



Universidad de Concepción

Facultad de Farmacia

**ASOCIACIÓN DE PROFAGOS Y GENES DE
CARBAPENEMASAS EN *ACINETOBACTER
BAUMANNII* RESISTENTE A CARBAPENÉMICOS**

POR DAGOBERTO JOSÉ SÁNCHEZ ARZOLA

Tesis presentada a facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción para optar
al título profesional de Bioquímico

Profesor Guía

Dr. Andres Opazo Capurro
Universidad de Concepción

Profesor Patrocinante

Dr. Andres Opazo Capurro
Universidad de Concepción

Abril, 2023

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento

1.- RESUMEN:

Acinetobacter baumannii es un cocobacilo gramnegativo, de la familia *Moraxellaceae*. Dadas sus cualidades oportunistas presenta una alta prevalencia en ambientes hospitalarios, particularmente en las Unidades de Cuidados intensivos (UCI), donde es considerada una de las bacterias con mayores índices de mortalidad de todo el mundo. Posee una gran capacidad para adquirir elementos genéticos móviles (EGMs) que portan genes de resistencia a antibióticos. Específicamente, *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (ABRC) fue incluida en la lista de patógenos prioritarios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2017, debido a su capacidad de resistir la acción de la gran mayoría de los antibióticos disponibles, incluyendo a los carbapenémicos. El mecanismo de resistencia más relevante contra carbapenémicos en esta especie bacteriana es la hidrólisis enzimática. Y las enzimas con actividad contra carbapenémicos más frecuentemente descritas en cepas de ABRC, son las carbapenemasas de clase D (tipo OXA). Latinoamérica presenta los índices de resistencias a carbapenémicos más elevados a nivel mundial, por lo que ampliar el monitoreo epidemiológico en la región, así como en nuestro país, es de vital relevancia para la toma de medidas al respecto. Ahora bien, considerando que alrededor del 20% de los genomas bacterianos suelen provenir desde secuencias profágicas, y el creciente reporte de secuencias similares a fagos asociadas a eventos de movilización de genes, es fundamental incluir en este monitoreo el análisis del rol de los bacteriófagos en la diseminación de genes de resistencia. Actualmente, se conoce el rol de los plásmidos conjugativos en la movilización de genes que codifican carbapenemasas del tipo OXA, no así el de la transducción mediada por bacteriófagos, cuya participación es en gran medida desconocida para esta especie bacteriana.

Debido a lo anterior, es que en este proyecto se buscará determinar la presencia de secuencias profágicas asociadas a genes de carbapenemasas tipo OXA en cepas de ABRC aisladas en Chile. Para ello, se obtendrán 100 muestras clínicas de *A. baumannii*, las cuales, serán sometidas a PCR para confirmar su pertenencia a la especie *A. baumannii* y la presencia de carbapenemasas adquiridas tipo OXA en su genoma. Luego, de aquellas cepas que presenten carbapenemasas se elegirán 20 para su secuenciación por las plataformas Illumina y Nanopore, y a través de los datos obtenidos de ellas, se pesquisarán profagos en los aislados a través del análisis bioinformático de las secuencias. Finalmente, se evaluará la asociación entre dichas estructuras (fagos y carbapenemasas tipo OXA). Los resultados generados proporcionarán información valiosa sobre el repertorio de profagos asociados a carbapenemasas tipo OXA en ABRC, lo cual, servirá como línea base para el entendimiento del potencial rol de la transducción mediada por fagos en la diseminación de estas enzimas en cepas recolectadas en hospitales de Chile.

2. INTRODUCCIÓN

El aumento de reportes sobre infecciones causadas por bacterias multirresistentes en las últimas décadas, auguran que la próxima gran pandemia podría ser causada por estos patógenos (O'Neill, 2016). Es más, según estimaciones de la Organización Mundial de la salud (OMS), para el año 2050 las infecciones causadas por bacterias resistentes llegarían a ser la principal causa de muerte en el mundo, pasando de las 700.000 muertes anuales causadas actualmente, a 10 millones de muertes, si no se toman medidas para su control (O'Neill, 2016).

Ya en la actualidad, los microorganismos multirresistentes son reconocidos como patógenos habituales en la adquisición de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) en todo el mundo (Tabah et al., 2012). Algunas de las bacterias más recurrentes en las Unidades de cuidados intensivos (UCI), son *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, consideradas dentro de las principales especies bacterianas causantes de infecciones con resultado fatal a nivel intrahospitalario (Labarca et al., 2016).

Particularmente *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (ABRC), presenta un repertorio sumamente elevado de mecanismos de resistencia a antibióticos, dentro de las cuales, las resistencias a carbapenémicos son las de mayor preocupación (Poirel & Nordmann, 2006). Los carbapenémicos, por su parte, son los antibióticos recomendados para infecciones graves causadas por Enterobacterales productores de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE), y son aún fármacos de elección para el tratamiento empírico de la sepsis causada por organismos gramnegativos multirresistentes (Hawkey et al., 2018). La producción de enzimas β -lactamasas con actividad frente a carbapenémicos son el mecanismo que se presenta con mayor frecuencia como forma de evasión frente a la acción de estos fármacos (Bonomo, 2017). Estas, se agrupan en las clases moleculares, A, B, C y D (Bonomo, 2017)(Ambler, 1980). Gran parte de estas enzimas han podido ser descritas en cepas de *A. baumannii*, pero de todas ellas, las que tienen actividad carbapenemasa y a su vez presentan los mayores índices de prevalencia, son las de clase D, también denominadas enzimas tipo OXA (Zhao & Hu, 2012).

La presencia de gran parte de estas carbapenemasas en ABRC, se debe a la transmisión horizontal de genes (THG), es decir, han sido adquiridas por la bacteria en su contacto con el medio y/o con otras bacterias (Jeon et al., 2023). Esta adquisición, es mediada por elementos genéticos móviles (EGMs), los cuales, como su nombre lo indica, permiten el movimiento de genes intra e intercelularmente (Jeon et al., 2023). Los mecanismos que permiten este movimiento entre bacterias, son: la conjugación, transformación y transducción (Jeon et al., 2023). De todos ellos, el mecanismo del que se tienen más registros para la movilización de genes de resistencia tipo OXA en ABRC, es la conjugación mediada por plásmidos (Jeon et al., 2023). Por otro lado, se desconoce el rol que puedan jugar los mecanismos no conjugativos en los procesos de movilización de genes en *A. baumannii*, especialmente la transducción mediada por bacteriófagos (o fagos)(López-Leal et al., 2020).

El rápido desarrollo de herramientas moleculares, como la secuenciación, han permitido estudiar más en profundidad el impacto de estos EGMs en los genomas bacterianos (Xing et al., 2013). Debido a esto, hoy sabemos que alrededor del 20% de los genomas bacterianos tiene un origen desde fagos (profagos intactos o crípticos)(Wang et al., 2010). Estos descubrimientos, y el creciente número de registros que asocian la movilización de carbapenemasas tipo OXA a secuencias similares a fagos en ABRC, sugiere que la transducción mediada por fagos juega un rol importante en la movilización de estos determinantes de resistencia en dicha especie bacteriana, haciendo de ello, una

fuente interesante y necesaria de estudio (López-Leal et al., 2020).

2.2.1. Transferencia de genes: Mecanismos

El genoma bacteriano suele tener con frecuencia gran cantidad de ADN cuyo origen no es propio de la especie, vale decir, ha ingresado a la bacteria y se ha insertado en su genoma (Ochman et al., 2000). Estas secuencias exógenas pueden ser reconocidas gracias a las diferencias en los porcentajes de G+C entre la secuencia externa y el genoma central de la bacteria, dado que cada especie tiene un porcentaje de C+G característico, además, las regiones adyacentes a estas secuencias suelen estar marcadas por elementos genéticos asociados a la transferencia de ADN (Ochman et al., 2000)(Gyles & Boerlin, 2014).

Los fenómenos de movilización de ADN están mediados por diversos EGMs los cuales, consisten en segmentos de ADN con la particular facultad de movilizarse entre elementos cromosómicos y plasmidiales, tanto a nivel intracelular como intercelular (Partridge et al., 2018). Algunos de estos EGMs, son las secuencias de inserción (IS) y los transposones (Tn), los cuales, son segmentos discretos de ADN que pueden moverse casi al azar a nuevas ubicaciones en las mismas o diferentes moléculas de ADN dentro de una sola célula (Partridge et al., 2018). Otros elementos, como los integrones (In) y casetes de genes, utilizan la recombinación sitio-específica para movilizar genes (por ejemplo, de resistencia) entre sitios definidos (Partridge et al., 2018). Además, existen aquellos elementos genéticos asociados a la movilización entre células, como por ejemplo, los plásmidos conjugativos, que son secuencias circulares de ADN extra cromosómico, con la capacidad para replicarse de forma independiente (Partridge et al., 2018). Además, se han descrito a los elementos conjugativos integrativos (ECI), que consisten en una columna vertebral (que contiene funciones de integración/escisión similares a fagos, componentes de conjugación/mantenimiento similares a plásmidos y un módulo de regulación) en el que se insertan genes accesorios, los cuales, se integran al cromosoma huésped y se replican como parte de él (Partridge et al., 2018). También actúan de esta manera los bacteriófagos, utilizando la maquinaria de la bacteria huésped para su replicación, y que bajo circunstancias particulares, pueden funcionar como movilizadores de genes (Sousa et al., 2020).

Los procesos de movilización intercelular de genes de resistencia a antibióticos (GRAs), suelen asociarse principalmente a mecanismos de transferencia horizontal de genes (o THG), por medio de los cuales, las bacterias aseguran su variabilidad genética y evolución, a través de la entrega y adquisición de EGMs (Partridge et al., 2018).

Existen tres formas de THG:

Transformación: Es el mecanismo de THG en el cual una bacteria incorpora y asimila ADN de otras bacterias presente en el medio externo, lo que tiene lugar cuando dicha bacteria se encuentra en un estado de competencia, por lo cual, es capaz de incorporar ADN desnudo presente en el medio, con su posible integración en el genoma, y posterior expresión (Krüger & Stingl, 2011).

Conjugación: Este proceso consiste en la transferencia de EGMs, específicamente plásmidos conjugativos o ICEs, a través del contacto íntimo entre bacterias, lo que involucra un sistema de secreción tipo IV, con un pili sexual en bacterias Gram-negativas, o con un aparato de translocación y unión de célula a célula basado en adhesina en organismos Gram-positivos, por medio del cual se transfiere ADN plasmídico desde una célula dadora a una receptora (Bhatty et al., 2013). Es reconocido hasta el momento como el principal responsable de la transferencia de material genético en bacterias, y de la aparición de multirresistencia en entornos hospitalarios, acuícolas,

entre otros (Lerminiaux & Cameron, 2019).

Transducción: Es el proceso mediante el cual los virus bacterianos, denominados bacteriófagos (o fagos), median la transferencia de ADN entre células bacterianas (Ochman et al., 2000).

2.2.2. Bacteriófagos: Generalidades

Estos virus son reconocidos como la entidad biológica más abundante de la biosfera, donde pueden ser encontrados en todos los ambientes (Batinovic et al., 2019). Dada su amplia distribución, y sumada a su alta plasticidad genómica, presentan una gran variedad genética y morfológica (Dion et al., 2020). Sus genomas, pueden estar compuestos por ADN o ARN, mono o bicatenario, el cual, se encuentra empaquetado en una cápside, cuya disposición puede ser: poliédrica, filamentosa, pleomórfica o conectada a una cola (Caudovirales), siendo estos últimos los más abundantes y estudiados. Además, algunos pueden presentar membranas lipídicas (Dion et al., 2020). En general, suelen tener genomas muy dispares entre sí, es más, muchos de ellos, presentan un genoma mosaico, con fragmentos genómicos que parecieran tener distintas historias evolutivas (Casjens & Thuman-Commike, 2011). Gran cantidad de genes relacionados a fagos, han sido descritos formando parte del genoma de otras especies (Moura de Sousa et al., 2021). Es más, los elementos similares a fagos pueden llegar a constituir un 20% de todo el genoma de una bacteria, y han sido encontrado en casi todos los genomas bacterianos patógenos y no patógenos secuenciados, lo que indica su relevancia en la evolución de los genomas bacterianos (Wang et al., 2010).

Estos virus al interactuar con la bacteria pueden tomar distintas vías, aquellos que son denominados como virulentos siguen estrictamente una ruta lítica, donde el virus hace uso de la maquinaria bacteriana para la generación de nuevos bacteriófagos y para programar la posterior lisis bacteriana, con el objetivo de seguir propagándose (Sousa et al., 2020). Por otro lado, aquellos denominados templados, pueden igualmente seguir hacia un ciclo lítico, o entrar en un ciclo lisogénico, en el cual, el ADN vírico asociado al genoma bacteriano, se mantiene en estado de latencia o inactivo, donde pasa a denominarse profago (Sousa et al., 2020).

El ciclo replicativo de los fagos con una ruta lítica tiene distintas etapas, como se ha podido estudiar en el fago T4 de *E. coli*, donde el proceso suele iniciar con una adsorción o acoplamiento del virus a la superficie bacteriana, seguido de la inyección del material genético viral. Una vez el material se encuentra dentro del hospedero, se integra al genoma bacteriano e inicia un proceso de replicación del material genético viral y síntesis de las envolturas proteicas, seguido del empaquetamiento del ADN dentro de la envoltura proteica y su ensamblaje. Todo este proceso culmina con la lisis bacteriana y liberación de las partículas virales maduras (Stone et al., 2019).

Los profagos aun estando insertos en el ADN bacteriano, pueden volver a activar la ruta lítica, retomando su rol como factores de diseminación bajo situaciones de estrés que afectan la integridad del ADN bacteriano, como se ha descrito con el fago λ de *E. coli* (Chen et al., 2006). Su presencia juega un papel vital en la evolución del genoma huésped, al permitir el flujo de genes exógenos al interior del genoma, los cuales, pueden conferir cualidades adaptativas que permitan un mejor desempeño de las bacterias en el medio (Brüssow et al., 2004). Uno de los rasgos asociados a la presencia de profagos, puede ser la resistencia a los antibióticos, otorgada a través de la movilización de genes por transducción (Krahn et al., 2016), o por "auto transducción", al promover la infección de bacterias competidoras del huésped que sean sensibles a la infección por fagos, y

permitir eventos de transferencia genética entre el genoma del hospedero con el de los fagos resultantes (Haaber et al., 2016). Los profagos pueden quedar 'atrapados' en el cromosoma del huésped debido a varios reordenamientos del genoma y deterioro gradual, volviéndose inactivos en términos de lisis celular, producción de partículas virales y formación de placas, momento en que pasan a ser llamados profagos crípticos, los cuales, aún pueden conferir ventajas adaptativas a su huésped (Wang et al., 2010).

2.2.3. Transferencia de genes mediada por fagos

Existen 2 mecanismos que permiten la transmisión genética por medio de fagos, estas son:

La **"transducción generalizada"**, en la cual, estos bacteriófagos virulentos pueden empaquetar cualquier región del ADN bacteriano (cromosómico o plasmidial), infectar a otra bacteria, y en consecuencia, transferirlo (Brüssow et al., 2004). El modelo utilizado para describir este mecanismo es el fago P22. Este proceso ocurre como un "error" durante el ciclo lítico, específicamente durante el proceso en que la maquinaria del bacteriófago se encuentra empaquetando moléculas de ADN viral, momento en que una secuencia de ADN bacteriano se empaquetaría por error (Chiang et al., 2019). Este empaquetado, es producto del reconocimiento erróneo de las terminaciones del bacteriófago con los sitios pseudo-pac (homólogos a los sitios pac [del inglés phage packaging site, cuya traducción al español es "sitio de empaquetamiento del fago"] que reconocen normalmente ciertos fagos, y que sería el indicador de empaquetado) presentes en el cromosoma bacteriano o plásmidos, para posteriormente salir contenido dentro de una estructura viral capaz de infectar a otras bacterias, dando como resultado una posible recombinación con el cromosoma de esta nueva bacteria (Thierauf et al., 2009). En su mayor parte, la transducción generalizada está mediada exclusivamente por fagos de tipo *pac* (Chiang et al., 2019).

Por otro lado, se encuentra la **"transducción especializada"**, la cual, se limita a la transferencia de conjuntos específicos de genes. Las partículas de transducción especializadas surgen cuando parte del ADN del virus y de la bacteria se encapsulan como una molécula híbrida, al existir un error en la escisión del profago. Este tipo de transducción ocurre en bacterias lisogénicas por acción de un profago (Kwoh & Kemper, 1978). El fago λ , es el modelo con el que se estudia este tipo de transducción. El mecanismo de este proceso desde una bacteria lisogenizada cuyas condiciones no son favorables para la integridad del ADN vírico, inicia con un evento de escisión aberrantes del profago, donde se escinde una parte del ADN viral junto con un segmento adyacente de ADN del cromosoma bacteriano huésped, es decir, los genes transducibles están limitados al entorno más próximo al lugar de inserción específico del fago (Chiang et al., 2019)(Griffiths et al., 2000). Una vez episomal, la molécula híbrida se replica como lo haría un genoma viral normal, y si contiene un sitio *cos* (del inglés **"cohesive end site"**, cuya traducción sería "sitio de termino cohesivo"), los cuales están involucrados en los procesos de inserción y escisión del profago, el ADN híbrido concatémico resultante de la replicación puede empezar a empaquetarse en las procapsides de fago mediante la maquinaria de empaquetamiento tipo *cos* (Chiang et al., 2019). Luego, una vez ensamblados, los fagos podrán seguir infectando nuevas bacterias. La transducción especializada normalmente es exclusiva de fagos con el sistema de empaquetado *cos*, aunque también puede darse con sistemas *pac* (Chiang et al., 2019).

2.2.4. *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (ABRC)

El género *Acinetobacter* comprende a bacterias Gram negativas, aerobias estrictas, no fermentadoras de glucosa, catalasa positivas, oxidasa negativas e inmóviles, con un contenido de ADN G+C de 39% a 47% (Peleg et al., 2008). Particularmente, *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (ABRC) es un cocobacilo gramnegativo cuyo impacto ha aumentado significativamente en el último tiempo, llegando a ser considerado como un patógeno de prioridad crítica según la Organización Mundial de la Salud (OMS), debido a su elevada resistencia a antibióticos (WHO, 2017). Esta bacteria perteneciente a la familia *Moraxellaceae*, presenta una particular dificultad para su identificación a nivel de especie por métodos fenotípicos, haciendo imposible su reconocimiento específico de otras especies del género *Acinetobacter* estrechamente relacionadas, por lo que es comúnmente reconocida como parte del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (Peleg et al., 2008). Para efectos clínicos, dadas las dificultades que aún confiere el uso del término anteriormente mencionado, al ser *A. calcoaceticus* una bacteria ambiental que no suele causar infecciones en humanos, hoy se utiliza el concepto de "grupo *baumannii*" para hacer referencia a las especies clínicamente relevantes del complejo, como lo son *A. baumannii*, *A. pittii* (antes genoespecie 3), *A. nosocomialis* (antes genoespecie 13 TU) (Nemec et al., 2011), *A. seifertii* y *A. dijkshoorniae* (Marí-Almirall et al., 2017). Actualmente su identificación de especie se logra por métodos moleculares (Nemec et al., 2011).

Esta bacteria tiene una alta prevalencia en el sector hospitalario como patógeno oportunista, ya que aprovecha sus simples requerimientos nutricionales, para colonizar y persistir en una gran cantidad de superficies e implementos médicos, facilitando su contacto con pacientes inmunodeprimidos (Peleg et al., 2008). En este tipo de pacientes, es reconocida como causante de un número considerable de infecciones intrahospitalarias graves, incluidas infecciones al tracto urinario, piel, tejidos blandos y heridas, pero es asociada principalmente a infecciones al torrente sanguíneo y neumonías asociadas a ventilador mecánico (Antunes et al., 2014). Algunos factores de riesgo que facilitan la adquisición de esta bacteria son períodos prolongados de hospitalización, el sexo masculino, la edad avanzada, entre otros (Antunes et al., 2014).

Su importancia como bacteria multirresistente radica en su rápida capacidad de adquirir y diseminar resistencias contra antibióticos que actualmente son utilizados para su control, destacándose por los crecientes registros de cepas resistentes a carbapenémicos (Antunes et al., 2014).

2.2.5. Distribución clonal de *A. baumannii*

La propagación mundial de *A. baumannii* resistente a múltiples drogas (MDR) se atribuye a la diseminación clonal de linajes genéticos específicos (Wachino et al., 2019). Esta situación fue evidenciada en estudios realizados en centros hospitalarios europeos distanciados entre sí, que tuvieron lugar a finales del siglo pasado e inicios del actual, donde la tipificación comparativa de diferentes cepas de *A. baumannii*, demostró la existencia de tres clones exitosos, originalmente denominados "clones europeos 1-3" (Dijkshoorn et al., 1996), y que posteriormente, pasaron a ser llamados "clones internacionales 1-3" debido a su distribución a lo largo de todo el mundo (Diancourt et al., 2010)(P. G. Higgins et al., 2010). A nivel mundial, esta bacteria muestra una resistencia a carbapenémicos que oscila desde el 40 al 80% (Chmielarczyk et al., 2016). Con el tiempo, se han reportado otros clones de gran relevancia (Giannouli et al., 2009), pero de todos ellos, el linaje de mayor distribución mundial corresponde al clon internacional 2 (IC2) (Hamidian & Nigro, 2019).

En Latinoamérica, las tasas de resistencia a antibióticos carbapenémicos (imipenem y meropenem) parecen estar entre las más elevadas a nivel global (Peleg et

al., 2008), así queda en evidencia en un informe del programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY, el cual, evaluó el aumento de las resistencias a imipenem para *A. baumannii* durante los periodos comprendidos entre 1997-1999 y 2008-2010, arrojando porcentajes de resistencia desde 6,4%, 12,6% y 0,0% en el primer periodo, hasta 84.9%, 71.4% y 50.0% en el segundo periodo, para países como Argentina, Brasil y Chile, respectivamente (Gales et al., 2012). Cabe destacar, que a diferencia de los otros continentes, los linajes resistentes a carbapenémicos más prevalentes en Latinoamérica, son el IC4 (asociado al complejo clonal 15 (CC15)) e IC5 (CC79), según estudios realizados en países como Brasil, Argentina, y Chile (Chagas et al., 2014) (Provasi Cardoso et al., 2016) (Opazo-Capurro et al., 2019). En Chile en particular, las cepas más prevalentes, pertenecen al linaje IC4 (CC15), en donde las tasas de resistencia a carbapenémicos son de un 66% aproximadamente (Opazo-Capurro et al., 2019).

2.2.6. Carbapenemasas tipo OXA en ABRC

Los mecanismos de resistencia a antibióticos identificados en *A. baumannii* son múltiples, dentro de los cuales destacan: La expulsión activa de fármacos, donde podemos encontrar, por ejemplo, cepas portadoras del sistema multidroga AdeABC (Opazo C et al., 2009); alteración de la función de las proteínas asociadas a la membrana externa (OMPs), como las porinas similares a OmpA, CarO y OprD (Uppalapati et al., 2020); alteración de las proteínas de unión a penicilina (PBPs), y en especial, la inactivación enzimática a través de carbapenemasas (Sen & Joshi, 2016).

Se han identificado alrededor de 210 β -lactamasas pertenecientes a 16 familias en *Acinetobacter* spp., dentro de ellas, las más prevalentes en *A. baumannii* son las de clase D (Zhao & Hu, 2012). Estas enzimas, inicialmente son denominadas OXA (oxacilinasas), ya que hidrolizan la isoxazolilpenicilina oxacilina más rápido que las penicilinas clásicas y al hecho de que no son inhibidas por el ácido clavulánico y el EDTA (Opazo et al., 2012). Suelen tener una eficiencia catalítica alrededor de 100 a 1000 veces menor a las enzimas de clase B (Opazo et al., 2012). Esta debilidad puede ser regulada mediante la inserción río arriba del gen de elementos IS como IS*Aba1*, cuya presencia aumenta la expresión del gen, como sucede para enzimas similares a OXA-51, donde la presencia de este elemento puede derivar en la actividad enzimática contra carbapenémicos, la cual, normalmente es prácticamente nula (Turton et al., 2006)(Opazo et al., 2012). También, se puede fortalecer su actividad al complementar la acción enzimática con otros mecanismos de resistencia a carbapenémicos (Opazo et al., 2012).

Los principales subgrupos de las enzimas OXA con actividad carbapenemasa corresponden a: OXA-23-like, OXA-24/40-like, OxaAb (OXA-51-like), OXA-58-like y OXA-143-like (Poirel et al., 2010). Estos subgrupos, son altamente prevalentes en cepas resistentes a carbapenémicos de esta especie (Poirel et al., 2010). De todas ellas, la gran mayoría es posible encontrarlas asociadas a plásmidos, sin embargo, la única que no presenta esta característica, dado que sería de carácter intrínseco cromosomal, corresponde las enzimas del grupo de OXA-51, cuyo gen, es utilizado como marcador de especie, al encontrarse en todas las cepas de *A. baumannii* de forma natural (Opazo et al., 2012). A su vez, el gen *oxa23* puede ser encontrado asociado tanto a plásmidos como al cromosoma (Opazo et al., 2012).

2.2.7. Epidemiología de carbapenemasas tipo OXA de ABRC

Las cepas portadoras de carbapenemasas tipo OXA, se han descrito en todo el

mundo (Opazo et al., 2012). El subgrupo más grande es el OxaAb (OXA-51-like), que corresponde a enzimas codificadas cromosómicamente en toda la especie (Opazo et al., 2012).

En cuanto a las enzimas codificadas en plásmidos:

Las carbapenemasas del grupo *oxa23* se detectaron por primera vez en Europa, específicamente en Escocia durante 1985 (Rodríguez et al., 2018). Fue la primera carbapenemasa observada en Latinoamérica, y en la actualidad, es la más distribuida en la región (Rodríguez et al., 2018).

Por otro lado, el grupo *oxa58* fue descrito a mediados de la década de 1990, en Argentina y Venezuela (Rodríguez et al., 2018). Diez años después, se convirtió en un determinante de resistencia exitoso en toda la región, particularmente Bolivia y Chile, siendo desplazado años después por la distribución de *oxa23* (Rodríguez et al., 2018).

El subgrupo *oxa40* (anteriormente OXA-24-like), puede normalmente ser encontrada en países europeos, asiáticos y EEUU (Opazo et al., 2012). Durante la década del 2010, se registraron los primeros hallazgos de esta enzima en Ecuador (2012) y Brasil (2014), mientras que en México, su variante *oxa72* es reconocida como la mayor contribución a la resistencia a carbapenémicos en el centro y norte del país (Rodríguez et al., 2018). En Chile, se registró la primera cepa portadora de estas enzimas en 2008, en 2 cepas no relacionadas clonalmente a ABRC (Opazo et al., 2012).

Por otro lado, las enzimas del grupo *oxa143*, desde su primera detección durante un brote de UCI en Brasil el 2004, sigue siendo hasta hoy endémicas en dicho país (Rodríguez et al., 2018).

2.2.8. Movilización de genes de resistencia en ABRC

En el caso de los mecanismos de transferencia de genes de carbapenemasas observados en ABRC, la conjugación es actualmente reconocida como el principal mecanismo de diseminación horizontal (Liu et al., 2014). Sin embargo, distintos trabajos actuales apuntan a la transformación natural y la transducción, como mecanismos que pueden desempeñar un papel mucho más relevante al que le es asignado actualmente respecto de la diseminación de genes de carbapenemasas tipo OXA (Wachino et al., 2019).

El potencial rol de los bacteriófagos como fuente de diseminación de carbapenemasas en ABRC ha sido escasamente explorado, siendo una prometedora fuente de estudio considerando el rápido desarrollo de nuevas herramientas como la secuenciación de genomas completos, las cuales, ha permitido visualizar elementos similares a fagos en gran parte de los aislados bacterianos estudiados (Arndt et al., 2016)(López-Leal et al., 2020). En este sentido, en un estudio de Wachino y colaboradores, se describió la transferencia de GRAs cromosómicos mediada por un mecanismo de transducción generalizada (Wachino et al., 2019). En otra publicación, Krahn y colaboradores, observaron que el gen *bla_{NDM-1}* fue adquirido por la cepa R2090 de *A. baumannii* desde otra cepa sin existir mediación de un plásmido móvil, situación que podría tener su explicación en un posible proceso de transducción, dado que la cepa R2090 posee tres profagos presumiblemente intactos integrados en su cromosoma (Krahn et al., 2016). A su vez, en un estudio epidemiológico en Egipto, los autores encontraron indicios de que el principal mecanismo para la diseminación de *oxa23* en los aislados del linaje prevalente en la región, CC_{PAS1}, parece ser un bacteriófago denominado phiOXA (Abouelfetouh et al., 2020). De todas formas, aún faltan estudios específicos sobre la movilización de carbapenemasas tipo OXA mediada por fagos, más aún, en nuestro país, donde incluso los estudios epidemiológicos de susceptibilidad

antimicrobiana general en *A. baumannii* son escasos y presentan grandes limitaciones.

2.3. NOVEDAD CIENTÍFICA O TECNOLÓGICA DE LA PROPUESTA

Acinetobacter baumannii resistente a carbapenémicos (ABRC), es proyectada como una de las bacterias gestantes de la próxima gran pandemia. La OMS ha llamado a su vigilancia epidemiológica, a modo de evaluar su comportamiento, estudiar su avance, y orientar los programas de prevención y control de estos patógenos (O'Neill, 2016).

A pesar de que diversos autores desestiman los porcentajes de resistencias informados en nuestro continente, argumentando una sobre estimación por falta de información (estudios centrados solo en unos pocos hospitales de centros urbanos más grandes) dadas las limitaciones regionales, indiscutiblemente esta bacteria se perfila actualmente como un problema para los sistemas de salud. (Rizk et al., 2021)

Con esto como objetivo, es que entender los procesos de movilización de genes de resistencia, que son los que caracterizan a esta bacteria por sobre otras, es de vital importancia. En la actualidad, se reconoce la conjugación mediada por plásmidos como la forma de diseminación de genes de resistencia a carbapenémicos predominante en ABRC (Liu et al., 2014). Considerando que las nuevas herramientas moleculares han permitido evaluar el impacto de los profagos en los genomas bacterianos, de los cuales, pueden constituir hasta un 20%, el estudio de estos EGMs se torna una necesidad (Wang et al., 2010). Más aún, si consideramos que estas mismas herramientas moleculares han permitido un aumento de los registros que presumen, la mediación de estos mecanismos en procesos de movilización de genes de resistencia a carbapenémicos célula a célula (Arndt et al., 2016)(Xing et al., 2013). Aun así, la investigación específica sobre los procesos de movilización de genes de carbapenemasas tipo OXA, son insuficientes, especialmente en nuestro país. Con este trabajo, **buscamos evaluar la presencia de profagos que potencialmente puedan estar relacionados a la movilización de genes de carbapenemasas tipo OXA, en cepas de ABRC presentes en Chile.** En un futuro, estas mismas cepas podrían ser sometidas a estudios que permitan no solo determinar teóricamente la existencia de profagos y carbapenemasas tipo OXA en asociación, sino que también, permitan evaluar la capacidad real de lo profagos encontrados para retomar una ruta lítica y transferir los genes de resistencia en cuestión, tanto a distintas cepas, como a otras especies. Además, se podría evaluar en las bacterias resultantes, la expresión de estos genes.

2.4. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

3.1 Problema de Investigación: Si bien se ha demostrado el rol de plásmidos conjugativos en la diseminación de carbapenemasas tipo OXA, no existe mayor evidencia sobre el mecanismo de transducción mediada por fagos en la movilización de estos genes en cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos.

3.2 Pregunta de investigación: ¿Existen secuencias profágicas asociadas a genes de carbapenemasas tipo OXA en el genoma de cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos, aisladas desde hospitales chilenos?

2.5. HIPOTESIS

“En Chile, existen cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos que presentan secuencias profágicas asociadas a genes que codifican carbapenemasas tipo OXA”

2.6. OBJETIVOS

2.6.1. Objetivo general: Pesquisar la presencia de secuencias de profagos asociadas a carbapenemasas tipo OXA en cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos aisladas en Chile.

2.6.2. Objetivos específicos:

5.2.1 Determinar la presencia de genes que codifican carbapenemasas adquiridas del tipo OXA en cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos.

5.2.2 Pesquisar la presencia de secuencias de profagos que contengan carbapenemasas adquiridas tipo OXA en cepas de *A. baumannii* resistente a carbapenémicos.

2.7. MATERIALES Y METODOS

2.7.1. Obtención de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos.

Se seleccionarán 100 cepas de importancia clínica identificadas fenotípicamente como parte del grupo *baumannii*, todas ellas aisladas desde la red de hospitales del grupo MICROB-R y del biorepositorio del Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA) de la Universidad de Concepción. Corresponderán a aislamientos provenientes desde infecciones graves, principalmente bacteriemias (sangre), infecciones del tracto respiratorio, piel, tejidos blandos y heridas. Las cepas obtenidas contarán con las respectivas pruebas de susceptibilidad a carbapenémicos como imipenem (IMP) y meropenem (MEM). Estos parámetros se determinarán utilizando el método de difusión en disco, de acuerdo con las directrices del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para *Acinetobacter* spp (CLSI, 2021), cuyos resultados serán interpretados de acuerdo con las guías del mismo organismo. Las cepas serán mantenidas a -80°C en una mezcla de caldo tripticasa/glicerol (2:1) para su posterior uso.

2.7.2. Identificación y selección de cepas de *A. baumannii* productoras de carbapenemasas por medio de PCR múltiple.

Las cepas seleccionadas serán sometidas a la extracción del ADN bacteriano por medio del kit de extracción de ADN genómico bacteriano Mag-MK (Sangon Biotech, Shanghai, China). La extracción se hará siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. Luego, para discriminar las cepas de *A. baumannii* a nivel de especie, se les amplificara el gen

de la OxaAb por PCR individualmente. Solo aquellas cepas que contengan el gen, serán posteriormente sometidas a amplificación de los genes para identificar los genes de carbapenemasas adquiridas *Oxa23*, *Oxa40*, *Oxa58* y *Oxa143* mediante PCR múltiple (Woodford et al., 2006)(Paul G. Higgins et al., 2010). Previamente a estos procedimientos, cada cebador será evaluado por separado frente a cepas de control.

Tanto el ensayo de identificación de especie por amplificación individual del gen de OxaAB, como la PCR múltiple para identificar carbapenemasas tipo OXA adquiridas se llevarán a cabo haciendo uso de volúmenes totales de 25 µL, los cuales, contendrán 2 µL de ADN templado, 10 pM de cada cebador, MgCl₂ 1,5 mM, 250 µM de cada dNTP, 10 mM de Tris-HCL, 30 mM de KCL y 1 U de Taq DNA polimerasa (Bioneer Company,

Daejeon, Corea). Las condiciones de amplificación para ambos procedimientos serán: desnaturalización inicial a 94° C durante 5 min; 30 ciclos de 25 s de desnaturalización a 94° C; 40 s de hibridación de los cebadores a 52° C; extensión de 50 s a 72° C; y una etapa final de alargamiento de 72° C durante 6 min (Mohammadi et al., 2017)(Woodford et al., 2006). Los amplicones se analizarán mediante electroforesis en geles de agarosa tamponada con TAE 0.5X.

2.7.3. Secuenciación del genoma completo

De las cepas de *A. baumannii* que contuviesen al menos uno de los genes codificantes de carbapenemasas tipo OXA adquiridas pesquisadas previamente, se elegirán 20, las cuales, serán sometidas a secuenciación del genoma completo. Estas 20 cepas serán secuenciadas utilizando las plataformas Oxford Nanopore GridION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido), e Illumina Nextseq (Illumina Inc., San Diego, California, EE.UU). Este procedimiento se desarrollará con una profundidad teórica de 30x. Para este fin, se contratarán los servicios de la empresa SeqCenter con sede en Pittsburgh, Pensilvania, Estados Unidos (<https://www.seqcenter.com/>).

Previamente, se llevará a cabo la extracción del ADN genómico total de las cepas bacterianas utilizando el kit "ChargeSwitch® gDNA Mini Bacteria Kit" (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EEUU). La extracción se desarrollará siguiendo las instrucciones dadas por el proveedor. Al final de las extracciones de ADN, las muestras se analizarán en un espectrofotómetro Take3 (BioTek instruments, Winooski, Vermont, EE.UU.) para evaluar la cantidad y la calidad del ADN extraído. Posteriormente, el ADN obtenido, será enviado hacia la empresa SeqCenter donde se procederá a generar las librerías para la secuenciación, utilizando el kit flexible de preparación de librerías de ADN Nextera™ (Illumina, San Diego, California, EEUU) para Illumina, y el kit rápido V14 (SQK-RAD114) (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido) para nanopore. Una vez generada las librerías, se dará paso a la secuenciación del genoma completo.

2.7.4. Procesamiento bioinformático de los datos de secuenciación

Las lecturas derivadas de la secuenciación de Illumina y Nanopore, se someterán a un control de calidad inicial con FastQC (v.0.11.9) (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y LongQC v1.2.0 (Fukasawa et al., 2020) respectivamente. Luego, las lecturas se pulirán, es decir, se retirarán las secuencias adaptadoras de los fragmentos de secuenciación, utilizando Trimmomatic v0.39 (Bolger et al., 2014) para lecturas cortas y Porechop v0.2.4 (<https://github.com/rrwick/Porechop>) para lecturas largas. Las lecturas de las 10 cepas

obtenidas por ambas plataformas serán ensambladas *de novo* con un enfoque híbrido usando el programa Unicycler (Wick et al., 2017), por otro lado, se utilizará SPAdes (Bankevich et al., 2012) para las secuencias obtenidas exclusivamente con Illumina. QUAST se utilizará para derivar las métricas del ensamblaje, incluidas N50 y L50 (Gurevich et al., 2013). Las secuencias de los genomas completos se anotarán con el Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/), de la NCBI (Biblioteca nacional para la información biotecnológica).

Luego, se utilizará MobileElementFinder (Johansson et al., 2021) para evaluar la presencia de elementos móviles en el cromosoma bacteriano. A su vez, se contrastará con la base de datos IS-Finder (<https://www-is.biotoul.fr/>) para la detección de secuencias de inserción. Los genes de resistencia a antibióticos, serán estudiados complementariamente con ResFinder v4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) y AMRFinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/AMRFinder/>).

2.7.5. Búsqueda de secuencias profágicas

Para identificar las secuencias profágicas presentes en los genomas de las cepas de *A. baumannii*, se hará uso de la plataforma PHASTER (<http://phaster.ca>) (Arndt et al., 2016). PHASTER separa los profagos identificados en: intactos, cuestionables e incompletos. Para ello, los criterios que utiliza son el número de secuencias de ADN codificantes (CDS) asociadas a fago y la presencia de genes relacionados con fagos (Arndt et al., 2016). Para efectos de este estudio, solo los profagos intactos serán considerados, y estos serán seleccionados bajo la condición de que presenten todos los elementos necesarios para la infección por fago. Los resultados obtenidos por PHASTER serán contrastados por medio de Prophage Hunter, disponible en (<https://pro-hunter.genomics.cn/>) (Song et al., 2019). Las secuencias de los profagos detectados se anotarán utilizando el servidor Prokka v1.14.5 (Seemann, 2014), y serán analizados en mayor profundidad por medio de BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y el kit de herramientas bioinformáticas HHPRED (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>).

2.7.6. Búsqueda de secuencias profágicas asociadas a genes que codifican genes de carbapenemasas

Para poder evaluar la presencia de genes de carbapenemasas asociado a profagos se utilizará la herramienta de visualización de Proksee (<https://proksee.ca/projects>).

2.8. Plan de trabajo y Carta Gantt

2.8.1. Plan de trabajo

Este proyecto será desarrollado en dos etapas. La primera, incluye el periodo entre los meses de marzo y mayo de 2023. En esta etapa, se obtendrán 100 cepas de *A. baumannii* desde los biorepositorios del Núcleo Milenio (MICROB-R) y del LIAA (UdeC), las cuales han sido previamente recolectadas desde pacientes con infecciones graves, aisladas, purificadas, identificadas fenotípicamente y sometidas a ensayos para la determinación de sus perfiles de susceptibilidad a carbapenémicos (IMP y MEM). Las cepas seleccionadas serán aquellas que sean identificadas fenotípicamente dentro del grupo *baumannii* y presenten resistencia a carbapenémicos. Estas cepas serán sometidas a una segunda selección, donde por medio de PCR se confirmará su pertenencia a la especie *A. baumannii*, y la existencia de genes codificantes de carbapenemasas adquiridas en su genoma.

Luego, en la segunda etapa comprendida entre los meses de junio y diciembre de 2023, se secuenciarán los genomas completos de las 20 cepas clínicas de ABRC seleccionadas, con las plataformas nanopore e illumina, cuyo procesamiento será llevado a cabo por la empresa SeqCenter (EE.UU). Una vez secuenciadas, se realizará un chequeo de calidad de los fragmentos obtenidos durante la secuenciación, seguido de su preparación y ensamblaje *de novo* (con un enfoque híbrido) a modo de obtener una reconstrucción del genoma completo lo más fidedigna posible. Luego, la lectura del genoma completo obtenido para cada cepa de ABRC será anotada y analizada por medio de herramientas bioinformáticas que ayudaran en el proceso de búsqueda de profagos, y su asociación a genes codificantes de carbapenemasas tipo OXA en el cromosoma bacteriano.

2.8.2. Carta Gantt

[illegible]

2.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Abouelfetouh A, Mattock J, Turner D, Li E, Evans BA. Diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and bacteriophage-mediated spread of the Oxa23 carbapenemase. *Microb Genom.* 2022 Feb;8(2):000752. doi: 10.1099/mgen.0.000752.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 289(1036), 321–331. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
- Antunes, L. C. S., Visca, P., & Towner, K. J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease*, 71(3), 292–301. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12125>
- Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., & Wishart, D. S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W16–W21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455. <https://doi.org/10.1089/CMB.2012.0021>
- Batinovic, S., Wassef, F., Knowler, S. A., Rice, D. T. F., Stanton, C. R., Rose, J., Tucci, J., Nittami, T., Vinh, A., Drummond, G. R., Sobey, C. G., Chan, H. T., Seviour, R. J., Petrovski, S., & Franks, A. E. (2019). Bacteriophages in Natural and Artificial Environments. *Pathogens*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS8030100>
- Bhatty, M., Laverde Gomez, J. A., & Christie, P. J. (2013). The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Research in Microbiology*, 164(6), 620–639. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.012>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bonomo, R. A. (2017). β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(1). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A025239>
- Brüssow, H., Canchaya, C., & Hardt, W.-D. (2004). Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 560–602. <https://doi.org/10.1128/mmbr.68.3.560-602.2004>
- Casjens, S. R., & Thuman-Commike, P. A. (2011). Evolution of mosaically related tailed bacteriophage genomes seen through the lens of phage P22 virion assembly. *Virology*, 411(2), 393–415. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2010.12.046>
- Chagas, T. P. G., Carvalho, K. R., de Oliveira Santos, I. C., Carvalho-Assef, A. P. D. A., & Asensi, M. D. (2014). Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): Countrywide spread of OXA-23-producing clones

- (CC15 and CC79). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(4), 468–472. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.006>
- Chen, F., Wang, K., Stewart, J., & Belas, R. (2006). Induction of Multiple Prophages from a Marine Bacterium: a Genomic Approach. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 72(7), 4995–5001. <https://doi.org/10.1128/AEM.00056-06>
- Chiang, Y. N., Penadés, J. R., & Chen, J. (2019). Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathogens*, 15(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1007878>
- Chmielarczyk, A., Pilarczyk-Zurek, M., Kamińska, W., Pobiega, M., Romaniszyn, D., Ziółkowski, G., Wójkowska-Mach, J., & Bulanda, M. (2016). Molecular Epidemiology and Drug Resistance of *Acinetobacter baumannii* Isolated from Hospitals in Southern Poland: ICU as a Risk Factor for XDR Strains. *Microbial Drug Resistance*, 22(4), 328–335. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0224>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2017) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 12th Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L., & Brisse, S. (2010). The Population Structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding Multiresistant Clones from an Ancestral Susceptible Genetic Pool. *PLOS ONE*, 5(4), e10034. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010034>
- Dijkshoorn, L., Aucken, H., Gerner-Smidt, P., Janssen, P., Kaufmann, M. E., Garaizar, J., Ursing, J., & Pitt, T. L. (1996). Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(6), 1519. [/pmc/articles/PMC229053/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9048441/)
- Dion, M. B., Oechslin, F., & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
- Fukasawa, Y., Ermini, L., Wang, H., Carty, K., & Cheung, M. S. (2020). LongQC: A Quality Control Tool for Third Generation Sequencing Long Read Data. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 10(4), 1193. <https://doi.org/10.1534/G3.119.400864>
- Gales, A. C., Castanheira, M., Jones, R. N., & Sader, H. S. (2012). Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73(4), 354–360. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007>
- Giannouli, M., Tomasone, F., Agodi, A., Vahaboglu, H., Daoud, Z., Triassi, M., Tsakris, A., & Zarrilli, R. (2009). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(4), 828–830. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKP032>
- Griffiths, A. J., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., & Gelbart, W. M. (2000). *Transduction*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21760/>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTT086>
- Gyles, C., & Boerlin, P. (2014). Horizontally Transferred Genetic Elements and Their Role in Pathogenesis of Bacterial Disease. In *Veterinary Pathology* (Vol. 51, Issue

- 2, pp. 328–340). *Vet Pathol.* <https://doi.org/10.1177/0300985813511131>
- Haaber, J., Leisner, J. J., Cohn, M. T., Catalan-Moreno, A., Nielsen, J. B., Westh, H., Penadés, J. R., & Ingmer, H. (2016). Bacterial viruses enable their host to acquire antibiotic resistance genes from neighbouring cells. *Nature Communications* 2016 7:1, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms13333>
- Hamidian, M., & Nigro, S. J. (2019). Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant acinetobacter baumannii. In *Microbial Genomics* (Vol. 5, Issue 10). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000306>
- Hawkey, P. M., Warren, R. E., Livermore, D. M., McNulty, C. A. M., Enoch, D. A., Otter, J. A., & Wilson, A. P. R. (2018). Treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria: report of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy/Healthcare Infection Society/British Infection Association Joint Working Party. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(suppl_3), iii2–iii78. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKY027>
- Higgins, P. G., Dammhayn, C., Hackel, M., & Seifert, H. (2010). Global spread of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(2), 233–238. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp428>
- Higgins, Paul G., Lehmann, M., & Seifert, H. (2010). Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(3), 305. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2009.10.014>
- Jeon, J. H., Jang, K. M., Lee, J. H., Kang, L. W., & Lee, S. H. (2023). Transmission of antibiotic resistance genes through mobile genetic elements in Acinetobacter baumannii and gene-transfer prevention. *Science of The Total Environment*, 857, 159497. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.159497>
- Johansson, M. H. K., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F. M., Roberts, A. P., & Petersen, T. N. (2021). Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in Salmonella enterica using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(1), 101–109. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA390>
- Krahn, T., Wibberg, D., Maus, I., Winkler, A., Bontron, S., Sczyrba, A., Nordmann, P., Pühler, A., Poirel, L., & Schlüter, A. (2016). Intraspecies transfer of the chromosomal Acinetobacter baumannii blaNDM-1 carbapenemase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5), 3032–3040. <https://doi.org/10.1128/AAC.00124-16>
- Krüger, N. J., & Stingl, K. (2011). Two steps away from novelty - principles of bacterial DNA uptake. In *Molecular Microbiology* (Vol. 80, Issue 4, pp. 860–867). Mol Microbiol. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07647.x>
- Kwoh, D. Y., & Kemper, J. (1978). Bacteriophage P22-mediated specialized transduction in Salmonella typhimurium: high frequency of aberrant prophage excision. *Journal of Virology*, 27(3), 519–534. <https://doi.org/10.1128/jvi.27.3.519-534.1978>
- Labarca, J. A., Salles, M. J. C., Seas, C., & Guzmán-Blanco, M. (2016). Carbapenem resistance in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii in the nosocomial setting in Latin America. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 42, Issue 2, pp. 276–292). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.940494>

- Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 34–44. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
- Liu, C. C., Kuo, H. Y., Tang, C. Y., Chang, K. C., & Liou, M. L. (2014). Prevalence and mapping of a plasmid encoding a type IV secretion system in *Acinetobacter baumannii*. *Genomics*, 104(3), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.07.011>
- López-Leal, G., Santamaria, R. I., Cevallos, M. Á., Gonzalez, V., & Castillo-Ramírez, S. (2020). Letter to the Editor: Prophages Encode Antibiotic Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Drug Resistance*, 26(10), 1275–1277. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0362>
- Marí-Almirall, M., Cosgaya, C., Higgins, P. G., Van Assche, A., Telli, M., Huys, G., Lievens, B., Seifert, H., Dijkshoorn, L., Roca, I., & Vila, J. (2017). MALDI-TOF/MS identification of species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group revisited: inclusion of the novel *A. seifertii* and *A. dijkshoorniae* species. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(3), 210.e1–210.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2016.11.020>
- Mohammadi F, Goudarzi H, HashemiA, Yousefi Nofookambari N, Khoshnood S, et al. Detection of *ISAbal* in *Acinetobacter baumannii* Strains Carrying OXA Genes Isolated From Iranian Burns Patients. *Arch Pediatr Infect Dis*. 2017;5(2):e39307
- Moura de Sousa, J. A., Pfeifer, E., Touchon, M., & Rocha, E. P. C. (2021). Causes and Consequences of Bacteriophage Diversification via Genetic Exchanges across Lifestyles and Bacterial Taxa. *Molecular Biology and Evolution*, 38(6), 2497–2512. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAB044>
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T. J. K., Deschaght, P., Passet, V., Vaneechoutte, M., Brisse, S., & Dijkshoorn, L. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Research in Microbiology*, 162(4), 393–404. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2011.02.006>
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Grolsman, E. A. (2000a). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. In *Nature* (Vol. 405, Issue 6784, pp. 299–304). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/35012500>
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Grolsman, E. A. (2000b). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. In *Nature* (Vol. 405, Issue 6784, pp. 299–304). <https://doi.org/10.1038/35012500>
- Opazo-Capurro, A., San Martín, I., Quezada-Aguiluz, M., Morales-León, F., Domínguez-Yévenes, M., Lima, C. A., Esposito, F., Cerdeira, L., Bello-Toledo, H., Lincopan, N., & González-Rocha, G. (2019). Evolutionary dynamics of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* circulating in Chilean hospitals. *Infection, Genetics and Evolution*, 73, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.022>
- Opazo, A., Domínguez, M., Bello, H., Amyes, S. G. B., & González-Rocha, G. (2012). OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *Journal of Infection in Developing Countries*, 6(4), 311–316. <https://doi.org/10.3855/JIDC.2310>
- Opazo C, A., Mella M, S., Domínguez Y, M., Bello T, H., & González R, G. (2009).

- Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a antimicrobianos. *Revista Chilena de Infectología*, 26(6), 499–503.
<https://doi.org/10.4067/S0716-10182009000700002>
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 31, Issue 4). American Society for Microbiology.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 21, Issue 3, pp. 538–582). American Society for Microbiology Journals.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>
- Poirel, L., Naas, T., & Nordmann, P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 54, Issue 1, pp. 24–38). <https://doi.org/10.1128/AAC.01512-08>
- Poirel, L., & Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12(9), 826–836. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2006.01456.X>
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119–123.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
- Provási Cardoso, J., Cayô, R., Girardello, R., & Gales, A. C. (2016). Diversity of mechanisms conferring resistance to β -lactams among OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* clones. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(1), 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.018>
- Rizk, S. S., Elwakil, W. H., & Attia, A. S. (2021). Antibiotic-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Low-Income Countries (2000–2020): Twenty-One Years and Still below the Radar, Is It Not There or Can They Not Afford to Look for It? *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 764, 10(7), 764.
<https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10070764>
- Rodríguez, C. H., Nastro, M., & Famiglietti, A. (2018). Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(3), 327–333.
<https://doi.org/10.1016/J.RAM.2017.10.006>
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Sen, B., & Joshi, S. G. (2016). Studies on *Acinetobacter baumannii* involving multiple mechanisms of carbapenem resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 120(3), 619–629. <https://doi.org/10.1111/JAM.13037>
- Song, W., Sun, H.-X., Zhang, C., Cheng, L., Peng, Y., Deng, Z., Wang, D., Wang, Y., Hu, M., Liu, W., Yang, H., Shen, Y., Li, J., You, L., & Xiao, M. (2019). Prophage Hunter: an integrative hunting tool for active prophages. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W74–W80. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ380>
- Sousa, J. A. M. de, Pfeifer, E., Touchon, M., & Rocha, E. P. C. (2020). Genome diversification via genetic exchanges between temperate and virulent bacteriophages. *BioRxiv*, 2020.04.14.041137.

<https://doi.org/10.1101/2020.04.14.041137>

- Stone, E., Campbell, K., Grant, I., & McAuliffe, O. (2019). Understanding and Exploiting Phage–Host Interactions. *Viruses*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/V11060567>
- Tabah, A., Koulenti, D., Laupland, K., Misset, B., Valles, J., Bruzzi De Carvalho, F., Paiva, J. A., Çakar, N., Ma, X., Eggimann, P., Antonelli, M., Bonten, M. J. M., Csomos, A., Krueger, W. A., Mikstacki, A., Lipman, J., Depuydt, P., Vesin, A., Garrouste-Orgeas, M., ... Timsit, J. F. (2012). Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: The EUROBACT International Cohort Study. *Intensive Care Medicine*, 38(12), 1930–1945. <https://doi.org/10.1007/S00134-012-2695-9/TABLES/5>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Kattula, D., & Burkert, F. (n.d.). *GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS*. Retrieved January 27, 2021, from <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
- Thierauf, A., Perez, G., & Maloy, A. S. (2009). Generalized transduction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 501, 267–286. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_23
- Turton, J. F., Ward, M. E., Woodford, N., Kaufmann, M. E., Pike, R., Livermore, D. M., & Pitt, T. L. (2006). The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters*, 258(1), 72–77. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2006.00195.X>
- Uppalapati, S. R., Sett, A., & Pathania, R. (2020). The Outer Membrane Proteins OmpA, CarO, and OprD of *Acinetobacter baumannii* Confer a Two-Pronged Defense in Facilitating Its Success as a Potent Human Pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.589234/FULL>
- Wachino, J. ichi, Jin, W., Kimura, K., & Arakawa, Y. (2019). Intercellular transfer of chromosomal antimicrobial resistance genes between *acinetobacter baumannii* strains mediated by prophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(8). <https://doi.org/10.1128/AAC.00334-19>
- Wang, X., Kim, Y., Ma, Q., Hong, S. H., Pokusaeva, K., Sturino, J. M., & Wood, T. K. (2010). Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nature Communications* 2010 1:1, 1(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms1146>
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
- Woodford, N., Ellington, M. J., Coelho, J. M., Turton, J. F., Ward, M. E., Brown, S., Amyes, S. G. B., & Livermore, D. M. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(4), 351–353. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2006.01.004>
- Xing, J., Witherspoon, D. J., & Jorde, L. B. (2013). Mobile element biology – new possibilities with high-throughput sequencing. *Trends in Genetics : TIG*, 29(5), 280. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2012.12.002>
- Zhao, W. H., & Hu, Z. Q. (2012). *Acinetobacter*: A potential reservoir and dispenser for β -lactamases. <http://Dx.Doi.Org/10.3109/1040841X.2011.621064>, 38(1), 30–51. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.621064>

3.-JUSTIFICACIÓN DE RECURSOS SOLICITADOS:

Para completar esta sección, consulte las Bases Concurso de Proyectos FONDECYT de Iniciación en Investigación 2022 (utilizar formato tamaño carta, fuente Verdana tamaño 10 o similar).

3.1.- PERSONAL TÉCNICO O DE APOYO

Complete el siguiente cuadro para justificar la solicitud de recursos en este ítem, indique el número de personas que colaborarán en el proyecto, horas de dedicación por semana, horas de dedicación por mes, meses de dedicación por año, años de dedicación al proyecto, y remuneraciones/honorarios pactados por jornadas propuestas. Además, especifique en detalle las labores que desarrollará cada persona que contemple este ítem.

3.2.- Personal Técnico: Personas que ejercen funciones de carácter técnico permanente a la investigación durante la ejecución del proyecto:

Personal Técnico	Horas de dedicación		Meses de dedicación			Remuneración /Honorarios m(\$)
	Semana	Mes	Año 1	Año 2	Año 3	
Personal 1	20	80	11			3135,0
Personal 2						

Describa aquí las labores de cada personal técnico:

Personal 1- Tareas	Mantenimiento de cepario, desarrollo de experimentos (PCR, electroforesis y extracciones), y procesamiento bioinformático de secuenciación.
Personal 2- Tareas	

3.3.- Personal de Apoyo: Personas que ejercen funciones de apoyo permanente a las actividades asociadas a la ejecución del proyecto:

Personal de Apoyo	Horas de dedicación	Meses de dedicación	Remuneración / Honorarios
-------------------	---------------------	---------------------	---------------------------

	Semana	Mes	Año 1	Año 2	Año 3	m(\$)
Personal 1	20	80	3			855,0
Personal 2						

Describa aquí las labores de cada personal de apoyo:

Personal 1- Tareas:	Preparación de muestras, pesaje de reactivos, preparación de soluciones, asegurar la trazabilidad de los materiales utilizados, y limpieza de material.
Personal 2- Tareas:	

3.4.- BECAS PARA TESISISTAS/ MEMORISTAS:

Informe las tesis de pre y postgrado que pretende financiar a través del proyecto.

	Número de tesisistas a formar, justificar solicitud
Año 1	1 tesisista de pregrado que desempeñe funciones técnicas
Año 2	
Año 3	

3.5.- GASTOS DE OPERACIÓN:

En este ítem deberá solicitar y justificar los recursos solicitados para viajes del proyecto, viajes de cooperación internacional y gastos de operación en general.

3.6.- GASTOS DE OPERACIÓN - VIAJES PARA EL PROYECTO:

Se financian viajes sólo para actividades directamente relacionadas con la ejecución del proyecto, presentación de sus resultados y difusión a la sociedad. Solo se aceptarán pasajes aéreos en **clase económica**.

Revise la tabla de valores referenciales de pasajes y viáticos disponible en la página web del concurso.

3.7.- VIAJES AL EXTRANJERO: Por concepto de reuniones científicas o congresos se financia como máximo un viaje por año.

	Pasajes m(\$)	Viáticos m(\$)	Destino	Nº Días	Propósito del viaje
Año 1					
Año 2					
Año 3					

VIAJES NACIONALES:

	Pasajes m(\$)	Viáticos m(\$)	Destino	Nº Días	Propósito del viaje
Año 1					
Año 2					
Año 3					

3.8.- GASTOS DE OPERACIÓN - VIAJES COOPERACIÓN INTERNACIONAL:

La cooperación internacional se entiende como el viaje que realiza a Chile, un(a) especialista residente en el extranjero, para participar en actividades científicas relacionadas directamente con la investigación.

En esta sección justifique su solicitud de recursos para desarrollar actividades de cooperación internacional en Chile. Sólo puede solicitar cooperación internacional para un máximo de dos años de ejecución del proyecto independiente de la duración de éste.

Pasajes m(\$)	Viáticos m(\$)	Procedencia invitado(a)	Nº días	Descripción del(de la) invitado(a) y propósito de la estadía

Año 1					
Año 2					
Año 3					

3.9.- GASTOS DE OPERACIÓN GENERAL:

En la siguiente tabla, indique el **costo anual estimado** de uno o más subítem necesarios para una exitosa ejecución del proyecto. Justifique detalladamente la solicitud de recursos en cada subítem.

Importante:

- Consulte las Bases Concurso de Proyectos FONDECYT de Iniciación en Investigación 2020, respecto a los gastos que puede realizar con cargo al proyecto.
- Equipos deben ser solicitados en el ítem equipamiento, de lo contrario no serán aprobados.

Subítem	Fundamente solicitud	Año 1 m(\$)	Año 2 m(\$)	Año 3 m(\$)
Materiales	* Para desarrollar las PCR múltiple, desde la extracción de ADN hasta su visualización, se requerirá de: Mag-MK Bacterial Genomic DNA Extraction Kit Solución de MgCl₂ Taq Buffer Taq ADN polimerasa Caldo tripticasa ADNasa TURBO™ RNasa A Caldo LB Primers que deben ser pedidos	2966		

	a medida para amplificar Oxa-23, Oxa-24/40, Oxa-51, Oxa-58 y Oxa-143 Buffer TAE Agarosa * Luego, para la extracción de ADN previa a la secuenciación se necesitará un kit de extracción, como: ChargeSwitch™ gDNA Mini Bacteria Kit * Durante todos estos procesos se usarán utensilios como: Micropipeta de volumen variable (0.5-10uL) y respectivas puntas Micropipeta de volumen variable (100-1000uL) y respectivas puntas Tubos eppendorf 0,5mL			
Capacitaciones				
Inscripción seminarios, congresos, talleres, etc.				
Publicaciones, Propiedad Intelectual e Industrial				
Material bibliográfico y suscripciones				
Gastos en difusión				
Softwares				
Costos de garantías de boletas, pólizas y pagarés				
Reparación y arriendo de equipos				

Movilizaciones y traslados				
Atención de reuniones				
Otros gastos de operación	La secuenciación de cada cepa por ambas plataformas cuesta alrededor de 280 m pesos chilenos (se harán 20). El envío calculado por FedEx sale alrededor de 180 m.	5900		
TOTAL:		8866		

3.10.- EQUIPAMIENTO:

Justifique la necesidad de contar con los equipos solicitados en relación a los objetivos y/o metodologías propuestas. Describa las características técnicas de cada uno de ellos.
Incluya en este ítem: Tablet, Impresora, Notebook, Computador, entre otros.

Se sugiere incorporar en la sección Anexos- Otros documentos, cotizaciones para equipos cuyas características son muy específicas.

No se podrá solicitar la adquisición de equipamiento en el último año de ejecución de los proyectos.

	Nombre Equipamiento	Costo m(\$)(*)	Fundamente solicitud
Año 1	Notebook	419,99	Se requerirá para todo el proceso de análisis de los genomas bactrianos.
	Termociclador	7377,0	Es necesario para hacer las PCR
	Cámara de electroforesis	1697,81	Las cuales son indispensables para evaluar los resultados de amplificación de las PCR
	Refrigerador	400,0	Necesario para almacenamiento de muestras
Año 2			
Año 3			

(*) El monto solicitado debe incluir los gastos de importación, adecuación de espacios físicos, instalación y puesta en marcha, mantención, garantías y seguros.

3.11.- INFRAESTRUCTURA Y MOBILIARIO:

En la siguiente tabla indique el **costo anual estimado** que solicita para cada uno de los subítem, necesarios para una exitosa ejecución del proyecto.

Subítem	Fundamente solicitud	Año 1 m(\$)	Año 2 m(\$)	Año 3 m(\$)
Acondicionamiento de espacios físicos	Mini cámaras de PCR	4197,194		
Mobiliario	Escritorio	200,00		
Total:				

10.- RECURSOS DISPONIBLES:

Incluya en esta sección todos los recursos de equipamiento, infraestructura y de colaboración que dispone para ejecutar adecuadamente su propuesta (utilizar formato tamaño carta, fuente Verdana tamaño 10 o similar).

- 1 Cámara de Bioseguridad nivel II Thermo Fisher™
- Mechero Bunsen
- 2 Microscopios ópticos
- 1 Incubadora con agitación
- 1 Agitador tipo vortex
- 4 Refrigeradores
- 2 Ultrafreezers -80°C
- 2 Termocicladores con gradiente de temperatura Applied Biosystem™
- Espectrofotómetro lector de microplacas Take3™
- 1 Celda de electroforesis horizontal