

# FORMATO 1

## FORMATO DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

### SECCION A: DATOS GENERALES

1. Título o nombre del proyecto

**DETECCIÓN DE LOS GENES *bla*TEM, *qnrA* y *qnrB* QUE CONFIEREN RESISTENCIA EN LA FRACCIÓN BACTERIANA Y FAGICA DE *Pseudomonas aeruginosa* Mutirresistente (PAMR).**

2. Línea de investigación de la Facultad/Área

Microbiología Molecular y Biotecnología

3. Unidad académica (Facultad/Escuela profesional/otra)

Departamento de Ciencias – Facultad de Ciencias de la Salud

4. Equipo investigador

**Investigador principal**

Dr. José Guillermo González Cabeza

**Co – investigador**

Tec. Lab. Alexander Terán Rojas.

**Estudiante:**

Génesis Díaz Leon

5. Institución y/o lugar donde se ejecutará el proyecto

Universidad Privada Antenor Orrego – UPAO

6. Duración (Fecha de Inicio y término)

Agosto del 2019 – Julio del 2020

## SECCIÓN B: PLAN DE INVESTIGACIÓN

### 1. Planteamiento y formulación del problema

Las enfermedades infecto-contagiosas están clasificadas entre las primeras causas de muerte en el mundo, y por lo tanto, consideradas un problema de salud pública. Entre ellas; los procesos infecciosos de etiología bacteriana causan gran preocupación, dado que estos microorganismos adquieren día a día mayor resistencia a los antibióticos; esto ocurre por medio de diversos mecanismos fisiológicos y moleculares, que les permiten a estos microorganismos adaptarse rápidamente a condiciones adversas (Prada 2008).

La diseminación de la resistencia podría llegar a generar problemas de gran envergadura, como incrementos en la mortalidad, la morbilidad y los costos de atención médica. El reporte de riesgos globales emitido por el Foro Económico Mundial resaltó el problema de la resistencia bacteriana en el 2013 (World Economic Forum\_2013) y la Organización Mundial de la Salud lo enfatizó en uno de sus últimos reportes (WHO 2014). Sólo en Estados Unidos se presentan 99,000 muertes al año por infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos adquiridas en hospitales, y el costo de cuidados médicos asociados a ellas, oscila entre 21 - 34 billones de dólares americanos anualmente.

El problema se extiende alrededor del mundo; en Rusia el 86.3% de los hogares utilizan indiscriminadamente antibióticos; en Tanzania, África Sub-Sahariana, el número de muertes por bacterias resistentes a antibióticos duplica al número de muertes por malaria (World Economic Forum\_2013). En países cercanos al nuestro como Colombia, se ha observado un incremento en el aislamiento de cepas multiresistentes, tanto en Unidades de Cuidado Intensivo (UCI) pediátricas, como en UCI de adultos; el riesgo de infecciones observado es de 2 a 20 veces mayor en recién nacidos que requieren dispositivos intravasculares. Entre los incrementos más dramáticos, se cuenta el caso de *Escherichia coli* productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), con un aumento del 3% entre el 2012 y el 2013 (GREBO 2013).

Se ha postulado que el incremento en la resistencia bacteriana se debe al uso inapropiado de los antibióticos (Karunasagar 2012), situaciones comunes como no completar las dosis prescritas, o prescripciones médicas innecesarias han hecho que hoy en día, existan infecciones bacterianas para las cuales ya no existe un antibiótico eficaz. Este panorama ha llevado a que recientemente, gobiernos y agencias de salud, manifiesten la necesidad de un uso más apropiado de los antimicrobianos, y la importancia de desarrollar nuevos agentes antibacterianos (Prada 2008, Editorial 2013).

El origen de la resistencia a los antibióticos, se extiende más allá del uso inadecuado en humanos, ya que existe también un manejo indiscriminado de estas sustancias por parte de las industrias alimenticias. En los sectores industriales de producción animal para consumo humano, los antibióticos permitidos son escasos y en ocasiones no se encuentra un tratamiento eficiente para el control y prevención de las bacterias patógenas (Philips et al. 2004, Editorial 2013). No obstante; hay estudios que indican que más del 80% de los antibióticos vendidos en los Estados Unidos y por lo menos el 50% de aquellos producidos en China van dirigidos como promotores de crecimiento a animales de consumo humano tales como cerdos, pollos y vacas; la inclusión de dichos promotores reduce la cantidad de alimento que se suministra a los animales e induce un aumento en su peso, consecuencia de ello logran un mayor rendimiento económico para los productores (Levin Institute 2014).

Lo anterior representa una situación bastante delicada y peligrosa, dado que al ser utilizados estos antibióticos en productos destinados al consumo humano, las bacterias que viven en los animales adquieren resistencia a los

antibióticos y esta resistencia puede ser transferida a las bacterias patógenas humanas (Donado-Godoy 2010).

En virtud de lo sostenido, las bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* contienen genes de resistencia a antibióticos (ARG's), muchos de los cuales han sido consecuencia de la dinámica de transferencia genética que se presenta en la naturaleza. Son numerosos los mecanismos naturales de transferencia genética; resultando uno de ellos los transmitidos por bacteriofagos (Brabban *et al.*, 2005; Colomer-Lluch *et al.*, 2011).

Se postula que los bacteriófagos juegan un rol como vectores, los cuales pueden movilizar los ARGs entre bacterias patógenas y/o comensales, por medio del mecanismo de la transducción generalizada, posibilitando transferir cualquier porción del genoma bacteriano a la células receptoras o huéspedes. Ello ha sido demostrado experimentalmente; donde fagos lisogénicos han sido inducidos a seguir el ciclo lítico mediante mitomicina C, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, rayos UV, dando como resultado que los fagos liberados sean capaces de transmitir estos genes entre bacterias (Brabban *et al.*, 2005; Balcazar, 2014; Colomer-Lluch *et al.*, 2014a). Otros estudios sobre el proceso de transducción (Iversen *et al.* 2015), reportan que el 39% de cepas de *E. coli* comensales tomadas de muestras fecales de niños, fueron susceptibles a la infección lisogénica por el fago  $\phi$ 734, transfiriendo el gen *Stx 2* proveniente de la cepa virulenta O103:H5 de *E. coli*.

Asimismo; investigaciones sobre los genes *blaTEM* y *blaCTX-M*, que confieren resistencia a ampicilina, han sido aislados de partículas fágicas y posteriormente fueron transferidos hacia las cepas WG5 y C600 de *E. coli*, las cuales no contenían ningún gen que confiriera resistencia (Colomer-Lluch *et al.*, 2011).

De otro lado; en 1998 se halló el primer gen *qnrA1*, y a la fecha tenemos descritos varios genes que confieren resistencia a las quinolonas, los cuales no sólo están presentes en el DNA bacteriano, sino además en el fágico (Colomer-Lluch *et al.*, 2014a; Colomer-Lluch *et al.*, 2014b). Las quinolonas son antibióticos empleados comúnmente en la clínica veterinaria y humana (Colomer-Lluch *et al.*, 2014b); sin embargo, la resistencia a estos antimicrobianos ha aumentado dramáticamente a nivel mundial debido a su uso indiscriminado (Kilani, 2015).

Colomer-Lluch *et al.* (2014a) detectaron una prevalencia de 71.4% del gen *qnrA* en el DNA fágico presente en agua residual de granjas animales; Quiron *et al.* (2009) reportaron una prevalencia de 63.8% del gen *blaTEM* y 42.5% del gen *qnrA*, esta prevalencia se obtuvo de muestras de heces humanas procedentes de un hospital de Barcelona, los pacientes tenían un rango de edad, desde 6 meses hasta los 102 años.

Calero-Caseres y Muniesa *et al.* (2016), han comparado diferentes tratamientos de desinfección utilizados en plantas tratadoras de agua para uso urbano, y reportan una disminución de CG/mL del gen *blaTEM* en el DNA fágico usando cloro; sin embargo, no se elimina en su totalidad pasando de 3.15 a 2.96 log<sub>10</sub> CG/mL.; el riesgo se hace más tangible cuando los fagos atemperados encuentran a un receptor transmitiendo este ARG. El entendimiento de los mecanismos de resistencia a antimicrobianos puede servir al desarrollo de estrategias efectivas para la reducción de este fenómeno (Balcazar, 2014).

Por lo tanto; este trabajo es el primero en su tipo en nuestro medio, dado que no se tiene antecedentes al respecto de lo que estaría sucediendo con *Pseudomonas aeruginosa*; por tanto, se tiene como objetivo colaborar en la comprensión del rol que juega *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes y sus bacteriofagos en la propagación de ARG's; determinando la prevalencia de los

genes *blaTEM*, *qnrA* y *qnrB* en el DNA bacteriano y fagico recolectado a partir de centros hospitalarios y aguas residuales respectivamente, de la ciudad de Trujillo.

## Problema

¿Existen genes de resistencia *blaTEM*, *qnrA* y *qnrB* EN LAS FRACCIONES BACTERIANAS Y FAGICAS DE *Pseudomonas aeruginosa* Multirresistente (PAMR)?

## 2. Antecedentes

Consecuencia del empleo masivo y descontrolado de los antibióticos, ello está provocando que cada vez existan más microorganismos que se hacen resistentes a ellos, dando como resultado un mayor número de muertes asociadas con infecciones de patógenos resistentes a antibióticos.

Se estima que la resistencia a antibióticos es responsable de más de 2 millones de infecciones, y 23,000 muertes cada año en los Estados Unidos; adicionalmente, ello conlleva a un incremento de 2 billones de dólares en gastos sanitarios (CDC, 2013). Según el Centro Europeo para el Control y la Prevención de enfermedades (ECDC), alrededor de 25,000 personas mueren por infecciones causadas por bacterias que han desarrollado resistencia a antibióticos (Borg, 2011). Si se efectúa un análisis más detallado, se llegaría a la conclusión que más del 70% de las bacterias responsables de estas muertes son resistentes a más de un antibiótico que se emplean convencionalmente (Muto, 2005).

Para la OMS, la resistencia a antibióticos supone una especial preocupación, y considera el problema de la aparición y dispersión de bacterias resistentes a antibióticos, como uno de los tres mayores peligros del siglo XXI para la salud pública. En los últimos tiempos, estamos recurriendo al empleo de antibióticos que habían caído en desuso, justamente para tratar infecciones multirresistentes, sobre todo para Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*. Uno de esos ejemplos, lo constituye la colistina, antibiótico que se empleaba entre las décadas de los años 50 y 70, cayendo en desuso en el año 2000 (Gelband et al., 2015).

Se define como *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (PAMR), como aquellas que presentan resistencia al menos a 3 o más grupos de las siguientes familias de antibióticos: piperacilina / tazobactam, ceftazidima, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y carbapenems). En Europa, las tasas de multirresistencia de *Pseudomonas aeruginosa* varían según el país, y de acuerdo al último informe anual publicado de la EARS (2013), los porcentajes más altos se registrarán en Eslovaquia (36.1%), Grecia (39.15%), y Rumanía (49.4%); mientras que las cifras más bajas se registraron en Islandia (0%), Estonia (0%) y Dinamarca (1.7%); España presentó un porcentaje del 12.2%.

La multirresistencia en *Pseudomonas aeruginosa* es un problema hospitalario que va en aumento y que afecta sobre todo a unidades de cuidados intensivos donde se han descrito brotes. En muchos países europeos, principalmente del área mediterránea, la resistencia a carbapenémicos en *Pseudomonas* es una situación endémica. El mecanismo de resistencia a estos compuestos más comúnmente identificado es debido a metalo-carbapenemasas (MBL) de tipo VIM. Según el

programa longitudinal MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) que se realiza desde el año 1997, la incidencia de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente en unidades de cuidados intensivos fue de hasta el 50% en países como Turquía, mientras que en España, Reino Unido, Alemania, Bulgaria y Malta es del 3%.

Dentro de ese contexto, se han realizado investigaciones sobre los genes *blaTEM* y *blaCTX-M*, implicados en la resistencia a  $\beta$ -lactámicos como la penicilina, ampicilina y otros, los cuales han sido detectados en partículas fágicas y *Escherichia coli*, los que posteriormente fueron transferidos hacia las cepas que carecían de algún gen señalado que confería resistencia (cepas WG5 y C600 de *E. coli*), resultando una clara muestra de la dinámica del flujo génico que puede estar sucediendo (Colomer-Lluch *et al.*, 2011).

Asimismo; referente a la resistencia frente a quinolonas, en 1998 se describió el primer gen (*qnrA1*) que confería resistencia a estos antibióticos, en la actualidad tenemos descritos otros genes también comprometidos en dicha resistencia; los cuales, a su vez no sólo están presentes en el DNA bacteriano, sino además en el fagico (Colomer-Lluch *et al.*, 2014a; Colomer-Lluch *et al.*, 2014b). Los genes *qnr* se han descrito en todo el mundo, en diversas especies de enterobacterias, y generalmente se encuentran asociados a elementos genéticos móviles. Las quinolonas son antibióticos empleados comúnmente en la clínica veterinaria y humana (Colomer-Lluch *et al.*, 2014b); sin embargo, la resistencia a estos antimicrobianos han aumentado dramáticamente a nivel mundial debido a su uso indiscriminado (Kilani, 2015).

Se tiene descrito además, que los genes *qnrA* y *qnrS*, codifican proteínas Qnr que realizan un efecto de protección sobre la DNA girasa y la topoisomerasa IV (dianas de las quinolonas), disminuyendo sustancialmente el efecto de las quinolonas sobre la bacteria, evitando el bloqueo de la síntesis del DNA (Jacoby *et al.*, 2008).

Colomer-Lluch *et al.* (2014a) detectaron una prevalencia de 71.4% del gen *qnrA* en el DNA fagico presente en agua residual de granjas animales; Quiron *et al.* (2009) reportaron una prevalencia de 63.8% del gen *blaTEM* y 42.5% del gen *qnrA*, esta prevalencia se obtuvo de muestras de heces humanas procedentes de un hospital de Barcelona, los pacientes tenían un rango de edad, desde 6 meses hasta los 102 años.

Calero-Caseres y Muniesa *et al.* (2016), han comparado diferentes tratamientos de desinfección utilizados en plantas tratadoras de agua para uso urbano, y reportan una disminución de CG/mL del gen *blaTEM* en el DNA fagico usando cloro; sin embargo, no se elimina en su totalidad pasando de 3.15 a 2.96 log<sub>10</sub> CG/mL.; el riesgo se hace más tangible cuando los fagos atemperados encuentran a un receptor transmitiendo este ARG. El entendimiento de los mecanismos de resistencia a antimicrobianos puede servir al desarrollo de estrategias efectivas para la reducción de este fenómeno (Balcazar, 2014).

### **3. Justificación (importancia, resultados esperados, impacto: social, económico, ambiental u otro).**

A lo largo de la historia de la humanidad, el hombre ha enfrentado numerosos problemas para combatir patologías ocasionadas por agentes infecciosos; resultando los antibióticos, la herramienta fundamental para dicho logro; no obstante, desde su aparición de los antimicrobianos, hemos sido testigos del surgimiento de cepas resistentes y multirresistentes a estos antibióticos.

Una clara muestra de todo ello, es que casi inmediatamente al descubrimiento de la penicilina utilizada para combatir a *Staphylococcus aureus*, este ya presentaba resistencia; otro ejemplo, fue la introducción de la Ceftarolina en el 2010 para el control de *Staphylococcus aureus*, y en el 2012 se detectaba ya resistencia.

El surgimiento de las resistencias se debe principalmente a la aparición de eventos mutacionales en el DNA bacteriano, procesos de recombinación y procesos de transferencia horizontal de genes; los cuales ante la presión de selección del antibiótico, prevalecen en el tiempo desplazando a las poblaciones silvestres o sensibles, condicionando su posterior distribución geográfica a nivel mundial promovido por la migración y la industrialización (Colomer-Lluch *et al.*, 2014a; Colomer-Lluch *et al.*, 2011).

Dentro de ese contexto; debemos considerar a los bacteriófagos como vectores genéticos naturales de genes de resistencia, por medio del fenómeno llamado transducción (Blahova *et al.*, 1993). Investigaciones proponen que esta transferencia no solo se realiza entre células bacterianas patógenas, sino que también entre las bacterias comensales, las cuales son blanco de la infección fágica. La situación se agudiza aún más, si consideramos que no solo se estarían transmitiendo genes de resistencia, sino además factores de virulencia entre ellas (Iversen *et al.*, 2015), agravando la situación para la salud humana e incluso animal (Colomer-Lluch *et al.*, 2011). Dentro de la comunidad científica, los bacteriófagos también han sido denominados “superpropagadores”.

Son numerosos los estudios que han demostrado la presencia de los genes *qnrS*, *qnrA*, *blaTEM*, *pse-1*, *STR*, *tet*, tanto en el DNA bacteriano como en el DNA fágico, confiriendo resistencia frente a quinolonas,  $\beta$ -lactámicos, aminoglucosidos y tetracilina. Así por ejemplo, algunos fagos temperados pueden estar transmitiendo genes a bacterias comensales y patógenas como *Escherichia coli* enterohemorrágica responsable del síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica y diarrea (Colomer-Lluch *et al.*, 2014a; Colomer-Lluch *et al.*, 2014b; Colomer-Lluch *et al.*, 2011; Iversen *et al.*, 2015).

Consecuencia de todo ello; la resistencia bacteriana se constituye en un problema de salud pública, por lo que es necesario conocer y estudiar la distribución de genes de resistencia *blaTEM*, *qnrA* y *qnrB* de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes (PAMR) y de sus bacteriofagos en el medio ambiente, ya que evidencias anteriores muestran el rol que juegan en la naturaleza, portando y transfiriendo estos genes de resistencia entre bacterias patógenas y/o comensales.

Nuestro grupo de trabajo está convencido que este tipo de investigación, contribuirá significativamente en propuestas predictivas sobre resistencia bacteriana en microorganismos de interés clínico; y de otro lado, sería el primero de su tipo en nuestro medio, afianzando nuestro quehacer investigativo en la zona norte del Perú.

#### 4. Objetivos

Objetivo General	Resultados Finales	Medios de Verificación
<p>Determinar la prevalencia de los genes <i>blaTEM</i>, <i>qnrA</i> y <i>qnrB</i> que confieren resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos y quinolonas, en la fracción bacteriana y fágica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Multirresistentes (PAMR) aislados de centros de salud y de aguas residuales de la Ciudad de Trujillo.</p>	<p>R1</p> <p>Establecer la prevalencia de los genes <i>blaTEM</i>, <i>qnrA</i> y <i>qnrB</i> en las fracciones bacterianas y fágicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Multirresistente</p>	<p>MV1</p> <p>Informe Final de la prevalencia de los genes <i>blaTEM</i>, <i>qnrA</i> y <i>qnrB</i> en las fracciones bacterianas y fágicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Multirresistente.</p>
	<p>R2</p> <p>Implementar 2 métodos moleculares para la investigación de genes de resistencia <i>blaTEM</i>, <i>qnrA</i> y <i>qnrB</i>.</p>	<p>MV2</p> <p>Protocolos de Laboratorio para la investigación de los genes de resistencia <i>blaTEM</i>, <i>qnrA</i> y <i>qnrB</i></p>
	<p>R3</p> <p>Poseer 1 colección de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Multirresistentes (PAMR). Poseer 1 colección de bacteriófagos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Multirresistente (PAMR)</p>	<p>MV3</p> <p>Cepario de PAMR. Colección de bacteriófagos de PAMR</p>
<p>Objetivos Específicos (Componentes)</p>	<p>Resultados Intermedios:</p>	<p>Medios de Verificación</p>

<p>1. Establecer una colección de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Multirresistentes (PAMR), procedentes de aislados clínicos de la Ciudad de Trujillo.</p>	<p>P1 Obtención de un Cepario de 30 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Multirresistentes (PAMR).</p>	<p>MV1 Informe técnico de los aislamientos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Multirresistentes (PAMR). Es el instrumento por el cual se acredita el cumplimiento del objetivo específico.</p>
<p>2. Establecer una colección de bacteriófagos líticos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Multirresistentes, procedentes de colectores cercanos a centros hospitalarios (Hospital Belén, Hospital Regional Docente, Hospital Víctor Lazarte Echegaray) de la Ciudad de Trujillo - Perú.</p>	<p>P2 Obtención de una colección de al menos 3 bacteriófagos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Multirresistentes.</p>	<p>MV2 Informe técnico de la colección de bacteriófagos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistentes.</p>
<p>3. Determinar la resistencia fenotípica de los aislamientos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Multirresistentes.</p>	<p>P3 Optimizar dos (2) sistemas de extracción de DNA, de la fracción bacteriana y la fracción fágica.</p>	<p>MV3 Protocolos de extracción de ácidos nucleicos.</p>
<p>4. Determinar la prevalencia de los genes <i>bla</i>TEM, <i>qnrA</i> y <i>qnrB</i> mediante PCR en el DNA bacteriano de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Multirresistente.</p>	<p>P4 Optimizar metodologías de PCR, para la detección de los genes de resistencia <i>bla</i>TEM, <i>qnrA</i> y <i>qnrB</i>.</p>	<p>MV4 Protocolos de amplificación de DNA de genes de resistencia</p>
<p>5. Determinar la prevalencia de los genes <i>bla</i>TEM, <i>qnrA</i> y <i>qnrB</i> en el DNA fágico de</p>	<p>P5 01 Análisis estadístico de los resultados</p>	<p>MV5 Informe estadístico.</p>

## 5. Marco teórico

Para la OMS, la multiresistencia ha adquirido tal importancia, que la considera como la 5° amenaza para la salud humana (Rice L., 2009); su importancia radica en que provoca un evidente incremento de la morbi-mortalidad de los pacientes, tanto en el ámbito hospitalario como comunitario, generando un impacto económico a nivel sanitario y de salud pública (Rice L., 2009). Por tanto; al presentarse un alto grado de resistencia, se ve restringida las posibilidades terapéuticas, condicionando que sean limitados el empleo de antimicrobianos para su control (36).

*Pseudomonas aeruginosa* multiresistente (PAMR) está dentro del grupo de microorganismos denominados “Problema o Conflictivos” (junto con *Enterococcus*, resistentes a vancomicina (ERV), *Staphylococcus aureus* resistente a la *meticilina* (SARM), *Enterobacterias multiresistentes* (BLEE) y *Acinetobacter baumannii*), que tienen en común la gravedad de infecciones causadas y presentan dificultades terapéuticas.

No existe un consenso respecto a la definición de “*multiresistente*” (Giske et. al. 2008), pero quizás la que tiene mayor aceptación, es la que presenta una resistencia demostrada ante antibióticos de tres o más familias de antipseudomónicos, entre los que se incluyen penicilinas antipseudomónicas (piperacilina), cefalosporinas (ceftazidima, cefepime), carbapenems (imipenem, meropenem, doripenem), fluoroquinolonas (ciprofloxacino), aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina), monobactam (aztreonam) y polimixinas (colistina) (Giske et. al. 2008).

En el año 2010, según The European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-NET), ha reportado que 28 países han notificado 8,203 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, 1.322 (16,1%) fueron resistentes a piperacilina ± tazobactam; las proporciones de cepas consideradas resistentes varió del 1,1% Suecia a 62,5% en Rumania. Un 13,6% fueron resistentes a ceftazidima, con proporciones de cepas resistentes del 0,0% Luxemburgo a 60,0% también en Rumania. Un 22,3% fueron resistentes a las fluoroquinolonas; a aminoglucósidos un 17,8%, y un 17,9% para carbapenems.

Los últimos estudios de vigilancia obtenidos de la Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene (EPINE), referente a la prevalencia de procesos infecciosos, ellos son debidos principalmente a bacterias Gram negativas (48.9%), resultando los del ámbito nosocomial 54.5% y el comunitario el 45.2%. Lo interesante de todo ello resulta que *Pseudomonas aeruginosa* fue la 2° causa de infección global (8.1%); asimismo, ese mismo informa que *Pseudomonas aeruginosa* fue la primera causa de infección respiratoria nosocomial (18,6%) y la segunda de infección urinaria nosocomial (9.8%), respiratoria comunitaria (12%) y de herida quirúrgica (10,7%) (EPINE, 2010).

Estudios realizados desde el año 2003, ya se reportaban en 136 hospitales españoles que la tasa de infección a causa de *Pseudomonas aeruginosa* era de 168 infecciones por cada 100,000 habitantes en la población en general, siendo en su gran mayoría pacientes con ingresos hospitalarios, en quienes alcanza una frecuencia de hasta del 25 por cada 1000 ingresos/año, en donde de 236 cepas resistentes a imipenem o meropenem y en un 46% cumplían criterios de PAMR (Bouza et. al. 2003).

Gutiérrez y cols del 2007 (Gutiérrez, et al. 2007) identificaron a partir de aislados clínicos una prevalencia de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a imipenem o meropenem del 18.9% y de 0.4% de cepas productoras de MBL. Mas adelante la REIPI informo sobre 190 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, donde la prevalencia fue del 1% entre el total de las cepas y de un 4% en las no sensibles a carbapenems (Gutiérrez, et al. 2007). Para finalizar; en el estudio realizado entre 2008-2009 en 16 hospitales Españoles (Riera, et. al. 2011), la prevalencia de MBL fue del 2,7% del total

de aislamientos (6,9% de las Resistentes a carbapenemicos), lo que pone en manifiesto un claro y progresivo aumento de este mecanismo de resistencia con el transcurso de los años.

En virtud de la función de cada gen, el mecanismo de resistencia sobre el antibiótico será distinto. Estos genes de resistencia se encuentran de forma natural en los cromosomas bacterianos en ambientes sin presión de selección, solamente se considera como contaminantes genuinos a aquellos elementos transferibles que bajo la presión de selección de los antibióticos son capaces de transferirse a otros microorganismos (Martínez, 2009).

Los elementos de resistencia adquiridos por transferencia horizontal son capaces de autorreplicarse, de esta forma son capaces de mantenerse en las poblaciones microbianas a no ser que supusieran un gran sobre coste para la bacteria mantener estos elementos. Algunos estudios apuntan a que, reduciendo la presencia de antibióticos en el ambiente, se consigue reducir la contaminación de genes de resistencia; esto da a entender que la resistencia a antibióticos se eliminaría una vez que desaparece la presión de selección con antibióticos. Sin embargo, los genes presentes en patógenos humanos, ya ha sido observado en bacterias cuyos ambientes no han entrado en contacto con antibióticos de origen antropológico, esto indica que los genes de resistencia a antibiótico se mantienen incluso en ausencia de presión de selección (Martínez, 2009).

Existen distintas formas de mantener los genes de resistencia en las poblaciones microbianas, una de ellas es mediante plásmidos que contienen sistemas toxina-antitoxina lo que hace que no se pueda perder el plásmido (Hayes, 2003). Otro sistema son los integrones, en los cuales el gen de resistencia a antibióticos se encuentra con otros elementos beneficiosos para la bacteria, así también se transfieren las multiresistencias (Martínez, 2009). La resistencia a antibióticos conjuntamente a metales pesados, es otra forma de mantener la resistencia, así, aunque no haya presencia de antibióticos en el medio, pero sí de metales pesados es posible mantener esta resistencia (Hernández et al., 1998; Stepanauskas et al., 2006).

La transferencia horizontal de genes es la forma que tienen las bacterias de compartir las resistencias a antibióticos. Esta transferencia de genes ocurre entre microorganismos de la misma especie, entre bacterias patógenas y no patógenas e incluso entre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Pruden et al., 2006). Dentro de la transferencia horizontal de genes encontramos tres formas de adquirir la resistencia:

## **TRANSFERENCIA GENÉTICA HORIZONTAL (HGT)**

Se denomina así, a todos aquellos procesos de intercambio de material genético entre linajes, ya sea cercanos o distantes (Gogarten et al., 2009; Zhaxybayeva & Doolittle, 2011). Estos mecanismos se constituyen en una de las principales fuentes evolutivas en todas las especies. Se han realizado proyecciones, donde se sostiene que entre el 0.05 – 80% de los genes bacterianos y arqueas han sido relacionados con HGT (Lukjancenko et al., 2010; Nakamura et al., 2004; Zhaxybayeva et al., 2006).

En la HGT están participando elementos Genéticos Transponibles (en inglés *Mobile genetic elements* o MGEs) (Frost et al., 2005).

### **Elementos genéticos móviles.**

- **Transposones**

Son elementos genéticos transponibles, con la capacidad de reubicarse en diversos lugares del genoma bacteriano y están presentes tanto en células procariotas y eucariotas (Skipper et al., 2013). Una de sus características es la expresión modular de los genes, a diferencia de otros sistemas de intercambio genético, los transposones no requieren amplias regiones de homología entre su secuencia y el punto de destino (Prescott, Harley, & Klein, 2004).

Los transposones codifican la enzima transposasa, responsable de la transposición dirigiendo la escisión e inserción de DNA. De otro lado los retrotransposones, se movilizan valiéndose de RNA intermedio, y dentro de su secuencia no presentan la coificación para la transposasa. Para finalizar, también encontramos las Secuencias de Inserción (SI), las cuales representan secuencias cortas de DNA, no portan genes y únicamente las proteínas que son codificadas solo forman parte de proceso de transposición (Pray, 2008; Siefert, 2009).

- **Plásmidos**

Los plásmidos, son moléculas de DNA extracromosómica independientes, y desde la óptica genética se comportan como una colección de módulos genéticos funcionales y representan los principales transportadores de genes entre bacterias (Jackson et al., 2011). Los plásmidos presentan sus propios centros de origen de replicación, presentan estabilidad entre generaciones y usualmente los genes presentes no son indispensables. Además de lo señalado, los plásmidos pueden ser portadores de genes que confieren cierta ventaja competitiva al huésped frente a sus competidores; así por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos (ARGs), genes de resistencia a metales pesados, genes de enzimas que favorecen la capacidad nutricional de la célula, determinantes de virulencia, entre otros.

- **Bacteriófagos**

Comúnmente denominados fagos, y se caracterizan por ser virus bacterianos. Son los entes más abundantes en la biosfera, estimándose que alcanzan hasta una densidad global de  $10^{30} - 10^{31}$  partículas fágica.

Biológicamente presentan una estructura bastante sencilla, consta de una cubierta proteica denominada cápside que rodea al núcleo, conteniendo el material genético que puede ser DNA o RNA (Gogarten et al., 2009). Ecológicamente, representan un grupo muy versátil debido a su capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales extremas.

Con el objeto de poner en relevancia el rol que cumplen los fagos como HGT, ellos pueden presentar dos ciclos biológicos durante su proceso de infección; el primero denominado lítico, en el cual se adhieren mediante receptores específicos presente en la superficie bacteriana e inyectan inmediatamente su material genético, posteriormente se apoderan de toda la maquinaria metabólica a favor de su multiplicación masiva al interior de la célula; la segunda vía es la lisogénica, en la cual sucedida la inyección del material genético del virus, este se integra al cromosoma bacteriano donde adoptan la denominación de provirus o profagos, replicándose conjuntamente con el cromosoma bacteriano, mientras que la célula bacteriana adopta la denominación de lisogénica.

Bajo la condición de profagos, el virus puede permanecer por largos periodos; no obstante ello, puede verse interrumpido por condiciones físico-químicas (deseccación, radiación, compuestos químicos etc.) que inducirían a que se expresen proteasas las cuales hidrolizan proteínas represoras del ciclo lisogénico y de esa manera se restablece la vía lítica.

- **Agentes de transferencia genética (GTAs)**

Los agentes de transferencia genética (GTAs: del inglés *gene transfer agents*) son estructuras que guardan algunas similitudes con los bacteriófagos, pero no pueden ser consideradas como tales. Los GTAs son cápsides de fagos cuyos genes están localizados en el cromosoma de la bacteria. Estos genes generan cápsides que portan una sección aleatoria del genoma de la célula huésped. Sin embargo, no suelen transportar los propios genes que codifican GTAs. Los GTAs están constitutivamente presentes en el cromosoma de algunos géneros bacterianos y no se requiere una infección previa por fagos virulentos para formarlos, diferenciándose de los fagos que realizan transducción generalizada. Una vez formados y liberados, los GTAs son capaces de movilizar el ADN de una célula donadora a la receptora ya que la cápside del GTA actúa igual que la cápside de un fago. En investigaciones recientes se ha descrito la importancia de la transferencia de genes por GTAs en bacterias del medio marino. Sin embargo, no hay datos sobre GTAs en otros grupos bacterianos, se desconocen las proporciones de GTAs en el medio ambiente así como los factores que influyen la transducción por GTAs (McDaniel et al., 2012).

- **Integriones**

Son plataformas genéticas presentes en los genomas bacterianos y se constituyen en un excelente modalidad para la adquisición y expresión de genes externos (Gillings, 2014). Para el logro de tal propósito, tienen dentro de su constitución elementos que posibilitan la recombinación específica posibilitando capturar y movilizar genes, de forma particular genes de resistencia.

Un integron está constituido por (1) El gen de la integrasa (*intI*), la cual es una recombinasa específica y (2) Un sitio de recombinación adyacente denominado (*attI*) (Jackson et al., 2011). Ellos pueden adquirir nuevos genes desde otros casetes de genes, los cuales pueden ser intercambiados entre integriones (Collis & Hall, 1995). En resumen, estas estructuras son muy versátiles para la integración específica de nuevo material genético, sin ruptura del genoma del recipiente (Boucher et al., 2007).

- **Elementos de integración conjugativa**

Los elementos de integración conjugativa (ICEs: del inglés *integrative conjugative elements*), son elementos genéticos móviles con capacidad de transferencia autónoma; generalmente localizados en el cromosoma del huésped, y contienen los genes necesarios para su conjugación así como sistemas regulatorios que controlan su escisión desde el cromosoma y su posterior transferencia conjugativa. Bajo determinadas condiciones, se lleva a cabo la expresión de los genes ICE, provocando la escisión de los ICE desde el cromosoma del huésped. Las células tienen la capacidad de transferir los ICEs u otro material genético por medio del sistema de conjugación a otro huésped. Los ICEs tienen una estructura modular, con genes acoplados de acuerdo al proceso en el que participan. Todos los ICEs contienen tres módulos que catalizan su integración/escisión, conjugación y regulación. Muchos ICEs portan otros genes, los cuales son los que otorgan el beneficio a sus huéspedes. Entre los fenotipos conferidos por estos genes se encuentra la resistencia a antibióticos (Johnson & Grossman, 2015).

- **Islas genómicas**

Las islas genómicas (GIs: del inglés *genomic islands*) son segmentos más o menos largos de DNA. Tienen la capacidad de integrar, escindir y transferirse a un nuevo huésped por medio de transformación, conjugación o transducción. Las islas genómicas presentan un módulo de recombinación, constituido por una integrasa de la familia de las tirosina recombinasas, un punto de recombinación (*attL* y *attR*), y en

muchos casos, un factor de recombinación direccional. Las GIs pueden portar genes que codifican funciones metabólicas, de degradación, de resistencia (antibióticos o metales pesados) así como de patogenicidad (Dobrindt et al., 2004a).

### **Mecanismos de HGT.**

Los mecanismos de HGT, se realizan por medio de los siguientes procesos: Transformación (por incorporación de DNA extracelular), Conjugación (mediada por plásmidos conjugativos) y Transducción (mediada por bacteriófagos).

- **Transformación**

Este proceso implica la incorporación de DNA en células competentes, donde los eventos a suscitarse son los siguientes: (i) Liberación o apareamiento del ADN en el medio ambiente. (ii) Inducción del estado competente en la célula huésped. (iii) Interacción de las células competentes y el DNA. (iv) Entrada del DNA y procesamiento dentro de la célula. (v) Integración funcional y expresión del DNA foráneo dentro de la célula.

El estado de competencia de la célula puede producirse de forma natural o ser inducido artificialmente en el laboratorio.

- **Conjugación**

La conjugación bacteriana implica la transferencia de DNA por medio del contacto directo entre dos células. Este proceso se lleva a cabo no sólo entre especies bacterianas relacionadas, sino entre diferentes géneros e incluso entre organismos Gram positivos y negativos. Por ende, es uno de los mecanismos más eficientes para el intercambio genético entre bacterias. El mecanismo de conjugación es el más habitual y es uno de los que contribuye en mayor grado a los procesos de HGT en procariontes.

El proceso de conjugación se sustenta en el intercambio genético entre dos células unidas por medio de un aparato llamado pili (elaborado por la célula donadora). Los elementos genéticos móviles transportados por este mecanismo son plásmidos conjugativos o ICEs insertados en el cromosoma. De forma accesoria, otros plásmidos pueden movilizarse por medio del pili conjugativo sintetizado por un plásmido conjugativo. La transferencia de DNA está mediada por una maquinaria macromolecular asociada a la membrana llamada sistema de secreción tipo IV (T4SS) (Cabezón et al., 2015).

- **Transducción**

La transducción es un proceso de transferencia de material genético mediado por bacteriófagos (fagos). Este proceso contribuye a la evolución de los genomas bacterianos.

Los fagos tienen la potencialidad de empaquetar material genético del huésped al interior de sus cápsides, y posteriormente integrar este nuevo DNA en una nueva célula a la que infectan. Al interior de este segundo huésped el DNA puede recombinarse dentro del cromosoma y este DNA ser transferido posteriormente vía transferencia genética vertical (Frost et al., 2005; Gogarten et al., 2009). Esta capacidad se encuentra limitada por el tamaño de su cápside; así, la capacidad de los fagos de DNA de doble cadena es de 50 a 100 kb (Frost et al., 2005).

Este proceso es trascendental para la evolución y virulencia de muchos patógenos, así como en la regulación de las poblaciones microbianas. Se han efectuado

proyecciones, que en los ecosistemas marinos el proceso de transducción entre bacterias, se lleva a cabo en una tasa de  $2 \times 10^{19}$  eventos por segundo; por lo tanto, los fagos en elementos importantes de transferencia en el medio ambiente. Existen dos tipos de transducción:

### **Transducción generalizada**

En este caso los bacteriófagos transductantes pueden movilizar cualquier región del cromosoma del huésped. Esta transducción generalizada se produce por un "error" durante la fase de encapsidación de DNA del fago dentro de la cápside fágica. Consecuencia de ello, ocurre un empaquetamiento de un fragmento aparentemente aleatorio de DNA cromosómico del huésped en lugar del empaquetamiento del DNA del fago. Aparentemente este evento no merma la capacidad de infección del fago resultante, independientemente del DNA que transporta. Así, cuando la partícula transductante reconoce el receptor específico de la bacteria receptora, se fija en la pared bacteriana, el DNA donante es inyectado dentro de la bacteria y es posteriormente integrado dentro del genoma bacteriano por mecanismos de recombinación.

La transferencia de DNA cromosómico por medio de transducción generalizada es un mecanismo que ocurre con baja frecuencia, se estima que representa tan sólo un evento por cada  $10^7 - 10^9$  infecciones por bacteriófagos, sin embargo, los números generales de fagos y bacterias existentes hacen de este proceso un suceso significativo (Penades et al., 2015).

Entre las limitaciones para el estudio de los bacteriófagos que realizan transducción generalizada se encuentra la imposibilidad para aislar partículas infecciosas capaces de replicar, lo que impide su aislamiento y caracterización. Se han descrito bacteriófagos capaces de realizar transducción generalizada con mayor frecuencia que otros, por ejemplo T4, Mu, ES18, P1, P22, SN-T, UT1 y D3112 (Muniesa, Imamovic, & Jofre, 2011). Los espectros de huéspedes de estos bacteriófagos incluyen diferentes subclases de *α-proteobacteria*, *β-proteobacteria* y *γ-proteobacteria* (Muniesa et al., 2011), demostrando así la versatilidad de este sistema como mecanismo de HGT.

### **Transducción especializada**

En esta modalidad, los bacteriófagos portan su propio DNA e incorporan fragmentos específicos del cromosoma bacteriano. Ello sucede en fagos atemperados y la incorporación del fragmento bacteriano tiene lugar durante la escisión del DNA fágico en el momento de inducción del profago. Al escindirse el DNA fágico, no se da dentro de los límites establecidos, sino que arrastra un fragmento adyacente de DNA del huésped. Todo el genoma fágico, incluyendo este fragmento se encapsida dentro de una partícula fágica. El fragmento se moviliza cuando la partícula resultante infecta una nueva célula huésped. De acuerdo a este sistema, ciertos profagos con bajo contenido de CG en bacterias Gram positivas, contienen genes extra junto al gen *attR* (que es el punto de unión del extremo derecho del fago en el cromosoma bacteriano *attachment right site*). En el caso de bacterias patógenas, estos genes adicionales codifican con frecuencia factores de virulencia, como por ejemplo toxinas bacterianas. La transducción especializada es probablemente un contribuyente minoritario para la transferencia genética en el medio ambiente en comparación con la transducción generalizada, sin embargo representa una excepcional herramienta para la ingeniería genética.

### **Genes de Resistencia a β-lactámicos**

## Genes de resistencia a antibióticos $\beta$ -lactámicos.

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son agentes bactericidas cuya función es inhibir la síntesis de la pared celular. En la actualidad son los antibióticos comerciales más usados; debido a su eficiencia, bajo coste y efectos secundarios mínimos. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos incluyen a: penicilinas y sus derivados semi-sintéticos, cefalosporinas y sus derivados semisintéticos, cefamicinas, monobactámicos (aztreonam), ácido clavulánico y tienamicina (carbapenem) (Villa & Veiga-Crespo, 2014).

Se han descrito cuatro mecanismos de resistencia a los compuestos  $\beta$ -lactámicos: (1) Bombas de flujo. (2) Modificación de las proteínas de anclaje de las penicilinas (PBPs). (3) Disminución de la expresión de las proteínas de membrana exteriores, (4) Producción de  $\beta$ -lactamasas. (Drawz & Bonomo, 2010). La producción de  $\beta$ -lactamasas es el mecanismo más habitual de resistencia, en especial en bacilos Gram negativos.

### $\beta$ -lactamasas

El mecanismo de acción de las  $\beta$ -lactamasas está basado en hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico, con la finalidad de inactivar el antibiótico. Hasta el año 2016, han sido identificadas alrededor de 1.300  $\beta$ -lactamasas (NCBI, 2016); las cuales están catalogadas, de acuerdo al esquema molecular de Ambler dentro de cuatro clases principales (A, B, C y D), en relación a su similitud entre secuencias y su mecanismo de acción. (Majiduddin et al., 2002). La figura 8 presenta un resumen de las características principales de cada clase.

Entre estas diferentes clases de enzimas, las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (ESBLs) son las más perjudiciales. Esta subclase puede degradar la mayoría de penicilinas, monobactámicos y cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación.

Las  $\beta$ -lactamasas de la familia TEM, representan el mecanismo de resistencia a  $\beta$ -lactamasas más prevalente en enterobacterias. Hasta octubre del 2015, se han descrito 223 variantes de TEM. Cada una contiene cambios en su secuencia de aminoácidos en comparación con TEM-1. Muchas sustituciones se localizan en una posición cercana al centro activo, otorgándoles una ventaja en la capacidad catalítica frente a los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro. Sin embargo, esta mejora en su capacidad de degradación es inversamente proporcional a su actividad catalítica frente a las penicilinas, en donde en ciertos casos, es 100 veces menos eficiente. La evolución de este gen es un ejemplo ideal de la respuesta de la presión selectiva por parte de los microorganismos.

## Genes de resistencia a quinolonas.

Las quinolonas representan uno de los grupos más importantes de los compuestos antibióticos. El primer miembro de la familia de las quinolonas, el ácido nalidíxico, fue descubierto como subproducto de la síntesis de la cloroquina (un conocido fármaco anti-malaria), el cual mostró poseer actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-negativas. La continua manipulación de la molécula por medio de síntesis química permitió obtener compuestos con una potencia significativamente mayor. La modificación más importante fue la adición de la molécula de flúor en la posición 6, las cuales son conocidas como 6-fluoroquinolonas (Dougherty & Pucci, 2012).

El mecanismo de acción de las quinolonas se basa en la interferencia de la síntesis celular a nivel de las enzimas ADN girasa (codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*) y topoisomerasa IV (codificadas por los genes *ParC* y *ParE*), las cuales son

fundamentales para la replicación, transcripción, recombinación y reparación del DNA.

Los mecanismos de resistencia a quinolonas adquirida, se encuentran clasificados en dos grupos:

- Mutaciones en las enzimas ADN girasa y/o topoisomerasa IV. El mecanismo de resistencia se lleva a cabo por medio de sustituciones de aminoácidos, en la subunidad de *gyrA* y/o *parC* conocida como "región determinante de resistencias a quinolonas (QRDR)"(G. Jacoby, 2005). Los trabajos de Morgan-Linnell et al, 2009 determinaron que, la presencia simultánea de dos mutaciones en el gen *gyrA* y una o dos mutaciones en *parC*, conlleva un aumento significativo de la concentración mínima inhibitoria (MICs: del inglés *minimum inhibitory concentration*) de ciertos aislamientos clínicos resistentes a fluoroquinolonas.

- Mecanismos de resistencia a quinolonas adquiridos. El primer determinante de resistencia fue denominado Qnr (luego QnrA, y después QnrA1), fue descubierto dentro de un plásmido de 56-Kb llamado pMG252, el cual porta genes de resistencia a quinolonas,  $\beta$ -lactámicos, aminoglicósidos, sulfonamidas, trimetoprim y cloranfenicol (Martínez-Martínez et al., 1998; Strahilevitz et al., 2009). En la actualidad, tres familias de genes se asocian con resistencia a quinolonas. (1) *aac(6')-Ib-cr*: Este gen, asociado a un plásmido, codifica una variante de una acetiltransferasa de aminoglicósidos; la cual es responsable de la acetilación y reducción de la actividad de ciertas fluoroquinolonas, desde 1986 han sido reportadas 30 variantes (Robicsek, Strahilevitz, et al., 2006). (2) Bombas de flujo: Cuatro tipos de proteínas: *OqxAB*, *QepA1*, *QepA2* y *QepA3*; han sido encontradas en aislamientos humanos y animales. Su función se basa en la regulación de la concentración de quinolonas al interior de la célula (Ruiz et al., 2012; Wang et al., 2016). (3) Qnr: Codifican proteínas de alrededor de 200 aminoácidos que son parte de la familia de pentapéptidos repetidos (Aldred et al., 2014). Su modo de acción es la interferencia con la acción de las quinolonas en la DNA girasa y la topoisomerasa IV, que confieren cierto grado de resistencia. Hasta abril del 2016, han sido descritas 105 variedades de genes Qnr, los cuales son clasificados dentro de seis familias: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrD*, *qnrS* y *qnrVC*. (G. Jacoby et al., 2008; Lahey Clinic, 2016).

## 6. Hipótesis

Existe una prevalencia menor al 50% de los genes *bla*TEM, *qnrA* y *qnrB* en las fracciones de DNA bacteriano y fagico de *Pseudomonas aeruginosa Multirresistente*.

## 7. Metodología (Diseño experimental en detalle)

### **OBTENCIÓN DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIRRESISTENTE (PAMR).**

Para la obtención de las cepas, serán cedidas gentilmente por el Servicio de Laboratorio de Microbiología del Hospital Belén de Trujillo. Debemos precisar que las muestras cedidas son consecuencia del resultado de los análisis habituales por el personal de dicho centro hospitalario; no obteniéndose directamente del personal hospitalizado y por tanto no requerirá consentimiento informado alguno.

### **CONSERVACIÓN DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa Multirresistente* (PAMR) EN VIALES CRIOGÉNICOS**

Para ello se realizarán cultivos en caldo LB de cada una de las cepas aisladas, las cuales previamente se hallarán en las placas master. Con la ayuda del asa bacteriológica se cogerá una colonia y sembradas en el caldo LB.

Realizado las siembras se incubarán durante 16-24 horas, la cual se considerará el overnight (ON). Al término de ello, se alicuotará en tubos estériles conteniendo glicerol hasta lograr una concentración del 30%. Posteriormente se agitarán en vórtex y se distribuirán en 03 viales criogénicos estériles debidamente rotulados y almacenados a una temperatura de -80°C en un congelador.

### **OBTENCIÓN CULTIVO EN FASE EXPONENCIAL**

Para tal propósito, se dispensará 4 mL. del ON y resuspendido en 16 mL de caldo LB fresco, e incubado a 37°C durante 04 horas y con agitación continua a 150 rpm.

### **EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE RESISTENCIA (MULTIRRESISTENCIA)**

Al momento de recolectar las muestras, estas ya estarán caracterizadas parcialmente mediante los sistemas automatizados con que cuenta el Hospital Belén de Trujillo. Llegadas al laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la UPAO, se procederá a su comprobación fenotípica mediante antibiogramas; en los cuales se evaluará su susceptibilidad frente a los discos de antibióticos: Piperaciclina (100 µg), Piperaciclina - tazobactam (100 - 10 µg), Ceftazidima (30 µg), Cefepima (30 µg), Imipenem (10 µg), Meropenem (10 µg), Amikacina 30 µg (AMK), Gentamicina 10 µg (GEN), Ciprofloxacina 5 µg (CIP), Colistina 10 µg (COL), Tobramicina 10 µg, Ofloxacina 5 µg, Cefepime 30 µg, Aztreonam 30 µg y Norfloxacina 30 µg.

### **SIEMBRA EN DOBLE CAPA**

Esta técnica se trabajará con varios propósitos, y consistirá en preparar en primer lugar, placas Petri con agar nutritivo (20 mL. aproximadamente) atemperadas. Durante el

ensayo, sobre la superficie del agar nutritivo se verterá el top-agar, el cual se encontrará a una temperatura entre 45-50°C.

### **AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS DE *Pseudomonas aeruginosa* Multirresistente A PARTIR DE AGUAS DE ALBAÑAL**

Las muestras de agua de albañal serán obtenidas de los recolectores cercanos a los centros hospitalarios mas importantes de la ciudad de Trujillo y alternativamente de cuerpos de agua próximo a las pozas de oxidación de la Ciudad de Trujillo. En total se pretende recoger aproximadamente 5 Lt. de aguas de cinco lugares diferentes.

Se deberán utilizar botellas de plástico de 1 Lt. de capacidad, y las muestras serán tomadas a un metro de profundidad para evitar los efectos de la luz en las muestras de agua. Las muestras serán transportadas al laboratorio en contenedores que mantengan la temperatura. Además, se tomarán mediciones de pH y temperatura de cada una de las muestras obtenidas.

### **PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE AGUA**

Las muestras de agua de albañal, deberán ser procesadas previo al aislamiento de los bacteriófagos. Este proceso se realizará sedimentando la muestra de agua durante 24 horas mínimo. Después de este tiempo, en 2 tubos Falcon de 50 ml se colocará 2 ml de caldo TB modificado junto con 2 ml de cultivo en fase exponencial y 18 ml de agua en cada uno. En uno de ellos se añadirá agua destilada, el cual representaría el grupo control, y en el otro el agua de albañal sin filtrar.

Se determinará la densidad óptica inicial de ambas muestras a 600 nm mediante espectrofotómetro y se tomará una medición después de una hora, y a partir de allí se realizarán mediciones en intervalos de 30 minutos. Aquellas muestras que presenten una disminución en la curva de crecimiento, se considerará que contienen bacteriófagos, por lo que se priorizará el uso de dicha muestra de agua para el aislamiento de bacteriófagos.

Las muestras se dejarán en ON, y posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm por 20 minutos, el sobrenadante se trasvasará a un nuevo tubo Falcon de 50 mL y se centrifugará nuevamente a 5000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se pasara por un filtro de nylon de 0,45 µm de diámetro solamente en uno de los ensayos.

### **AISLAMIENTO DE FAGOS DE LA MUESTRA DE AGUA POR ENRIQUECIMIENTO**

Para el aislamiento de los bacteriofagos será necesario preparar diluciones seriadas de la muestra de agua procesada. Para ello se colocarán 5 tubos de ensayo estériles en una gradilla, a cada uno de los tubos se le añadieron 9 mL de caldo TB modificado. Al primer tubo se le adicionará 1 mL de la muestra de agua procesada y se agitará en vórtex, se tomará 1 mL del tubo uno y se añadirá al tubo 2 el cual se agitará también en vórtex y se procederá de la misma manera con el resto de tubos.

Por otro lado, se preparará un cultivo ON de cada cepa en caldo LB, se colocarán 2 mL del cultivo ON en un tubo de ensayo estéril junto con 1 mL de la muestra de agua procesada y se incubará a 37°C durante 10 minutos. Después de este tiempo, se añadirá 10 mL de top agar al tubo.

Previamente a ello, se deberán colocar las placas de agar nutritivo en la incubadora a 37°C para evitar colocar el top agar en placas frías. Se dispondrá la mezcla previa de top agar junto con el cultivo sobre las placas temperadas y se incubará ON a 37°C.

Transcurrido este tiempo, se evaluarán las placas y se buscará la presencia de calvas (placas de lisis). Cada calva será extraída (tanto el top agar como el agar nutritivo) mediante la punta de una micropipeta estéril, previamente cortada al tamaño aproximado de una calva. Ambas capas de medio extraídas serán colocadas en un tubo Eppendorf que contendrá 1 mL de buffer SM junto con 10  $\mu$ L de cloroformo. El medio se mezclará completamente en el buffer con la ayuda de una micropipeta y será almacenado a una temperatura de 4°C.

Se realizarán ensayos probando diferentes medios de conservación de bacteriófagos, entre ellos TB, SM y LEM con concentraciones de cloroformo de 0  $\mu$ L, 10  $\mu$ L y 20  $\mu$ L.

### **LISADOS EN MEDIO LÍQUIDO**

Para pretender obtener un mayor título de bacteriófagos, se tomará 2 mL de un cultivo en fase exponencial y se agregará 200  $\mu$ L del aislado fágico. Se incubará a 37°C durante 16 horas, y se centrifugará el cultivo a 10,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperará el sobrenadante, añadiéndose 10  $\mu$ L de cloroformo y conservándose las muestras a 4°C.

### **PRUEBA DE LA GOTTA**

Para la realización de esta prueba se preparará un cultivo en fase exponencial, y se colocarán 2 mL de este cultivo en un tubo de ensayo estéril al cual se le adicionará 10 mL de top agar, el cual se colocará sobre una placa Petri con agar nutritivo previamente temperada a 37°C. Se dejara enfriar las placas en una cabina de bioseguridad o en una zona estéril alrededor de un mechero durante 10 minutos.

Después de este tiempo, el agar deberá estar completamente solidificado por lo que se procederá a realizar la prueba de la gota. Para ello se colocarán 10  $\mu$ L de cada fago conservado, en los distintos medios en una distribución que permitiera su identificación posterior.

Se dejarán secar las gotas durante 10 minutos en una cabina de bioseguridad o alrededor de un mechero y se incubara las placas boca abajo a 37°C durante 16–20 horas. Después de este tiempo se deberá observar si existen zonas de lisis.

### **VERIFICACIÓN DE FAGOS NO CONTAMINADOS**

Se verificará que los lisados en medio líquido y los fagos conservados en SM no estarán contaminados mediante la colocación de 10  $\mu$ L de cada lisado fágico en una placa Petri con agar nutritivo. Se incubará el ON a 37°C tiempo después del cual se observará la presencia de contaminaciones bacterianas en cada marca de gota colocada.

### **TITULACIÓN DE LISADOS FÁGICOS**

Se realizarán diluciones seriadas del lisado en caldo LB, se añadirá 900  $\mu$ L de SM y 100  $\mu$ L de fago en SM + 10  $\mu$ L de cloroformo y se sembrará las diluciones en cultivo de doble capa añadiendo 1 mL de la dilución, 2 mL de cultivo en fase exponencial, se incubará durante 10 minutos a 37°C, se agregará 10 mL de top agar y se realizará la siembra en doble capa.

### **EXTRACCION DE DNA BACTERIANO (PAMR)**

A partir de un ON de 5 mL de la cepa bacteriana escogida, se obtendrá un pellet mediante centrifugaciones sucesivas (6,000 rpm por 3 min). El pellet recuperado será resuspendido en 200 µL de agua MQ estéril y sometido a 100°C durante 10 min. Posteriormente; nuevamente se someterá a máxima centrifugación (12,000 rpm durante 5 min), recuperado el sobrenadante (DNA) que será almacenado posteriormente a -30°C.

### EXTRACCION DE DNA VIRAL

El objetivo de este protocolo es obtener el DNA viral para ensayos moleculares. El protocolo a utilizar permite obtener DNA fagico a partir de cultivos líquidos, sin utilizar columnas de purificación. La cuantificación y calidad del DNA, será evaluada mediante un nanodrop. El DNA obtenido, es suficiente para realizar ensayos moleculares como PCR o RFLPs, aunque no es recomendable utilizarlo para secuenciación

### DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS EN EL DNA BACTERIANO Y FÁGICO.

Para ello, se empleará la tecnología de la PCR a punto final; y se utilizará un termociclador marca Veriti (Applied System - USA).

Para la detección de los genes seleccionados *blaTEM*, *qnrA* y *qnrB*, será necesario la síntesis de los siguiente oligonucleotidos (Primers), los que se muestran a continuación:

Primers	Secuencia de oligonucleotidos 5'----3'	Gen	Tamaño del fragmento (pares de bases)	Referencia
MultiTSO-T_for	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	<i>blaTEM</i>	800	Dallenne <i>et al.</i> (2010)
MultiTSO-T_rev	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	<i>blaTEM</i>		
QnrAm_F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	<i>qnrA</i>	580	Bergiante <i>et al.</i> (2016)
QnrAm_R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	<i>qnrA</i>		
QnrBm_F	GGMATHGAAATTCGCCACTGa	<i>qnrB</i>	264	Bergiante <i>et al.</i> (2016)
QnrBm_R	TTTGCGYGYCGCCAGTCGAAa	<i>qnrB</i>		

#### Condiciones para la amplificación del gen *blaTEM*.

Para las reacciones de PCR se prepararán a un volumen final de 25 µL, el cual estará constituido por 3 µL de DNA bacteriano o fagico (3µl), 5µl 10x de buffer, 200 µM de cada desoxirribonucleotidos trifosfato, 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 1µl de cada grupo de primers y 1.25U de *Taq* polimerasa (Promega, USA).

Las condiciones para la amplificación del gen *blaTEM* se realizará como lo reporta Dallene *et al.* (2010): una desnaturalización inicial a 94°C por 10 min; 30 ciclos de 94°C por 40s, 60°C por 40s y 72°C por 1min; y una extensión final a 72°C por 7min.

#### Condiciones para la amplificación de los genes *qnrA* y *qnrB*.

Para las reacciones de PCR se prepararán a un volumen final de 25 µL, el cual estará constituido por 3 µL de DNA bacteriano o fagico (3µl), 5µl 10x de buffer, 200 µM de cada desoxirribonucleotidos trifosfato, 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 1µl de cada grupo de primers y 1.25U de *Taq* polimerasa (Promega, USA).

Para la amplificación de los genes *qnrA* y *qnrB* se utilizaron las condiciones que reporta Bergiante *et al.* (2016): una desnaturalización inicial a 95°C por 10 min; 25 ciclos de 95°C por 45 s, 58°C por 45 s y 72°C por 15 s; y una extensión final a 72°C por 3 min.

Todos los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% a 75V por 1h y posteriormente fueron tenidos con bromuro de etidio (0.05mg/L) y se examinaron en un transluminador de UV (Bergiante *et al.*, 2016).

### **PERFILES DE RESTRICCIÓN (RFLPs)**

El objetivo de estos ensayos es generar patrones de bandas que permitan comparar distintos genomas virales, mediante el uso de enzimas de restricción. Para la construcción de los perfiles, se utilizarán las enzimas de restricción: *BstEII*, *EcoRV*, *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *XbaI*.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.**

Se diseñara una base de datos en Microsoft Excel y, posteriormente, se analizarán en SPSS. Se efectuará un análisis univariado para conocer las frecuencias de las variables.

## 8. Bibliografía

- Balcazar JL. (2014). Bacteriophages as Vehicles for Antibiotic Resistance Genes in the Environment. *PLoS Pathog*, 10(7), 1-4.
- Blahova J, Hupkova M, Babalova M, Krcmery V, Schafer V. (1993). Transduction of resistance to imipenem, aztreonam and ceftazidime in nosocomial strain of *Pseudomonas aeruginosa* by wild-type phage. *Acta Virol*, 37(6), 429-436.
- Borg, M. A. (2011). National cultural dimensions as drivers of inappropriate ambulatory care consumption of antibiotics in Europe and their relevance to awareness campaigns. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(3), 763-767.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, et al (2009) Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 48: 1-12.
- Bouza E, García-Garrote F, Cercenado M, Marín M, Díaz M.S., Sánchez Romero I, Vindel A. (2003) *Pseudomonas aeruginosa*: Estudio multicentrico en 136 hospitales españoles. *Rev. Esp Quimioterap*, 16:41-52.
- Brabban AD, Hite E, Callaway TR. (2005). Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer. *Foodborne Pathog Dis*, 2(4), 287-303.
14. Bravo TA. (2006). Manual de Procedimientos para el muestreo microbiológico oficial en carnes faenadas en mataderos de exportación. Programa de Reduccion de Patogenos PRP/MP2. Gobierno de Chile.
- Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., de la Cruz, F., & Arechaga, I. (2015). Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(1), 81–95.
- Calero-Caseres W y Muniesa M. (2016). Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Res*, 15;95, 11-18.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention) (2013). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013.
- Colomer-Lluch M, Calero-Caceres W, Jebri S, Hmaied F, Muniesa M, Jofre J. (2014 a). Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewater as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environ Int*, 73: 167-175.
- Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. (2011). Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples. *PLoS One*, 6(3), 1-11.
- Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. (2014b). Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *J Antimicrob Chemother*, 69(5), 1265-1274.
- Colomer-lluch, M., Jofre, j., & Muniesa, M. (2011). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PloS one*, 6(3), e17549.
- David NG, Robert JG, Helen W et al (2010) The 10 x 20 Initiative: Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New Antibacterial Drugs by 2020. *Clin Infect Dis*, 50: 1081–3.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., & Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(5), 414–424.
- Donado-Godoy M. (2010). Prevalence, resistance patterns and risk factors for antimicrobial resistance in poultry farms and retail chicken meat in Colombia and molecular characterization of *Salmonella* Paratyphi B and *Salmonella* Heidelberg. Tesis Doctoral. Office of Graduate Studies, Universidad de California.
- Dougherty, T., & Pucci, M. (2012). Antibiotic Discovery and Development (Vol. 1). Springer.

- Editorial (2013). Un nuevo problema mundial. El Tiempo. [www.eltiempo.com](http://www.eltiempo.com). Consultado Marzo 16 2015.
- EPINE (2010). Estudio de prevalencia de infecciones Nosocomiales (2010) Informe global de España Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene.
- Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis LA (2006) The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 55:1619-1629.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat.Rev.Microbiol.*, 3(1740-1526 (Print)), 722–732.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat.Rev.Microbiol.*, 3(1740-1526 (Print)), 722–732.
- Gelband, H., Miller-Petrie, M., Pant, s., Gandra, s., Levinson, j., & Barter, D. (2015). The state of the world's antibiotics, 2015. Washington: Center for Disease Dynamics, *Economics & Policy*. CDDEP. Washington, D.C. 79 pp.
- Gelband, H., Miller-Petrie, M., Pant, S., Gandra, S., Levinson, J., & Barter, D. (2015). The state of the world's antibiotics, 2015. Washington: Center for Disease Dynamics. *Economics & Policy*.
- Giske CG, Monnet DL, Cars O, et al (2008) Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 813-21.
- Gogarten, M. B., Gogarten, J. P., & Olendzenski, L. (2009). Horizontal Gene Transfer: Genomes in flux (Vol. 532). Humana press.
- Gogarten, M. B., Gogarten, J. P., & Olendzenski, L. (2009). Horizontal Gene Transfer: Genomes in flux (Vol. 532). Humana press.
- GREBO Grupo para el Control de la Resistencia Antimicrobiana en Bogotá (2013) Boletín informativo.
- Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E, et al. (2007) Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrobial Agents Chemoter*, 51: 4329-35.
- Hankin ME. The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes. *Ann Inst Pasteur*. 1896; 10:511-23.
- Hayes, F. (2003). Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. *Annual Review of Genetics*, 37(1), 3–29.
- Hernández, A., Mellado, R. P., & Martínez, J. L. (1998). Metal Accumulation and Vanadium-Induced Multidrug Resistance by Environmental Isolates of *Escherichia hermannii* and *Enterobacter cloacae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4317-4320.
- Iversen H, L'Abée-Lund TM, Aspholm M, Arnesen LPS, Lindback T. (2015). Commensal *E. coli* Stx2 lysogens produce high levels of phages after spontaneous prophage induction. *Front Cell Infect Microbiol*, (5), 1-8.
- J. P., Charlebois, R. L., ... Papke, R. T. (2006). Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: Quantification of horizontal gene transfer events Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: Quantification of horizontal gene transfer events, (902), 1099–1108.
- Jackson, R. W., Vinatzer, B., Arnold, D. L., Dorus, S., & Murillo, J. (2011). The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. *Mobile Genetic Elements*, 1(1), 55–65.
- Karunasagar I. (2012) Public health and trade impact of antimicrobial use in aquaculture. En: Bondad-Reantaso MG., Arthur JR., Subasinghe RP. (eds) Improving biosecurity through

- prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, Roma, España pp 1-9.
- Kilani H, Salah AM, Ferjani S, Mansouri R, Sghaier S, Ben SR, Jaouani J, Douja G, Brahim S, Hammami S, Ben CN, Boutiba-Ben Bl. (2015). Occurrence of blaCTX-M-1, qnrB1 and virulence genes in avian ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from Tunisia. *Front Cell Infect Microbiol*, 5(38), 1-8.
- Levin Institute (2014) Regulating Antibiotics in Animals <http://www.globalization101.org/regulating-antibiotics-in-animals/>. Consultado Febrero 25 2014.
- Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution*, 157(11), 2893-2902.
- McDaniel, L. D., Young, E. C., Ritchie, K. B., & Paul, J. H. (2012). Environmental factors influencing gene transfer agent (GTA) mediated transduction in the subtropical ocean. *PLoS ONE*, 7(8).
- Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J. E., & Stokes, H. W. (2007). Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends in Microbiology*, 15(7), 301–309.
- Johnson, C. M., & Grossman, A. D. (2015). Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annual Review of Genetics*, 49(1).
- Muniesa, M., Imamovic, L., & Jofre, J. (2011). Bacteriophages and genetic mobilization in sewage and faecally polluted environments. *Microbial Biotechnology*, 4(6), 725–734.
- Munir, M., Wong, K., & Xagorarakis, I. (2011). Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Research*, 45(2), 681–93.
- Muto, C. A. (2005). Why Are Antibiotic-Resistant Nosocomial Infections Spiraling Out of Control? *Infection control and hospital epidemiology*, 26(1), 10-12.
- Penades, J. R., Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Carpena, N., & Novick, R. P. (2015). Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Current Opinion in Microbiology*, 23, 171–178.
- Philips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, et al. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53(1):28-52.
- Prada G. (2008) Impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo de la medicina contemporánea. *Revista Med*. 16(1):9-11.
- Prada G. (2008) Impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo de la medicina contemporánea. *Revista Med*. 16(1):9-11.
- Pray, L. (2008). Transposons: The Jumping Genes. *Nature Education*, 1(1), 204.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2004). *Microbiología*. McGraw- Hill/Interamericana.
- Pruden, A., Arabi, M., & Storteboom, H. N. (2012). Correlation between upstream human activities and riverine antibiotic resistance genes. *Environmental Science & Technology*, 46(21), 11541–9.
- Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H., & Carlson, K. H. (2006). Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environmental Science & Technology*, 40(23), 7445-7450.
- Rice LB (2009) The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr Opin Microbiol*, 12:476-81.
- Riera E., Cabot G., Mulet X., Garcia-Castillo M., Del Campo R., Juan C., Canton R., Oliver A (2011) *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact in

- the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother*, 66 (9): 2022-7
- Siefert, J. L. (2009). Defining the mobilome. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 532, 13–27.
- Stepanauskas, R., Glenn, T. C., Jagoe, C. H., Tuckfield, R. C., Lindell, a. H., King, C. J., & Mcarthur, J. V. (2006). Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. *Environmental Microbiology*, 8(9), 1510-1514.
- Villa, T., & Veiga-Crespo, P. (2014). *Antimicrobial Compounds*. Springer Berlin Heidelberg.
- World Economic Forum (2013) *Global Risks 2013 Eighth Edition* 80p  
[http://www3.weforum.org/docs/WEF Global Risks Report 2013.pdf](http://www3.weforum.org/docs/WEF_Global_Risks_Report_2013.pdf). Consultado Diciembre 10, 2015.
- Zhaxybayeva, O., & Doolittle, W. F. (2011). Lateral gene transfer. *Current Biology*, 21(7), R242–R246.



**SECCIÓN D: PRESUPUESTO DEL PROYECTO**

<b>Partida presupuestaria</b>	<b>Monto (S/.)</b>
1. Equipos y bienes duraderos (hasta un 25% del presupuesto)	00.00
2. Recursos humanos (hasta un 25% del presupuesto)	00.00
3. Materiales e insumos	19,305.00
4. Pasajes y viáticos	00.00
5. Servicios tecnológicos	00.00
<b>TOTAL</b>	<b>19,305.00</b>

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

Equipos y bienes duraderos	Especificaciones técnicas	Proforma (fecha)	Costo unitario	Cantidad	Costo total S/.
					00.00
					00.00
					00.00

**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/.
Estadístico					00.00
Tesista					00.00
					00.00

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

Descripción	Costo unitario	Cantidad	Costo total S/.
Agar Cetrimide	250	02 lb.	500
Triptona	300	01 lb	300
Tris - HCl	400	01 lb	400
Tris - Base	400	01 lb	400
Extracto de Levadura	200	01 lb	200
Tubos Falcon de 50 mL de capacidad.	200	2 cientos	400
Tubos Falcon de 15 mL. de capacidad.	200	2 Cientos	400
Papel Aluminio	15	10 rollos	120
Tubos Eppendorf de 1,5 mL.	200.00 / millar	02 millares	400
Agar Nutritivo	300	3 lb	900
Agar Mueller-Hinton	300	2 lb	600
EDTA	170	100 grs.	170
Caja de Filtros de Nitrocelulosa de 0.45 um tamaño de poro	400	02 cajas	800
Caja de Filtros de Nitrocelulosa de 0.22 um tamaño de poro	400	02 cajas	800
Fago Lambda	300	03 unidades	900
Puntas blancas de 10 uL	40	10 bolsas	400
Puntas Amarillas de 200 uL	40	10 bolsas	400
Puntas Azules de 1000 uL	40	10 bolsas	400
Diseño de Oligonucleótidos (Primers)	90	10 secuencias	900
DNAsa	500	01 Unidades	500
RNAsa	500	01 Unidades	500
Enzima de Restricción: BstEII	300	01 Unidad	500
Enzima de Restricción: EcoRV	300	01 Unidad	500
Enzima de Restricción: EcoRI	300	01 Unidad	500
Enzima de Restricción: HindIII	300	01 Unidad	500
Enzima de Restricción: PstI	300	01 Unidad	500

Enzima de Restricción: Xbal	300	01 Unidad	500
Discos de ATB de: piperaciclina (100 µg),	20	03 Frasco de 100 unidades	60
Discos de ATB de: Piperaciclina - tazobactam (100 - 10 µg)	20	03 Frasco de 100 unidades	60
Discos de Antibiótico de: Ceftazidima (30 µg)	20	03 Frasco de 100 unidades	60
Discos de Antibiótico de: Cefepima (30 µg)	20	03 Frasco de 100 unidades	60
Discos de Antibiótico de: Imipenem (10 µg),	20	03 Frasco de 100 unidades	60
Discos de Antibiótico de: Meropenem (10 µg),	20	03 Frasco de 100 unidades	60
Discos de Antibiótico de: Amikacina (30 µg) (AMK)	20	03 Frasco de 100 unidades	60
Discos de Antibiótico de: Gentamicina (10 µg) (GEN)	20	03 Frasco de 100 unidades	60
Discos de Antibiótico de: Ciprofloxacina (5 µg) (CIP)	20	03 Frasco de 100 unidades	60
Discos de Antibiótico de: Colistina (10 µg) (COL)	20	03 Frasco de 100 unidades	60
Discos de Antibiótico de: Tobramicina (10 µg)	20	03 Frasco de 100 unidades	60
Discos de Antibiótico de: Ofloxacina (5 µg)	20	03 Frasco de 100 unidades	60
Discos de Antibiótico de: Cefepime (30 µg)	20	03 Frasco de 100 unidades	60
Discos de Antibiótico de: Aztreonam (30 µg)	20	03 Frasco de 100 unidades	60
Discos de Antibiótico de: Norfloxacina (30 µg)	20	03 Frasco de 100 unidades	60
50X TAE Buffer (Tris-acetate-EDTA)	400	01 Lt	400
Leader de 10 kpb de DNA (Invitrogene)	800	01 kit	800
Leader de 1 kpb de DNA (Invitrogene)	800	01 kit	800
Leader de 100 pb de DNA (Invitrogene)	800	01 kit	800
Glicerol	100.00	02 Lt.	200
Kit de Extracción de DNA (Invitrogen)	1	01 kit	1200
CTAB (N-Cetil-N,N,N-trimetilamonio bromuro) grado Biología Molecular frasco de 100 g	250	100 grs.	250
Buffer de carga 6X para electroforesis de DNA o productos PCR	200	2 UNID.	400
Ácido Acético 2,5 Lt.	165	2,5 Lt.	165
			<b>19,305</b>

**CUADRO Nº 4: Pasajes y viáticos**

Descripción	Costo unitario	Cantidad	Costo total S/.
			00.00
			00.00
			00.00



**CUADRO N° 5: Servicios tecnológicos**

Descripción	Costo unitario	Cantidad	Costo total S/.
Análisis especializado			00.00
			00.00
			00.00



Vicerrectorado de Investigación  
Oficina de Investigación

## FORMATO 2

### DECLARACION JURADA DE COMPROMISO Y AUTENTICIDAD DEL PROYECTO (SOLO PARA EL INVESTIGADOR PRINCIPAL)

Trujillo, 29 de Abril del 2,019

Señor Doctor  
Luis Cerna Bazán  
Vicerrector de Investigación  
Presente.-

De mi consideración:

El suscrito docente de la Facultad de Ciencias de la Salud, del Departamento Académico de Ciencias, identificado con DNI N° 17910133 y domicilio en La Constancia 514 Urb. Huerta Grande, DECLARO BAJO JURAMENTO mi compromiso de participar como Investigador Principal y **responsable** del proyecto de investigación titulado DETECCIÓN DE LOS GENES *blaTEM*, *qnrA* y *qnrB* QUE CONFIEREN RESISTENCIA EN LA FRACCIÓN BACTERIANA Y FAGICA DE *Pseudomonas aeruginosa* Mutirresistente (PAMR); el cual es **ORIGINAL Y AUTENTICO** y está enmarcado en las áreas académicas y líneas de investigación priorizadas por la Universidad Privada Antenor Orrego (UPAO).

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente,

-----  
*José González Cabeza*  
DNI N° 17910133