



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“PCR ACOPLADA A CRISPR-CAS12A
PARA LA DETECCIÓN DE LOS GENES
DE RESISTENCIA CTX-M-15 Y *FLOR*
EN *ESCHERICHIA COLI*: PRUEBA DE
CONCEPTO”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRA EN MICROBIOLOGÍA

MARYHORY FIORELLA VARGAS REYES

LIMA-PERÚ

2023

ASESORA

Mónica Pajuelo Travezaño PhD

CO ASESORES

Pohl Milón Mayer PhD

Roberto Alcántara Estela MSc

JURADO DE TESIS

DR. HOLGER MAITA MALPARTIDA

PRESIDENTE

MG. DORA JESUS MAURTUA TORRES

VOCAL

MG. RUTH LILIANA CRISTOBAL DELGADO

SECRETARIO (A)

DEDICATORIA.

A mis padres y a aquellos que somos entusiastas de la ciencia, especialmente de la microbiología.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a Dios porque me ha bendecido con unos maravillosos padres. Expreso mi profundo agradecimiento a los doctores Marcos Milla y María Goñi por brindarme la oportunidad de estudiar la maestría mediante las Becas Milla-Goñi en la UPCH, un espacio donde tuve el placer de conocer a la Dra. Mónica Pajuelo del Laboratorio de Microbiología Molecular, así como a mis queridas compañeras de la maestría en microbiología: Mishell Landa, Angie Saguma y Ayme Huaman.

Y con un afectuoso reconocimiento, agradezco también a los miembros del Laboratorio de Biomoléculas de la UPC: Ana Sánchez, Alicia Arica, Eva Dueñas, Victoria Poma, y a mis asesores, el Dr. Pohl Milón y el MSc. Roberto Alcántara.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento por su invaluable apoyo a lo largo de este significativo proceso.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

La presente tesis se desarrolló con el soporte financiero de la Beca Milla Goñi, el programa PROCIENCIA del CONCYTEC (Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica) mediante el convenio PE501079419-2022 y Fogarty International Center, National Institutes of Health (D43TW001140).

PCR ACOPLADA A CRISPR-CAS12A PARA LA DETECCIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA CTX-M-15 Y FLOR EN ESCHERICHIA COLI: PRUEBA DE CONCEPTO

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	www.frontiersin.org Fuente de Internet	2%
2	journals.plos.org Fuente de Internet	1%
3	www.biorxiv.org Fuente de Internet	<1%
4	www.mdpi.com Fuente de Internet	<1%
5	Submitted to Monash University Trabajo del estudiante	<1%
6	link.springer.com Fuente de Internet	<1%
7	Submitted to Aristotle University of Thessaloniki Trabajo del estudiante	<1%
8	ouci.dntb.gov.ua Fuente de Internet	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	3
1.2. Planteamiento del problema	6
1.3. Justificación del estudio	9
II. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo general	11
2.2. Objetivos específicos	11
III. MARCO TEÓRICO	12
3.1. Mecanismo de acción y resistencia a betalactámicos	12
3.2. Mecanismo de acción y resistencia a anfenicoles	14
3.3. . Sistemas CRISPR-Cas	15
IV. METODOLOGÍA	20
4.1. Diseño del estudio	20
4.2. Tipo de estudio	20
4.3. Procedimientos y técnicas	21
4.3.1. Fase preparativa para la obtención de los componentes moleculares	21
4.3.1.1. Diseño de cebadores	21
4.3.1.1.1. Alineamiento de secuencias para el diseño de cebadores para los genes de resistencia antimicrobiana	21
4.3.1.1.2. Diseño de cebadores mediante programas bioinformáticos	21
4.3.1.2. ARNcr	22
4.3.1.2.1. Diseño del ARNcr	22
4.3.1.2.2. Transcripción <i>in vitro</i>	24
4.3.1.3. ADN total de los aislados <i>E. coli</i>	25
4.3.1.3.1. Material Biológico	25
4.3.1.3.2. Ensayos de viabilidad celular	26
4.3.1.3.3. Extracción de ADN total de <i>E. coli</i>	27
4.3.1.4. Proteínas recombinantes: Taq Pol y Cas12a	28
4.3.2. Ensayos PCR-CRISPR-Cas12a	28

4.3.2.1. Optimización de la PCR para la detección de los genes de resistencia antimicrobiana (<i>bla_{CTX-M-15}</i> y <i>floR</i>)	28
4.3.2.1.1. Evaluación de la actividad de la Taq polimerasa recombinante	28
4.3.2.1.2. Evaluación de la curva de temperatura de hibridación	30
4.3.2.1.3. Evaluación de la curva de ADN total y número de ciclos	31
4.3.2.1.4. Evaluación de los productos de PCR	31
4.3.2.2. Optimización de la CRISPR-Cas12a para la detección de los amplicones de los genes de resistencia (<i>bla_{CTX-M-15}</i> y <i>floR</i>).....	32
4.3.2.2.1. Evaluación de la actividad de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a	32
4.3.2.2.2. Evaluación en función de ADN total en reacción	33
4.3.2.2.3. Evaluación de la curva de concentración de MgCl ₂	33
4.3.2.2.4. Evaluación cuantitativa y cualitativa de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a	34
4.3.2.2.5. Punto de Corte.....	34
4.3.3. Evaluación del desempeño de detección de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a	35
4.3.3.1. Límite de detección.....	35
4.3.3.1.1. Purificación de productos PCR	35
4.3.3.1.2. Determinación del Límite de detección	36
4.3.3.2. Concordancia de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a con los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.....	37
4.3.3.2.1. Preparación de las muestras	37
4.3.3.2.2. Método de difusión en disco para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana para los aislados que contienen el gen <i>bla_{CTX-M-15}</i>	38
4.3.3.2.3. Método de micro dilución para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana en los aislados que contienen el gen <i>floR</i>	40
4.3.3.2.4. Evaluación de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a para la concordancia con pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.....	42
4.4. Tamaño de muestra (aislados de <i>E. coli</i>).....	42
4.5. Consideraciones éticas	44
4.6. Análisis estadístico	44
V. RESULTADOS	46
5.1. Componentes moleculares obtenidos de la fase preparativa.....	46
5.1.1. Cebadores.....	46
5.1.2. ARNcr	47
5.1.2.1. Evaluación de los diseños de la secuencia guía del ARNcr.....	47
5.1.2.2. Producción del ARNcr	49

5.1.3.	ADN total de los aislados <i>E. coli</i>	50
5.1.3.1.	Crecimiento de los aislados <i>E. coli</i>	50
5.1.3.2.	Extracción de ADN	51
5.2.	Optimización de la PCR	51
5.2.1.	Optimización de la PCR con los cebadores T7	51
5.2.2.	Optimización de la PCR de los cebadores para los genes de resistencia ..	53
5.3.	Optimización de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a	58
5.3.1.	Evaluación de la actividad de la tecnología CRISPR-Cas12a	58
5.3.2.	Evaluación del ADN durante la PCR en los dos diseños de ARNcr para la detección de <i>bla_{CTX-M-15}</i> y <i>floR</i>	58
5.3.3.	Evaluación de la curva de concentración de MgCl ₂ en la técnica PCR- CRISPR-Cas12a	62
5.3.4.	Punto de corte	63
5.4.	Evaluación de desempeño	64
5.4.1.	Límite de detección	64
5.4.2.	Concordancia con pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	66
5.4.2.1.	Método de difusión en disco para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana para los aislados que contienen el gen <i>bla_{CTX-M-15}</i>	66
5.4.2.2.	Método de micro dilución para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana para las bacterias que contienen el gen <i>floR</i>	69
5.4.2.3.	Concordancia entre la técnica PCR-CRISPR-Cas12a con las pruebas de disco combinado y determinación de la CMI	71
VI.	DISCUSIÓN	74
VII.	CONCLUSIONES	78
VIII.	RECOMENDACIONES	79
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
X.	ANEXOS	

GLOSARIO

ADN: Ácido desoxirribonucleico

dsDNA: ADN de doble cadena

AC: Acido clavulánico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNcr: ARN – CRISPR

ATCC: Colección Americana de Tipos de Cultivos

BLEE: betalactamasas de espectro extendido

CAZ: ceftazidima

CD: Prueba de Disco combinado, por sus siglas en ingles.

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas,

CTX: cefotaxima

CTX-M-15: Gen de resistencia *bla*_{CTX-M-15} a betalactámicos

C1: 1° diseño de ARNcr para el set de cebadores de Chop Chop

C2: 1° diseño de ARNcr para el set de cebadores de Ramadan

DDS: Prueba de sinergia de doble disco double-disk synergy, por sus siglas en ingles

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénica

floR: Gen de resistencia a Florfenicol

F1: 1° diseño de ARNcr para el set de cebadores de Qian

F2: 2° diseño de ARNcr para el set de cebadores de Qian

LB: Luria Bertani

LoB: Límite del blanco

LoD: Límite de detección

MHA: Mueller-Hinton Agar

MFS: major facilitator superfamily, por sus siglas en inglés

NEG: Reacción negativa

NGS: Secuenciación de última generación, por sus siglas en inglés.

NTC: Control *non-template*

PAM: Motivo adyacente al protoespaciador de CRISPR

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

POS: Reacción positiva

PBS: Buffer fosfato salino

RAM: Resistencia antimicrobiana

UFC: Unidades formadoras de colonia

VPP: Valor predictivo positivo

WGS: Secuenciación del genoma completo, por sus siglas en inglés

%G: Porcentaje de guanidina y citosina

ΔG : Energía libre de Gibbs

RESUMEN

Estudios recientes sobre la resistencia antimicrobiana han reportado una alta prevalencia de los genes de resistencia *bla*_{CTX-M-15}, los cuales producen resistencia a betalactámicos, antibióticos de uso humano, y *floR*, que confiere resistencia a florfenicol, un antibiótico de uso veterinario, proponiéndolos como biomarcadores de la resistencia antimicrobiana (RAM). Estos genes se encuentran en bacterias *E. coli* provenientes de muestras de humanos, animales y aguas residuales, acentuando la necesidad de que sean monitoreados. Desafortunadamente, la mayoría de los laboratorios se encuentran limitados de adquirir y mantener equipos de alta tecnología, como las plataformas de secuenciación de próxima generación para el monitoreo de la RAM.

En este estudio, se desarrolló una técnica de detección molecular de los genes de resistencia *bla*_{CTX-M-15} y *floR* en *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) basados en la tecnología CRISPR-Cas12a acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando equipos básicos, como un termociclador y un transiluminador. Para ello, se diseñaron el ARNcr y los cebadores de las regiones conservadas de los genes de resistencia *bla*_{CTX-M-15} y *floR*, mediante análisis bioinformático. Además, se optimizó un sistema de amplificación de ácidos nucleicos y de detección fluorescente mediante CRISPR-Cas. En la determinación del límite de detección, se demostró que la técnica puede detectar concentraciones de ADN diana tan bajas como 100 aM en una reacción de PCR con 30 ciclos de amplificación y un tiempo de detección de 1.5 horas.

Finalmente, al comparar la técnica PCR-CRISPR-Cas12a para los genes de resistencia *bla*_{CTX-M-15} y *floR* con los métodos difusión en disco y la microdilución,

respectivamente, nuestros resultados también mostraron una buena concordancia con un índice de kappa de 1 ($p < 0.001$). La aplicación de la técnica aquí descrito se perfila como una opción prometedora para la detección de genes de resistencia antimicrobiana en entornos con recursos limitados, lo que contribuiría a una mejor vigilancia y control de la RAM.

PALABRAS CLAVES

PCR, CRISPR, Cas12a, RAM, *floR*, *bla_{CTX-M-15}*

ABSTRACT

Recent studies have reported a high prevalence of *bla*_{CTX-M-15} resistance genes, which confer resistance to beta-lactam antibiotics used in humans, and *floR*, which imparts resistance to florfenicol, a veterinary antibiotic. These genes are being proposed as biomarkers for antimicrobial resistance (AMR). They have been found in *E. coli* from human, animal, and wastewater samples, underscoring the need for monitoring them. Unfortunately, in most laboratories, there are limitations in acquiring and maintaining high-tech equipment like next-generation sequencing platforms for AMR monitoring.

In this study, a molecular detection method for *bla*_{CTX-M-15} and *floR* resistance genes in *E. coli* ETEC was developed using CRISPR-Cas12a technology coupled with polymerase chain reaction (PCR) and basic equipment such as a thermocycler and a transilluminator. CRISPR RNA and primers for the conserved regions of *bla*_{CTX-M-15} and *floR* resistance genes were designed through bioinformatic analysis. Additionally, a nucleic acid amplification and fluorescent detection system was optimized using CRISPR-Cas. The research shows that the system can detect target DNA concentrations as low as 100 aM in a reaction with 30 PCR amplification cycles and a detection time of 1.5 hours.

Finally, when comparing the PCR-CRISPR-Cas12a technique for *bla*_{CTX-M-15} and *floR* resistance genes with the disk diffusion and microdilution methods, our results showed good agreement with a kappa index of 1 ($p < 0.001$). The application of the method shown here is a promising option for detecting antimicrobial resistance genes in resource-limited environments, contributing to better surveillance and control of AMR.

KEY WORDS

PCR, CRISPR, CAS12a, AMR, *floR*, *bla_{CTX-M-15}*

1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de los antibióticos permitió el control de las infecciones bacterianas. Sin embargo, el uso excesivo e inapropiado de los mismos aceleró la evolución de las bacterias para que generen resistencia. Se estima que las muertes debido a la resistencia antimicrobiana (RAM) en el 2050 serán de 10 millones anuales (1).

La bacteria *Escherichia coli* es uno de los principales patógenos causante de infecciones intrahospitalarias (2). Los genes de resistencia en *E. coli* se adquieren a través de la transferencia horizontal, entre los cuales se encuentran los genes *bla_{CTX-M-15}* y *floR*, que causan resistencia a antibióticos betaláctamicos y anfenícolos de uso común humano y veterinario, respectivamente (3,4). Ambos genes se han detectado en diversas bacterias proveniente de muestras de animales y reservorios de agua, con prevalencias superiores al 50% (5–8). Actualmente, se aplican distintos métodos de detección de la RAM, siendo los más usados el antibiograma y el secuenciamiento de genes (9). El primero se aplica comúnmente en los centros de salud, es específico y económico, pero requiere 24 horas para obtener resultados. El segundo, utilizado en centros de referencia, también es altamente específico, pero además de necesitar más de 24 horas para los resultados, tiene limitaciones de costos y requerimiento de personal altamente especializado (10).

De esta manera, existe la necesidad de desarrollar técnicas alternativas que detecten genes de resistencia con alta sensibilidad y especificidad sin las desventajas de las técnicas anteriores: corto tiempo y de bajo costo. Sistemas PCR acoplada a la detección fluorescente mediada por el complejo CRISPR-Cas12a (PCR-CRISPR-Cas12a) para otros blancos moleculares se ha reportado en un tiempo de ejecución

de 2 horas con el uso de equipos básicos, como un termociclador y un transiluminador (11,12). Esto proporciona una opción económica y rápida en comparación con el secuenciamiento y los antibiogramas. Por consiguiente, esta tesis tuvo como objetivo el desarrollo de una técnica de detección molecular de resistencia a antibióticos basado en la PCR-CRISPR-Cas12a que reconozca las regiones conservadas de los genes *bla*_{CTX-M-15} y *floR* en aislados de *E. coli*. El complejo CRISPR-Cas12a está formado por la nucleasa Cas12a y un ARN guía (ARNcr) específico para las regiones a detectar, que juntos reconocen la secuencia diana. Una vez que el complejo se une a la región blanco, la nucleasa muestra una actividad de corte en trans que permite la digestión enzimática de una sonda de ADN de hebra simple etiquetado con un fluoróforo y un quencher. Esto permite la detección de los genes de resistencia mediante el aumento de fluorescencia mediada por la pérdida de FRET (del inglés, *Föster resonance energy transfer*) (Figura 1).

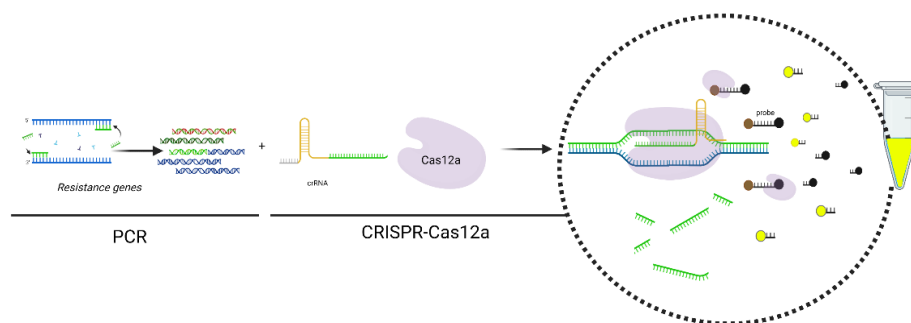


Figura 1. Técnica PCR-CRISPR-Cas12a para la detección de los genes de resistencia *bla*_{CTX-M-15} y *floR*.

Los productos amplificados por la técnica PCR se añaden al sistema CRISPR-Cas12a, donde el ARNcr se hibrida a la región blanco del ADN y la proteína corta el ADN, y la sonda que permite la visualización de fluorescencia con ayuda de un transiluminador.

Fuente: Elaboración propia.

1.1. Antecedentes

Pruebas fenotípicas, generales para RAM y enfocadas en *bla*_{CTX-M-15} y *floR*

En las técnicas microbiológicas, el antibiograma, considerado un *gold standard*, evalúa el fenotipo de la especie bacteriana y determina su susceptibilidad a los compuestos antimicrobianos (13). Esto se realiza mediante diversas pruebas de las que se encuentra los métodos de difusión en disco o de microdilución. La expresión fenotípica de las bacterias que contienen genes de resistencia, como *bla*_{CTX-M-15}, se evalúa comúnmente mediante métodos de difusión en disco para evaluar la producción de betalactamasas mediante la evaluación del diámetro de inhibición (3). En el caso de *floR*, se utiliza el método de microdilución para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) a florfenicol (14). A nivel general, en ambas pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, la sensibilidad y especificidad se reportaron superiores al 90% en comparación con el secuenciamiento (15,16). No obstante, bacterias como *E. coli*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* ocasionalmente pueden desarrollar un estado viable pero no cultivable durante procesos infecciosos, lo que podría comprometer los resultados del antibiograma (17).

Pruebas moleculares, generales para RAM y enfocadas en *bla*_{CTX-M-15} y *floR*

En estudios genéticos y moleculares, el secuenciamiento de ADN se considera *gold standard*, ya que permite la identificación de genes de resistencia antimicrobiana en bacterias, incluso aquellas que se clasifican como 'no cultivables' (18). En la aplicación del secuenciamiento genético para la detección de *bla*_{CTX-M-15} y *floR*, se observa una alta especificidad (99% a 100%) y sensibilidad (85% a 91%) comparado a pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (15,16). Sin embargo, este

método tiene un alto costo de implementación y requiere más de 24 horas, al igual que el antibiograma (Tabla 1) (10). Además, los datos genómicos suelen ser vastos y complejos, su interpretación requiere de herramientas y algoritmos especializados y, por tanto, varias etapas de análisis.

Tabla 1: Comparación de los métodos y técnicas para la detección de la RAM

Métodos/Técnicas	Precio	Tiempo	Ventaja
Antibiograma (DDS)	5 USD	24 h	Bajo costo
Secuenciamiento (NGS)	1000 USD Costo por genoma	>24 h	Conocimiento de nuevos patógenos <i>Gold standard</i>
Test Bioquímico	2–10 USD	2 h	Rápido
PCR convencional	≈8 USD	2-3 h	Rápido
CRISPR-Cas asociado a PCR	≈12 USD	2 h	Rápido Mayor especificidad y sensibilidad

Las pruebas rápidas bioquímicas utilizan la coloración como principio para detectar la presencia de enzimas betalactamasas expresadas por genes como *bla_{CTX-M-15}* (19). Sin embargo, se desconoce pruebas bioquímicas efectivas para detectar la resistencia asociada al gen *floR*. Además, estas pruebas presentan una menor especificidad (83%) en comparación con la PCR convencional, que tiene una especificidad del 90% comparado al secuenciamiento de ADN (20).

CRISPR-Cas12a y sus aplicaciones para diagnóstico en general y RAM

La tecnología CRISPR-Cas12a ha emergido como una herramienta poderosa para la detección molecular. Investigaciones recientes, como las de Gootenberg *et al.* (2018), han destacado su aplicabilidad en la identificación precisa de secuencias específicas de ácidos nucleicos, permitiendo plataformas de detección rápidas y sensibles (21). Recientemente, la tecnología CRISPR-Cas12a se ha utilizado para la detección de virus, parásitos y bacterias. Para los virus ZIKA, SARS-CoV2, se reportó la sensibilidad y especificidad de 100% (12,22). Para parásitos como *Leishmania* se obtuvo porcentaje de concordancia positivo y negativo de 82% y 100% comparado a la prueba qPCR (12,22,23). Dentro del grupo de bacterias, se detectaron a *Mycobacterium tuberculosis*, *E. coli* y *Staphylococcus aureus* (24–26).

1.2. Planteamiento del problema

La rápida difusión de genes que confieren resistencia a betalactámicos, anfenicoles y otros antibióticos requieren ahora estudios de vigilancia molecular en grandes números, poblaciones, ambientes, aguas, etc., exponiendo una nueva problemática que afrontar en la lucha contra las RAM. Las pruebas actuales para detectar RAM son la qPCR, la PCR, el secuenciamiento de ADN y diversas pruebas de susceptibilidad fenotípica. Sin embargo, las herramientas actuales (microbiológicas o moleculares de laboratorio) poseen limitaciones particulares del procesamiento rápido de un gran número de muestras, o el costo de implementación en países con recursos limitados (infraestructura y adquisición), lo que conlleva que las pruebas actuales sean poco compatibles con potenciales iniciativas de vigilancia molecular, seguimiento en el tiempo, predicción en dinámicas poblacionales o de intervención. Por otro lado, las tecnologías de diagnóstico molecular automatizadas como el secuenciamiento de ADN están creciendo lentamente en Latinoamérica y países en vías de desarrollo.

Es de suma importancia desarrollar herramientas que sean compatibles con la aplicación en atención primaria y actividades de monitoreo molecular para genes RAM, que permitan el procesamiento de grandes números de muestras en tiempos y costes adecuados. En particular, técnicas alternativas al secuenciamiento de ADN se encuentran en desarrollo aún, lo cual limita la implementación de estrategias de vigilancia en nuestro como en otros países con recursos limitados. Sin embargo, sí existen planes de vigilancia y reporte de patógenos y sus respectivas resistencias en el Perú, centralizado en el INS.

En este sentido, la tecnología CRISPR-Cas12a propone diversas alternativas que permitirían el desarrollo de pruebas de detección y estudios con características compatibles con esfuerzos de vigilancia molecular. En particular, métodos que combinan amplificación de ADN con reconocimiento y detección mediada por CRISPR-Cas12a han sido satisfactoriamente empleados en grandes números durante la pandemia de Covid-19 en países africanos (30). Otros reportes muestran que reacciones de amplificación isotérmica acoplada a CRISPR pueden realizarse en un solo tubo de ensayo, característica importante para reducir la probabilidad de contaminación cruzada (31). Además, la modularidad del sistema también permite otras formas para evidenciar el resultado de las reacciones de detección, como por ejemplo tiras de flujo lateral o sensores electroquímicos, que por su bajo costo, portabilidad y digitalización del resultado también son características deseables con fines de aumentar la capacidad de detección molecular, particularmente en grandes números.

El desarrollo de una técnica para su aprobación para la detección molecular con fines diagnósticos, de monitoreo, o de vigilancia requiere cumplir con diversos pasos, algunos comunes y otros particulares a cada objetivo. Sin embargo, todas requieren inicialmente probar que las reacciones bioquímicas son efectivamente dependientes de la presencia o ausencia del elemento genético que se quiere detectar. Esto es válido para toda prueba molecular, PCR, qPCR, secuenciación, Lamp, RPA, y CRISPR-Cas12a. La presente tesis explora el desarrollo de una técnica de detección molecular de los genes de resistencia *bla_{CTX-M-15}* y *floR* en *Escherichia coli* basados en la tecnología CRISPR-Cas12a acoplada a PCR. Como primera etapa de una fase de desarrollo tecnológico, el presente trabajo explora

parámetros químicos, moleculares, bioquímicos y biológicos que determinan la detección molecular en un contexto controlado. Es así, que a nivel experimental se busca determinar las condiciones ideales para un conjunto de reacciones bioquímicas, sales, enzimas, ADN, cebadores, ARNcr, parámetros de fluorescencia, entre otros.

Dicho conjunto de condiciones da paso a una técnica o prueba que puede ser validada a nivel de laboratorio y así definir parámetros importantes que ayuden a identificar su potencial compatibilidad como método de vigilancia, monitoreo o diagnóstico. Entre estos parámetros se resalta el límite del blanco (o *cutoff*), el límite de detección, y la concordancia entre la prueba nueva con respecto a otros ensayos ampliamente usados. Este primer paso de desarrollo y caracterización de una nueva prueba para la detección de *bla_{CTX-M-15}* y *floR* es fundamental para determinar la viabilidad de su uso sucesivo. Es así que la tesis planteada podría contribuir con la optimización de una prueba de detección molecular para la detección de RAM, aportando las bases tecnológicas primarias para la aplicación de la tecnología Crispr/Cas en la identificación de RAM tomando como modelo la detección molecular de *bla_{CTX-M-15}* y *floR*.

1.3. Justificación del estudio

El reporte de genes de la RAM como *bla*_{CTX-M-15} y *floR* en agua resaltan la preocupante propagación, subrayando la necesidad de abordar la resistencia antimicrobiana con métodos de mayor alcance de aplicación, en términos de mayor número de muestras a costos menores. En ese sentido los métodos o técnicas basados en la tecnología CRISPR-Cas12a ofrecen dicho potencial (Figura 2)(7,8). Esta necesidad es además sustentada donde el panorama de la prevalencia para *bla*_{CTX-M-15} supera el 35%, y para *floR* alcanza el 15%, incluyendo a niños y adultos en entornos comunitarios y clínicos (32–34). En animales, todas las prevalencias de *floR* son superiores al 50%, mientras que para *bla*_{CTX-M-15} es de 18%. (5,6,33,35,36) (Figura 2). Favorecidas por la transferencia horizontal, las bacterias han transferido los genes *bla*_{CTX-M-15} y *floR* al ecosistema, o viceversa.

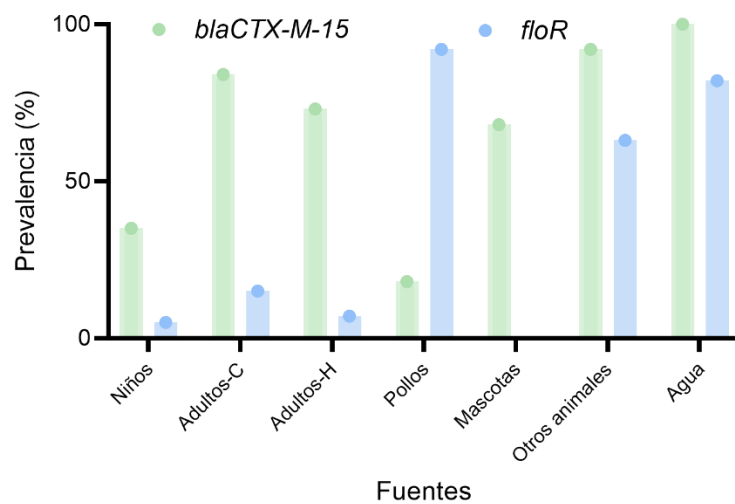


Figura 2. La prevalencia de los genes de resistencia *bla*_{CTX-M-15} y *floR*.

La prevalencia de los genes de resistencia se comparó en diferentes muestras, incluyendo niños (34,37), adultos-C que provienen de un ambiente comunitario (vendedores de pollo) (33,37) y adultos-H, de un ambiente hospitalario (32,38), pollos (33,36), mascotas (35) y otros animales aves migratorias para *bla*_{CTX-M-15} (5) y animales de granja para *floR* (39), así como agua (ríos para *bla*_{CTX-M-15} (7) y piscigranja para *floR* (8).

Fuente: Elaboración propia con los datos de los artículos citados.

Una de las ventajas de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a es que presenta una doble especificidad. En primer lugar, los cebadores utilizados en la técnica PCR, y luego a través del uso del ARNcr de la tecnología CRISPR-Cas, que reconoce una región específica del gen amplificado (11). En comparación con los métodos moleculares tradicionales, como la amplificación de ácidos nucleicos, el ensayo de PCR-CRISPR-Cas tiene el potencial de ofrecer una mejor especificidad. La molécula de ARNcr utilizada proporciona un segundo nivel de especificidad en la detección de la región objetivo. Además, al utilizar técnicas de detección basados en fluorescencia, se logra una mayor sensibilidad en comparación con la visualización de los productos de amplificación mediante electroforesis.

En consecuencia, es importante aumentar nuestras capacidades de detección de genes de resistencia, como *bla_{CTX-M-15}* y *floR*, de gran importancia clínica e industrial. De esta manera, se podrá identificar la presencia y difusión de dichos genes en pacientes, ambientes hospitalarios, granjas, tierras aledañas y ambiente, entre otros. Métodos o técnicas que permitan una mayor frecuencia de monitoreo molecular y con tiempos de respuesta menores permitirán intervenciones dirigidas con el objetivo de contener la difusión horizontal de resistencias a antibióticos.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Desarrollar una técnica de detección molecular de los genes de resistencia *bla_{CTX-M-15}* y *floR* en *Escherichia coli* basados en la tecnología CRISPR-Cas12a acoplada a PCR.

2.2. Objetivos específicos

- Diseñar el ARNcr, los cebadores de las regiones conservadas de los genes de resistencia *bla_{CTX-M-15}* y *floR*, mediante análisis bioinformático.
- Optimizar la reacción de amplificación mediante PCR convencional para genes de resistencia *bla_{CTX-M-15}* y *floR*
- Optimizar la reacción de detección mediante CRISPR-Cas12a para genes de resistencia *bla_{CTX-M-15}* y *floR*.
- Determinar el límite de detección de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a para *bla_{CTX-M-15}* y *floR*
- Comparar la técnica PCR-CRISPR-Cas12a para genes de resistencia *bla_{CTX-M-15}* y *floR* frente a pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Mecanismo de acción y resistencia a betalactámicos

La frecuencia de uso de los antibióticos betalactámicos se debe a su efectividad y bajo precio en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas (27). El mecanismo de acción de los beta-lactámicos se basa en la inhibición de la síntesis de peptidoglucano, componente común de la pared celular bacteriana (40). Un paso importante del mecanismo de acción de los betalactámicos es la transpeptidación, que está dirigida por una transpeptidasa llamada proteína de unión a penicilina (PBP). Los β -lactámicos poseen un anillo característico: una amida cíclica reactiva que se abre para unirse al hidroxilo, que es el sitio activo de la PBP, lo que resulta en una unión covalente irreversible y la consiguiente inhibición de la síntesis (41). Estos antibióticos se clasifican en penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos (42).

En respuesta a la acción antibiótica de los betalactámicos, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia, como la producción de β -lactamasas, enzimas peptidasas que disocian el anillo betalactámico (43,44). De acuerdo a lo propuesto por Ambler (1980) y Bush (1995), estas enzimas de las clases A, C y D contienen serina, que hidroliza el anillo betalactámico, impidiendo su unión a las proteínas PBP y, por lo tanto, inhibiendo su mecanismo de acción (45,46). En la Clase A, se encuentran las bacterias productoras de BLEE (betalactamasas de espectro extendido) que degrada a una gran variedad de antibióticos, incluyendo a las cefalosporinas de tercera generación (47)

El gen *bla*_{CTX-M}, que codifica cefotaximasas de Munich CTX-M, fue reportado por su alta afinidad a dos derivados de cefalosporinas: ceftazidima y cefotaxima (48). La bacteria de origen del gen *bla*_{CTX-M} fue *Kluyvera spp.*, que transfirió al gen a través de elementos genéticos móviles a otros géneros y especies, entre ellas a *E. coli*, lo que contribuyó a su propagación (49). En la familia Enterobacteriaceae, los genes *bla*_{CTX-M} se han reportado no solo en plásmidos en *K. pneumoniae*, *Salmonella* y *Shigella*, sino también en el cromosoma de *Enterobacter cloacae* y *E. coli* favorecidos por el transposón IS Ecp1 (49,50). Por su parte, *E. coli* es el productor más frecuente de BLEE, predominando la *bla*_{CTX-M-15} con una prevalencia superior al 50% en comparación con otras *bla*_{CTX-M} e incluso otros genes de resistencia antimicrobiana como *bla*_{SVH} y *bla*_{TEM} (51–53). En la distribución filogenética de la familia CTX-M, *bla*_{CTX-M-15} presenta alta frecuencia en cepas *E. coli*, especialmente en ST 131 (Figura 3) (54).

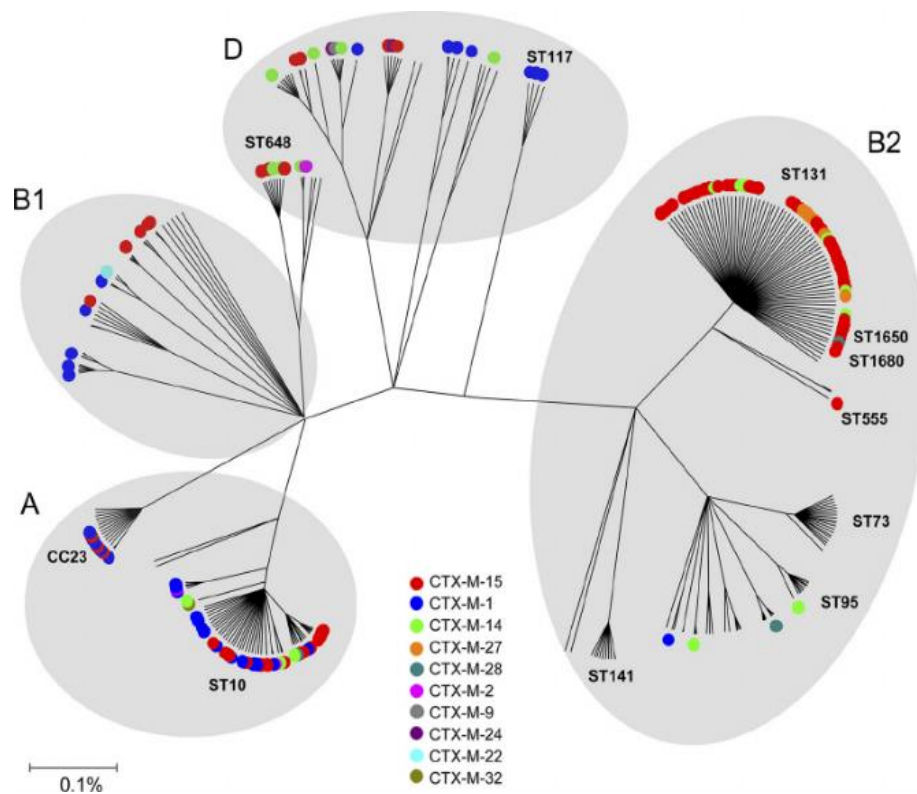


Figura 3. Distribución filogenética de las enzimas CTX-M en *E. coli*.

Un total de 304 aislados se agruparon en 4 grupos filogenéticos A (23%), B1 (14%), B2 (48%) y D (15%). El gen *bla*_{CTX-M-15} está representado por el círculo de color rojo, el cual es predominante.

Fuente: Brise *et al.* 2012 (54)

3.2. Mecanismo de acción y resistencia a anfenicoles

Los anfenicoles son un grupo de antibióticos con una estructura fenilpropanoide, usados exclusivamente en la medicina veterinaria. El mecanismo de acción se basa en la unión a la subunidad ribosomal 50S, específicamente en el centro de peptidil transferasa (PTC) (55). Esto inhibe la formación de enlaces peptídicos y la adición de aminoácidos a la cadena polipeptídica (56). El primer antibiótico de este grupo fue el Cloranfenicol con actividad bacteriostática de amplio espectro que actualmente está prohibida debido a su toxicidad (57,58). Un anfenicol de segunda generación es el Tiamfenicol, que no presenta niveles de toxicidad considerables, aunque es menos activo (59). Finalmente, florfenicol, llamado también Flunixin, es uno de los antibióticos más usados actualmente en veterinaria, el cual es un derivado del tiamfenicol (60).

En la identificación de genes asociados a resistencia al cloranfenicol en el cromosoma de *Salmonella typhimurium* DT104, se evidenció la presencia del gen *floR*, el cual también está asociado a la resistencia al florfenicol (61). El gen *floR*, codifica una proteína perteneciente a la familia MFS ubicada en la membrana bacteriana, encargada de expulsar específicamente a los anfenicoles (62). El mecanismo de acción de esta bomba de eflujo se basa en la utilización de la energía del potencial de membrana y una fuerza motriz de protones para llevar a cabo la eliminación activa de los anfenicoles (63)

A la fecha, se ha reportado la presencia del gen *floR* en *E. coli* aislado de ganado vacuno, pollos y cerdos asociados a transposones (36,64). Además, el gen *floR* no solo se ha reportado en *E. coli*, sino también en *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *K. pneumoniae* en muestras humanas (36,38,65). La presencia de fragmentos similares del plásmido pKP18-125 en *K. pneumoniae* aislada de muestras clínicas y en *E. coli* de pollos sugiere la transferencia de bacterias patógenas entre humanos y animales (38)

3.3.. Sistemas CRISPR-Cas

En la última década, el estudio genético de las bacterias y arqueas ha llevado al descubrimiento de un sistema inmune adaptativo en bacterias denominado CRISPR (66). La función biológica inmunitaria de los sistemas CRISPR es esencial contra elementos genéticos invasores como virus o bacteriófagos, debido a la capacidad para reconocer, adquirir, recordar secuencias genéticas específicas y posteriormente, degradar o inhibir la expresión del material genético invasor.

Los genes asociados a los sistemas CRISPR-Cas están organizados en un casete de genes Cas y el locus CRISPR (Figura 4). El locus CRISPR es un arreglo repetitivo de secuencias llamadas espaciadores que se transcriben los ARNcr, también conocidos como ARN guía, los cuales guían a las proteínas Cas para reconocer la secuencia objetivo (67). Estas regiones son pequeños fragmentos de ADN foráneo derivados de genomas de organismos invasores, que han sido adquiridos por bacterias y arqueas del medio e integrados dentro del locus CRISPR llamados espaciadores (*spacer* en inglés) (Figura 4) (68).

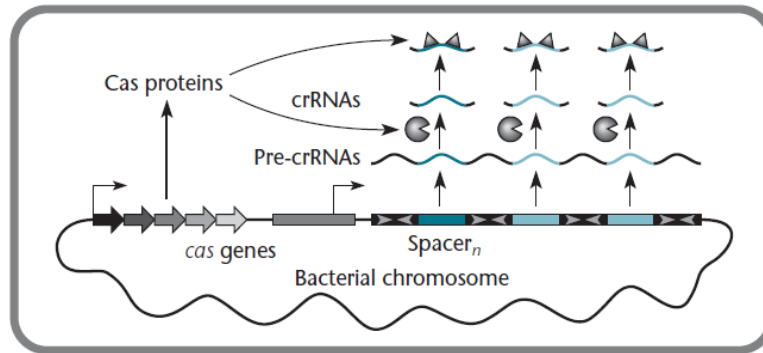


Figura 4. Esquema del locus CRISPR en bacterias.

El sistema CRISPR forma una única molécula de ARN extendida (Pre-crRNAs). Este ARN se corta luego en las secuencias repetidas para generar ARN guía CRISPR ("crRNAs o ARNcr"), cada uno portando la secuencia específica de uno de los espaciadores.

Fuente: Snyder *et al.* 2013(68)

Los componentes principales del sistema CRISPR son el ARNcr y las proteínas Cas. Por un lado, el ARNcr contiene dos regiones, la secuencia *scaffold*, que forma una estructura *hairpin* es una región conservada que varía en función de las proteínas Cas para unirse a ellas. Mientras que, la secuencia guía es una región que varía de acuerdo al ADN foráneo y se une de manera complementaria a este (Figura 5)(69,70).

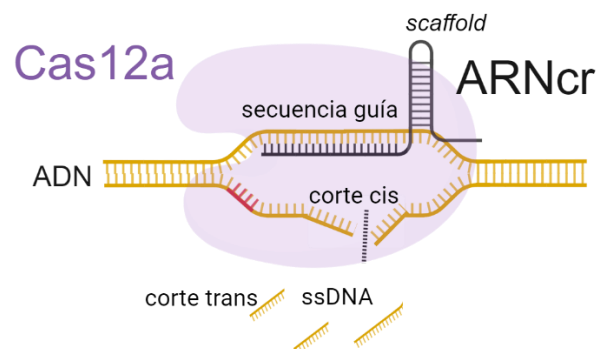


Figura 5. Sistema CRISPR-Cas12a.

Los componentes principales del sistema CRISPR-Cas12a son la proteína Cas12a, el ARNcr y el ADN. La activación de la proteína Cas12a, debido a la hibridación

del ARNcr-ADN, comienza con el corte de tipo cis, específico para el ADN objetivo, y luego con el corte trans, que corta el ADN de manera inespecífica. Fuente: Elaboración propia

Por otro lado, las proteínas Cas, de tipo endonucleasas, presentan una gran diversidad destacando las proteínas Cas12a o también llamada Cpf1 para el uso de las plataformas CRISPR para detección. A nivel estructural, la proteína presenta dos lóbulos: REC (REC 1 y REC 2) y NUC (RuvC, la región de interacción de PAM (PI), dominios WED y el puente hélice). La interfase entre RuvC y los dominios NUC permiten el reconocimiento específico de la unión híbrida del crARN con la dsDNA y posterior corte (71).

El mecanismo de acción de las proteínas Cas12a implica inicialmente la formación del complejo Cas12a-ARNcr, con la unión de la secuencia *scaffold* a la proteína Cas. Posteriormente, la proteína Cas12a explora secuencias PAM señal para la hibridación de la secuencia guía del ARNcr con el ADN foráneo (Figura 5) (71). Luego, la proteína Cas12a, en su sitio catalítico RuvC, realiza su acción endonucleasa a 5 nucleótidos de la región PAM a través de la incisión de tipo cis a la región que no es complementaria al ARNcr (*NT-strand*) y luego, a la complementaria al ARNcr (*T-strand*) (69,72) (Figura 6). Después del corte de tipo cis al dsADN, *in vitro* se ha observado un tipo de incisión trans de recambio múltiple e inespecífico que le otorga la capacidad de realizar cortes indiscriminados en cadenas simples de ADN libres en solución (72). Por último, su función catalítica se recicla para iniciar su actividad en otras dsDNA(Figura 6) (71).

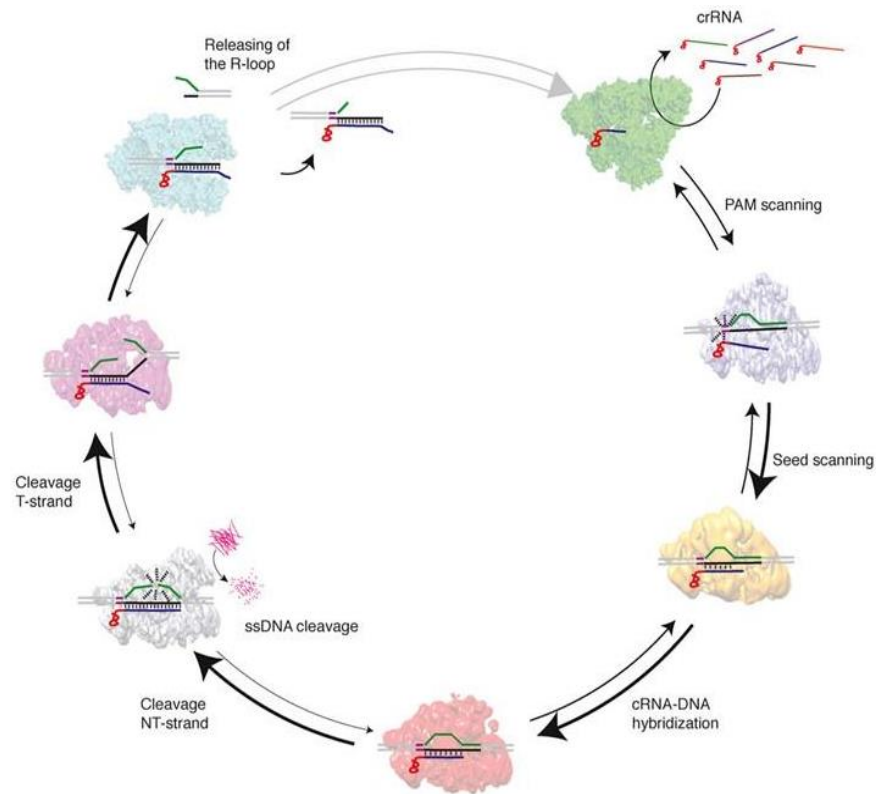


Figura 6. Actividad de la proteína Cas12a en el sistema CRISPR.

El proceso comienza con la Cas12a de color verde unida al ARNcr. El complejo Cas12a-ARNcr, después de reconocer secuencias PAM en el ADN objetivo, mediante cambios conformacionales de la proteína Cas12a, desenrolla el ADN para permitir la hibridación con el ARNcr. La primera región del ARNcr, denominada "seed", se hibridiza con el ADN. En caso de que haya una hibridación completa entre la secuencia del ARNcr y el ADN, se activa la función nucleasa de la proteína, iniciando el corte de tipo cis en el ADN objetivo, primero en la región no complementaria (cadena NT) y luego en la complementaria (cadena T).

Fuente: Stella *et al.* 2018 (71).

La tecnología CRISPR-Cas12a reúne las características necesarias para ser una plataforma de detección específica de genes de resistencia a antibióticos como *bla_{CTX-M-15}* y *floR*. La proteína Cas12a muestra actividad de corte específico (cis) en ADN a hebra doble y corte (trans) inespecífico en secuencias de ácido nucleico de una sola hebra, como el reportero fluorescente. Esto permite la aplicación de este sistema como tecnología para la detección de los genes de resistencia mediante la

emisión de fluorescencia que puede ser leída a través de un lector de fluorescencia, cámara de luz azul e incluso visualización directa con tiras de flujo lateral. El tiempo que se requiere para visualizar la presencia de los genes de resistencia es menor comparado a un gel de agarosa.

Así, en los últimos tres años, se ha desarrollado este sistema para la detección de diversos genes de resistencia antimicrobiana relacionados con la colistina (*mcr-1*), kanamicina (*KanaR*), penicilina (*AmpR*), cloranfenicol (*CmR*), carbapenémicos (KPC, OXA y NDM) y macrólidos (*ermB*) en un tiempo de 1 a 2 horas, con bajos límites de detección que demuestran alta sensibilidad (Tabla 2) (22,73–76)

Tabla 2. Sistemas CRISPR-Cas12a para la detección de genes RAM

CRISPR	Blanco RAM	Tiempo (h)	LoD	Ref
RPA-CRISPR-Cas12a	<i>mcr-1</i>	1 h	420 fg	Gong L <i>et al.</i> , 2022
Au-Fe ₃ O ₄ nanozyme coupled with CRISPR-Cas12a	<i>KanaR</i> , <i>AmpR</i> y <i>CmR</i>	1 h	0.1 UFC/ μ l	Chen H <i>et al.</i> , 2023
RPA-CRISPR-Cas12a	KPC, OXA y NDM	2 h	100 aM	Curti LA <i>et al.</i> , 2020
LAMP-CRISPR-Cas12a	KPC y NDM	2 h	3×10^5 UFC/mL	Xu H <i>et al.</i> , 2022
LAMP-CRISPR-Cas12a	<i>ermB</i>	2h	2.75×10^3 copias/ μ L	Mao K <i>et al.</i> , 2024

Fuente: Elaboración propia

IV. METODOLOGÍA

4.1. Diseño del estudio

El desarrollo de la técnica de detección para ambos genes de resistencia y PCR acoplada a CRISPR-Cas12a implica los procedimientos que se describen en la figura 7. En primer lugar, en la fase preparativa, se obtuvieron los componentes moleculares, como los cebadores, el ARNcr, la proteína Taq ADN Polimerasa y el ADN total (genómico y plasmídico). En segundo lugar, se optimizó la técnica PCR-CRISPR-Cas12a. Por último, se evaluó la técnica de detección mediante la determinación del límite de detección y la comparación con pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

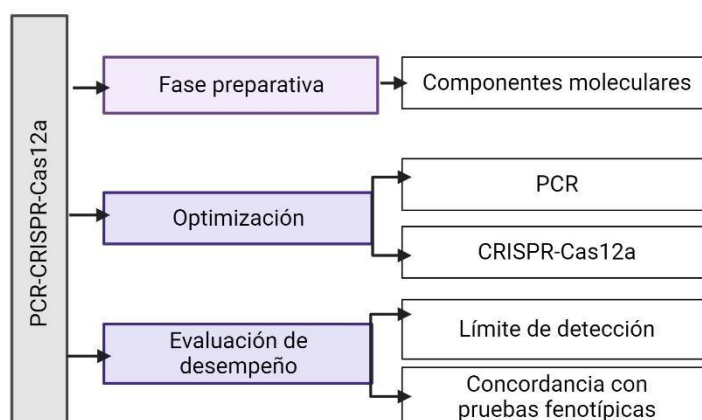


Figura 7. Diagrama de representación general del diseño de estudio.

El estudio se dividió en tres fases: preparativa, optimización y la de evaluación de desempeño.

Fuente: Elaboración propia.

4.2. Tipo de estudio

El presente estudio califica como un estudio experimental *in vitro*, dado que los ensayos fueron realizados en condiciones controladas fuera de un organismo vivo.

4.3. Procedimientos y técnicas

4.3.1. Fase preparativa para la obtención de los componentes moleculares

4.3.1.1. Diseño de cebadores

4.3.1.1.1. Alineamiento de secuencias para el diseño de cebadores para los genes de resistencia antimicrobiana

Primero, se buscaron todas las secuencias reportadas de los genes de resistencia de *E. coli* en GenBank, almacenadas en GenBank hasta enero de 2022. Luego, se alinearon las secuencias de los genes *bla_{CTX-M-15}* y *floR* por separado utilizando el programa AliView para identificar las regiones conservadas (77). Este proceso se llevó a cabo utilizando la herramienta MUSCLE, la cual permite una alineación precisa de múltiples secuencias (78).

4.3.1.1.2. Diseño de cebadores mediante programas bioinformáticos

Los resultados del alineamiento permitieron el diseño de cebadores utilizando el programa *PrimerDesign-M*. Este programa consideró los criterios de la temperatura de Melting, porcentaje guanina y citosina (GC) y probabilidad de formación de dímeros (79). Posteriormente, se diseñó otro set de cebadores en el programa Chop-Chop que tiene incorporado el programa *Primer3* con los mismos criterios de evaluación del programa *PrimerDesign-M* (80). Además, se encontraron en la literatura sets de cebadores de referencia para el gen de resistencia *bla_{CTX-M-15}* (3,81,82) y *floR* (65,83) (Figura 8).

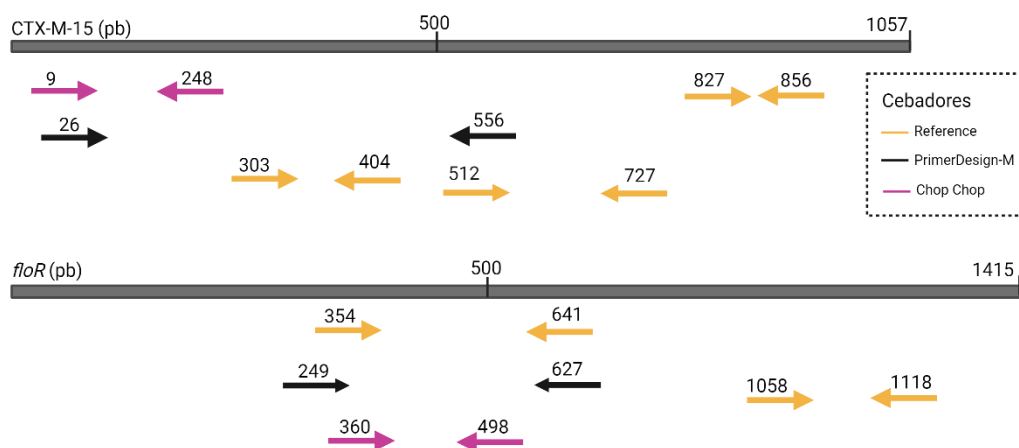


Figura 8. Cebadores utilizados en la presente investigación.

Los cebadores reportados en la literatura se indican en color anaranjado. Los cebadores en color negro fueron obtenidos del programa *Primer Design-M*, mientras que los cebadores en color morado fueron obtenidos de Chop Chop en la presente investigación.

Fuente: Elaboración propia.

4.3.1.2. ARNcr

4.3.1.2.1. Diseño del ARNcr

En base a los cebadores seleccionados, se obtuvieron candidatos para las secuencias guía de los ARNcr utilizando dos programas bioinformáticos, con la especificación de utilizar la enzima Cas12a para verificar la presencia de las regiones PAM (TTTV). Los programas CRISPRscan y Chop Chop evaluaron las regiones inespecíficas (off) para humanos y bacterias, respectivamente (84,85) (Figura 9A). Manualmente, se descartaron las secuencias guía que estaban cerca de los extremos de los amplicones, con una distancia menor a 40 pb, debido a que abarcaban las regiones de los cebadores y podrían resultar en uniones inespecíficas. A continuación, se seleccionaron los primeros 10 diseños de secuencias guía, descartando aquellos que tenían un porcentaje de GC mayor al 75% y que mostraban auto-complementariedad (Figura 9A).

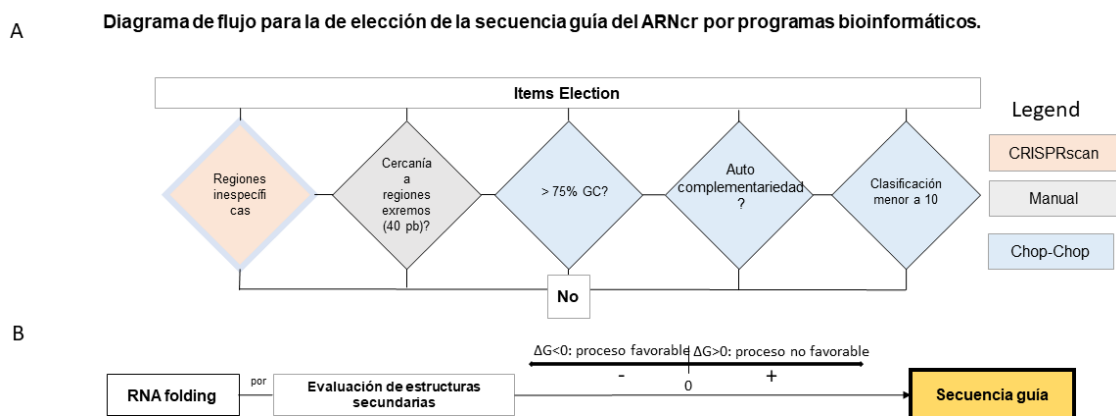


Figura 9. Diseño de ARNcr.

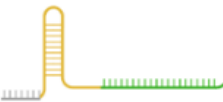
A) Elección de las secuencias guía. Diagrama de flujo para evaluar las secuencias guía para ARNcr producidos por los programas CRISPRscan y Chop-Chop (84,85). B) Evaluación de plegamiento de los candidatos mediante el programa *RNAfold* (86).

Fuente: Elaboración propia con los datos de los artículos citados.

A continuación, se analizaron los candidatos utilizando el programa *RNAfold*, el cual evaluó la probabilidad de formación de estructuras secundarias a diferentes temperaturas (25°C, 30°C y 37°C) (86). Para ello, se consideró que los valores de ΔG estuvieran cercanos a 0 o fueran positivos, ya que indicaban una menor probabilidad de formación de estructuras secundarias (Figura 9B).

Para generar las secuencias candidatas de ARNcr, se diseñó un constructo de ADN de doble hebra que constaba de un promotor T7 en el extremo 5' para la transcripción *in vitro*, seguido de la secuencia “*scaffold*” necesaria para la unión del ARNcr-Cas12a, y finalmente la secuencia guía que se une a la región de interés (Tabla 3).

Tabla 3. Partes genómicas del diseño ARNcr

Diseño ARNcr		
		
Promotor T7	Secuencia <i>scaffold</i>	Secuencia guía
AATACGACTCACT ATAGG	TAATTTCTACTAAGTG TAGAT	TAGTATTTTATGTG TAGTA

4.3.1.2.2. Transcripción *in vitro*

Para la síntesis del ARNcr, se llevó a cabo una transcripción *in vitro* utilizando el kit TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (#K0411 - Thermo Fisher Scientific, USA, MA). La reacción se preparó de acuerdo con el protocolo de manufactura (87) (Tabla 4). Las reacciones se incubaron a 37°C durante 4 horas.

Tabla 4. Mezcla maestra para la transcripción *in vitro*

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 reacción
5X TranscriptAid Reaction <i>buffer</i>	5X	1X	8 µl
NTPs mix	25 mM	10 mM	16 µl
TranscriptAid Enzyme Mix	10X	1X	4 µl
Agua libre de nucleasas	-		11 µl
ADN Template	100 µM	4 nM	1 µl
Total			40 µl

*NTPs: mezcla proporcional de los nucleótidos ATP, GTP, CTP y UTP.

La purificación del ARNcr se llevó a cabo utilizando el Kit RNA Clean & Concentrator (Cat #11-353B, Zymo Research) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (88). En el primer paso, se mezcló el producto transcrito con 80 µl de *buffer* RNA Binding y 120 µl de Etanol, y luego se transfirió esta mezcla a una columna de sílice. En el segundo paso, se añadieron 400 µl de *buffer* (RNA prep) a la columna. Para eliminar las secuencias no transcritas de

ADN, se agregó una solución de tratamiento con DNasa que consistía en 5 µl de Dnasa I de 1500 U (#E1011-A, Zymo Research) y 75 µl de *buffer* de Digestión a la columna, y se incubó a 25°C durante 15 minutos.

En el tercer paso, se lavó la columna dos veces con el *buffer* Wash RNA, utilizando volúmenes de 700 µl y 400 µl respectivamente, y se centrifugó durante 2 minutos. Para la elución del ARNcr, se utilizó 50 µl de agua libre de nucleasas y se incubó durante 5 minutos. Todos los pasos, se llevaron a cabo mediante un proceso de centrifugación a 12000 RPM durante un intervalo de 30 a 60 segundos. El ARNcr purificado se cuantificó realizando diluciones de 1 en 10, por triplicado, utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop One microvolume UV-Vis spectrophotometer, Thermofisher) en el modo de ARN y se almacenó a -80 °C.

4.3.1.3. ADN total de los aislados *E. coli*

4.3.1.3.1. Material Biológico

El ADN total para los ensayos de optimización de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a, se obtuvieron de aislados que cumplieron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterio de inclusión

- Aislados positivos a *bla_{CTX-M-15}*
- Aislados negativos a *bla_{CTX-M}* que contienen otros genes diferentes a la familia de genes CTX-M y otros genes de resistencia diferentes a *bla_{CTX-M-15}*
- Aislados positivos a *floR*
- Aislados negativos a *floR*: que contienen otros genes de resistencia diferentes a *floR*

Criterio de exclusión, solo aplicada para el gen *bla_{CTX-M-15}*

- Aislados que contienen los otros genes *CTX-M* (Ej. CTX-M-12)

Los aislados evaluados en este estudio provienen de una investigación longitudinal de cohorte que involucró a niños recién nacidos desde febrero de 2016 hasta junio de 2017 en “Oasis” del distrito de Villa el Salvador y que fueron evaluados hasta los dos años de edad. Se obtuvieron aislados de Enterobacterias a partir de muestras de heces (Código de SIDISI: 65178). Las colonias de *E. coli* presentes en las muestras se almacenaron en glicerol al 50% a -70 °C en los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (Laboratorio Microbiología Molecular). A partir de ello, 100 aislados de diferentes muestras (N=100) tomadas en un tiempo específico fueron secuenciadas utilizando el pipeline Abricate con la base de datos de Resfinder para determinar la presencia de *bla_{CTX-M-15}* y *floR*. El proceso de secuenciación fue realizado por un laboratorio externo, *The Broad Institute of MIT and Harvard*. Esta información, se utilizó para optimizar la técnica PCR-CRISPR-Cas12a tomando en cuenta la presencia y ausencia de los genes de resistencia.

4.3.1.3.2. Ensayos de viabilidad celular

Las placas con agar LB (Anexo 1) sin antibiótico se colocaron previamente como control de contaminación a 37°C durante 16 horas. Los aislados de *E. coli* seleccionados se sembraron en las placas con agar LB que no presentaron contaminación utilizando la técnica de siembra por agotamiento, en duplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 horas y se observó crecimiento en todas los aislados evaluados, confirmando la viabilidad celular. Para los ensayos de optimización de la PCR y CRISPR-Cas12a, se seleccionó una colonia positiva y

negativa por cada gen de resistencia. A continuación, se inoculó una colonia aislada en 10 ml de medio LB (Anexo 1) y se incubó a 37°C con agitación a 120 RPM durante 16 horas para la evaluación del crecimiento celular por triplicado.

4.3.1.3.3. Extracción de ADN total de *E. coli*

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de un cultivo de *E. coli* con un crecimiento registrado mediante absorbancia entre 0.5 y 0.7 (OD600), utilizando el kit Quick DNA Miniprep de Zymo Research (Cat # D4069, Zymo Research) (89). Para lisar las células, se centrifugó una alícuota de un mililitro de cultivo a 3000 RPM durante 1 minuto (1-14, Sigma Aldrich). El pellet obtenido se diluyó en 200 µl de *buffer* fosfato salino (PBS), al que se agregaron 200 µl del *buffer* Biofluid Cell y 20 µl de proteinasa K (Concentración inicial: 20 mg/ml). La mezcla se mezcló durante 10 segundos y se incubó a 55°C durante 10 minutos, con el objetivo de activar la proteinasa K y evitar la degradación del ADN por enzimas DNAsas.

La purificación del ADN se realizó mediante columnas de sílica. Al lisado se le añadieron 420 µl de *buffer Genomic Binding*. Para el lavado de la columna, se utilizó 400 µl de *buffer* Pre-Wash, seguido de 700 µl y 200 µl del *buffer* g-DNA Wash Buffer. Finalmente, se aplicaron 70 µl de *buffer* Elution en la columna, se dejó reposar durante 5 minutos y luego se centrifugó a 14000 RPM durante 1 minuto. Todos los pasos, excepto la elución, se realizaron mediante centrifugación a 12000 RPM durante 1 minuto con descarte de flujo. La cuantificación del ADN se realizó directamente a la elución, por triplicado, en un espectrofotómetro NanoDrop en la opción ADN y se almacenó a -20 °C.

4.3.1.4. Proteínas recombinantes: Taq Pol y Cas12a

Las proteínas Taq ADN polimerasa fueron expresadas en *E. coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido pET-28^a_6H-TAQ_E602D (90). La metodología y resultados se encuentran en el Anexo 2-4. Por otro lado, la proteína Cas12a se obtuvo de un proyecto previo. Ambas proteínas se obtuvieron siguiendo los protocolos descritos por Mendoza-Rojas et al. (91).

4.3.2. Ensayos PCR-CRISPR-Cas12a

4.3.2.1. Optimización de la PCR para la detección de los genes de resistencia antimicrobiana (*bla_{CTX-M-15}* y *floR*)

4.3.2.1.1. Evaluación de la actividad de la Taq polimerasa recombinante

Para evaluar la actividad de la Taq Polimerasa en una reacción de PCR convencional, se utilizaron los cebadores T7 (Tabla 5) en una reacción positiva y negativa. Este experimento se llevó a cabo utilizando ADN plasmídico obtenido de la cepa BL21 (pET24a EC *infC* L1).

Tabla 5. Secuencia de los cebadores T7

Type	Sequence	Tm °C
F	TAATACGACTCACTATAGG	55°C
R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

La enzima se mezcló con el *buffer* RPB4X (Anexo 3) y la mezcla de nucleótidos, añadiendo 5 µl de RPB4X y 1 µl de nucleótidos (10 mM) para lograr una concentración final de 0.5 mM. Como control de reacción se utilizó la Dream Hot

Start (Cat # K9021, ThermoFisher), que es una presentación comercial de todos los componentes necesarios para la PCR, lista para usar. Las concentraciones finales de la mezcla maestra se aplicaron en todas las reacciones de PCR (Tabla 6).

Tabla 6. Componentes de la Master Mix PCR con la Taq Polimerasa *in house*

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Taq Pol in house	Dream Taq
Dream Taq	2X	1X		10 μ l
Buffer RPB dNTP (2 mM)	5X	1X	5 μ l	-
Taq Polimerasa	20 ng/ μ l	2 ng/ μ l	2 μ l	-
Primer F	5 μ M	0.2 μ M	0.8 μ l	0.8 μ l
Primer R	5 μ M	0.2 μ M	0.8 μ l	0.8 μ l
PCR Water			9.4 μ l	6.4 μ l
ADN				2 μ l
Total			20 μ l	20 μ l

Luego de evaluar la funcionalidad de la enzima, se realizó una evaluación de la concentración de la Taq polimerasa, variando desde 1 ng/ μ l hasta 5 ng/ μ l. Además, se evaluó el tiempo de hibridación y extensión en 4 condiciones (Figura 10).

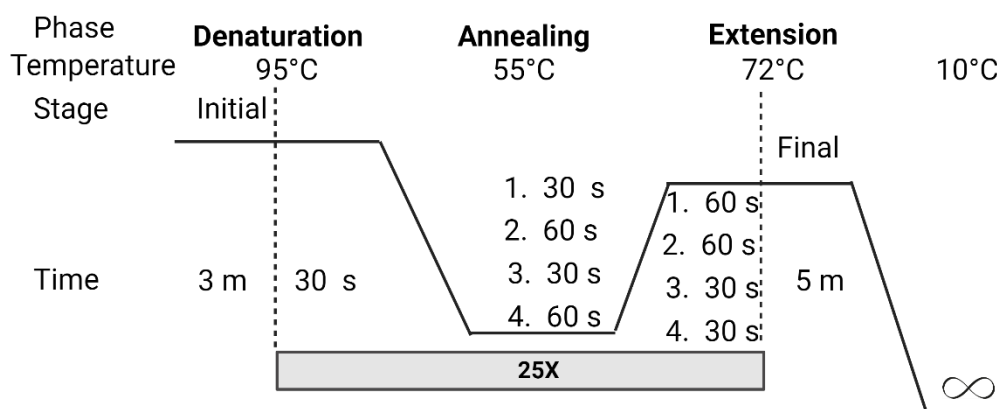


Figura 10. Condiciones de ciclado para la PCR convencional. En el tiempo de hibridación y extensión se hizo 4 variaciones de 30 segundos a 60 segundos y viceversa. Fuente: Elaboración propia

También se llevó a cabo una evaluación de la concentración del plásmido (BL21 pET24a EC infC) obtenida a partir de una cepa crio preservada del Laboratorio de Biomoléculas y se realizó una dilución decimal seriada desde una concentración máxima de 1 ng/ μ l y mínima de 10^{-5} ng/ μ l. Esto se realizó para determinar la concentración mínima de ADN necesario para la reacción de la PCR.

4.3.2.1.2. Evaluación de la curva de temperatura de hibridación

Una vez optimizada la reacción de PCR convencional con la Taq Polimerasa se evaluaron las parejas de cebadores diseñados para los genes de resistencia, en cuanto a temperatura de hibridación. Esto se hizo con la finalidad de que no se generen productos inespecíficos, debido a la inadecuada hibridación de los cebadores. Para ello, se utilizó el ADN total de un aislado positivo como control para cada gen de resistencia. La temperatura de hibridación se determinó utilizando los datos de los cebadores seleccionados en el programa *New England Biolabs* (NEB). Luego, con la función de curva de temperatura de hibridación del termociclador se colocó un gradiente considerando la temperatura obtenida del programa NEB (T-100, BioRad). Finalmente, preparó una mezcla maestra con las concentraciones finales indicadas en la Tabla 5 en un volumen de 200 μ l de reacción de PCR, con 1 ng/ μ l de ADN, dividiéndola en 6 tubos para evaluar diferentes temperaturas en volúmenes de 20 μ l, considerando el control en ausencia de ADN (NTC, del inglés *No template control*).

4.3.2.1.3. Evaluación de la curva de ADN total y número de ciclos

La curva de concentración de ADN total se realizó de manera similar a la realizada con los cebadores T7. Se realizó una dilución decimal seriada del ADN total en 6 puntos de 20 ng a 2×10^{-4} ng de ADN total. Para evaluar el número de ciclos, se utilizó una curva de ADN que abarcó de 25 a 35 ciclos para cada set de cebadores. Para esto, se preparó una mezcla maestra de 160 μ l por cada punto de la curva de ADN y se dividió en 7 tubos de PCR, cada uno con un volumen de 20 μ l, y se incluyó el control NTC.

4.3.2.1.4. Evaluación de los productos de PCR

Todos los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (Cat # CSL-AG500, Cleaver Scientific). Las condiciones del gel de agarosa fueron de 1% para los cebadores T7 (800 pb) y de 1.7% para los cebadores de los genes de resistencia (200-300 pb). Las corridas de electroforesis se realizaron con *buffer* TBE 1X a 80 V durante 1 hora. Se utilizaron 5 μ l de producto de PCR mezclados con 1 μ l de 6X Trick-Track – SYBR Gold (Cat # R1161, ThermoFisher) como *buffer* de corrida, y se incluyó un marcador de peso molecular de 100 pb (Cat # SM0242, Thermo Scientific). Luego, se tomaron fotografías en blanco y negro de los productos en los geles de agarosa utilizando un foto-documentador con la opción Sybergold (Gel Doc-BioRad). También, se evaluó la intensidad de la banda, mediante el área bajo la curva (AUC) en el programa Gel Analyzer v19.1 (92).

4.3.2.2. Optimización de la CRISPR-Cas12a para la detección de los amplicones de los genes de resistencia (*bla_{CTX-M-15}* y *floR*)

4.3.2.2.1. Evaluación de la actividad de la técnica PCRCRISPR-Cas12a

Como prueba inicial de la técnica, se llevaron a cabo cuatro reacciones de CRISPR-Cas12a para cada set de cebadores. La PCR se realizó utilizando una concentración de ADN de 1 ng/ μ l de los aislados seleccionados como positivos y negativos. El proceso experimental constó de cinco pasos (Figura 11). En el primer paso, se prepararon los *buffers* CRB1 y CRB2 siguiendo las instrucciones del Anexo 5 durante la incubación del ARNcr. En el segundo paso, se formó e incubó el complejo Cas12a-ARNcr (Anexo 5). En el tercer paso, se configuró el lector de fluorescencia Sinergy H1 (Biotek) mientras se aguardaba la incubación del complejo Cas12a. En el cuarto paso, se mezcló el *buffer* CRB2 con las muestras de PCR, incluyendo el producto de NTC-PCR. En el quinto paso, se combinó el complejo Cas12a con la solución preparada en el paso anterior en una placa de 96 pozos negra (Cat #23710, ThermoFisher). Finalmente, la placa se colocó en el lector de fluorescencia (Sinergy H1, BioTek Instruments) que contiene los parámetros de emisión y excitación de la sonda FAM (491 nm y 525 nm) y la fluorescencia se midió en intervalos de 1 minuto con un tiempo total de 2 horas, resultando en 120 mediciones a lo largo de la reacción.

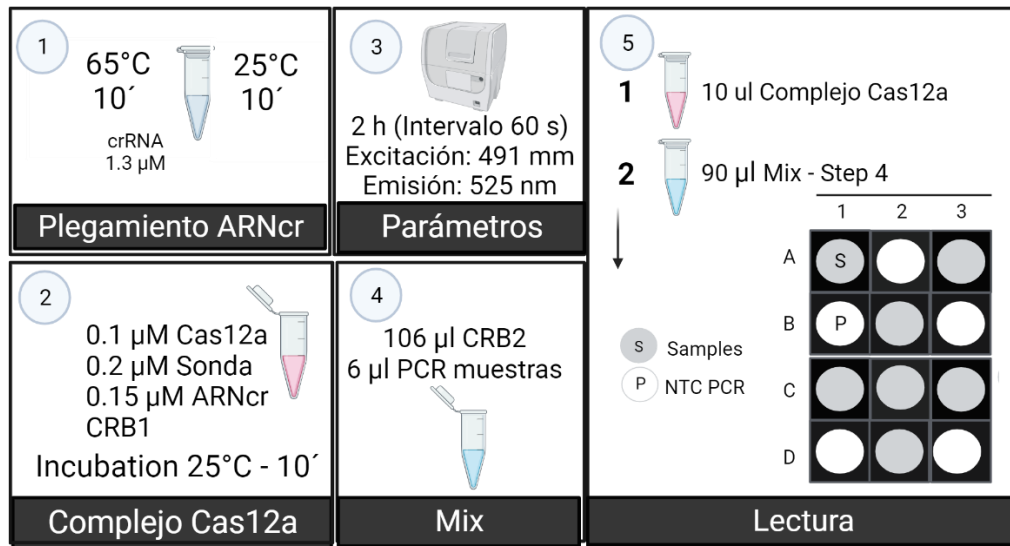


Figura 11. Flujo experimental de la reacción de CRISPR-Cas12a.

Descripción general en 5 pasos para la reacción de PCR-CRISPR-Cas12a. Los *buffers* CRB1 y CRB2 se describen en el Anexo 5.

Fuente: Elaboración propia

4.3.2.2.2. Evaluación en función de ADN total en reacción

Para ello, se realizó una curva de 6 puntos del ADN total utilizando una dilución seriada decimal en el rango de 20 ng a 2×10^{-4} ng. Todos los puntos de la curva fueron amplificados con 30 ciclos y evaluados en la técnica PCR-CRISPR-Cas12a bajo las condiciones descritas en el flujo experimental (Figura 11).

4.3.2.2.3. Evaluación de la curva de concentración de $MgCl_2$

El $MgCl_2$ cumple un rol importante en la detección por CRISPR-Cas12a, por ello se realizó una curva de concentración de magnesio que abarcó desde 7.5 mM hasta 25 mM (Anexo 5). En la curva de magnesio se evaluaron los productos de PCR, con una concentración de ADN genómico de 2 ng/ μ l y 30 ciclos de amplificación y en con los pasos de la reacción CRISPR-Cas12a descritas en la figura 11.

4.3.2.2.4. Evaluación cuantitativa y cualitativa de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a

Para la evaluación cuantitativa, se registró la fluorescencia cruda de cada pocillo evaluado a lo largo del tiempo y se calculó la razón de fluorescencia, que se define como la división entre los valores de fluorescencia cruda de la muestra positiva y los valores de fluorescencia cruda del control negativo (NTC) representada como razón: M/NTC. Para la evaluación cualitativa, cada reacción CRISPR-Cas fue transferida a tubos de 0.5 ml, y se expusieron a un transiluminador de luz azul (Safe View, Cleaver Scientific). Los tubos fueron fotografiados en color utilizando una cámara de 28 mm y 12 megapíxeles de un celular iPhone 7 (93).

4.3.2.2.5. Punto de Corte

Después de optimizar la técnica PCR-CRISPR-Cas12a, se evaluaron 10 aislados negativos para determinar el punto de corte de la razón de la fluorescencia (proporción entre la muestra y NTC) como marcador de clasificación entre muestras positivas y negativas a los genes de resistencia. Para calcular el punto de corte (PC) se consideró el promedio más tres desviaciones estándar del promedio de la razón obtenido de 10 muestras negativas ($PC = \text{promedio}_{10 \text{ mx-neg}} + 3 \text{ SD}$) (Figura 12) (23,94).

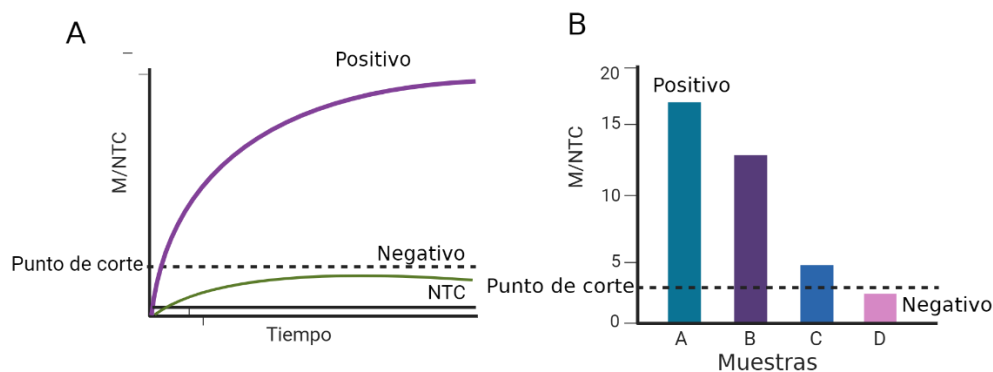


Figura 12. Punto de corte de fluorescencia para la detección de genes de resistencia mediante PCR-CRISPR-Cas12a.

A) Gráfica ilustrativa del punto de corte durante la actividad nucleasa de Cas12a en el tiempo. B) Aplicación del punto de corte en la razón de fluorescencia.

Fuente: Elaboración propia

4.3.3. Evaluación del desempeño de detección de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a

4.3.3.1. Límite de detección

4.3.3.1.1. Purificación de productos PCR

Para la determinación del límite de detección (LoD), se prepararon productos de PCR purificados para cada gen, de modo que se pudiese expresar en molaridad la cantidad de blanco a detectar. Para ello, se llevó a cabo una amplificación inicial de cada blanco utilizando una polimerasa comercial, y el producto resultante se purificó. Luego, se realizó una curva de concentración y se llevó a cabo la amplificación utilizando la Taq polimerasa producida en este estudio.

El ADN extraído de los aislados para la optimización de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a, por cada gen de resistencia, se utilizó para la determinación del límite de detección. Para ello, se llevó a cabo una reacción de PCR de 100 μ l utilizando una Taq Polimerasa comercial (Dream Taq Hot Start 2X) con una concentración de 0.5 μ M de cebadores y ADN a 40 ng/ μ l. Para la purificación de los productos de PCR,

se utilizó el Kit Oligo Clean de Zymo Research (Cat # D4060, Zymo Research) (95). Siguiendo el protocolo, se mezclaron 100 µl de producto de PCR con 200 µl de Oligo Binding y 800 µl de etanol. La mezcla se dividió en dos fracciones en la columna. Para el lavado de la columna, se añadieron 750 µl de *buffer* Wash. Para la elución, se agregaron 15 µl de agua y se esperó durante 15 minutos. Todos los pasos de centrifugación se realizaron a 14000 RPM durante 30 segundos, descartando el flujo en cada paso, excepto durante la elución. Para los pasos de lavado, se centrifugó la columna al vacío. La cuantificación se realizó a la dilución de 1 en 10 por triplicado en un espectrofotómetro NanoDrop utilizando la opción ADN, y se consideró el tamaño del amplicón para determinar la concentración molar.

4.3.3.1.2. Determinación del Límite de detección

Para determinar el límite de detección, primero se determinó el Límite del Blanco (LoB). Para ello, el ADN de los aislados negativos fueron evaluados en la técnica PCR-CRISPR-Cas12a, en las condiciones previamente optimizadas y se aplicó la fórmula del LoB (96):

$$LoB = mean_{NEC} + 1.645 (SD_{NEC})$$

Donde, SD es la desviación estándar de las muestras negativas (NEC)

Luego, se realizaron diluciones decimales seriadas del producto purificado desde 10 nM hasta 1 aM, resultando en 10 puntos de dilución que se evaluaron en la técnica PCR-CRISPR-Cas12a. Para el cálculo de la señal correspondiente al LOD se utilizó la fórmula (104):

$$LoD = LoB + 1.645 (SD_{low\ concentration\ sample})$$

Donde, SD es la desviación estándar de la concentración del analito de menor concentración cuya señal se diferencia del control NTC.

Finalmente, se graficaron todos los puntos de la curva de concentración en un gráfico de dos ejes en el programa GraphPad con el modelo Curva sigmoideal estándar (4PL). De esta manera, se calculó la fórmula de la línea de tendencia y se calculó la concentración correspondiente al valor obtenido en la fórmula previa.

4.3.3.2. Concordancia de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a con los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

4.3.3.2.1. Preparación de las muestras

Los aislados *E. coli* y la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 que se utiliza según las pautas establecidas por el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (97,98). La cepa *E. coli* ATCC 25922 liofilizada (Cat # 0335, Lab Elite), contenida en un hisopo de inoculación, y los aislados *E. coli* ETEC fueron sembrados por agotamiento en placas de agar LB e incubada durante 16 horas a 37°C. De las colonias aisladas previamente, se seleccionaron 4 colonias únicas y se sembraron en cuatro cuadrantes en Mueller-Hinton Agar a 37°C a 16 horas. Por cada muestra, se eligió un cuadrante para la evaluación mediante la técnica PCR-CRISPR-Cas12a y se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para la evaluación de la concordancia (Figura 13). La extracción de ADN siguió el mismo protocolo descrito anteriormente y se aplicó solo aislados *E. coli* ETEC (Sección 4.3.1.3.3.). Todas las suspensiones preparadas para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana tuvieron una densidad de 0.5 *McFarland* (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

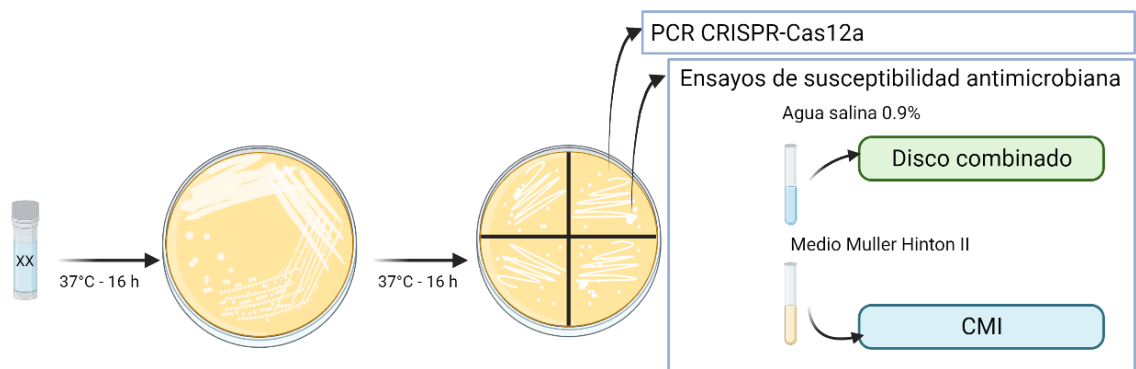


Figura 13. Diseño de siembra de placas.

Para los ensayos de la concordancia de CRISPR-Cas12a con pruebas de susceptibilidad se seleccionó una colonia por cada aislado a evaluar.

Fuente: Elaboración propia

4.3.3.2.2. Método de difusión en disco para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana para los aislados que contienen el gen *bla_{CTX-M-15}*

Para determinar la producción de betalactamasas se evaluó mediante el método de difusión en disco con la prueba de disco combinado aplicando la técnica de Kirby Bauer. Para ello, se sembraron los aislados suspendidos en agua salina al 0.9% en la placa de Agar Mueller Hinton utilizando un hisopo (106) (Figura 14A). Los discos de antibióticos cefotaxima CTX 30 μg (Cat # 9017, Liofilchem, Italia), ceftazidima CAZ 30 μg (Cat # 9019, Liofilchem, Italia), y en combinación con ácido clavulánico: CTX/AC 40 μg (Cat # 9182, Liofilchem, Italia), y CAZ/AC 40 μg (Cat # 9145, Liofilchem, Italia), se colocaron en la placa de Mueller Hinton Agar previamente sembrada (Figura 14B). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 16 horas en una incubadora (Hotspack, USA).

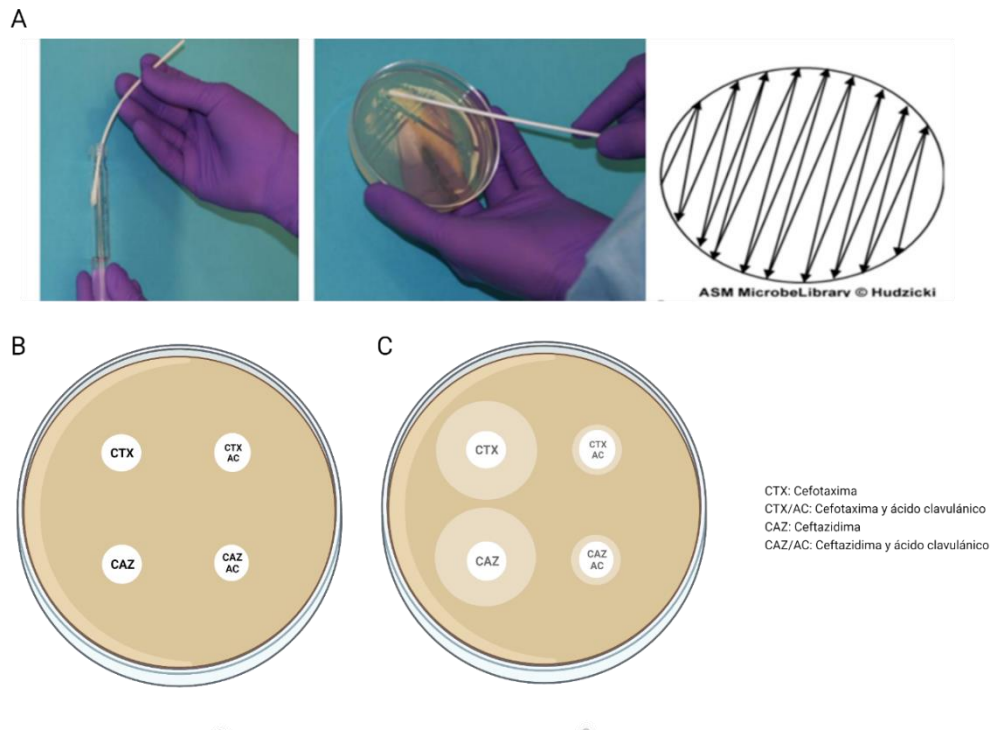


Figura 14. Esquema del método de difusión en disco.

A) Siembra por hisopado con el método de Kirby Bauer. **B)** Ubicación de los antibióticos en la placa. **C)** Resultado esperado del diámetro de inhibición de crecimiento de un aislado productor de betalactamasas (>5 mm)

Fuente: Elaboración propia.

Los aislados se evaluaron en base a la diferencia de diámetro de inhibición entre cada antibiótico (CTX y CAZ) en ausencia y presencia del ácido clavulánico. Si la diferencia era mayor o igual a 5 mm, se consideraban como resistentes (R) o productoras de enzimas BLEE. En caso contrario, si la diferencia era menor a 5 mm, se consideraron no productor de BLEE o sensibles (S) (98). El resultado esperado para una cepa productora de enzimas de enzimas BLEE con una diferencia a mayor a 5 mm se muestra en la Figura 14C.

4.3.3.2.3. Método de micro dilución para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana en los aislados que contienen el gen *floR*

Para determinar la concentración mínima inhibitoria se usó el método de microdilución utilizando la técnica de dilución en microplaca (99). El antibiótico florfenicol (Cat #F1427-500MG, Merck) se preparó en una concentración de 100 mg/ml en DMSO. Se realizaron diluciones para obtener una concentración de 1.024 µg/ml, cuatro veces la concentración alta de la CMI. En una placa de 96 pozos (Cat # 3596, ThermoFisher, EEUU), se agregó el medio Mueller-Hinton II en todas las filas excepto en la última, donde se colocaron controles positivos y negativos (Figura 15A). En la primera columna se colocaron 100 µl de florfenicol (1.024 µg/ml) y se realizaron diluciones seriadas hasta la columna 12 (Figura 15B). En cada fila se añadieron 100 µl de inóculos de *E. coli* suspendidos en Mueller-Hinton II a una densidad de 0.5 McFarland. Los pozos de la placa contuvieron tanto el inóculo como el antibiótico (Figura 15C). En la última fila se colocaron 200 µl de muestra de bacteria de cada aislado evaluado sin antibiótico como control positivo en las columnas 1 a 6, y 200 µl de Mueller Hinton II con un 0.05% de DMSO como control negativo en las columnas 7 a 12. La placa se incubó durante 16 horas a 37°C con movimiento orbital, y se realizó una lectura de absorbancia a 600 nm en el equipo de lector de microplacas (Sinergy H1, BioTek Instruments).

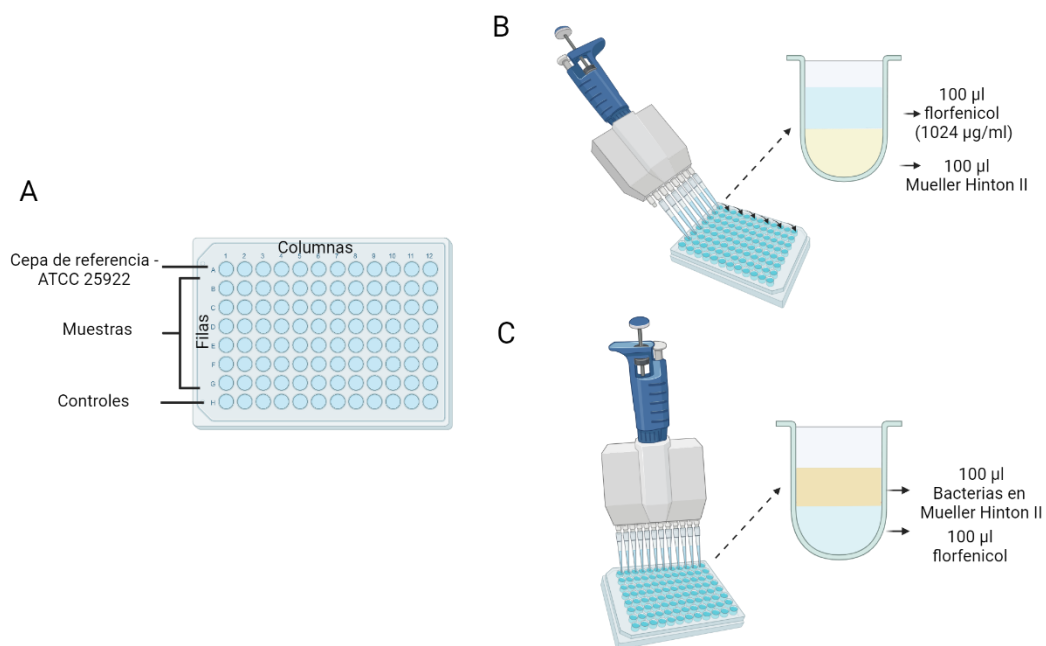


Figura 15. Esquema del método de micro dilución para la determinación de La CMI.

A) Distribución de las muestras para la determinación de la CMI en la placa de 96 pozos. **B)** Dilución del antibiótico florfenicol. **C)** Evaluación de los aislados. Fuente: Elaboración propia

El crecimiento bacteriano se registró mediante la evaluación de los valores de absorbancia a 600 nm en un lector de absorbancia (Sinergy H1, BioTek Instruments). La absorbancia fue registrada cada 10 minutos por un intervalo de 16 horas. De esta manera, se compararon las curvas de crecimiento de las cepas de referencia con los aislados positivos y negativos. Para determinar la CMI, se consideró la turbidez del pocillo. Para determinar la susceptibilidad a florfenicol se evaluó el crecimiento bacteriano en presencia de 32 µg/ml de florfenicol, de acuerdo a lo sugerido por Singer *et al.* 2004 (14). Esta concentración se ha reportado como punto de corte para determinar resistencia fenotípica a florfenicol.

4.3.3.2.4. Evaluación de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a para la concordancia con pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Para la detección de los genes de resistencia mediante la técnica PCR-CRISPR-Cas12a, se analizaron 17 cepas independientes para cada gen evaluado. La extracción se realizó como se describo previamente.

4.4. Tamaño de muestra (aislados de *E. coli*)

Para evaluar la concordancia entre los resultados de la PCR-CRISPR-Cas12a y las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, se utilizó la fórmula propuesta por Donner para calcular el tamaño de la muestra (100).

$$N = \lambda(1, 1 - \beta, \alpha) \left\{ \frac{[\pi(1 - \pi)(K_1 - K_0)]^2}{\pi^2 + \pi(1 - \pi)K_0} + \frac{2[\pi(1 - \pi)(K_1 - K_0)]^2}{\pi(1 - \pi)(1 - K_0)} + \frac{[\pi(1 - \pi)(K_1 - K_0)]^2}{(1 - \pi)^2 + \pi(1 - \pi)K_0} \right\}^{-1}$$

Donde:

λ = el parámetro de no centralidad denotado

α = nivel de significancia

β = la potencia o la probabilidad acumulada

$\lambda(1, 1 - \beta, \alpha)$ = grados de libertad

π = prevalencia

K_1 = concordancia de la hipótesis alterna o del investigador

K_0 = concordancia de la hipótesis nula

Para ambos genes, se planteó la siguiente hipótesis: la hipótesis nula (H0) establece que no hay concordancia entre la prueba de disco combinado o microdilución y la

PCR-CRISPR-Cas12a, mientras que la hipótesis alternativa (Ha) supone una concordancia del 70% medida mediante el coeficiente Kappa.

H0=No hay concordancia entre los resultados de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana y PCR-CRISPR-Cas12a ($K_1=0$)

Ha=Existe concordancia significativa de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana y PCR-CRISPR-Cas12a ($K_2=0.7$)

La fórmula se aplicó para ambos genes:

$$\begin{aligned}
 & \text{bla}_{CTX-M-15}: \\
 & 17 = \lambda(1,1 - \beta, \alpha) \left\{ \frac{[0.1(1 - 0.1)(0.7 - 0)]^2}{0.1^2 + 0.1(1 - 0.1)0} + \frac{2[0.1(0.7 - 0.1)(0.7 - 0)]^2}{0.1(1 - 0.1)(1 - 0)} \right. \\
 & \quad \left. + \frac{[0.1(1 - 0.1)(0.7 - 0)]^2}{(1 - 0.1)^2 + 0.1(1 - 0.1)0} \right\}^{-1} \\
 & \text{floR}: \\
 & 17 = \lambda(1,1 - \beta, \alpha) \left\{ \frac{[0.5(1 - 0.5)(0.7 - 0)]^2}{0.5^2 + 0.5(1 - 0.5)0} + \frac{2[0.5(0.7 - 0.5)(0.7 - 0)]^2}{0.5(1 - 0.5)(1 - 0)} \right. \\
 & \quad \left. + \frac{[0.5(1 - 0.5)(0.7 - 0)]^2}{(1 - 0.5)^2 + 0.5(1 - 0.5)0} \right\}^{-1}
 \end{aligned}$$

Luego de realizar los cálculos, el tamaño de muestra para cada gen de resistencia es de 17. La selección de la muestra se realizó de manera aleatoria. Para el gen *floR*, se obtuvieron 11 aislados positivos y 6 aislados negativos. En cuanto al gen *bla*_{CTX-M-15}, no fue posible aplicar la aleatoriedad debido a que todas las muestras secuenciadas presentaban otros genes de la familia *CTX-M*, lo cual incumplía con el criterio de exclusión. Por lo tanto, se contó con 9 aislados positivos de las 100 cepas secuenciadas y se obtuvieron 8 aislados negativos de otro estudio.

4.5. Consideraciones éticas

El estudio se llevó a cabo después de haber sido evaluado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código de SIDISI: 209511). Los aislados provienen de muestras obtenidas de sujetos que participaron en el estudio titulado "La infección natural de norovirus y sapovirus en una cohorte de nacimiento en una comunidad periurbana del Perú" (Con revisión por comité de Ética con código de SIDISI: 65178). Dichas muestras son anónimas y están identificadas únicamente mediante códigos alfanuméricos.

4.6. Análisis estadístico

Para analizar los datos de la fluorescencia (PCR-CRISPR-Cas12a) para ambos genes de resistencia se utilizó el programa Gen 5, del lector de microplacas Sinergy H1, un software que exporta los datos a Excel (101). Luego, la información se procesó y analizó en el programa GraphPad Prism versión 9 para Windows (102). Para operaciones básicas como promedio, razón de fluorescencia y aleatoriedad, se empleó Microsoft Excel. Para determinar el Límite de detección (LoD), se aplicaron fórmulas en el programa Microsoft Excel y Graphpad, donde también se aplicó la función de interpolación.

Para determinar la concordancia entre los resultados obtenidos de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana (difusión en disco para *bla_{CTX-M-15}* y CMI para *flor*) y la técnica PCR-CRISPR-Cas12a, los datos se normalizaron el programa GraphPad Prism versión 9. Asimismo, se estimó el estadístico de kappa ponderado de Cohen y su significancia mediante el valor p, considerando un nivel de significancia (alfa) de 0.05, utilizando el programa STATASE (versión 17) (103). El análisis de concordancia se hizo utilizando el índice kappa de Cohen. Se

considera "aceptable" si el valor de "k" es mayor o igual a 0.40 y "excelente" si es superior a 0.75. Para la estimación del intervalo de confianza (IC) al 95% se aplicó las fórmulas descritas por David J. Sheskin (104). Para ello, se tomó en cuenta el error estándar calculado por el programa Stata y se aplicó la siguiente fórmula.

$$IC (95\%) = \kappa \pm Z_{\alpha/2} \times SE(\kappa)$$

Donde, k: estimado de kappa

$Z_{\alpha/2}$: 1.96

SE (k): Error estándar del estimado de kappa

V. RESULTADOS

5.1. Componentes moleculares obtenidos de la fase preparativa

5.1.1. Cebadores

En total, se descargaron 61 secuencias de *bla_{CTX-M-15}* y 46 secuencias de *floR* depositadas en el GenBank ([Link Drive- Anexo 6](#)). Todas las secuencias fueron reportadas para aislados de *E. coli*. Las secuencias obtenidas tenían longitudes de 1057 pb para *bla_{CTX-M-15}* y 1415 pb para *floR*.

Para *bla_{CTX-M-15}* se utilizó un conjunto de cebadores del programa Chop Chop que abarcaba una región diferente al conjunto de referencia. Los diseños de cebadores del programa Primer Design-M se descartaron debido a su superposición con los sets de cebadores de Ramdan *et al.* (3). En cambio, para el gen *floR* se empleó exclusivamente el conjunto de cebadores diseñados por Qian *et al.* (65), ya que los otros conjuntos abarcaban la misma región de amplificación (Tabla 7).

Tabla 7. Conjunto de cebadores para los genes de resistencia *bla_{CTX-M-15}* y *floR*

Gen	N ^o	T	Secuencia	Tamaño	T°
<i>bla_{CTX-M-15}</i>	1	F	GCAAAAACCTTGCCGAATTAGAG	241 pb	56° C
		R	CTTTTCCGCAATCGGATTATAG		
	2	F	GCGCTACAGTACAGCGATAA	216 pb	50° C
		R	TTTACCCAGCGTCAGATTCC		
<i>floR</i>	1	F	GCGCAACGGCTTTCGTCATT	270 pb	58° C
		R	GCATCGCCAGTATAGCCAAA		

5.1.2. ARNcr

5.1.2.1. Evaluación de los diseños de la secuencia guía del ARNcr

A partir del análisis bioinformático de las secuencias consenso se obtuvieron cinco candidatos para *bla_{CTX-M-15}* y 4 candidatos para *floR* que cumplieron con los criterios de selección con el programa CRISRSscan y Chop-Chop. Además, ninguno estuvo cerca de las regiones de los cebadores. La elección final se basó en los resultados del modelamiento de los candidatos en el programa Chop-Chop *RNAfold*, donde se seleccionaron 2 candidatos por cada gen de resistencia (Tabla 8) resaltados en amarillo). Los candidatos seleccionados fueron los que obtuvieron los valores de ΔG más bajos. Para las secuencias seleccionadas se obtuvieron valores de ΔG de -2.67 y -7.14 para *bla_{CTX-M-15}*, y de -3.76 y -4.5 para *floR* en las temperaturas de 25°C y 30°C.

Tabla 8. Candidatos de secuencia guía del ARNcr de los genes de resistencia *bla_{CTX-M-15}* y *floR*. La abreviación R, se refiere a Ranking / AC: Autocomplementariedad / GC: Guanina y Citosina.

Secuencias		Tamaño (pb)	Programas				
Gen	Candidatos de la secuencia guía del ARNcr		Chop Chop			RNAfold	
			R	AC	%GC	25°C	30°C
<i>bla_{CTX-M-15}</i>	ACAGATTCGGTTCGCTTTCACCTT	23	4	No	42	-3.50	-2.67
	TCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGA	23	7	No	54	-7.85	-7.15
	GTCTCCCAGCTGTCGGGCGAACG	23	1	No	71	-7.14	-6.37
	ACGTCGGCTCGGTACGGTTCGAGA	23	3	No	67	-8.95	-8.11
	CGCCATTGCCCGAGGTGAAGTGGT	24	4	No	62	-8.37	-7.51
<i>floR</i>	AGTTCGGTGCTGGCGTTCGTGCC	23	1	No	62	-7.66	-6.84
	CGTCTACTTCAAGCAGTGGGCG	22	2	No	62	-9.86	-9.05

	TGCCAACCGTCCTGAGGGTGTCG	23	4	No	62	-4.5	-3.76
	TCGCTTCCGTCTACTTCAAGCA	23	5	No	50	-4.45	-3.88

A los candidatos de la secuencia guía se le agrego el promotor T7 y la secuencia *scaffold* al extremo 5 prima (Tabla 9).

Tabla 9. Constructos para la producción de ARNcr para los genes de resistencia

Gen	N°	Promotor T7 + scaffold sequence + secuencia guía
<i>bla_{CTX-M-15}</i>	C1	TAATACGACTCACTATAGG TAATTTCTACTAAGTGTAGAT ACAGATTCGGTTCGCTTTCCTT
	C2	TAATACGACTCACTATAGG TAATTTCTACTAAGTGTAGAT GTCTCCCAGCTGTCGGGCGAACG
<i>floR</i>	F1	TAATACGACTCACTATAGG TAATTTCTACTAAGTGTAGATT GCCAACCGTCCTGAGGGTGTCG
	F2	TAATACGACTCACTATAGG TAATTTCTACTAAGTGTAGATT CGCTTTCGTCTACTTCAAGCA

Finalmente, para cada set de cebadores para *bla_{CTX-M-15}* se diseñó un ARNcr; y para el set de cebadores para *floR* se diseñaron dos ARNcr. Las posiciones de los cebadores y ARNcr por cada gen de resistencia, se detallan en la Figura 16.

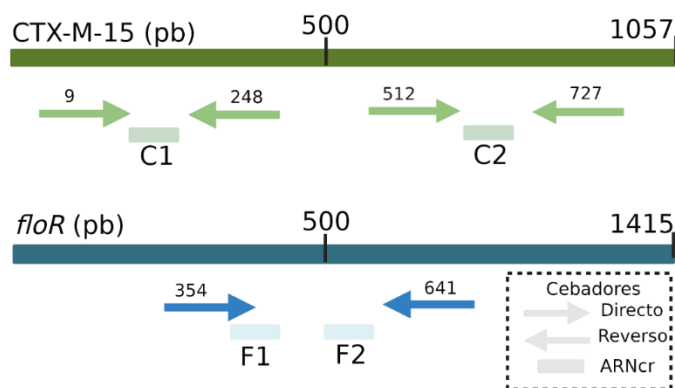


Figura 16. Ubicación de los cebadores y ARNcr para los genes de resistencia. El gen *bla_{CTX-M-15}* tiene un tamaño de 1057 pb y el gen *floR* tiene un tamaño de 1415 pb. Los números encima de los cebadores indican su ubicación dentro de la región de los genes. Se ha proporcionado los nombres pertinentes encima de los ARNcr utilizados en el estudio.

Fuente: Elaboración propia

5.1.2.2. Producción del ARNcr

A partir de las reacciones de transcripción se obtuvo una concentración mínima de 35.5 μM y una máxima de 109.8 μM (Tabla 10). Las razones 260/280 y 260/230 obtenidos por espectrofotometría a 260 nm estuvieron en los valores aceptables de pureza en el rango entre 2.0 a 2.1 y 2.4 a 2.6, respectivamente

Tabla 10. Concentración de los diseños de ARNcr por cada gen de resistencia

Diseños de ARNcr	N° Eluciones	N° Lecturas (ng/ μl)			Promedio (ng/ μl)	Promedio (μM)
		1	2	3		
<i>bla_{CTX-M-15}</i> (1)	1	82.3	82.7	82.6	82.5	55.09
	2	53.1	53.2	53.2	53.2	35.48
<i>bla_{CTX-M-15}</i> (2)	1	79.8	79.9	81.2	80.3	53.6
	2	48.6	48.3	48.1	48.3	32.27
<i>floR</i> (1)	1	167.8	162.9	162.9	164.5	109.83
	2	97.7	98.1	98.2	98.0	65.41
<i>floR</i> (2)	1	146.2	146.3	146.6	146.4	97.69
	2	77	79	78	78.0	59.58

5.1.3. ADN total de los aislados *E. coli*

5.1.3.1. Crecimiento de los aislados *E. coli*

No se observaron diferencias considerables en las curvas de crecimiento de los aislados utilizados para la optimización de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a, tanto para los aislamientos que portaban el gen *bla_{CTX-M-15}* como para los que portaban el gen *floR*. Además, se determinó que, en 3 horas, como máximo, se llegaba al OD 600 nm de 0.5 y 0.7 para la ejecución del protocolo de extracción de ADN de los aislados. El crecimiento fue registrado durante un período aproximado de 16 horas, y a partir de las 8 horas de incubación, las curvas de crecimiento registradas fueron bastante similares (Figura 17).

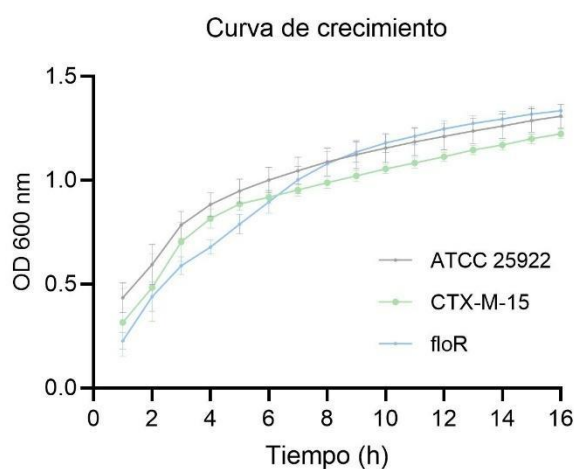


Figura 17. Curva de crecimiento de *E. coli* ATCC-25922 y *E. coli* portadora de los genes de resistencia *bla_{CTX-M-15}* y *floR* (ETEC 3545). Las bacterias fueron cultivadas a 37°C con una velocidad de agitación de 150 rpm durante un período de 16 horas. Los datos presentados representan el promedio de cinco repeticiones y se muestran con barras de error para indicar la variabilidad experimental.

5.1.3.2. Extracción de ADN

Se obtuvo una concentración promedio de ADN total de 15 a 160 ng/μl con una razón promedio 260/280 de 1.9 ± 0.3 y 260/230 de 1.8 ± 0.2 , a partir de cultivos con tres horas de incubación a 37°C.

5.2. Optimización de la PCR

5.2.1. Optimización de la PCR con los cebadores T7

La concentración de la Taq Polimerasa, se evaluó mediante una titulación de 5 puntos en un rango de 1 a 5 ng/μl. Se observó amplificación a partir de 1 ng/μl (Figura 18A). Además, se realizaron pruebas con concentraciones inferiores a 1 ng/μl, pero no se observaron productos de amplificación. Finalmente, las condiciones seleccionadas fueron la fase de: Desnaturalización inicial por 3 minutos a 95°C, y luego para cada ciclo, desnaturalización de 30 segundos, fase de hibridación 55°C por 30 segundos, fase de extensión y final por 30 segundos y 5 minutos a 72°C, las cuales resultaron ser similares a las condiciones de amplificación de la Dream Taq Hot Start (Figura 18B). La Taq Polimerasa producida localmente (*in house*) también mostró capacidad de amplificación a partir de 25 ciclos y funcionó en una reacción de PCR con una concentración de 10^{-5} ng/μl de ADN plasmídico (BL21 pET24a EC *infC*) (Figura 18C).

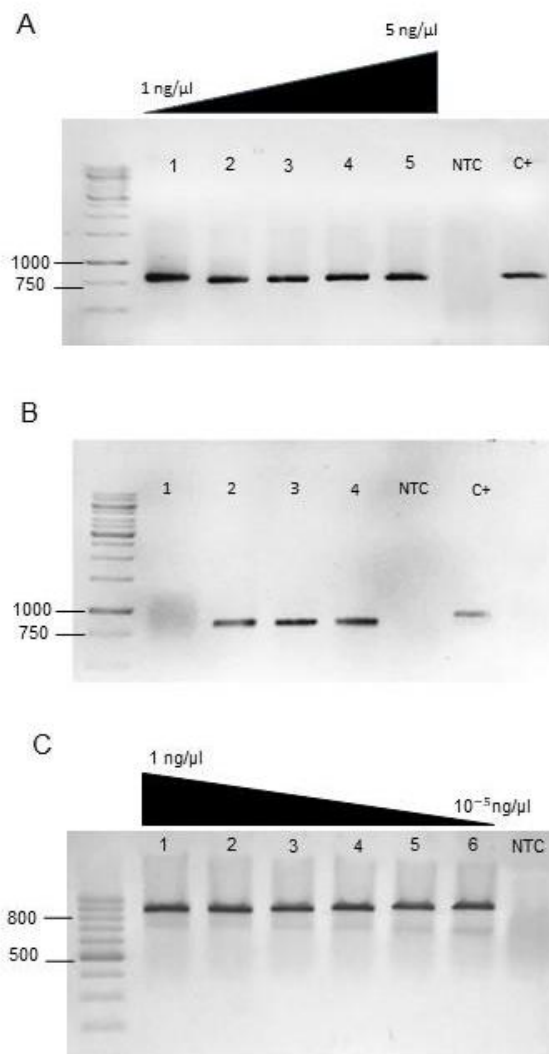


Figura 18. Optimización de la Taq Polimerasa con los cebadores T7.

A) Curva de concentración de la Taq Polimerasa en rangos de 1 ng/μl hasta 5 ng/μl. Los números indican la concentración de la proteína Taq Polimerasa utilizada en cada punto. **B)** Evaluación del tiempo de hibridación y extensión. Los números representan las cuatro condiciones evaluadas para los tiempos de hibridación y extensión. **C)** Curva de dilución del ADN plasmídico mediante diluciones decimales a partir de una concentración inicial de 1 ng/μl. La concentración de ADN plasmídico utilizada en las Figuras A y B fue de 50 ng/μl, mientras que la concentración de la enzima en el control NTC fue de 2 ng/μl. Se utilizó la enzima Dream Taq Hot Start como control positivo para evaluar la actividad enzimática. Todos los ensayos de la PCR fueron de 25 ciclos.

5.2.2. Optimización de la PCR de los cebadores para los genes de resistencia

Los sets de cebadores se evaluaron en una curva de temperatura de hibridación que abarcó desde 50°C hasta 59°C, utilizando las temperaturas específicas reportadas por cada pareja de cebadores. La cantidad total ADN para la optimización de la concentración de cebadores fue de 10 ng. Cualquier punto de la curva pudo ser elegido, ya que las bandas observadas son únicas para cada temperatura (Figuras 19A-C). Por lo tanto, se eligió una temperatura de 59°C debido a que implicaba un menor tiempo de ciclado.

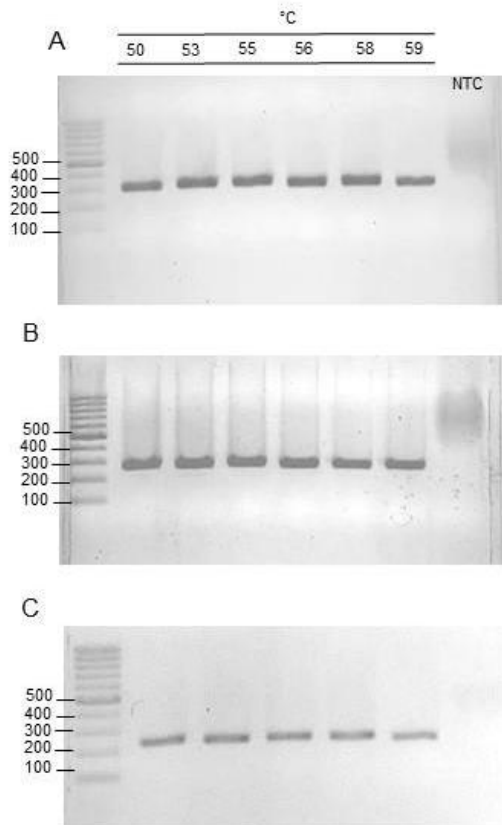


Figura 19. Evaluación de la temperatura de hibridación del set de cebadores **A)** *floR_Qian*, **B)** *CTX_PE* (este estudio) y **C)** *CTX_Ramadan*.

Posteriormente, se realizó una curva de ADN total para cada gen de resistencia en un rango de 20 a 35 ciclos (Figura 20-21). Se observó amplificación con los

cebadores específicos para *floR* utilizando concentraciones tan bajas de ADN total como 0.2 ng en un pcr de 20 y 25 ciclos. Mientras que, con 30 ciclos, 0.002 ng y 35 ciclos, 2×10^{-4} ng de ADN total (Figura 20A-D).

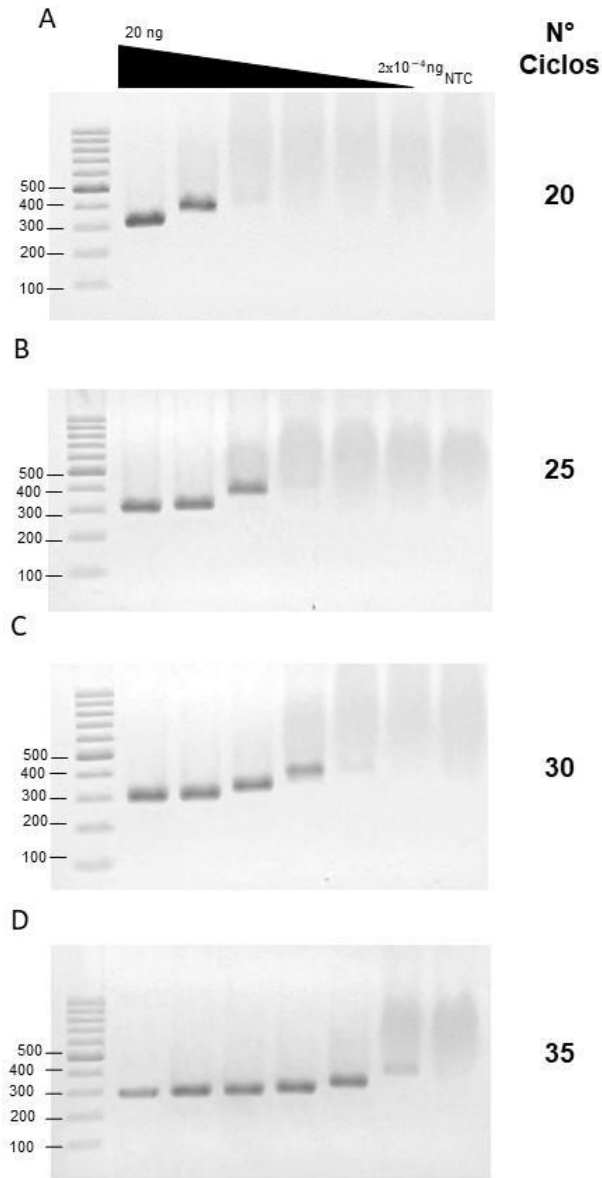


Figura 20. Evaluación de la PCR en función de ADN total y ciclos de amplificación para el gen *floR*.

Los cebadores empleados son los reportados por Qian *et al.* (74) **A)** 20 ciclos, **B)** 25 ciclos, **C)** 30 ciclos, **D)** 35 ciclos. Se realizó una dilución decimal seriada desde 20 ng hasta 2×10^{-4} ng. Se observó una diferencia en el tamaño de las últimas bandas, con un aparente mayor tamaño (105).

En el caso de *bla_{CTX-M-15}*, se observó diferencia en la intensidad de la banda de ADN amplificado a partir de 0.2 ng de ADN total desde los 25 ciclos de amplificación para la pareja de cebadores “CTX_Ramadan” (Figura 21A-D). Por otro lado, al comparar las parejas de cebadores para “CTX_Ramadan” y “*floR_Qian*” se observó que amplificaron las mismas concentraciones de ADN con intensidad de bandas similares en cada ciclo evaluado (Figura 20-22). Para lograr una mayor sensibilidad en la PCR, se seleccionaron 30 ciclos, lo que permite amplificar hasta 0.02 ng de ADN total, equivalente a 20 pg para *bla_{CTX-M-15}* y 2 pg para *floR* (Figura 20C, 21E, 21F).

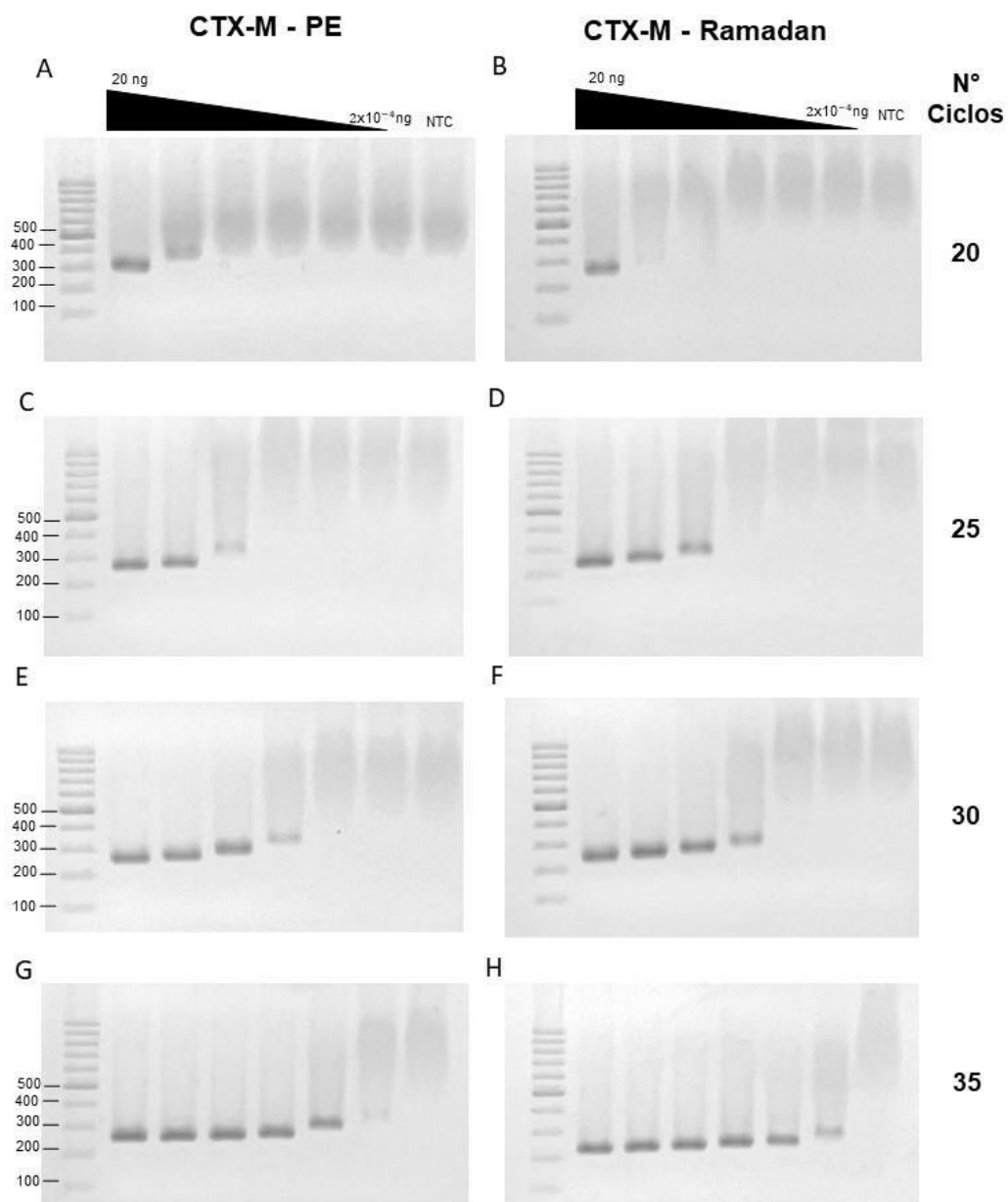


Figura 21. Evaluación de la PCR en función de ADN total y ciclos de amplificación para el gen *bla_{CTX-M-15}* .

El PCR se realizó con cebadores de PE y Ramadan **A-B)** 20 ciclos, **C-D)** 25 ciclos, **E-F)** 30 ciclos y **G-H)** 35 ciclos. Se realizó una dilución decimal seriada desde 20 ng hasta 2×10^{-4} ng.

Finalmente, se comparó la Taq polimerasa *in house* con una Taq polimerasa comercial (DreamTaq Green Master Mix 2X). Se evaluaron diferentes

concentraciones de ADN blanco en una amplificación de 30 ciclos. Se observó amplificación a partir de 2 pg (2×10^{-3} ng) de ADN total para la Taq comercial en comparación a 20 pg (2×10^{-2} ng) de ADN total para la Taq Pol *in house* producida en el laboratorio (Figura 22). Aun así, con el objetivo de optimizar los tiempos, se mantuvo el ciclo seleccionado de 30 para la PCR convencional utilizada en la tecnología CRISPR-Cas12a.

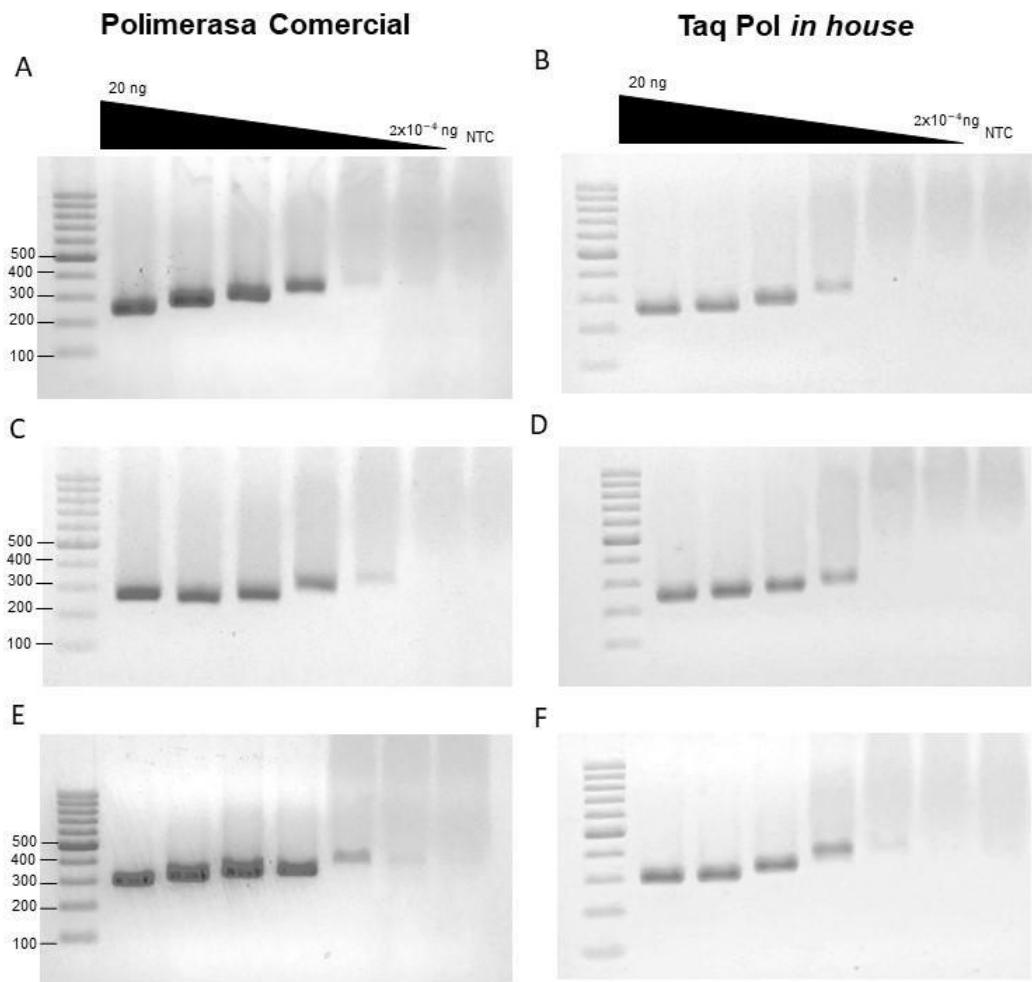


Figura 22. Evaluación de la Taq polimerasa en función de ADN total a 30 ciclos de amplificación.

Las reacciones se realizaron empleando la polimerasa comercial DreamTaq Hot Start como control. La amplificación se realizó empleando los siguientes sets de cebadores **A-B)** CTX-M (este trabajo), **C-D)** CTX-M_Ramadan, y **E-F)** *floR*_Qian.

5.3. Optimización de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a

5.3.1. Evaluación de la actividad de la tecnología CRISPR-Cas12a

En la evaluación inicial de la tecnología CRISPR-Cas12a, se observó una mayor fluorescencia en las reacciones positivas con todos los ARNcr diseñados, mientras que para las reacciones negativas y el control NTC se observó una menor señal fluorescente (Figura 23).

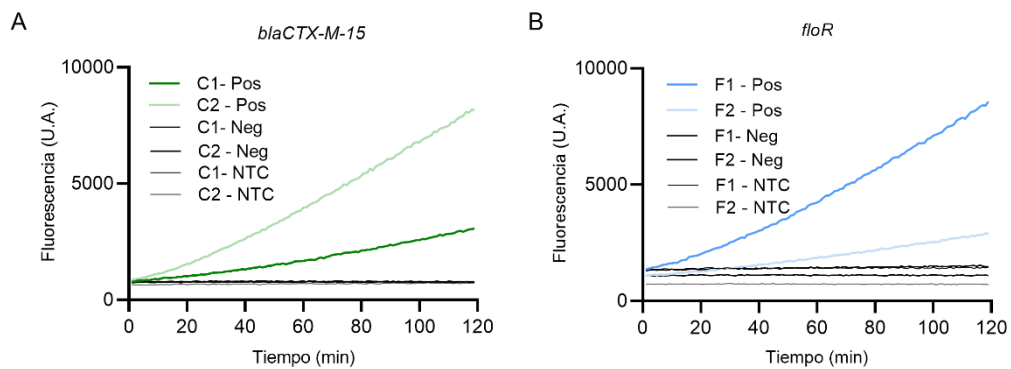


Figura 23. Prueba inicial de CRISPR-Cas12a con los ARNcr.

Las curvas representan la detección de los genes de resistencia **A)** *bla*_{CTX-M-15} y **B)** *floR*

5.3.2. Evaluación del ADN durante la PCR en los dos diseños de ARNcr para la detección de *bla*_{CTX-M-15} y *floR*

En relación con la evaluación de la fluorescencia a lo largo del tiempo, se observó que la reacción con el ARNcr “C2” fue más rápida en comparación con todos los demás diseños de ARNcr para el mismo gen (Figura 24A-D). Por otro lado, en el caso de *floR*, el ARNcr “F1” mostró una reacción más rápida en comparación con el ARNcr “F2” (Figura 26E-H). En cuanto a los controles NTC-PCR, no se observó

un aumento de la fluorescencia cruda en función del tiempo para ambos genes, indicando la ausencia de la secuencia blanco o contaminación alguna (Figuras 24A-B).

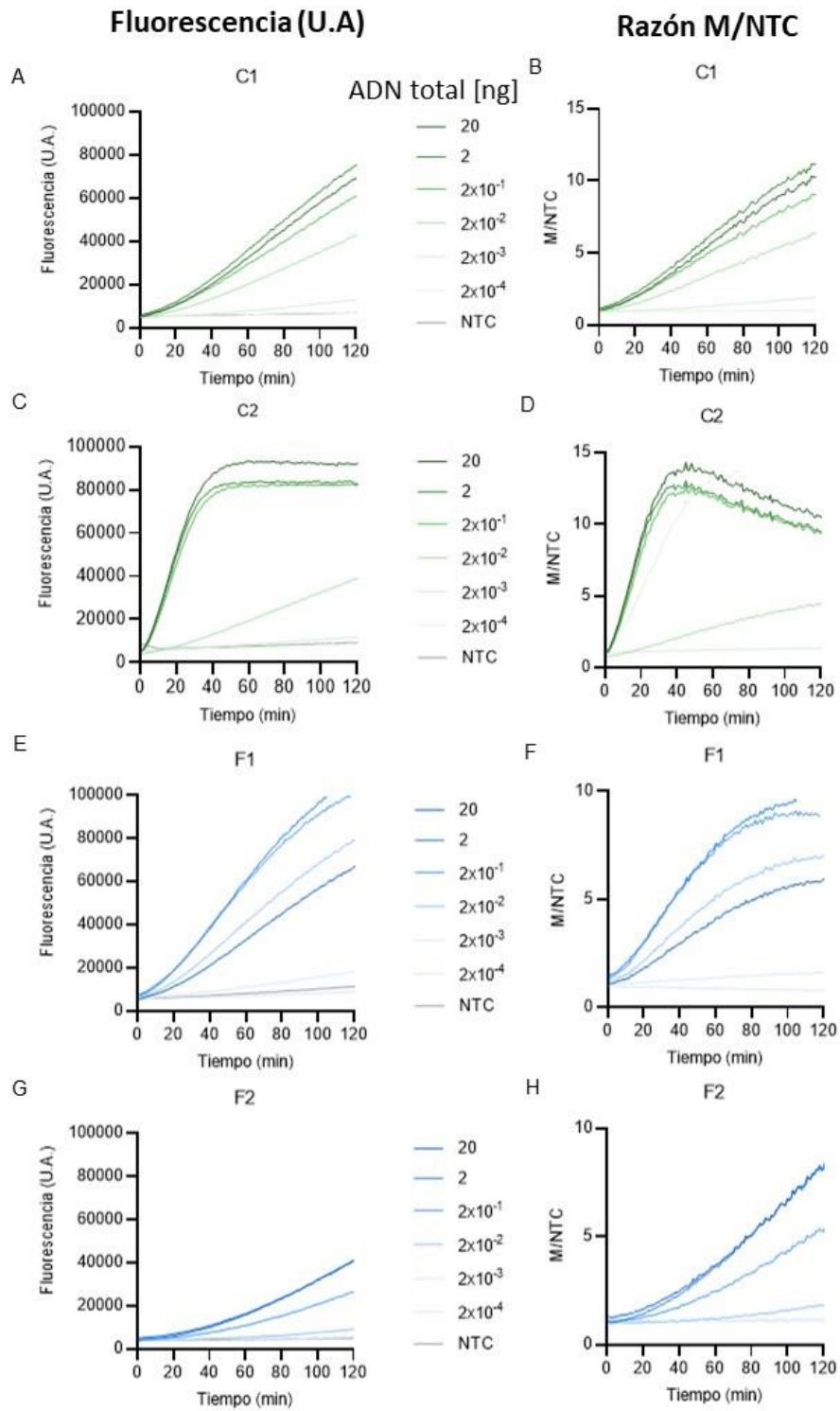


Figura 24. Detección mediada por CRISPR-Cas12a.

La detección se realizó en función del tiempo y ADN total durante la PCR. **A-D)** *bla_{CTX-M-15}* y **E-H)** *floR*. Los paneles de la izquierda muestran las mediciones directas de fluorescencia en unidades arbitrarias (U.A.). Los paneles de la derecha muestran la normalización de las mediciones como la razón de la fluorescencia de cada muestra (M) entre la fluorescencia resultante del control de PCR sin ADN (NTC, del inglés *no-template control*). Razón = M/NTC (paneles de la derecha).

Se observó una diferencia considerable en la señal de fluorescencia producida al utilizar el ARNcr “C2” con la pareja de cebadores de “CTX_Ramadan”. Utilizando este ARNcr se detectó amplificación a una cantidad de 2 pg de ADN total, lo cual no fue evidente en el gel de agarosa (Figura 25C-21C). Por otro lado, al utilizar al ARNcr “C1” con el set de cebadores de “CTX_PE” solo se observó señal fluorescente hasta una cantidad de 20 pg, como se observó en el gel de agarosa (Figura 23C).

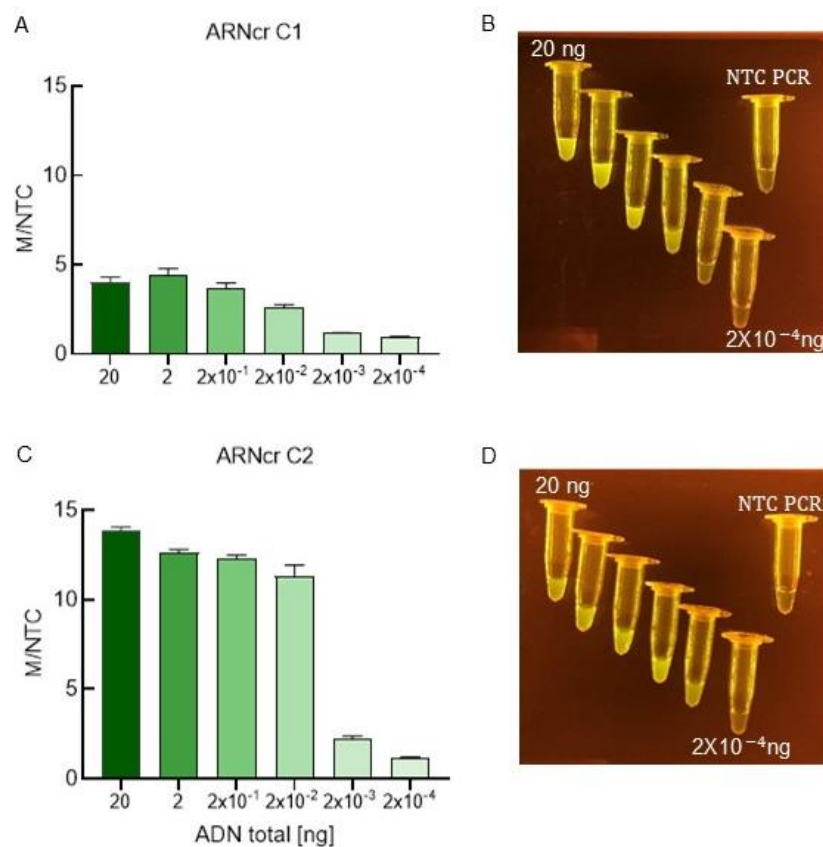


Figura 25. Comparación de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a para la detección de *blaCTX-M-15*.

La comparación se realizó empleando una curva de ADN. Razón de fluorescencia del ARNcr C1. **B)** Evaluación cualitativa del ARNcr C1. **C)** Razón de fluorescencia del ARNcr C2. **D)** Evaluación cualitativa del ARNcr C2. (Los valores de error reportados corresponden al promedio de las lecturas obtenidas en los últimos 10 minutos de una corrida de 40 minutos)

Acorde a las condiciones evaluadas en nuestro estudio, se observó amplificación utilizando cantidades tan bajas como 2 pg de ADN total (Figura 20C). Al evaluar los ARNcr se observó que con el ARNcr “F1” se obtuvo una mayor señal fluorescente (Figura 26A-B). Al igual que con el ARNcr “C2”, el ARNcr “F1” registró una señal fluorescente hasta una reacción de amplificación con 2 pg de ADN total. (Figura 25C-26A). Por el contrario, con el ARNcr “F2” se observó fluorescencia hasta la reacción de amplificación con 2 pg de ADN total (Figura 26C-D).

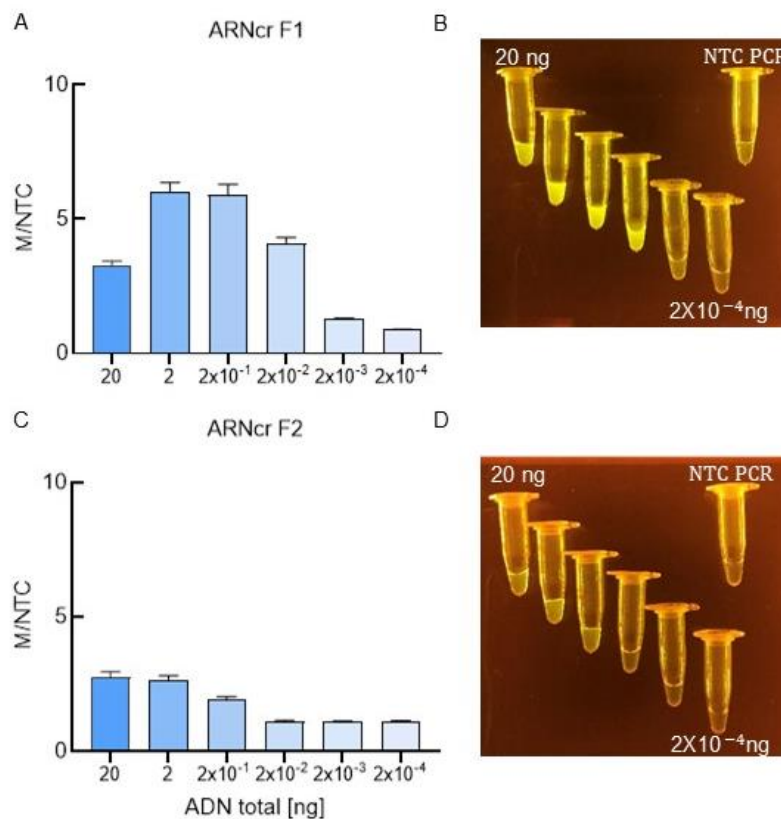


Figura 26. Comparación de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a para la detección de *floR*

La comparación se realizó empleando una curva de ADN total en ng. **A)** Razón de fluorescencia del ARNcr F1. **B)** Evaluación cualitativa del ARNcr F1. **C)** Razón de fluorescencia del ARNcr F2. **D)** Evaluación cualitativa del ARNcr C2. (Los valores de error reportados corresponden al promedio de las lecturas obtenidas en los últimos 10 minutos de una corrida de 40 minutos)

5.3.3. Evaluación de la curva de concentración de MgCl₂ en la técnica PCR-CRISPR-Cas12a

El cloruro de magnesio, como parte esencial para el corte de la enzima Cas12a, se evaluó una curva de concentraciones. Todos los ensayos fueron realizados con una amplificación a partir de 2 ng de ADN total. Se observó un incremento de las razones de la fluorescencia calculadas directamente proporcional a la concentración de MgCl₂ en la reacción. En el caso de los ARNcr C1 y F2 no se observó un incremento de las razones de fluorescencia en relación a la concentración de MgCl₂. Los mayores valores de la razón fueron obtenidos a una concentración de 20 mM MgCl₂ para los ARNcr C2 y F1 (Figura 27A-B). De esta manera, se decidió que en las evaluaciones posteriores para la detección de *bla_{CTX-M-15}* con ARNcr C2, y para *floR*, ARNcr F1 con una concentración de 20 mM de MgCl₂.

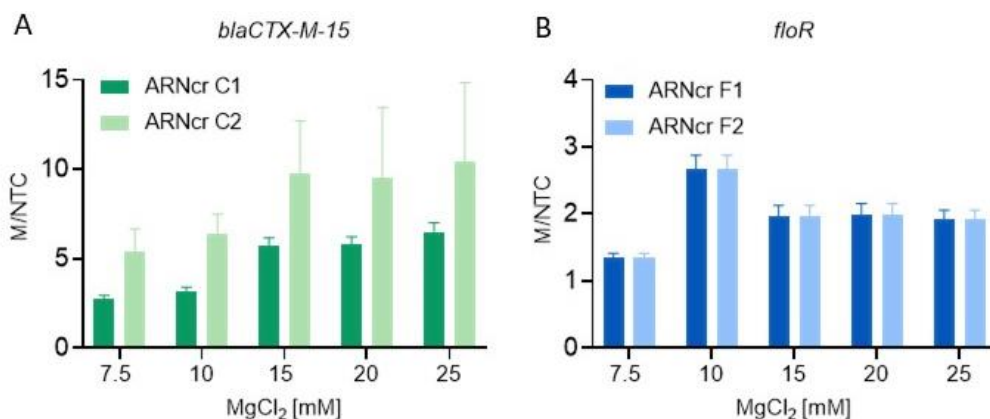


Figura 27. Evaluación de la curva de concentración de MgCl₂ en la técnica PCR-CRISPR-Cas12a.

A) Comparación de los ARNcr para la detección de *bla_{CTX-M-15}* (valores

correspondientes a los últimos 10 minutos de una corrida de 20 minutos). **B)** Comparación de los ARNcr para la detección de *floR* (valores correspondientes a los últimos 10 minutos de una corrida de 40 minutos).

Respecto a los controles NTC-PCR se observó que a mayores concentraciones de MgCl₂ la señal de fluorescencia inespecífica también incrementa. Sin embargo, la señal obtenida es mucho menor con una representatividad menor al 20%, en comparación a las reacciones con muestras positivas. (Figura 28).

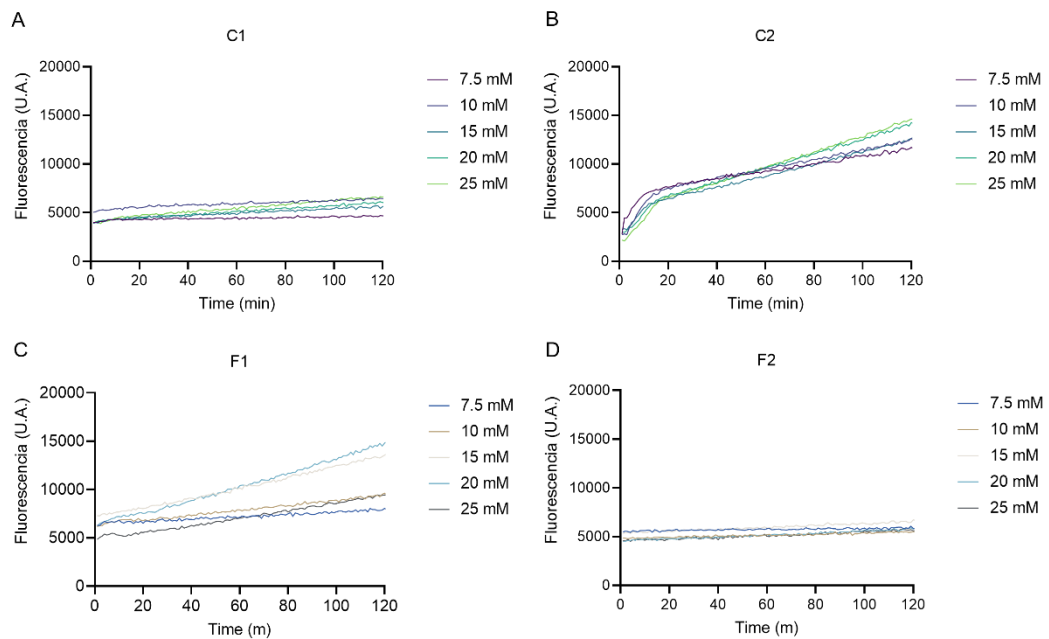


Figura 28. Comparación de los controles NTC (No Template Control) en la técnica PCR-CRISPR-Cas12a.

A) Control NTC PCR para la muestra C1. **B)** Control NTC PCR para la muestra C2. **C)** Control NTC PCR para la muestra F1. **D)** Control NTC PCR para la muestra F2.

5.3.4. Punto de corte

Después de optimizar la técnica PCR-CRISPR-Cas12a, se determinó el punto de corte utilizando ADN total de 10 aislados que no contenían el gen de resistencia evaluado. El punto de corte fue calculado a partir del promedio de las señales de fluorescencia obtenidas. Se observó una mayor señal fluorescencia inespecífica

para el gen *bla_{CTX-M-15}*. Sin embargo, en ambos genes se observó que los valores de fluorescencia obtenidos fueron similares al control NTC (Figura 29A). Para el gen *bla_{CTX-M-15}*, el promedio de la razón fue de 1.04 con una desviación estándar de 0.2 con un punto de corte establecido en 1.6. Por otro lado, para el gen *floR*, el promedio fue de 0.9 con una desviación estándar de 0.1 y se obtuvo un punto de corte de 1.3 (Figura 29B) (Anexo 7).

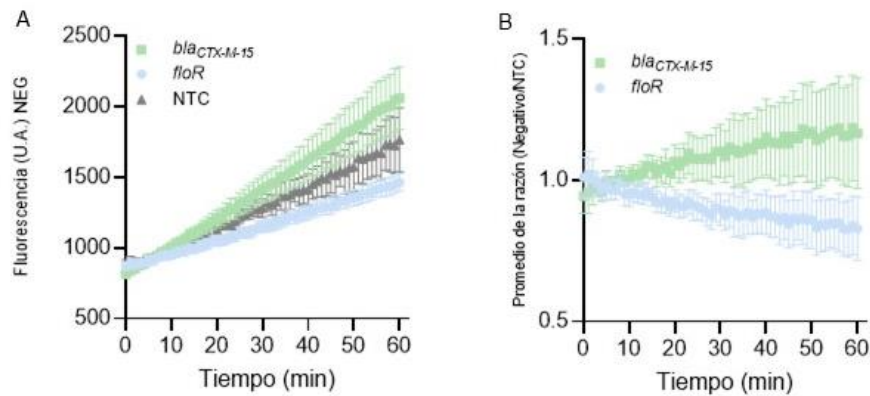


Figura 29. Punto de corte para la detección de los genes de resistencia *bla_{CTX-M-15}* y *floR*.

A) Fluorescencia cruda de los aislados negativos a los genes de resistencia. **B)** Razón de fluorescencia de los aislados negativos a los genes de resistencia.

5.4. Evaluación de desempeño

Para la evaluación del desempeño de la técnica optimizado PCR-CRISPR-Cas12a, se determinó el límite de detección y se evaluó la concordancia con las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

5.4.1. Límite de detección

Para determinar el límite de detección, se realizaron diluciones desde 1 nM hasta 1 aM del ADN diana provenientes de amplicones purificados (Figura 30A-B). Las razones de fluorescencia obtenidos fueron mayores a 6 incluso a concentraciones tan bajas como 100 aM (10^{-7} nM) que fue el último punto de la curva que se logró diferenciar para ambos genes (Figura 30C-D).

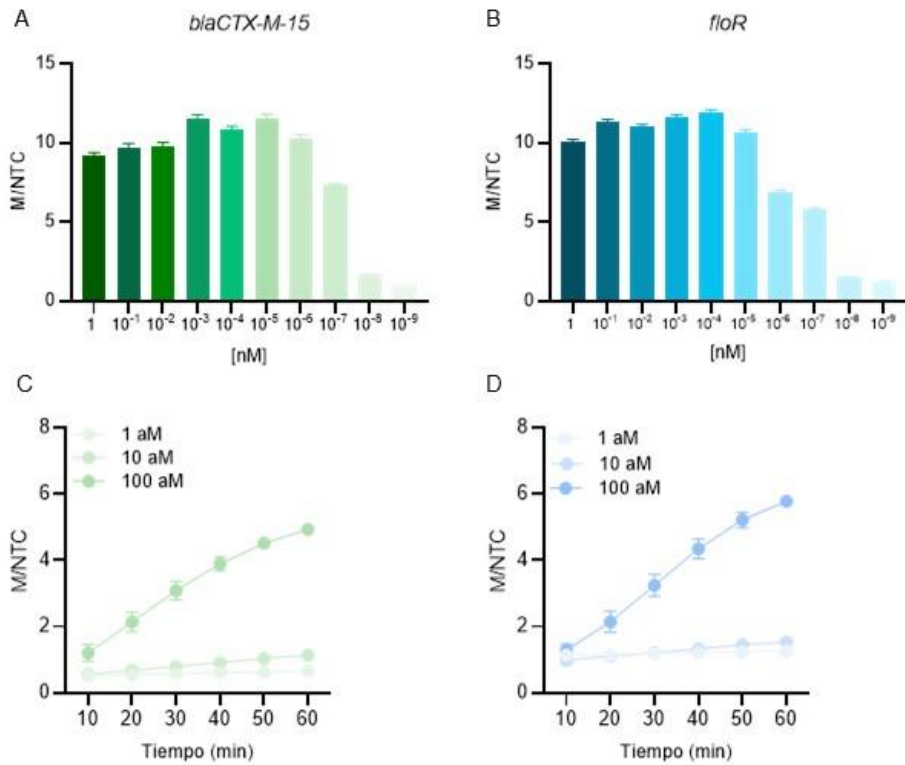


Figura 30. Curva de dilución para la determinación del límite de detección. **A)** *blaCTX-M-15*, **B)** *floR*. (Los valores de error reportados corresponden al promedio de las lecturas obtenidas en los últimos 10 minutos de una corrida de 20 minutos de tres repeticiones independientes) Concentraciones Attomolares para el gen **C)** *blaCTX-M-15* y **D)** *floR*. (Los valores reportados de error corresponden al promedio de las lecturas obtenidas de tres repeticiones independientes)

En el análisis del límite de detección, la técnica PCR-CRISPR-Cas12a reporta un LoD de 100 aM equivalente a 147 copias/ μ l para la detección de ambos genes en un tiempo de reacción mínimo de 20 minutos (Figura 31A-B).

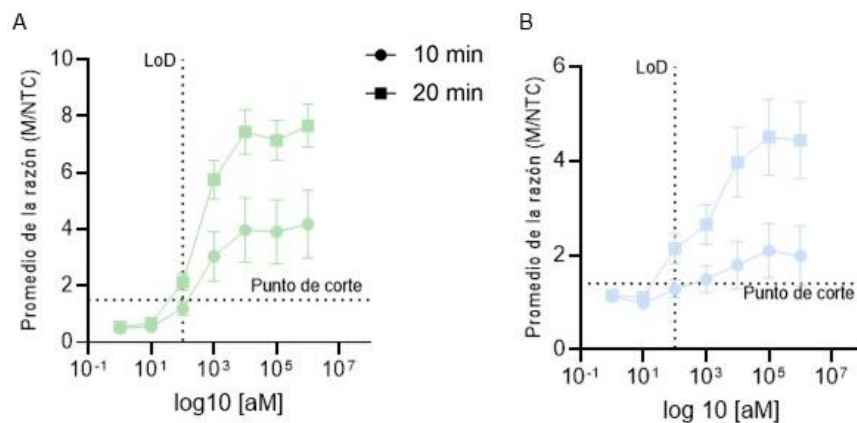


Figura 31. Límite de detección en dos tiempos: 10 y 20 minutos de los genes. **A)** *bla_{CTX-M-15}* y **B)** *floR*. Los valores de la razón se encuentran en función de la concentración; los cuales fueron obtenidos de la interpolación de la fórmula del límite de detección.

El CRISPR-Cas12a acoplado a la PCR mejora el límite de detección de los genes de resistencia. En particular, la PCR detecta hasta 1 fM equivalente a 3,7 fg ADN total, mientras que con la tecnología CRISPR-Cas12a se alcanzan niveles de 100 aM o 0,37 fg ADN total. Este patrón se observa para ambos genes: *bla_{CTX-M-15}* y *floR* (Figura 32).

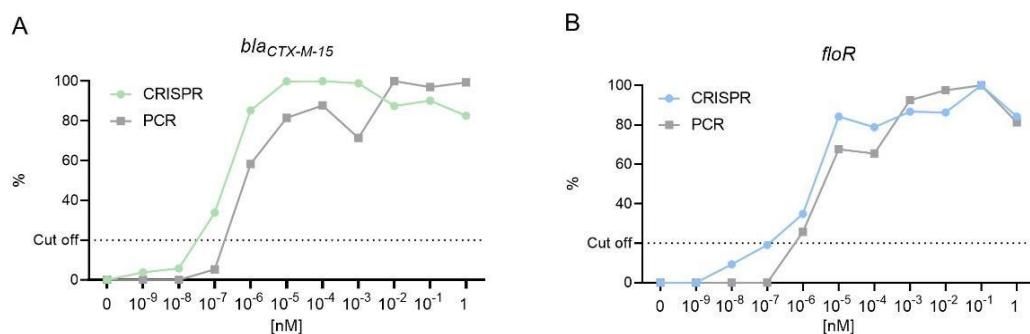


Figura 32. Comparación del límite de detección de la PCR y CRISPR-Cas12a. Detección de los genes de resistencia **A)** *bla_{CTX-M-15}* y **B)** *floR*.

5.4.2. Concordancia con pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

5.4.2.1. Método de difusión en disco para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana para los aislados que contienen el gen *bla_{CTX-M-15}*

El método de difusión en disco utilizando la prueba de disco combinado se realizó en un total de 17 aislados, que incluyeron tanto aislados positivos y negativos para el gen de resistencia *bla_{CTX-M-15}*, junto con la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922. En la prueba inicial de los aislados que se utilizaron para optimizar la técnica

PCR-CRISPR-Cas12a, se observa un cambio diferenciado en el diámetro de inhibición en los aislados resistentes a los betalactámicos en presencia del ácido clavulánico (Figura 33A). Por otro lado, los aislados no resistentes muestran una diferencia mínima en el diámetro de inhibición (Figura 33B). El aislado resistente presentó diámetros de inhibición de cefotaxima de $1\pm 0,5$, con AC de 15 ± 1 ; ceftazidima de 6 ± 0.5 y en combinación con AC de 16 ± 1.5 . En cambio, en la cepa de referencia, los diámetros de inhibición de cefotaxima fueron de 23 ± 2 y ceftazidima, 20 ± 1 . Los diámetros en combinación con el AC fueron similares con una diferencia de 1 a 2 mm.

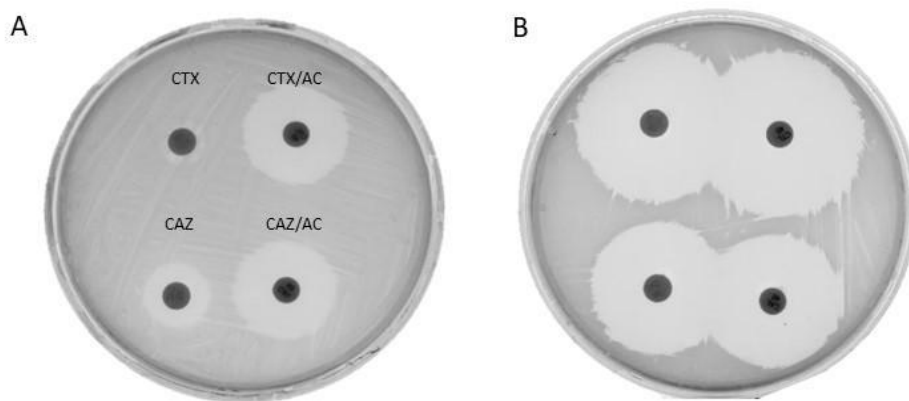


Figura 33. Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana utilizando el método de difusión en disco.

A) Aislado resistente a los antibióticos betalactámicos. **B)** Cepa de referencia (*E. coli* ATCC 25922). Se muestra un ejemplo con la muestra que se utilizó para estandarizar la técnica PCR-CRISPR-Cas12a.

Los aislados positivos a *bla*_{CTX-M-15} mostraron diámetros de inhibición en presencia de CTX que oscilaron entre 0 y 8 mm, mientras que para CAZ se observaron diámetros de inhibición de 12 a 14 mm. Sin embargo, al combinar los antibióticos con ácido clavulánico, se observó un aumento significativo en los diámetros de inhibición, alcanzando valores de 17 a 24 mm para CTX/AC y de 19 a 22 mm para

CAZ/AC (Figura 34A). La diferencia en los diámetros de inhibición observados en los aislados que contienen el gen *bla_{CTX-M-15}* fue superior a 5 mm, lo que indicó que son productores BLEE (Figura 34B). Por otro lado, en el caso de los aislados que no contenían el gen de resistencia *bla_{CTX-M-15}* los diámetros de inhibición de los antibióticos fueron de 17 a 30 mm tanto en ausencia como en presencia de ácido clavulánico (Figura 34A). Los resultados de los aislados sensibles fueron similares a los resultados obtenidos en la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 (Figura 34B).

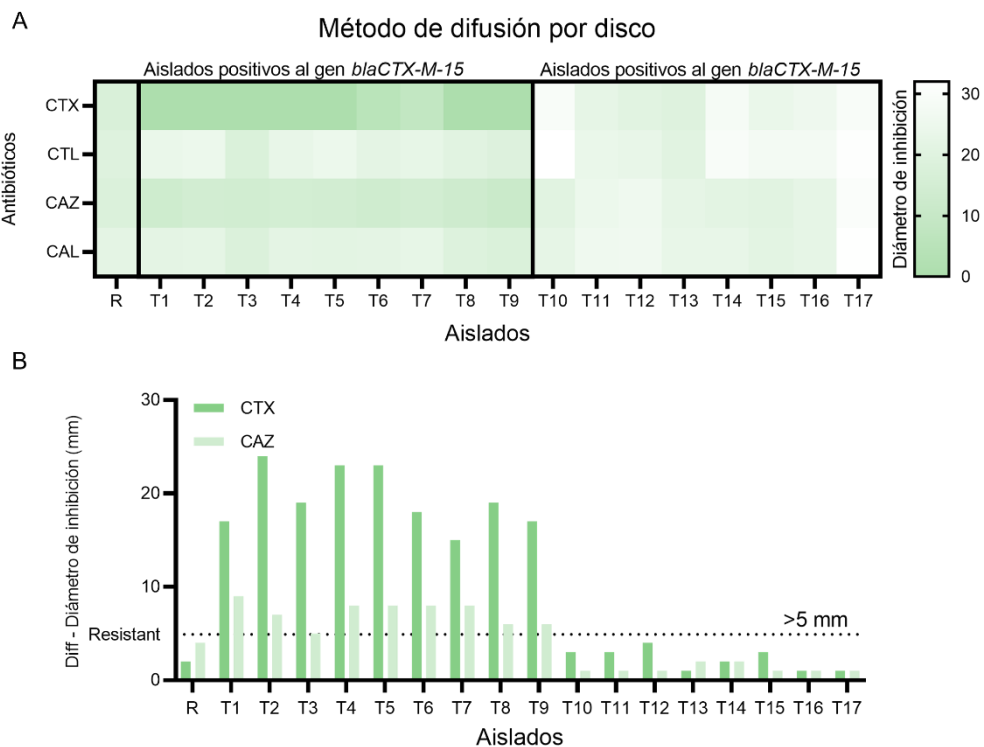


Figura 34. Resultados del método de difusión en disco.

La prueba de disco combinado se aplicó a 17 aislados para el gen *bla_{CTX-M-15}*. **A)** Mapa de calor que muestra los diámetros de inhibición de los antibióticos CTX, CAZ, CTX/AC y CAZ/AC. **B)** Diferencia en los diámetros de inhibición de los antibióticos en presencia de ácido clavulánico. Las muestras positivas al gen de resistencia *bla_{CTX-M-15}* corresponden a las T1-T9, mientras que las muestras negativas corresponden a las T10-T17. R representa la cepa de referencia, que es susceptible a los genes de resistencia (*E. coli* ATCC 25922).

5.4.2.2. Método de micro dilución para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana para las bacterias que contienen el gen *floR*

El perfil de susceptibilidad a florfenicol se evaluaron a 17 aislados. En cada ensayo se incluyó la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922, así como como controles positivos y negativos (Figura 35A). Como prueba inicial, se realizó una evaluación duplicada de la cepa de referencia, obteniendo un valor de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 4 µg/ml (Figura 35B-C). El aislado positivo al gen *floR*, que se utilizó para optimizar la técnica PCR-CRISPR-Cas12a, se evaluó por triplicado y evidencio un valor de CMI de 256 µg/ml, lo que indica una resistencia al antibiótico florfenicol (Figura 35B).

Los controles positivos demostraron un crecimiento normal de las bacterias (Figura 35C), mientras que los controles negativos se utilizaron para verificar que el sistema no estuviera contaminado (Figura 35D). De esta manera, los controles garantizaron que los efectos observados fueran atribuibles únicamente al antibiótico.

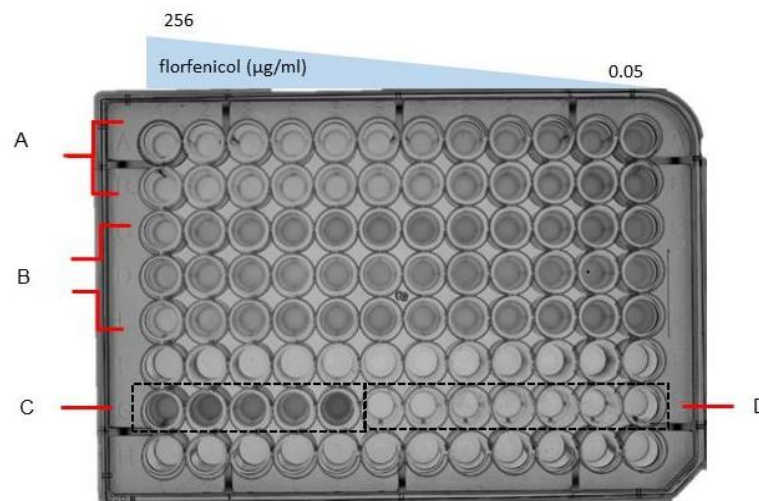


Figura 35. Prueba inicial para determinar la CMI

La determinación de la concentración mínima inhibitoria se realizó utilizando el método de microdilución para **A)** Cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922. **B)** Aislados positivos al gen de resistencia *floR* **C)** Control de crecimiento sin antibiótico. **D)** Controles del medio con DMSO sin bacteria ni antibiótico.

La cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 mantuvo una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) constante de 8 µg/ml en las 8 evaluaciones independientes realizadas, con un OD 600 promedio de 0.3 ± 0.05 . Por otro lado, los aislados positivos al gen *floR* (L1-L11) mostraron resistencia al antibiótico florfenicol, con valores de CMI que variaron entre 256 y 128 µg/ml (Figura 36A). En contraste, los aislados negativos para el gen *floR* (L12 a L17) presentaron valores iguales o inferiores a 32 µg/ml, lo que confirma su susceptibilidad al florfenicol.

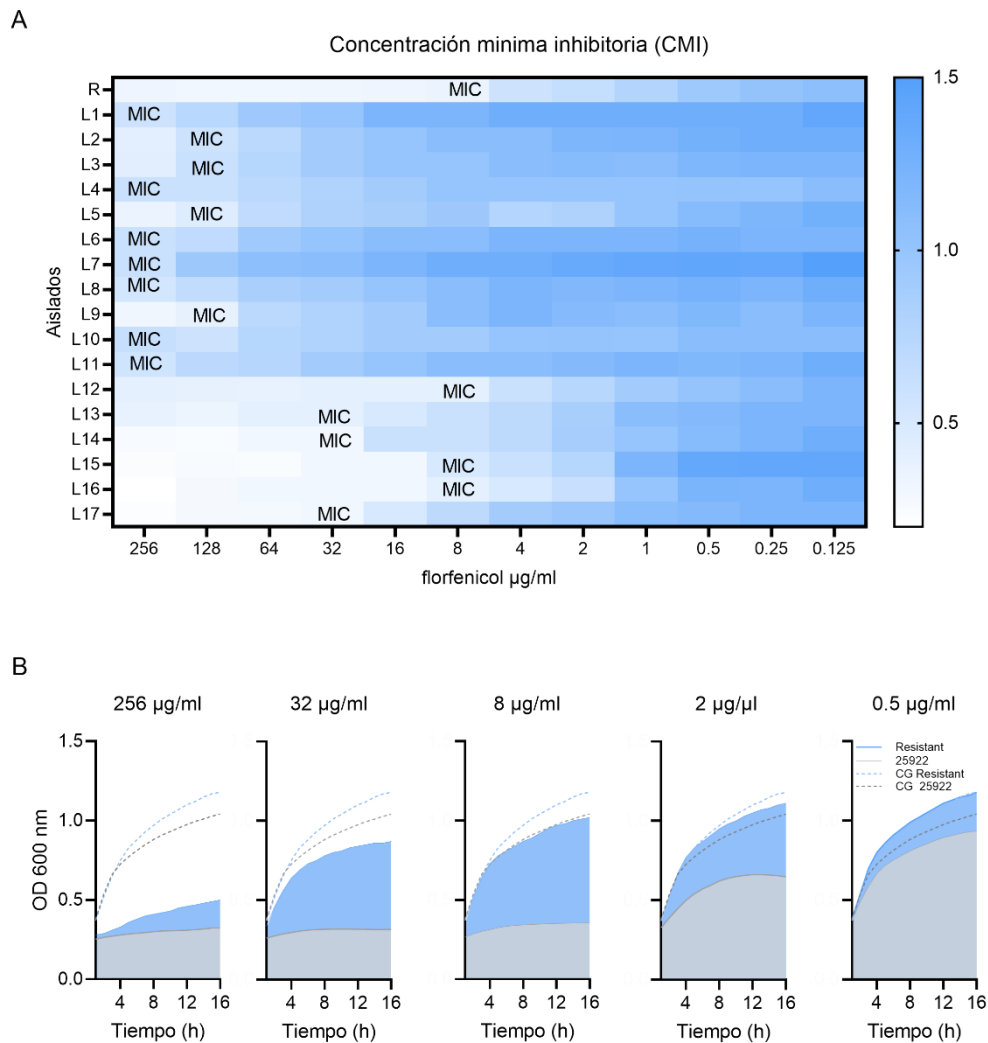


Figura 36. Resultados de la Mínima concentración inhibitoria (CMI) **A**) Mapa de calor que muestra los valores de la CMI. Los aislados L1-L11 son positivos para el

gen de resistencia *floR*, mientras que L12-17 son negativos. R, representa la cepa de referencia, que es susceptible a los genes de resistencia (*E. coli* ATCC 25922). **B)** Comparación de la curva de crecimiento entre diferentes concentraciones de antibiótico.

Se compararon la concentración alta del antibiótico (256 µg/ml), la concentración reportada de inhibición para cepas que presentan el gen de resistencia *floR* (32 µg/ml), la concentración para cepas que no presentan el gen de resistencia *floR* (8 µg/ml) y dos concentraciones menores del antibiótico (2 y 0.4 µg/ml). Las curvas se compararon con las curvas sin antibiótico (CG, *Control Growth*). Los datos representan el promedio de dos repeticiones.

Todos los aislados resistentes presentaron el gen *floR* y exhibieron una curva de crecimiento exponencial en presencia de concentraciones elevadas del antibiótico florfenicol, mientras que la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 mostró un crecimiento ralentizado. Este aumento en el crecimiento de los aislados resistentes se observó incluso a concentraciones altas del antibiótico (Figura 36B). En el caso de la cepa de referencia, su crecimiento exponencial solo se evidenció en concentraciones menores a 8 µg/ml.

5.4.2.3. Concordancia entre la técnica PCR-CRISPR-Cas12a con las pruebas de disco combinado y determinación de la CMI

Las muestras que se procesaron por el disco combinado y la CMI, fueron evaluadas por la técnica PCR-CRISPR-Cas12a con la finalidad de determinar la concordancia entre la prueba fenotípica y molecular. Tanto la pruebas de secuenciamiento y PCR-CRISPR-Cas12a evaluaron la presencia del gen *bla_{CTX-M-150} floR*, mientras que las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana determinaron si los aislados eran BLEE o presentaban una CMI alta.

Todas las muestras fueron clasificadas como sensibles o resistentes correctamente, acorde a la presencia o ausencia del gen por secuenciamiento. Las razones de fluorescencia medidos para las muestras resistentes en la detección por PCR-CRISPR-Cas12a a *bla_{CTX-M-15}* fueron de 10 a 15 y para *floR*, de 5 a 8 en un tiempo de 60 minutos. Mientras que, las muestras susceptibles, tuvieron un rango de razones de fluorescencia de 0.8 a 1.5 y en *floR*, de 0.6 a 1.1, ambas inferiores a los puntos de cortes determinados arriba (Figura 37).

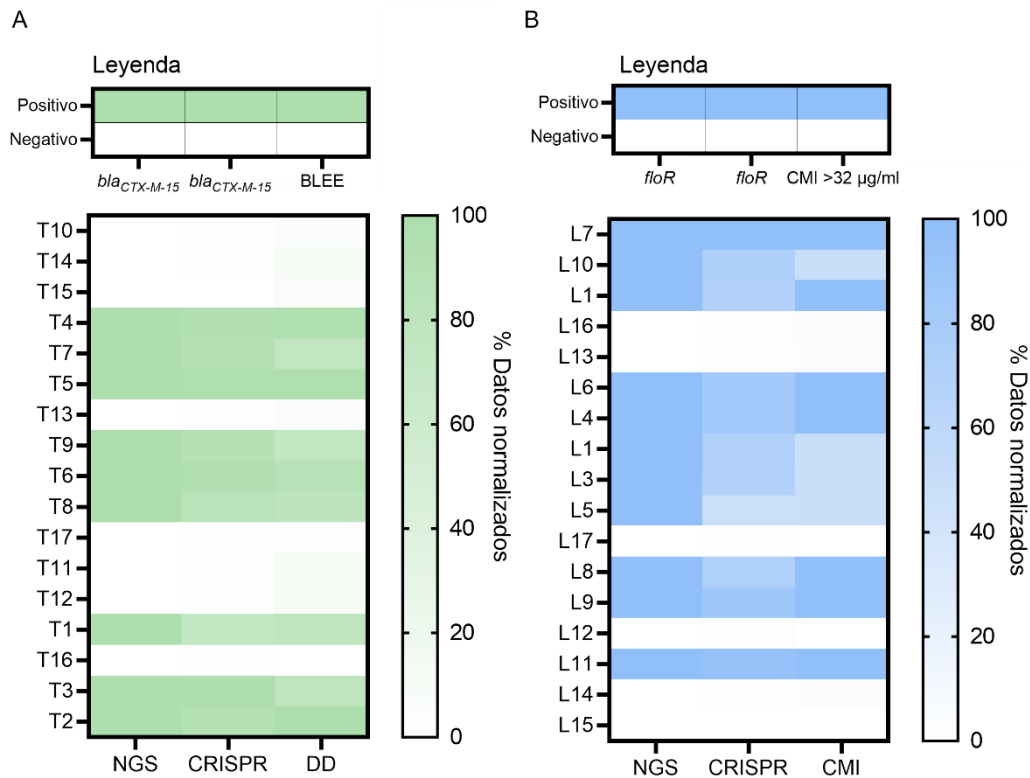


Figura 37. Concordancia entre pruebas moleculares y microbiológicas para la detección de la resistencia antimicrobiana.

A) Concordancia entre secuenciación, PCR-CRISPR-Cas12a y método de difusión en disco para la detección del gen de resistencia *bla_{CTX-M-15}*. **B)** Concordancia entre secuenciación, PCR-CRISPR-Cas12a y prueba de CMI para la detección del gen *floR*.

Los resultados de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a fueron comparados con las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana utilizando el índice kappa de concordancia de Cohen (106). Se incluyeron los datos obtenidos previamente mediante secuenciación de nueva generación (NGS), considerada como el estándar en pruebas genotípicas (107). Se observó una concordancia buena y estadísticamente significativa, con un valor de Kappa igual a 1 (95% CI: 0.53 – 1; $p < 0.001$) (Figura 37). Estos hallazgos indican que la técnica PCR-CRISPR-Cas12a presenta una buena concordancia tanto con una prueba genotípica estándar (NGS) como con una prueba fenotípica.

VI. DISCUSIÓN

En este estudio, se desarrolló una técnica de detección para los genes de resistencia *bla_{CTX-M-15}* y *floR* en *Escherichia coli* basados en la tecnología CRISPR-Cas12a acoplada a PCR. Esta técnica, además de presentar un bajo límite de detección (LoD), exhibe una buena concordancia con pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, lo cual es fundamental para el desarrollo de una plataforma de monitoreo destinada a la detección de la resistencia a betalactámicos y anfenícoles.

El límite de detección de la PCR para ambos genes de resistencia fue de 1 fM equivalente a 3.7 fg total de ADN total. Estos resultados son consistentes con investigaciones anteriores que han reportado límites de detección en el rango de fentogramos con la técnica de PCR (108,109). El grupo de Li, determinó que CRISPR-Cas y la PCR convencional de manera independiente presentan un LoD de 1000 aM y 0.1 nM, respectivamente. Mientras que cuando se acoplan ambas pruebas el LoD mejora detectando hasta 10 aM,(11). La técnica PCR-CRISPR-Cas12a en este estudio demostró también una mejora considerable en el límite de detección alcanzado niveles de 100 aM, comparado a la PCR con 1 fM. La propuesta de utilizar un sistema de amplificación previo a CRISPR, además de ser novedoso, se basa en el aumento de la sensibilidad de la técnica y, por lo tanto, en la mejora de su límite de detección.

Previamente, se ha reportado el uso de la tecnología CRISPR-Cas9 para la detección de resistencia betalactámicos con los grupos de betalactamasas mediante los genes *CTX-M*, principalmente *bla_{CTX-M-15}* y carbapenamasas mediante los genes que expresan *KPC* y *NDM* (110). En esta misma línea, utilizando la tecnología

CRISPR-Cas12a se detectó a los genes de resistencia: *blaKPC*, *blaOXA* y *blaNDM*, *mcr-1*, y *emrb* reportando diversos valores del límite de detección como 100 aM, 420 fg y 2.8×10^3 copias/ul,, similar al LoD de este estudio de 100 aM (Tabla 2) (22,73,76)

Los reportes del límite de detección de otros métodos moleculares específicamente para la detección del gen *bla_{CTX-M-15}* y *floR* son limitados en la literatura. El grupo de Higgings y Ertl, utilizaron métodos isotérmicos para la detección *bla_{CTX-M-15}*, en el rango de 10 a 20 copias/μl, mientras que la técnica PCR-CRISPR-Cas12a de esta investigación reporta 147 copias/μl para la detección de los genes de resistencia (111,112). Esto se debe a que los métodos que utilizaron mejoran la sensibilidad en comparación con la PCR convencional. En el caso del gen *floR*, el grupo de Randall Singer, reportó un límite de detección de 53,1 UFC/g de heces con el uso de PCR convencional (20). Por otro lado, las herramientas nanotecnológicas, para la detección de otros genes de resistencia reportan valores de límite de detección con 10 fg/μl y 1 fM (113,114).

Ante la propuesta del uso de métodos moleculares para el monitoreo de la resistencia antimicrobiana, la OMS recomienda contar con evidencia de la relación genotipo-fenotipo (13). En este estudio se observó una buena concordancia entre esta relación con un índice de kappa de 1 (95% CI: 0.5 to 1) para los genes de resistencia *bla_{CTX-M-15}* y *floR*. En relación a la relación genotipo-fenotipo para el gen *bla_{CTX-M-15}*, esta investigación evidenció que todos los aislados que contenían el gen *bla_{CTX-M-15}* eran productoras BLEE, mediante el método de difusión en disco ($k=1$). Los estudios anteriores han informado resultados similares con un kappa superior a 0.8 comparando el secuenciamiento NGS para la detección de *bla_{CTX-M-15}* y

antibiogramas con discos de antibióticos (15,115). El grupo de Wiegand reporto que el 79% de los aislados *E. coli* productores de BLEE, presentaban el gen *bla_{CTX-M}* (116). Una reciente investigación determino que el 84% presentaba el gen *bla_{CTX-M-15}* a partir de aislados de niños como este estudio (52). Por otro lado, el grupo de Ramadán, reporto que aproximadamente el 50% de aislados de *E. coli* resistentes a cefotaxima y ceftazidima, presentaban el gen *bla_{CTX-M-15}* (3).

En la evaluación fenotípica, los aislados que contenían el gen *floR*, presentaron una CMI igual o superior a 128 µg/ml. Estos resultados coinciden con otros estudios previos que reportaron valores de CMI mayor o iguales a 128 µg/ml a 512 µg/ml (36,65). Con respecto a la evaluación genotipo-fenotipo mediante la determinación de la CMI se confirmó que todos los aislados que presentaban el gen *floR* eran resistentes a florfenicol. El grupo de Li, reporto que aquellas cepas resistentes a florfenicol presentaban el gen *floR* en un 92% (36). Mientras, en las cepas resistentes a Cloranfenicol la presencia del gen *floR* se reduce a un 78% (16). El gen *floR* confiere resistencia a florfenicol, utilizado exclusivamente en animales; por lo que su detección en humanos generalmente indica una transferencia horizontal de genes desde animales, comportándose como un biomarcador.

Por otro lado, los resultados de este estudio, además de mostrar una buena concordancia, presentan un tiempo de ejecución similar a los métodos moleculares actuales. El paso de aislamiento no se considera, debido a que la extracción de ADN puede ser realizada a bacterias (como este proyecto) pero también a otro tipo de muestras sin necesidad de aislar la bacteria. Teniendo en cuenta el tiempo de procesamiento experimental: 1 h de extracción de ADN y 1.3 horas de PCR-

CRISPR-Cas12 hace un aproximado de 3 horas. Las pruebas microbiológicas convencionales pueden tardar un mínimo de 32 horas, mientras que las pruebas moleculares rápidas pueden reducir ese tiempo a 0.5-4 (117). El grupo de Curti, que empleó el sistema RPA-CRISPR-Cas12a para la detección de genes de resistencia, estima un tiempo aproximado de 2 horas desde el inicio de la reacción. Este tiempo también ha sido reportado por otros grupos de investigación que utilizaron CRISPR-Cas para la detección de genes de resistencia con un tiempo de 1 a 2 h (22,73–76)

Es importante destacar que una de las desventajas de las pruebas moleculares existentes es su precio, el cual a menudo no es accesible para todos los laboratorios y países de ingresos bajos o medianos (LMICs, por sus siglas en inglés) (140). Sin embargo, la técnica PCR-CRISPR-Cas12a. desarrollado en esta investigación utiliza equipos considerados como básicos en un laboratorio de referencia, como un termociclador y un transiluminador de luz azul, los cuales suelen estar disponibles en muchos laboratorios. De manera novedosa, esta investigación ha demostrado con éxito el uso de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a para la detección de dos genes de resistencia antimicrobiana considerados como biomarcadores.

VII. CONCLUSIONES

- Se diseñaron el ARNcr y los cebadores de las regiones conservadas de los genes de resistencia *bla_{CTX-M-15}* y *floR*, mediante análisis bioinformáticos.
- Se optimizó un sistema de amplificación de ácidos nucleicos y de detección fluorescente mediante CRISPR-Cas.
- En la determinación del límite de detección de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a, se demostró que puede detectar concentraciones de ADN diana tan bajas como 100 aM en una reacción con 30 ciclos de amplificación y un tiempo de detección de 20 minutos.
- En la comparación de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a para genes de resistencia *bla_{CTX-M-15}* y *floR* frente a las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana mostraron una buena concordancia con un índice de concordancia de 1.

VIII. RECOMENDACIONES

La aparición de nuevas mutaciones en los genes *bla_{CTX-M-15}* y *floR* podría comprometer la especificidad y sensibilidad, por lo que se recomienda el secuenciamiento como método estándar de control. Se sugiere un tamizaje inicial basado en regiones conservadas y secuenciamiento, especialmente ante variantes resistentes a carbapenémicos en *bla_{CTX-M-15}* y *floR* solo encontradas en *Pseudomonas aeruginosa* sin clasificación establecida.

Aunque el objetivo a un largo plazo es convertir la técnica PCR-CRISPR-Cas12a en un POC (Point of Care), se necesita un termociclador para realizar la PCR convencional. Por lo tanto, se recomienda integrar la tecnología CRISPR-Cas12a con técnicas de amplificación isotérmicos. Además, el tiempo informado no incluye la etapa de aislamiento de bacterias y la extracción de ADN agrega un paso de 1 hora en el proceso. Por ello, se sugiere evaluar la posibilidad de evaluar directamente a muestras sin la necesidad de aislar e incluso de extraer ADN. De esta manera, la técnica PCR-CRISPR-Cas12a se convertiría en una propuesta interesante de POC al no requerir del paso de extracción de ADN y proporcionar resultados en menos tiempo.

Por último, la aplicación de la técnica PCR-CRISPR-Cas12a se llevó a cabo a un nivel inicial o prueba de concepto satisfactoriamente. La propuesta para futuros estudios es un monitoreo rápido epidemiológico, independiente de la detección del organismo, utilizando la técnica PCR-CRISPR-Cas12a. Por lo tanto, los siguientes pasos serían la validación de esta técnica para su posterior uso como una potencial herramienta de monitoreo de genes de resistencia.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neill JO'. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. 2014;(December).
2. Iredell J, Brown J, Tagg K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: Mechanisms and clinical implications. Vol. 352, BMJ (Online). BMJ Publishing Group; 2016.
3. Ramadan AA, Abdelaziz NA, Amin MA, Aziz RK. Novel blaCTX-M variants and genotype-phenotype correlations among clinical isolates of extended spectrum beta lactamase-producing Escherichia coli. Sci Rep. 2019 Dec 1;9(1).
4. Fernández-Alarcón C, Miranda CD, Singer RS, López Y, Rojas R, Bello H, et al. Detection of the floR gene in a diversity of florfenicol resistant gram-negative bacilli from freshwater salmon farms in Chile. Zoonoses Public Health. 2010 May;57(3):181–8.
5. Mohsin M, Raza S, Schaufler K, Roschanski N, Sarwar F, Semmler T, et al. High prevalence of CTX-M-15-Type ESBL-Producing E. coli from migratory avian species in Pakistan. Front Microbiol. 2017 Dec 12;8(DEC).
6. Ying Y, Wu F, Wu C, Jiang Y, Yin M, Zhou W, et al. Florfenicol Resistance in Enterobacteriaceae and Whole-Genome Sequence Analysis of Florfenicol-Resistant Leclercia adecarboxylata Strain R25. Int J Genomics. 2019;2019.
7. Amos GCA, Hawkey PM, Gaze WH, Wellington EM. Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. J Antimicrob Chemother. 2014;69(7):1785–91.
8. Liao CY, Balasubramanian B, Peng JJ, Tao SR, Liu WC, Ma Y. Antimicrobial Resistance of Escherichia coli From Aquaculture Farms and Their Environment in

- Zhanjiang, China. *Front Vet Sci.* 2021;8(December):1–12.
9. March Rosselló GA, Bratos Pérez MÁ. Antibiograma rápido en Microbiología Clínica. Vol. 34, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Elsevier Doyma; 2016. p. 61–8.
 10. Colman RE, Mace A, Seifert M, Hetzel J, Mshaiel H, Suresh A, et al. Whole-genome and targeted sequencing of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* on the iSeq100 and MiSeq: A performance, ease-of-use, and cost evaluation. *PLoS Med.* 2019;16(4).
 11. Li SY, Cheng QX, Li XY, Zhang ZL, Gao S, Cao RB, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. Vol. 4, *Cell Discovery*. Nature Publishing Groups; 2018.
 12. Alcántara R, Peñaranda K, Mendoza-Rojas G, Nakamoto JA, Martins-Luna J, del Valle-Mendoza J, et al. Unlocking SARS-CoV-2 detection in low- and middle-income countries. *Cell Reports Methods.* 2021 Nov 22;1(7).
 13. WHO. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Molecular methods for antimicrobial resistance (AMR) diagnostics to enhance the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System. 2019.
 14. Singer RS, Patterson SK, Meier AE, Gibson JK, Lee HL, Maddox CW. Relationship between phenotypic and genotypic florfenicol resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(10):4047–9.
 15. Peker N, Rossen JWA, Deurenberg RH, Langereis PC, Raangs EGC, Kluytmans JA, et al. Evaluation of an accelerated workflow for surveillance of *esbl* (Ctx-m)-producing *Escherichia coli* using amplicon-based next-generation sequencing and automated analysis. *Microorganisms.* 2018 Jan 11;6(1).

16. Bharat A, Petkau A, Avery BP, Chen J, Folster J, Carson CA, et al. Correlation between Phenotypic and In Silico Detection of Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* in Canada Using Staramr. *Microorganisms*. 2022;10(2):1–10.
17. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. Vol. 5, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Research Foundation; 2014. p. 1–1.
18. Shelburne SA, Kim J, Munita JM, Sahasrabhojane P, Shields RK, Press EG, et al. Whole-genome sequencing accurately identifies resistance to extended-spectrum β -lactams for major gram-negative bacterial pathogens. *Clin Infect Dis*. 2017 Sep 1;65(5):738–45.
19. Poirel L, Fernández J, Nordmann P. Comparison of three biochemical tests for rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2016 Feb 1;54(2):423–7.
20. Patterson SK, Singer RS. Development of a polymerase chain reaction assay for the detection of antibiotic resistance genes in community DNA. *J Vet Diagnostic Investig*. 2006;18(2):172–81.
21. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science* (80-) [Internet]. 2018;360:439–44. Available from: <https://www.science.org>
22. Curti LA, Pereyra-Bonnet F, Repizo GD, Fay JV, Salvatierra K, Blariza MJ, et al. CRISPR-based platform for carbapenemases and emerging viruses detection using Cas12a (Cpf1) effector nuclease. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Jan 1;9(1):1140–8.
23. Dueñas E, Nakamoto JA, Cabrera-Sosa L, Huaihua P, Cruz M, Arévalo J, et al.

- Novel CRISPR-based detection of *Leishmania* species. *Front Microbiol.* 2022;13(September):1–23.
24. Bonini A, Poma N, Vivaldi F, Biagini D, Bottai D, Tavanti A, et al. A label-free impedance biosensing assay based on CRISPR/Cas12a collateral activity for bacterial DNA detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2021 Sep 10;204.
 25. Ai JW, Zhou X, Xu T, Yang M, Chen Y, He GQ, et al. CRISPR-based rapid and ultra-sensitive diagnostic test for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect.* 2019 Jan 1;8(1):1361–9.
 26. Xu L, Dai Q, Shi Z, Liu X, Gao L, Wang Z, et al. Accurate MRSA identification through dual-functional aptamer and CRISPR-Cas12a assisted rolling circle amplification. *J Microbiol Methods.* 2020 Jun 1;173.
 27. Thakuria B, Lahon K. The beta lactam antibiotics as an empirical therapy in a developing country: An update on their current status and recommendations to counter the resistance against them. Vol. 7, *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2013. p. 1207–14.
 28. Lhermie G, Toutain PL, El Garch F, Bousquet-Mélou A, Assié S. Implementing precision antimicrobial therapy for the treatment of bovine respiratory disease: Current limitations and perspectives. *Front Vet Sci.* 2017 Aug 29;4(AUG).
 29. Kuo HC, Wei HW, Chang CD, Chou CC, Tu C, Liao JW, et al. Molecular detection of florfenicol and chloramphenicol resistance among *Escherichia coli* isolates from healthy pigs during 2003 to 2007. *J Food Drug Anal.* 2009 Jun;17(3).
 30. Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc.* 2019 Oct 1;14(10):2986–3012.

31. Li S, Huang J, Ren L, Jiang W, Wang M, Zhuang L, et al. A one-step, one-pot CRISPR nucleic acid detection platform (CRISPR-top): Application for the diagnosis of COVID-19. *Talanta*. 2021 Oct 1;233.
32. Ensor VM, Shahid M, Evans JT, Hawkey PM. Occurrence, prevalence and genetic environment of CTX-M β -lactamases in Enterobacteriaceae from Indian hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Dec;58(6):1260–3.
33. Maciuca IE, Williams NJ, Tuchilus C, Dorneanu O, Guguianu E, Carp-Carare C, et al. High prevalence of Escherichia coli-producing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in poultry and human clinical isolates in Romania. *Microb Drug Resist*. 2015 Dec 1;21(6):651–62.
34. Araque M, Labrador I. Prevalence of fecal carriage of CTX-M-15 beta-lactamase-producing Escherichia coli in healthy children from a rural andean village in Venezuela. *Osong Public Heal Res Perspect*. 2018;9(1):9–15.
35. Salgado-Caxito M, Benavides JA, Adell AD, Paes AC, Moreno-Switt AI. Global prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase producing-Escherichia coli in dogs and cats – A scoping review and meta-analysis. *One Heal*. 2021 Jun 1;12.
36. Li P, Zhu T, Zhou D, Lu W, Liu H, Sun Z, et al. Analysis of Resistance to Florfenicol and the Related Mechanism of Dissemination in Different Animal-Derived Bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Jul 31;10.
37. Murray M, Salvatierra G, Dávila-Barclay A, Ayzanoa B, Castillo-Vilcahuaman C, Huang M, et al. Market Chickens as a Source of Antibiotic-Resistant Escherichia coli in a Peri-Urban Community in Lima, Peru. *Front Microbiol*. 2021;12.
38. Lu J, Zhang J, Xu L, Liu Y, Li P, Zhu T, et al. Spread of the florfenicol resistance

- floR gene among clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018 Nov 1;7(1).
39. Verner-Jeffreys DW, Brazier T, Perez RY, Ryder D, Card RM, Welch TJ, et al. Detection of the florfenicol resistance gene floR in *Chryseobacterium* isolates from rainbow trout. Exception to the general rule? *FEMS Microbiol Ecol*. 2017 Apr 1;93(4).
 40. Tipper DJ, Strominger JL. MECHANISM OF ACTION OF PENICILLINS: A PROPOSALBASED ON THEIR STRUCTURAL SIMILARITYTO ACYL-D-ALANYL-D-ALANINE. Vol. 54, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1965.
 41. Georgopapadakou N, Hammarstrom S, Strominger JL. Isolation of the penicillin-binding peptide from D-alanine carboxypeptidase of *Bacillus subtilis* (penicilloyl-carboxypeptidase/peptide fragments/ester bond). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(3):1009–12.
 42. Fernandes R, Amador P, Prudêncio C. β -Lactams: Chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. Vol. 24, *Reviews in Medical Microbiology*. 2013. p. 7–17.
 43. Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases. Vol. 62, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology; 2018.
 44. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care*. 2020;8(1):1–13.
 45. Ambler R. The structure of Beta-lactamases [Internet]. Vol. 289, *Trans. R. Soc. Lond. B*. 1980. Available from: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/>

46. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1211–33.
47. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. Vol. 54, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2010. p. 969–76.
48. Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. Vol. 9, *Current Opinion in Microbiology.* 2006. p. 466–75.
49. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. Vol. 3, *Frontiers in Microbiology.* Frontiers Research Foundation; 2012.
50. Shawa M, Furuta Y, Mulenga G, Mubanga M, Mulenga E, Zorigt T, et al. Novel chromosomal insertions of ISEcp1-bla CTX-M-15 and diverse antimicrobial resistance genes in Zambian clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2021 Dec 1;10(1).
51. Mazumder R, Abdullah A, Ahmed D, Hussain A. High prevalence of bla_{CTX-M-15} gene among extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing extraintestinal infections in Bangladesh. *Antibiotics.* 2020 Nov 1;9(11):1–11.
52. Akenten CW, Khan NA, Mbwana J, Krumkamp R, Fosu D, Paintsil EK, et al. Carriage of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* among children in rural Ghana: a cross-sectional study. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2023 Dec 1;12(1).
53. Almogbel M, Atheban A, Alenezi M, Al-Motair K, Menezes G. CTX-M-15 Positive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Outbreak in the Neonatal Intensive Care Unit of a Maternity Hospital in Ha'il, Saudi Arabia. *Dovepress.* 2021;14:2843-

28–49.

54. Brisse S, Diancourt L, Laouénan C, Vigan M, Caro V, Arlet G, et al. Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum- β - lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: Group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes. *J Clin Microbiol*. 2012 Sep;50(9):2974–81.
55. Schlünzen F, Zarivach R, Harms J, Bashan A, Tocilj A, Albrecht R, et al. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria [Internet]. 2001. Available from: www.nature.com
56. Dunkle JA, Xiong L, Mankin AS, Cate JHD. Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *PNAS* [Internet]. 2010; Available from: www.pnas.org/lookup/suppl/
57. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. Vol. 28, *FEMS Microbiology Reviews*. 2004. p. 519–42.
58. (EFSA) European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Chloramphenicol in food and feed. Vol. 12, *EFSA Journal*. Wiley-Blackwell Publishing Ltd; 2014 Nov.
59. Cannon M, Harford S, Darks J. A comparative study on the inhibitory actions of chloramphenicol, thiamphenicol and some fluorinated derivatives [Internet]. Vol. 26, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1990. Available from: <http://jac.oxfordjournals.org/>
60. Wu G, Schumacher DP, Tormos W, Clark JE, Murphy BL. An Improved Industrial Synthesis of Florfenicol plus an Enantioselective Total Synthesis of Thiamphenicol

and Florfenicol. 1997.

61. Arcangioli M-AI, Leroy-Se ètrin SP, Martel J-L, Chaslus-Dancla E. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;
62. Kadlec K, Kehrenberg C, Schwarz S. Efflux-mediated resistance to florfenicol and/or chloramphenicol in *Bordetella bronchiseptica*: Identification of a novel chloramphenicol exporter. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Feb;59(2):191–6.
63. Braibant M, Chevalier J, Chaslus-Dancla E, Pagès JM, Cloeckaert A. Structural and functional study of the phenicol-specific efflux pump floR belonging to the major facilitator superfamily. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jul;49(7):2965–71.
64. Cloeckaert A, Baucheron S, Flaujac G, Schwarz S, Kehrenberg C, Martel J-L, et al. Plasmid-Mediated Florfenicol Resistance Encoded by the floR Gene in *Escherichia coli* Isolated from Cattle. *Antimicrob AGENTS ANDCHEMOTHERAPY.* 2000;44(10):2858–60.
65. Qian C, Liu H, Cao J, Ji Y, Lu W, Lu J, et al. Identification of floR Variants Associated With a Novel Tn4371-Like Integrative and Conjugative Element in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Jun 21;11.
66. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* 2005 Feb;60(2):174–82.
67. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology.* 2009;155(3):733–40.

68. Larry Snyder, Joseph E. Peters, Tina M. Henkin WC. Phage Defense Mechanisms. In: *Molecular Genetics of Bacteria*, 4th Edition. 2013. p. 311.
69. Swarts DC, Jinek M. Mechanistic Insights into the cis- and trans-Acting DNase Activities of Cas12a. *Mol Cell*. 2019 Feb 7;73(3):589-600.e4.
70. Feng W, Newbigging AM, Tao J, Cao Y, Peng H, Le C, et al. CRISPR technology incorporating amplification strategies: molecular assays for nucleic acids, proteins, and small molecules. Vol. 12, *Chemical Science*. Royal Society of Chemistry; 2021. p. 4683–98.
71. Stella S, Mesa P, Thomsen J, Paul B, Alcón P, Jensen SB, et al. Conformational Activation Promotes CRISPR-Cas12a Catalysis and Resetting of the Endonuclease Activity. *Cell*. 2018 Dec 13;175(7):1856-1871.e21.
72. Li S-Y, Cheng Q-X, Liu J-K, Nie X-Q, Zhao G-P, Wang J. CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA. *Cell Res* [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41422-018->
73. Gong L, Jin Z, Liu E, Tang F, Yuan F, Liang J, et al. Highly Sensitive and Specific Detection of Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-1* by CRISPR-Based Platform. *Microbiol Spectr*. 2022 Oct 26;10(5).
74. Chen H, Li B, Shi S, Zhou T, Wang X, Wang Z, et al. Au–Fe₃O₄ nanozyme coupled with CRISPR-Cas12a for sensitive and visual antibiotic resistance diagnosing. *Anal Chim Acta*. 2023 Apr;1251:341014.
75. Xu H, Tang H, Li R, Xia Z, Yang W, Zhu Y, et al. A New Method Based on LAMP-CRISPR–Cas12a-Lateral Flow Immunochromatographic Strip for Detection. *Infect Drug Resist*. 2022;15:685–96.
76. Kang Mao HZFRHCRFWDXLZY. Portable biosensor combining CRISPR/Cas12a

- and loop-mediated isothermal amplification for antibiotic resistance gene *ermB* in wastewater. *J Hazard Mater.* 2024;
77. Larsson A. AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics.* 2014 Feb 27;30(22):3276–8.
 78. Edgar RC. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(5):1792–7.
 79. Yoon H, Leitner T. PrimerDesign-M: A multiple-alignment based multiple-primer design tool for walking across variable genomes. *Bioinformatics.* 2015 May 1;31(9):1472–4.
 80. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012 Aug;40(15).
 81. Njage PMK, Buys E. A high resolution DNA melting curve analysis for the rapid and efficient molecular diagnostics of extended spectrum β -lactamase determinants from foodborne *Escherichia coli*. *Microorganisms.* 2020 Jan 1;8(1).
 82. Dhanji H, Doumith M, Clermont O, Denamur E, Hope R, Livermore DM, et al. Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* and its CTX-M-15-like extended-spectrum β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Oct;36(4):355–8.
 83. Zhu D, Wei X, Zhu H, Yang Z, Wang M, Jia R, et al. Emergence of plasmid-mediated tigeicycline, β -lactam and florfenicol resistance genes *tet(X)*, *blaOXA-347* and *floR* in *Riemerella anatipestifer* isolated in China. *Poult Sci* [Internet]. 2022;101(10):102057. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102057>
 84. Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin JD, Fernandez JP, Mis EK, Khokha MK, et al. CRISPRscan: Designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9

- targeting in vivo. *Nat Methods*. 2015 Sep 29;12(10):982–8.
85. Labun K, Montague TG, Krause M, Torres Cleuren YN, Tjeldnes H, Valen E. CHOPCHOP v3: Expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jul 1;47(W1):W171–4.
 86. Mathews DH. Predicting RNA secondary structure by free energy minimization. *Theor Chem Acc*. 2006 Aug;116(1–3):160–8.
 87. Thermo Scientific. TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit, #K0441 [Internet]. 2014. Available from: www.thermoscientific.com/onebio
 88. Zymo Research. RNA Clean & Concentrator™-5 Clean-up RNA from any sample Highlights. 2023.
 89. Zymo Research. Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit. 2023.
 90. Graham TGW, Darzacq CD, Dailey GM, Nguyenla XH, Dis E Van, Esbin MN, et al. Open-source RNA extraction and RT-qPCR methods for SARS-CoV-2 detection. *PLoS One*. 2021 Feb 1;16(2 February).
 91. Mendoza-Rojas G, Sarabia-Vega V, Sanchez-Castro A, Tello L, Cabrera-Sosa L, Nakamoto JA, et al. A low-cost and open-source protocol to produce key enzymes for molecular detection assays. *STAR Protoc*. 2021 Dec 17;2(4).
 92. Istvan Lazar Jr., PhD Istvan Lazar Sr., PhD Cs. GelAnalyzer 19.1 [Internet]. Available from: www.gelanalyzer.com
 93. Apple. iPhone Manual del usuario para software iOS 7.1.
 94. Classen DC, Morningstar JM, Shanley JD. Detection of Antibody to Murine Cytomegalovirus by Enzyme-Linked Immunosorbent and Indirect Immunofluorescence Assays. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*.

- 1987.
95. ZYMO RESEARCH. Oligo Clean & Concentrator™. 2023.
 96. Armbruster DA, Pry T. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. Vol. 29, Clin Biochem Rev. 2008.
 97. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information. Am Soc Microbiol [Internet]. 2012;(December 2009):1–13. Available from: <https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>
 98. Cockerill F (Franklin), Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-first informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011. 165 p.
 99. Franklin R. Cockerill. M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition [Internet]. 2012. Available from: www.clsi.org.
 100. Donner A, Eliasziw M. A GOODNESS-OF-FIT APPROACH TO INFERENCE PROCEDURES FOR THE KAPPA STATISTIC: CONFIDENCE AND SAMPLE SIZE ESTIMATION INTERVAL CONSTRUCTION, SIGNIFICANCE-TESTING A N D. Vol. 11, STATISTICS IN MEDICINE. 1992.
 101. BIOTEK. Operator’s Manual Hybrid Multi-Mode Microplate Reader Synergy™ H1. 2012.
 102. GraphPad Software LJC. One-way ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparisons test was performed using GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA [Internet]. [cited 2021 Aug 2]. Available from: www.graphpad.com

103. STATA 17. kappa-Interrater agreement.
104. Sheskin DJ. PARAMETRIC and NONPARAMETRIC STATISTICAL PROCEDURES SECOND EDITION [Internet]. Vol. 2. 2000. Available from: www.crcpress.com
105. Sharp PA, Sugden B, Sambrook J. Haemophilus parainjuensae Using Analytical Agarose-Ethidium Bromide Electrophoresis. 1973.
106. Cohen J. A COEFFICIENT OF AGREEMENT FOR NOMINAL SCALES. Educ Psychol Meas. 1960;
107. Bakker E. Is the DNA sequence the gold standard in genetic testing? Quality of molecular genetic tests assessed. Vol. 52, Clinical Chemistry. 2006. p. 557–8.
108. Martinez AN, Britto CFPC, Nery JAC, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of Mycobacterium leprae DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. J Clin Microbiol. 2006 Sep;44(9):3154–9.
109. Wang C, Ye Q, Jiang A, Zhang J, Shang Y, Li F, et al. Pseudomonas aeruginosa Detection Using Conventional PCR and Quantitative Real-Time PCR Based on Species-Specific Novel Gene Targets Identified by Pangenome Analysis. Front Microbiol. 2022 May 4;13.
110. Müller V, Rajer F, Frykholm K, Nyberg LK, Quaderi S, Fritzsche J, et al. Direct identification of antibiotic resistance genes on single plasmid molecules using CRISPR/Cas9 in combination with optical DNA mapping. Sci Rep. 2016 Dec 1;6.
111. Higgins O, Chueiri A, O'Connor L, Lahiff S, Burke L, Morris D, et al. Portable Differential Detection of CTX-M ESBL Gene Variants, bla CTX-M-1 and bla CTX-M-15 , from Escherichia coli Isolates and Animal Fecal Samples Using Loop-

- Primer Endonuclease Cleavage Loop-Mediated Isothermal Amplification .
Microbiol Spectr. 2023 Feb 14;11(1).
112. Ertl NG, Irwin AD, Macdonald J, Bauer MJ, Wang CYT, Harris PNA, et al. Rapid molecular detection of CMY-2, and CTX-M group 1 and 9 variants via recombinase polymerase amplification. JAC-Antimicrobial Resist. 2023 Mar 2;5(2).
113. Huber F, Lang HP, Lang D, Wüthrich D, Hinić V, Gerber C, et al. Rapid and Ultrasensitive Detection of Mutations and Genes Relevant to Antimicrobial Resistance in Bacteria. Glob Challenges. 2021 Feb;5(2):2000066.
114. Kang J, Nguyen V-T, Kim M-S. Rapid and Sensitive Detection of Antibiotic Resistance Genes by Utilizing TALEs as a Diagnostic Probe with 2D-Nanosheet Graphene Oxide. Anal Chem. 2023 Jun 27;95(25):9505–12.
115. Veenemans J, Overdeest IT, Snelders E, Willemsen I, Hendriks Y, Adesokan A, et al. Next-generation sequencing for typing and detection of resistance genes: Performance of a new commercial method during an outbreak of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2014;52(7):2454–60.
116. Wiegand I, Geiss HK, Mack D, Stürenburg E, Seifert H. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. J Clin Microbiol. 2007 Apr;45(4):1167–74.
117. Vasala A, Hytönen VP, Laitinen OH. Modern Tools for Rapid Diagnostics of Antimicrobial Resistance. Vol. 10, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Frontiers Media S.A.; 2020.

X. ANEXOS

Anexo 1. Medio líquido y agarosa de Luria-Bertoni (LB)

Medio	Preparación para 1 Litro
LB	Triptona 10g Nacl 10 g Levadura 5 g
LB agar	LB Agar 15 g

Anexo 2. Metodología de la Taq Polimerasa

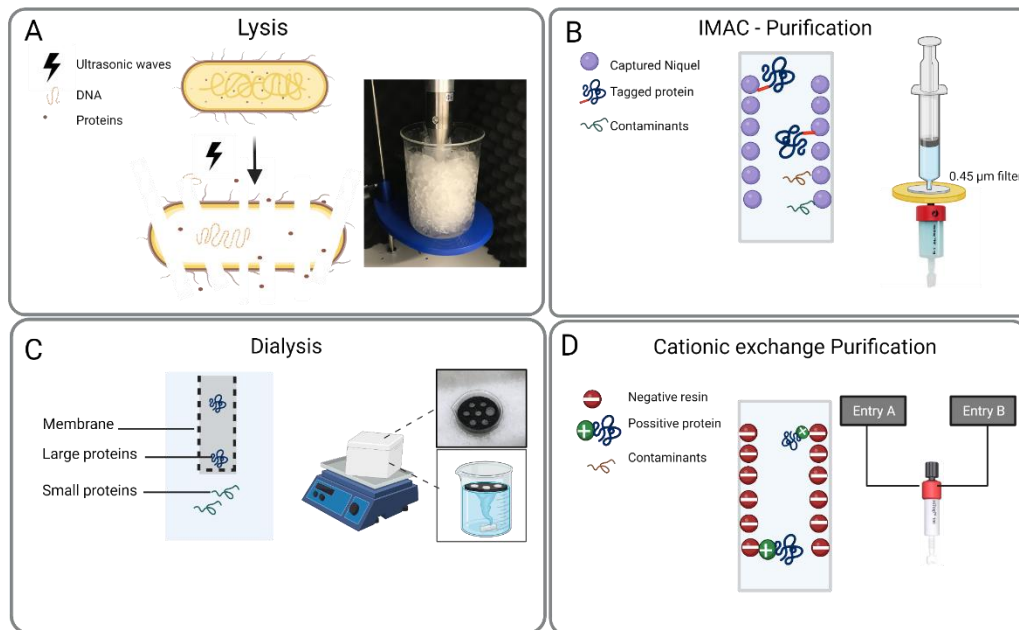
Expresión de Taq polimerasa recombinante

Las proteínas Taq polimerasa fueron expresadas en *E. coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido pET-28^a_6H-TAQ_E602D (90)). La cepa fue reactivada en agar Luria-Bertoni (LB) (Anexo 1) con kanamicina (30 µg/ml) (Cat # K1876-25G, Sigma-Aldrich) y cloranfenicol (17 µg/ml) (Cat # C0378-25G, Sigma-Aldrich). Se seleccionó una colonia de *E. coli* que creció en medio LB y se incubó en caldo LB (Anexo 1) durante 16 horas a 37°C y 150 RPM en una incubadora con agitación del modelo Incu-Shacker/Benchmark. Luego, se inocularon ocho frascos con 250 ml de LB utilizando 5 ml del cultivo anterior, se incubaron a las mismas condiciones y se añadieron 250 µl de IPTG (1 M) como inductor para alcanzar una concentración final de 1 mM. La inducción de las proteínas se verificó mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 15%. Materiales y componentes para un gel de poliacrilamida al 15%

Materials	Components
SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 15 %	(SDS 10%, TEMED, Acrilamida), Sample buffer o buffer de muestra (SDS +), Buffer de staining y distaining (Azul de Comassie, ácido acético 10%, alcohol 70%)
Marcador de peso proteico	Thermo Scientific Cat # 26610

El volumen total de inducción (2 L) se centrifugó a 5000 RPM en una centrifugadora refrigerada preparativa (MF 48-R, Awel) durante 5 minutos a 4°C en tubos cónicos de 50 ml. Se removió el sobrenadante y se añadieron 15 ml de *buffer* TAKM (Anexo 3). Luego, se centrifugó en las mismas condiciones anteriores y se repitió este proceso tres veces para asegurar el lavado del pellet. El pellet obtenido en dos tubos cónicos se pesó y se añadió *buffer* de lisis celular (Anexo 3) en una proporción de 5 ml por gramo de pellet. En total, se agregaron 15 ml y 17 ml respectivamente. Para la lisis celular, se agregó el *buffer* de lisis (17 ml), benzamidina (0.8 mM) y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) (170 µg/ml). Posteriormente, se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones previas (5000 RPM durante 5 minutos a 4°C).

La lisis celular se realizó mediante el método de sonicación, que utiliza ondas sonoras para la ruptura de la pared celular (Anexo 2—Figura 1). Las condiciones del sonicador (Pulse 150 Ultrasonic Homogenizer, Benchmark) fueron un tiempo total de 15 minutos con intervalos de dos segundos ON y tres segundos OFF, a una potencia del 50% y un porcentaje de lisis mayor al 93%, según el manual de operaciones del equipo. Una vez finalizada la sonicación, la muestra se centrifugó a 12000 RPM y 4°C durante 45 minutos.



Anexo 2 – Figura 1. Obtención de la Taq ADN Polimerasa. **A)** Lisis celular mediante sonicación. **B)** Purificación de Taq Pol por Cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés). **C)** Diálisis de la proteína. **D)** Purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico
Fuente: Elaboración propia

Purificación de Taq polimerasa recombinante

Purificación mediante IMAC

La purificación de la Taq Polimerasa se llevó a cabo utilizando la columna HisTrap FF (Cat # 11000458, Cytiva) de 5 ml, que contiene iones de níquel (Ni^{2+}) inmovilizados en una resina de sefarosa. Las proteínas Taq Polimerasa recombinantes con poli-histidinas se retuvieron en la columna debido a su afinidad por los iones y se eluyeron utilizando un gradiente de imidazol (Anexo 2-Figura 1B). El sobrenadante obtenido después de la sonicación y centrifugación se filtró en una membrana de 0.45 µM (Cat # 10418024, Merck) y se cargó en la columna previamente equilibrada con 10 ml de *buffer* TaB1 (Anexo 3). Se realizaron lavados con 10 ml de TaB2 y TaB3 (Anexo 3), y la elución se llevó a cabo con 8 ml de

TaB4 (Anexo 3), recolectando 0.5 ml en 16 tubos de 1,5 ml. Para limpiar la columna, se utilizó 5 ml de *buffer* TaB1 con 10 ml de agua ultrapura y se almacenó con una solución de etanol al 20%. La pureza de las fracciones se evaluó mediante un gel de poliacrilamida al 15% (Anexo 3-4), seleccionando las fracciones con bandas específicas al tamaño esperado de la proteína. Las fracciones seleccionadas se combinaron en un volumen de 3 ml.

Diálisis

La mezcla purificada se sometió a diálisis utilizando una membrana de tamaño de poro máximo (MWCO) de 12 a 14 kDa (Cat # 71510, Cytiva), contra un litro de *buffer* TaB5 (Anexo 3) a 4°C, agitando constantemente durante 18 horas. Para garantizar una mayor estabilidad, se utilizó un flotador en el tubo de diálisis (**Anexo 2 – Figura 1C**). Posteriormente, la muestra se centrifugó a 12000 RPM a 4°C durante 2 minutos y el sobrenadante se transfirió a tubos de 1.5 ml.

Purificación mediante intercambio catiónico

En el último paso de purificación, se utilizó la columna HiTrap Heparin HP (Cat # 17040701, Cytiva) con su resina de carga negativa para capturar la proteína en un *buffer* de bajo pH, y posteriormente se utilizó una mayor concentración de NaCl en el *buffer* TaB6 (Anexo 3) para eluir la proteína de la columna (**Anexo 2 – Figura 1D**). Se empleó un sistema de cromatografía líquida de proteínas rápidas FPLC (AKTA start, Cytiva) con la columna HiTrap Heparin HP, realizando lavados iniciales en las Entradas A y B del equipo FPLC, con 5 ml y 10 ml, respectivamente. La proteína dializada (3 ml) se cargó en la columna previamente equilibrada con 10 ml de *buffer* TaB5. La elución se realizó con 5 ml de TaB6, y se recolectaron las

fracciones de elución en tubos de 1.5 ml. Se llevó a cabo la limpieza en ambas entradas del sistema FPLC con 5 ml de TaB5 y 10 ml de agua ultrapura. Las fracciones seleccionadas, mediante el análisis en gel de poliacrilamida, se dializaron con TaB7 (Anexo 3-4) y finalmente, la enzima Taq Polimerasa se almacenó en el *buffer* TaB7 a -80°C

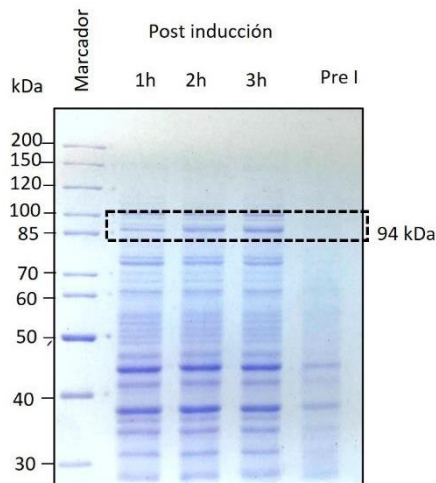
Anexo 3. Componentes del Buffer para lisis celular y purificación Taq Polimerasa

Chromatographic column	Purpose	Name	Components
	Lysis	TAKM	50 mM Tris-HCl pH: 7.4, 70 mM CH ₃ COONH ₄ , 30 mM KCl, 10mM MgCl ₂
HisTrap FF	Equilibration	TaB1	50 mM Tris-HCl pH:8, 500 mM NaCl, 0.1% NP-40 and 0.1% Triton X-100
	Wash1	TaB2	50 mM Tris-HCl pH:8, 500 mM NaCl, 0.05% NP-40, 5% glycerol, 10 mM imidazole, 6 mM β-Mercaptoethanol
	Wash2	TaB3	50 mM Tris-HCl pH:8, 100 mM NaCl, 0.05% NP-40, 5% glycerol, 10 mM imidazole, 6 mM β-Mercaptoethanol
	Elution	TaB4	50 mM Tris-HCl pH:8, 100 mM NaCl, 0.05% NP-40, 5% glycerol, 300 mM imidazole, 6 mM β-Mercaptoethanol
HiTrap Heparin HP	Dialysis	TaB5	50 mM Tris-HCl pH:8, 100 mM NaCl, 0.05% NP-40, 10% glycerol, 6 mM β-Mercaptoethanol
	Equilibration		
	Wash		
	Elution	TaB6	50 mM Tris-HCl pH:8, 1 M NaCl, 0.05% NP-40, 10% glycerol, 6 mM β-Mercaptoethanol
	Dialysis and storage	TaB7	50 mM Tris-HCl:pH8, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glycerol
	Taq Pol Buffer	RPB5X	(200 mM Tris-HCl (pH 8.4 25°C), 300 mM KCl, 12 mM MgCl ₂ , 40% trehalose, 40 mM DTT, 0.4 mM EDTA, 1.6 mM dNTP mix
	Dilution Buffer	MLV-SV	50 mM Tris-HCl pH:8, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% Triton X-100 y 50% glycerol
	Electrophoresis	TBE 5X	89 mM Tris Base y Ácido bórico y 2 mM de EDTA

*Añadir DTT al final *Verificar el pH de TrisHCl

Anexo 4. Resultados de la producción de la proteína Taq Polimerasa

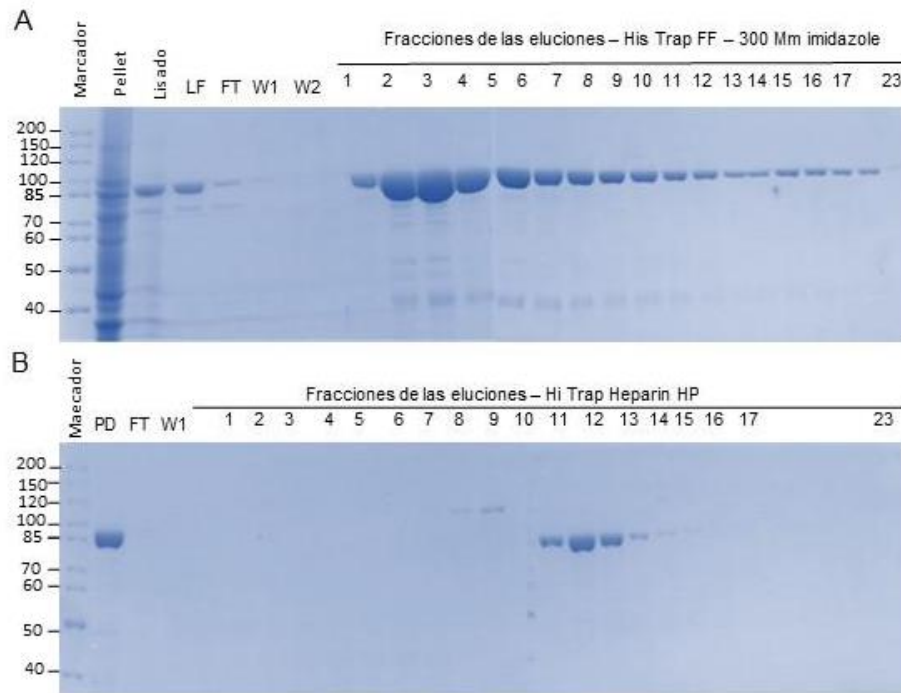
La producción de la proteína se confirmó mediante SDS-PAGE al observar una banda con un peso aproximado de 94 KDa en el gel de poliacrilamida después de 3 horas de inducción con IPTG (Anexo 4 - Figura 1).



Anexo 4 – Figura 1. Análisis de la expresión de la proteína Taq Polimerasa por SDS-PAGE (10% poliacrilamida – tinción azul de Coomassie). Inducción de la proteína Taq Polimerasa por IPTG. Se observa la aparición de la banda correspondiente a la proteína (94 kDa) durante las horas de inducción, en contraste con la ausencia de la banda en la preinducción (Pre I).

En la purificación con la columna His-Trap FF se obtuvieron 18 fracciones donde se observó la banda correspondiente a la Taq polimerasa, las cuales se mezclaron .

En la columna Hi Trap – Heparina HP, se obtuvo 3 fracciones finales (Figura 2 Anexo 4). La proteína Taq Polimerasa se cuantificó por absorbancia a 280 nm, gel de poliacrilamida y Bradford, registrándose una concentración promedio de 2.3 mg/ml. Por otro lado, para este proyecto se utilizaron alícuotas de LbCas12a producidas anteriormente por el Laboratorio de Biomoléculas de UPC.



Anexo 4 – Figura 2. Análisis de la purificación de la proteína Taq Polimerasa por SDS-PAGE (10% poliacrilamida – tinción azul de Coomassie). **A)** Purificación cromatográfica por IMAC con la columna His Trap FF. Las muestras fueron analizadas desde el pellet, el lisado por sonicación, el lisado sonicado (LF), el flujo continuo (FT) hasta los lavados (W1-W2), obteniendo un total de 23 fracciones **B)** Purificación por intercambio catiónico con la columna His Trap Heparin Hp. Las fracciones obtenidas de la purificación anterior se mezclaron (PD), se pasaron por la columna (FT) y se lavaron (W1), obteniendo fracciones purificadas de la proteína Taq Polimerasa.

Anexo 5. Componentes de los Buffers para las reacciones PCR-CRISPR-Cas12a

Nombre	Componentes
CRB1 (1X)	100 Mm TrisHcl – 500 Mm NaCl ⊕10X BSA – 100 ug/ul
CRB2	CRB1X – 15 Mm MgCl2

Preparación del Buffer CRB2 en diferentes concentraciones de Magnesio para una reacción

[] MgCl ₂	7.5 nM	10 nM	15 Nm	20 nM	25 Nm
MgCl ₂ (1 M)	0.9 µl	1.2 µl	1.8 µl	2.4 µl	3 µl
CRB1	101.1 µl	100.8 µl	100.2 µl	99.6 µl	99 µl

Total	μl
-------	----

Anexo 6. Drive Alineamiento – genes de resistencia

https://drive.google.com/drive/folders/10Cn16Vv-4ksbxf3t6Mgs_ZdYjuG8EWE?usp=drive_link

Anexo 7. Punto de corte

Determinación del punto de corte para la detección del gen *bla_{CTX-M-15}*

<i>bla_{CTX-M-15}</i>								
	Fluorescencia cruda				Razón de fluorescencia			
Muestras	15	30	45	60	15	30	45	60
NEC 1	895.44	1343.40	1833.00	2322.40	0.95	1.09	1.21	1.28
NEC 2	1035.38	2886.87	3354.87	3829.13	1.10	1.15	1.20	1.23
NEC 3	1028.63	2423.60	2758.53	3127.67	1.09	1.08	1.07	1.07
NEC 4	1106.88	4545.00	5407.60	6242.00	1.17	1.46	1.67	1.84
NEC 5	945.94	1659.13	1836.07	2004.13	1.01	0.91	0.83	0.79
NEC 6	879.19	1526.47	1680.60	1835.33	0.94	0.85	0.78	0.73
NEC 7	988.13	2155.67	2444.27	2724.80	1.05	1.02	1.00	0.97
NEC 8	870.94	1685.33	1863.67	2056.87	0.93	0.87	0.82	0.78
NEC 9	901.38	1718.27	1914.13	2119.00	0.96	0.88	0.84	0.80
NEC 10	951.06	2355.87	2699.93	3049.13	1.01	1.03	1.03	1.04
Average	960.29	2229.96	2579.27	2931.05	1.02	1.03	1.05	1.05
SD	63.57	658.30	780.77	904.75	0.07	0.13	0.19	0.24
Cut off	1150.99	4204.86	4921.59	5645.29	1.22	1.42	1.62	1.78

Determinación del punto de corte para la detección del gen *floR*

<i>floR</i>								
	Fluorescencia cruda				Razón de fluorescencia			
Muestras	15	30	45	60	15	30	45	60
NEC 1	776.94	890.07	1001.73	1113.73	0.79	0.77	0.77	0.76
NEC 2	971.13	1086.20	1230.00	1375.87	0.99	0.94	0.94	0.94
NEC 3	899.63	1037.87	1154.53	1300.40	0.92	0.90	0.89	0.89
NEC 4	1008.69	1162.73	1332.00	1500.87	1.03	1.01	1.02	1.02
NEC 5	947.69	1093.87	1271.00	1439.27	0.97	0.95	0.98	0.98
NEC 6	1048.13	1194.20	1339.87	1486.00	1.07	1.04	1.03	1.01
NEC 7	1047.38	1264.87	1502.13	1746.80	1.07	1.10	1.15	1.19

NEC 8	888.56	1036.33	1189.73	1351.73	0.91	0.90	0.91	0.92
NEC 9	967.44	1118.67	1275.33	1423.60	0.99	0.97	0.98	0.97
NEC 10	774.56	894.20	1009.53	1139.93	0.79	0.78	0.78	0.78
Average	933.01	1077.90	1230.59	1387.82	0.95	0.94	0.94	0.951
SD	78.47	90.63	113.48	131.49	0.08	0.08	0.09	0.09
Cut off	1168.43	1349.78	1571.03	1782.28	1.19	1.17	1.21	1.21