



## **Caracterización molecular de bacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido aisladas de queso fresco regional**

**Modalidad: Continuación**

**Responsable Técnico:** Dr. Rafael Jiménez Mejía\*

### **Participantes:**

M. en C. Luis Enrique Flores Pantoja (Técnico Académico) \*

María Fernanda Vivas García (Tesisista)\*

\*Genómica Alimentaria, Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, Avenida Universidad No. 3000, Colonia Lomas de la Universidad, C.P. 59103, Sahuayo, Michoacán.

## Introducción

La leche y queso son productos muy importantes en la dieta del hombre, este último se elabora desde hace siglos a partir de leche de diversos mamíferos y actualmente debido a su tradición y características tanto sensoriales como nutritivas tiene buena aceptación entre la población. En particular, el queso fresco artesanal mexicano es elaborado de leche cruda de vaca principalmente, se vende al público en los mercados y tianguis a lo largo y ancho del país, es un producto muy conocido dentro de la gama de productos lácteos. Muchos productores de queso fresco en México, utilizan leche sin pasteurizar debido a que se tiene la creencia de que la microbiota nativa de la leche confiere aromas y sabores agradables al producto final (de la Rosa-Hernández *et al.*, 2018). Sin embargo, por la cantidad de nutrientes, humedad, entre otras características, el queso fresco es un excelente medio de cultivo para diversos microorganismos tanto benéficos como patógenos de humanos. Por lo cual, frecuentemente se le ha asociado con brotes de infecciones e intoxicaciones alimentarias (Reséndiz *et al.*, 2012).

En este sentido, Las infecciones transmitidas por alimentos son uno de los principales problemas de salud pública a nivel global. Por ejemplo, en el 2013, en USA se registraron 818 brotes de infecciones asociadas con alimentos, de los cuales se registraron 13360 infecciones las cuales derivaron 16 muertes. En el 10% de esos brotes se asociaron productos de origen bovino. En este sentido, en ese mismo país entre 1998 y 2011 se registraron 90 brotes de infecciones por el consumo de queso, de las cuales 39% se asociaron a queso elaborado con leche sin pasteurizar y de éstos últimos casi la mitad se derivaron de queso importado de México (Guzman-Hernandez *et al.*, 2016). De forma particular, en nuestro país de forma oficial se han reportado muy pocos brotes de infecciones asociadas con queso, lo cual puede deberse principalmente a que en México no existe un sistema para la vigilancia de las infecciones transmitidas por alimentos. Sin embargo, si hay reportes en algunos estudios científicos, tal es el caso del realizado en 1993, en el cual de forma retrospectiva se estudiaron 58 brotes reportados, de los cuales 29% fueron asociados al consumo de queso (Guzman-Hernandez *et al.*, 2016).

Por otro lado, de particular preocupación en la cadena de producción de alimentos de origen animal, es la frecuencia con que se presentan bacterias patógenas resistentes a los antibióticos como *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *E. coli* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE). Generalmente esas bacterias se han asociado con ambientes clínicos, sin embargo en años recientes ha incrementado su detección en bacterias presentes en alimentos, tal es caso de *E. coli* productora de BLEE en queso elaborado con leche sin pasteurizar. Lo cual representa riesgos a la población que consume ese tipo de productos.

### **Antecedentes**

La leche es un alimento complejo que contiene los nutrientes vitales para el desarrollo de los mamíferos jóvenes. A nivel mundial la industria láctea es muy importante económicamente hablando, dentro de ésta, la quesera es una de las más grandes. Además, tanto la leche como el queso son alimentos ampliamente distribuidos y consumidos por sus las características nutritivas, funcionales, de textura y sensoriales. Para el caso particular de México, la industria quesera representa la segunda en importancia dentro de la industria láctea, solo por debajo de la dedicada al envasado de leche (González-Montiel & Franco-Fernández, 2015). De acuerdo a las estadísticas oficiales, en el 2017 la producción nacional de leche fue de cerca de 12 mil millones de litros, de los cuales un porcentaje importante se destinó a la elaboración de queso, con una producción anual estimada en 361020 toneladas, siendo el 17.4% (61373.4 ton) de queso fresco (SIAP, 2017). En nuestro país predomina el consumo de distintas variedades de queso fresco, muchos de ellos elaborados con técnicas artesanales. Los cuales por su formulación, proceso de elaboración y almacenamiento, presentan características organolépticas y contenido de microorganismos particulares (González Montiel & Franco-Fernández, 2015). El queso fresco por su origen y características (nutrientes, humedad etc.) contiene un gran número de microorganismos patógenos de humanos, por lo que frecuentemente se les asocia con brotes de infecciones e intoxicaciones alimentarias (Reséndiz et al., 2012).

Entre las bacterias que representan riesgos a la salud pública y que se encuentran con frecuencia en leche y queso fresco se pueden mencionar a *E. coli* y sus variantes patógenas, que habitan en el intestino de humanos y animales, siendo el ganado bovino un portador natural. Además, de que son causa frecuente de mastitis bovina (Jiménez-Mejía et al., 2017).

De acuerdo con lo anterior, en México el estudio de quesos frescos artesanales de diferentes regiones ha revelado la presencia de bacterias potencialmente patógenas. En el análisis de las instalaciones de elaboración de quesos, así como de muestras de queso fresco se encontró que las bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales, *Salmonella* y *S. aureus* superaron los límites permisibles por las normas mexicanas (Sánchez-Valdéz et al., 2016; Ortiz-Hernández et al., 2016; Romero-Castillo et al., 2009; Solís-Méndez et al., 2013).

Aunado a lo anterior, los productos de origen animal se han visto implicados en la evolución y diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos, lo cual constituye un serio problema de salud pública a nivel mundial. Lo cual es debido al amplio uso de antibióticos para la prevención de enfermedades y la promoción de crecimiento en animales. Práctica que generalmente se realiza utilizando dosis bajas de los antibióticos por periodos prolongados, esto sirve como presión selectiva para la evolución de bacterias resistentes a los antimicrobianos (Maron et al., 2013).

De tal forma que la resistencia a antibióticos es uno de los principales retos en la medicina moderna, dado que las bacterias presentan resistencia a los principales grupos de antimicrobianos utilizados en la práctica médica, como es la producción de beta-lactamansas de espectro extendido (BLEE). Las BLEE son un grupo de enzimas que confieren resistencia a antibióticos beta-lactámicos como penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, y aztreonam, frecuentemente se codifican en elementos genéticos móviles, como los plásmidos. Debido a la frecuencia en la movilidad de los genes codificantes de BLEE, en la última década se ha observado un incremento alarmante de infecciones por bacterias productoras de esas enzimas en distintas partes del mundo. Lo cual ha motivado en la comunidad científica el estudio de la frecuencia, movilidad y origen

de las bacterias productoras de BLEE. Derivado de ello se ha observado que una de las fuentes principales son los animales que se utilizan como alimentos, tal es el caso del ganado bovino y los productos que de esa especie derivan (Doi *et al.*, 2017).

### **Justificación**

En el estado de Michoacán, la principal cuenca lechera es la denominada Ciénega de Chapala, integrada por los municipios que forman el distrito de riego (DDR) Sahuayo, dos municipios del DDR Zamora y uno del DDR de la Piedad, en conjunto la cuenca contribuye con el 38% de la producción estatal de leche. De acuerdo a lo anterior en el 2017 en el estado se produjeron 344.3 millones de litros de leche de bovino, de la cual, aproximadamente el 55% se destinó a la producción de queso, del cual se produjeron 2 millones de toneladas aproximadamente. En ésta región el queso fresco elaborado con leche bronca sin pasteurizar en un productos que se elabora de forma artesanal y se expende en los mercados locales con buena aceptación por los consumidores. Sin embargo, algunos estudios han descrito que la calidad microbiológica de la leche en la región Ciénega de Chapala, Michoacán es deficiente, aunque, no hay mucha información (Zamora-Vega *et al.*, 2012). Por otro lado, la calidad microbiológica de la leche se ve impactada directamente por la salud del ganado. En este sentido estudios recientes indican que en la región hay alta prevalencia de mastitis bovina, siendo *S. aureus* y *E. coli* los principales patógenas asociados a la enfermedad, las cuales además presentan resistencia a diversos antibióticos (Jiménez-Mejía *et al.*, 2017; Sánchez-Ceja *et al.*, 2018). Frecuentemente esas bacterias son resistentes a los antibióticos, por lo que en caso de causar infecciones en humanos complica su tratamiento. Por lo anteriormente expuesto, es pertinente inicial el monitoreo en la región de bacterias productoras de BLEE en productos de origen animal, sobre todo de aquellos que no sufren ningún procesamiento antes de su consumo, como es el caso del queso fresco. Conocer la prevalencia y características de las bacterias contribuirá a conocer la calidad microbiológica e inocuidad de ese producto, de igual forma la información puede ser compartida

con los tomadores de decisiones para que se implementen buenas prácticas de higiene en la línea de producción y distribución del queso fresco regional. De igual forma permitirá estimar riesgos a los consumidores por el consumo de queso fresco.

### **Hipótesis**

Las bacterias aisladas de queso fresco artesanal regional representan una fuente de diseminación de genes de resistencia que codifican para beta-lactamasas de espectro extendido.

### **Objetivo general**

Determinar la frecuencia y tipo de beta-lactamasas de espectro extendido en bacterias aisladas de queso fresco regional, así como analizar la movilidad de los genes que las codifican.

### **Objetivos específicos**

- 1.- Determinar la frecuencia y tipo de beta-lactamasas de espectro extendido en bacterias obtenidas de queso.
- 2.- Determinar la resistencia bacteriana a los antibióticos y biocidas, así como la distribución de genes asociados.
- 3.- Identificar a nivel molecular las bacterias productoras de BLEE.
- 4.- Estudiar el contenido y diversidad de plásmidos asociados a la resistencia.

## **Materiales y métodos**

### **Colección bacteriana de estudio.**

De octubre del 2018 a junio del 2019 se recolectaron 60 muestras de queso fresco de los mercados municipales de Sahuayo y Jiquilpan. De las cuales, 45 fueron positivas a la presencia de bacterias posiblemente productoras de BLEE, a partir de esas muestras se obtuvo una colección de 60 bacterias, las cuales se estudiarán en este proyecto. Vale la pena indicar que la colección de bacterias sigue en aumento ya que se continúa la colecta y análisis de muestras de queso.

### **Confirmación de la producción de BLEE**

Primero se realizará la confirmación de la producción de BLEE por la colección bacteriana mediante la técnica de doble disco. Para lo cual 100 µl de diluciones bacteriana equivalentes a  $1 \times 10^8$  UFC/ml de cada bacteria se sembrarán uniformemente en la superficie de cajas Petri con agar Mueller-Hinton (DB Bioxón), posteriormente se colocaran discos con cefotaxima (30 µg) y cefotaxima/ácido clavulánico (30/10 µg), además de ceftazidima (30 µg) y ceftazidima/ácido clavulánico (30/10 µg). El aumento mayor a 5 mm en el diámetro del halo de inhibición en los discos con dos antibióticos se interpretará como resultado positivo (CLSI, 2015).

### **Determinación del tipo de BLEE**

A las bacterias que mediante ensayos de doble disco se haya confirmado la producción de BLEE, se analizará el tipo de gen codificante de la enzima mediante la detección por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para esto, se analizará la distribución de genes más comunes en enterobacterias como son *blaCMY*, *blaCTX-M*, *blaOXA*, *blaSHV* y *blaTEM* (Jiménez-Mejía *et al.*, 2017).

### **Determinación de los perfiles de resistencia a antibióticos y biocidas de las bacterias productoras de BLEE**

Las pruebas de susceptibilidad a antibióticos y desinfectantes se realizarán mediante ensayos de microdilución en placas de Elisa de 96 pozos de acuerdo a lo establecido (CLSI, 2015). Para realizar lo anterior las bacterias se sembrarán en 2 ml de caldo Mueller-Hinton (CMH) y se incubaron a 37 °C por 20 h. Posteriormente, se diluirán en el mismo medio hasta igualar la turbidez al tubo 0.5

de la escala de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/ml), de cada dilución se depositarán 100  $\mu$ L en cada pozo de la placa conteniendo 100  $\mu$ l de CMH con la concentración con una concentración específica de cada antibióticos a estudiar. Los antibióticos (Sigma-Aldrich) que se analizarán serán: ampicilina, gentamicina, tetraciclina, estreptomina, kanamicina, ciprofloxacina, carbenicilina, ceftazidima, cefotaxima, cloranfenicol, meropenem y cefixima las concentraciones probadas fueron de 0.125 a 1024  $\mu$ g/ml. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue aquella a la que no se observó crecimiento visible sobre la superficie del agar. Además, con los datos obtenidos las bacterias se clasificaron como resistentes o susceptibles de acuerdo a los puntos de corte establecidos (CLSI, 2015).

De igual forma que para los ensayos de resistencia a antibióticos, se determinará la CMI para los desinfectantes cloruro de benzalconio (Cb), triclosán (Tri), bromuro de cetiltrimetilamonio (Ctab), glutaraldehído (Gta) y digluconato de clorhexidina (Chx) (Sigma Aldrich), mediante microdilución en CMH (CLSI, 2015). Las concentraciones que se probaron fueron de 0.125 a 1024  $\mu$ g/ml. La CMI se determinó como aquella a la que no se observó crecimiento visible sobre la superficie del agar. Siguiendo los criterios descritos en la literatura, las bacterias se clasificaron como resistentes o susceptibles a esos compuestos (Morrissey *et al.*, 2014; Kampf, 2018).

### **Análisis de la frecuencia de genes de resistencia para antibióticos**

Se analizó la presencia de los genes de resistencia a estreptomina (*strA* y *strB*), tetraciclina (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* y *tetE*) y para fluoroquinolonas (*qnrA*, *qnrB* y *qnrS*) (Jiménez-Mejía *et al.*, 2017; Guillaume *et al.*, 2000).

### **Identificación molecular de las bacterias productoras de ESBL**

La identidad de las bacterias se confirmó a nivel molecular mediante la amplificación por PCR del fragmento ITS (16S–23S rDNA internal transcribed spacer) específico de *K. pneumoniae* con los oligonucleótidos Pf y Pr1 y en las condiciones previamente descritas por Liu *et al.* (2008).

La identidad de los aislados de posibles *E. coli* se confirmará mediante la amplificación por PCR de fragmentos de los genes *uidA* y *lacZ* con los



oligonucleótidos y las condiciones de amplificación se realizarán de acuerdo a la metodología descrita en la literatura (Jiménez-Mejía et al., 2017).

### **Determinación del contenido y diversidad de plásmidos**

Para estimar la cantidad y diversidad de plásmidos en las bacterias, se determinará el perfil en cada una de las bacterias productoras de BLEE de acuerdo a la metodología descrita en la literatura (Kado & Liu, 1981). El tamaño de los plásmidos se determinará con moléculas de tamaño conocido.

El análisis de la diversidad de los plásmidos se realizará mediante digestión de esos elementos con las enzimas de restricción NotI, HincII o PstI. Los fragmentos de ADN resultantes se separarán en geles de agarosa al 1.5 %. La relación genética de los plásmidos se determinará de acuerdo a los patrones de bandas obtenidos, los cuales se analizarán con software de acceso libre GelJ.

### **Referencias**

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth. M100-S25. Wayne, PA.

de la Rosa-Hernández, M. C., Cadena-Ramírez, A., Téllez-Jurado, A., Gomez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Chávez-Urbiola, E. A., & Castro-Rosas, J. (2018). Presence of multidrug-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Enteropathogenic *Escherichia coli*, and enterotoxigenic *Escherichia coli* on fresh cheeses from local retail markets in Mexico. *Journal of food protection*, 81(11), 1748-1754.

Doi, Y., Lovleva, A., & Bonomo, R. A. (2017). The ecology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the developed world. *Journal of Travel Medicine*, 24(suppl. 1), S44-S51.

González-Montiel, L., & Franco-Fernández, M. J. (2015). Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña/Microbiological profile of aro cheese consumed in Oaxaca, Mexico. *Brazilian Journal of Food Technology*, 18(3), 250.

Guzman-Hernandez, R., Contreras-Rodriguez, A., Hernandez-Velez, R., Perez-Martinez, I., Lopez-Merino, A., Zaidi, M. B., & Estrada-Garcia, T. (2016). Mexican

unpasteurised fresh cheeses are contaminated with *Salmonella* spp., non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* and potential uropathogenic *E. coli* strains: A public health risk. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 10-16.

Jiménez-Mejía, R., Gudiño Sosa, L. F., Aguilar López, J. A., & Loeza Lara, P. D. (2017). Caracterización molecular de *Escherichia coli* resistente a antibióticos aislada de mastitis bovina en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(4), 387-396.

Kado, C. A., & Liu, S. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology*, 145(3), 1365-1373.

Kampf, G. (2018). *Antiseptic stewardship*. First edition. Springer. Basel.

Liu, Y., Liu, C., Zheng, W., Zhang, X., Yu, J., Gao, Q., Hou, Y. & Huang, X. (2008). PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S–23S internal transcribed spacer. *International Journal of Food Microbiology*. 125(3), 230-235.

Maron, D. F., Smith, T. J., & Nachman, K. E. (2013). Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Globalization and Health*, 9(1), 48.

Morrissey, I., Oggioni, M.R., Knight, D., Curiao, T., Coque, T., Kalkanci, A. & Martínez, J.R. (2014). Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms. *PLoS One*. 9(1), e86669.

Ortíz-Hernández, M., Jiménez-Vera, R., del Carmen Ara-Chan, S., González-Cortés, N., Alejo-Martínez, K., Perera-García, M. A., & López, E. L. (2016). Calidad Sanitaria del Queso Crema Elaborado Artesanalmente en Tenosique, Tabasco. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(2), 1-11.

Reséndiz, M. R., Hernández, Z. J. S., Ramírez, H. R., & Pérez, A. R. (2012). El queso fresco artesanal de la canasta básica y su calidad sanitaria en Tuzupán, México. *Acta Iberoamericana de Conservación Animal*, 2, 253-255.

Romero-Castillo, P. A., Leyva-Ruelas, G., Cruz-Castillo, J. G., & Santos-Moreno, A. (2009). Evaluación de la calidad sanitaria de queso crema tropical mexicano de

la región de Tonalá, Chiapas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 8(1), 111-119.

Sánchez-Ceja, M., Arceo-Martínez, Ma., T., Sandoval-Flores, Ma., G., Alva Murillo, P. N., Jiménez-Mejía, R., & Loeza-Lara, P. D. (2018). Uso de nisina y quitosano para la inhibición de *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos y asociado a mastitis bovina- *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(4), 792-810.

Sánchez-Valdés, J. J., Colín-Navarro, V., López-González, F., Avilés-Nova, F., Castelán-Ortega, O. A., & Estrada-Flores, J. G. (2016). Diagnóstico de la calidad sanitaria en las queserías artesanales del municipio de Zacazonapan, Estado de México. *Salud Pública de México*, 58, 461-467.

Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2017). Panorama de la leche en México. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Ciudad de México, México.

Solís Méndez, A., Martínez Loperena, R., Solorio Sánchez, J., Estrada Flores, J., Avilés Nova, F., Gutiérrez Ibáñez, A., & Castelán Ortega, O. (2013). Características del queso Tepeque de la tierra caliente de Michoacán: un queso producido en un sistema silvopastoril intensivo. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16(2), 201-214.

Zamora-Vega, R., Flores, H. E. M., Soto, J. L. M., Silva, U. H., & Sánchez, R. E. P. (2013). Estudio microbiológico de queso fresco adicionado con el probiótico *Saccharomyces boulardii*. *Biológicas*, 14(2), 37-41.

## Calendario de trabajo

Actividad	Justificación	Tipo de gasto	Monto	Participante	Inicio	Duración
Determinar la frecuencia y tipo de beta-lactamasas de espectro extendido en bacterias obtenidas de queso	Se cuenta con una colección bacteriana aislada de queso fresco de la región y que presuntamente son productoras de BLEE. Por lo tanto, se requiere la confirmación de ese fenotipo, así como la confirmación molecular de la presencia de genes que codifican esas enzimas. Para lo cual se requiere la compra de discos impregnados con antibióticos, cajas Petri desechables y sistemas comerciales para la amplificación de fragmentos de ADN. Lo anterior dado que ya se cuenta con otros materiales requeridos para completar la actividad.	Corriente	13700	Dr. Rafael Jiménez Mejía/ Estudiante	2 septiembre 2019	1 mes
Determinar la resistencia bacteriana a los antibióticos y biocidas, así como la distribución de genes asociados.	Uno de los problemas a nivel global es la resistencia a antibióticos en bacterias ambientales y patógenas, por lo cual uno de los objetivos del proyecto es monitorear la frecuencia de resistencia a distintos tipos de antibióticos y biocidas en las bacterias productoras de BLEE, así como la distribución de genes asociados a esos fenotipos. Dado que ya se cuenta con algunos materiales y reactivos, para el desarrollo de la actividad, se considera la compra de antibióticos grado reactivo en polvo, biocidas, oligonucleótidos y materiales complementarios.	Corriente	10100	Dr. Rafael Jiménez Mejía/ Estudiante	1 octubre del 2019	1 mes
Identificar a nivel	Conocer la identidad de las bacterias	Corriente	3700	M. C. Enrique	4 de	1 mes

molecular las bacterias productoras de BLEE	productoras de BLEE es muy importante para tratar de determinar la vía de contaminación del queso. Para esto se cuenta con diversos materiales y reactivos. Pero se requiere la compra de sistemas comerciales para la amplificación de fragmentos de DNA.			Flores Pantoja/Estudiante	noviembre del 2019	
Determinación del contenido y diversidad de plásmidos	Los plásmidos son elementos genéticos móviles que tienen gran importancia en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos. Para determinar las bacterias productoras de BLEE tienen plásmidos y si los genes codificadores de BLEE se localizan en ellos se cuenta con la mayoría de materiales y reactivos necesarios. Solo se solicita la adquisición de las enzimas de restricción como son HincII, PstI, NotI.	Corriente	4500	Dr. Rafael Jiménez Mejía	2 de diciembre	2 meses
Beca	El monto solicitado será para una beca a una estudiante de licenciatura que participará en el proyecto y del cual derivará su tesis para titulación.	Corriente	8000	Estudiante	2 de septiembre del 2019	4 meses

Planeación de gastos

Actividad	Justificación	Gasto corriente/ Monto	Materiales
<p>Determinar la frecuencia y tipo de beta-lactamasas de espectro extendido en bacterias obtenidas de queso</p>	<p>El monto solicitado se requiere para la compra de los materiales y reactivos básicos de laboratorio que se mencionan, lo que permitan el desarrollo de la actividad y que servirán también para el desarrollo de las otras actividades de este proyecto. También se requiere para cubrir gastos de traslado para la colecta de muestras.</p>	4000	2 caja con 576 cajas Petri estériles de 90 x 15 mm, SyM
		1500	1 paquete de 10 cartuchos con 50 discos de cefotaxima (30 µg) cada uno
		1500	1 paquete de 10 cartuchos con 50 discos de ceftazidima (30 µg) cada uno
		1500	1 paquete de 10 cartuchos con 50 discos de cefotaxima (30 µg) y ácido clavulánico (10 µg) cada uno
		1500	1 paquete de 10 cartuchos con 50 discos de ceftazidima (30 µg) y ácido clavulánico (10 µg) cada uno
		3700	2 Go Taq Green master Mix para 100 reacciones cada uno, M7122, Promega.
<p>Determinar la resistencia bacteriana a los antibióticos y biocidas, así como la distribución de genes asociados.</p>	<p>Para el desarrollo de esta actividad de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas de queso, por lo cual uno de los objetivos del proyecto es monitorear la frecuencia de resistencia a distintos tipos de antibióticos y biocidas en las bacterias productoras de BLEE, así</p>	3000	Frasco de colistin grado reactivo de 1 gr, PHR1605, Sigma
		1500	Frasco de fosfomicin grado reactivo de 1 gr, P5396, Sigma
		2000	Frasco de azithromycin grado reactivo de 1 gr, PHR1088, Sigma

	como la distribución de genes asociados a esos fenotipos. Dado que ya se cuenta con algunos materiales y reactivos, para el desarrollo de la actividad, se considera la compra de antibióticos grado reactivo en polvo, biocidas, oligonucleótidos y materiales complementarios.	1300	1 caja con 50 placas de Elisa de poliestireno de 96 pozos de fondo plano de empaque individual, KART2620, Kartell
		1000	1 cajas con 50 piezas de tapas para caja de Elisa de poliestireno de empaque individual, KART2623
		1300	1 sistema de amplificación de ADN GoTaq Green master Mix para 100 reacciones, M7122, Promega.
Identificación molecular de las bacterias productoras de ESBL	El monto solicitado se requiere para la compra de los reactivos necesarios para la identificación moléculas de los principales grupos de patógenos que se buscan en el proyecto. Ya se cuenta con reactivos y materiales extra que se requieren.	3700	2 Go Taq Green master Mix para 100 reacciones cada uno, M7122, Promega.
Determinación del contenido y diversidad de plásmidos	Con el monto solicitado se requiere para la adquisición de los reactivos y materiales solicitados se utilizarán para el análisis del contenido y diversidad de plásmidos de resistencia a antibióticos de las bacterias aisladas a partir de muestras de queso.	1400	Tubo con 200 U de enzima de restricción HincII, R6031, Promega
		1600	Tubo con 3000 U de enzima de restricción PstI, R6111, Promega
		1500	Tubo con 200 U de enzima de restricción NotI, R6431, Promega
Beca	El monto solicitado se destinará como beca de apoyo a un estudiante que participará en el proyecto y desarrollará su trabajo de titulación en la modalidad de tesis.	8000	Beca para 1 estudiante que desarrollará su tesis derivado del proyecto, 2000 pesos mensuales por 4 meses

### **Propuesta de evaluación de resultados**

Se propone que la evaluación de los resultados se realice mediante la entrega de un informe final a Secretaría Académica o al Consejo Académico General, en el cual se plasmen los resultados obtenidos hasta la fecha establecida en la convocatoria. Además, se sugiere que a nivel institucional se realice un foro abierto en el que los investigadores responsables de proyectos expongan los resultados obtenidos en una presentación oral y los estudiantes participantes en el proyecto presenten los resultados de su participación en un poster.

### **Propuesta de indicadores de impacto social**

Formación de personal en el área: Número de alumnos que se titules derivado del proyecto

Difusión del conocimiento a la sociedad: Número de artículos, resúmenes, pláticas o informes técnicos en los que se plasmen los hallazgos del proyecto.