -10 μ L; 20 -200 μ L; 100-1000 μ l	1
Pipetas 10ml	2
Espátula	1
Puntas con filtro 10 μ l;100 μ l; 500 μ l ;1000 μ l	1000
Cajas Racks	5
Tubos de 0.2 ml para PCR	50
Tubos de ensayo con tapa 20ml	25
Placas MicroAmp de 96 pocillos	3 cajas
Aplicador de película adhesiva	1
Pinza metálica	1

2.1.2. Equipos

Tabla N° 2. Equipos de Laboratorio

Detalle	Cantidad
Autoclave (Midmark M11 UltraClave)	1
Incubadora Bacteriológica red LINE by BINDER	1
Balanza Analítica AE ADAM	1
Baño María StableTemp	1
Mechero de Bunsen	1
Cámara de Flujo Laminar Thermo Scientific	1
Centrífuga Sorvall St8	1
Microcentrífuga Sorvall Legend Micro i7	1
Vórtex Digital OHAUS	1
Transiluminador UV enduro TM GDS Tower	1
Cámara de electroforesis OWL Easycast Thermo Scientific	1
Espectrofotómetro NanoDrop™ 2000	1
Termociclador 7500 Fast Real- Time PCR System	1

2.1.3. Reactivos

Tabla N° 3. Reactivos de Laboratorio

Detalle	Cantidad
Caldo nutritivo LB (Luria-Bertani)	50 g
Ultrapure™ 10X TBE buffer Invitrogen	1 unidad
Agua Libre de Nucleasas (VWR)	10 unidades
TaqMan Environmental Master Mix 2.0	3 unidades
SYBR® Green PCR Master Mix	1 unidad
Kit de extracción de plásmidos (EasyPrep™ Plasmid Midiprep-II Kit)	1 caja
Kit de purificación de productos de PCR (GenElute™ PCR Clean-Up Kit)	1caja
Primers gen (<i>16S rDNA</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>qnrS</i> , <i>sulI</i> <i>emrB</i> , <i>tetW</i>)	1 unidad c/u

2.1.4. Insumos

Tabla N° 4. Insumos de Laboratorio

Detalle	Cantidad
Mascarillas	3 cajas
Guantes de Nitrilo	1 caja
Para film	1 caja
Cinta adhesiva auca de papel	1 unidad
Papel aluminio	1 caja
Papel toalla rollo cafe	1 rollo
Alcohol antiséptico	2 litros
Gel antibacterial	1 unidad
Jabón líquido	1 unidad
Cloro	1 litro

2.1.5. Materiales de escritorio

Tabla N° 5. Materiales de Escritorio

Detalle	Cantidad
Computadora	1
Impresora	1
Cámara Fotográfica	1
Folios A4	1 paquete
Esferos y lápices	5
Calculadora	1
Marcador permanente para CD	3
Cuaderno	2

2.2.Métodos

2.2.1 Protocolo de Extracción de Plásmidos

Antes de iniciar, es necesario cultivar y generar biomasa de las bacterias transformadas con el plásmido de interés (100 mL de cultivo *overnight*: O/N).

- 1) Colocar 40 mL de biomasa en 6 tubos falcón de 50 mL y centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos. Descartar el sobrenadante.
- 2) Añadir 1 mL de tampón A1 en 5 tubos falcón y transferir el 1 mL de tampón A1 del primer tubo falcón al segundo tubo falcón, hasta obtener un volumen total de 5 mL de tampón A1 en el quinto tubo falcón. Al trasladar el 1 mL de tampón A1 en cada tubo falcón es importante suspender el sedimento bacteriano mediante pipeteo. Finalmente se añade 5 mL de tampón A1 en el sexto tubo falcón y se vuelve a suspender completamente el sedimento bacteriano por pipeteo.
- 3) Añadir 5 mL de tampón A2 y mezclar suavemente 5- 6 veces con un poco de agitación. Incubar durante 3 minutos.
- 4) Añadir 2 mL de tampón A3 y mezclar suavemente 5- 6 veces con un poco de agitación.
- 5) Para eliminar el lisado, colocar la jeringa EasyFilter en un nuevo tubo falcón sin el émbolo, verter el lisado en el filtro de la jeringa y dejar reposar durante 10 minutos. Insertar suavemente el émbolo para expulsar el lisado limpio al tubo.
- 6) Añadir 4 mL de tampón A3 y 5 mL de etanol al 96%. Mezclar suavemente 5- 6 veces.
- 7) Para preparar la columna añadir 3 mL de tampón de columna a la columna e incubar por 2 minutos y se centrifugar a 3.500 rpm durante 3 minutos. Desechar el flujo continuo.
- 8) Transferir 20 mL de la mezcla lisado / etanol a una columna de ADN con el tubo de recolección y centrifugar a 3500 rpm durante 3 minutos. Desechar el flujo continuo.

- 9) Añadir 5 mL de etanol al 70% en la columna y centrifugar a 3500 rpm durante 3 minutos. Desechar el flujo continuo.
- 10) Repetir el paso 9.
- 11) Centrifugar a 3.500 rpm durante 5 minutos.
- 12) Colocar la columna en un nuevo tubo falcón de 50 mL y añadir 500 µL de tampón de elución e incubar durante 1 min. Eluir el ADN por centrifugación a 3.500 rpm durante 2 minutos.
- 13) Añadir el eluido que se encuentra debajo de la columna y nuevamente añadir 500 µL de tampón de elución y centrifugar a 3.500 rpm por 1 minuto.
- 14) Almacenar el plásmido puro en congelación a -20°C.

2.2.2. Medición de la Concentración de ADN en Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

- 1) Abrir el programa Nanodrop 2000 y seleccionar la opción ácidos nucleicos.
- 2) Levantar la tapa del Nanodrop y cargar 2 µL de la solución blanco (buffer del plásmido). Pulsar BLANK.
- 3) A continuación cargar 2 µL de cada muestra, ingresando sus correspondientes códigos y pulsar MEASURE. Los resultados de la cuantificación pasan a una hoja de Excel, donde se encuentra las concentraciones en ng/µL y la relación 260/280 para verificar la calidad del ADN.
- 4) Almacenar las muestras de ADN a -20°C

2.2.3. Diseño del Estándar Plasmídico del gen *tetW*

- 1) Obtener la secuencia del gen *tetW* a partir de la base de datos de genes de resistencia a antibióticos CARD (*The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*, University of McMaster).
- 2) Evaluar la especificidad de los primers y sondas mediante la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, National Center for Biotechnology Information).
- 3) Seleccionar un fragmento de 200 pb y enviar a sintetizar este fragmento dentro de un plásmido pTOP Blunt V2 en Macrogen (Corea del Sur).
- 4) Colocar cada dilución (-1 a -11) en 3 tubos eppendorf, donde se obtuvo 3 réplicas de diluciones y se conservó a -20°C.
- 5) Cuantificar por medio de qPCR aplicando la técnica TaqMan (ver tabla 8y fig. 3).
- 6) Los resultados obtenidos se interpretaron por medio del análisis de gráficas.

2.2.4. Elaboración de Estándares de qPCR

- 1) Realizar la purificación del plásmido a partir de un cultivo O/N de la bacteria con el plásmido de interés.
- 2) Cuantificar la cantidad de plásmido a través del espectrofotómetro Nanodrop con el fin de verificar la eficiencia de la extracción.
- 3) Realizar una PCR convencional, donde se utilizó como muestra el plásmido extraído y como control positivo una cepa que contenga el gen de interés, empleando las condiciones de reacción que se observa en tabla 6 y fig. 2.
- 4) Al obtener una amplificación positiva, se realizó un banco de diluciones del plásmido a partir de agua bidestilada libre de nucleasas, en un rango entre -1 y -11, con un volumen final c/dilución: 90 µL

- 5) Colocar cada dilución en 3 tubos eppendorf, donde se obtuvo 3 réplicas de diluciones y se conservó -20°C.
- 6) Cuantificar por medio de qPCR, donde se aplicó la técnica TaqMan para los genes *bla_{TEM}*, *sul1*, *qnrS*, utilizando las reacciones presentes en la tabla 8 y fig. 3. En el caso del gen *ermB* se aplicó la técnica Sybr Green y se utilizó las reacciones que se detallan en la tabla 9 y fig. 4
- 7) Los resultados obtenidos se interpretaron por medio del análisis de gráficas

2.2.5. Elaboración de Estándares del 16S rDNA

- 1) Realizar una PCR convencional, empleando la reacción de la tabla 7 y fig. 1
- 2) Al alcanzar una amplificación positiva, se procedió a realizar el protocolo de purificación de productos de amplificación por PCR.
- 3) Cuantificar la cantidad de ADN a través del espectrofotómetro Nanodrop.
- 4) Realizar un banco de diluciones del 16S rDNA a partir del tampón de elución, en un rango entre -1 y -11, con un volumen final c/dilución: 90 µL
- 5) Colocar cada dilución en 3 tubos eppendorf, donde se obtuvo 3 réplicas de diluciones y se conservó a -20°C.
- 6) Cuantificar por medio de qPCR, utilizando la técnica TaqMan y las condiciones de reacción como se muestra en la tabla 8 y fig. 3.
- 7) Los resultados obtenidos se interpretan por medio del análisis de gráficas.

2.2.6. Protocolo de Purificación de Productos de Amplificación por PCR

- 1) Colocar una columna de mini espín de plásmido GenElute en un tubo de recolección y agregar 500 μL de la solución de preparación de la columna. Centrifugar a 12,000 xg durante 1 minuto. Desechar el eluato.
- 2) Añadir 5 volúmenes de solución de unión (5 veces el volumen de las muestras de la reacción de PCR) en el tubo de las muestras positivas de la reacción de PCR. Transferir la solución a la columna y centrifugar a 12,000 xg durante 1 minuto. Desechar el eluato pero retener el tubo de recolección.
- 3) Añadir 500 μL de solución de lavado a la columna y centrifugar a 12,000 xg durante 1 minuto. Desechar el eluato pero retener el tubo de recolección.
- 4) Nuevamente centrifugar a 12,000 xg durante 2 minutos para eliminar el exceso de etanol. Desechar el eluido residual y el tubo de recolección.
- 5) Transferir la columna en un nuevo tubo de recolección y añadir 50 μL de solución de elución. Incubar por 1 minuto y centrifugar a 12,000 xg durante 1 minuto.
- 6) Una vez más recoger la elución que se encuentra debajo de la columna y de nuevo añadir 50 μL de solución de elución y centrifugar a 12,000 xg durante 1 minuto.
- 7) Retirar la columna y almacenar el producto de PCR puro a -20°C .

2.2.7. Reacciones de PCR Y qPCR

Para las reacciones de amplificación de PCR convencional se usó un volumen final de 25 μL . Este volumen está formado por 2,5 μL de muestra y otros 23,5 μL de mezcla de reacción MIX, compuesto por Dream Taq, primers específicos para cada gen (forward y reverse) y agua libre de nucleasas. El volumen necesario para cada componente se detalla en la tabla 6.

Tabla N° 6. Reacciones de PCR convencional

Reactivo	Cantidad (μL)	Descripción
Dream Taq	12,5	ADN polimerasa Dream Taq, tampón DreamTaq Green optimizado MgCl ₂ y desoxinucleótidos (dNTP)
Primer 1	0,5	Concentración: 30μM
Primer 2	0,5	Concentración: 30μM
dd H ₂ O	9	Agua libre de nucleasas
Muestra	2,5	Plásmido extraído

Para las reacciones de amplificación de PCR 16S rDNA se usó un volumen final de 50 μL. Este volumen está formado por 5 μL de muestra y otros 45 μL de mezcla de reacción MIX, compuesto por Dream Taq, primers específicos para cada gen (forward y reverse) y agua libre de nucleasas. El volumen necesario para cada componente se detalla en la tabla 7.

Tabla N° 7. Reacción de PCR 16S rDNA

Reactivo	Cantidad (μL)	Descripción
Dream Taq	25	ADN polimerasa Dream Taq, tampón DreamTaq Green optimizado MgCl ₂ y desoxinucleótidos (dNTP)
Primer 1	0,33	Concentración: 10μM
Primer 2	0,33	Concentración: 10μM
dd H ₂ O	19,34	Agua libre de nucleasas
Muestra	5	Plásmido extraído

Para las reacciones de amplificación de qPCR se usó un volumen final de 20 μL . Este volumen está formado por 9 μL de muestra ,1 μL de Primer -sonda y 10 μL de TaqMan®, como se observa en la tabla 8.

Tabla N° 8. Reacción de qPCR TaqMan

Reactivo	Cantidad (μL)	Descripción
Primer y sonda	1	Primer 1 y 2: Conc.18 μM Sonda: Conc. 5 μM
TaqMan®	10	<i>TaqMan Environmental Master Mix 2.0.</i>
Muestra	9	Plásmido extraído

Para las reacciones de amplificación de qPCR *emrB* se usó un volumen final de 10 μL . Este volumen está formado por 4,5 μL de muestra ,5 μL de SYBR® Green y 0,25 μL de primer forward y reverse, como se observa en la tabla 9.

Tabla N° 9. Reacción de qPCR Sybr Green

Reactivo	Cantidad (μL)	Descripción
SYBR® Green	5	<i>SYBR ® Green PCR Master Mix</i>
Primer 1	0,25	Concentración: 10 μM
Primer 2	0,25	Concentración: 10 μM
Muestra	4,5	Plásmido extraído

2.2.8. Condiciones de reacción de PCR y qPCR

La reacción de PCR del 16S rDNA se desarrolló en un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 15 min, seguido por 30 ciclos de amplificación en cual consiste en 95°C por 60 s, 50°C por 45 s y 72°C por 90 s y un ciclo final de extensión a 72°C por 10 min, como se aprecia en la fig. 1

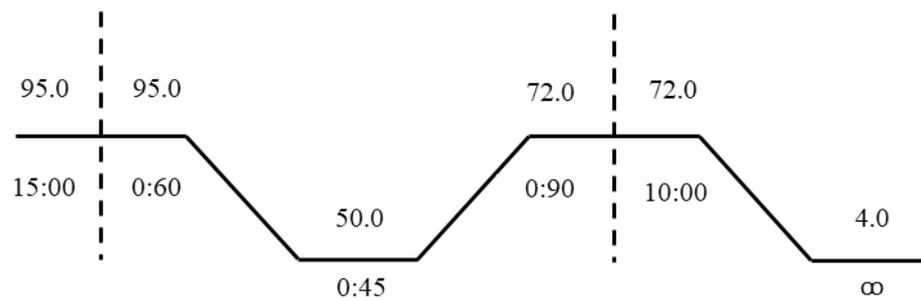


Figura 1. Condiciones de reacción de PCR para el gen 16S rDNA

Las reacciones de PCR se desarrolló en un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 25 ciclos de amplificación en cual consiste en 94°C por 30 s, 53°C por 30 s y 72°C por 30 s y un ciclo final de extensión a 72°C por 7 min, como se observa en la fig. 2

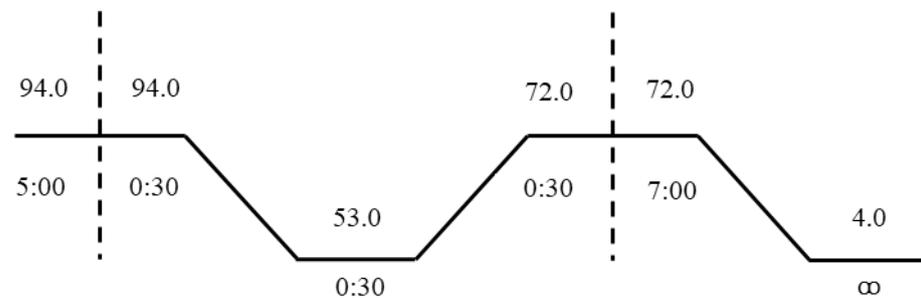


Figura 2. Condiciones de reacción de PCR convencional

La reacción de qPCR se realizaron en un Termociclador 7500 Fast Real- Time PCR System de Applied Biosystems usando el programa con el siguiente régimen del ciclado: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 15 s a 95°C, 1 min a 60°C, como se observa en la fig. 3

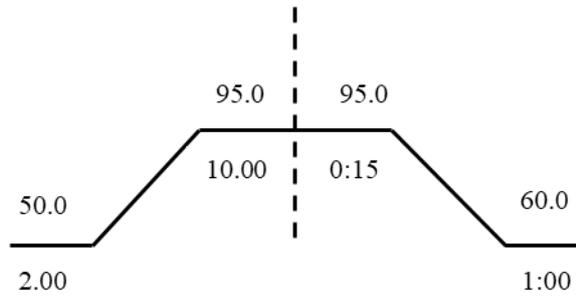


Figura 3. Condiciones de reacción de Real- Time qPCR (TaqMan)

Para la reacción de qPCR *emrB* se realizó con el siguiente orden del ciclado: 2 min a 50°C, 2 min a 95°C, 15 s a 95°C, 20 s a 58°C, como se observa en la fig. 4

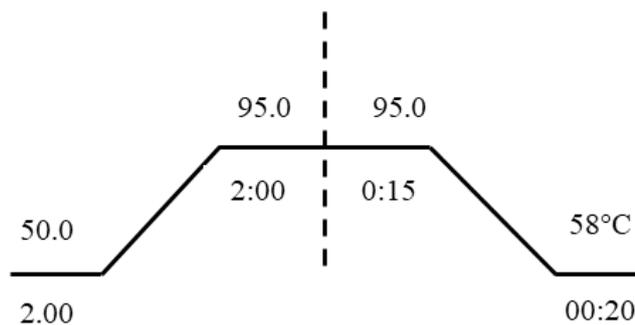


Figura 4. Condiciones de reacción de Real- Time qPCR (Sybr)

2.2.9. Amplificación de Genes de Resistencia mediante PCR

Para la identificación de los genes de resistencia se utilizaron las siguientes cepas control, tal como se observa en la tabla 10.

Tabla N° 10. Cepas control usados para la amplificación de los genes de resistencia

Control (Tipo de Gen)	Bacteria
<i>bla</i> _{TEM}	<i>Escherichia coli</i> DH5 α + pGEM (<i>bla</i> _{TEM}) Universidad de Barcelona-MARS
<i>qnrS</i>	<i>Escherichia coli</i> DH5 α + pGEM (<i>qnrS</i>) Universidad de Barcelona-MARS
<i>sul 1</i>	<i>Escherichia coli</i> DH5 α + pGEM (<i>sul 1</i>) Universidad de Barcelona-MARS
<i>ermB</i>	<i>Escherichia coli</i> DH5 α + pGEM (<i>ermB</i>) Universidad de Barcelona-MARS
16S rDNA	Gen 16S rDNA <i>Escherichia coli</i> WG5
<i>tetW</i>	Plásmido pTOP Blunt V2 + <i>tetW</i> (200 pb) Macrogen (Corea del Sur).

2.2.10. Oligonucleótidos usados en este estudio

En este trabajo se utilizó los primers y sondas específicos para cada gen, tal como se muestra en la tabla 11.

Tabla N° 11. Oligonucleótidos usados para la amplificación mediante qPCR

GEN	PRIMER	SECUENCIA 5' 3'	PB	REFERENCIA
<i>bla</i> _{TEM}	UP	CTCACCCAGAAACGCTGGTG	569	(Colomer-Lluch et al.,2011)
	PCR LP	ATCCGCCTCCATCCAGTCTA		
<i>bla</i> _{TEM}	UP	CACTATTCTCAGAATGACTTGGT	85	(Lachmayr et al.,2009)
	qPCR LP	TGCATAATTCTCTTACTGTCATG		
	SONDA	FAM-CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ		
<i>qnrS</i> PCR	UP	AAGTGATCTCACCTTCACCGCTTG	425	(Colomer-Lluch et al.,2014)
	LP	TTAAGTCTGACTCTTTCAGTGATG		
<i>qnrS</i> qPCR	UP	CGACGTGCTAACTTGCGTGA	118	(Colomer-Lluch et al.,2014)
	LP	GGCATTGTTGGAAACTTGCA		
	SONDA	VIC-AGTTCATTGAACAGGGTGA-MGBNFQ		
<i>sulI</i> PCR	UP	TTCATGGGCAAAAGCTTGATG	964	(Modificado de Heur, & Smalla,2007)
	LP	GGCCGGAAGGTGAATGCTA		
<i>sulI</i> qPCR	UP	CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG	67	(Modificado de Czekalski,Berthold, Caucci, Egli & Burgmann,2012)
	LP	TTGCCGATCGCGTGAAGT		

GEN	PRIMER	SECUENCIA 5' 3'	PB	REFERENCIA
<i>ermB</i> PCR	91f	GATACCGTTTACGAAATTGG	364	(J. Chen et al., 2007)
	454r	GAATCGAGACTTGAGTGTGC		
16 rDNA	27f	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG		(Sander &
PCR	1492r	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	1503	Schmieger,2001)
16S rDNA	UP	TCCTACGGGAGGCAGCAGT		(Walsh et al., 2011)
qPCR	LP	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	466	
	SONDA	FAM-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-MGBNFQ		
<i>tetW</i>	UP	CGGCAGCGCAAAGAGAAC	58	(Walsh et al., 2011)
	LP	CGGGTCAGTATCCGCAAGTT		
	SONDA	FAM-CTGGACGCTCTTACG-MGBNFQ		

2.2.11. Diagrama de la estrategia experimental

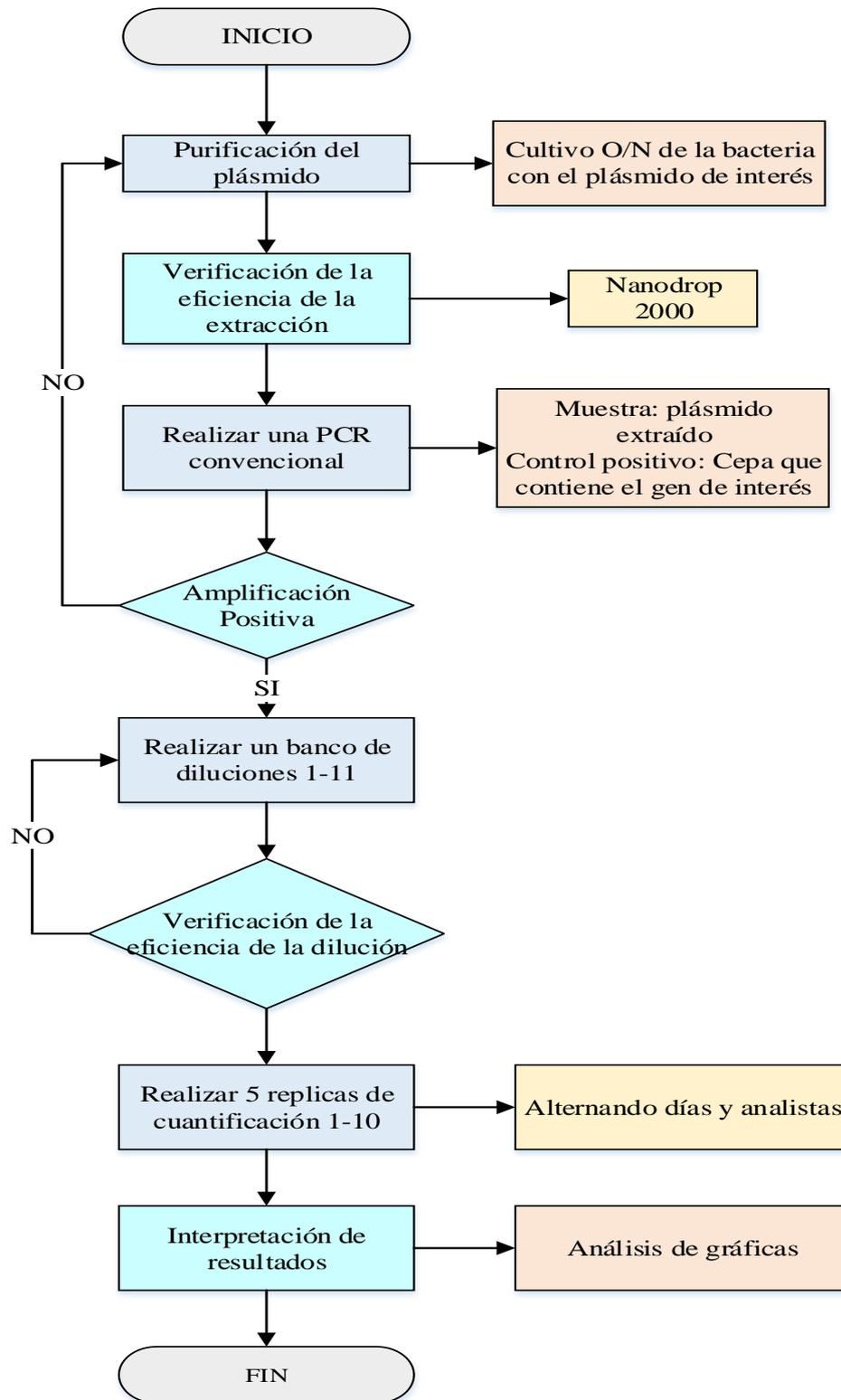


Figura 5. Diagrama de flujo del proceso de la qPCR

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados

3.1.1. Diseño del estándar del gen de resistencia a tetraciclina *tetW*

En la base de datos de genes de resistencia a antibióticos CARD (*The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*, University of McMaster) (en el sitio <https://card.mcmaster.ca/>), se buscó la secuencia completa del gen *tetW* (ver fig. 6).

```
Protein  DNA
>gb|AJ222769.3|+|3687-5606|tetW [Butyrivibrio fibrissolvens]
ATGAAAATAATCAATATTGGAAATTCCTTGCCCATGTAGACGCTGGAAAGACGACCTTGACGGAGAGCCTGCTATATGCCACGGAGCCATT
TCAGAACCGGGGAGCGTGGAAAAGGGACAAACAGGAGCGGACACCCATGTTTTGGAGCGGCGAGCGTGGGATTACCATTCAGCGGCGAGTC
ACTTCCTCCAGTGGSCACAGATGTAAAGTTAACATTGTGGATACGCCCGGCCACATGGATTTTTTGGCGGAGGTGTACCCGCTCTTTGGCT
GTTTTAGATGGGGCCATCTTGGTGAICTCCGCTAAAGATGGCGTGCAGGCCAGACCCGATTTCTGTTCCATGCCCTGCGGAAAATGAAC
ATTCCACCCGTTATCTTTATCAACAAGATCGACAGGCTGGCGTTGATTTGCAGAGCGTGGTTCAGTCTGTTCCGGATAAGCTCTCCGCC
GATATTATCATCAGCAGACGGTGTGCGTGTCCCGGAAATAGTCCCTGGAGGAAAATACCGACATAGAACCATGGGATGCGGTTCATCGAA
AATAACGATGAATATTGGAAAAGTATATCGCAGGAGAACCATCAGCGCGGAAAACCTTGGCGGGAGGACAGCAGCGGGTTCAGAGAC
GCCTCCCTGTTCCAGTCTATCATGGCAGCGCCAAAATGGCCCTTGGCATTCAACCGTTGATGGATGCGGTGACAGGCGTGTCCAAACCG
ATTGGGGAACAGGGGGGCGCCGCTATGGCGCAGCGTTTTCAAGGTGAGTACACCGATTGCGGCCAGCGCGTGTCTATCTACGGTTA
TACAGCGGAACGCTGCGCCCTGCGGATACGGTGGCCCTGGCCGGAGAGAAAAGCTGAAAATCACAGAGATGCGTATTCCATCCAAAGGG
GAAATTTGTTGCGACAGACACCGCTTATCAGGGTGAATTTGTTATCCTCCCGACGACAGCGTGAAGTTAAACGATGTATTAGGGGACCAA
ACCGGCTCCCTCGTAAAGTGGGCGGAGGACCCGCTCCGCTGCTGCGGACGAGGATTGCGCCGAAAACGCGCAGCGCAAGAGAACGG
CTGCTGGACGCTCTTACGCACTTGGGATACAGCCGCTTTTTGGCTGGGAAAGTGGATTCCATCACCCATGAGATCATCTCTCTTTT
TTGGCCGGGTCAGTTGGAGGTTGTTTTCCGCTTTGCTGTGGGAAAATACAAAGCTTGAACAGTGGTAAAGGAAACCCCTCCGCTATTAT
ATGGAGCGCGCGCTCAAAGCAGCCAGCCACACCATCCATATCGAGGTGCCGCCAACCCGTTTTGGGCAATCCATAGACTGTCTGTTACA
CCACTCTCGCTTGGCTCCGGTGTACAAATACGAGAGCCGGTTTTCCGCTGGGATACTTGAACAGAGTTTTCAAACCGCTGTACAGGGATGGT
ATCCGTTACGGGCTGGAGCAGGGCTTGTTCGGCTGGAACGTAACCGACTGTAAGATTTGCTTTGAATACGGGCTTTTATTACAGTCCGGTC
AGCACCGCGCGGACTTCCGCTCATTGGCCCGGATTTGATTTGGAACAGGCATTGAAGGAAATCGGGGACGCGCTGCTGGAACCTTATCTC
TCTTTCATCTCTATGGCCCCAGGAAATACCTTTCAGGGCTTATCATGATGCACCGAAATACTGTGGCCACCATCGAAACGGCCAGGTA
AAJAGGATGAAAGTTGTTTACTGGCGAGATTCGCCCGCGTGTATACAGGCATACCGTACTGATCTGGCCTTTTACACCAAACGGGCGG
AGCGTATGCCTTACAGAGCTGAAAAGATATCAGGCGCTGTCCGCTCAGCCGCTCATCCAGCCCCGCTCCAAACAGCCGCTGGACAG
GTGCGCCATATGTTTCAGAAAGTAAATGTA
```

Figura 6. Obtención de la secuencia del gen *tetW* en la base de datos CARD

Se comprobó la especificidad teórica de las secuencias seleccionadas por medio de la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, National Center for Biotechnology Information) disponible en el sitio web (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se evaluó la especificidad de los primers del gen *tetW* en la herramienta Primer Blast, disponible en web

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), en donde se introdujo la secuencia seleccionada. Los resultados de la evaluación de la especificidad de los primers con el fragmento sintetizado se encuentran en la figura 7. Finalmente, se envió a sintetizar un fragmento de 200 pb que abarque a las regiones que flanquean los primers (58 pb), dentro de un plásmido pTOP Blunt V2 en MacroGen (Corea del Sur). El reporte de la síntesis del gen se encuentra en el anexo 1.

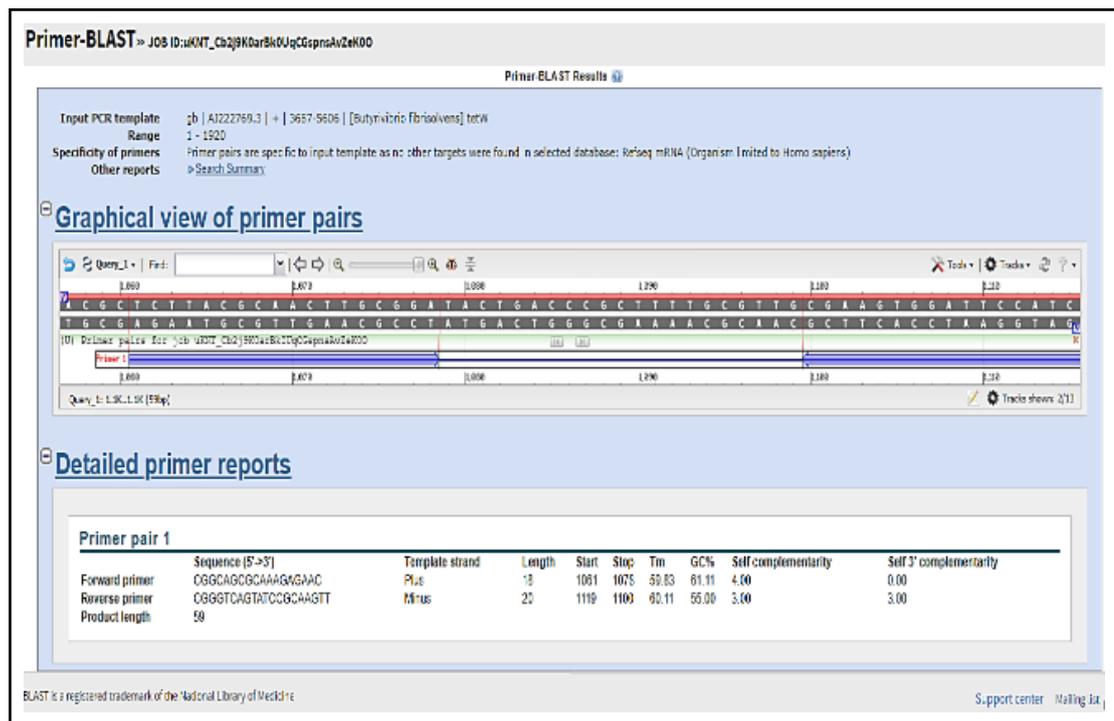


Figura 7. Reporte de especificidad del NCBI del Gen *tetW*

3.1.2. Extracción, purificación y cuantificación de los plásmidos

Los plásmidos portadores de los genes diana fueron purificados y cuantificados utilizando el equipo NanoDrop (Thermo Scientific, Estados Unidos) por triplicado. El detalle de las concentraciones y los ratios de pureza se describen en la tabla 12. En el caso de obtener bajas cuantificaciones de DNA o ratios de pureza inferiores a 1.8 (260/280) y de 2.0 (260/230) fueron considerados inaceptables y se repitió la técnica de extracción de plásmido.

Tabla N° 12. Concentración de los estándares purificados y ratios de pureza

Gen	Concentración ng/μl	Ratio 260/280 nm	Ratio 260/230 nm
<i>bla</i> _{TEM}	287,13	1,92	2,47
<i>qnrS</i>	247,17	1,95	2,78
<i>sul 1</i>	102,3	1,93	2,80
16S rDNA	85,45	1,97	2,73
<i>ermB</i>	89,85	1,94	3,41

Para la estimación de la cantidad del gen objetivo en la muestra, se analizó la correlación entre la señal del termociclador en tiempo real, y la cantidad del gen estándar correspondiente. Para lo cual, se realizaron diluciones seriales de estándares, para cuantificar la señal que emiten al ser amplificadas en presencia de fluoróforos (TaqMan o Sybr), y poder estimar los rangos de cuantificación y límites de detección correspondientes. El detalle de los controles se encuentra en la tabla 10. Las diluciones seriadas se realizaron utilizando agua destilada libre de nucleasas como solvente, de acuerdo al flujo observado en el gráfico 1.

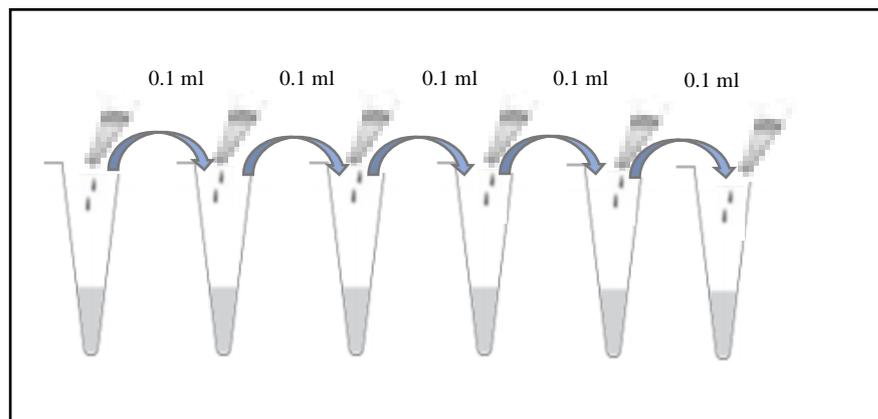


Gráfico 1. Elaboración de Diluciones en Serie

3.1.3. Eficiencia y linealidad del método

3.1.3.1. Elaboración de las curvas estándar en qPCR en tiempo real, empleando la técnica TaqMan

Curva estándar del gen *bla*_{TEM}

Para realizar la curva estándar de *bla*_{TEM}, se partió de las diluciones -1 a -11, donde se cuantificó por triplicado. En la figura 8A se muestra una tendencia lineal en las primeras diluciones; sin embargo, al llegar a la dilución -10 y -11 (zona sombreada) va disminuyendo su comportamiento lineal, con un coeficiente de correlación de 0,995 y una eficiencia fuera del rango óptimo (111,7%).

Se volvió a colocar la concentración del plásmido, descartando los pocillos de la dilución -11 (fuera de la tendencia lineal) y se procedió nuevamente a calcular los resultados; obteniendo así un alto coeficiente de correlación. Con esta modificación, la curva estándar resultante es una recta con pendiente -3,182; un coeficiente de correlación r^2 de 0,999 (mayor linealidad) y una eficiencia de 106,2% (figura 8B); por lo que los datos generados se encuentran dentro del rango óptimo como sugiere **Applied Biosystems, (2010)**.

Posteriormente, se realizaron 5 réplicas de la cuantificación con estos 10 puntos, alternando los días y los analistas, con el objetivo de verificar la reproducibilidad del método y disminuir las fuentes de error aleatorio y sistemático (**Calero, 2016**).

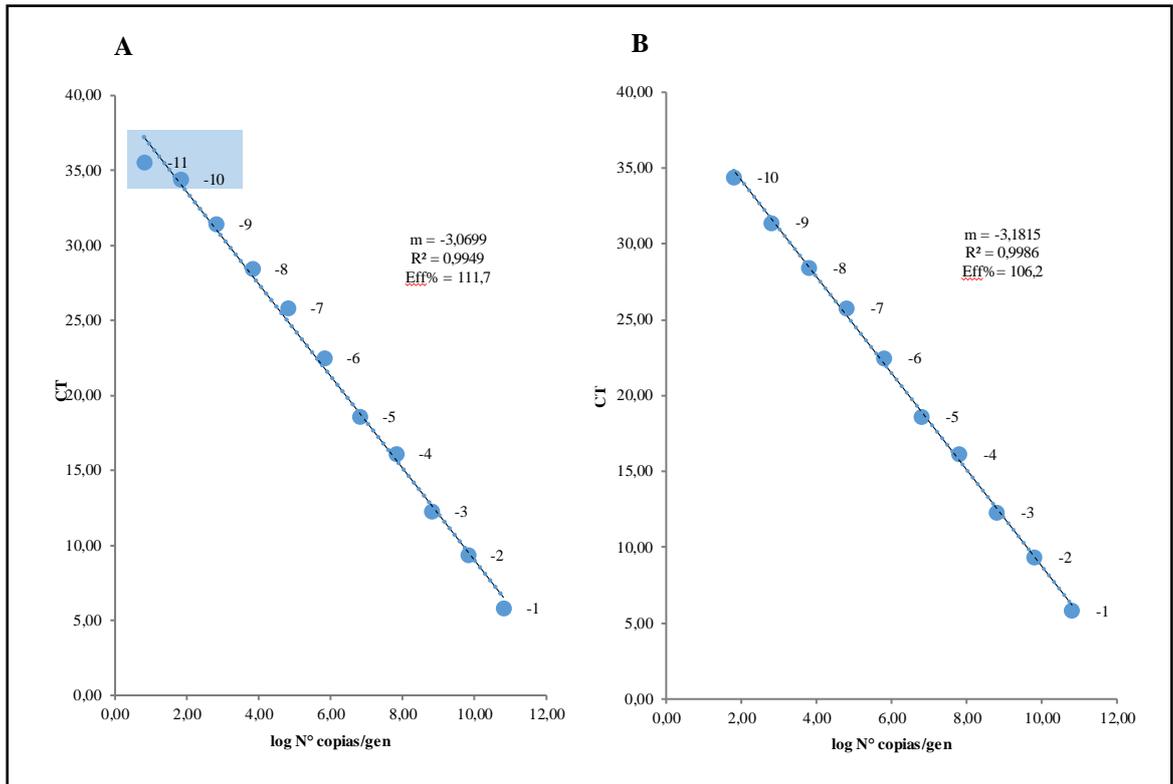


Figura 8. Curva estándar de *bla*_{TEM}

A. Figura del logaritmo de la concentración del estándar Vs número del ciclo umbral, usando 11 diluciones seriadas: 1×10^1 - 1×10^{11} (fuera del rango lineal). Pendiente = -3,069 $r = 0,995$ y Eficiencia de 111,7% **B.** Figura del logaritmo de la concentración del estándar Vs número del ciclo umbral, usando 10 diluciones seriadas: 1×10^1 - 1×10^{10} (dentro del rango lineal). Pendiente = -3,182; $r = 0,999$ y Eficiencia de 106,2%.

Curva estándar del gen *qnrS*

Para realizar la curva estándar de *qnrS*, se partió igualmente de las diluciones -1 a -11, en el que se cuantificó por triplicado. En la figura 9A se observa que en las primeras diluciones existe una tendencia lineal, la misma que se va perdiendo en la dilución -10 y -11 (zona sombreada), con un coeficiente de correlación de 0,994 y una eficiencia fuera del rango óptimo de 111%.

Nuevamente se colocó la concentración del plásmido, eliminando los pocillos respectivos a la dilución -11 (fuera de la tendencia lineal), obteniendo así una curva estándar con mayor linealidad, con pendiente $-3,207$; un coeficiente de correlación r^2 de $0,998$ y una eficiencia aceptable de 105% (figura 9B); por lo cual estos indicadores de eficiencia están dentro de los rangos óptimos.

De igual manera, a partir de estos 10 puntos, se realizó mínimo 5 réplicas de la cuantificación, alternando los días y los analistas, con el propósito de verificar la reproducibilidad del método y disminuir las fuentes de error aleatorio y sistemático.

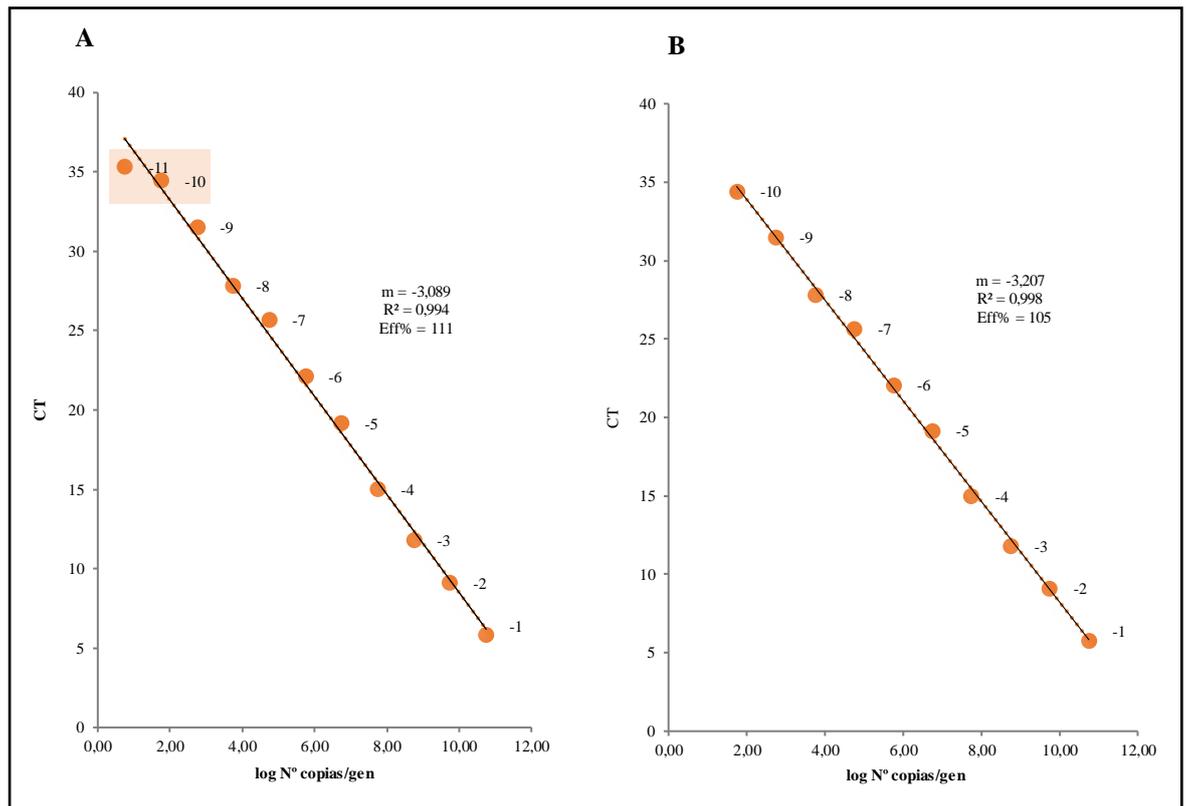


Figura 9. Curva estándar de *qnrS*

A. Figura del logaritmo de la concentración del estándar Vs número del ciclo umbral, usando 11 diluciones seriadas: $1 \times 10^1 - 1 \times 10^{11}$ (fuera del rango lineal). Pendiente = $-3,090$ $r = 0,994$ y Eficiencia de 111% **B.** Figura del logaritmo de la concentración del estándar Vs número del ciclo umbral, usando 10 diluciones seriadas: $1 \times 10^1 - 1 \times 10^{10}$ (dentro del rango lineal). Pendiente = $-3,207$; $r = 0,998$ y Eficiencia de 105% .

Curva estándar del gen *sul 1*

Para llevar a cabo la curva estándar de *sul1*, se realizó las diluciones 1 a -11, en el cual se cuantificó por triplicado. En la figura 10A se observa una tendencia lineal en las primeras diluciones, en cambio al llegar a la dilución -10 y -11 va reduciendo su comportamiento lineal (zona sombreada), con un coeficiente de correlación de 0,992 y una eficiencia fuera del rango óptimo de 115,6%.

Por lo que, se volvió a colocar la concentración del plásmido, descartando los pocillos de las diluciones correspondientes a las diluciones -11 (fuera de la tendencia lineal) y se calculó nuevamente los resultados. Ahora la curva estándar presenta una pendiente -3,108; un coeficiente de correlación r^2 de 0,995 (mayor linealidad) y una eficiencia de 109,8% (figura 10B); lo cual se encuentran dentro del rango que requiere el equipo Termociclador 7500 Fast Real- Time PCR System.

Por consiguiente, para verificar la reproducibilidad del método y disminuir las fuentes de error aleatorio y sistemático, se realizó mínimo 5 réplicas de la cuantificación con estos 10 puntos.

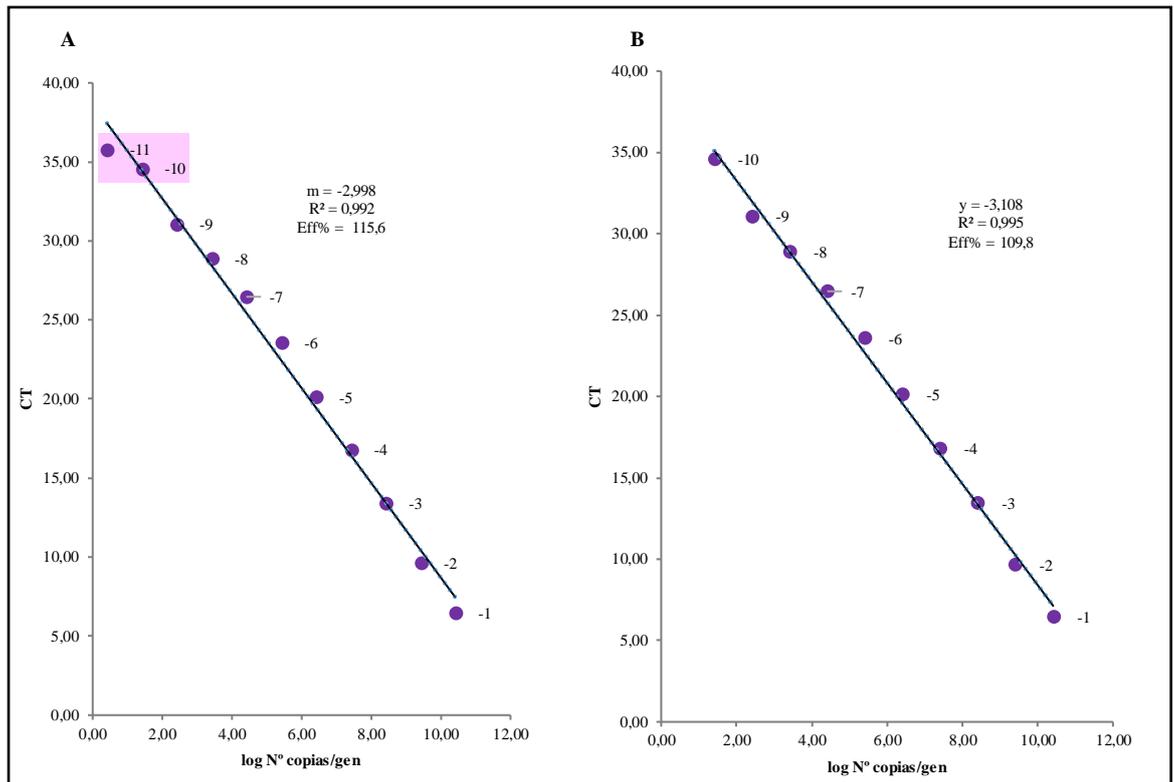


Figura 10. Curva estándar de *sulI*

A. Figura del logaritmo de la concentración del estándar Vs número del ciclo umbral, usando 11 diluciones seriadas: 1×10^1 - 1×10^{11} (fuera del rango lineal). Pendiente = -2,998; $r = 0,992$ y Eficiencia de 115,6% **B.** Figura del logaritmo de la concentración del estándar Vs número del ciclo umbral, usando 10 diluciones seriadas: 1×10^1 - 1×10^{10} (dentro del rango lineal). Pendiente = -3,108; $r = 0,995$ y Eficiencia de 109,8%.

Curva estándar del gen 16S rDNA

Con la finalidad de elaborar la curva estándar 16s rDNA, se llevó primero a cabo la purificación de los productos de amplificación utilizando el kit de purificación de productos de PCR (GenElute™ PCR Clean-Up Kit) y se realizó las diluciones 1 a -11, en el cual se cuantificó por triplicado. En la figura 11A se observa una tendencia lineal en las primeras diluciones, en cambio al llegar a la dilución -10 y -11 (zona sombreada) va reduciendo su comportamiento lineal, con un coeficiente de correlación de 0,996 y una eficiencia de 105%. Aunque se obtuvo una eficiencia

dentro del rango óptimo, se realizó un ajuste lineal en la curva estándar, eliminando las diluciones -11 con el fin de obtener una mayor tendencia lineal. Ahora la curva estándar presenta una pendiente de -3,31; un coeficiente de correlación r^2 de 0,999 (mayor linealidad) y una eficiencia de 100,5%. Al obtener una pendiente cercana a -3,3 indica una eficiencia de amplificación óptima del 100%, tal como se muestra en la figura 11B, por lo que los datos generados se encuentran dentro del rango óptimo.

Así pues, para verificar la reproducibilidad del método y disminuir las fuentes de error aleatorio y sistemático, se realizó mínimo 5 réplicas de la cuantificación con estos 10 puntos.

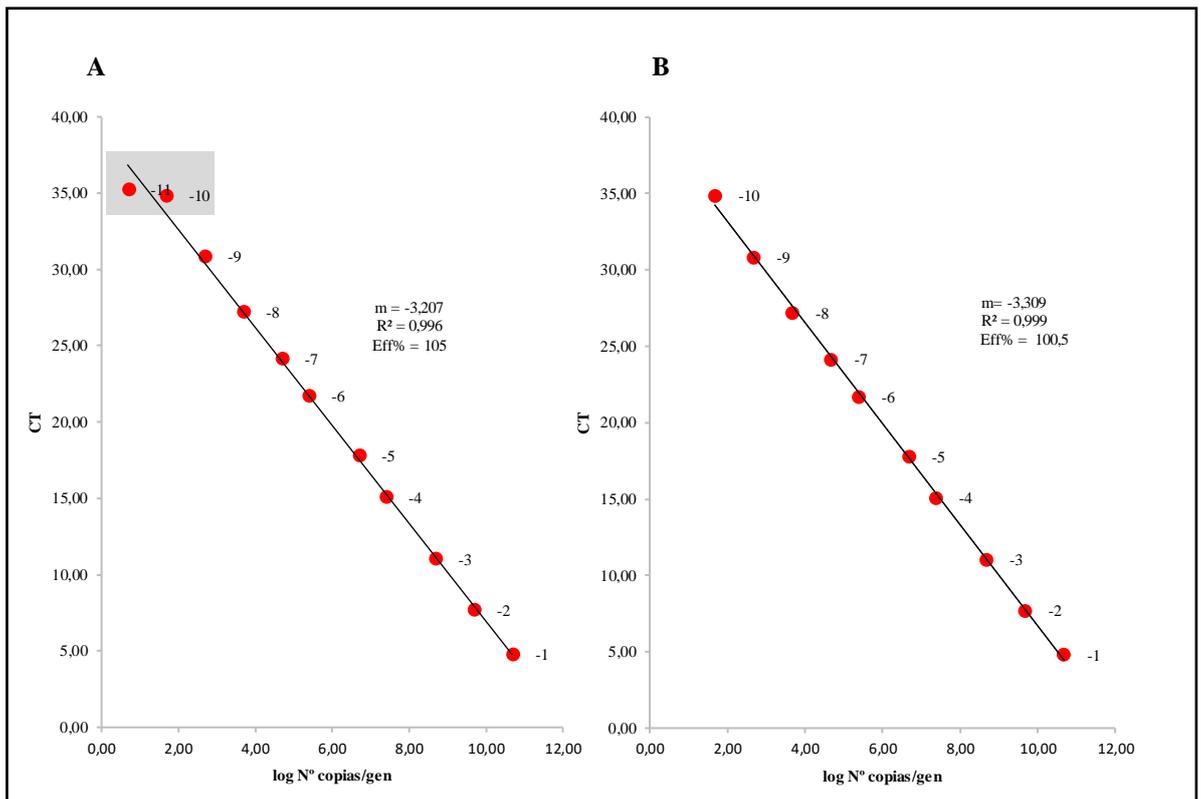


Figura 11. Curva estándar de 16S rDNA

A. Figura del logaritmo de la concentración del estándar Vs número del ciclo umbral, usando 11 diluciones seriadas: $1 \times 10^1 - 1 \times 10^{11}$ (fuera del rango lineal). Pendiente = -3,206 $r = 0,996$ y Eficiencia de 105% **B.** Figura del logaritmo de la concentración del estándar Vs número del ciclo umbral, usando 10 diluciones seriadas: $1 \times 10^1 - 1 \times 10^{10}$ (dentro del rango lineal). Pendiente = -3,31; $r = 0,999$ y Eficiencia de 100,5%.

Curva estándar del gen *tetW*

Para llevar a cabo la curva estándar *tetW*, se realizó las diluciones -1 a -11 por triplicado, las diluciones -11 no se aprecian ya que su resultado fue indeterminado. En la figura 12A se observa una tendencia lineal en las primeras diluciones y al llegar a la dilución -9 y -10 va reduciendo su linealidad (zona sombreada), con un coeficiente de correlación de 0,993 y una eficiencia de 103,4%. Pese a que la eficiencia se encuentre dentro del rango, se realizó un ajuste lineal con el fin de aumentar su comportamiento lineal. Por lo cual, se volvió a colocar la concentración del plásmido, descartando los pocillos de las diluciones correspondientes a las diluciones -10 (fuera de la tendencia lineal) y las diluciones -11 (indeterminado) y se calculó nuevamente los resultados.

Ahora la curva estándar presenta una pendiente ideal de -3,385; un coeficiente de correlación r^2 de 0,998 (mayor linealidad) y una eficiencia de 97,4%, como se observa en la figura 12B, por lo que los datos obtenidos se encuentran dentro del rango óptimo.

Por lo tanto, para verificar la reproducibilidad del método y disminuir las fuentes de error aleatorio y sistemático, se realizó mínimo 5 réplicas de la cuantificación con estos 9 puntos.

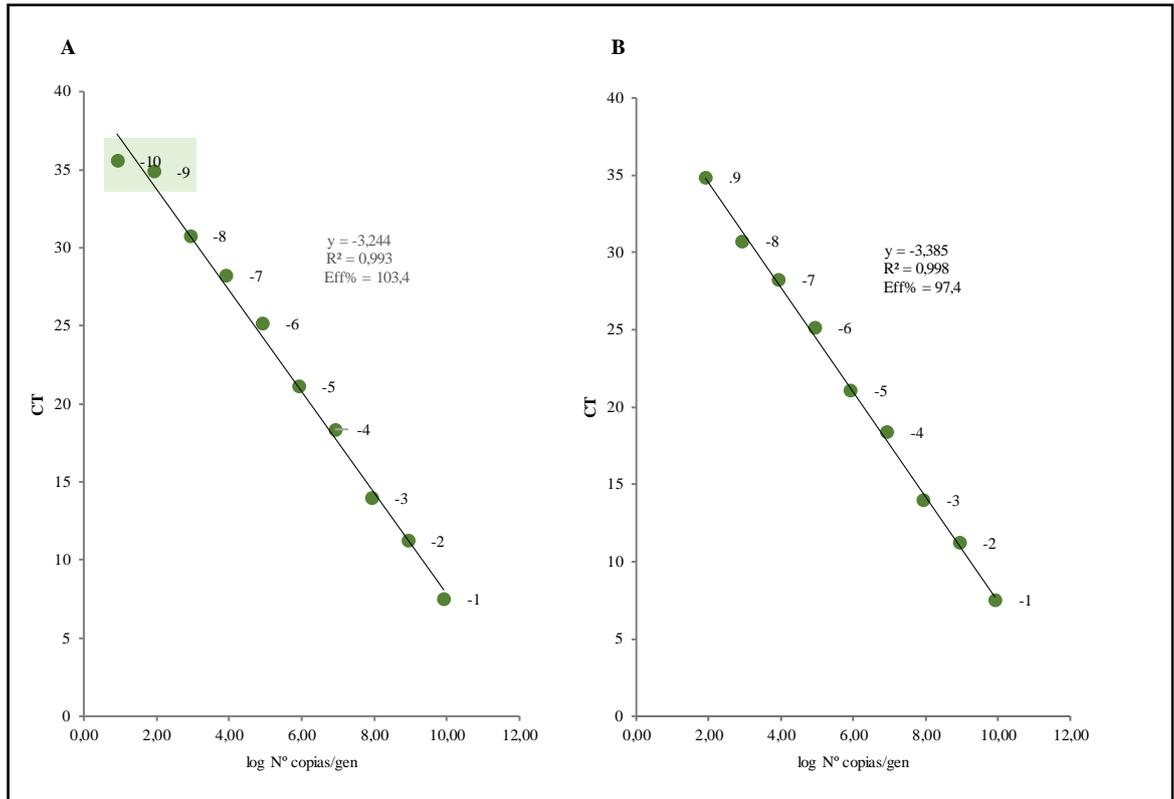


Figura 12. Curva estándar de *tetW*

A. Figura del logaritmo de la concentración del estándar Vs número del ciclo umbral, usando 10 diluciones seriadas: $1 \times 10^1 - 1 \times 10^{10}$ (fuera del rango lineal). Pendiente = -3,244 $r = 0,993$ y Eficiencia de 103,4% **B.** Figura del logaritmo de la concentración del estándar Vs número del ciclo umbral, usando 9 diluciones seriadas: $1 \times 10^1 - 1 \times 10^9$ (dentro del rango lineal). Pendiente = -3,385; $r = 0,998$ y Eficiencia de 97,4%.

3.1.3.2. Elaboración de las curvas estándar en qPCR en tiempo real, empleando la técnica Sybr Green.

Curva estándar del gen *ermB*

Para llevar a cabo la curva estándar *ermB*, se realizó las diluciones 1 a -11, en el cual se cuantifico por triplicado. En la figura 13A se observa una tendencia lineal en las primeras diluciones y al llegar a la dilución -10 y -11 (zona sombreada) va reduciendo su linealidad, con un coeficiente de correlación de 0,993 y una eficiencia fuera de

rango de 111,08%. De tal forma, se volvió a colocar la concentración del plásmido, descartando los pocillos de las diluciones correspondientes a las diluciones -11 (fuera de la tendencia lineal) y se calculó nuevamente los resultados. Ahora la curva estándar presenta una pendiente de $-3,221$; un coeficiente de correlación r^2 de $0,998$ (mayor linealidad) y una eficiencia de $104,4\%$, como se observa en la figura 13B; lo cual se encuentran dentro del rango óptimo de desempeño en un ensayo de qPCR.

Por lo tanto, para verificar la reproducibilidad del método y disminuir las fuentes de error aleatorio y sistemático, se realizó mínimo 5 réplicas de la cuantificación con estos 10 puntos.

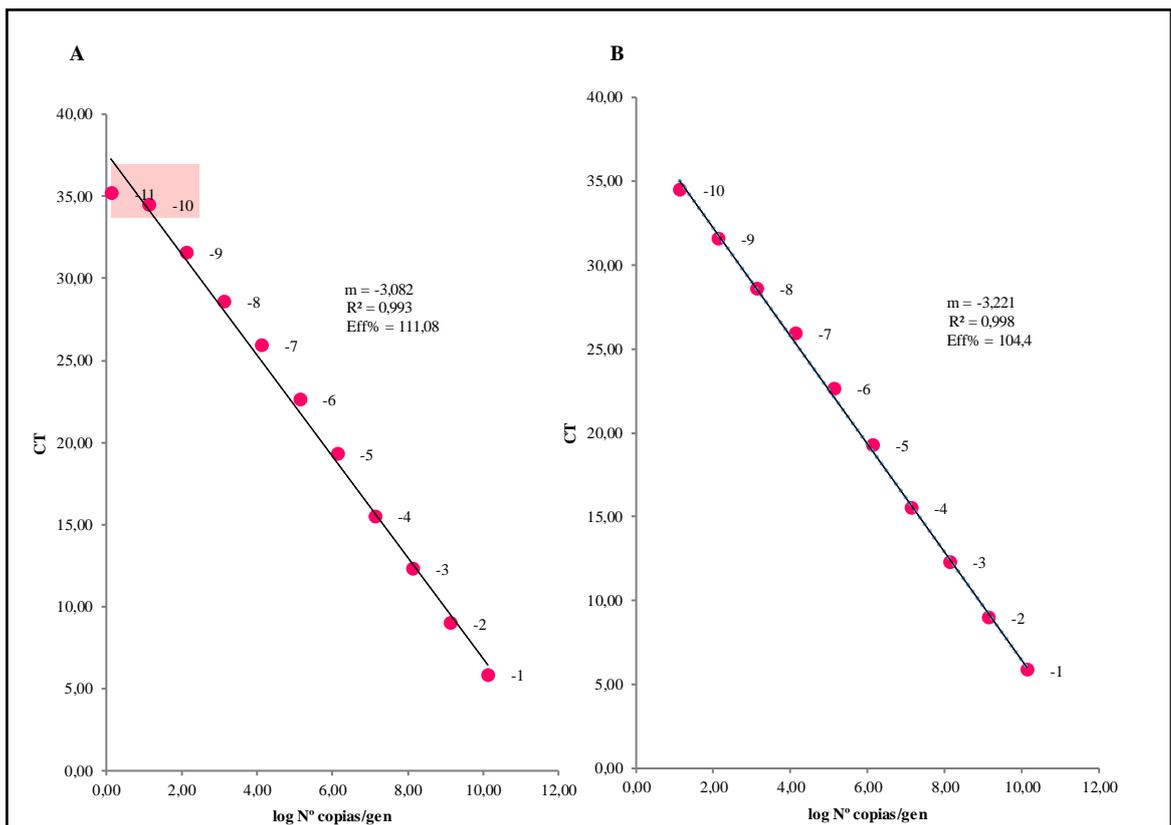


Figura 13. Curva estándar de *ermB*

A. Figura del logaritmo de la concentración del estándar Vs número del ciclo umbral, usando 11 diluciones seriadas: $1 \times 10^1 - 1 \times 10^{11}$ (fuera del rango lineal). Pendiente = $-3,082$ $r = 0,993$ y Eficiencia de $111,08\%$ **B.** Figura del logaritmo de la concentración del estándar Vs número del ciclo umbral, usando 10 diluciones seriadas: $1 \times 10^1 - 1 \times 10^{10}$ (dentro del rango lineal). Pendiente = $-3,221$; $r = 0,998$ Eficiencia de $104,4\%$.

3.1.4. Ecuaciones de las rectas

Las ecuaciones de las rectas se realizaron a partir de los resultados de Ct para cada dilución, y el valor del logaritmo del número de copias genómicas de los estándares. La descripción de los resultados por repetición se detalla en el anexo B. A nivel general, se observan las diferencias de ΔCt entre las diluciones decimales; para *bla*_{TEM} fue aproximadamente de $\Delta Ct \approx 3,19$, *qnrS* fue $\Delta Ct \approx 3,91$, *sul 1* fue $\Delta Ct \approx 3,45$, 16S rDNA fue $\Delta Ct \approx 3,34$, *tetW* fue $\Delta Ct \approx 3,42$ y *ermB* fue de 3,20. Estos valores se encuentran dentro de los rangos recomendados de diferencias entre diluciones decimales.

Se calcularon las ecuaciones de las rectas para cada gen, a través de las gráficas de dispersión. En el eje x se colocaron las medias de los Ct y en el eje y los log No. Copias de cada dilución, tal como se observa en la figura 14.

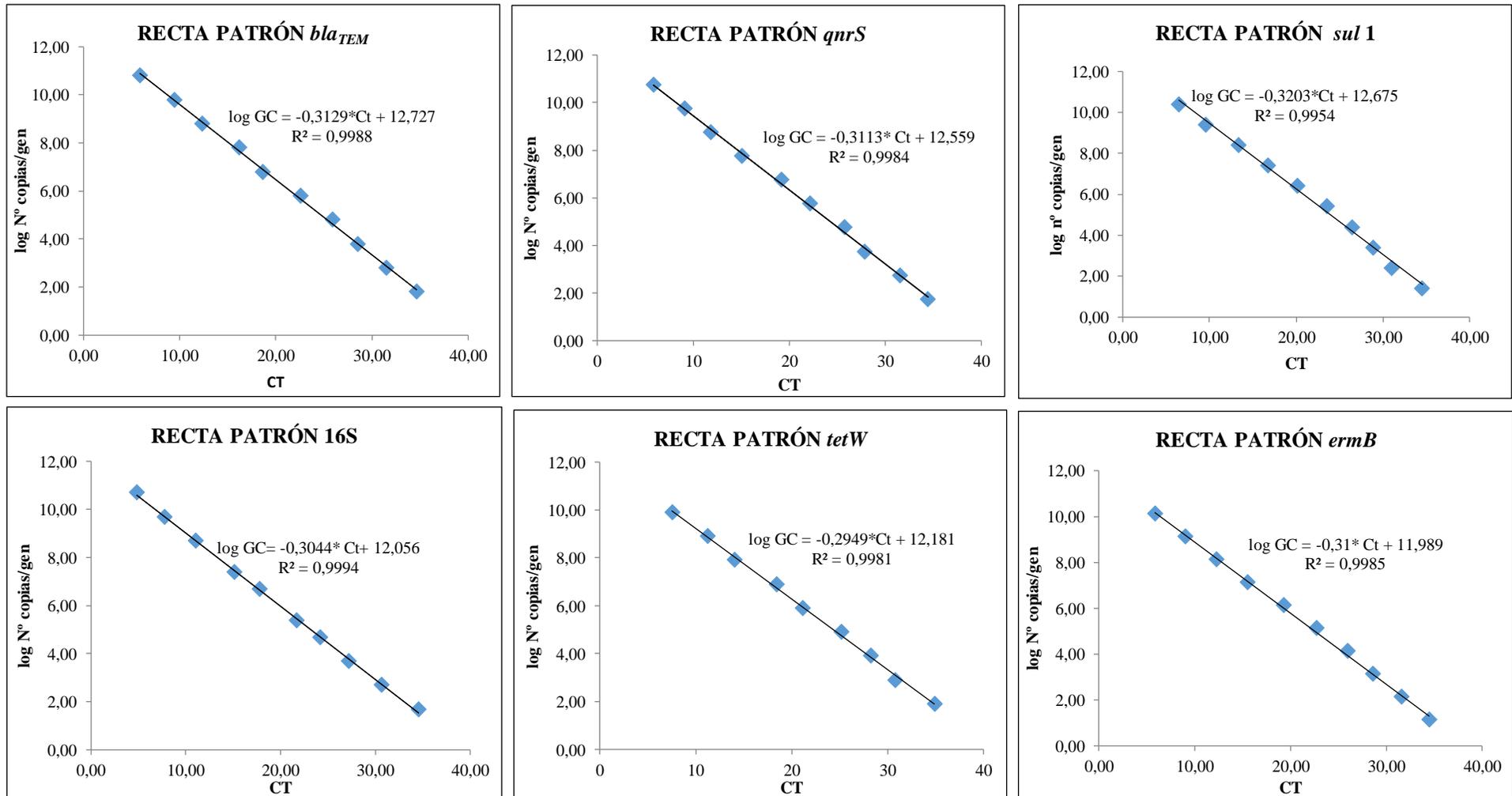


Figura 14. Ecuaciones de las rectas

3.1.5. Línea base (Thresholds)

Las líneas base (threshold) se estableció automáticamente en el software, en donde en base a la fase exponencial de las curvas de amplificación y a la señal del ruido de fondo, calcula apropiadamente el punto en el cual se establece correctamente los valores de Ct en la curva, tal como se presenta en la tabla 13.

Tabla N° 13. Línea de threshold de los diferentes genes

Gen	Thresholds
<i>bla</i> _{TEM}	0,99
<i>qnrS</i>	0,10
<i>sul 1</i>	0,50
16S rDNA	0,03
<i>tetW</i>	0,08
<i>ermB</i>	0,05

3.1.6. Límite de cuantificación del método

Los resultados de las curvas estándar de cada gen, indican que los límites de cuantificación de Ct se encuentran entre 33,8 a 34,9. Según lo indicado por **Bustin, Benes, & Garson, (2008)** un valor de Ct < 35 es deseable, por lo tanto los límites de cuantificación obtenidos de los diferentes genes fueron adecuados. Este límite de cuantificación es la menor concentración de ADN detectado a través de las curvas estándar para cada gen, que puede ser cuantificada con una exactitud aceptable (**Castillo, 2014; Pérez, 2017; Torre, 2007**).

En la siguiente tabla 14 se observan las concentraciones de ADN detectado y el número de copias en qPCR.

Tabla 14. Límite de cuantificación de Ct de los diferentes genes

Gen	Ct	Nº copias en qPCR
<i>bla</i> _{TEM}	34,4	6,32
<i>qnrS</i>	34,5	5,38
<i>sul 1</i>	34,5	2,58
<i>tetW</i>	34,8	8,20
16S rDNA	34,8	4,79
<i>ermB</i>	34,4	1,33

3.1.7. Especificidad del método

La especificidad de los primers (*bla*_{TEM}, *sul1*, *qnrS*, *ermB* y 16S rDNA) se comprobó utilizando el programa informático de alineamiento de secuencias BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, National Center for Biotechnology Information), con el fin de verificar que tengan una sola secuencia a dentro del DNA que será amplificado. Para lo cual, se utilizaron diferentes secuencias de la base de datos del NCBI portadoras de los genes de interés.

En las siguientes figuras se observan el resultado de las búsquedas de la especificidad teórica de cada uno de los primers:

Especificidad para el Gen *bla_{TEM}*

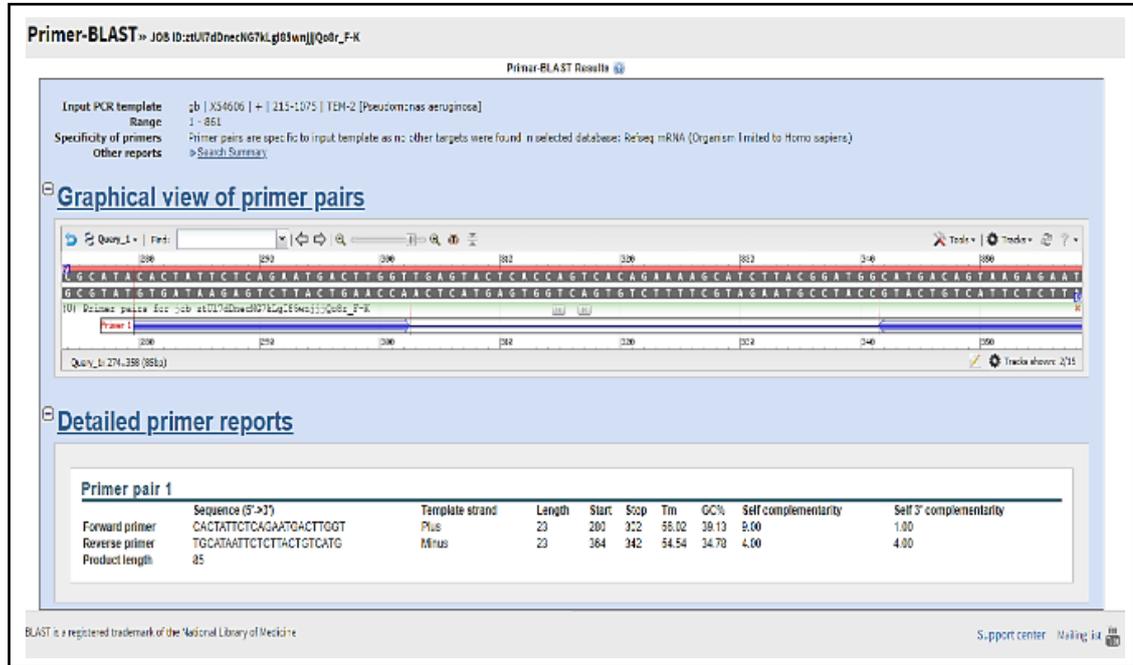


Figura 15. Reporte de especificidad del NCBI del Gen *bla_{TEM}*

Especificidad para el Gen *qnrS*

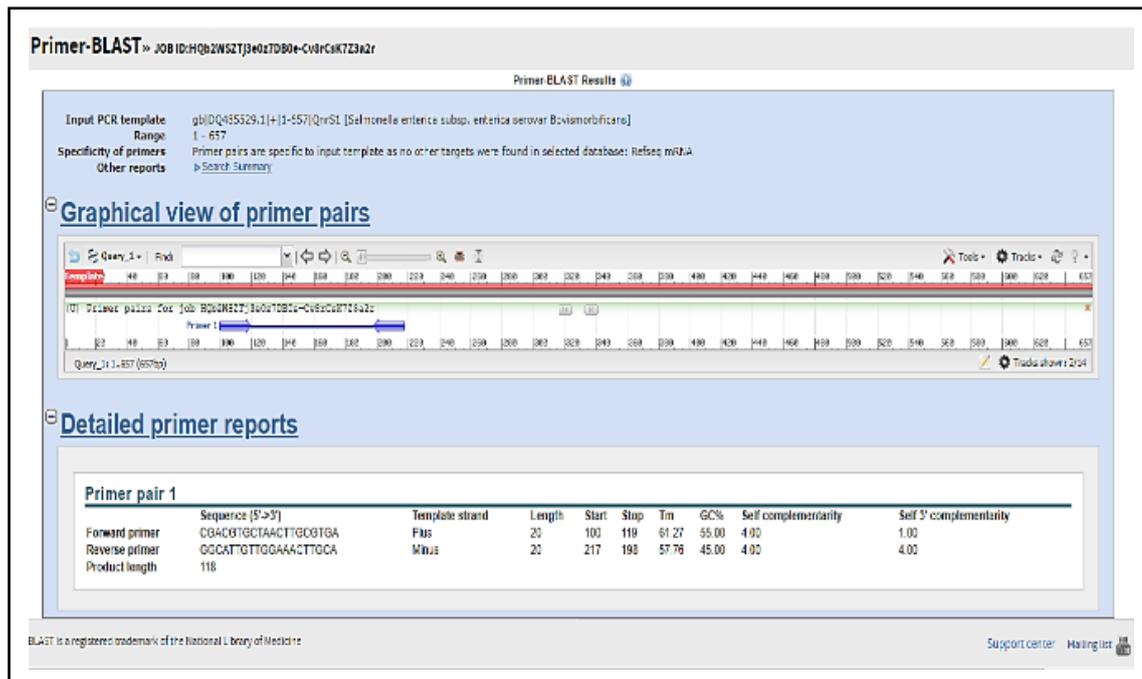


Figura 16. Reporte de especificidad del NCBI del Gen *qnrS*

Especificidad para el Gen *sul 1*

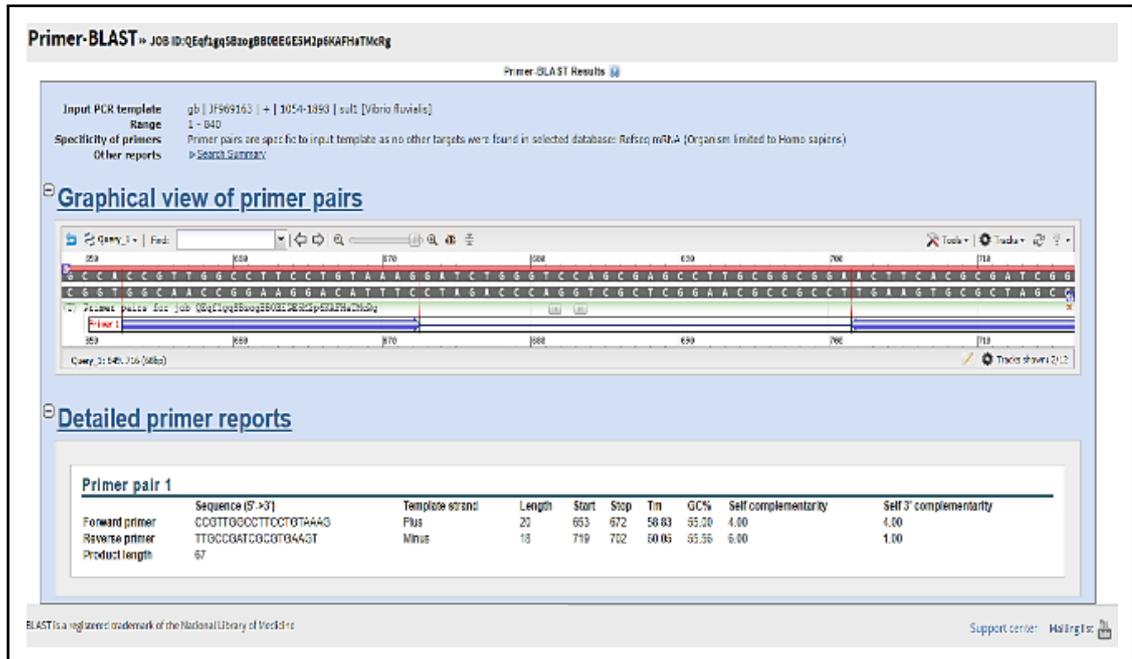


Figura 17. Reporte de especificidad del NCBI del Gen *sul 1*

Especificidad para el Gen *ermB*

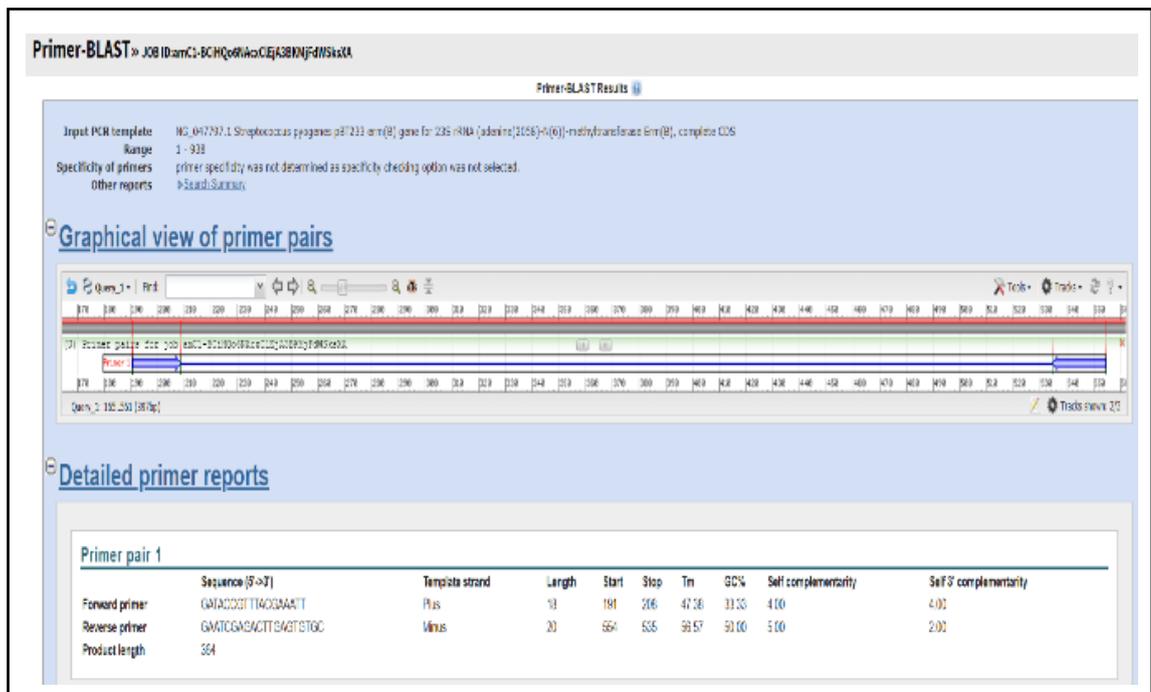


Figura 18. Reporte de especificidad del NCBI del Gen *ermB*

Especificidad para el Gen 16S rDNA

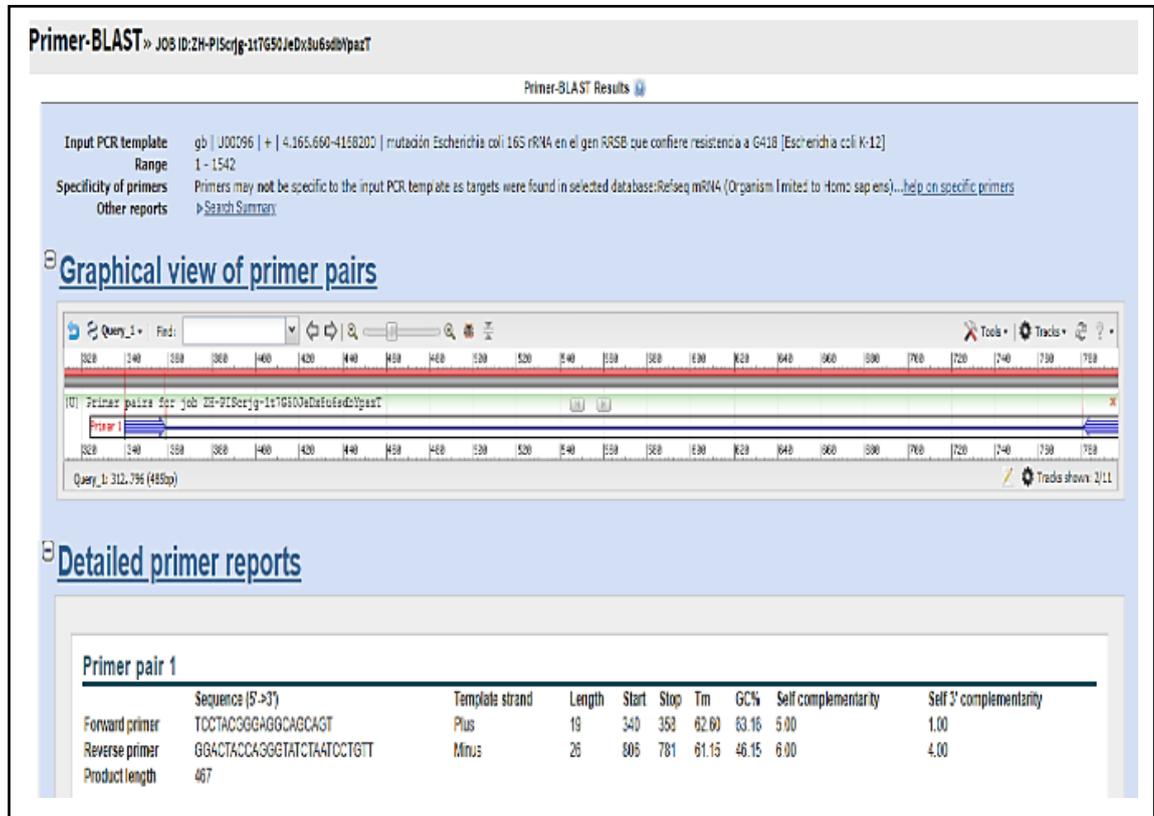


Figura 19. Reporte de especificidad del NCBI del Gen 16 rDNA

3.1.8. Reproducibilidad del método

A continuación, se muestran los resultados de reproducibilidad obtenidos mediante cinco réplicas de la cuantificación por qPCR de los 5 genes de resistencia a antibióticos y el 16S rDNA, con diferentes analistas y días.

En la tabla 15 se observan los resultados de reproducibilidad del gen *bla*_{TEM} calculados a través de cinco réplicas de PCR en tiempo real, alternando los días y analistas. Los resultados indican que en todas las diluciones (1×10^1 - 1×10^{10}) la desviación estándar fue menor a 0,73 ciclos de amplificación y los coeficientes de variación tuvieron un rango de 0,84-4,53%. En este caso se muestra una menor variabilidad en los resultados, demostrando así una buena reproducibilidad del método.

Tabla 15. Reproducibilidad del método de PCR a tiempo real del gen *bla*_{TEM}

Dilución	Ct1x	Ct2x	Ct3x	Ct4x	Ct5x	Media CT	SD*	CV* (%)
-1	6,08	5,85	6,12	5,54	5,76	5,87	0,24	4,07
-2	9,29	9,45	9,39	9,53	9,44	9,42	0,09	0,94
-3	12,32	12,60	12,27	11,83	12,58	12,32	0,31	2,53
-4	16,32	15,62	16,38	17,23	15,36	16,18	0,73	4,53
-5	18,74	18,34	18,79	18,61	18,67	18,63	0,18	0,94
-6	22,59	22,74	22,71	21,87	22,84	22,55	0,39	1,73
-7	26,28	25,36	25,51	25,77	26,33	25,85	0,44	1,71
-8	28,33	28,47	28,70	28,17	28,73	28,48	0,24	0,84
-9	32,35	31,58	30,91	31,72	30,74	31,46	0,65	2,07
-10	34,71	35,15	33,66	34,32	34,26	34,42	0,55	1,63

*SD= desviación estándar

*CV= coeficiente de varianza

En la tabla 16 se observan los resultados de reproducibilidad del gen *qnrS*, lo cual se demuestra que en todas las diluciones (1×10^1 - 1×10^{10}) la desviación estándar fue menor a 0,64 ciclos de amplificación y los coeficientes de variación obtuvieron un rango de 1,33-5,39%, indicando una menor variabilidad en los resultados.

Tabla 16. Reproducibilidad del método de PCR a tiempo real del gen *qnrS*

Dilución	Ct1x	Ct2x	Ct3x	Ct4x	Ct5x	Media CT	SD	CV (%)
-1	5,71	5,78	5,61	6,21	5,94	5,85	0,23	4,01
-2	8,88	9,21	8,68	9,17	9,81	9,15	0,43	4,68
-3	12,14	12,5	12,28	11,18	11,15	11,85	0,64	5,39
-4	15,18	15,12	14,83	14,77	15,25	15,03	0,22	1,44
-5	19,35	19,51	18,83	18,75	19,61	19,21	0,40	2,06
-6	21,65	21,84	22,71	22,55	21,85	22,12	0,48	2,15
-7	25,53	25,68	25,73	26,26	25,35	25,71	0,34	1,33
-8	27,43	27,35	28,12	27,85	28,45	27,84	0,46	1,66
-9	32,23	30,78	31,64	31,86	31,24	31,55	0,56	1,78
-10	34,39	34,27	33,53	35,03	35,08	34,46	0,64	1,84

*SD= desviación estándar

*CV= coeficiente de varianza

En la tabla 17 los resultados de reproducibilidad del gen *sul I* indican que en todas las diluciones (1×10^1 - 1×10^{10}) la desviación estándar fue menor a 0,58 ciclos de

amplificación y los coeficientes de variación tuvieron un rango de 0,19-3,69%, mostrando una menor variabilidad en los resultados.

Tabla 17. Reproducibilidad del método de PCR a tiempo real del gen *sul 1*

Dilución	Ct1x	Ct2x	Ct3x	Ct4x	Ct5x	Media CT	SD	CV (%)
-1	6,40	6,5	6,85	6,45	6,19	6,48	0,24	3,69
-2	9,72	9,72	9,36	9,78	9,63	9,64	0,17	1,73
-3	13,61	13,65	13,32	13,34	13,31	13,45	0,17	1,26
-4	16,89	16,89	16,89	16,74	16,76	16,83	0,08	0,46
-5	19,92	19,92	20,30	20,27	20,32	20,15	0,21	1,03
-6	23,59	23,62	23,53	23,65	23,61	23,60	0,04	0,19
-7	26,55	26,42	26,53	26,46	26,39	26,47	0,07	0,26
-8	28,77	29,38	29,27	28,55	28,55	28,90	0,40	1,37
-9	31,50	31,30	31,70	30,6	30,36	31,09	0,58	1,87
-10	34,80	34,50	35,21	33,82	34,63	34,59	0,51	1,47

*SD= desviación estándar

*CV= coeficiente de varianza

En la siguiente tabla 18 se observa los resultados de reproducibilidad del gen 16S rDNA, lo cual se demuestra que en todas las diluciones (1×10^1 - 1×10^{10}) la desviación estándar fue menor a 0,66 ciclos de amplificación y los coeficientes de variación obtuvieron un rango de 1,12-5,42%, indicando una menor variabilidad en los resultados.

Tabla 18. Reproducibilidad del método de PCR a tiempo real del gen 16S rDNA

Dilución	Ct1x	Ct2x	Ct3x	Ct4x	Ct5x	Media CT	SD	CV (%)
-1	5,08	4,54	5,11	4,61	4,81	4,83	0,26	5,42
-2	7,45	8,02	8,12	7,62	7,54	7,75	0,30	3,88
-3	11,13	10,82	11,35	10,79	11,26	11,07	0,25	2,30
-4	14,88	15,32	15,31	14,86	15,23	15,12	0,23	1,53
-5	17,69	18,14	17,53	18,07	17,72	17,83	0,26	1,47
-6	21,89	22,28	21,62	21,39	21,47	21,73	0,36	1,66
-7	24,42	23,89	23,93	24,48	24,23	24,19	0,27	1,12
-8	27,59	26,76	28,05	26,91	26,89	27,24	0,56	2,04
-9	30,49	31,56	31,41	30,35	30,59	30,88	0,56	1,82
-10	35,44	33,81	35,25	35,21	34,74	34,89	0,66	1,88

*SD= desviación estándar

*CV= coeficiente de varianza

En la tabla 19 los resultados de reproducibilidad del gen *tetW* indican que en todas las diluciones (1×10^1 - 1×10^9) la desviación estándar fue menor a 0,53 ciclos de amplificación y los coeficientes de variación tuvieron un rango de 0,58-5,26%, mostrando una menor variabilidad en los resultados.

Tabla 19. Reproducibilidad del método de PCR a tiempo real del gen *tetW*

Dilución	Ct1x	Ct2x	Ct3x	Ct4x	Ct5x	Media CT	SD	CV (%)
-1	7,54	7,63	7,12	8,21	7,15	7,53	0,40	5,26
-2	12,02	11,24	10,79	10,86	11,34	11,25	0,44	3,90
-3	14,18	13,76	14,05	14,00	14,06	14,01	0,14	0,99
-4	18,57	17,98	18,89	17,79	18,62	18,37	0,42	2,26
-5	21,24	21,25	21,12	20,96	20,98	21,11	0,12	0,58
-6	25,57	25,87	24,94	24,80	24,62	25,16	0,53	2,12
-7	28,21	27,94	28,29	28,30	28,41	28,23	0,18	0,63
-8	30,43	31,19	30,67	30,62	30,84	30,75	0,29	0,93
-9	34,63	34,44	34,70	35,23	35,35	34,87	0,40	1,14

*SD= desviación estándar

*CV= coeficiente de varianza

En la siguiente tabla se observa los resultados de reproducibilidad del gen *ermB*, lo cual se demuestra que en todas las diluciones (1×10^1 - 1×10^{10}) la desviación estándar fue menor a 0,85 ciclos de amplificación y los coeficientes de variación obtuvieron un rango de 0,54-4,97%, indicando una menor variabilidad en los resultados.

Tabla 20. Reproducibilidad del método de PCR a tiempo real del gen *ermB*

Dilución	Ct1x	Ct2x	Ct3x	Ct4x	Ct5x	Media CT	SD	CV (%)
-1	5,59	6,12	5,65	5,75	6,24	5,87	0,29	4,97
-2	9,15	9,24	9,03	8,82	8,78	9,00	0,20	2,23
-3	12,17	12,32	12,26	12,49	12,31	12,31	0,12	0,95
-4	15,32	15,74	15,58	15,41	15,6	15,53	0,17	1,07
-5	19,22	18,79	19,31	19,57	19,61	19,30	0,33	1,71
-6	23,59	21,76	23,47	21,89	22,64	22,67	0,85	3,74
-7	26,32	25,68	25,73	25,81	26,21	25,95	0,29	1,13
-8	28,41	28,58	28,65	28,36	29	28,60	0,25	0,89
-9	31,85	31,60	31,45	31,53	31,42	31,57	0,17	0,54
-10	35,36	33,82	34,42	35,12	33,66	34,48	0,70	2,03

*SD= desviación estándar

*CV= coeficiente de varianza

3.1.9. Evaluación de la validación de la PCR en tiempo Real

La validación de la técnica de PCR en tiempo real, se realizó utilizando el termociclador 7500 Fast Real- Time PCR System, junto con los agentes intercalantes fluorescentes Sybr Green para el gen *ermB* y TaqMan para los genes *bla_{TEM}*, *sull*, *qnrS*, *tetW* y 16S rDNA, en el cual la fluorescencia se incrementa proporcionalmente con el aumento en la cantidad de DNA, donde se cuantifica a la vez el número de copias que se están produciendo en cada ciclo de amplificación (**Barrera, Cerón, & Villamizar, 2016**). Es decir a mayor número de copias iniciales de la muestra de ADN, más rápido se detectará un incremento en la fluorescencia. De esta forma, es posible realizar la cuantificación de ADN de un modo exacto y reproducible (**Aguayo & Rueda, 2013**).

Sin embargo, la ejecución de esta técnica es muy susceptible a fuentes de error sistemático e indeterminado, que pueden influenciar en la obtención de resultados erróneos. En la qPCR, la realización de las diluciones seriadas representa un factor crítico en la obtención de las curvas de calibración, considerando que las técnicas moleculares presentan una elevada sensibilidad a la presencia de contaminantes (Peñaherrera & Chicaiza, 2015). Otra fuente de error sistemática que influye las mediciones está relacionada con errores de pipeteo, como los relacionados a una operación inadecuada, pipetas sin calibración vigente o puntas desechables contaminadas (**Kuang, Yan, Genders, Granata, & Bishop, 2018**). La ejecución de estas técnicas demanda que los reactivos polimerasa, primers y agua libre de nucleasas sean mezclados y dispensados en zona blanca (libre de DNA) y las muestras de estándares en una zona apropiada para el manejo de ácidos nucleicos. Por lo tanto la optimización de estos factores fue clave en los resultados obtenidos.

Además se empleó la cuantificación absoluta, puesto que se utilizaron estándares con concentraciones conocidas, realizando diluciones seriadas del ADN plasmídico correspondiente a cada gen, con las cuales se elaboraron curvas de calibración, a

partir de los valores de Ct obtenidos para cada concentración y los logaritmos de las concentraciones respectivas (**Ferrando, 2013; Pérez, 2017**).

La finalidad de la validación es diferente según los tipos de métodos moleculares, que se pueden clasificar en cualitativos y cuantitativos. En este caso al ser un método cuantitativo, los parámetros a tener en cuenta son los siguientes: sensibilidad o límite de detección, límite de cuantificación, especificidad, y reproducibilidad (**Broeders et al., 2014**), por lo tanto es importante evaluar y verificar cada uno de estos parámetro con el objetivo de demostrar que las técnicas de qPCR en tiempo real funcionen de maneras correctas (**Camaró et al., 2013**).

Según **Bahrtdt et al., (2010)** es importante verificar la especificidad de los primers y sondas durante el desarrollo de la técnica de qPCR para asegurar que solo reaccionen con las secuencias de interés. En otras palabras solo se debe detectar la secuencia objetivo en lugar de otros productos no específicos que también pueden estar presentes en las muestras estándar. Para llevar a cabo la especificidad de la técnica se debe ejecutar una búsqueda en la base de datos de secuencias de ADN, en base a este resultado se selecciona los oligonucleótidos diseñados. En esta validación de la técnica de PCR cuantitativa, la especificidad de los primers seleccionados se comprobó teóricamente usando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, National Center for Biotechnology Information), resultando ser 100% específicos.

En cuanto a la reproducibilidad del método de qPCR se evaluó a través del coeficiente de varianza, en el cual muestra el grado de dispersión de los resultados obtenidos de Ct entre las diferentes repeticiones por triplicado de cada una de las diluciones (**Barrera, Cerón, & Villamizar, 2016**). En esta técnica las desviaciones estándares (σ) para cada gen fueron bajas y ninguna mayores de 1, lo cual demuestra que la técnica fue reproducible. Sin embargo, la reproducibilidad de la técnica de PCR en tiempo real suele ser afectada por pequeñas alteraciones en las concentraciones de los reactivos y por errores de manipulación (**Bahrtdt, Krech, & Wulff, 2010**).

Existen otros parámetros adicionales para desarrollar y validar los métodos (Sybr Green y TaqMan) los cuales son la eficiencia de amplificación y la linealidad del ensayo, siendo importantes para determinar el rendimiento de la qPCR. La eficiencia de amplificación de la qPCR se establece a partir de la pendiente de la curva de regresión lineal, encontrándose en un rango cercano de -3,3 y -3,6, que corresponde a eficiencias que van del 90 al 110%. Así mismo al realizar el análisis de regresión lineal de los datos obtenidos, el programa Excel proporciona el coeficiente de correlación R^2 de la curva que es una medida de la linealidad de la reacción de qPCR que es de $\geq 0,99$ (**Bustin, Benes, & Wittwer, 2009**).

En el análisis de resultados, se observó que las curvas estándar para cada gen fueron adecuadas; el gen *tetW* alcanzó un rango lineal de 10^1 - 10^9 y los genes *bla*_{TEM}, *qnrS*, *ermB* y 16S rDNA alcanzaron un rango lineal entre 10^1 - 10^{10} , con una buena correlación lineal R^2 que varía entre 0,995 a 0,999, llegando aproximadamente a un valor de 1, lo que indica un ajuste ideal entre la línea de regresión y los puntos de datos, mostrando unas eficiencias altas entre 97,4 al 109,8%, tal como aprecia en la Tabla 21. Por ende, se demostró que los métodos de qPCR tienen un rendimiento aceptable, dado que los valores obtenidos se encuentran dentro de los rangos óptimos que requiere el equipo Termociclador 7500 Fast Real- Time PCR System, considerando así como datos confiables.

Una vez que se evaluaron todos los parámetros de la validación del rendimiento de la PCR en Tiempo Real, se contará con una técnica altamente sensible, específica, fiable y rápida (**Castillo, 2014; Torre, 2007**) que se empleará como una herramienta con un gran interés para estimar la presencia y abundancia de genes de resistencia a antibióticos en muestras ambientales.

Tabla N° 21. Resultados del desempeño de los oligonucleótidos de la PCR en tiempo Real

GEN	PRIMER	SECUENCIA 5' 3'	Rango Lineal (copias/20µl)	R²	Eficiencia (%)
<i>bla</i> _{TEM}	UP	CACTATTCTCAGAATGACTTGGT			
	LP	TGCATAATTCTCTTACTGTCATG	10 ¹ -10 ¹⁰	0,999	106,2
<i>qnrS</i>	UP	CGACGTGCTAACTTGCGTGA			
	LP	GGCATTGTTGGAACTTGCA	10 ¹ -10 ¹⁰	0,998	105
<i>sulI</i>	UP	CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG			
	LP	TTGCCGATCGCGTGAAGT	10 ¹ -10 ¹⁰	0,995	109,8
16S rDNA	UP	TCCTACGGGAGGCAGCAGT			
	UP	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	10 ¹ -10 ¹⁰	0,999	100,5
<i>tetW</i>	UP	CGGCAGCGCAAAGAGAAC			
	LP	CGGGTCAGTATCCGCAAGTT	10 ¹ -10 ⁹	0,998	97,4
<i>ermB</i>	91f	GATACCGTTTACGAAATTGG			
	454r	GAATCGAGACTTGAGTGTGC	10 ¹ -10 ¹⁰	0,998	104,4

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Se validaron técnicas de PCR cuantitativa (qPCR) aplicando diferentes técnicas (TaqMan y Sybr Green) y estándares de plásmidos recombinantes así como de fragmentos sintéticos. Para cada uno de los genes, los resultados demostraron una alta sensibilidad y especificidad. Por tal motivo, se utilizarán como una herramienta para evaluar la diseminación de genes de resistencia a antibióticos en diversas matrices ambientales que estudia el grupo de investigación UTA RAM One Health de la Universidad Técnica de Ambato.

Se diseñó un estándar plasmídico sintético para el gen *tetW*, cuya especificidad teórica y experimental fue comprobada, siendo esta una alternativa aplicable especialmente en la industria, cuando no se puede contar con estándares de los genes deseados o no se cuenta con sistemas de clonación en plásmido.

Se purificó los estándares a partir de bacterias portadoras de plásmidos recombinantes para los genes *bla_{TEM}*, *sull*, *qnrS*, *ermB* y del gen 16S rDNA, cuyas concentraciones y ratios de pureza fueron de alta calidad y aceptables para llevar a cabo la estandarización de las curvas para la qPCR en tiempo real.

Se realizó los experimentos de obtención de las curvas estándar, utilizando los métodos Sybr Green para el gen *ermB* y TaqMan para los genes *bla_{TEM}*, *sull*, *qnrS*, *tetW* y 16S rDNA, para los cuales se obtuvieron eficiencias superiores a 97,4% y correlaciones lineales mayores a 0,99; encontrándose dentro de los rangos recomendados.

Se obtuvo las ecuaciones de cada recta por medio de las gráficas de dispersión, las líneas base, la especificidad de los primers, las cuales se verificaron utilizando el programa informático de alineamiento de secuencias BLAST y los límites de cuantificación que se encontraron entre Ct 34,4 a 34,8.

4.2. Recomendaciones

Utilizar puntas con filtro y micropipetas calibradas y limpias, al momento de realizar el banco de diluciones y preparar la mezcla de reacción para prevenir la contaminación de las muestras estándar.

Al momento de colocar la mezcla de la reacción MIX y las muestra estándar en la placa de qPCR, es útil realizar una tabla de apoyo que indique que va y a donde va cada muestra estándar y los controles negativos, para saber que contiene cada pocillo en el caso de distraerse y olvidarse de que pocillo tiene y cual no tiene.

Es importante incluir un control negativo (control sin muestra estándar), pues si se observa una amplificación en este pocillo, significa que existen problemas de contaminación en la mezcla de reacción Mix o en el estándar utilizado.

Antes de colocar la placa en el quipo Termociclador 7500 Fast Real- Time PCR System, realizar un spin para evitar que la mezcla se quede pegado en las paredes de los pocillos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguayo, D., & Rueda, A. (2013). Determinación del ciclo umbral y eficiencia para PCR cuantitativa en tiempo real. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 32(1), 36–39.
- Aguilera, P., Ruiz, M., Rocha, M., Pineda, B., & Chánez, M. (2015). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología* (Vol. 13).
- Applied Biosystems. (2010). *Applied Biosystems 7000/7500 fast real Time PCR System*.
- Bahrtdt, C., Krech, A. B., Wurz, A., & Wulff, D. (2010). Validation of a newly developed hexaplex real-time PCR assay for screening for presence of GMOs in food, feed and seed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6), 2103–2112. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3380-x>
- Balcázar, J. L., Vendrell, D., Blas, I., Ruiz, I., Gironés, O., & Múzquiz, J. L. (2007). Quantitative detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue by real-time PCR using self-quenched, fluorogenic primers. *Journal of Medical Microbiology*, 56(3), 323–328. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46647-0>
- Barrera, G., Murcia, J., Cerón, J., Cuartas, P., Guzmán, C., & Villamizar, L. (2016). PCR en tiempo real: una metodología útil para la detección y cuantificación de granulovirus. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 24. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61514>
- Biassoni, R., & Raso, A. (2014). *Quantitative Real-Time PCR - Methods and Protocols / Springer*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0733-5>
- Braykov, N., Eisenberg, J., Grossman, M., Zhang, L., Vasco, K., Cevallos, W., Levy, K. (2016). Antibiotic Resistance in Animal and Environmental Samples Associated with Small-Scale Poultry Farming in. *MSphere*, 1(1), 1–15. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00021-15>.Editor
- Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M., Morisset, D. (2014). Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science and Technology*, 37(2), 115–126.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.008>

- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Calero, W. (2016). *Evaluación de reservorios ambientales de partículas fágicas portadoras de genes resistencia a antibióticos*. 231. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/398991>
- Calero, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., & Muniesa, M. (2014). Sludge As a Potential Important Source of Antibiotic Resistance Genes in Both the Bacterial and Bacteriophage Fractions. In *Environmental science & technology*. <https://doi.org/10.1021/es501851s>
- Calero, W., & Muniesa, M. (2016). Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.006>
- Camaró, M., Catalá, V., Gimeno, C., Martínez, R., & Olmos, P. (2013). *Procedimientos en Microbiología Clínica: Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos*. Retrieved from <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia48.pdf>
- Chen, J., Yu, Z., Michel, F. C., Wittum, T., Morrison, M., & Morrison, M. (2007). Development and application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4407–4416. <https://doi.org/10.1128/AEM.02799-06>
- Chen, Q., An, X., Li, H., Su, J., Ma, Y., & Zhu, Y. G. (2016). Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil. *Environment International*, 92–93, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.026>
- Chirinos, M. (2015). Guía de PCR en tiempo real Guía de PCR en tiempo real.

Figshare, 1–22. <https://doi.org/10.1080/07351690903032124>

Ciriza, A. (2017). *Desarrollo de un método rápido basado en la PCR a tiempo real para recuento de Escherichia coli en leche cruda.*

Colomer, M., Calero, W., Jebri, S., Hmaied, F., Muniesa, M., & Jofre, J. (2014). Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environment International*, 73, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.07.003>

Coque, T. M., Baquero, F., & Canton, R. (2008). Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 13(47), 1-11. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2693-2700.2005>

Du, J., Ren, H., Geng, J., Zhang, Y., Xu, K., & Ding L. (2014). Occurrence and abundance of tetracycline, sulfonamide resistance genes, and class 1 integron in five wastewater treatment plants. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21(12), 7276-84. <http://doi.org/10.1007/s11356-014-2613-5>

Ferrando, N. (2013). *Desarrollo y validación de un nuevo sistema de detección molecular basado en qPCR de Legionella spp . en muestras ambientales.*

Fondevila, N., Compaired, D., Maradei, E., & Duffy, S. (2014). Validación de una técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección del virus de fiebre aftosa y evaluación de su desempeño en la infección aguda. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(3), 188–195. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70071-9](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70071-9)

Garrido, A. (2013). *Aplicación de la PCR en tiempo real para la detección de patógenos en la industria alimentaria.* <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2017.07.018>

Guo, X., Stedtfeld, R. D., Hedman, H., Eisenberg, J. N., Trueba, G., Yin, D., Zhang, L. (2018). Antibiotic Resistome Associated with Small-Scale Poultry Production in Rural Ecuador. *Environmental Science & Technology*, 52(15), 8165–8172. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01667>

- Heuer, H., Schmitt, H., & Smalla, K. (2011). Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, *14*(3), 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.009>
- Hooper, F. C. (2001). Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging Infectious Diseases*, *7*(2), 337-41. <http://doi.org/10.3201/eid0702.700337>
- Huijbers, P. M., Blaak, H., Jong, M. C., Graat, E. A., Vandenbroucke, C. M., & Husman, A. M. (2015). Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial Resistance to Humans: A Review. *Environmental Science & Technology*, *49*(20), 11993–12004. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02566>
- Joy, S., Bartelt, S., Snow, D., Gilley, J., Woodbury, B., Parker, D., & Marx, D. (2013). *Fate and Transport of Antimicrobials and Antimicrobial Resistance Genes in Soil and Runoff Following Land Application of Swine Manure Slurry*.
- Kuang, J., Yan, X., Genders, A. J., Granata, C., & Bishop, D. J. (2018). An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196438>
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A., Wertheim, H., Sumpradit, N., Cars, O. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, *13*(12), 1057–1098. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)
- Marti, R., Scott, A., Tien, Y. C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., & Topp, E. (2013). Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(18), 5701–5709. <https://doi.org/10.1128/AEM.01682-13>
- McArthur, A. G., Waglehner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., Wright, G. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(7), 3348–3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>
- Mora, M., Ascón, D., & Hung, A. (2016). Evaluación y validación de la prueba de

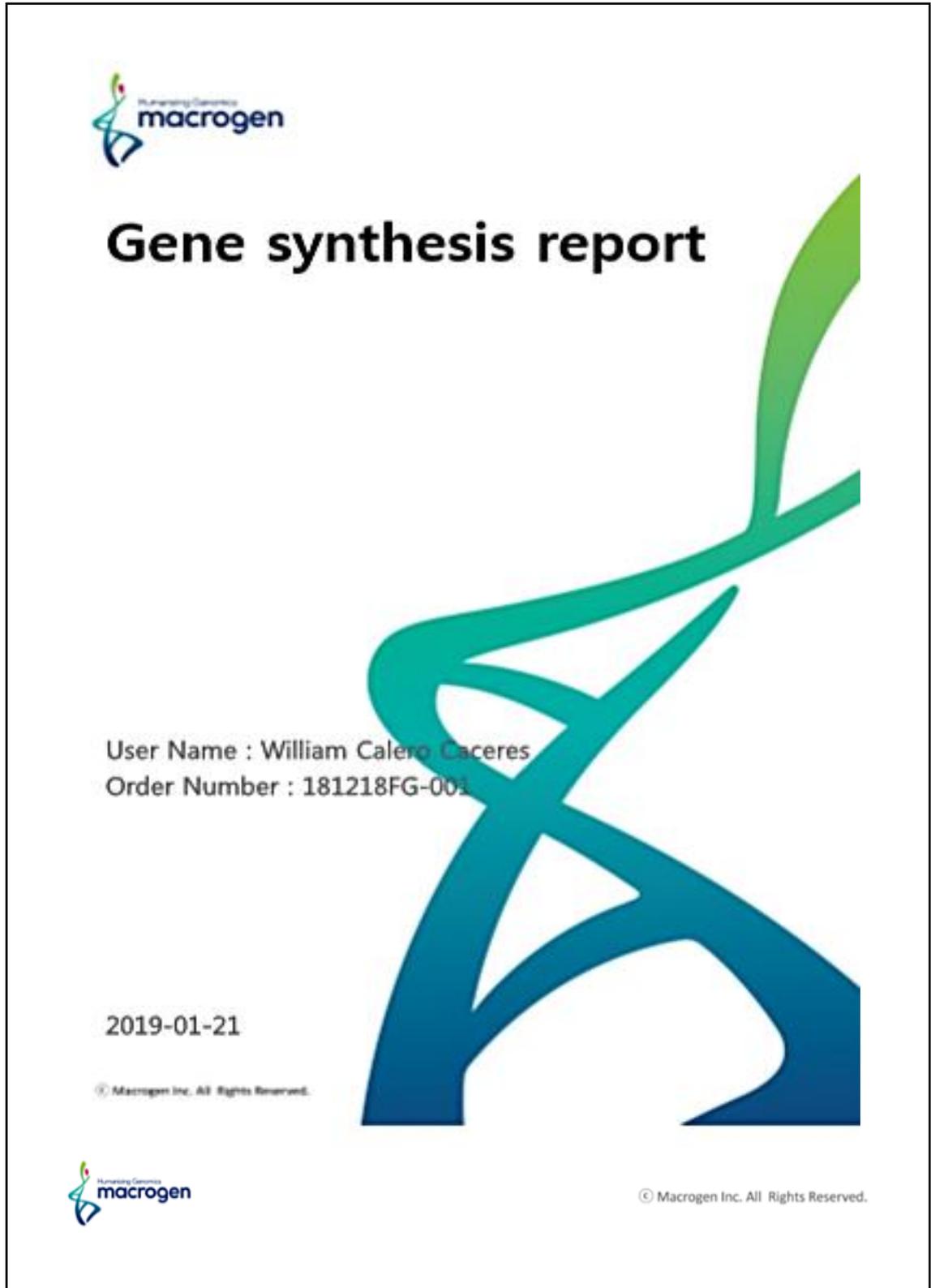
- qPCR para el control y monitoreo de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* en las bahías de Guaynuna y Salinas. *Salud y Tecnología Veterinaria*, 3(1), 13–22. <https://doi.org/10.20453/STV.V3I1.2760>
- Palacios, A., & Canón, C. (2014). Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para la detección de *Helicobacter pylori* en aguas de consumo. *Universidad Nacional de Colombia*, 30–40. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/46636/1/05599317.2014.pdf>
- Pei, R., Kim, S. C., Carlson, K. H., & Pruden, A. (2006). Effect of River Landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Research*, 40, 2427–2435. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.017>
- Peñaherrera, S., & Chicaiza, O. (2015). Análisis de la expresión de los genes β -actin, ruans y rummyb10, involucrados en la biosíntesis de antocianinas mediante la técnica RT- qPCR en la especie *rubus niveus* recolectada en el cantón Rumiñahui – provincia de Pichincha. In *Tesis*. <https://doi.org/10.20868/UPM.thesis.39079>
- Pikkemaat, M. G., Yassin, H., Fels-Klerx, H. J., & Berendsen, B. J. A. (2016). Antibiotic Residues and Resistance in the Environment. *RIKILT Report 2016.009.*, 32. <https://doi.org/10.18174/388253>
- Queenan, K., Hasler, B., & Rushton, J. (2016). A One Health approach to antimicrobial resistance surveillance: is there a business case for it? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(4), 422–427. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.014>
- Ramos, V., Duarte, C., Díaz, A., & Moreno, J. (2013). Elementos genéticos móviles asociados con resistencia a eritromicina en aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* en Colombia. *Biomédica*, 34(0), 209. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1684>
- Rodríguez-Baño, J., Alcalá, J. C., Cisneros, J. M., Grill, F., Oliver, A., Horcajada, J. P., Pascual, A. (2008). Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Archives of Internal Medicine*, 168(17), 1897-902. <http://doi.org/10.1001/archinte.168.17.1897>

- Rodriguez, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez, A., Balcázar, J. L. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>
- Sabri, N. A., Schmitt, H., Van, B., Gerritsen, H. W., Zuidema, T., Rijnaarts, H. H. M., & Langenhoff, A. A. M. (2018). Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2018.03.004>
- Torre, I. D. La. (2007). PCR en tiempo real para la detección cuantitativa de ADN bovino en piensos vegetales. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1(2), 237–245. Recuperado de <http://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/view/RCCV0707230237A>
- Walsh, F., Ingenfeld, A., Zampiccoli, M., Hilber-Bodmer, M., Frey, J., & Duffy, B. (2011). Real-time PCR methods for quantitative monitoring of streptomycin and tetracycline resistance genes in agricultural ecosystems. *Journal of Microbiological Methods*, 86(2), 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.04.011>
- Wang, Z., Zhang, X.-X., Huang, K., Miao, Y., Shi, P., Liu, B., Li, A. (2013). Metagenomic profiling of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in a tannery wastewater treatment plant. *PloS One*, 8(10), e76079. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0076079>
- Wax, R. G., Lewis, K., Salyers, A. A., & Taber, H. (2007). *Bacterial Resistance to Antimicrobials*. CRC Press.
- WHO. (2017). Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report Early implementation. In *WHO*. <https://doi.org/ISBN 978-92-4-151344-9>
- Wieland, U., & Kreuter, A. (2018). Why the antibiotic resistance crisis requires a One Health approach. *Www.TheLancet.Com/Infection*, 18. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30653-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30653-9)

World Health Organization. (2015). *WHO / Global action plan on antimicrobial resistance*. World Health Organization.

ANEXOS

ANEXO A. Informe de la síntesis génica del fragmento seleccionado del gen *tetW*



 **macrogen**

Gene synthesis report

User Name : William Calero Caceres
Order Number : 181218FG-001

2019-01-21

© Macrogen Inc. All Rights Reserved.

 **macrogen**

© Macrogen Inc. All Rights Reserved.

Gene Synthesis

Gene name : tetW

Gene size : 200 bp

GC% : 57.58%

Gene sequence

```
GCTCCCTCGTAAAAGGTGGCGGAGGACCCCTCCCATGCTGCGGACGACGATTGCGCCGAAAACGGCAGCGCAA  
GAGAACGGCTGCTGGACGCTCTTACGCAACTTGCGGATACTGACCCGCTTTTTCGTTGCGAAGTGGATTCCATCACC  
CATGAGATCATTCTTTCTTTTTGGGCCGGGTGCAGTTGGAGTTG
```

Gene Synthesis

Vector : pTOP_Blunt_V2

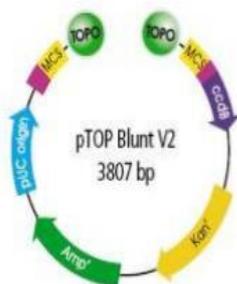


Figure 15. A schematic map of pTOP Blunt V2 (3807 bp).

A molecule of topoisomerase (TOPO) is covalently coupled to the 3 blunt duplex ends (nt positions 294 and 295) of pTOP Blunt V2 (Cat.# EZ002 and EZ012). Therefore, pTOP Blunt V2 can form a covalent bond with blunt-ended PCR products obtained by Pfu DNA polymerase.

Lac promoter/operator : 95-216

M13 Reverse Primer binding site : 205-221

LacZ ORF : 217-534

MCS, Multiple Cloning Sites : 234-357

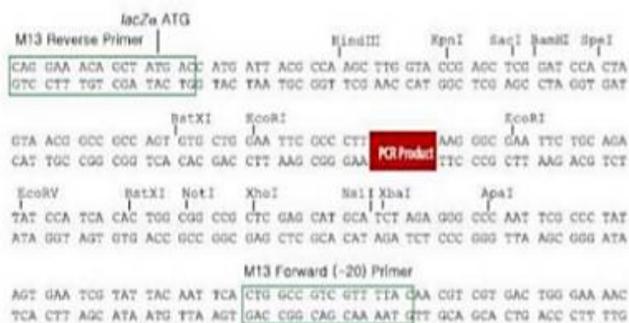
M13 (-20) Forward Primer binding site : 391-406

ccdB ORF : 544-846

Kanr gene : 1057-1989

Amp^r gene : 2007-2867

pUC origin : 3012-3685



Gene Synthesis

Sequence align data

```
tetW -----GCT CCCT CGT AAAAGGT GGGCGAGGACCCC  
tetW_SD_contig_1 CGAATT GGGCCCT CT AGAT GCAT GCT CGAGCGGCCCGCAGT GT GAT GGAT AT CT GCAGAATT CGCCCTT GCT CCCT CGT AAAAGGT GGGCGAGGACCCC  
*****
```

```
tetW CT CCCCAT GCT GCGGACGACGATT GCGCCGAAAACGGCAGCGCAAAGAGAACGGCT GCT GGACGCT CTTACGCAACTT GCGGATACT GACCCGCTTTT GC  
tetW_SD_contig_1 CT CCCCAT GCT GCGGACGACGATT GCGCCGAAAACGGCAGCGCAAAGAGAACGGCT GCT GGACGCT CTTACGCAACTT GCGGATACT GACCCGCTTTT GC  
*****
```

```
tetW GTT GCGAAGT GGATT CCAT CACCCAT GAGAT CATT CTTT CTTTTT GGGCCGGT GCAGTT GGAGTT G-----  
tetW_SD_contig_1 GTT GCGAAGT GGATT CCAT CACCCAT GAGAT CATT CTTT CTTTTT GGGCCGGT GCAGTT GGAGTT GAAGGGCGAATT CCGACACT GGGGCCGTT  
*****
```

```
tetW -----  
tetW_SD_contig_1 ACT AGT GGAT CCGAGCT CCGTACCAAGCT G
```

ANEXO B. Cálculo del número de copias en qPCR de los genes en la hoja de cálculo Excel.

Tabla 22. Número de copias y valores de Ct del gen *bla_{TEM}* calculados mediante la PCR en tiempo real.

Tamaño del plásmido	Bp	3015	OBSERVACIONES							
Tamaño del inserto (<i>bla_{TEM}</i>)	Bp	713								
Construcción total	Bp	3728	Sumatoria plásmido + inserto							
Concentración del stock	ng/ μ L	287,125	Concentración en nanodrop							
Masa 1 molécula plásmido	nanogr	4,09E-09								
N° copias en 1 μL stock	n° copias/ μ L	7,03E+10								

	N° copias por μL	V	N° copias en qPCR	log n° C	Ct1x	Ct2x	Ct3x	Ct4x	Ct5x	Media CT
-1	7,03E+09	9	6,32E+10	10,80	6,08	5,85	6,12	5,54	5,76	5,87
-2	7,03E+08	9	6,32E+09	9,80	9,29	9,45	9,39	9,53	9,44	9,42
-3	7,03E+07	9	6,32E+08	8,80	12,32	12,60	12,27	11,83	12,58	12,32
-4	7,03E+06	9	6,32E+07	7,80	16,32	15,62	16,38	17,23	15,36	16,18
-5	7,03E+05	9	6,32E+06	6,80	18,74	18,34	18,79	18,61	18,67	18,63
-6	7,03E+04	9	6,32E+05	5,80	22,59	22,74	22,71	21,87	22,84	22,55
-7	7,03E+03	9	6,32E+04	4,80	26,28	25,36	25,51	25,77	26,33	25,85
-8	7,03E+02	9	6,32E+03	3,80	28,33	28,47	28,70	28,17	28,73	28,48
-9	7,03E+01	9	6,32E+02	2,80	32,35	31,58	30,91	31,72	30,74	31,46
-10	7,03E+00	9	6,32E+01	1,80	34,71	35,15	33,66	34,32	34,26	34,42
-11	7,03E-01	9	6,32E+00	0,80	35,56	36,12	35,57	34,23	36,32	35,56

Tabla 23. Número de copias y valores de Ct del gen *qnrS* calculados mediante la PCR en tiempo real.

Tamaño del plásmido	Bp	3015	OBSERVACIONES							
Tamaño del inserto (<i>qnrS</i>)	Bp	622								
Construcción total	Bp	3637	Sumatoria plásmido + inserto							
Concentración del stock	ng/ μ L	247,125	Concentración en nanodrop							
Masa 1 molécula plásmido	nanogr	3,98651E-09								
N° copias en 1 μL stock	n° copias/ μ L	6,20E+10								
	N° copias por μL	V	N° copias en qPCR	log n° C	Ct1x	Ct2x	Ct3x	Ct4x	Ct5x	Media CT
-1	6,20E+09	9	5,58E+10	10,75	5,71	5,78	5,61	6,21	5,94	5,85
-2	6,20E+08	9	5,58E+09	9,75	8,88	9,21	8,68	9,17	9,81	9,15
-3	6,20E+07	9	5,58E+08	8,75	12,14	12,5	12,28	11,18	11,15	11,85
-4	6,20E+06	9	5,58E+07	7,75	15,18	15,12	14,83	14,77	15,25	15,03
-5	6,20E+05	9	5,58E+06	6,75	19,35	19,51	18,83	18,75	19,61	19,21
-6	6,20E+04	9	5,58E+05	5,75	21,65	21,84	22,71	22,55	21,85	22,12
-7	6,20E+03	9	5,58E+04	4,75	25,53	25,68	25,73	26,26	25,35	25,71
-8	6,20E+02	9	5,58E+03	3,75	27,43	27,35	28,12	27,85	28,45	27,84
-9	6,20E+01	9	5,58E+02	2,75	32,23	30,78	31,64	31,86	31,24	31,55
-10	6,20E+00	9	5,58E+01	1,75	34,39	34,27	33,53	35,03	35,08	34,46
-11	6,20E-01	9	5,58E+00	0,75	36,09	37,23	35,54	34	36,4	35,33

Tabla 24. Número de copias y valores de Ct del gen *sul 1* calculados mediante la PCR en tiempo real.

Tamaño del plásmido	Bp	3015	OBSERVACIONES							
Tamaño del inserto (<i>sul 1</i>)	Bp	245								
Construcción total	Bp	3620	Sumatoria plásmido + inserto							
Concentración del stock	ng/ μ L	102,3	Concentración en nanodrop							
Masa 1 molécula plásmido	nanogr	3,57296E-09								
N° copias en 1 μL stock	n° copias/ μ L	2,86E+10								

	N° copias por μ L	V	N° copias en qPCR	log n° C	Ct1x	Ct2x	Ct3x	Ct4x	Ct5x	Media CT
-1	2,86E+09	9	2,58E+10	10,41	6,40	6,5	6,85	6,45	6,19	6,48
-2	2,86E+08	9	2,58E+09	9,41	9,72	9,72	9,36	9,78	9,63	9,64
-3	2,86E+07	9	2,58E+08	8,41	13,61	13,65	13,32	13,34	13,31	13,45
-4	2,86E+06	9	2,58E+07	7,41	16,89	16,89	16,89	16,74	16,76	16,83
-5	2,86E+05	9	2,58E+06	6,41	19,92	19,92	20,30	20,27	20,32	20,15
-6	2,86E+04	9	2,58E+05	5,41	23,59	23,62	23,53	23,65	23,61	23,60
-7	2,86E+03	9	2,58E+04	4,41	26,55	26,42	26,53	26,46	26,39	26,47
-8	2,86E+02	9	2,58E+03	3,41	28,77	29,38	29,27	28,55	28,55	28,90
-9	2,86E+01	9	2,58E+02	2,41	31,50	31,30	31,70	30,6	30,36	31,09
-10	2,86E+00	9	2,58E+01	1,41	34,80	34,50	35,21	33,82	34,63	34,59
-11	2,86E-01	9	2,58E+00	0,41	34,96	35,82	36,45	35,79	35,98	35,8

Tabla 25. Número de copias y valores de Ct del gen 16S rDNA calculados mediante la PCR en tiempo real.

Tamaño del plásmido	Bp	998	OBSERVACIONES							
Tamaño del inserto (16S rDNA)	Bp	467								
Construcción total	Bp	1465	Sumatoria plásmido + inserto							
Concentración del stock	ng/ μ L	85,45	Concentración en nanodrop							
Masa 1 molécula plásmido	nanogr	1,60564E-09								
N° copias en 1 μL stock	n° copias/ μ L	5,32E+10								
	N° copias por μL	V	N° copias en qPCR	log n° C	Ct1x	Ct2x	Ct3x	Ct4x	Ct5x	Media CT
-1	5,32E+09	9	4,79E+10	10,68	5,08	4,54	5,11	4,61	4,81	4,83
-2	5,32E+08	9	4,79E+09	9,68	7,45	8,02	8,12	7,62	7,54	7,75
-3	5,32E+07	9	4,79E+08	8,68	11,13	10,82	11,35	10,79	11,26	11,07
-4	5,32E+06	9	4,79E+07	7,68	14,88	15,32	15,31	14,86	15,23	15,12
-5	5,32E+05	9	4,79E+06	6,68	17,69	18,14	17,53	18,07	17,72	17,83
-6	5,32E+04	9	4,39E+05	5,68	21,89	22,28	21,62	21,39	21,47	21,73
-7	5,32E+03	9	4,79E+04	4,68	24,42	23,89	23,93	24,48	24,23	24,19
-8	5,32E+02	9	4,79E+03	3,68	27,59	26,76	28,05	26,91	26,89	27,24
-9	5,32E+01	9	4,79E+02	2,68	30,49	31,56	31,41	30,35	30,59	30,88
-10	5,32E+00	9	4,79E+01	1,68	35,44	33,81	35,25	35,21	34,74	34,89
-11	5,32E-01	9	4,79E+00	0,68	35,23	34,32	35,81	35,76	35,33	35,29

Tabla 26. Número de copias y valores de Ct del gen *tetW* calculados mediante la PCR en tiempo real.

Tamaño del plásmido	Bp	3807	OBSERVACIONES							
Tamaño del inserto (<i>tetW</i>)	Bp	200								
Construcción total	Bp	4007	Sumatoria plásmido + inserto							
Concentración del stock	ng/ μ L	40	Concentración en nanodrop							
Masa 1 molécula plásmido	nanogr	4,39167E-09								
N° copias en 1 μL stock	n° copias/ μ L	9,11E+09								

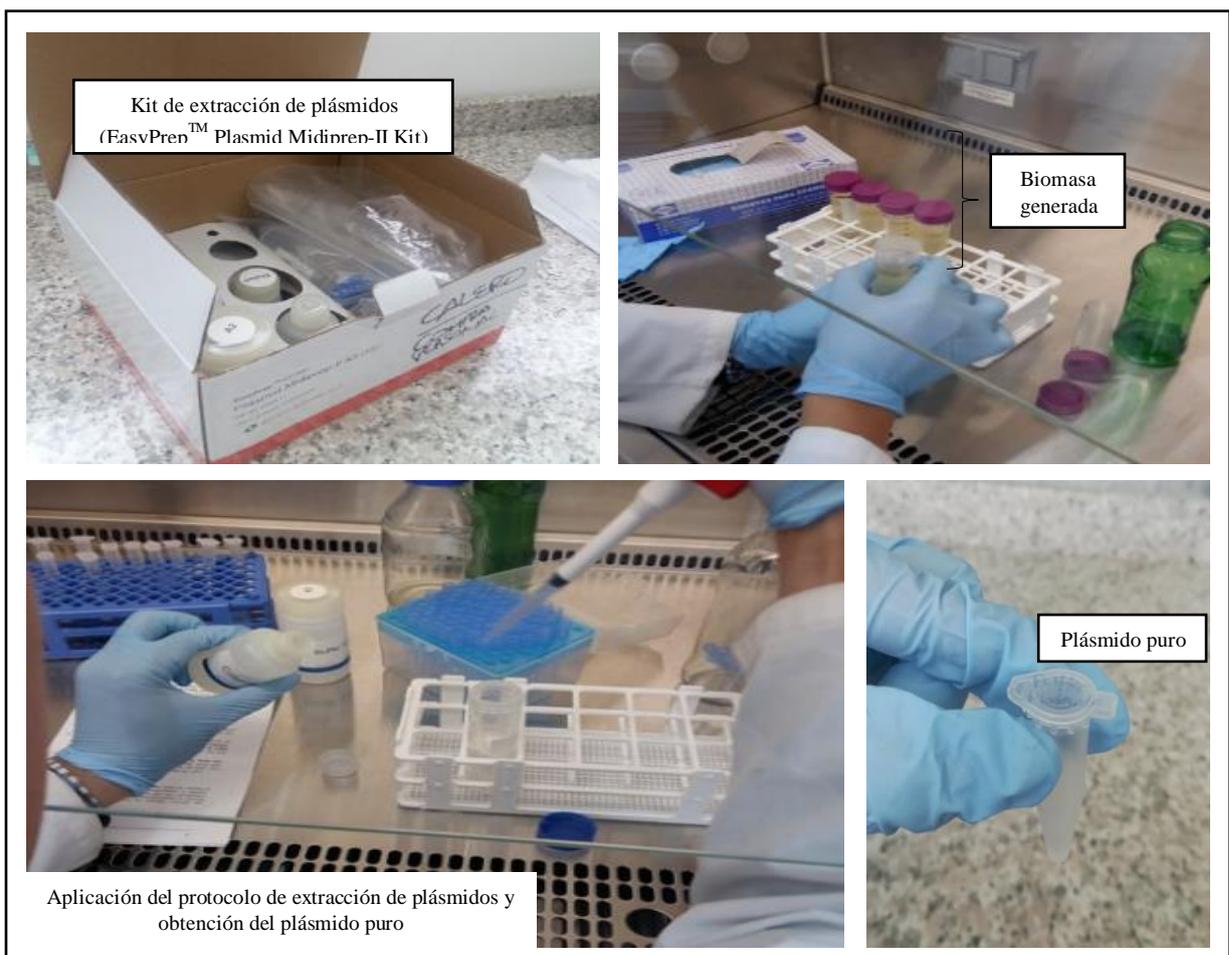
	N° copias por μL	V	N° copias en qPCR	log n° C	Ct1x	Ct2x	Ct3x	Ct4x	Ct5x	Media CT
-1	9,11E+08	9	8,20E+09	9,91	7,54	7,63	7,12	8,21	7,15	7,53
-2	9,11E+07	9	8,20E+08	8,91	12,02	11,24	10,79	10,86	11,34	11,25
-3	9,11E+06	9	8,20E+07	7,91	14,18	13,76	14,05	14,00	14,06	14,01
-4	9,11E+05	9	8,20E+06	6,91	18,57	17,98	18,89	17,79	18,62	18,37
-5	9,11E+04	9	8,20E+05	5,91	21,24	21,25	21,12	20,96	20,98	21,11
-6	9,11E+03	9	8,20E+04	4,91	25,57	25,87	24,94	24,80	24,62	25,16
-7	9,11E+02	9	8,20E+03	3,91	28,21	27,94	28,29	28,30	28,41	28,23
-8	9,11E+01	9	8,20E+02	2,91	30,43	31,19	30,67	30,62	30,84	30,75
-9	9,11E+00	9	8,20E+01	1,91	34,63	34,44	34,70	35,23	35,35	34,87
-10	9,11E-01	9	8,20E+00	0,91	36,23	35,56	34,76	35,98	35,79	35,66

Tabla 27. Número de copias y valores de Ct del gen *ermB* calculados mediante la PCR en tiempo real.

Tamaño del plásmido	Bp	3807	OBSERVACIONES							
Tamaño del inserto (<i>ermB</i>)	Bp	200								
Construcción total	Bp	4007	Sumatoria plásmido + inserto							
Concentración del stock	ng/ μ L	40	Concentración en nanodrop							
Masa 1 molécula plásmido	nanogr	4,39167E-09								
N° copias en 1 μL stock	n° copias/ μ L	9,11E+09								

	N° copias por μL	V	N° copias en qPCR	log n° C	Ct1x	Ct2x	Ct3x	Ct4x	Ct5x	Media CT
-1	2,43E+09	5,5	1,33E+10	10,13	5,59	6,12	5,65	5,75	6,24	5,87
-2	2,43E+08	5,5	1,33E+09	9,13	9,15	9,24	9,03	8,82	8,78	9,00
-3	2,43E+07	5,5	1,33E+08	8,13	12,17	12,32	12,26	12,49	12,31	12,31
-4	2,43E+06	5,5	1,33E+07	7,13	15,32	15,74	15,58	15,41	15,6	15,53
-5	2,43E+05	5,5	1,33E+06	6,13	19,22	18,79	19,31	19,57	19,61	19,30
-6	2,43E+04	5,5	1,33E+05	5,13	23,59	21,76	23,47	21,89	22,64	22,67
-7	2,43E+03	5,5	1,33E+04	4,13	26,32	25,68	25,73	25,81	26,21	25,95
-8	2,43E+02	5,5	1,33E+03	3,13	28,41	28,58	28,65	28,36	29	28,60
-9	2,43E+01	5,5	1,33E+02	2,13	31,85	31,60	31,45	31,53	31,42	31,57
-10	2,43E+00	5,5	1,33E+01	1,13	35,36	33,82	34,42	35,12	33,66	34,48
-11	2,43E-01	5,5	1,33E+00	0,13	34,63	35,42	36,23	35,71	33,93	35,18

ANEXO C. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS



ANEXO D. ELABORACION DE qPCR EN TIEMPO REAL

