



Universidad
Católica
de Valencia
San Vicente Mártir

Facultad de Medicina

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Desarrollo de una técnica de microscopía para la identificación
rápida del nivel de sensibilidad-resistencia de *Streptococcus
pneumoniae* a levofloxacino**

Iria Fernández Cajigal

Tutores: Fátima María Otero Fariña y Javier Puertas Cuesta

Junio 2021

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. El problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos	
1.2. Quinolonas	
1.3. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
1.4. Antibiogramas	
1.5. Técnica de lisis en microgel (Micromax®)	
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
3.1. Cepas bacterianas y determinación de la CMI	
3.2. Técnica de lisis en microgel (Micromax®)	
3.3. Dosis-respuesta	
3.4. Correlación con la CMI	
3.5. Discriminación entre cepas sensibles y cepas resistentes	
3.6. Análisis estadístico	
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Protocolo técnico	
4.2. Efecto de la incubación con levofloxacino	
4.3. Dosis-Respuesta	
4.4. Correlación con la CMI	
4.5. Discriminación entre cepas sensibles y cepas resistentes	
5. DISCUSIÓN.....	33
5.1. Protocolo técnico y mecanismo	
5.2. Interés	
5.3. Limitaciones	
6. CONCLUSIONES.....	38
7. BIBLIOGRAFÍA.....	39
8. ANEXOS.....	43

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

APUA: Alianza para el Uso Prudente de Antibióticos

AUC: Area Under the ROC Curve, o Area bajo la curva ROC

CDC: Centros para el Control de Enfermedades

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

ECDC: Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades

E-test: Épsilon test

E. coli: Escherichia coli

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

IC: Intervalo de Confianza

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight

NAG: N-acetil-D-glucosamina

NAM: Ácido N-acetilmurámico

OD600: Densidad óptica a 600 nanómetros (nm)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBPs: Penicillin-Binding Proteins

PRAN: Plan nacional contra la resistencia a los antibióticos

Qnr: Quinolone resistance

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa

QRDR: Quinolone-Resistance Determining Region

R: Resistente

ROC: Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor

S: Sensible

S. pneumoniae: Streptococcus pneumoniae

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

TBE: Tris-Borato-Ácido etilendiaminotetraacético

RESUMEN

Antecedentes

La resistencia bacteriana a los antibióticos es una seria amenaza sanitaria a nivel mundial. *Streptococcus pneumoniae* es un patógeno gram-positivo que ha ido desarrollando un alto nivel de resistencia a β -lactámicos y macrólidos. Todavía mantiene una alta sensibilidad a las quinolonas, como el levofloxacino. Estos antibióticos inducen la letalidad mediante la fragmentación del ADN bacteriano. Pero su mal uso puede favorecer el desarrollo y extensión de cepas resistentes.

Los antibiogramas clásicos, basados en la evaluación del crecimiento bacteriano, requieren tiempo. Un antibiograma rápido permitiría una prescripción rápida y eficaz, previniendo las resistencias. En este trabajo, la técnica Micromax®, desarrollada para bacilos gram-negativos, ha sido adaptada para evaluar con rapidez el efecto del levofloxacino en cepas clínicas de *S. pneumoniae*.

Material y Métodos

Las bacterias (n= 44), con diferentes niveles de concentración mínima inhibitoria (CMI) para levofloxacino, fueron incubadas con la quinolona 1 hora en medio de cultivo líquido y luego tratadas con una mezcla de lisozima y mutanolisina, para debilitar la pared bacteriana. Posteriormente se incluyeron en un microgel inerte sobre un portaobjetos, se incubaron con una solución de lisis, se deshidrataron, el ADN se tiñó con un fluorocromo de alta sensibilidad y se observaron con el microscopio de fluorescencia.

Resultados

Una proporción de las bacterias aparecieron lisadas, liberando su ADN al microgel. En este grupo, unas mostraron su ADN intacto y un porcentaje lo evidenció fragmentado. Con respecto al cultivo control sin antibiótico, el aumento del porcentaje de bacterias con ADN fragmentado dentro de las lisadas, se demostró como el parámetro de elección para determinar el nivel de sensibilidad o resistencia de la cepa, dado que (1) se incrementó progresivamente con la concentración de levofloxacino, de modo mucho más prominente en una cepa sensible que en otra resistente; y (2) disminuyó gradualmente a medida que aumentaba la CMI de la cepa.

Preliminarmente, con las cepas examinadas, la curva ROC evidenció que cuando el valor de este parámetro era igual o menor a 9,07, la cepa de *S. pneumoniae* es resistente, con un 100% de sensibilidad y 97,4% de especificidad.

Conclusión

La técnica permite la determinación de la sensibilidad o resistencia de *S. pneumoniae* a levofloxacino en 2 horas. Esto podría ayudar a una prescripción rápida y efectiva del antibiótico, mejorando la supervivencia del paciente, previniendo el desarrollo de resistencias y ayudando a preservar un antibiótico todavía efectivo.

ABSTRACT

Background

Bacterial resistance to antibiotics is a serious health threat worldwide. *Streptococcus pneumoniae* is a gram-positive pathogen that has developed a high level of resistance to β -lactams and macrolides. It still maintains a high sensitivity to quinolones, such as levofloxacin. These antibiotics induce lethality by fragmentation of bacterial DNA. But its misuse can favor the development and spread of resistant strains.

Classical antibiograms, based on the evaluation of bacterial growth, require time. A rapid antibiogram will allow a fast and effective prescription, preventing resistance. In this work, the Micromax® technique, developed for gram-negative bacilli, has been adapted to rapidly evaluate the effect of levofloxacin on clinical strains of *S. pneumoniae*.

Material and Methods

Bacteria (n = 44), with different levels of minimum inhibitory concentration (MIC) for levofloxacin, were incubated with the quinolone for 1 hour in liquid culture medium and then treated with a mixture of lysozyme and mutanolysin, to weaken the bacterial cell wall. Subsequently, they were included in an inert microgel on a slide, incubated with a lysis solution, dehydrated, and the DNA was stained with a high sensitivity fluorochrome, to be observed with the fluorescence microscope.

Results

A proportion of the bacteria appeared lysed, releasing their DNA to the microgel. In this group, a percentage showed that its DNA was fragmented. With respect to the control culture without antibiotics, the increase in the percentage of bacteria with fragmented DNA within the lysated population, was demonstrated as the parameter of choice to determine the level of sensitivity or resistance of the strain, since (1) progressively increased with the levofloxacin concentration, much more prominent in a susceptible strain than in a resistant one; and (2) gradually decreased as the MIC of the strain increased. Preliminarily, with the strains examined, the ROC curve showed that when the value of this parameter was equal to or less than 9.07, the *S. pneumoniae* strain is resistant, with 100% sensitivity and 97.4% specificity.

Conclusion

The technique allows the determination of the sensitivity or resistance of *S. pneumoniae* to levofloxacin in 2 hours. This could allow a rapid and effective

prescription of the antibiotic, improving patient survival, preventing the development of resistance and helping to preserve a still effective antibiotic.

Palabras clave: neumococo, quinolona, levofloxacino, resistencia bacteriana, fragmentación del ADN, test rápido

Key words: pneumococcus, quinolone, levofloxacin, bacterial resistance, DNA fragmentation, rapid test

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos

El uso de antibióticos se ha expandido en los últimos decenios. No solo se emplean en la terapia de enfermedades infecciosas en humanos, sino también a nivel veterinario y en la industria alimentaria, como preventivo de enfermedades o para favorecer el crecimiento.^{1,2} Esta exposición extensa y continuada supone una presión selectiva sobre los microorganismos, eliminándose progresivamente la mayor parte de las bacterias sensibles y seleccionándose las cepas con mutaciones que generan resistencia. El mal uso, a dosis o tiempos inadecuados, las indicaciones erróneas, y el abuso de antibióticos de amplio espectro, favorecen la aparición de resistencias en la flora habitual del individuo. Las mutaciones causales pueden no solo tener lugar a nivel del cromosoma bacteriano, sino que frecuentemente se relacionan con elementos móviles extracromosómicos, como plásmidos y transposones. En consecuencia, además de transmisión vertical a las bacterias hijas, estos elementos pueden ser transferidos horizontalmente a otras cepas de la misma u otra especie.^{3,4} De este modo se van generando cepas multirresistentes, que suponen una amenaza sanitaria mundial.

Agencias como la Organización Mundial de la Salud (OMS), los Centros para el Control de Enfermedades (CDC), la Alianza para el Uso Prudente de Antibióticos (APUA), alertan del crecimiento exponencial de la resistencia a los antimicrobianos a nivel mundial. A este fenómeno se suma el escaso desarrollo de nuevos antibióticos.⁵ El Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) estima que las bacterias resistentes a los antibióticos en la UE causan alrededor de 33.000 muertes cada año, con un coste de más de 1.500 millones de euros anuales.⁶ En Estados Unidos, anualmente se reconocen 2,8 millones de infecciones resistentes a los antibióticos, con más de 35.000 muertes.⁷ Según el plan nacional contra la resistencia a los antibióticos (PRAN 2019-2021), España está, de modo persistente, entre los países que más antibióticos consumen. Los β -lactámicos y las quinolonas suponen la mayoría del consumo.⁸

Habitualmente se aplican terapias antibióticas empíricas que, si no son adecuadas, aumentan la mortalidad. La administración urgente del antibiótico correcto puede ser clave en el éxito terapéutico, en determinadas situaciones clínicas, por ejemplo, en

pacientes inmunocomprometidos. Esto, además, reduce el coste sanitario y la aparición y propagación de resistencias.^{9, 10}

1.2. Quinolonas

Las quinolonas son antibióticos de amplio espectro que matan a las bacterias con relativa rapidez.¹¹ Sus dianas son las topoisomerasas de tipo II: ADN girasa y topoisomerasa IV. La ADN girasa parece ser el objetivo preferente en bacterias gram-negativas, mientras que la topoisomerasa IV se ve afectada principalmente en bacterias gram-positivas. Estas enzimas inducen roturas transitorias de la doble cadena del ADN en los cromosomas bacterianos. La ADN girasa está compuesta por dos subunidades GyrA y dos GyrB, y la topoisomerasa IV contiene dos subunidades ParC y dos ParE.

Las topoisomerasas producen una rotura de la doble cadena del ADN, pasan la molécula de ADN a través de dicha rotura y luego sellan la misma. De este modo, la ADN girasa induce superenrollamiento negativo del ADN, mientras que la topoisomerasa IV relaja el superenrollamiento y decatena los cromosomas hijos tras la replicación.¹² Las quinolonas se unen a las topoisomerasas unidas al ADN, produciendo complejos ternarios quinolona-topoisomerasa-ADN. Estos complejos bloquean la replicación y transcripción, lo cual detiene el crecimiento, pero no provoca la muerte celular. Tras inducirse la rotura de la doble cadena del ADN por la topoisomerasa, la quinolona bloquea su reparación. Esto ocurre a lo largo de todo nucleóide bacteriano, el cual se fragmentará masivamente. Esta fragmentación sí parece correlacionar con la muerte celular (Figura 1).¹³⁻¹⁵

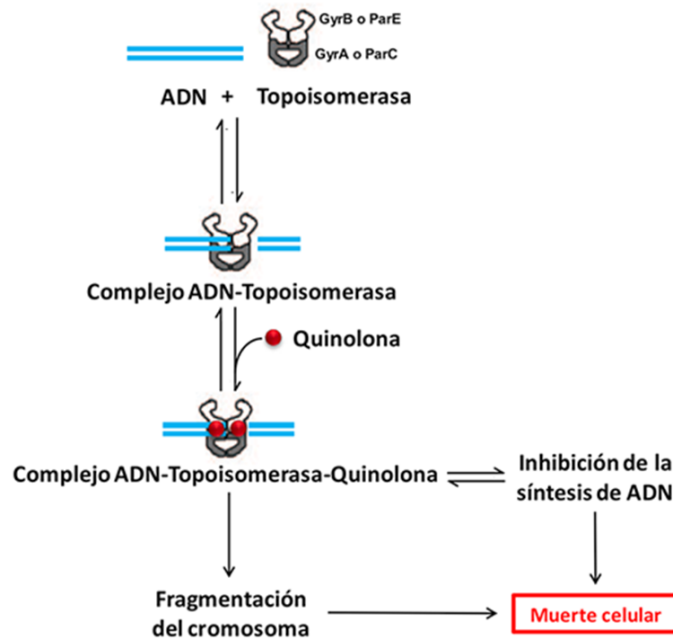


Figura 1. Mecanismo de acción de las quinolonas. Modificado de referencia ¹².

Existe una larga lista de cuatro generaciones de quinolonas, desarrolladas a lo largo de los años. Las más empleadas son las fluoroquinolonas como el ciprofloxacino, norfloxacino, moxifloxacino, levofloxacino y ofloxacino.

La resistencia a las quinolonas se debe principalmente a mutaciones, a nivel cromosómico, de los genes que codifican las subunidades GyrA de la ADN girasa y/o ParC de la topoisomerasa IV, especialmente en la región QRDR (quinolone-resistance determining region). Estas mutaciones interfieren con la unión del antibiótico. La resistencia también puede deberse a una disminución en la permeabilidad al fármaco o a un aumento de la actividad de las bombas de expulsión en la membrana. Estas modificaciones pueden acumularse progresivamente en la cepa, adquiriendo cada vez mayor nivel de resistencia.^{11, 16} Los genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos qnr (quinolone resistance) pueden conferir un nivel discreto de resistencia. Qnr pertenece a la familia de los pentapéptidos repetidos y protege a las topoisomerasas de la inhibición por las quinolonas.^{17, 18} También se han descrito enzimas inactivadoras de fluoroquinolonas, como una variante del gen que codifica la aminoglucósido acetiltransferasa AAC (6')-Ib.¹⁹

1.3. *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae es un patógeno causante del 25% de las neumonías adquiridas en la comunidad. También puede ser responsable de meningitis, así como de sinusitis paranasal, otitis media, osteomielitis, sepsis y otras infecciones.²⁰ Es una bacteria gram-positiva que suele encontrarse colonizando la nasofaringe. Tiene aspecto de coco alargado y produce altos niveles de peróxido de hidrógeno. Por ello, para cultivarlo, se suele incluir sangre en el medio nutritivo, la cual aporta catalasa que descompone el peróxido de hidrógeno.

El neumococo suele poseer una cápsula polisacárida, que tiene gran influencia en la virulencia. Se han descrito sobre 90 variantes, responsables de diferentes serotipos. Las variantes antigénicas más abundantes son la base para el desarrollo de las vacunas contra *S. pneumoniae*. Siendo una bacteria gram-positiva, su pared celular es más gruesa que las de las gram-negativas, pues tiene varias capas de peptidoglicano. Además, posee ácidos teicoicos unidos al peptidoglicano y ácidos lipoteicoicos unidos a la membrana lipídica citoplasmática, presente por debajo del peptidoglicano.

Ambos ácidos incluyen residuos de fosforilcolina, importantes para la unión a receptores de colina presentes en las células humanas.²¹

S. pneumoniae posee una característica habilidad para autodesintegrarse, debido a la presencia de la autolisina LytA. Esto suele ocurrir cuando la población alcanza la fase estacionaria o cuando la bacteria es afectada por antibióticos que inhiben la síntesis del peptidoglicano. La incubación con sales biliares (deoxicolato) u otros detergentes, activa la autolisina, provocando la respuesta autolítica en pocos minutos, por lo que este fenómeno suele emplearse para su identificación.^{22, 23}

El neumococo tiene una gran capacidad para generar resistencias a diferentes antibióticos. Además de los procesos de mutación-selección, posee un sistema de transformación natural, que permite el intercambio o incorporación de material genético exógeno a bacterias en estado fisiológico de competencia. Este mecanismo es responsable de la expansión de resistencias a antibióticos β -lactámicos, debido a que sus dianas, las proteínas de unión a penicilina (penicillin-binding proteins; PBPs), que corresponden a transpeptidasas del peptidoglicano, están alteradas, mostrando baja afinidad al antibiótico.²¹

Actualmente, en España, hasta un 10% de las cepas de neumococo se consideran resistentes a las penicilinas. En este caso, los macrólidos, como la eritromicina, claritromicina y azitromicina, son la alternativa clásica a las penicilinas. Sin embargo, la

resistencia a estos antibióticos se ha disparado, alcanzando a una cuarta parte de las cepas, por lo que ya no se pueden considerar como alternativa. Por el momento, la resistencia a las quinolonas, como el ciprofloxacino y levofloxacino, es todavía muy discreta, pero podría incrementarse.²⁴ Por este motivo sería importante preservar este tipo de antibióticos, como opción para infecciones de extrema gravedad y por cepas resistentes a los antibióticos de primera elección.

1.4. Antibiogramas

Tras el aislamiento e identificación del germen causante de la infección, los laboratorios de Microbiología realizan los antibiogramas para determinar la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos, utilizando procedimientos estandarizados basados en la evaluación de la afectación o no del crecimiento bacteriano.²⁵

Una metodología común para elaborar un antibiograma basado en la difusión en agar es la de Kirby-Bauer.²⁶ En el método semi-cuantitativo de Kirby-Bauer, se colocan varios discos que contienen diferentes antibióticos en diferentes zonas de cultivo homogéneo de bacterias ricas en nutrientes, en una placa de Petri.

Debido a que el antibiótico se difunde en el agar a partir del disco, el diámetro alrededor del disco en el que no crecen las bacterias sugiere aproximadamente la concentración mínima inhibitoria (CMI) de ese antibiótico para la cepa de bacterias cultivada (Figura 2). La CMI es la concentración más baja de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano.



Figura 2. Discos de difusión en agar de cefaclor para antibiograma Oxoid de Thermo Fisher Scientific.²⁷

Una variante más elaborada de la anterior metodología es el Épsilon test (E-test). En este caso, en vez de utilizar un disco, se utiliza una tira rectangular que contiene un gradiente de diluciones de antibiótico. En torno a cada cinta de antibiótico se forma un halo de inhibición de crecimiento bacteriano (Figura 3). Para determinar la CMI de la cepa bacteriana se observa la intersección más baja de la elipse formada con la tira de fármaco, cuyo valor asignado a ese punto se corresponde con la concentración mínima inhibitoria de fármaco para la cepa de estudio (epsilometría).



Figura 3. E-test de seis antibióticos en una cepa de agar. Imagen tomada de la página web de bioMérieux.²⁸

Un método cuantitativo habitual se basa en una serie de caldos o soluciones de agar que contengan concentraciones progresivamente más bajas del antibiótico en cuestión. La concentración más baja de antibiótico en la que las bacterias no pueden crecer proporciona la CMI. Este método cuantitativo suele emplearse de forma rutinaria en los hospitales, generalmente utilizando paneles comerciales de antibióticos y sistemas semiautomáticos de incubación y software para la interpretación de datos.²⁵

Las CMIs establecidas como puntos de corte de sensibilidad y resistencia a cada antibiótico y tipo de bacteria son establecidas por organismos reguladores como el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) o el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Los métodos de difusión y dilución se basan en el principio de inhibir la proliferación bacteriana y esto requiere tiempo suficiente para muchos ciclos reproductivos de bacterias. Pueden necesitar un mínimo de entre 18 y 24 horas. Pero muchos pacientes críticos requieren un tratamiento antibiótico rápido y eficaz. Dado el relativamente largo período de tiempo necesario para realizar el antibiograma estándar, los antibióticos se proporcionan generalmente de modo empírico, inicialmente. Este tipo de tratamiento es ineficaz en el 20-40 % de los casos, y el cambio de tratamiento, tras los resultados del antibiograma, podría ya no tener éxito. El desarrollo de un antibiograma rápido es un gran reto que puede salvar vidas y reducir los costes de atención sanitaria. Además, la prescripción rápida y efectiva minimiza el riesgo de extensión de la resistencia y puede preservar a antibióticos más recientes, de amplio espectro, o antibióticos que representan la última opción en casos de multiresistencia.^{9, 10}

Actualmente, se están desarrollando nuevas metodologías para aplicar al desarrollo de antibiogramas rápidos (revisado en ²⁹⁻³¹). La obtención de resultados de crecimiento microbiano también se puede acelerar mediante el uso de microscopía a tiempo real, que visualiza *in situ* la evolución de las bacterias. La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qPCR) permite el análisis en el tiempo del aumento de secuencias de ADN bacterianas específicas, que se relaciona directamente con el número de bacterias. De esta manera, se podrían obtener resultados al cabo de 6 horas de cultivo.²⁹⁻³¹

Además de la evaluación rápida del crecimiento bacteriano, se están desarrollando nuevos enfoques experimentales basados en la afectación o no de ciertos parámetros fisiológicos por parte de los antibióticos. Una posibilidad es la medida del calor liberado por las bacterias metabólicamente activas en el cultivo. La espectrometría de masas MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) se aplica principalmente para la identificación rápida de los microorganismos, sin embargo, también podría utilizarse para detectar las enzimas que desactivan antibióticos, mutaciones presentes en el ADN de cepas resistentes o cambios en el perfil de proteínas en microorganismos sensibles, tras la incubación con los antibióticos.²⁹⁻³¹

La citometría de flujo permite determinar cambios en la morfología, la actividad metabólica y la viabilidad de los microorganismos después de la exposición a los antibióticos. También se están desarrollando nuevos sistemas prometedores basados en genotipado y en microfluídica.²⁹⁻³¹

1.5. Técnica de lisis en microgel (Micromax®)

Una técnica de microscopía ha permitido estimar, de modo simple y rápido, la sensibilidad o resistencia a quinolonas como el ciprofloxacino, de algunas especies de bacterias gram-negativas de elevada patogenicidad, como *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.³² Las bacterias que previamente se habían incubado con la quinolona en un medio de cultivo líquido, durante 40-60 minutos, son procesadas siguiendo tres pasos fundamentales: a) inmovilización del microorganismo sobre un portaobjetos, sin fijación, mediante inclusión del mismo una fina película de microgel inerte, de agarosa; b) incubación de 5 minutos con una solución de lisis que afecta a la pared celular de todas las bacterias, por lo que el nucleóide de ADN bacteriano es liberado; c) estabilización del ADN sobre el portaobjetos, y tinción del mismo con un fluorocromo de alta sensibilidad, como el SYBR Gold (Figura 4).

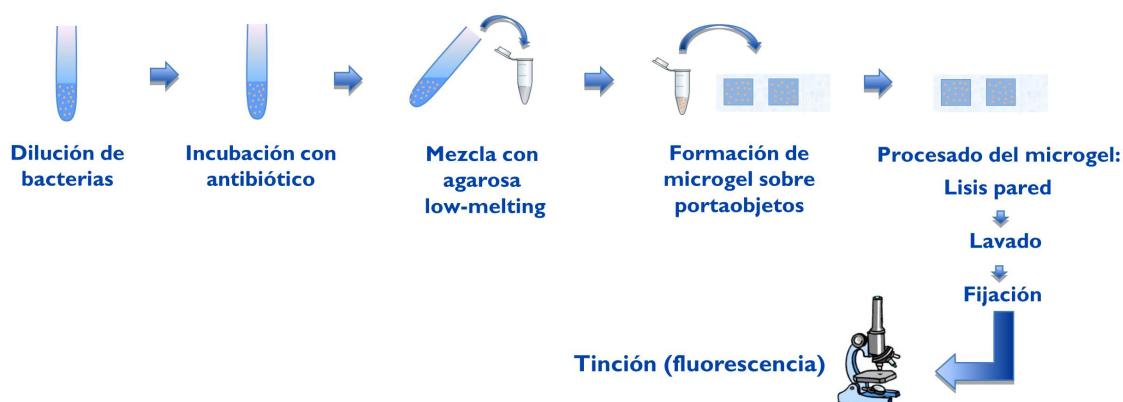


Figura 4. Esquema de la técnica Micromax® para evaluar el efecto de las quinolonas.

De este modo, bajo el microscopio de fluorescencia, es posible visualizar directamente, *in situ*, célula a célula, el ADN bacteriano, que es la diana específica de la quinolona, y determinar su integridad. En las cepas sensibles a la quinolona, el ADN se muestra fragmentado, constituyendo un gran halo periférico de puntos que han difundido de la bacteria residual central.

En las cepas resistentes, el nucleóide bacteriano se observa intacto, compacto, correspondiendo a bucles que se han extendido de la bacteria residual (Figura 5). La técnica visual es simple, con una sensibilidad y especificidad prácticamente total, en

relación con el antibiograma clásico. El resultado puede obtenerse en una hora y media, incluyendo el tiempo de incubación con el antibiótico.³²⁻³⁴

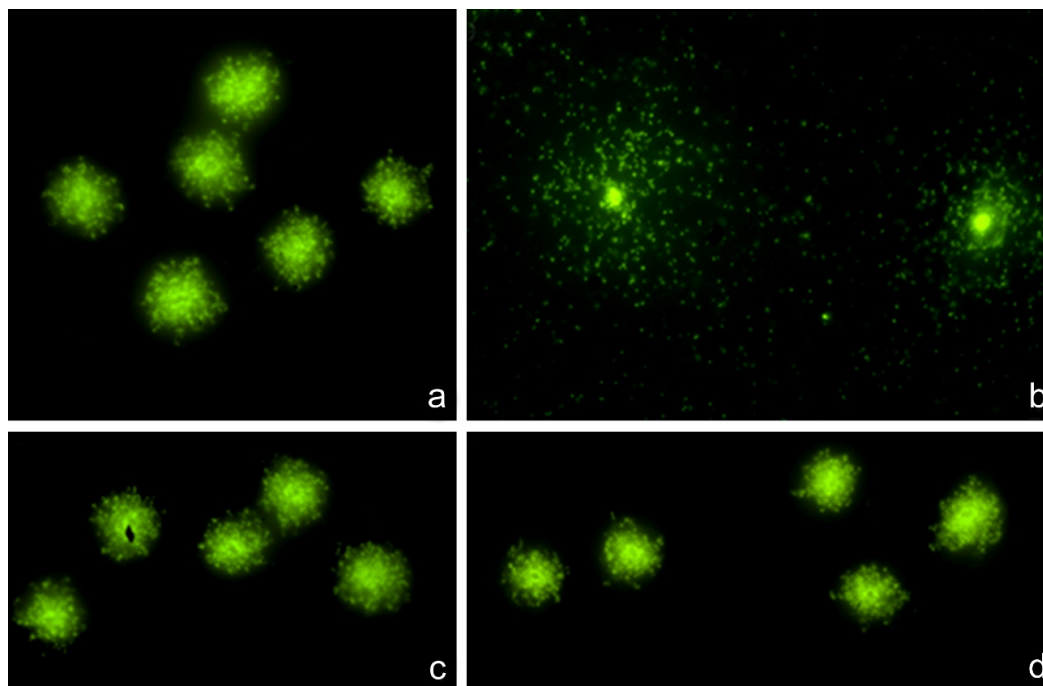


Figura 5. *E. coli* procesadas por la técnica Micromax® para determinar sensibilidad o resistencia al ciprofloxacino. Arriba (**a, b**): cepa sensible. Abajo (**c, d**): cepa resistente. Izquierda (**a, c**): cultivos control sin antibiótico. Derecha (**b, d**): cultivos tratados con ciprofloxacino. La lisis en microgel libera los nucleoides en todas las bacterias, los cuales aparecen intactos en los cultivos control sin antibiótico (**a, c**). Tras incubación con la quinolona, el cultivo sensible muestra su ADN fragmentado (**b**), mientras que el resistente no resulta afectado y los nucleoides aparecen sin fragmentación (**d**).

Esta técnica rápida para quinolonas ha sido puesta a punto en bacterias gram-negativas en las que la incubación con la solución de lisis se ha demostrado suficiente para deshacer la pared y poder liberar el ADN. Pero esa solución de lisis no es efectiva en bacterias gram-positivas, cuya pared posee varias capas de peptidoglicano. En estas bacterias se hace necesaria la incubación previa con enzimas que digieren el peptidoglicano, anterior a la solución de lisis, para poder conseguir liberar el nucleóide. En este trabajo se pretende extender la técnica de microscopía para evaluar de modo rápido la sensibilidad o resistencia a la quinolona a una bacteria gram-positiva, *S. pneumoniae*.

2. OBJETIVOS

El objetivo fundamental es diseñar y evaluar un sistema de microscopía de fluorescencia, adaptado a partir de la técnica Micromax®, para identificar de modo rápido la sensibilidad o resistencia de las cepas de *S. pneumoniae* al levofloxacino.

De modo más concreto, se pueden establecer los siguientes objetivos:

- Puesta a punto del sistema de lisis de la pared bacteriana, para observar y evaluar la integridad del ADN de *S. pneumoniae*.
- Investigar el efecto de la incubación con concentraciones progresivamente crecientes de levofloxacino en el nivel de lisis celular y el nivel de fragmentación del ADN de *S. pneumoniae*, en cepas sensibles y resistentes al antibiótico.
- Determinar el efecto de la incubación con la dosis de corte del CLSI de levofloxacino en cepas de *S. pneumoniae* con CMIs progresivamente mayores.
- Estimar el poder de identificación de las cepas resistentes mediante la técnica de microscopía.
- Establecer los índices de validez analítica de la técnica, en comparación con el antibiograma clásico.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas y determinación de la CMI

Los estudios se realizaron en 44 cepas de *S. pneumoniae* aisladas en el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña y en el Instituto de Salud Carlos III. Este tipo de investigación no requiere de la autorización de un Comité Ético de Investigación Clínica.

La CMI de dichas cepas se determinó por el test de epsilometría (E-test). Las cepas conservadas a -80°C en medio Müeller-Hinton II con glicerol, se descongelaron, se sembraron en placas agar con sangre ovina al 5% y se dejaron crecer entre 18 y 24 h a 37°C con atmósfera de CO₂ (5%).

Para realizar el E-test se introdujo una colonia de la placa de cultivo en un tubo con 2 ml de medio líquido Müeller-Hinton II y se ajustó la OD600 (Densidad óptica a 600 nm) de las bacterias a 0,1, con la ayuda de un espectrofotómetro (Biomate-3 Thermo Scientific). Se sembraron las bacterias en una placa Petri, en tres direcciones con la ayuda de un hisopo, asegurándose de inocular toda la superficie de la placa para que la bacteria crezca homogéneamente. Posteriormente, se colocaron encima las tiras con gradiente de concentración de levofloxacin (E-test AB Biodisks; bioMérieux). Las placas se incubaron en una estufa a 37° C durante 24 h. Tras este período, se formó un halo elíptico de inhibición de crecimiento en torno a la tira de fármaco. Para determinar la CMI de la cepa bacteriana se observó el punto de intersección de la elipse formada con la tira. Para clasificar las bacterias en sensibles, intermedias o resistentes, se emplearon los puntos de corte referidos por el CLSI, el año 2020 (≤ 2 - 4 - ≥ 8 mg/L).³⁵

3.2. Técnica de lisis en microgel (Micromax®)

Las cepas de neumococo se incubaron en medio de cultivo líquido Müeller-Hinton II con cationes y 2-3% de sangre lisada de caballo. Para prepararlo, se disolvieron 4,4 g de Müeller-Hinton II en 200 ml de agua destilada, se esterilizó el medio y se mantuvo en refrigeración hasta el momento del ensayo. En ese momento, el medio se atemperó a 20-25°C y se añadieron 10 ml de sangre lisada de caballo, en una cabina de flujo.

Para hacer los ensayos, las cepas se sembraron y ajustaron siguiendo el mismo protocolo utilizado para la determinación de la CMI por E-test. Se utilizaron placas Microtiter (micropocillo).

Se añadieron en los pocillos 24 µl de medio con bacterias y 6 µl de solución de levofloxacino, excepto en el control negativo, que llevó agua destilada en vez de antibiótico. Tras 1 hora de incubación, se añadieron las enzimas de pared.

Se ensayaron diferentes concentraciones y tiempos de incubación, para establecer las condiciones de lisis más adecuadas:

-Lisozima 100, 500, 1000, 2500, 5000, 10000 y 20000 mg/L, durante 5, 10, 15, 30, 45 y 60 min a 37°C.

-Mutanolisina 2500 y 5000 U/ml, 15 min.

-Mezcla de lisozima 5000, 10000 y 20000 mg/L y mutanolisina 5000 U/mL, 15 min, a 37°C.

La mezcla de lisozima 5000 mg/L y mutanolisina 5000 U/mL, 15 minutos, a 37°C, demostró ser la más adecuada técnicamente, por lo que fue la que se empleó en los diferentes experimentos.

Después de la incubación con las enzimas, se añadieron 70 µl de agarosa líquida, de bajo punto de fusión, a 37°C (1,2%) a cada pocillo de la placa, se homogeneizó y, se extrajeron 10 µl que se pipetearon sobre un portaobjetos pretratado. Se colocó un cubreobjetos de 18 x 18 mm y se enfrió en la nevera durante 5 minutos para que gelificase la agarosa. Se formó así un microgel de agarosa con las bacterias embebidas en su interior.

Tras eliminar los cubreobjetos, los portaobjetos se introdujeron en una solución de lisis del kit Micromax® (Halotech DNA SL, Madrid) durante 2 minutos. A continuación, se introdujeron 5 minutos en agua destilada para eliminar los restos de lisis y luego se realizó un tratamiento de deshidratación con alcoholes al 70%, 90% y 100%, 2 minutos cada uno y se dejó secar en estufa. Una vez secos, los portaobjetos se tñeron con SYBR Gold diluido 1:400 en Tris-borato-EDTA (TBE). Para ello, se añadieron 100 µl encima de cada portaobjetos y se colocó un cubreobjetos de 24 x 60 mm, permaneciendo 2 minutos en oscuridad.

Los portaobjetos se lavaron con tampón fosfato, para eliminar los restos de SYBR Gold, y se colocó de nuevo un cubreobjetos, tras lo que se observaron las bacterias en un microscopio de epifluorescencia Nikon E800, usando el filtro correspondiente. Se tomaron fotografías con una cámara de alta sensibilidad Apogee KX32 ME.

3.3. Dosis-respuesta

Se realizó una prueba inicial, con el fin de evaluar si la técnica podría tener capacidad para distinguir entre una cepa sensible (S) y otra resistente (R) al levofloxacino. Para ello, una cepa con CMI= 0,5 mg/L (S) y otra con CMI > 32 mg/L (R), se incubaron con el antibiótico, que fue añadido 1 hora antes de la digestión con las enzimas. La concentración de levofloxacino fue la del punto corte de sensibilidad establecido por el CLSI (≤ 2 mg/L).

Tras la prueba inicial de evaluación del efecto de una concentración única de antibiótico, una cepa S (CMI= 1,5 mg/L) y otra R (CMI > 32 mg/L), fueron incubadas con concentraciones crecientes de levofloxacino: 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 y 32 mg/L, incluyendo un control sin antibiótico. Una vez realizado el procesado técnico, se cuantificó el % de células lisadas y el % de células con ADN fragmentado en estas células lisadas. Habitualmente se cuantificaron 200 bacterias, en cada punto experimental.

3.4. Correlación con la CMI

El conjunto de 44 cepas de *S. pneumoniae* fue evaluado mediante e-test para establecer su CMI para levofloxacino, tal como se ha descrito en el apartado 3.1. Por otra parte, todas estas cepas fueron procesadas, de modo ciego, mediante la técnica de microgeles desarrollada en este trabajo. Así, se incubaron 1 hora en medio líquido con levofloxacino (2 mg/L), esto es, el punto de corte de sensibilidad establecido por el CLSI. Posteriormente, tras el tratamiento con la mezcla de lisozima y mutanolisina, las bacterias se incluyeron en microgeles, se incubaron con la solución de lisis y se lavaron, deshidrataron y tiñeron con SYBR Gold. En cada cepa, se cuantificaron 4 parámetros, evaluando su posible correlación con las CMIs.

A) Estimación de si el daño inducido en la cepa por las propias enzimas (cultivos control) guarda de por sí una relación con la CMI de la cepa. Es decir, evaluar si las cepas resistentes al antibiótico ya poseen de por sí alguna modificación estructural o fisiológica que hace que las enzimas produzcan un daño diferente al que inducen en las cepas sensibles. De modo breve: daño por las enzimas solamente. Ese daño se cuantificó como:

1. El % de células lisadas obtenido tras incubar únicamente con las enzimas, en el cultivo basal sin antibiótico.

2. El % de células con ADN fragmentado dentro de las lisadas, tras incubar únicamente con las enzimas, en el cultivo basal sin antibiótico.

B) Estimación de si el posible efecto observado tras incubar con el antibiótico estaba realmente correlacionado con la CMI de la cepa. De modo breve: daño por el antibiótico = (daño tras incubar con enzimas + levofloxacino) – (daño tras incubar con las enzimas solamente). Estos efectos fueron:

3. La variación en el % de células lisadas en el cultivo con antibiótico con respecto al cultivo control sin antibiótico (Δ % Lisis) = (% lisadas por enzimas + levofloxacino) – (% lisadas por enzimas solamente).
4. La variación en el % de células con ADN fragmentado dentro de las lisadas, en el cultivo con antibiótico con respecto al cultivo control sin antibiótico (Δ % Fragmentación-ADN) = (% fragmentadas por enzimas + levofloxacino) – (% fragmentadas por enzimas solamente).

3.5. Discriminación entre cepas sensibles y cepas resistentes

Tras la estimación de las CMIs mediante los e-test, las cepas se distinguieron entre sensibles y resistentes a levofloxacino, según el punto de corte establecido por el CLSI (≤ 2 - 4 - ≥ 8 mg/L). Teniendo en cuenta el parámetro con mayor nivel de correlación con la CMI evidenciado en el estudio anterior, se determinó el valor numérico de dicho parámetro, que permite discriminar con mayor sensibilidad y especificidad las cepas resistentes de las sensibles. Este valor sería el punto de corte de la técnica. Se compararon los resultados obtenidos mediante la técnica Micromax® con los del E-test.

3.6. Análisis estadístico

Se utilizó el programa SPSS Statistics IBM. Además de la estadística descriptiva de los distintos parámetros, los estudios de correlación se realizaron mediante el coeficiente Rho de Spearman. Como pruebas de evaluación de homogeneidad se emplearon el test de los signos de Wilcoxon y la U de Mann-Whitney. La capacidad discriminativa de la técnica se evaluó mediante curvas ROC (Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor), incluyendo el cálculo de los índices de validez analítica. La significación fue definida como $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Protocolo técnico

Dado que el efecto de la quinolona es a nivel del ADN, es necesario conseguir lisar las bacterias para que el nucleóide bacteriano pueda liberarse y ser visualizado. El protocolo básico está basado en la técnica Micromax® diseñada para bacilos gram-negativos. Las bacterias se incluyen en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y se incuban con una solución de lisis específica que deshace la pared celular en toda la población bacteriana, por lo que el nucleóide se libera en la matriz del microgel. Tras deshidratar en alcoholes, el ADN se tiñe con un fluorocromo de alta sensibilidad y se observa al microscopio de fluorescencia. Si la cepa es sensible a la quinolona, el ADN aparece fragmentado. Si la bacteria es resistente, el nucleóide aparece intacto, compacto.

El neumococo es una bacteria gram-positiva, con una pared gruesa, con muchas capas de peptidoglicano, mucho más difícil de lisar. La solución de lisis que se emplea para bacilos gram-negativos no fue capaz de lisar los neumococos, por sí sola. Para conseguirlo, antes de incluir las bacterias en el microgel, fue necesario una incubación en el medio de cultivo líquido con enzimas que digieren el peptidoglicano. Se ensayaron diferentes concentraciones y tiempos de incubación con lisozima, mutanolisina y mezcla de ambas.

Después del tratamiento enzimático, las bacterias se mezclaron con la agarosa líquida de bajo punto de fusión, la cual se enfrió formando un microgel sobre un portaobjetos y se incubaron 2 minutos con la solución de lisis. Tras lavar, deshidratar y secar, las bacterias quedaron incluidas en una fina película de agarosa seca, adherida al portaobjetos, distribuidas en un solo plano, siendo teñidas con SYBR Gold y visualizadas al microscopio de fluorescencia.

La lisozima por sí sola no fue suficiente para conseguir una adecuada lisis. La mutanolisina sola consiguió cierto nivel de lisis. Sin embargo, la mezcla de ambas resultó en mejores niveles de células lisadas. El protocolo más efectivo fue una mezcla de lisozima 5000 mg/L y mutanolisina 5000 U/mL, 15 minutos a 37°C.

A diferencia de lo que ocurre con los bacilos gram-negativos, donde todas las bacterias son lisadas, es importante destacar que en el caso del neumococo solo se consiguió lisar una proporción de las bacterias, nunca todas. Si los neumococos eran incubados con concentraciones más altas de enzimas y/o durante tiempos más largos,

las bacterias que se lisaban mostraban su ADN excesivamente dañado, por lo que no era adecuado para ver un posible efecto de la quinolona.

Al microscopio de fluorescencia se distinguieron 3 tipos morfológicos (Figura 6):

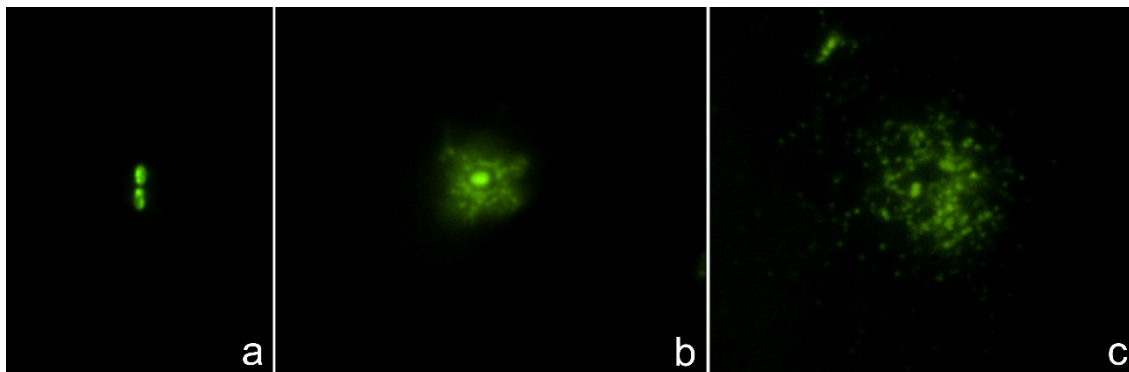


Figura 6. Tipos morfológicos observados tras la adaptación de la técnica Micromax® para *S. pneumoniae*. **a:** bacteria no lisada. **b:** bacteria lisada con ADN no fragmentado. **c:** bacteria lisada con ADN fragmentado.

1. Bacterias no lisadas. Estas mantenían su morfología prácticamente inalterada, con su ADN interior.
2. Bacterias lisadas, con ADN intacto. Estas bacterias habían liberado su ADN, constituyendo un nucleoide sin fragmentación. Este nucleoide correspondía a fibras de ADN que forman bucles que se expanden a partir del residuo bacteriano central, formando un halo periférico compacto.
3. Bacterias lisadas, con ADN fragmentado. Los fragmentos forman un amplio halo circular, de aspecto punteado, que difundieron de la región bacteriana central.

Evidentemente, las bacterias lisadas corresponden a todas las que muestran su ADN liberado, tanto intacto como fragmentado.

4.2. Efecto de la incubación con levofloxacino

En una prueba inicial, para evaluar la posible capacidad de la técnica para distinguir cepas de neumococo sensibles y resistentes al levofloxacino, una cepa sensible (S- CMI= 0,5 mg/L) y otra resistente (R- CMI > 32 mg/L) se incubaron con este antibiótico, el cual fue añadido al medio de cultivo líquido 1 hora antes de la incubación con las

enzimas. La concentración de levofloxacino fue la del punto corte de sensibilidad establecido por el CLSI (≤ 2 mg/L). El resultado se muestra en la Figura 7.

En los cultivos control sin antibiótico, se lisaron el 36,5% y el 51,0% de las bacterias, en las cepas S y R, respectivamente. Centrándonos en estas bacterias lisadas, el 24,6% de las mismas en la cepa S y el 31,4% en la cepa R, mostraron su ADN fragmentado, de modo basal. En los cultivos tratados con levofloxacino, el % de células lisadas fue de 49,0% en la cepa S y de 58,0% en la cepa R. La proporción de células con ADN fragmentado dentro de las lisadas fue de 81,3% en la cepa S y de 32,8% en la cepa R.

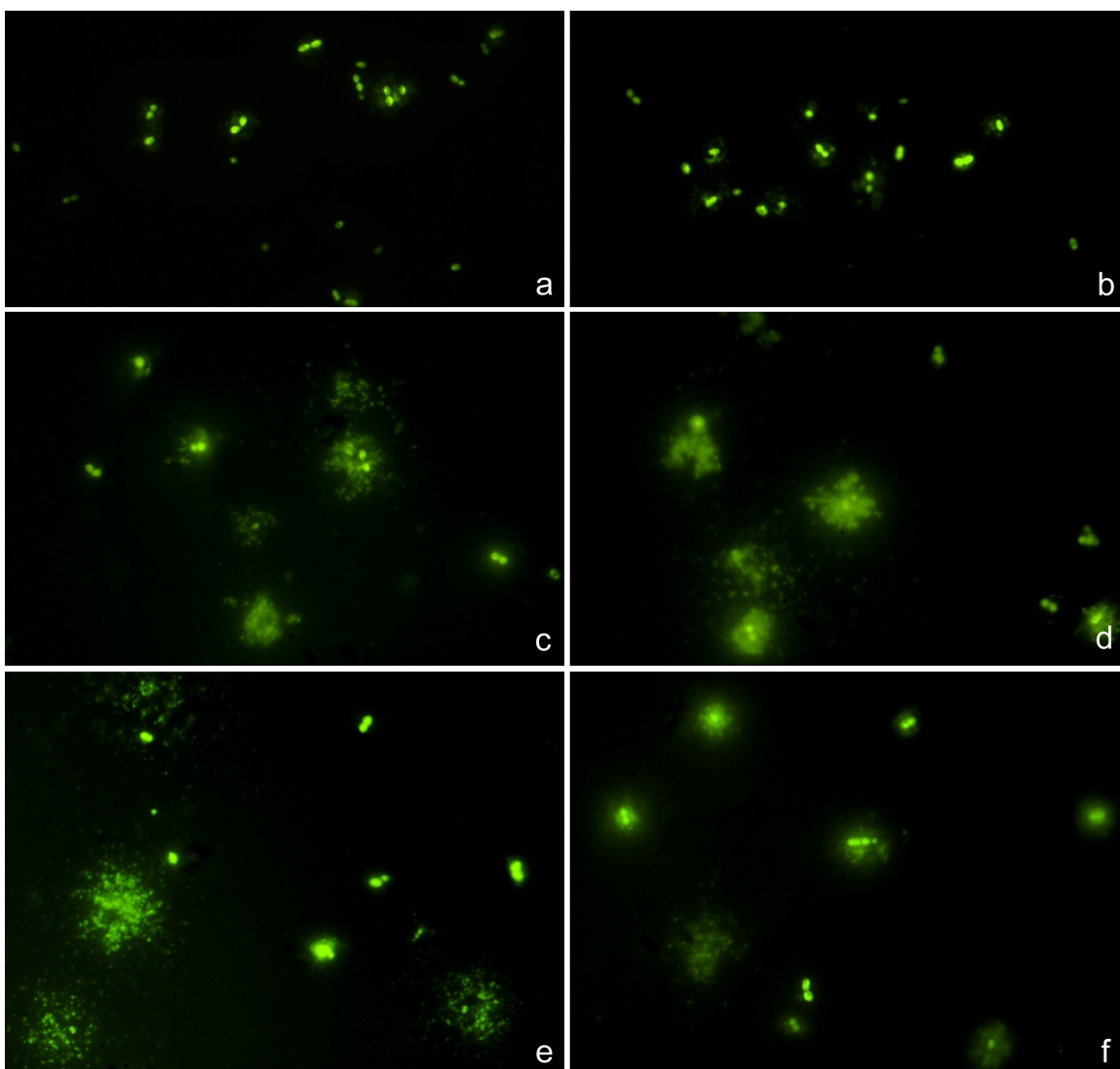


Figura 7. Cepa de *S. pneumoniae*, sensible (S: columna izquierda; **a, c, e**) y resistente (R: columna derecha; **b, d, f**) a levofloxacino. **a, b:** cultivos control sin antibiótico y sin procesar por la técnica Micromax®, mostrando bacterias intactas. **c, d:** cultivos control, sin antibiótico, procesados por la

técnica Micromax®, evidenciando bacterias sin lisar, lisadas con ADN sin fragmentación y alguna lisada con ADN fragmentado. e, f: cultivos tratados con levofloxacin, procesados por la técnica Micromax®. El levofloxacin incrementa claramente las bacterias lisadas con ADN fragmentado en la cepa sensible (e).

En conclusión, en la cepa S, el levofloxacin incrementó el % de células lisadas en un 13,5% más, y la fracción con ADN fragmentado en un 56,7% más, que el cultivo control sin antibiótico. Por el contrario, en la cepa R, el % de células lisadas aumentó en un 7% más y la fracción con ADN fragmentado apenas varió, solamente un 1,4% más. Según este experimento preliminar, ambos parámetros, el incremento del % de células lisadas y el incremento en la diferencia de la fracción de células con ADN fragmentado dentro de las lisadas, podrían evidenciar efecto del levofloxacin y ayudar a distinguir cepas S y R a este antibiótico. Sin embargo, la diferencia numérica presentó un rango muchísimo mayor para las células con ADN fragmentado en la cepa S. Además, el hecho de que el levofloxacin apenas aumente esta fracción en la cepa R, apoya que sea un parámetro mucho más discriminativo entre las dos cepas.

4.3. Dosis-respuesta

Dos cepas, S (CMI = 1,5 mg/L) y R (CMI > 32 mg/L), fueron incubadas con 8 concentraciones crecientes de levofloxacin, desde 0,25 mg/L hasta 32 mg/L, además del control sin antibiótico (Figura 8). El % de células lisadas en la cepa S osciló alrededor del 20%, sin evidenciar un efecto con el aumento de concentración del antibiótico. En la cepa R, tampoco se observaron variaciones apreciables en el % de células lisadas con los incrementos de dosis de levofloxacin, oscilando alrededor del 50% (gráfica en Anexo 1, arriba). De acuerdo con estas observaciones, no se obtuvo correlación estadísticamente significativa entre la dosis de quinolona y la variación de células lisadas con respecto al cultivo control sin antibiótico (Δ % Lisis), en ninguna de las cepas (cepa S-Rho de Spearman: -0,298; p = 0,436; cepa R-Rho de Spearman: 0,351; p = 0,354) (gráfica en Anexo 1, abajo).

En cuanto a la fracción de células lisadas con ADN fragmentado, esta se fue incrementando progresivamente con la concentración de levofloxacin en la cepa S, de tal modo que la diferencia con el basal (Δ % Fragmentación-ADN) pasó de un 4,1% más, en la dosis más baja de 0,25 mg/L, hasta un 32,8% más, en la dosis más alta, de 32 mg/L. En la cepa R, el incremento fue también progresivo, pero muchísimo más

leve, llegando al 11,6% tras la dosis más alta, de 32 mg/L. En ambas cepas se observó una correlación positiva perfecta entre ambos parámetros (cepa S-Rho de Spearman: 0,970; $p < 0,001$; cepa R-Rho de Spearman: 1,000).

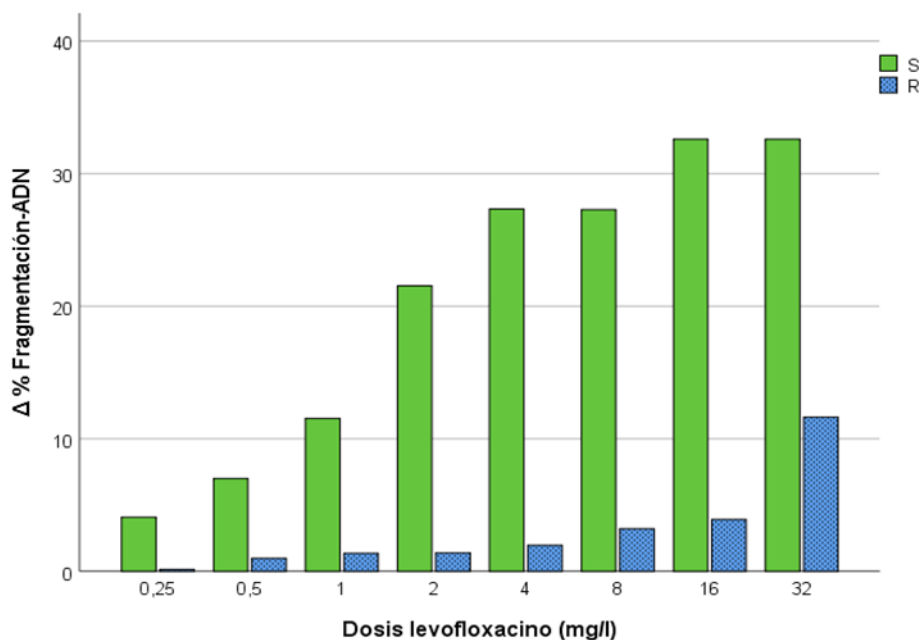


Figura 8. Efecto de concentraciones crecientes de levofloxacino en una cepa sensible (S; CMI: 1,5 mg/L) y otra resistente (R; CMI > 32 mg/L) de *S. pneumoniae*. El parámetro evaluado es el incremento del porcentaje de bacterias con ADN fragmentado en las bacterias lisadas, con respecto al cultivo control sin antibiótico (Δ % Fragmentación-ADN, en eje y).

El hecho de que la fracción de células lisadas tienda a mantenerse relativamente estable con el incremento de las dosis de levofloxacino en ambas cepas S y R, indica que este parámetro no es adecuado para distinguirlas. Por otra parte, la evaluación del incremento de la diferencia en la fracción de células con ADN fragmentado (1) sí guardaba una relación clara con la dosis del antibiótico en la cepa S y, además, (2) se evidenció que producía una mucho menor variación en la cepa R. Estos resultados identificaron a este parámetro como el más conforme para discriminar las cepas S y R a levofloxacino.

4.4. Correlación con la CMI

Los resultados del e-test practicado sobre las 44 cepas de *S. pneumoniae* evidenciaron diferentes CMIs para levofloxacin. Según orden creciente de CMI, se distinguieron:

CMI= 0,30 mg/L: 7 cepas; CMI= 0,50 mg/L: 19 cepas; CMI= 0,75 mg/L: 10 cepas; CMI= 1,00 mg/L: 2 cepas; CMI= 1,50 mg/L: 1 cepa; CMI > 32 mg/L: 5 cepas

Tras incubar con 2 mg/L levofloxacin, esto es, el punto de corte de sensibilidad establecido por el CLSI, las cepas fueron procesadas mediante el protocolo técnico desarrollado en este trabajo. Los resultados se visualizan en la Figura 9.

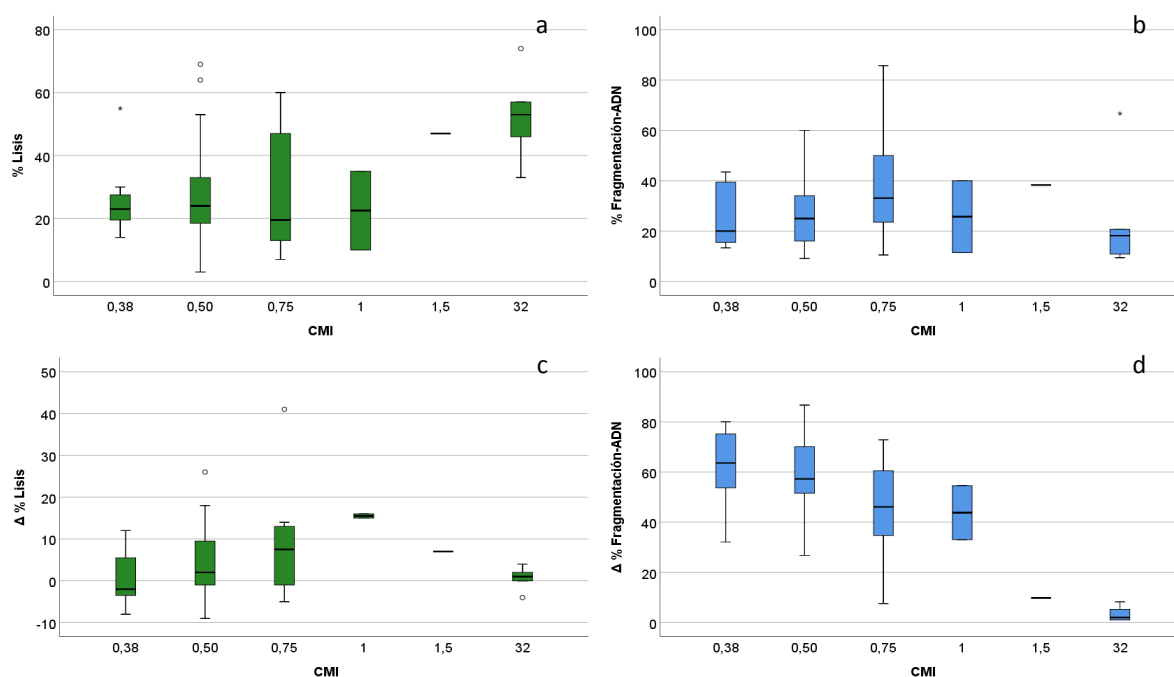


Figura 9. Diagramas de cajas y bigotes, donde se muestran los resultados en función de la CMI (eje x) de las cepas de *S. pneumoniae*, de **a**: porcentaje de bacterias lisadas en cultivo sin antibiótico. **b**: porcentaje de bacterias con ADN fragmentado, dentro de las lisadas, en cultivo sin antibiótico. **c**: tras incubar con 2 mg/L levofloxacin, incremento en el porcentaje de células lisadas con respecto al cultivo control sin antibiótico (Δ % Lisis). **d**: tras incubar con 2 mg/L levofloxacin, incremento en el porcentaje de células con ADN fragmentado dentro de las lisadas, con respecto al cultivo control sin antibiótico (Δ % Fragmentación-ADN). Este último es el único que evidencia una relación inversa con la CMI.

1. La Figura 9a presenta los datos de estadística descriptiva del % de células lisadas obtenidas tras incubar solamente con las enzimas, en relación con la CMI de las

cepas. No se apreció una relación clara entre ambos parámetros. La correlación no fue estadísticamente significativa (Rho de Spearman: 0,231; $p = 0,132$), lo que sugiere que la sensibilidad a la digestión enzimática no tiene relación con el nivel de sensibilidad al levofloxacino (datos numéricos en Anexo 2).

2. La Figura 9b muestra los resultados de la fracción de células fragmentadas dentro de las lisadas, en cultivos sin antibiótico, incubados solo con las enzimas. Tampoco mostraron una relación con la CMI (Rho de Spearman: 0,540; $p = 0,729$) (datos numéricos en Anexo 2).

3. La Figura 9c presenta los datos de la variación del % de células lisadas tras incubarse con el levofloxacino (Δ % Lisis), en relación con la CMI de las cepas. En este caso, la correlación tampoco resultó estadísticamente significativa (Rho de Spearman: 0,187; $p = 0,225$) (datos numéricos en Anexo 2).

4. La Figura 9d evidencia que, a medida que aumentaba la CMI de la cepa, menor fue el incremento de la proporción de células con ADN fragmentado con respecto al control sin antibiótico (Δ % Fragmentación-ADN). La dosis de levofloxacino fue induciendo menos fragmentación. Esta correlación negativa entre la CMI y la diferencia de porcentajes de fragmentación resultó estadísticamente significativa (Rho de Spearman: -0,580; $p < 0,001$) (datos numéricos en Anexo 2).

El experimento fue una demostración evidente de que la magnitud del incremento de la fracción de células con ADN fragmentado es el parámetro indicativo del nivel de sensibilidad o resistencia de la cepa de *S. pneumoniae* al levofloxacino.

4.5. Discriminación entre cepas sensibles y cepas resistentes

Teniendo en cuenta los puntos de corte para levofloxacino establecidos por el CLSI ($\leq 2 - 4 - \geq 8$ mg/L), las 5 cepas cuyo e-test evidenció una CMI > 32 mg/L fueron consideradas resistentes. Las 39 cepas restantes se categorizaron como sensibles.

La Tabla 1 y Figura 10 muestran la estadística descriptiva de la diferencia del % de células con ADN fragmentado en la fracción de células lisadas, entre los cultivos con y sin levofloxacino 2 mg/L (Δ % Fragmentación-ADN), tras el procesamiento por la técnica rápida, en las cepas sensibles (S) y en las resistentes (R).

Clasificación CLSI	N	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Desviación típica
S	39	53,82	56,31	7,62	86,67	19,61
R	5	3,54	2,05	1,04	8,29	3,17

Tabla 1. Estadística descriptiva del incremento del porcentaje de bacterias con ADN fragmentado en las bacterias lisadas, con respecto al del cultivo control sin antibiótico (Δ % Fragmentación-ADN), en las cepas de *S. pneumoniae* sensibles (S) y resistentes (R) a levofloxacino.

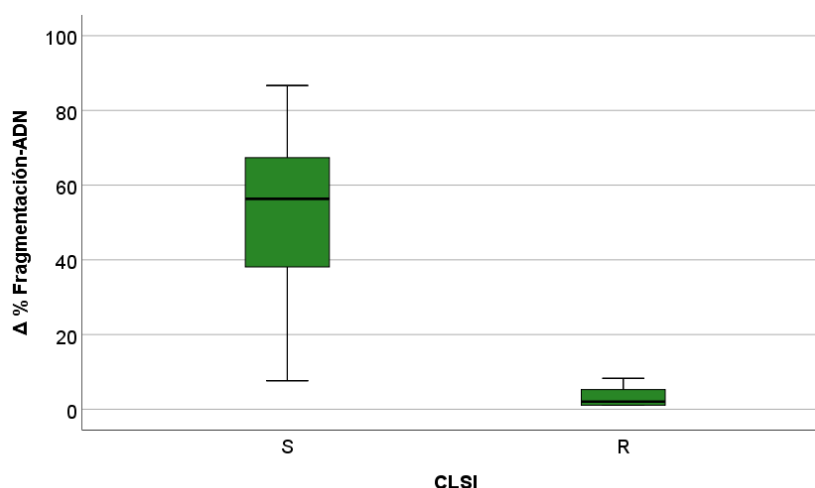


Figura 10. Diagrama de cajas y bigotes de los datos del incremento del porcentaje de bacterias con ADN fragmentado en las bacterias lisadas, con respecto al del cultivo control sin antibiótico (Δ % Fragmentación-ADN), en las cepas de *S. pneumoniae* sensibles (S) y resistentes (R) a levofloxacino, clasificadas según el criterio del CLSI.

Con respecto al cultivo control sin antibiótico, el levofloxacino 2 mg/L indujo un incremento estadísticamente significativo en el % de células con ADN fragmentado en la fracción de células lisadas, en las cepas S (Wilcoxon, $p < 0,001$), y también en las R (Wilcoxon, $p = 0,043$). Sin embargo, este incremento resultó significativamente mayor en las cepas S (mediana: 56,3) que en las R (mediana: 2,0) (U Mann-Whitney, $p < 0,001$).

Los resultados obtenidos mediante la evaluación del incremento de la fracción de células con ADN fragmentado fueron comparados con los del antibiograma clásico. Para establecer el valor de incremento de fracción de células con ADN fragmentado, como punto de corte más adecuado de nuestra técnica, que mejor discrimine las cepas resistentes de las sensibles, se analizaron las coordenadas de la curva ROC (curva y tabla de coordenadas en Anexo 3). En nuestro caso, el interés principal era tener la máxima sensibilidad, para no fallar en la detección de cepas resistentes, es decir, obtener un 0% de falsos negativos de resistencia. La tabla proporcionada por la curva ROC evidenció que el punto de corte de 9,07 era el que proporcionaba el valor de sensibilidad total (1,000), acompañado por el menor valor de 1-especificidad (0,026).

Se realizó nuevamente la curva ROC, utilizando el punto de corte óptimo previamente reconocido, demostrando un poder discriminante casi total (Area Under the ROC Curve; AUC: $0,987 \pm 0,016$; $p < 0,001$; IC 95%: 0,956 – 1,000) (Figura 11). Los índices de validez analítica se muestran en la Tabla 2. Utilizando el punto de corte, la identificación de las cepas R fue perfecta. En cuanto a las cepas S, solamente una de ellas resultó falso positivo de resistencia, pues el e-test establecía su CMI en 0,75 mg/L.

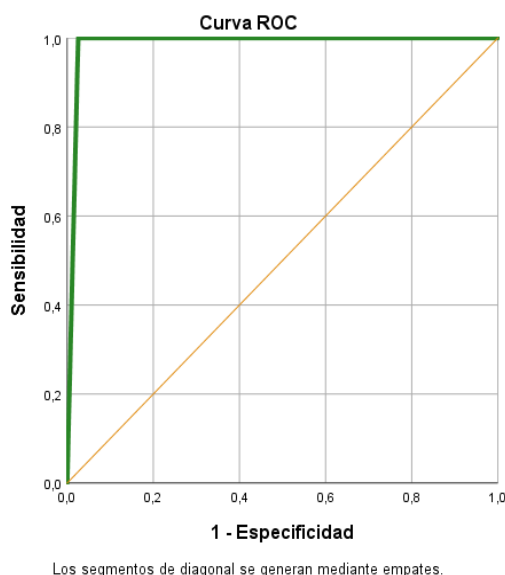


Figura 11. Curva ROC para la detección de resistencia a levofloxacino por la técnica Micromax® en *S.pneumoniae*.

	Valor (%)	IC 95%
Sensibilidad	100	90,00 - 100
Especificidad	97,44	91,19 - 100
Valor predictivo +	83,33	45,18 - 100
Valor predictivo -	100	98,68 - 100
AUC	0,99	0,96 - 1

Tabla 2. Índices de validez analítica de la categorización de cepa de *S. pneumoniae* como resistente a levofloxacino, según la técnica Micromax®, en comparación con el antibiograma estándar. AUC: Area Under the ROC Curve.

En conclusión, cuando, en nuestras condiciones, tras incubar con 2 mg/L de levofloxacino, se obtiene un incremento del porcentaje de células con ADN fragmentado en la fracción de células lisadas, con respecto al del control sin antibiótico, igual o menor a 9,07, la cepa de *S. pneumoniae* es resistente, con un 100% de sensibilidad y 97,4% de especificidad.

5. DISCUSION

5.1. Protocolo técnico y mecanismo

La técnica Micromax® para la evaluación del efecto de las quinolonas, se basa en la observación directa del ADN bacteriano. Para ello es necesario que la bacteria libere su ADN. En bacilos gram-negativos, esto se logra simplemente mediante la incubación con una solución que contiene un detergente que lisa la pared celular.³²⁻³⁴ Pero esto no es efectivo en las bacterias gram-positivas.

La pared celular de las bacterias gram-negativas posee una membrana lipídica exterior a modo de barrera y un peptidoglicano subyacente. El peptidoglicano es una molécula lineal polimérica que constituye el saco de mureína. Se compone de unidades de ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetil-D-glucosamina (NAG), unidos por enlaces glicosídicos β (1→4), es decir, entre el carbono 1 del NAM y el carbono 4 de NAG. A cada residuo de NAM se enlaza un tetrapéptido, el cual se une a otro tetrapéptido de la cadena próxima, dando rigidez a la estructura.³⁶

La pared celular de las bacterias gram-negativas presenta solo de 2 a 5 capas de peptidoglicano, dependiendo del estadio de crecimiento. Sin embargo, en las bacterias gram-positivas, que no poseen una barrera lipídica exterior, la red de mureína está muy desarrollada y puede llegar a tener hasta 40 capas, incluyendo además hasta un 50% de ácido teicoico, una familia de carbohidratos unidos covalentemente al peptidoglicano o a la membrana citoplásmica, formando un gel polianiónico.³⁶ Además, en las gram-positivas, los tetrapéptidos de los polímeros adyacentes están unidos por puentes de penta-glicina, mientras que en las gram-negativas, la unión entre los tetrapéptidos es directa.

Para poder liberar el ADN de *S. pneumoniae*, se incubó con lisozima, la cual hidroliza el enlace glicosídico β (1→4) entre NAM y NAG. Sin embargo, no se obtuvo un resultado satisfactorio. Aunque la mutanolisina actúa de modo semejante a la lisozima, parece ser más efectiva en bacterias más difíciles de lisar, como el estreptococo. La mezcla de la lisozima con la mutanolisina sí logró debilitar la pared, de tal modo que la solución de lisis fue efectiva para obtener bacterias lisadas que liberaban su ADN.

La técnica de lisis con detergente es efectiva en todas las bacterias gram-negativas y todas muestran su ADN, por lo que la simple inspección visual es suficiente para reconocer si la cepa es sensible (ADN fragmentado) o resistente (ADN no fragmentado) a la quinolona. No es necesario ningún recuento. Pero en el caso del

neumococo, el tratamiento lítico solo consigue afectar con suficiente intensidad a una fracción de las bacterias, variable según las cepas. El neumococo es una bacteria especialmente sensible. Si se emplean condiciones más extremas, el ADN liberado suele mostrarse fragmentado espontáneamente, posiblemente a consecuencia de la activación de la autolisina LytA, característica del neumococo. Esta autólisis no permite evaluar el efecto de quinolona.³⁷

Siguiendo las condiciones establecidas, esto es, incubando con la mezcla de lisozima 5000 mg/L y mutanolisina 5000 U/mL, 15 minutos, a 37°C, solo una fracción se lisa y el resto no. Es posible que las bacterias sean más sensibles a las enzimas de pared en determinados momentos de su crecimiento, donde la maduración de la pared no es total, especialmente si todavía no se han establecido suficientes puentes interpeptídicos entre las cadenas adyacentes del peptidoglicano. Esto también podría acontecer a nivel de la cápsula exterior.

Dentro de las bacterias lisadas, el fenómeno de fragmentación espontánea del ADN se restringe a un porcentaje de las mismas, también variable según las cepas. Para evaluar el posible efecto del levofloxacino, lo lógico es determinar si el antibiótico provoca un incremento en la fracción de células con ADN fragmentado dentro de la población de bacterias que han sido lisadas, con respecto al cultivo control que no ha sido tratado con la quinolona.

En las bacterias gram-negativas, el efecto de la quinolona sobre el ADN era observado en todas las bacterias de la población.³²⁻³⁴ En cambio, en el neumococo, no todos los nucleoides aparecen con el ADN fragmentado, a pesar de que sea sensible al levofloxacino. Es posible que el efecto del levofloxacino sea más lento, necesiéndose tiempos de incubación más largos con el antibiótico para observarlo en prácticamente toda la población. Sin embargo, eso alargaría el tiempo de ejecución de la técnica, perdiendo rapidez, lo cual compromete la razón de ser del ensayo.

Quizás esta población de bacterias presenta el efecto de la quinolona con más anticipación que las demás. Es posible que incorporen más fácilmente el levofloxacino, al tener una pared menos madura. Por otra parte, se ha indicado que la topoisomerasa IV, más que la ADN girasa, sería la principal diana para las quinolonas en las bacterias gram-positivas.³⁸ Dado el papel de la topoisomerasa IV en la decatenación y separación de los nucleoides hermanos tras la replicación del ADN, parte de esas bacterias con mayor permeabilidad al levofloxacino podrían además estar decatenando su ADN por la enzima, en ese preciso momento temporal.

La fluoroquinolona inhibe la reparación de la rotura de la doble cadena del ADN inducida por la topoisomerasa tipo II. Cada uno de los dos extremos de la rotura permanece unido a una subunidad diferente de la topoisomerasa. Pero, además, la unión de la fluoroquinolona da lugar a la disociación de esas subunidades, separando físicamente los dos extremos de la rotura, fragmentando directamente el cromosoma bacteriano. Esto conduce a una letalidad rápida.^{13, 14}

Sin embargo, con la primera generación de quinolonas, como el ácido nalidíxico, las subunidades de la topoisomerasa no se disocian y mantienen constreñidos los extremos rotos del ADN, en su posición, sin desplazamiento. La muerte bacteriana aparece de modo mucho más lento que con la fluoroquinolona. La letalidad parece ser derivada de la fragmentación tardía del ADN, pero no inducida primariamente por la propia topoisomerasa bloqueada, sino secundaria a la activación posterior de una presunta proteína de suicidio.^{13, 14} Teniendo esto en cuenta, cabría la posibilidad de que en bacterias gram-positivas o en el propio neumococo, la fragmentación del ADN por el levofloxacin también sea un evento secundario y más tardío y gradual en la población bacteriana, a pesar de ser una fluoroquinolona. Esto podría ser otra explicación de porqué la fragmentación que observamos al microscopio se observa en una proporción de las bacterias que muestran su ADN y no en todas.

En el caso de los bacilos gram-negativos, pueden observarse diferentes niveles o grados de fragmentación del cromosoma bacteriano, apareciendo más fragmentado cuanto mayor sea la concentración de la quinolona y cuanto menor sea la CMI de la cepa.³²⁻³⁴ Sin embargo, en *S. pneumoniae*, las bacterias que muestran su ADN fragmentado lo suelen presentar en alto grado, y no se aprecian diferencias claras en función de la dosis de levofloxacin o la CMI de la cepa. Este hecho es otro apoyo a la hipótesis de que la fragmentación del ADN por la quinolona en *S. pneumoniae* sea secundaria y no directa por la quinolona.

Independientemente del mecanismo, lo relevante es el hecho práctico de que el incremento de bacterias con ADN fragmentado con respecto al cultivo control se ha demostrado correlacionado con la CMI de la cepa, siendo un parámetro preciso para distinguir las cepas resistentes de la muestra.

5.2. Interés

En general, se considera que la resistencia del neumococo a la quinolona es todavía baja. En Estados Unidos se estima una frecuencia de cepas resistentes menor del 1%,

y en Europa, menor del 3%. Pero esto puede cambiar en un futuro próximo, sobre todo si no se usa correctamente el antibiótico. Se están reportando niveles más altos de resistencia en Canadá (7,3%) y sobre todo en Asia (10,5%).²¹ Esto puede ser debido a que, dada la elevada resistencia a penicilinas y macrólidos por parte del neumococo, en algunos países ya se viene empleando la fluoroquinolona como antibiótico de primera elección, para tratamiento empírico de neumonías e infecciones del tracto respiratorio.²¹

Los datos sobre neumococos resistentes a levofloxacino de 25 países, analizados a través del estudio PROTEKT (1999 a 2000), mostraron que si bien el 34% eran del linaje Spain23F-1, la mayoría de los aislados no estaban relacionados genéticamente.³⁹ Estos informes sugieren que, durante este período, tanto la aparición de nuevas cepas resistentes como la diseminación clonal de cepas contribuyeron a la propagación de la resistencia a las fluoroquinolonas.

En el caso específico del neumococo, parece que la resistencia a las quinolonas habitualmente se debe a mutaciones en la región QRDR de la (o las) subunidades GyrA de la ADN girasa o/y ParC de la topoisomerasa IV, tal como acontece en las demás bacterias. También se ha descrito actividad elevada de bombas de expulsión PmrA. No se han reconocido plásmidos Qnr ni enzimas inactivadoras.²¹

Actualmente, se están desarrollando metodologías para la detección rápida de resistencias basadas en técnicas moleculares. Por ejemplo, sistemas de PCR para la detección y cuantificación de genes que codifican enzimas que modifican antibióticos o determinación de mutaciones en genes que codifican proteínas diana.³¹ Estos sistemas requieren conocer previamente la secuencia del gen de interés, las mutaciones a estudiar y disponer de los cebadores necesarios. La valoración de la actividad de bombas de expulsión no suele estar cubierta con estas técnicas.

Sin embargo, el sistema empleado en este trabajo permite una detección rápida de la sensibilidad o resistencia, sin necesidad de realizar estudios previos sobre genes, proteínas u otros mecanismos moleculares de resistencia. Además, permite una visualización *in situ* de los efectos generados por los antibióticos, una información que no proporcionan otras técnicas.

El hecho de que pueda determinarse el nivel de sensibilidad o resistencia tras 2 horas de haber aislado el microorganismo e identificado como neumococo, puede permitir usar con seguridad el levofloxacino, especialmente en pacientes donde es crucial un tratamiento antibiótico rápido y efectivo. Principalmente, en casos donde, dada su condición, la infección puede ser de extrema gravedad; por ejemplo, en

inmunodeprimidos, con cáncer, trasplantes, grandes quemados, etc. La administración rápida y efectiva puede ayudar a prevenir el desarrollo y propagación de resistencias, permitiendo su preservación.

5.3. Limitaciones

El estudio se ha realizado con un número limitado de cepas de *S. pneumoniae* consideradas resistentes al levofloxacino. Pero ésta es la situación natural en nuestro país, por lo que es difícil encontrar cepas resistentes. Para conseguir ampliar el número, se necesitó la colaboración del Instituto Carlos III. Sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, esto podría cambiar en el futuro, dada la peligrosa tendencia general de incremento de resistencias, especialmente en ciertos países. Afortunadamente, en el caso del neumococo, la disposición de vacunas parece estar ayudando a reducir dichas resistencias.²¹

A pesar del bajo número de cepas resistentes, las cepas sensibles muestran un rango variado de CMIs y la fragmentación del ADN está marcadamente correlacionada de modo inverso con dicha CMI. Esto apoya con firmeza el valor discriminativo de la técnica rápida. Las cepas resistentes son todas de una CMI > 32 mg/L, por lo que el punto de corte de fragmentación del ADN derivado de la curva ROC se debe considerar preliminar u orientativo. Es posible que pueda refinarse en un futuro, cuando se analicen más cepas resistentes y especialmente con CMI próxima al punto de corte de resistencia.

La técnica rápida es específica para el levofloxacino. No es universal. Si se quiere aplicar a otras quinolonas, es posible que los niveles de fragmentación, la correlación con la CMI y los puntos de corte, sean diferentes. Las condiciones para cada antibiótico y cada bacteria, deben de ser establecidas empíricamente.

El sistema requiere trabajo manual. Sin embargo, parte del mismo es susceptible de ser automatizado. Es posible adaptar plataformas de microscopía con platina motorizada, con enfoque automático, captura de imágenes con cámara de alta sensibilidad y software acoplado de análisis de imagen para distinguir y cuantificar los diferentes fenotipos bacterianos.

6. CONCLUSIONES

Del presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La mezcla de lisozima y mutanolisina es efectiva para que, junto con la solución de lisis de la técnica Micromax®, se obtenga un porcentaje de bacterias de *Streptococcus pneumoniae* lisadas, que liberan su ADN en un microgel y pueda ser observado bajo microscopía de fluorescencia. Una fracción de las mismas muestra su ADN fragmentado, de modo espontáneo. Ambas fracciones varían según las cepas.
2. Únicamente el incremento del porcentaje de bacterias con ADN fragmentado dentro de la fracción de lisadas, con respecto al del control sin antibiótico, guarda una relación directa con la concentración de levofloxacino e inversa con la CMI de las cepas, lo cual lo identifica como el parámetro de elección para la evaluación rápida del nivel de susceptibilidad o resistencia a la quinolona.
3. Preliminarmente, teniendo en cuenta el punto de corte del CLSI y las cepas de la muestra, cuando tras incubar con 2 mg/L de levofloxacino, se obtiene un incremento del porcentaje de bacterias con ADN fragmentado dentro de las lisadas igual o menor a 9,07, la cepa de *S. pneumoniae* se categoriza como resistente, con un 100% de sensibilidad y 97,4% de especificidad.
4. El trabajo es una prueba inicial que evidencia el potencial de la técnica como test rápido para la determinación de la susceptibilidad o resistencia de *S. pneumoniae* a levofloxacino, en 2 horas.

7. BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. Recuperado de:
<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en>
2. Witte W. 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279: 996-997.
3. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13: 42-51.
4. Woodford N, Turton J F, Livermore DM. 2011. Multiresistant gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35: 736-755.
5. Spellber B, Barlett JG, Gilbert DN. 2013. The future of antibiotics and resistance. *N Engl J Med* 368: 299-302.
6. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, Colomb-Cotinat M, Kretzschmar ME, Devleeschauwer B, Cecchini M, Ouakrim DA, Oliveira TC, Struelens MJ, Suetens C, Monnet DL; Burden of AMR Collaborative Group. 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* 19: 56-66.
7. CDC's Antibiotic Resistance Threats in the United States. 2019. Recuperado de:
<https://www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html>
8. Plan nacional resistencia antibióticos. Recuperado de:
<https://resistenciaantibioticos.es/es/profesionales/vigilancia/mapas-de-consumo>
9. Peleg AY, Hooper DC. 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med* 362: 1804-1813.
10. Editorial. 2018. Progress on antibiotic resistance. *Nature* 562: 307.
11. Naeem A, Badshah SL, Muska M, Ahmad N, Khan K. 2016. The current case of quinolones: synthetic approaches and antibacterial activity. *Molecules* 21: 268.
12. Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X. 2009. Quinolones: actions and resistance updated. *Curr Top Med* 9: 981-998.
13. Malik M, Zhao X, Drlica K. 2006. Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones. *Mol Microbiol* 61: 810-825.

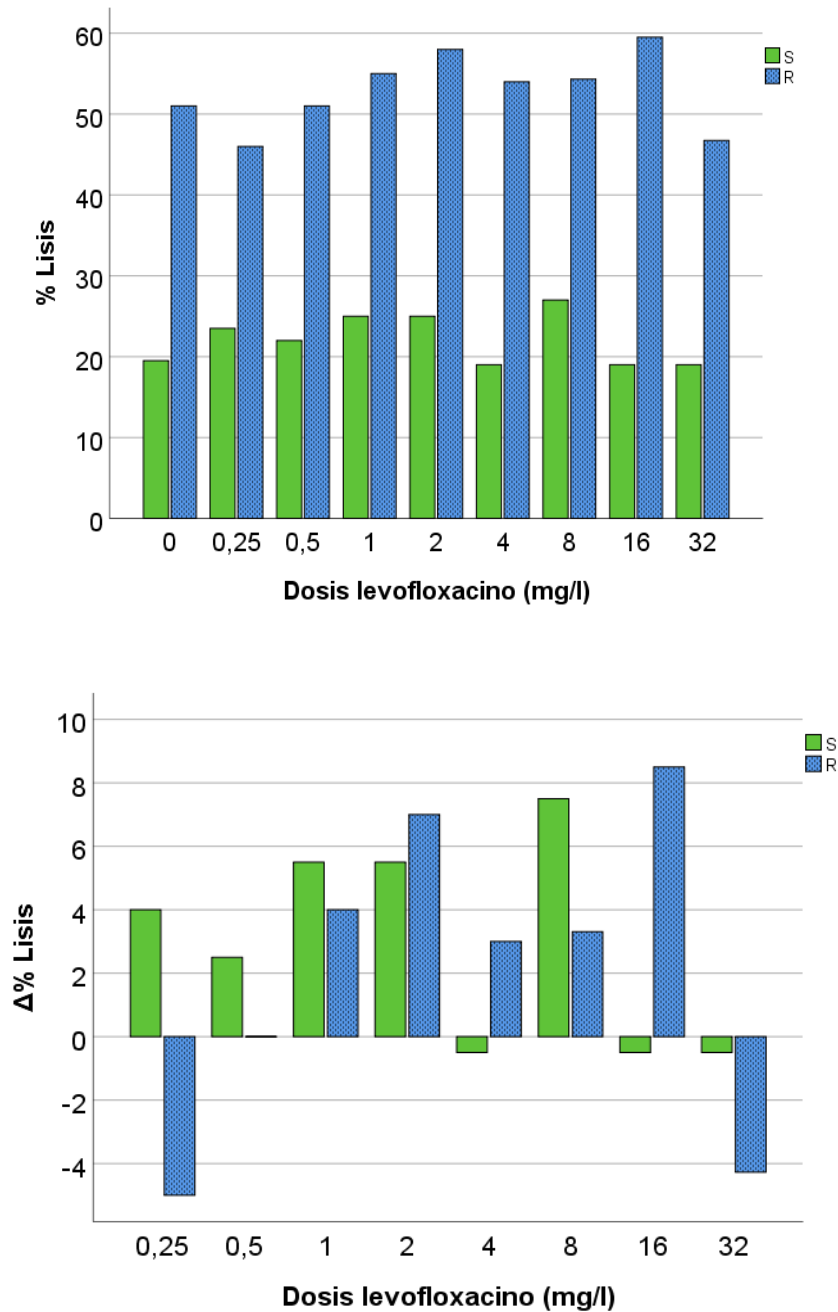
14. Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X. 2008. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 385-392.
15. Gutierrez A, Stokes JM, Matic I. 2018. Our evolving understanding of the mechanism of quinolones. *Antibiotics* 7: 32.
16. Chen F-J, Lo H-J. 2003. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance. *J Microbiol Immunol Infect* 36: 1-9.
17. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. 2012. Plasmid mediated quinolone resistance; interactions between human, animal and environmental ecologies. *Front Microbiol* 3: 24.
18. Chávez-Jacobo VM, Ramírez-Díaz MI, Silva-Sánchez J, Cervantes C. 2015. Resistencia bacteriana a quinolonas: determinantes codificados en plásmidos. *REB* 34: 4-9.
19. Robiseck A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 12: 83-88.
20. Feldman C, Anderson R. 2014. Recent advances in our understanding of *Streptococcus pneumoniae* infection. *F1000 Prime Rep.* 6: 82.
21. Kim L, McGee L, Tomczyk S, Beall B. 2016. Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in pre- and post-conjugate vaccine eras: a United States perspective. *Clin Microbiol Rev* 29: 525-552.
22. Tomasz A, Waks S. 1975. Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 4162-4166.
23. Obregon V, García P, García E, Fenoll A, López R, García JL. 2002. Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble. *J Clin Microbiol* 40: 2545-2554.
24. Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria (semFIC). 2019. Día europeo para el uso prudente de los antibióticos. Recuperado de: <https://www.semfyc.es/ante-los-preocupantes-niveles-de-resistencias-bacterianas-las-medidas-de-difusion-de-los-proa-son-todavia-mas-urgentes/>
25. Jorgensen JH, Ferraro MJ. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis.* 2009 49: 1749-1755.
26. Bauer A W, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496.

27. Thermo Fisher Scientific. *Escherichia coli* ATCC 35218 on Mueller-Hinton agar plate [Imagen en línea]. 2011. Recuperada de:
<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/CT0149B>
28. bioMérieux España. Etest *K. pneumoniae* [Imagen en línea]. Recuperada de
<http://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/etest>.
29. Khan ZA, Siddiqui MF, Park S. 2019. Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. *Diagnostics (Basel)* 9: 49.
30. Maugeri G, Lychko I, Sobral R, Roque ACA. 2019. Identification and antibiotic-susceptibility profiling of infectious bacterial agents: a review of current and future trends. *Biotechnol J* 14: e1700750.
31. van Belkum A, Bachmann TT, Lüdke G, Lisby JG, Kahlmeter G, Mohess A, Becker K, Hays JP, Woodford N, Mitsakakis K, Moran-Gilad J, Vila J, Peter H, Rex JH, Dunne WM Jr; JPIAMR AMR-RDT Working Group on Antimicrobial Resistance and Rapid Diagnostic Testing. 2019. Developmental roadmap for antimicrobial susceptibility testing systems. *Nat Rev Microbiol* 17: 51-62.
32. Otero F, Santiso R, Tamayo M, Bou G, Gosálvez J, Fernández JL. 2017. Rapid detection of bacterial susceptibility or resistance to quinolones. *Methods Mol Biol* 1644: 95-104.
33. Tamayo M, Santiso R, Gosálvez J, Bou G, Fernández JL. 2009. Rapid assessment of the effect of ciprofloxacin on chromosomal DNA from *Escherichia coli* using an in situ DNA fragmentation assay. *BMC Microbiol* 9: 69.
34. Santiso R, Tamayo M, Fernández JL, del Carmen Fernández M, Molina F, Villanueva R, Gosálvez J, Bou G. 2009. Rapid and simple determination of ciprofloxacin resistance in clinical strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 47: 2593-2595.
35. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100, 30th edition. CLSI, Wayne, PA, USA.
36. Rice KC, Bayles KW. 2008. Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 85-109.
37. Cottagnoud P, Tomasz A. 1993. Triggering of pneumococcal autolysis by lysozyme. *J Infect Dis* 167: 684-690.
38. Drlica K, Zhao X. 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4- quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 377-392.

39. Canton R, Morosini M, Enright MC, Morrissey I. 2003. Worldwide incidence, molecular epidemiology and mutations implicated in fluoroquinolone- resistant *Streptococcus pneumoniae*: data from the global PROTEKT surveillance programme. J Antimicrob Chemother 52: 944-952.

8. ANEXOS

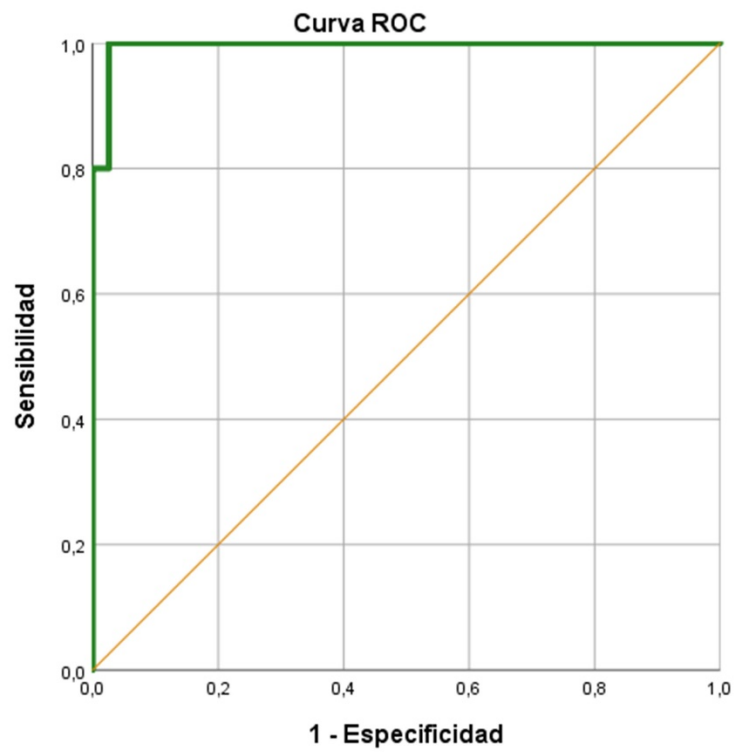
Anexo 1. Efecto de concentraciones crecientes de levofloxacino en una cepa sensible (S; CMI: 1,5 mg/L) y otra resistente (R; CMI > 32 mg/L) de *S. pneumoniae*. El parámetro evaluado es porcentaje de bacterias lisadas (% Lisis en eje y; gráfica de arriba), y su variación con respecto al cultivo control sin antibiótico (Δ % Lisis, en eje y; gráfica de abajo).



Anexo 2. Tabla de estadística descriptiva de los resultados del análisis de las cepas de *S. pneumoniae* en función de la CMI, tras incubar con levofloxacino 2 mg/L.

CMI (mg/L)		% Lisis	% Fragmentación		Δ%	
			ADN	ADN	Fragmentación	Fragmentación
0,38 (n=7)	Media	26,57	26,66	0,86	61,94	
	Mediana	23,00	20,00	-2,00	63,59	
	Mínimo	14,00	13,33	-8,00	32,14	
	Máximo	55,00	43,48	12,00	80,00	
	Desviación	13,53	13,59	7,44	16,91	
0,5 (n=19)	Media	29,58	27,21	4,89	58,82	
	Mediana	24,00	25,00	2,00	57,24	
	Mínimo	3,00	9,09	-9,00	26,80	
	Máximo	69,00	60,00	26,00	86,67	
	Desviación	17,26	14,09	8,89	16,67	
0,75 (n=10)	Media	29,20	39,22	9,20	45,04	
	Mediana	19,50	33,09	7,50	46,09	
	Mínimo	7,00	10,53	-5,00	7,62	
	Máximo	60,00	85,71	41,00	72,81	
	Desviación	19,55	22,28	13,03	20,60	
1 (n=2)	Media	22,50	25,72	15,50	43,83	
	Mediana	22,50	25,72	15,50	43,83	
	Mínimo	10,00	11,43	15,00	33,08	
	Máximo	35,00	40,00	16,00	54,57	
	Desviación	17,68	20,20	0,71	15,20	
1,5 (n=1)	Media	47,00	38,30	7,00	9,85	
	Mediana	47,00	38,30	7,00	9,85	
	Mínimo	47,00	38,30	7,00	9,85	
	Máximo	47,00	38,30	7,00	9,85	
	Desviación	-	-	-	-	
32 (n=5)	Media	52,60	25,19	0,60	3,54	
	Mediana	53,00	18,18	1,00	2,05	
	Mínimo	33,00	9,46	-4,00	1,04	
	Máximo	74,00	66,67	4,00	8,29	
	Desviación	15,04	23,67	2,97	3,17	

Anexo 3. Curva ROC y tabla de coordenadas para la selección del punto de corte (valor de $\Delta\%$ Fragmentación-ADN) que mejor discrimina las cepas resistentes de las sensibles a levofloxacin.



Área bajo la curva

Variables de resultado de prueba: $\Delta\%$ Fragmentación-ADN

Área	Desv. Error ^a	Significación asintótica ^b	95% de intervalo de confianza asintótico	
			Límite inferior	Límite superior
,995	,008	,000	,979	1,000

a. Bajo el supuesto no paramétrico

b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Coordenadas de la curva

Variables de resultado de prueba: Δ % Fragmentación-ADN

Positivo si es menor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
,0400	,000	,000
1,0550	,200	,000
1,5600	,400	,000
3,6550	,600	,000
6,4400	,800	,000
7,9550	,800	,026
9,0700	1,000	,026
16,8800	1,000	,051
25,3550	1,000	,077
29,4700	1,000	,103
32,3000	1,000	,128
32,7700	1,000	,154
33,9200	1,000	,179
35,4250	1,000	,205
36,1350	1,000	,231
38,0900	1,000	,256
45,3700	1,000	,308
50,8500	1,000	,333
51,7000	1,000	,359
53,3250	1,000	,385
54,3900	1,000	,410
55,1500	1,000	,436
55,8600	1,000	,462
56,1500	1,000	,487
56,3150	1,000	,513
56,4200	1,000	,538
56,8800	1,000	,564
57,2450	1,000	,590
58,8600	1,000	,615
62,0300	1,000	,641
63,8800	1,000	,667
64,4400	1,000	,692
65,5050	1,000	,718
67,3300	1,000	,744
70,0700	1,000	,769
72,2950	1,000	,795
73,6600	1,000	,821
74,5550	1,000	,846
75,1700	1,000	,872
77,8700	1,000	,897
80,9950	1,000	,923
82,1000	1,000	,949
84,4400	1,000	,974
87,6700	1,000	1,000

a. El valor de corte más pequeño es el valor mínimo de prueba observado

