**UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Departamento de Ciencias**

***Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología***

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Transferencia horizontal in vitro de genes de resistencia a betalactamicos entre Enterobacterias patógenas y bacterias de la flora microbiana humana**

**Autor:**

**Ms.C. Carlos E. Abanto Díaz**

**Coautores:**

**Dr. José Gonzales Cabeza**

**Jhony Alexander Terán Rojas**

**TRUJILLO, PERÚ**

**FAIN 2017**

**SECCION A: DATOS GENERALES:**

1. **Título o nombre del proyecto**

Transferencia horizontal in vitro de genes de resistencia a betalactamicos entre Enterobacterias patógenas y bacterias de la flora microbiana humana

**2. Línea de investigación de la Facultad/Área**

Microbiología molecular y biotecnología

**3. Unidad Académica a la que Pertenece el Proyecto.**

Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología.

Departamento de Ciencias.

Facultad de Ciencias de la Salud.

**4**. **Equipo Investigador:**

Mblgo.MsC. Carlos Eduardo Abanto Díaz (Investigador principal)

Dr. José Gonzales Cabeza (coinvestigador)

Laboratorista Clínico: Yony Alexander Terán Rojas (coinvestigador)

**5. Institución o Lugar donde se ejecutará el Proyecto**

Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología. Departamento de Ciencias.

Universidad Privada Antenor Orrego

**6. Duración de la ejecución del proyecto**.

Inicio: enero 2018

Termino: diciembre 2018

**SECCION B: PLAN DE INVESTIGACION**

1. **Planteamiento y formulación del problema**

Hablamos de flora normal para referirnos a aquellos microorganismos que habitualmente encontramos sobre la superficie o en el interior del cuerpo de las personas sanas. La flora normal se adquiere con rapidez durante y poco después del nacimiento y cambia de constitución en forma permanente a lo largo de la vida. Muchos de estos microorganismos también coexisten en algunos animales o bien pueden desarrollar una vida libre.

Se ha estimado que la cantidad de microorganismos comensales llega en promedio a  1014  que  no producen enfermedad en su hábitat natural a esto se denomina Flora normal del Organismo y habitan en piel, cavidades en contacto  con  la    superficie y tracto gastrointestinal.(1)

La flora normal es beneficiosa ya que impide la colonización por otros microorganismos patógenos y producen algunos nutrientes esenciales para el organismo (por ejemplo, la Vitamina K) (2), sin embargo el uso de antibióticos de amplio espectro barre con parte de la flora normal, lo que permite la aparición de infecciones por bacterias nocivas que normalmente se mantienen de forma limitada o bien bacterias externas que llegan a colonizar sin restricciones. (3)

Dentro de las estructuras del cuerpo humano con presencia de flora bacteriana  el intestino del ser humano presenta una gran diversidad bacteriana aproximadamente entre 400 a 500 bacterias  comensales.(4) La flora microbiana gastrointestinal endógena desempeña un papel fundamentalmente importante en la salud y la enfermedad en el ser humano. Estudios realizados en la microflora intestinal han revelado que la mayoría de bacterias son de los filos  Bacteroidetes y Firmicutes aproximadamente en un 95%. El filum Bacteroidete son bacterias Gran negativas como por ejemplo la familia de las enterobacterias, el filum firmicuta son bacterias Gram positivas por ejemplo clostridium y bacterias ácido lácticas incluyendo los géneros *Streptococcus, Enterococcus y Lactobacillus* (5)

 La familia Enterobacteriaceae incluye géneros que habitan en el tracto intestinal de los seres humanos y otros animales, así como no patógenos (comensales) y especies patógenas (6). Esta microbiota gastrointestinal constituye la primera barrera biológica contra las bacterias patógenas. Estos microorganismos colonizan en niveles de alta población  de células vivas y se ha demostrado científicamente para influir en la composición y actividad de la microbiota intestinal y tienen efectos beneficiosos en el huésped por prevenir o reducir la duración de algunas infecciones gastrointestinales (7) Muchas especies de esta familia las cuales están presentes en el tracto intestinal son frecuentemente expuestas a diferentes agentes antimicrobianos, creando el potencial para diseminar los genes de resistencia a los antimicrobianos a otras especies (8)

Dentro de las bacterias gram positivas presentes en el tracto intestinal los lactobacilos representan el grupo de bacterias ácido lácticas más ubicuas pudiendo crecer en todos los hábitats que contengan azúcares fermentables, productos hidrolizados de proteínas, vitaminas, factores de crecimiento y aun baja tensión de oxígeno. Además, por ser buenos productores de ácido láctico (hasta 2,7%) y en ocasiones de sustancias antimicrobianas, tienden a dominar numéricamente y limitar o impedir el desarrollo de microorganismos patógenos. En el hombre, los animales y las plantas, cotidianamente se encuentran lactobacilos, probablemente porque éstos son sus huéspedes naturales. Las bacterias ácido lácticas son inocuas para la especie humana (9). No obstante, investigaciones recientes han afirmado que las bacterias comensales incluyendo las bacterias ácidos lácticas pueden actuar como reservorios de genes de resistencia a antibióticos similares a los encontrados en patógenos humanos (10).  La principal amenaza asociada con estas bacterias es que pueden transferir los genes de resistencia a bacterias patógenas por medio de elementos móviles como plásmidos o transposones (11)

En efecto los genes de resistencia puede encontrarse formando parte de la flora de distintos nichos ecológicos y, por tanto, transmitirse según su cadena epidemiológica (fuente de infección, mecanismo de transmisión y huésped sensible),de una persona a otra, de un animal a otro, de un animal a una persona, de un animal a un alimento, o de un alimento a una persona de bacterias patógenas o la flora normal. Es debido a estas presencias genéticas y a estas capacidades  de las bacterias   que la microflora intestinal se ha vuelto un escenario muy favorable para que ocurra la transferencia de genes al tener un número alto de bacterias capaces de transferir genes de resistencia con mucha facilidad. Por tal razón su estudio se ha vuelto de gran interés para determinar los factores que influyen en este flujo de genes  ya que son de interés medico al observar bacterias patógenas que puedan causar daños severos en la salud humana (5)

El estudio masivo de las microflora intestinal de individuos sanos ha revelado una cantidad significativa de determinantes de resistencia, algunos conocidos como betalactamasas tipo CTX-M o TEM y otras muchas no conocidas. *Sommer y col.*encuentran hasta 93 determinantes de resistencia confiriendo resistencia fenotípica, entre ellas 27 betalactamasas, confirmando la idea de que el microbioma intestinal es un reservorio de resistencia). Ahora bien, el proceso de transferencia desde bacterias patógenas a las comensales  del intestino y viceversa es todavía un proceso poco aclarado  (11)

**Formulación del problema:**

Es posible la transferencia horizontal de genes bla tipo TEM, SHV y CTX-M que codifican la resistencia a antibióticos betalactamicos entre Enterobacterias patógenas como *Salmonella, Kleibsiella pnuemoniae. Shigella y E.coli* y bacterias miembros de la microflora normal como *Lactobacilos, Enterococos, Staphylococcus epidermidis* ?

1. **Antecedentes**

La resistencia bacteriana está siendo ampliamente estudiada, algunos microorganismos adquieren resistencia por mutación o la adquisición de genes de otras bacterias. La resistencia adquirida por transferencia horizontal de genes aparece como el más preocupante, debido al gran impacto en la terapéutica (12). por lo cual se han realizado estudios de la movilidad y la transferencia de genes de resistencia entre la flora no patógena normal de animales y personas, con bacterias patógenas y entre la flora ambiental. Actualmente se reconoce ampliamente que la transferencia horizontal de genes (HTG) es responsable de jugar un papel importante en la adquisición, evolución y distribución de genes que confieren resistencia a antibióticos, además de conferir virulencia y características metabólicas de algunas especies bacterianas (13)

Barros y col en el 2012 llevaron a cabo estudios de investigación en plásmidos presentes en *E. coli* aislado a partir de muestras de pollos y gallinas ponedoras, estos autores detectaron plásmidos de alto peso molecular en la mayoría de los aislados lo que pueden indicar su asociación con resistencia a los antimicrobianos, esto sugiere que está ocurriendo transferencia de genes entre diferentes bacterias, patógenas y no patógenas, que sería responsable de mantener un "pool" de genes procesos vinculados en la patogénesis de la población bacteriana (14) (15)

Desie y col en el 2013 examinaron la posibilidad de transferencia de la resistencia a la ciprofloxacina entre *E. coli* de aves de corral y los humanos los resultados obtenidos indicaron claramente que se produce la transmisión de los plásmidos de los clones entre las aves y los seres humanos. (16)

Los análisis de la transferencia horizontal de genes a través de la conjugación con integron de clase 1 en muestras de *E. coli* aves de corral intestinal y extra intestinal hecha por Nórgrády y col en el 2006 sugieren que muchas de las bacterias pueden contener diferentes combinaciones de elementos de resistencia dentro de la clase 1 integrones frente a: cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclina, gentamicina, kanamicina, trimetoprim-sulfametoxazol, cefotaxima, ácido nalidíxico y ciprofloxacina Estos resultados son de gran importancia, dado que sugieren que las cepas estudiadas podrían actuar como un reservorio para el potencial de propagación de genes de resistencia frente los fármacos del estudio (17)

Okamoto et al. (2011) informaron de la capacidad y la propagación de genes de resistencia en bacterias no patógena y beneficioso del intestino de las aves como los "Lactobacillus spp." Las cuales actuarían como reservorios de importante cepas bacterianas "*Salmonella enteritidis* y *E. coli*" patógeno para las aves y seres humanos. (18). Este proceso de adquisición de genes de resistencia entre bacterias patógenas e intestinales benéficas fue bien informado y revisado por Teuber et al. (1999) en otras especies de animales, estos autores describen la transferencia de plásmidos de conjugación y transposones como responsable de la transferencia de la resistencia a antibióticos entre las bacterias del ácido láctico presentes en los alimentos.(19) Los resultados antes mencionados sugieren similitud en los genes responsables de los perfiles de resistencia, lo que denota el potencial fuente de propagación de la resistencia a otras bacterias,

En el caso de bacterias del ser humano se ha demostrado que las bacterias del tracto gastrointestinal habrían tenido un papel relevante como vehículo de transmisión (20), pues habrían sido bacterias reiteradamente expuestas a antibióticos lo que habría facilitado la selección de variantes resistentes, bien por mutación cromosómica o por fenómenos de transferencia horizontal (21, 22). (elementos genéticos móviles implicados en la resistencia)

El intestino alberga 100.000 millones de bacterias de más de 100 especies diferentes (10 veces el número de células de un organismo humano). La administración de antibióticos favorece la colonización del intestino por bacterias resistentes. Los resultados de algunos investigadores indican que cuanto más se prolongan los tratamientos de antibióticos más aumenta el riesgo de colonización. Afortunadamente el efecto de barrera es eficaz en el hombre cuando esta funciona correctamente. En ese caso, las bacterias resistentes transitan en el tubo digestivo sin implantarse duraderamente. Desgraciadamente, esto es cada vez menos frecuente, ya que esta barrera es sensible a múltiples agresiones. (23)

Trabajos recientes han demostrado la posibilidad de colonización del tubo digestivo del hombre por bacterias de origen animal y la transferencia de genes de resistencia a los antibióticos desde estos microorganismos hasta las bacterias comensales del hombre. (23)

Experiencias realizadas en el Instituto Pasteur de París y en el INRA han mostrado que este simple tránsito intestinal permite a veces la transferencia de las resistencias bacterianas a bacterias sensibles de la flora normal, incluso si la bacteria en tránsito no es de la misma especie que las de la flora intestinal. (24)

Hay estudios que demuestran la transferencia de plásmidos interespecie in vivo, como el trabajo de Marchandin y colaboradores en 1999, que describen la transferencia de una betalactamasa plasmídica entre cuatro enterobacterias diferentes aisladas de un mismo paciente ingresado en un hospital y sometido a presión antibiótica. (25). Ésta es la forma más probable por la que *Salmonella spp*. haya adquirido algunas betalactamasas tipo TEM, tan frecuentemente halladas en plásmidos conjugativos de cepas de *E.coli* aisladas en el intestino de hombres y animales, como resultado del intercambio genético entre ambos microorganismos. Las investigaciones más recientes han examinado también la participación de cepas no patógena en la difusión de genes de resistencia en el medio ambiente y su posible papel como reservorios de genes de resistencia al recibir estos genes de otras especies patógenas Es por ello que los estudios sobre resistencia microbiana a los antibióticos que se centraban principalmente a especies bacterianas patógenas, pero en los últimos años ha prestado más atención a aislamientos no patógenos porque se sabe que la resistencia a los antibióticos es también generalizada entre estos aislamientos (26)

Por ejemplo las bacterias lácticas a lo largo de su evolución han adquirido los genes necesarios para la utilización de la lactosa de manera independiente en mas de una ocasión y de distintas fuentes; genes que se han ido transfiriendo con posterioridad entre los miembros del grupo

Otro ejemplo lo constituye el plásmido pk214 descubierto en Lactobacilos lactis el cual codifica resistencia a diversos antibióticos como estreptomicina , cloranfenicol y tetraciclina. A juzgar por la organización génica y la homología de secuencia de ADN, los segmentos en los que se encuentran los genes de resistencia a antibiotricos, parecen provenir de plásmidos de *S. aureus*, *Listeria monocytogenes y Streptocos sp* (27). Las mismas conclusiones parecen derivarse del plásmido pMD5057 de *Lactobacilos plantarum* en el que parece haberse insertado de forma reciente un gen de resistencia a tetraciclina procedente de *S. aureus* o *Clostridium perfringens*. Ambos plásmidos ejemplarizan el potencial de transferencia horizontal y el papel que esta juega en la adaptación bacteriana a un ambiente cada vez más cargado de antibióticos (28)

En el caso de otros miembros de la flora intestinal como los Enterococos, epidemiólogos americanos de la Cornell University han establecido que la resistencia a la vancomicina y su difusión depende de un elemento genético altamente móvil, que podría pasar del enterococo a otras formas bacterianas mucho más patógenas, como los estafilococos. Esta resistencia se explica por una modificación de los elementos genéticos bacterianos extra-cromosómicos: los plásmidos. Estos pueden transmitirse verticalmente pero también horizontalmente a bacterias de diferente especie. (29)

**3. Justificación**

Actualmente el problema de la resistencia a antibióticos principalmente de tipo betalactámicos es uno de los más frecuentes presentados en los hospitales y en el tratamiento de diferentes patologías ya sea que ésta se presente por mutaciones en el genoma bacteriano o por transferencia de genes a través de plásmidos o transposones, ocurriendo esto como consecuencia del alto consumo de éste tipo de antibióticos a veces de manera innecesaria debido a la automedicación o por tratamientos demasiados prolongados lo cual afecta no solo al patógeno sino que termina produciendo también muchas veces una disminución significativa de las poblaciones bacterianas de la flora normal, sin embargo desde hace unos quince años se conoce de la existencia de un flujo de genes entre bacterias, de cocos Gram positivos hacia los bacilos Gram negativos y viceversa (30) la de un sistema de transferencia genética de las bacterias hacia las plantas(33) en condiciones naturales asi como la demostración mas reciente en laboratorio de una transferencia de ADN de los bacilos Gram negativos a los cocos Gram positivos (6) de las bacterias a los hongos (31) o a las células de mamíferos, incluido el ser humano, (32). Es por todo ello que el presente trabajo pretende demostrar in vitro si es posible que bacterias de nuestra flora microbiana normal como son Lactobacilos, *Staphylococcus epidermidis* y *Enterococos* puedan volverse resistente a los antibióticos betalactamicos al recibir de las patógenas por mecanismos de transferencia génica los genes de resistencia que codifican la producción de betalactamasas de espectro extendido tipo TEM. SHV y CTX-M y de esta manera en lugar de verse afectadas por los tratamientos antibióticos puedan convertirse a mediano plazo en productoras de betalactamasas de espectro extendido, con el peligro que puedan servir de fuente de reserva de la resistencia antibiotica a betalactamicos en el interior de nuestro organismo a partir de las cuales pueda trasmitir nuevamente éstos genes de resistencia a nuevas bacterias patógenas sensibles incluso de diferentes especies complicando aún más el panorama de la resistencia

**4. Objetivos**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Objetivo General**  **(Propósito del proyecto  )** | | **Resultados Finales** | **Medios de Verificación** |
| Demostrar in vitro la transferencia horizontal de genes de resistencia que codifican la producción de betalactamasas de espectro extendido tipo TEM. SHV y CTX-M de Enterobacterias patógenas como *Salmonella, Shigella y E.coli* portadoras de estos genes a bacterias de la flora microbiana humana como son *Lactobacilo*s, *Staphylococcus epidermidis* y *Enterococos* sensibles a betalactamicos | | Presencia de los  genes CTX-M  TEM SHV que codifican la resistencia a antibióticos betalactamicos  en los  cultivos de bacterias  de la flora microbiana normal como *Lactobacilos, Enterococcus* y *S. epidermidis* | **MV1**  Informe  de investigación con las bandas de ADN amplificadas correspondientes a los genes CTX-M  TEM SHV que codifican la resistencia a antibióticos betalactamicos  en los  cultivos de bacterias  de la flora microbiana normal |
| **Objetivos Específicos**  **(Componentes)** | | **Resultados Intermedios:** | **Medios de Verificación** |
| 1 | Detectar por PCR la presencia de genes  TEM SHV y CTX-M que codifican la resistencia a antibióticos betalactamicos en cepas de Enterobacterias patógenas donadoras  como *E.coli, Salmonella, Shigella, Kleibsiella pnueminiae*  y la  ausencia de estos genes en cepas receptoras de Lactobacilos sp, Enterococos y Staphylococos epidermidis | Presencia de genes TEM, CTX-M y SHV en las muestras de ADN provenientes de cepas de *E. coli Salmonella, Shigella y Kleibsiella pnuemoniae*    Ausencia de los genes  TEM SHV y CTX-M en las muestras de ADN provenientes de  cepas de  *Lactobacilos, Enterococcus y S. epidermidis* | Informe y fotografías de los corridos electroforéticos  con los resultados de PCR que confirmen la presencia  de las bandas para cada tipo de gen en  los cultivos de Enterobacterias patógenas    Informe y fotografías de los corridos electroforéticos  con los resultados de PCR que confirmen la ausencia  de las bandas para cada tipo de gen en los cultivos de la flora normal |
|  | Detectar  de la adquisición de genes BLEES por Transferncia horizontal en las bacterias de la flora normal *Lactobacilos, Enterococs* y *S. epidermidis* | Obtención de colonias  de la flora normal como  *Lactobacilos, Enterococcus y S.epidermidis*  aislados a partir del caldo de conjugación, crecidos  en medios de cultivo con antibióticos betalactamicos resistentes a los mismos  Presencia de los tipos de genes bla TEM, SHV, CTX-M en las muestras de ADN  de   los cultivos (transconjugados)  de la flora como *Lactobacilos, Enterococcus y S. epidermidis* amplificados por PCR | Informe con las medidas de los halos de resistencia  obtenidos de las bacterias de la flora normal (transconjugados)    Informe  de investigación con las bandas de ADN amplificadas correspondientes a los genes bla TEM, SHV, CTX-M que codifican para β-lactamasas de Espectro Extendido |

**5. Marco Teórico:**

Los antibióticos ß-lactámicos son ampliamente utilizados, tanto a nivel hospitalario como en la comunidad, favoreciendo la selección de bacterias productoras de enzimas ß-lactamasas, que son responsables de la resistencia por hidrólisis del anillo ß-lactámico del antibiótico1. Trascendental importancia revisten las cepas productoras de ß-lactamasas de espectro-extendido (BLEE), enzimas que tienen la capacidad de inactivar cefalosporinas de tercera generación (C3G), monobactámicos y, en menor grado, algunas cefalosporinas de cuarta generación1-3. Estas cepas productoras de BLEE son seleccionadas, principalmente, en el ambiente hospitalario por el frecuente uso de cefalosporinas, especialmente de tercera generación1,5. la aparición y diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos. betalactamicos es una característica codificada en genes de ubicación extra cromosómica. La presión selectiva que los antibióticos ejercen en determinados hábitats favorece la adquisición de genes de resistencia como respuesta adaptativa de los microorganismos. La resistencia es, pues, un proceso evolutivo inevitable y predecible. el principal mecanismo por el que las bacterias obtienen genes de resistencia a antibióticos es la adquisición de ADN exógeno a través del proceso de la   transferencia genética horizontal el cual permite a las  bacterias adquirir material genético de otras células o del entorno y con ello aumentar sus capacidades bioquímicas.. En ocasiones, por este mecanismo se adquieren bloques génicos dedicados a la resistencia a muchos antibióticos distintos. Esto es debido a que los genomas bacterianos están en un constante estado de flujo de genes, y cualquier segmento de ADN en una población bacteriana puede transferirse horizontalmente a otra. (10)

La transferencia horizontal de genes consiste en la transmisión del genoma o parte de éste de un organismo a otro que no forma parte de su descendencia. Desde hace tiempo se conoce la importancia del proceso de transferencia genética horizontal en procariotas, como en el caso de la conjugación bacteriana, descubierto a mediados del siglo pasado, en la que una célula transfiere información genética a otra diferente con la mediación de plásmidos. Estos procesos son muy importantes como fuente de variación genética, es una herramienta importante en la adaptación de procariotas a un nicho específico, ya que la adquisición de un conjunto de genes ya preparado y mejorado aumenta la adaptabilidad de estos organismos (30)

Sin embargo, en los últimos años se han acumulado evidencias que los procesos de intercambio horizontal de material genético son mucho más generalizados y frecuentes de lo que se pensaba en un principio, no estando reducido a ciertos tipos de bacterias. dado que también se produce transferencia genética entre especies alejadas filogenéticamente, lo cual permite que los genomas microbianos esten formados por pequeñas piezas de mosaico de procedencia diversa engarzadas primorosamente hasta conformar las eficientes y adaptadas especies microbianas actuales(4) La transferencia horizontal de genes parece haber tenido una gran importancia en todos los grupos de seres vivos, incluyendo plantas superiores y animales, al menos en las primeras etapas de la evolución. Hoy sabemos que gran parte del genoma humano está constituido por ADN vírico, incorporado al material genético de la célula (31).(32)

Las bacterias patógenas han desarrollado sistemas de transferencia de ADN extremadamente eficaces a un espectro de huéspedes muy amplio. La transferencia tiene lugar por diferentes mecanismos: la conjugación, que implica un contacto físico directo entre bacteria donante y bacteria receptora y por lo cual el plásmido pasa de una a otra; la transformación, por la cual una bacteria llamada «competente» incorpora ADN desnudo, presente en el medio; y la transducción, durante la cual el ADN es vehiculado por un bacteriófago.31

La conjugación es la vía principal de diseminación de genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas. Éste es el mecanismo de intercambio de genes más importante entre las bacterias gram-negativas. Para que se produzca es imprescindible que las bacterias estén en contacto directo entre sí y por la tanto es muy frecuente que ocurra entre bacterias que comparten nicho biológico, como ocurre con las enterobacterias en el intestino. En los microorganismos gram-negativos participa en el proceso un “*pilus*conjugativo” a través del cual se produce el intercambio de material genético. En los microorganismos gram-positivos el proceso no parece estar relacionado con la presencia de “*pili*conjugativo”  En este caso juega un papel primordial la producción de feromonas  por la célula receptora. Estas feromonas son pequeños péptidos que inducen la formación de adhesinas en las células donadoras responsables del contacto entre ambas. (33)

La conjugación permite la transferencia de plásmido entre distintos géneros bacterianos (34) incluso algunos muy alejados filogenéticamente, algo que no ocurre con la transformación y la transducción.  No obstante las bacterias  gram-positivas tienen más facilidad para transferir su material genético y es mucho más frecuente encontrar genes de resistencia a antibióticos específicos de microorganismos gram-positivos en gramnegativos que el caso contrario (35)

 La transmisión de los factores de resistencia a los microorganismos patógenos complica o impide el tratamiento de las enfermedades que éstos causan. En ambientes hospitalarios es habitual la presencia de microorganismos resistentes a muchos antibióticos distintos, fruto de procesos de concentración de genes dedicados a este fin. De esta forma, han ido surgiendo cepas resistentes y multiresistentes de estafilococos, neumococos y enterococos responsables de graves infecciones, difíciles de tratar, La transmisión de las resistencias dependerá de la naturaleza de los elementos en que se codifica (plásmidos, transposones, etc.), de la concentración y proximidad de las cepas donadora y receptora, y de la presencia de agentes selectores en el medio que favorezcan la multiplicación de la progenie resistente (35)

La resistencia a antibióticos por transferencia génica horizontal también presenta un peligro potencial cuando se encuentra en los microorganismos comensales o beneficiosos, ya que estos pudieran convertirse en reservorios desde dónde los genes de resistencia podrían transferirse a los microorganismos oportunistas y a los patógenos 14), es por esto que los estudios sobre resistencia microbiana a los antibióticos que se centraban principalmente en especies bacterianas patógenas, en los últimos años,  ha prestado más atención a aislamientos no patógenos porque se sabe que la resistencia a los antibióticos es también generalizada entre estos aislamientos (27).  Entre los aislamientos no patógenos, las bacterias comensales y omnipresentes como los de la flora normal representan un reservorio de genes de resistencia a los antibióticos con potencial para ser transferido a humanos, animales y microbios patógenos (13)  por todo ello es que  en microorganismos probióticos, como los Lactobacilos también ha surgido dudas con respecto a su introducción en la cadena alimentaria, ya que eventualmente estos microorganismos podrían funcionar como reservorios de genes de resistencia que podrían ser transferidos a la flora comensal de animales y humanos y a las bacterias patógenas que residan temporalmente en el hospedero (3-4), razón por la cual es de suma importancia el verificar que las bacterias ácido lácticas a utilizar como probióticos carezcan de elementos de resistencia antes de ser adicionadas a productos alimenticios (5). Identificación, cuantificación y determinación del perfil de sensibilidad a antibióticos de bacterias prebióticas adicionadas a productos de consumo frecuente en Costa Rica

**6. Hipótesis**

Los genes que codifican la resistencia a antibióticos betalactamicos de tipo TEM, CTX\_M y SHV pueden ser transferidos horizontalmente desde las cepas de Enterobacterias patógenas como *Salmonella, Shigella , Kleibsiella pneumoniae, Escherichia coli* a bacterias de la flora microbiana normal como *Lactobacilos, S. epidermidis y Enterococos*

**7. METODOLOGIA (DISEÑO EXPERIMENTAL)**

**I. Obtención de las cepas bacterianas a ensayar.**

Como cepas dadoras se utilizará cuatro cepas: *E.coli Salmonella Shigella y K. pneumoniae* productoras de BLEE, y poseedoras de los genes bla TEM, CTX-M y SHV. Las cepas seran aisladas de diversas muestras hospitalarias especialmente heces y orina

Como cepas receptoras se utilizará tres cepas ATCC que no produzcan betalactamasas y que no posean los genes bla CTX-M, TEM y SHV como *Lactobacilos, Enterococos y S. epidermidis*. A partir de estas cepas se obtendrán mutantes resistentes

Se utilizará cepas ATCC control tanto de *E.coli Salmonella Shigella y Kleibsiela pnuemoniae* como de *Lactobacilos Enterococos y S. epidermidis*

**II. Análisis de genes BLEES (TEM SHV y CTX-M) en cepas de enterobacterias patógenas donadoras como *E.coli, Salmonella, Shigella, Kleibsiella pnueminiae* y ausencia de estos genes en cepas receptoras de *Lactobacilos sp, Enterococos Staphylococos epidermidis***

Se analizara por PCR, cepas de *E.coli, Salmonella, Shigella, Kleibsiella pnueminiae* positivas a los genes BLEES y cepas de *Lactobacilos, Enterococos y Staphylococos epidermidis* negativas para los mismos genes a ensayar para lo cual se seguirán los siguientes procedimientos.

**2.1. Extracción de ADN: La extracción de DNA se realizará por el método de ebullición según lo describen Zhang y col. con algunas modificaciones (17).**

Las colonias frescas de 24-48 horas serán suspendidas en 400 μL de agua destilada estéril, llevadas a ebullición por 15 min y luego centrifugadas por 5 min a 15000 rpm. El sobrenadante conteniendo el DNA será conservado a -20°C.

**2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa:**

Se llevará a cabo en un termociclador. La mezcla de reacción de PCR a trabajar para cada uno de los genes será ajustada según las condiciones de TermoFisher Cientific. Se emplearán primers o cebadores de oligonucleótidos específicos que amplificarán diferentes genes bla (TEM, SHV, CXT).

Para la amplificación de los genes bla TEM serán empleados los primers TEM-1 (5´-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA3) y TEM-2 (5´- GACAGTTACCAATGCTTAATC 3).

Para la amplificación de los genes bla SHV serán empleados los primers: S H V-1 ( 5 ´ TGGTTATGCGTTATATTCGCC 3) y S H V - 2 ( 5 ´ - GGTTAGCGTTGCCAGTGC 3)

Para la amplificación de los genes bla CTX-M serán empleados los primers: CTX-M - 1 ( 5 ´-TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA3') y CTX-M - 2 ( 5 ´ - CGATATCGTTGGTGGTGCCAT)

Los productos de PCR amplificados se analizaran en una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%, donde se verificará el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados resultantes, utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb. como referencia. Se esperara obtener bandas del tamaño aproximado de 1078 pb, 870 pb y de 544 pb para los genes blas TEM, SHV y CTX-M respectivamente

**III. Ensayo de transferencia horizontal de genes**

**2.1. Estandarización de los inóculos**

Se ensayaran sembrando en caldo de cultivo diversas concentraciones de inoculo tanto de los cultivos de la flora normal: Lactobacilos Enterococos y Staphylococos epidermidis asi como de las enterobacterias patógenas Esherichia coli Salmonella, Shigella, Kleibsiella pneumoniae, manteniendo una proporción de concentración de inoculo 4 a 1 entre las bacterias de la flora normal y las Enterobacterias patógenas respectivamente con la finalidad de encontrar la concentración a la cual ambas especies bacterianas crezcan juntas, sin que el crecimiento de las enterobacterias patógenas inhiba el crecimiento de las bacterias de la flora normal. Se ensayaran según las siguientes combinaciones

**Siembra y crecimiento simultaneo de E. coli con miembros de la flora**

En caldo de cultivo 1: Inoculo de E.coli con Lactobacilos

En caldo de cultivo 2: Inoculo de E. coli con Enterococus

En caldo de cultivo 3: Inoculo de E.coli y S. epidermidis

**Siembra y crecimiento simultaneo de Salmonella con miembros de la flora**

En caldo de cultivo 1: Inoculo de Salmonella con Lactobacilos

En caldo de cultivo 2: Inoculo de Salmonella con enterococus

En caldo de cultivo 3: Inoculo de Salmonella y S. epidermidis

**Siembra y crecimiento simultaneo de Shigella con miembros de la flora**

En caldo de cultivo 1: Inoculo de Shigella con Lactobacilos

En caldo de cultivo 2: Inoculo de Shigella con enterococus

En caldo de cultivo 3: Inoculo de Shigella y S. epidermidis

**Siembra y crecimiento simultaneo de Kleibsiella pneumonaie con miembros de la flora**

En caldo de cultivo 1: Inoculo de K. pnuemoniae con Lactobacilos

En caldo de cultivo 2: Inoculo de K. pnuemoniae con enterococus

En caldo de cultivo 3: Inoculo de K. pnuemoniae y S. epidermidis

La cantidad de cel/ml de cada uno de los inóculos trabajados se determinarán a través de Nefelometro de Mac Farland

**2.2. Estandarización de la concentración de Antibiótico a usar durante la Transferencia horizontal de genes**

A través de la concentración mínima inhibitoria se determinara la concentración de antibiótico (cefalosporina de 3era generación) para la cual es posible evidenciar tanto el crecimiento de las enterobacterias patógenas como los de la flora normal (al menos en un 50%) Dicha concentración se usara durante la prueba de Transferencia horizontal de genes como un inductor antimicrobiano

**2.3. Realización in vitro de la transferencia horizontal de genes de las poblaciones de Enterobacterias donadoras y bacterias de la flora normal receptoras (según Valencia y col 2010) (35)**

En un sistema con agitación continua a 70 RPM en caldo de cultivo (caldo de conjugación) se sembrara a la vez los inóculos (a la concentración previamente estandarizados) de los cultivos puros de las Enterobacterias patógenas y de la flora normal según las combinaciones de cultivos arriba especificadas y se añadirá el antibiótico (cefalosporina de 3era generación) a la concentración previamente determinada (el cual creara el medio hostil antibacteriano necesario para la transferencia) y se dejara incubar por 24 horas a 37C

**III. Comprobación de la adquisición de genes BLEES por Transferencia horizontal en las bacterias de la flora normal**

**3.1. Aislamiento y selección de transconjugados (según Valencia y col 2010) (35)**

Se tomara 100ul del caldo de conjugación y se lo sembrara en diferentes medios selectivos según sea el tipo de cepa transconjugada a reaislar :

A) placas agar Rogosa con cefotaxima (15 ug/ml) y ceftazidima (50 ug/ml)) para el reaislamiento de Lactobacilos

B) agar Manitol salado con cefotaxima (15 ug/ml) y ceftazidima (50 ug/ml)) para el reaislamiento de S. epidermidis

C) agar Enterococo con cefotaxima (15 ug/ml) y ceftazidima (50 ug/ml)) para el reaislamiento de S. epidermidis

Todas las colonias que crecieran en los medios con antibióticos (transconjugados) serán seleccionadas, cultivadas y almacenadas en congelación.

**3.2. Comprobación de la adquisición de genes de Betalactamasas por PCR**

A partir de las colonias que crezcan en los medios con antibióticos (transconjugados seleccionados) se procederá a hacer la comprobación de la presencia de genes BLEE (TEM , CTX-M o SHV) en estos cultivos. La detección de los genes de ßlactamasas, tipo TEM , CTX-M o SHV) se realizara utilizando la reacción en cadena de la polimerasa PCR, de acuerdo a los protocolos mencionados y con los mismos primers anteriormente ya señalados

**3.3. Análisis estadístico**

Se diseñara una base de datos en Microsoft Excel y, posteriormente, se analizarán en SPSS.

**8. BIBLIOGRAFIA**

1.-   Santamaría, Y. Flora cutánea como protección y barrera de la piel normal.

 Rev. Cent Dermatol. Pascua. 11(1): 18-21. 2000 Disponible en: <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol16num3/articulos/microcosmos/index.htm>

2. Montiel, F.  Boletín Laboratorio de Enfermedades Infecciosa .26 (3).1997.

      Disponible en:

      http://escuela.med.puc.cl/publ/boletin/Laboratorio/FloraBacteriana.html

3. Barreda, P.Desarrollo de la Flora Intestinal Normal. 2005. Disponible en:

<http://www.pediatraldia.cl/flora_intestinal_normal.htm>

4. Dionisio F, Rodrigues, O. 2002 Genetics: Plasmid Spread Very Fast in Heterogeneous Bacterial communities Vol 162 pag 1521-32

5. Eckburg P. Relman D. 2005. Science: Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. Vol.308, p 1635-38

6. Howard, B.J.; Klass, II. J.; Rubin, S.J. *etal.*Clinical and pathogenic    microbiology. StLouis: *The C. V. Mosby,* 1987.

7. Ouwehand, A.C.; Salminen, S.; Isolauri, E. Probiotics: an overview of

beneficial effects. Antonie Van Leeuwenhoek , v.82, p.279-289, 2002.

8. Goldstein, C.; Lee, M.D.; Sanchez, S. *et al.*Incidence of class 1 and 2 integrases in linical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicr. Agents Chemother.*, v.45, p.723-726, 2001.

9. Palomino, C. 2015. Estudio de la capacidad antagónica de bacterias ácido lácticas aisladas de productos pesqueros ahumados en frío. Trabajo de ascenso. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas.

10.Vanegas, M.C. 2012. Antimicrobial resistance of bacteria in food. pp. 455-468. En: Pana, M. (ed.). Antibiotic resistant bacteria - A continuous challenge in the new millennium. InTech, Rijeka, Croatia.

11.Mathur S, Singh R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria —a review. International Journal of Food Microbiology, 105 (3): 281-295.

12.Spinosa, H.S.; Ito, N.M.K.; Miyaji, C.I.; et al. Antimicrobianos: considerações gerais. In: PALERMO- NETO  J.;  SPINOSA,  H.S.;  GORNIAK S.L.      Farmacologia      Aplicada      a Avicultura.    1.ed.  São  Paulo:  Roca, 2005, p.87-103.

13.DE LA CRUZ, I.; DAVIES, J. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. Trends Microbiology,    v.8,   n.8,   p.128–133, 2000.

14.Barros, M.R.; Silveira, W.D.; Araujo, J.M.D. *et al.*Antimicrobial resistance and plasmidial profile of *Escherichia coli*strain isolated from broilers and commercial layers in the state of Pernambuco, Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.32, n.5, p.405-410, 2012.

15.Van Den Bogaard, A.E.; London, N.; Driessen, C. et al. Antibiotic resistance of faecal Escherichia coli in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.47, n.6, p.763-771, 2001.

16.Dessie, H.K.; Bae, D.H.; Lee, Y.J Characterization of integrons and their cassettes in Escherichia coli and Salmonella isolates from poultry in Korea. Poultry Science, v.92, n.11, p.3036-3046, 2013.

17.Nogrády, N.; Paszti, J.; Pikó, H. *et al.*Class1 integrons and their conjugal transfer with and without virulence associated genes in extra intestinal *Escherichia coli*of poultry. Avian Pathology, v.35, n.4, p.349-356, 2006.

18.Okamoto, A. S.; Andreatti filho, R.L.; Rocha, T.S. et al. Transference in vitro of the resistance to the antimicrobials between Escherichia coli, Lactobacillus spp. and Salmonella enteritidis isolated from chickens. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.63, n.5, p.1149-1153, 2011

19.Teuber, M.; Meile, L.; Schwartz, F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antonie van Leeuwenhoek, v.76, n.1-4, p.115– 137, 1999.

*20.*Hallet B, Arciszewska LK, Sherratt DJ.  Reciprocal control of catalysis by the tyrosine recombinases XerC and119

21.XerD: an enzymatic switch in site-specific recombination. 1999. Mol Cell. 4(6):949-59.26.-Cox MM. Motoring along with the bacterial RecA protein. 2007. Nat Rev Mol Cell Biol. 8(2):127-38.

22.De Palmenaer D, Siguier P, Mahillon J. IS4 family goes genomic. 2008. BMC Evol Biol. 23;8:18

23. Antoine Andremont, Denis Corpet, Patrice Courvalin. Op. Cit.

24. Marchandin H., Carrier C., Sirot D., Jean-Pierre H. y Darbas H. 1999. TEM-24

Produced by four different species of Enterobacteriaceae including Providencia

rettgeri in a single patient. Antimicrob Agents Chemother; 43(8): 2069-2073.

25.Balis E., Vatopoulus A.C., Kanelopoulou M., Mainas E., Hatzoudis G.,Kontogianni V., Malamou H., Kitsou-Kiriakopoulou S. y kalapothaki V. 1996 Indications of in vivo transfer of an epidemic R plasmid from Salmonella enteritidis to Escherichia coli of the normal human gut flora. J Clin Microbiol; 34(4): 977-979.

26.Perreten,V. F Schwarz,L Cresta, M. Boeglin 1997 Antibiotic Resistance spread in food. Nature 389: 801-802

27.Danielsen M. 2002 Characterization of the tetracycline resistance plasmid pMD5057 from Lactobacillus plantarun 5057 reveals a composite structure Plasmid 48:98-103

28.Rybkine T, Mainardi JL, Sougakoff W, Collatz E, Gutmann L. Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of Enterococcus faecium with different levels of beta-lactam resistance. J Infect Dis 1998; 178(1): 159-63.

29.Lawrence, J. G. (2002) Gene Transfer in Bacteria: Speciation without Species%3F. Theoretical Population Biology, 61: 449–460.

30.Arber, W. (2000) Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial

evolution. FEMS Microbiology Reviews 24: 1-7.

31.Solomon, J. M. & Grossman , A. D. (1996) Who's competent and when: regulation of

        natural genetic competence in bacteria Trends in genetics, 12 (4): 150-155.

32.Clewell D.B. 1990. Movable genetic elements and antibiotic resistance in Enterococci. Eur J Microbiol Infect Dis; 9: 90-120.

33.Heineman J.A.1991. Genetics of gene transfer between species. Trends Genet; 181- 185.

34.Brisson-Nöel A., Arthur M. y Courvalin P. 1998. Evidence for natural gene

transfer from Gram-positive cocci to E. Coli. J Bacteriol; 170: 1739-1745.

35. Valencia P, Barragan P 2010 Evidencia de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos provenientes de bacterias ambientales Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador

**SECCIÓN C: CRONOGRAMA DE INVESTIGACIÓN**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Actividad** | | **Meses** | | | | | | | | | | | |
| **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** | **12** |
| **1** | Obtención de las cepas bacterianas a ensayar y  análisis de la presencia de los genes BLEES (TEM SHV y CTX-M) en cepas de enterobacterias patógenas donadoras como E.coli, Salmonella, Shigella, Kleibsiella pnueminiae y  ausencia de estos genes en cepas receptoras de Lactobacilos sp, Enterococos Staphylococos epidermidis | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** |  |  |  |  |  |  |  |
| **2** | Ensayo de transferencia horizontal de genes  Estandarización de los inóculos |  |  | **X** | **X** | **X** |  |  |  |  |  |  |  |
| **3** | Estandarización de la concentración de Antibiótico a usar durante la Transferencia horizontal de genes |  |  |  |  | **X** | **X** |  |  |  |  |  |  |
| **4** | **Informe parcial del proyecto** |  |  |  |  |  | **X** | **X** |  |  |  |  |  |
| **5** | Realización in vitro de la transferencia horizontal de genes de las poblaciones de Enterobacterias donadoras y bacterias de la flora normal receptoras |  |  |  |  |  | **X** | **X** | **X** |  |  |  |  |
| **6** | Comprobación de la adquisición de genes BLEES por Transferencia horizontal en las bacterias de la flora normal  Aislamiento y selección de transconjugados |  |  |  |  |  |  |  | **X** | **X** |  |  |  |
| **7** | Comprobación de la adquisición de genes de Betalactamasas por PCR |  |  |  |  |  |  |  |  | **X** | **X** | **X** |  |
| **8** | **Informe final del proyecto** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | **X** | **X** |

**SECCIÓN D: PRESUPUESTO DEL PROYECTO**

|  |  |
| --- | --- |
| **Partida presupuestaria** | **Monto (S/.)** |
| 1. Equipos y bienes duraderos | 0 |
| 1. Recursos humanos (estadista) | 0 |
| 1. Materiales e insumos | 19992 |
| 1. Pasajes y viáticos | 0 |
| **TOTAL** | 19992 |

**CUADRO Nº 1: Equipos y bienes duraderos (adjuntar proformas)**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Equipos y bienes duraderos** | **Especificaciones técnicas** | **Proforma (fecha)** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

**CUADRO Nº 2: Recursos Humanos - Valorización del equipo Técnico**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nombre** | **Escuela o Unidad a la que pertenece** | **% de dedicación** | **Honorario mensual** | **Nº de meses** | **Costo total S/.** |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
| **TOTAL** |  |  |  |  |  |

**CUADRO Nº 3: Material e insumos (adjuntar proformas)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Descripción** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| *Klebsiella Pneumoniae Subsp.Pneumoniae Atcc 13882* | 250 | 1 | 250 |
| *Shigella Sonei* Atcc 25931 | 250 | 1 | 250 |
| *Enterococcus Faecalis Atcc 49149* | 250 | 1 | 250 |
| *Lactobacillus Acidophylus Atcc 4356* | 250 | 1 | 250 |
| *Salmonella Entérica Serovar Typhimurium Atcc 13311* | 250 | 1 | 250 |
| TEM-1 (5´-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA 3) | 80 | 1 | 80 |
| TEM-2 (5´- GACAGTTACCAATGCTTAATC 3). | 80 | 1 | 80 |
| S H V - 1 (5 ´ TGGTTATGCGTTATATTCGCC 3) | 80 | 1 | 80 |
| S H V - 2 (5 ´ - GGTTAGCGTTGCCAGTGC 3) | 80 | 1 | 80 |
| CTX-M - 1 (5 ´-TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA 3 ') | 80 | 1 | 80 |
| CTX-M - 2 (5 ´ - CGATATCGTTGGTGGTGCCAT | 80 | 1 | 80 |
| TAE, 50x 1000ml | 500 | 1 | 500 |
| DNTPS, 10mM 1 ML.  Thermo Fisher Scientific | 600 | 1 | 600 |
| Agarose, Ultrapure 100 g  Cleaver Scientific | 200 | 1 | 200 |
| Caja de Tubos (Viales) de 0.2 ml para Pcr | 200 | 5 | 1000 |
| Tubo, Criovial Con Tapa Rosca / Esteril / Color Rojo, x 2ml x 500 Unid | 130 | 2 | 260 |
| Brilliant SYBR Green QPCR 400 Rx | 900 | 1 | 900 |
| Agua MilliQ/L | 50 | 3 | 150 |
| Kit Reactivo, Kit Extraccion Dna Genejet, Genomic Dna Purification Kit 50 Prep. G01471-A, Thermo Fisher Scientific: K0721 | 700 | 2 | 1400 |
| Reactivo, Maxima Hot Start Pcr Master Mix (2x) 100x50¿L Rxns, Thermo  Fisher Scientific: K1051 | 470 | 2 | 940 |
| GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder 50 µg | 240 | 2 | 480 |
| Puntas, 100ul Universal Fit Filter Tips, Racked, & Pre-Sterilized; 96 Tips x Rack, Axygen Scientific: Tf-100-R-S-1u | 40 | 5 | 200 |
| Puntas, 0.5-10ul Filter Tips P-2, Ultramicro, Racked & Presterilized; 96 Tips Por Rack Axygen Scientific :, Tf-300-R-S-1u | 35 | 5 | 175 |
| Cefotaxima En Polvo 5 Gramos (Oxoid) | 100 | 1 | 100 |
| Ceftazidima En Polvo 5 Gramos (Oxoid) | 100 | 1 | 100 |
| Discos De Antibiótico Ceftazidima (30ug) (Oxoid) | 16 | 5 | 80 |
| Discos De Antibiótico Cefotaxima (30ug) (Oxoid) | 16 | 5 | 80 |
| Caldo Infusión Cerebro Corazon (BHI) | 500 | 1 | 500 |
| Caldo Tripticasa Soya (Tsb) X 500 G | 500 | 1 | 500 |
| Agar Tripticasa Soya (Tsa) X 500 G | 400 | 1 | 400 |
| Caldo Mueller Hinton X 500 G | 400 | 1 | 400 |
| Agar Mueller Hinton X 500 G | 260 | 2 | 520 |
| Agar Rogosa X 500 G | 500 | 1 | 500 |
| Caldo Rogosa X 500 G | 500 | 1 | 500 |
| Agar Para Enterococos X 500 G (Merck) | 1632 | 1 | 1632 |
| Placa Petri Descartables 100 X 15 Mm | 2 | 300 | 600 |
| Placa Petri Pyrex Para Antibiograma De 15 Cm | 10 | 20 | 200 |
| Tubo Para Pcr, Cap. 0.2ml, Pared Delgada, Tapa Plana 1000/Bolsa. | 400 | 2 | 800 |
| Tubos Tapa Rosca 10 X 120 (caja x 100 Unds) | 200 | 3 | 600 |
| Pipetas Descartables Esteriles De 10 ml | 100 | 2 | 200 |
| Puntas amarillas GRAD. 05 - 200 UL bolsa x 1000 UND PREMIER | 60 | 9 | 540 |
| Puntas azules GRAD. 50 - 1000 UL bolsa X 500 UND BRAND | 45 | 7 | 315 |
| Puntas blancas 10 UL bolsa x 1000 UND BIOLOGIX | 55 | 8 | 440 |
| Micropipetas De 1 A 10 Ul | 1000 | 1 | 1000 |
| Micropipetas De 10 A 100 Ul | 700 | 1 | 700 |
| Racks, Of 96 Tips (960 Tips) Marca:Tipone Procedencia:United States | 40 | 10 | 400 |
| Tubos eppendorf caja de 500 | 80 | 2 | 160 |
| Guantes Descartables X 50 Pares | 20 | 8 | 160 |
| Papel Aluminio De Cocina | 10 | 3 | 30 |
| TOTAL |  |  | S/.19992 |

**CUADRO Nº 4: Pasajes y viáticos**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Descripción** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

**CUADRO Nº 5: Servicios tecnológicos**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Descripción** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| **Análisis especializado** |  |  |  |
| **Software** |  |  |  |
|  |  |  |  |