



***MEJORAMIENTO DEL CEPARIO DE LA UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR
DE CUNDINAMARCA MEDIANTE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DE LA COLECCIÓN DE CEPAS GRAM NEGATIVAS***

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO TRABAJO DE
GRADO
BOGOTA D.C.
2018- I**



***MEJORAMIENTO DEL CEPARIO DE LA UNIVERSIDAD COLEGIO
MAYOR DE CUNDINAMARCA MEDIANTE LA CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DE LA COLECCIÓN DE CEPAS GRAM NEGATIVAS***

LAURA CAROLINA GUZMÁN

ARIAS DIEGO ALEJANDRO

MORENO MUÑOZ

Mg. LIGIA CONSUELO SÁNCHEZ LEAL

Asesora

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO TRABAJO DE GRADO**

BOGOTA D.C.

2018- I

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo a Dios, por guiarnos en cada paso, por darnos fortaleza, disciplina, entendimiento y sabiduría para alcanzar nuestras metas.

A nuestras familias, por ser fuentes de inspiración, amor y apoyo incondicional.

A nuestro amigos y docentes, en especial a la memoria de Laura Marulanda, quien nos demostró que los sueños se cumplen, que siempre habrá una esperanza, y que las ganas de alcanzar nuestros sueños, son más grandes que cualquier obstáculo, a pesar de que aún no estás con nosotros, te dedicamos esta tesis a ti, y todos los esfuerzos que hemos hecho para desarrollarla, pues, bien sabemos que si hubieras tenido la oportunidad de hacer tu trabajo de grado, lo habrías hecho con el mismo amor y pasión con la que nosotros hicimos este proyecto.

“Sólo hay dos días en el año en que nada se puede hacer. Uno se llama Ayer y el otro se llama Mañana. Hoy es el día adecuado para Amar, crecer, y sobre todo vivir”.

Dalai Lama

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecemos a las maestras Ligia Consuelo Sánchez y Martha Lucia Posada, de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por brindarnos esta valiosa oportunidad y abrirnos las puertas del Cepario, y por su constante orientación durante la realización y culminación de este importante proceso, indudablemente su paciencia, confianza y el completo conocimiento académico que nos brindaron, fueron los pilares que nos llevaron a desarrollar este proyecto.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por nuestra formación académica y por hacernos partícipes de la investigación, dándonos a nuestra disposición sus instalaciones, recursos económicos y humanos para hacer posible la ejecución de este proyecto.

Al grupo de investigación Ceparium de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por enriquecer nuestros conocimientos y brindarnos los espacios para la realización del proceso experimental, ofreciéndonos la oportunidad de contribuir a sus investigaciones.

Finalmente, nuestros más sinceros agradecimientos a nuestras familias, amigos y todos aquellos que de una u otra forma contribuyeron a la culminación de este proyecto.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	5
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
1. ANTECEDENTES	6
2. MARCO REFERENCIAL	12
2.1 Generalidades de los bancos de cepas a nivel mundial	12
2.3. Historia, estructura, documentación y registro de la Colección de Microorganismos de la UCMC	17
2.4. Generalidades de las bacterias Gram negativas en estudio	21
2.4.1 Familia <i>Enterobacteriaceae</i>.	21
<i>Escherichia coli</i>	22
<i>Shigella</i> spp.	22
<i>Salmonella</i> spp.	22
<i>Citrobacter</i> spp.	23
<i>Enterobacter</i> spp.	24
<i>Klebsiella</i> spp.	24
<i>Providencia</i> y <i>Morganella</i> spp.	24
<i>Pantoea</i> spp.	25
<i>Hafnia</i> spp.	25
<i>Proteus</i> spp.	25
<i>Yersinia</i> spp.	26
2.4.2 Familia <i>Pseudomonadaceae</i>.	26
<i>Pseudomona</i> spp.	26
<i>Burkholderia</i> spp.	27
<i>Xantomonas</i> spp.	27
<i>Stenotrophomona</i> spp.	28
<i>Acinetobacter</i> spp.	28
2.4.3 Familia <i>Vibrionaceae</i>	29
<i>Vibrio</i> spp.	29
<i>Aeromonas</i> spp.	29
<i>Plesiomonas</i> spp.	30

2.3. Técnicas Fenotípicas de identificación de los microorganismos en estudio	30
2.3.1 Características microscópicas.	31
2.3.2 Características macroscópicas.	31
2.3.3. Identificación por pruebas bioquímicas.	33
2. 4 Técnicas de caracterización molecular, historia, avances y desarrollo.	38
2.4.1. Conformación molecular bacteriana.	38
2.4.2. Características del gen 16 S.	39
2.4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa - PCR.	40
Extracción de DNA.	41
Electroforesis.	42
Secuenciación.	43
Secuenciación mediante Sanger.	43
Aspectos de la identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S.	44
Bases de datos y estrategias de análisis.	44
Bases de datos generales	45
3. DISEÑO METODOLÓGICO	47
3.1 Tipo de investigación	47
3.2 Universo, población, muestra	47
3.3. Hipótesis, variables, indicadores	47
3.4. Técnicas y procedimientos	48
4. RESULTADOS	56
5. DISCUSIÓN	78
6. CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFIA	85
Anexos	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Formato hojas de vida identificación de las bacterias almacenadas en la Colección de microorganismos de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.	20
Figura 2 Regiones conservadas e hipervariables de un gen 16S rRNA. (3)	40
Figura 3 Técnica de secuenciación mediante el método de Sanger (67).	43
Figura 4 Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S (68).	44
Figura 5 Crecimiento exponencial del número de secuencias ARNr 16S registradas en el GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) de los Estados Unidos (70).	46
Figura 6 Esquematización de panel de reacciones fermentativas para identificación de bacterias Gram Negativas. (71)	51
Figura 7 Representación esquemática de perfiles bioquímicos de positividad y negatividad para bacterias Gram negativas Autores Guzmán y Moreno 2018	51
Figura 8 Representación de Columna Kit Zymo Research DNA (98)	53
Figura 9 Rango de cobertura del marcador de peso molecular Hyperladder II (73)	55
Figura 10 Representación electroferograma secuencia bacteriana Autores Guzmán y Moreno 2018.	55
Figura 11 Características microscópicas y macroscópicas de las bacterias en estudio. Autores. Guzmán y Moreno 2018.	62
Figura 12 Electroforesis bacteriana 1 Autores Guzmán y Moreno 2018	66
Figura 13 Electroforesis bacteriana 2 Autores Guzmán y Moreno 2018	67
Figura 14 Electroforesis bacteriana 3 Autores Guzmán y Moreno 2018	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Lista de colecciones registradas a nivel nacional ante el RNC (Registro Único Nacional de Colecciones Biológicas) (19).	12
Tabla 2 Master Mix para llevar a cabo la PCR volumen final de 50 microlitros	54
Tabla 3 Condiciones de PCR para la amplificación de la región 16S	54
Tabla 4 Porcentaje de identificación de sistema BBL Crystal 41 bacterias Gram Negativas	63
Tabla 5 Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas en las 41 cepas en estudio	65
Tabla 6 Comparación de 41 bacterias Gram negativas reconfirmadas por BBL Crystal y 26 bacterias Gram Negativas secuenciadas, editadas, comparadas y confirmadas con BBL Crystal y BLAST.	70



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**MEJORAMIENTO DEL CEPARIO DE LA UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR
DE CUNDINAMARCA MEDIANTE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DE LA COLECCIÓN DE CEPAS GRAM NEGATIVAS**

RESUMEN

Los métodos moleculares se han establecido como procedimientos que verifican la identificación fenotípica, cuando se necesita la identidad exacta de un microorganismo. La Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca cuenta con una colección de 97 bacterias, que reposan en el Laboratorio Central, todas ellas, manejadas de acuerdo con los protocolos internacionales y niveles de bioseguridad descritos por el CDC de Atlanta. Su identificación actualmente está suministrada por fenotipificación con pruebas bioquímicas por medio del Sistema rápido BBL Crystal. El objetivo de este proyecto fue fortalecer la colección de 41 cepas bacterianas Gram negativas, mediante la identificación molecular de las bacterias. La metodología utilizada fue la obtención de ADN total con el Kit: Zymo Research Quick-DNA Universal, la amplificación del producto de la extracción mediante PCR con evaluación por electroforesis en

gel de agarosa 2% con Buffer TAE 1X. El producto de PCR fue enviado al centro de investigación CorpoGen, donde fue secuenciado con los primers 16S-8F y 16S-1492R y su edición se realizó con el programa Chromas Lite (versión 2.6.5). Las secuencias editadas, fueron comparadas con las bases de datos pertenecientes al GenBank del NCBI (USA) con el algoritmo BLASTn, asumiendo una identidad significativa superior o igual al 97%. Los resultados obtenidos permitieron identificar molecularmente 17 bacterias, 6 de ellas hasta género, y 11 hasta especie. Las 9 bacterias restantes, arrojaron resultados erráticos. A futuro, se espera establecer una nueva base de datos para posterior registro de la Colección.

PALABRAS CLAVES: Cepario, bacterias Gram negativas, fenotipificación, ADN, PCR, secuenciación.

Estudiantes Laura Carolina Guzmán Arias

Diego Alejandro Moreno

Docentes Ligia Consuelo Sánchez Leal

Fecha 2018 – I

Institución UCMC

INTRODUCCIÓN

Con la invención de nuevas tecnologías moleculares, se logró clasificar a los organismos mediante características de las principales biomoléculas orgánicas, en particular de los ácidos nucleicos. Dichos análisis incluyen estudios de marcadores conservados en las bacterias; uno de los más representativos el gen 16S rRNA, que se mantiene constante a lo largo de los periodos de evolución, sin cambiar sus características, evitando la acción de mutaciones específicas en el gen y facilitando la realización de árboles filogenéticos y esquemas evolutivos (1). Estos avances han llevado a que países en desarrollo, dentro de sus políticas internas, diseñen tratados y legislaciones para la creación de centros de investigación, encargados de clasificar, identificar y registrar nuevas especies aisladas en diferentes tipos de ambientes, con el fin de recopilar toda la información necesaria para conocer y relacionar aspectos a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico (2).

La Colección de Cultivos de Microorganismos del Programa de Bacteriología de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca se creó en 1986 y se ha fortalecido en forma permanente por medio de la compra, donación y canje. Actualmente, cuenta con la identificación fenotípica de todas las cepas existentes en la Colección.

El principal problema que presenta esta colección, es la ausencia de registro ante el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander Von Humboldt", debido a que, no cuenta con la respectiva caracterización molecular.

De esta manera, el presente proyecto estuvo argumentado en organizar la información contenida en el Cepario, asociada a los especímenes que allí se encuentran, promoviendo la mejora del mismo con la identificación genotípica de la población Gram negativa. Con este trabajo se brindó un insumo que fortaleció y mejoró el Cepario, para que este pueda lograr el registro de la colección ante el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander Von Humboldt", lo que sugiere la oportunidad de prestar diversos servicios investigativos y provisión de microorganismos a la comunidad científica que los

requiera, e indirectamente la universidad se beneficiará nivel de calidad de educación.

En este proyecto se trabajó con la colección de microorganismos de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, específicamente con 41 bacterias Gram negativas. Las fases del desarrollo del proyecto, comprendieron: la confirmación de las características microscópicas utilizando la Coloración de Gram, macroscópicas con el cultivo de los microorganismos usando el agar MacConkey (agar selectivo y diferencial) y metabólicas, mediante el montaje de pruebas rápidas BBL Crystal y técnica tradicional con tubo. Para posteriormente realizar la identificación genética de 26 de estas bacterias mediante técnicas moleculares, usando el gen 16S rRNA (3), mediante extracción de ADN con el kit Zymo Research Quick-DNA universal, posterior amplificación del producto de la extracción mediante PCR convencional y su evaluación por electroforesis en gel de agarosa al 2% con Buffer TAE 1X, para finalmente secuenciar el producto de PCR, con la técnica de Sanger, editando su secuencia con el programa Chromas Lite y comparándola con el GenBank con el algoritmo BLASTn.

Los resultados que se obtuvieron permitieron identificar 41 cepas Gram negativas a nivel bioquímico, diferenciando características macro y microscópicas y 26 de ellas a nivel molecular. Cada una mostro un perfil genético único lo que permitió distinguir polimorfismos.

Finalmente el estudio demostró variabilidades metabólicas, sustentadas por la literatura y definió las características genéticas que permitieron diferenciar cepas de diferente origen que pertenecían a la misma especie y género.

El aporte más significativo que tuvo este estudio fue el reporte de nuevas especies que no habían sido descritas a nivel bioquímico y fueron identificadas a nivel genético.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Fortalecer los registros de la colección de microorganismos Gram negativos de la UCMC, mediante la identificación genotípica por técnicas moleculares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar el mantenimiento, cultivo, aislamiento y revalidación de la identidad bioquímica, de las cepas de microorganismos Gram negativos del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
- Confirmar los géneros y especies de los microorganismos en estudio, mediante técnicas moleculares.
- Generar el registro de las cepas evaluadas con el fin de contribuir al proceso de presentación de la colección biológica de acuerdo a las recomendaciones de la normatividad aplicable.
- Comprobar la trazabilidad de los métodos de conservación y el mantenimiento que se ha realizado a las cepas Gram negativas del Cepario de la universidad hasta la fecha.

1. ANTECEDENTES

J. Washington en 1976 (3), de la División de Productos Analytab de American Home Products, realizó los primeros ensayos para la identificación de enterobacterias utilizando Kits comerciales "Rapid I-D Sistem", analizando modelos de comportamiento bacteriano, metabolitos propios y procesos oxidoreductores que presentaban estas cepas, recogió muestras de pacientes clínicos, y los analizó con estos Kits. Para ese entonces los paneles de pruebas presentaban solo 12 analitos, entre los que se incluyen: oxidasa, B-D galactosidasa, Fenilalanina, indol, nitratos, VP, malonato, lisina, ornitina, ureasa hidrolisis de la esculina. Todas estas pruebas lograron la identificación de bacterias Enterobacterias con un 95% de certeza a diferencia de pruebas convencionales. Estas metodologías cobraron mayor importancia debido a la especificidad y reproducibilidad de sus resultados, a través del tiempo, y ante variedad de géneros.

En 1981, American MicroScan, introdujo el autoSCAN-3, un instrumento semiautomatizado que utilizaba microdilución en bandejas que contenían sustratos convencionales congelados para la identificación de cepas bacterianas. Una evaluación temprana, que incorporaba tanto *Enterobacteriaceae* y no fermentadores. Ellner y Myers en 1981 (4) informaron un acuerdo de 95,0% entre las identificaciones leídas y por métodos automatizados, garantizando así que las máquinas eran capaces de generar interpretaciones precisas de las reacciones en cada pocillo.

J. Jorgensen en 1983 (5) Comparó el método automatizado Vitek AMS para la identificación de *Enterobacteriaceae*, con dos métodos manuales: el Sistema de Identificación Micro y el procedimiento API 20E, usando 400 aislados clínicos frescos. Se compararon con los resultados tras 4 horas de incubación proporcionados por el Micro ID y los resultados de 5 horas proporcionados por API. El sistema Micro ID demostró ser el más rápido y preciso de los tres sistemas de ensayo, identificando correctamente 96,8% (387/400) de los aislados. El API 20E usando lecturas de 5 horas identificó 90,7% (363/400) de

los aislamientos, pero con una muy baja selectividad. El AMS identificó correctamente 88,8% (355/400) de los aislamientos después de 5 horas, y 95,0% (380/400) después de 8 horas de incubación. Mostrando así que el sistema Micro ID era el más apropiado para la identificación de enterobacterias.

B. Holmes en 1994 (6) probó la evolución de dos kits rápidos para la identificación de enterobacterias; el kit de identificación Rapid Stool y el Enteric Island Enteric / Nonfermenter, cada uno contenía alrededor de 30 pruebas para la identificación, se probaron 266 cepas, en el primer kit (Enteric/Nonfermenter ID) se logró la filiación de 36 taxones de la familia *Enterobacteriaceae* (188 cepas) 5 taxones fermentativos oxidasa positiva (26 cepas) y 10 taxones no fermentativos, estas mismas fueron comparadas con el kit (The Rapid Stool/Enteric ID) encontrando el 93% de las cepas identificadas correctamente, el 6% fueron no identificadas, y 1% restante fueron identificadas hasta género; comprobaron que ninguno de los Kits comerciales lograba la filogenia en un 100%. Esto, debido a que, siempre se presentaba un rango de disyunción entre los resultados, concluyendo así que el kit que mayor precisión presentaba era el de (Enteric/Nonfermenter ID).

A. Robinson en 1995 (7) realizó un estudio comparativo de tres sistemas de identificación de enterobacterias, (Crystal entérica / Nonfermenter (Crystal Becton Dickinson, Cockeysville, Md.), 20E API (API; bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, MO), y la tarjeta Vitek GNI (Vitek; bioMérieux Vitek), se llevó a cabo con 512 aislamientos clínicos de bacilos gram-negativos, entre ellos 381 miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y 131 bacilos entéricos. Con las pruebas, API, Crystal, y Vitek identificó correctamente a nivel de género y la especie 505 (98,6%), 489 (95,5%), y 494 (96,5%) de los 512 aislados, concluyendo que no hubo diferencias significativas entre los tres sistemas en su capacidad para identificar cualquiera de las cepas aisladas en el grupo ($P > 0,05$), pero ninguno podía identificar correctamente todos los géneros bacterianos probados en el ensayo, pues presentaban un nivel de desviación del 3% en identificación.

Leong y Greisen en 1994 (8) publicaron la estrategia de amplificar una secuencia presente en la mayoría de bacterias (región del genoma bacteriano que codifica la subunidad 16S del RNA ribosómico), mediante iniciadores universales o consenso. Este sistema permite la detección de un amplio espectro de bacterias, entre las que se incluyen los agentes bacterianos que causan meningitis con más frecuencia. La identificación posterior del microorganismo se efectúa por hibridación de los fragmentos amplificados, con sondas internas a la región amplificada, y específicas para cada microorganismo, marcadas con isótopos radiactivos o no radiactivos. A partir de este trabajo, han surgido escasas publicaciones para la detección de meningococo en LCR y con series muy reducidas.

Soumitesh en 2007 (9), argumenta que cada región del gen 16 rRNA contiene una considerable diversidad de secuencias entre diferentes bacterias. Ninguna región se puede diferenciar entre todas las bacterias; por lo tanto se requieren investigaciones que comparen las ventajas de cada región para los diferentes objetivos de diagnóstico. Soumitesh y su equipo de trabajo, caracterizaron 110 especies bacterianas diferentes, incluidos patógenos transmitidos por sangre, agentes seleccionados por el CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades) y microflora ambiental, usando las regiones hipervariables del gen 16S (V1-V8). Crearon dendrogramas (representación esquemática en forma de árbol) con segmentos cortos apropiados para la prueba de ADN y la PCR en tiempo real. Ellos encontraron que la región V1 era mejor diferenciada para *Staphylococcus aureus* y microorganismos coagulasa negativos, como los *Staphylococcus sp.* La región V2 y V3 fue la más adecuada para distinguir todas las especies bacterianas a nivel de género incluyendo las enterobacterias. La región V6 de 58 nucleótidos de longitud podría distinguir entre la mayoría de las especies bacterianas excepto las enterobacterias, V6 también fue importante, por ser capaz de diferenciar entre todos los agentes seleccionados definidos por el CDC (Centro de Control y Prevención de Enfermedades), incluido *Bacillus anthracis*. Todos estos estudios referentes al gen 16S rRNA son importantes para el diseño de sondas y cebadores específicos en ensayos moleculares con el fin de identificar bacterias patógenas para el ser humano.

Varios autores han analizado la posibilidad de estudios cortos de lectura para la clasificación del gen 16S, mediante los posibles efectos que puedan repercutir en la variación durante la lectura, la elección de la región y la profundidad del muestreo, como es el caso de Marcus J en 2009 (10).

Claesson MJ en 2010 (11) señala que tecnologías moleculares con un mayor rendimiento pueden identificar comunidades microbianas en entornos de difícil obtención, de una forma más precisa, ya que muchas veces las condiciones ambientales y los requerimientos del microorganismo dificultan su recuperación, con el perfil filogenético de lecturas de secuencias mucho más cortas con numerosos extremos emparejados. En estudios de secuenciación del gen 16S rRNA observaron varias longitudes de lectura, logrando así obtener lecturas con una mayor resolución, sin embargo, no lograron clasificar a nivel de género debido a su menor longitud y altas tasas de error.(12)

Caporaso en 2011 (13), comenta que las nuevas plataformas de secuenciación de segunda generación (la pirosecuenciación a gran escala - 454), fue la opción preferida en estudios iniciales ya que por su especificidad proporciona secuencias un poco más largas (500 pb), en comparación con otras plataformas. Sin embargo, la entrada al mercado de nuevas plataformas como (Illumina MiSEQ y HiSEQ), son mucho más atractivas ya que su longitud de lectura pasa de 100 pb en los sistemas tradicionales a 250 pb combinándolo con su producción más alta y mucho más económica. Aunque en el cambio de análisis de secuencias se está experimentando un cambio significativo en la deliberación de nuevas tecnologías, no se ha realizado una evaluación sistemática de estos diseños que utilizan este tipo de procesos.

En un estudio reciente, Werner et al, en 2012 (14), examino las virtudes de la secuencia por pares en comparación con las de un solo extremo, pero en lugar de discriminar sus lecturas para determinar una taxonomía, los autores agruparon los datos en unidades taxonómicas operacionales (OTU) y cálculos de índices de diversidad. Así fue como construyeron un árbol filogenético de estas OTU. Sin embargo, las limitaciones del tamaño de inserción no se han tenido en cuenta en varios estudios. Por ejemplo, Soerger et al en 2012 (15),

examinó recientemente combinaciones de cebadores que abarcaban toda la región del gen 16S rRNA, sin tener en cuenta que muchos de los productos después de la amplificación son mucho más largos que las recomendaciones generalmente aceptadas 500-1500 pb.

A pesar de ello, las investigaciones de Soerger et al (15), recopilaron miles de combinaciones posibles de cebador y longitud de lectura que ayudaron a discernir la elección de las regiones del gen 16S rRNA a secuenciar. Desafortunadamente sus estudios se centraron en la consulta que tenía en una contraparte aportada en las bases de datos con al menos un (97% de identidad). Como resultado no hay manera de constatar si los diseños experimentales estudiados por él, entraban en las categorías en el caso de especies nuevas, que son comunes encontrarlas en diferentes tipos de ambientes.

Orna Mizrahi en 2013 (16), comenta que son varios los aspectos por los que se elige el estudio de la biodiversidad microbiana, en relación con el estudio del gen 16S rRNA, ya que lo hace óptimo para las observaciones de estos microorganismos. Mencionando tres aspectos a favor, que lo hacen apropiado para estos estudios taxonómicos: el primero hace referencia a la presencia de éste durante toda la vida procariota, haciéndolo imprescindible para estos estudios. En segundo lugar menciona su alto grado de conservación que da como resultado tasas de mutación similares en todos los estadios evolutivos de estas especies y el tercero y más importante, es que el gen 16S rRNA posee tantas regiones conservadas que facilitan el diseño de cebadores de amplificación a través de taxones gracias a sus nueve regiones hipervariables (V1-V9).

Ruth Aquino en 2017 (17) caracterizó molecularmente bacterias patógenas en vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística, mediante el estudio del gen 16S rRNA, referenciándolo como el método Gold estándar en identificación de microorganismos, utilizando tecnologías de nueva generación como la Espectrometría de masas desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI TOF MS), es preferida ya que aumenta la rapidez

con que se identifica una especie microbiana (de 2 horas a 3 minutos). Este método además de reducir costos y materiales, se basa en reconocer las principales proteínas ribosómicas mediante ionización por radiación laser, para que finalmente esta información sea comparada con el espectro de una base de datos determinada (17).

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 Generalidades de los bancos de cepas a nivel mundial

Las colecciones de microorganismos se han establecido con el fin de crear un conjunto de cepas de importancia mundial y de proporcionarlas a los diversos países. Entre las colecciones que actualmente son mundialmente reconocidas, se encuentra: La Federación de Colecciones de Cultivos del Mundo (WFCC), la cual cuenta con 614 colecciones en 71 países; la Colección Americana de cultivos tipo (ATCC), con más de 18.000 cepas de bacterias en 750 géneros distintos y con 30.000 cepas de hongos filamentosos y levaduras, el Banco Nacional de Microorganismos (BNM), que reúne cepas nativas de rizobios, bacterias fotosintéticas, fitopatógenas, y otras aisladas del suelo, resultantes de distintos proyectos de investigación de importancia agronómica y ambiental, y finalmente, la Federación Japonesa de Colecciones de Cultivos (JFCC) que preserva 229.840 cultivos, entre hongos filamentosos, levaduras, actinomicetos, bacterias, virus y algas (18).

A nivel nacional, se han establecido variedad de colecciones, con el fin de brindar apoyo a nivel biológico y científico, frente a problemas en las áreas de la salud, agricultura y medio ambiente. Colombia cuenta con 23 colecciones de microorganismos con registro vigente en el país.

Tabla 1 Lista de colecciones registradas a nivel nacional ante el RNC (Registro Único Nacional de Colecciones Biológicas) (19).

LISTA DE COLECCIONES REGISTRADAS A NIVEL NACIONAL ANTE EL RNC (REGISTRO UNICO NACIONAL DE COLECCIONES BIOLOGICAS)			
Titular de la colección	Nombre de la colección – Acrónimo	Ubicación	Generalidades y características de la colección
Universidad Nacional de Colombia	Museo Micológico (MMUNM)	Antioquia – Medellín	Se encuentran depositados alrededor de 8000 especímenes de

			hongos fitoparásitos colectados en Colombia y otros países.
Universidad Nacional de Colombia	Banco de Cepas y Genes - Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia (IBUN)	Bogotá D.C	Alberga microorganismos solvento génicos y celulolíticos, cepas con uso agrícola, industrial, productoras de biopolímeros y patógenos tanto humanos como de plantas, y además conserva cepas de referencia
Corporación para el Desarrollo de la Biotecnología - Biotec	Colección de Microorganismos (CMCB)	Valle del Cauca – Palmira	Base de datos privada
Federación Nacional de Cafeteros - Centro Nacional de Investigaciones de Café - CENICAFÉ	Colección de Microorganismos de CENICAFÉ (CEN)	Caldas – Chinchiná	Se preservan hongos asociados a plagas y enfermedades de café y otros cultivos de la zona cafetera colombiana
Universidad del Valle	Parasitología – Univalle (UV-PAR)	Valle del cauca - Cali	Base de datos privada
Universidad del Valle	Cepario de Microorganismos y Hongos Filamentosos de la Universidad del Valle (CCMhf-UV)	Valle del cauca - Cali	Se encuentran bacterias ácido lácticas obtenidas de los intestinos de vertebrados e invertebrados acuáticos, y los hongos filamentosos han sido obtenidos de áreas manglarinas y costeras
Universidad del Valle	Hongos- Univalle (UV-MICO)	Valle del cauca - Cali	
Corporación para Investigaciones Biológicas -CIB	Microorganismos Corporación para Investigaciones	Antioquia – Medellín	Contiene hongos y bacterias que fueron aislados a partir de:

	Biológicas (Micro CIB)		Pacientes con infecciones por hongos, micobacterias tuberculosas y no tuberculosas (MNT), inmediaciones de plantas sin sintomatología aparente de enfermedades ubicadas en cultivos comerciales establecidos en Colombia..
Universidad de Antioquia	Colección de Tremátodos de la Universidad de Antioquia (CTUA)	Antioquia – Medellín	Base de datos privada
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica	Colección Nacional de Fitopatógenos (CNF)	Cundinamarca - Mosquera	Alberga variedad de hongos
Corporación Corpogen	Cepario Corpogen (CG)	Bogotá D.C	Cuenta primordialmente con bacterias de procedencias tras investigaciones propias, o donadas
Pontificia Universidad Javeriana	Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana (CMPUJ)	Bogotá D.C	Mantiene 506 microorganismos, de los cuales existen alrededor de (66) géneros y (203) especies de bacterias y (45) géneros y (38) especies de hongos
Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite	Colección de Microorganismos Asociados a la Palma de Aceite (MPA-CENIPALMA)	Bogotá D.C	Cuenta con variedad de hongos de diversas familias
Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano	Colección de Bacilos Esporulados Colombianos	Bogotá D.C	Base de datos privada

	(UJTL-CBEC)		
Universidad de la Sabana	Colección de microalgas de la universidad de la sabana (ALGUS)	Cundinamarca – Chía	Cuenta con especímenes, dentro de los cuales se encuentran los géneros: Chlorella, Scenedesmus, Closterium, Nitzschia, Chroomonas, Anabaena
Universidad EAFIT	Colección de bacterias aisladas de Musa sp. (EA CB)	Antioquia – Medellín	Colección de bacterias aeróbicas formadoras de endospora aisladas de la rizosfera y filosfera de plantas de banano y plátano del Urabá Antioqueño
Universidad del Magdalena	Colección de Microalgas Marinas (UMC-MA)	Magdalena – Santa Marta	Alberga cepas vivas de microorganismos fotoautótrofos obtenidos de colecciones extranjeras o de su aislamiento de cuerpos de agua nacionales
Universidad de Antioquia	Bioma Bacteriología (BIOMABAC)	Antioquia – La estrella	Cuenta con bacterias de importancia agrícola (biocontroladoras, biofertilizantes y fitopatógenas)
Corporación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas	Banco de cepas de Resistencia Bacteriana (GIIRA)	Valle del Cauca - Cali	Mantiene cepas de bacterias gram negativas portadoras de B-lactamasas y otros mecanismos de resistencia
Universidad Nacional de Colombia	Colección de microorganismos Grupo SABIO, Universidad Nacional de Colombia (UNC-SAB)	Antioquia – Medellín	Cuenta con alrededor de 180 especímenes, entre los que se encuentran bacterias, levaduras y hongos
Universidad Industrial de Santander	Cepario del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis	Santander – Bucaramanga	Alberga un total de 349 especímenes. A la fecha, esta colección cuenta con

	Ambiental de la UIS (Cepario-LMMA-UIS)		211 especímenes conservados e identificados, y otros 103 conservados, no identificados, además de 35 cepas ATCC de diferentes especies tipo bacterianas adquiridas por el LMMA; siendo aisladas de muestras de suelo y subsuelo
Corporación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas	Biobanco de Cepas de Leishmania (BD-CL)	Valle del cauca – Cali	Mantiene cepas de leishmania provenientes principalmente de la zona sur occidental de Colombia.

2.2. Normatividad nacional e internacional a nivel de colecciones biológicas

En Colombia las colecciones biológicas son manejadas por normativas establecidas a nivel nacional mediante los entes de control, los cuales son los encargados de llevar un registro único que constate resultados verídicos y reales. El RNC (Registro Único de Nacional de Colecciones biológicas) es un instrumento que busca consolidar y difundir la información básica sobre las colecciones biológicas del país. El reconocimiento y uso de la información disponible en estas bibliotecas de la vida, son fundamentales para una efectiva gestión integral de la biodiversidad y los servicios ecosistémicos.

Todo lo anterior se encuentra consolidado dentro del siguiente marco legal:

- Decreto 309 del 2000 (20), por el cual se reglamenta la investigación científica sobre la diversidad biológica.
- Decreto 1375 de 2013 (21), por el cual se administra el funcionamiento de las colecciones biológicas en el territorio nacional, se vigilan los

derechos y obligaciones de los titulares de las colecciones y se establece el procedimiento de registro de las colecciones biológicas ante el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humboldt"

- Decreto 1076 del 2015 (22), por medio del cual se expide el decreto único reglamentario del sector ambiente y Desarrollo sostenible y se encarga de definir las políticas y regulaciones a las que se sujetarán la recuperación, conservación, protección, ordenamiento, manejo, uso y aprovechamiento sostenible de los recursos naturales renovables y del ambiente de la nación
- Ley 165 de 1994 (23), mediante la cual el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt ha determinado las pautas y prioridades en la investigación de la diversidad microbiana y ha puesto a disposición de la comunidad científica la información que lleva a las pautas de acción prioritaria sobre estos temas para Colombia enmarcada en el Convenio sobre Diversidad Biológica de las Naciones Unidas.

2.3. Historia, estructura, documentación y registro de la Colección de Microorganismos de la UCMC

La Colección de Cultivos de Microorganismos pertenecientes al Programa Bacteriología de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca se creó en 1986 y se ha fortalecido en forma permanente por medio de compra, donación y canje. Actualmente se cuenta con la identificación fenotípica de todas las cepas existentes en la Colección. El Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca requirió para sus procesos académicos, cultivos de microorganismos, bacterias, hongos y parásitos, los cuales eran conseguidos por cada docente para sus actividades didácticas. En 1987, un grupo de docentes inició la consecución de cepas,

unas nativas y otras de referencia, organizando un mantenimiento temporal, el cual permitía cumplir en forma parcial con los procesos de aprendizaje de los estudiantes en el área de Bacteriología (24).

Producto de esta necesidad se realizó un trabajo en 1992 llamado “Modelo técnico para el desarrollo, manejo y mantenimiento de un Cepario” Primera parte. Por parte de las docentes Constanza López de Arcila, Gabriela Coy, Luz Helena Herrera, Ellen Perdigón de Toro y Vilma Martínez. El objetivo fue cubrir las necesidades académicas en el área de Bacteriología y Micología, recopilar la información existente sobre Ceparios para suplir las dificultades de consecución de los microorganismos y ofrecer servicios a la comunidad en el área de la salud, la investigación y la industria (25).

Desde ese momento y de acuerdo con las necesidades que se iban presentando en las asignaturas se fue enriqueciendo el Cepario. Los microorganismos tanto bacterias como hongos eran conseguidos en la Secretaría de Salud, o en diferentes hospitales de la ciudad, los cuales eran aislados de muestras biológicas de pacientes y fueron identificados por métodos bioquímicos, lo cual no garantizaba en un 100% la viabilidad y seguridad de que fuera el microorganismo esperado.

Hasta el año 2006, la colección de cultivos se manejó con mantenimiento semistok utilizando como medio de cultivo B.A.B. (Agar Base Sangre) recto e inclinado en tubos 16 x 150 con tapa rosca (10 ml) para la mayoría de las bacterias (aerobias y anaerobias facultativas), Caldo tripticasa soya con carne para aerobios estrictos y Agar Micosel inclinado para hongos y realizándose pases cada 6 meses o un año en el caso del *Vibrio cholerae*. En la actualidad, los cultivos llegan de diferentes partes y se referencia su lugar de origen y muestra de donde han sido obtenidos, contándose con 97 muestras bacterianas, para el uso académico. Los microorganismos se siembran en placas de agar enriquecido o selectivo según como sea más conveniente. Estos pases se realizan en una cabina de flujo laminar y un espacio que cuenta con las condiciones de Bioseguridad básicas para estos procedimientos (24).

Además se tiene un formato denominado Hojas de vida de los microorganismos, en el cual se consignan los datos del depositante, el origen,

la forma de ingreso y los datos del microorganismo. Igualmente, en esta hoja de vida aparecen todas las verificaciones de identificación que se hacen semestral o anual a cada microorganismo.

El siguiente es el protocolo para la recepción, identificación y depósito de los microorganismos que conforman la Colección de microorganismos de la Universidad Colegio Mayor de CundinamarcaCCM-UCMC (26):

1. Identificación del depositante

1. El depositante es la persona, entidad o grupo de trabajo o de investigación que desea aportar un espécimen a la Colección de microorganismos de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
2. Se debe escribir claramente el nombre de la persona natural o jurídica, grupo de investigación o trabajo que hace el aporte.
3. Si es persona natural deberá identificarse la entidad o grupo al que pertenece y consignar su dirección, teléfono e e-mail si lo posee.
4. Se debe establecer cuál es la forma de adquisición de este microorganismo: Compra, donación, canje entre otros y aportar un documento que lo sustente (factura, carta, convenio docente asistencial, resumen ejecutivo del proyecto)

2. Identificación del microorganismo

1. Una vez se establezcan todos los datos del depositante es necesario identificar en forma precisa el microorganismo depositado. Para ello es necesario:

- Colocar el nombre exacto del germen
- Identificar el género al que pertenece de acuerdo con la Clasificación Taxonómica de Bergey
- Establecer el origen: humano, animal, vegetal, manipulado genéticamente, o si fue aislado del medio ambiente establecer de que hábitat fue aislado
- Localización geográfica del aislamiento: ciudad, pueblo, región, país - Fecha y hora del aislamiento.
- La forma en que fue aislado y obtenido inicialmente, tipo de medio de cultivo

utilizado o transporte utilizado si no fue aislado

- Nivel de seguridad de acuerdo con el CDC de Atlanta
- Forma en que será conservado el microorganismo: congelación a -70°C y nitrógeno líquido de acuerdo con el protocolo producto del proyecto del grupo CEPARIUM.
- Enunciar el tipo de pruebas bioquímicas utilizadas para su identificación y los resultados obtenidos con los cuales se asegura la confirmación de que ese es el microorganismo depositado
- Se deben establecer las fechas y la forma en que se confirma la viabilidad y estabilidad del microorganismo como parte de un control permanente sobre la colección de cultivos. Así mismo, deberá ir el nombre del profesional que realizó el control. Para cada microorganismo se tiene su ficha correspondiente.

La información reposa en la base de datos correspondiente y tiene 2 Back up en CD. Una vez se obtenga el registro de la colección la información deberá divulgarse por internet en la página web y a través de folletos informativos.



COLECCIÓN DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS – CUM-UCMC
UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
LABORATORIO CENTRAL – ÁREA CEPARIO

SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS
FICHA DE IDENTIFICACIÓN

CODIGO 021		
DATOS DEL DEPOSITANTE		
DEPOSITANTE	CARLOS RIOS GALEGO	
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	SECRETARIA DE SALUD BOGOTÁ	
DIRECCION	Calle 13 No. 32-49	
TELÉFONO	3449990	
E-MAIL	www.saludbogota.gov.co	
FORMA DE ADQUISICION	DONACION POR CONVENIO	
IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO		
MICROORGANISMO	Substrato de <i>Shigella flexneriae</i>	
GÉNERO	Substrato de	
ORIGEN – HABITAT	Copias confirmadas por Secretaria de Salud Bogotá- Sección Microbiología	
LOCALIZACION GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Bogotá	
FECHA / HORA DE AISLAMIENTO	2002	
PRON. EDIMIENTO INICIAL	Microorganismos a -70°C con subcultivo en Agar McConkey	
NIVEL DE SEGURIDAD		
CONSERVACION DEL MICROORGANISMO	-70°C y -130°C en nitrógeno líquido Cálculo BHI con 10% de glicerol	
PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACION	Pruebas bioquímicas en tubo, Sistema rápido BBL CRYSTAL y Sistema rápido CRYSTAL	
FECHAS	TIPO DE CONFIRMACION	RESPONSABLE
Junio 2002	Sistema rápido CRYSTAL	Ligia Consueco Sánchez Leal
Noviembre 2002	Pruebas Bioquímicas en tubo	Ruth Sánchez
Marzo 2003	Pruebas Bioquímicas en tubo	Lucia Constanta Corrales
Noviembre 2003	Sistema rápido CRYSTAL	Ligia Consueco Sánchez Leal
Agosto 2004	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Consueco Sánchez Leal
Junio 2005	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Consueco Sánchez Leal
Abril 2006	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Consueco Sánchez Leal
Febrero 2007	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Consueco Sánchez Leal
Diciembre 2008	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Consueco Sánchez Leal
Octubre 2009	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Consueco Sánchez Leal
Agosto 2010	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Consueco Sánchez Leal
Junio 2011	Pruebas bioquímicas en Tubo	Ligia Consueco Sánchez Leal
Junio 2012	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Consueco Sánchez Leal
Junio 2013	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Consueco Sánchez Leal
Junio 2014	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Consueco Sánchez Leal
Agosto 2014	Sistema rápido BBL CRYSTAL	Ligia Consueco Sánchez Leal

FIRMA RESPONSABLES

DECANA FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

DOCENTE RESPONSABLE COLECCION

Figura 1 Formato hojas de vida identificación de las bacterias almacenadas en la Colección de microorganismos de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Los microorganismos del Cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca se encuentran almacenados por dos métodos (para asegurar óptima viabilidad, almacenamiento y pureza): almacenamiento a ultra baja temperatura en nitrógeno líquido a temperatura de -140°C o en congeladores a -70°C; éstos son los mejores métodos para minimizar el riesgo de cambios genéticos. (27)

2.4. Generalidades de las bacterias Gram negativas en estudio

2.4.1 Familia *Enterobacteriaceae*.

Enterobacteriaceae son bacilos Gram negativos con una longitud de 1 - 3 µm. Son anaerobios facultativos, oxidasa negativa, catalasa positiva y crecen en agar MacConkey; sus huéspedes naturales son intestinos humanos, animales, y de insectos; sin embargo, también se encuentran en suelo, agua y materia en descomposición (28). Hay 44 géneros y aproximadamente 176 especies. La flora normal incluye *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Morganella spp.*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Serratia spp.*, y los patógenos humanos obligatorios incluyen *Salmonella Spp.*, *Shigella spp.* Y *Yersinia spp.* Las *Enterobacteriaceae* pueden representar el 80% de los principales aislados patológicos de muestras clínicas Gram negativas. Algunas especies de la familia *Enterobacteriaceae*, sólo han sido identificadas en base a su secuencia de 16S rRNA y no han sido aisladas o caracterizadas bioquímicamente (28). El estudio de estas bacterias está sujeto a la importancia de las mismas a nivel patológico en hombres, animales y plantas, y económicamente a nivel industrial y genético.

La familia *Enterobacteriaceae* se divide en tres grupos en base a la fermentación de lactosa:

- **Fermentadores de lactosa**, tales como *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, y *Klebsiella spp.*
- **Fermentadores de lactosa tardía**, como *Citrobacter spp.* y *Serratiaspp.*

- **No fermentadores de lactosa**, tales como *Edwardsiella*, *Hafnia*, *Morganella morganii*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* y *Yersinia spp.*

Escherichia coli

Es un habitante natural del extremo del íleon y el colon, en animales y hombres, representando el 1% de la flora bacteriana del intestino. Es eliminado por heces, siendo capaz de conservarse por periodos largos de tiempo en condiciones favorables, convirtiéndose en un indicador del grado de contaminación de alimentos y agua. Causa diversidad de patologías, desde enteropatías (diarrea), hasta septicemias. Cuenta con variedad de factores de virulencia, tales como: la presencia de capsula, adhesinas, enterotoxinas (termolábil, termoestable), neurotóxicas (29).

La tipificación serológica de *E.coli* se basa en el reconocimiento de los antígenos:

- a) Antígenos O somáticos o de la pared celular (polisacáridos, termoestables)
- b) Antígenos K de la capsula (polisacáridos ácidos)
- c) Antígenos H de los flagelos (proteína, termolábil)
- d) Antígenos de las fimbrias (proteína, termolábil)

Shigella spp.

El único reservorio es el humano. Causante de diarreas y dolor abdominal con moco y sangre (diarreas invasivas) y en algunos casos con aparición de pus en las heces, denominándose: disentería bacilar. Esta infección es producida por la ingestión de alimentos o agua contaminada con heces humanas, o por transmisión de persona a persona. La diarrea es producida por un mecanismo en donde se da una invasión directa de la mucosa intestinal y la subsiguiente producción de una enterotóxina (30).

Salmonella spp.

Su hábitat natural es el tracto gastrointestinal de hombres y animales. Algunas

de ellas tienen especificidad para un huésped determinado:

- Hombre: *S.typhi*, *S.paratyphi B*
- Gallinas: *S.gallinarum*
- Ovinos: *S.abortusovis*
- Bovinos: *S.dublin*
- Cerdo: *S.choleraesuis*
- Equinos: *S.abortusequi*

Estas bacterias causan la Salmonelosis, un tipo de gastroenteritis transmitida por alimentos. Cabe resaltar el caso particular de *Salmonella typhi*, quien es el agente etiológico más reportado en la literatura causante de la fiebre tifoidea, una entidad relacionada con las condiciones de sanitarias de los humanos.

Los factores de virulencia de *Salmonella*, obedecen a la presencia de una endotoxina, en donde es necesario el complejo LPS para su desarrollo (31,32).

Citrobacter spp.

Este género se denomina porque sus miembros cuentan con la capacidad para usar citrato como única fuente de carbono. Entre otras cosas, se diferencian por su capacidad para convertir el triptófano en indol, fermentar la lactosa y utilizar malonato. *C. freundii* produce H₂S, de ahí que pueda confundirse con *Salmonella*.

Asociados frecuentemente con infecciones de tracto urinario, en especial aquellas asociadas con catéter insertado. Aunque han sido aisladas a partir de las vías respiratorias, representando con más frecuencia colonización que infección sintomática. Además, se encuentran implicadas en infecciones intraabdominales, infecciones de tejidos blandos y osteomielitis. *C. diversus* ha sido implicado en la producción de brotes nosocomiales de meningitis neonatal. Las cepas de *C. freundii* tienen genes ampC cíclico inducibles que codifican la resistencia a la ampicilina y cefalosporinas de primera generación (33).

***Enterobacter* spp.**

Hasta la década de 1960 se encontraban agrupados en la clasificación de *Klebsiella-Aerobacter*. A diferencia de *Klebsiella* spp., los *Enterobacter* son móviles y su cápsula tiende a ser menos notable. Las cepas de *Enterobacter* suelen colonizar a los pacientes hospitalizados, en particular a los tratados con antibióticos, y han sido asociados con infecciones de quemaduras, heridas, vías respiratorias y del tracto urinario (30).

***Klebsiella* spp.**

Habitante natural del intestino y mucosa de la nasofaringe en animales y humanos, así como en el agua y la tierra. Son aisladas generalmente de infecciones nosocomiales, como septicemias, infecciones urinarias, y en cuadros asociados con diarreas y dolor abdominal. Su transmisión se da por ingestión de alimentos o agua contaminada con heces contaminadas. En animales causan afecciones respiratorias, del tracto genital y diarreas. Sus factores de virulencia son: capsula, endotoxina, fimbrias, enterotoxina (34).

***Serratia* spp.**

Son considerados microorganismos oportunistas, móviles y que fermentan la lactosa con lentitud o no la fermentan. *Serratia marcescens* se relaciona con enfermedades humanas. Se han comunicado raros casos de enfermedades debidas a *Serratia liquifaciens*, *Serratia raubidaea* y *Serratia plymuthica*.

Entre las infecciones nosocomiales que provoca *Serratia*, se encuentra aproximadamente el 4% de las bacteriemias y las infecciones del tracto respiratorio inferior y el 2% de las infecciones de las vías urinarias, heridas quirúrgicas y piel. *Serratia* presenta múltiples resistencias a fármacos, lo que complica su tratamiento con antibióticos, ante variedad de infecciones (30).

***Providencia* y *Morganella* spp.**

Estos géneros son lactosa negativa, móviles y producen fenilalaninodesaminasa y H₂S. Se diferencian de los bacilos enterobacterianos típicos al expresar

fimbrias y flagelos para dar bastones muy alargados con miles de flagelos que translocan con rapidez a través de la superficie de placas de agar. *Providencia stuartii* es un microorganismo que rara vez se aísla en la clínica, excepto a partir de la orina de enfermos en residencias o en ancianos con catéteres urinarios insertados durante largo plazo. *Morganella morganii* es el único miembro de su género, es un aislado nosocomial poco común, en general de orina o heridas (30).

Pantoea spp.

Es un bacilo, que causa fundamentalmente infecciones nosocomiales, aunque también se han descrito casos de meningitis neonatal y de artritis séptica (36,37). Puede crecer en medios ricos en glucosa, por lo que ocasionalmente produce infecciones relacionadas con la infusión intravenosa de sueros, que pueden originar brotes de bacteriemia en los hospitales (38). Se ha referido un aumento de las resistencias de este microorganismo a los antibióticos betalactámicos, lo que puede motivar el empleo de los carbapenemas en ciertos casos (35,36, 37).

Hafnia spp.

Fue considerado como miembro del género *Enterobacter*, sin embargo, ahora se define como un género separado, que cuenta con una sola especie denominada: *Hafnia alvei*. Son bacterias móviles. Asociadas a infecciones nosocomiales y la sensibilidad que presentan ante los antibióticos parece ser similar a la observada entre los microorganismos del grupo *Enterobacter* (30).

Proteus spp.

Desempeñan un papel esencial en los procesos de putrefacción, se hallan en la flora intestinal de varias especies animales (roedores, aves, carnívoros, rumiantes y porcinos). En el hombre originan infecciones urogenitales agudas, en animales esta bacteria también es agente etiológico de entidades como: otitis, diarrea, infecciones de las glándulas anales, mastitis y estomatitis ulcerosa (39).

***Yersinia* spp.**

Aislada frecuentemente en enteropatías humanas, y como agente causal de linfadenitis mesentéricas en jóvenes y adultos, siendo los animales la principal fuente de contagio. Se clasifica en 34 serotipos O (Antígenos somáticos), teniendo la capacidad de invadir y multiplicarse en los macrófagos, gracias a un plásmido característico que actúa como factor de virulencia (40, 41).

2.4.2 Familia *Pseudomonadaceae*.

Esta familia integra un grupo de bacterias que viven casi exclusivamente como saprofitos del suelo, el agua dulce, salada y en determinado material orgánico. Se trata de bacilos rectos o ligeramente curvos, con flagelo polar, que utilizan compuestos orgánicos simples como fuente de carbono y energía. Poseen metabolismo aerobio, carecen de actividad fermentativa y producen oxidasa. Conformada por géneros: *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp., *Zooglea* spp. Y *Gluconobacter* spp. (42).

***Pseudomona* spp.**

Es un bacilo que en ocasiones se encuentra capsulado. Es capaz de producir el desdoblamiento oxidativo de la glucosa, crece en medios de cultivo simples ya que no es un microorganismo exigente. Se caracteriza por la producción de pigmento. En el caso de *P.aeruginosa*, es de color verde azulado (la piocianina), y para las especies de *P.fluorescens* y *P.putida*, se produce un pigmento de color amarillo con fluorescencia verde azulada (pioverdina) (42). Puede encontrarse en muchos fluidos, incluyendo algunas soluciones antisépticas. Muchas veces coloniza al hombre sin causar enfermedad, pero puede producir infección cuando alcanza áreas del organismo que normalmente se encuentran estériles, esto lo hace, a través de un traumatismo o infusión. En los individuos inmunocompetentes rara vez causa enfermedad; sucede lo contrario con los sujetos inmunosuprimidos en donde a partir de pequeñas colonizaciones de mucosas es capaz de producir infección. Por lo

tanto, este microorganismo cumple un papel importante en las infecciones hospitalarias en general, en infecciones de heridas quirúrgicas, quemaduras y en infecciones respiratorias (42).

***Burkholderia* spp.**

Bacilo que pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*; existen siete especies del género *Burkholderia* de las cuales sólo dos producen patología en seres humanos: *B. cepacia* y *B. pseudomallei*. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y se aísla del suelo, el agua, las plantas y verduras. Produce infección nosocomial por contaminación de desinfectantes, equipos médicos, material protésico y fármacos como anestésicos o líquidos de irrigación urológicos. También se han descrito casos de bacteriemias por catéter, septicemia después de cirugía cardíaca, endocarditis por válvulas contaminadas, infección del tracto urinario tras practicar cistoscopias, artritis séptica y peritonitis (43,44).

***Xanthomonas* spp.**

El género *Xanthomonas* spp. Contiene principalmente especies de bacterias que causan graves enfermedades en plantas de utilidad agrícola y comercial. Destaca su presencia en cultivos de elevado interés como arroz, algodón, especies hortícolas como tomate o pimiento y plantas leñosas como los cítricos o los frutales de hueso. Además, son responsables de enfermedades en plantas ornamentales de alto valor económico. Al mismo tiempo, el género *Xanthomonas* spp. Constituye un grupo de bacterias extremadamente interesante desde un punto de vista microbiológico por presentar una alta especificidad por el huésped, de tal manera que cepas pertenecientes a una misma especie pueden infectar de forma exclusiva huéspedes diferentes (45). Las bacterias de este género, incluyen más de 100 especies de fitopatógenos y serovares pertenecientes a la subdivisión de las proteobacterias. A nivel microbiológico se presentan como bacterias Gram negativas, con forma de bastones, cuyo tamaño aproximado va de 0.4-1.5 μm

de ancho por 1.2-4.0 μm de largo, móviles por medio de un flagelo polar, producen un pigmento amarillo cuando crecen en medio sólido y la mayoría tienen un crecimiento lento, todas son patógenos vegetales y se encuentran asociadas sólo a plantas o materiales vegetales (45).

***Stenotrophomona* spp.**

Antiguamente clasificada dentro de los géneros *Pseudomonas* (1961) y *Xanthomonas* (1983). En 1993, Palleroni y Bradbury proponen el nuevo género *Stenotrophomonas* constituido por dos especies: *S. maltophilia* y *S. africana* recientemente aislada de LCR de un paciente infectado por VIH con meningoencefalitis. Es un microorganismo de baja patogenicidad, y su hábitat natural es el ambiente acuático. Resulta de importancia en patologías nosocomiales, debido fundamentalmente a su alta resistencia a los antimicrobianos, lo que favorece su selección. Los aislados clínicos representan la mayoría de las veces colonización; sin embargo, se describen cuadros graves, tales como neumonía en pacientes de UCI con ventilación mecánica y bacteriemias asociadas a catéter venoso central. También puede producir en forma inhabitual meningitis, endocarditis, endoftalmitis y un amplio rango de infecciones cutáneas como celulitis y ectima gangrenoso. Se considera un patógeno emergente en pacientes con factores de riesgo como: uso prolongado de diversos antimicrobianos, incluyendo carbapenémicos y cefalosporinas de última generación, neutropenia, edad avanzada y procedimientos invasores en pacientes de UCI (46,47).

***Acinetobacter* spp.**

Son bacilos estrictamente aerobios no fermentadores, no móviles y oxidasa negativos, que se presentan en pares al microscopio. Se distribuyen ampliamente en la naturaleza, son importantes en el suelo y contribuyen a su mineralización.

Acinetobacter es también una importante fuente de infección en los pacientes inmunodeprimidos que se encuentran hospitalizados. Siendo capaces de

sobrevivir en diversas superficies. Ocasionalmente son aislados de productos alimenticios y algunas cepas son capaces de sobrevivir sobre diversos equipos médicos e incluso sobre la piel humana sana. Muchas cepas de *A. baumannii* son multiresistentes a antibióticos, debido a características contenidas en su genoma (48,30).

2.4.3 Familia Vibrionaceae

Es común encontrarlo en las clasificaciones junto a las enterobacterias, por sus características morfológicas y metabólicas. Estos microorganismos son acuáticos y/o marinos, ya que requieren altas concentraciones de sal para su crecimiento (halófilas), pudiendo ser aisladas de agua de mar, tracto intestinal o en la piel de animales marinos.

Conformada por géneros: *Vibrio spp.*, *Aeromonas spp.*, *Plesiomonas spp.*, y *Photobacterium spp.* Su importancia está dada en la capacidad que tienen de generar patologías en hombres y animales a través del consumo de aguas o alimentos que provienen del mar (49).

Vibrio spp.

Son bacilos cortos, rectos o curvos, provistos de un flagelo polar. Son fermentadores y oxidasa positivos. Su hábitat es el agua de mar y las aguas dulces, explicando la necesidad que tienen de varios cationes (Na⁺, K⁺ y Mg⁺) y de NaCl en los medios de cultivo, especialmente en concentración de 2,5%. A nivel de patogenicidad se resalta el papel de *V. cholerae*, quien es el causante del cólera, que es una gastroenteritis debida a una exotoxina llamada toxina colérica, que altera intensamente la permeabilidad de la mucosa del intestino delgado, y da lugar a la pérdida de una gran cantidad de líquido, llegando a ser fatal, debido a la deshidratación y pérdida de líquidos (49).

Aeromonas spp.

Comprende bacilos aerobios y anaerobios facultativos, que poseen oxidasa y catalasa, y además fermentan la glucosa. Algunas de ellas son móviles, como es el caso de *A. hydrophila*. Se hallan comúnmente en aguas residuales y

superficiales, así como en el suelo y los alimentos (P.Ej: la leche). Se ha aislado en ocasiones de las heces de las personas sanas y diversas especies animales, aunque también es causante de infecciones y diarreas (49).

***Plesiomonas* spp.**

Este género tiene una única especie *P.shigelloides*, y crece en medios selectivos para las enterobacterias enteropatógenas, sin embargo, se diferencia de ellas por su reacción positiva a la oxidasa. Su nombre “*shigelloides*” obedece a la posesión de un antígeno común con *Shigela sonnei*. Esta bacteria vive en el agua, sin embargo no resiste el agua de mar. Hasta ahora no se le ha encontrado como agente causal de infecciones en animales, pero en hombres se ha aislado en gastroenteritis especialmente en regiones tropicales y subtropicales (50).

2.3. Técnicas Fenotípicas de identificación de los microorganismos en estudio

La taxonomía bacteriana tiene como objetivo la construcción de sistemas que permitan clasificar a las bacterias. Dentro de la clasificación taxonómica, las categorías y definiciones más utilizadas son familia (un grupo de géneros relacionados entre sí), género (un grupo de especies relacionadas entre sí), especie (un grupo de cepas relacionadas entre sí), tipo (grupos de cepas interrelacionados dentro de las especies; por ejemplo, biotipo, serotipo) y cepa (aislamiento concreto de una especie en particular). Uno de los factores clave para identificar a las bacterias como agentes patógenos depende de su aislamiento en cultivo puro. Una colonia en cultivo puro está compuesta por un solo tipo de microorganismo y procede de una sola célula original. Las pruebas de identificación se deben hacer siempre con colonias únicas procedentes de cultivos puros (51).

2.3.1 Características microscópicas.

El estudio microscópico en fresco y tras tinción revela la forma, la manera de agruparse, la estructura de las células y su tamaño. Según sus características, las bacterias pueden clasificarse en:

Morfología: cocos, bacilos, cocobacilos, filamentosos, bacilos curvos.

Presencia de capsula

Endosporas: ovales, esféricas, terminales, subterminales

Tamaño: cortos, largos

Disposición: parejas, cadenas, tétradas, racimos

Este análisis se realiza mediante variedad de tinciones, como:

- Coloración de Gram, una tinción diferencial, que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas, de acuerdo a las características de su pared celular (52).
- Coloración Ziehl Neelsen, permite diferenciar a las bacterias en dos grupos: aquellos que son capaces de resistir la decoloración con alcohol-ácido y aquellos que no lo son. Aprovechando la complejidad bioquímica de la pared de las micobacterias (53).
- Coloración de Azul de metileno y tinción negativa, las cuales revelan la forma (cocos, bacilos, cocobacilos, filamentosos, bacilos curvos), la manera de agruparse, la estructura y su tamaño. Siendo, la tinción negativa capaz de revelar la presencia de capsula (54).

2.3.2 Características macroscópicas.

Los medios de cultivo permiten el crecimiento y multiplicación de las bacterias en un rango de tiempo de 18-24 horas. Todas las bacterias tienen unos requerimientos nutricionales imprescindibles para su crecimiento. Necesitan

una fuente de energía, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, algunas sales, oligoelementos y agua. Estos se encuentran en presentación líquida y sólida, con la diferencia de que el último cuenta con una base de agar, que es un polímero de origen vegetal que se mantiene en fase líquida a altas temperaturas y al enfriarse forma un gel, manteniendo una alta humedad y conteniendo los elementos nutricionales necesarios. El cultivo sobre medios sólidos permite identificar fácilmente las colonias bacterianas y de esta manera clasificarlas bajo 4 características: tamaño, forma, consistencia, y a veces por su color (30).

Tamaño: es generalmente uniforme entre una especie y está determinada por los bordes y el grosor de la colonia: lisa, rugosa, irregular, abultada o plana.

Textura: Puede variar desde seca a viscosa, con superficie lisa o granular.

Pigmento: generalmente se produce de manera característica, como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* (pigmento verde), *Serratia marcescens* (pigmento rojo)

Hemolisis. Algunas bacterias producen hemolisinas que causan la lisis de los hematíes en medios que contienen sangre. Esta hemolisis puede ser beta (zona clara alrededor de la colonia) o alfa (halo de color verdoso alrededor de la colonia).

Por otro lado, en medios líquidos, el crecimiento suele ser mayor, debido a la disponibilidad de nutrientes. El medio a escoger, depende el tipo de muestra o del microorganismo que se desea aislar, encontrándose medios básicos, de enriquecimiento, selectivos, diferenciales y cromogénicos (30).

a) Medios básicos: ricos en nutrientes, permiten el crecimiento de la mayoría de las bacterias (p.ej, agar sangre)

b) Medios de enriquecimiento: están desarrollados para recuperar bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales (p.ej, caldo de tioglicolato o el caldo BHI)

- c) Medios selectivos: contienen sustancias como cloruro sódico a dosis elevadas, citrato sódico, cristal violeta, sales biliares o antibióticos y antisépticos que fomentan el crecimiento de algunas bacterias y evitan el de otras, siendo de gran utilidad para el aislamiento bacteriano a partir de una población bacteriana mixta
- d) Medios diferenciales: se utilizan para poner de manifiesto características distintivas de las colonias. Son medios que distinguen entre distintos grupos bacterianos en función casi siempre del color de sus colonias. (p.ej, el agar MacConkey)
- e) Medios cromogénicos: medios que incorporan sustancias cromo génicas para detectar distintas enzimas producidas por los microorganismos y que suelen ser específicas de un género. Cuando la bacteria produce la enzima, se hidroliza el sustrato y se libera un compuesto cromo génico que adquiere un color intenso, dando color a la colonia.

2.3.3. Identificación por pruebas bioquímicas.

Permiten determinar las características metabólicas de las bacterias, algunas de ellas evalúan la presencia de enzimas, o componentes metabólicos (55).

Pruebas para identificación preliminar con lectura inmediata:

- Catalasa: enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas.
- Oxidasa: útil para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. sólo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y, excepcionalmente, en alguna microaerofila, pero las bacterias anaerobias estrictas carecen

de actividad oxidasa.

Pruebas para lectura en 6 hrs:

- β -galactosidasa (ONPG): Esta prueba demuestra la presencia de la enzima β - galactosidasa, tras la adición del compuesto orgánico O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), y posterior transformación en ortonitrofenol, un derivado cromo génico de color amarillo. Hay bacterias que a pesar de poseer enzimas que hidrolizan la lactosa (β - galactosidasas), no pueden actuar sobre ella porque les faltan las enzimas extracelulares apropiadas (permeasas). Todas las bacterias fermentadoras lentas de la lactosa son β -galactosidasa positivas.
- Ureasa: Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoniaco por acción del enzima ureasa. *Proteus* se caracteriza por esta actividad enzimática.
- Indol: Mediante esta prueba se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano. Dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa.

Pruebas para lectura de 18 a 48h:

- Oxido-Fermentación: útil para determinar si la utilización de los hidratos de carbono por parte de un microorganismo se realiza por vía oxidativa (proceso aeróbico, presencia de oxígeno) o por vía fermentativa (proceso anaeróbico, ausencia de oxígeno).
- Reducción de nitratos: Permite apreciar la capacidad de un microorganismo de reducir el nitrato en nitritos.
- Rojo de metilo: Es un indicador de pH, y actúa entre pH 4,2 y 6,3 variando desde rojo (pH 4,2) a amarillo (pH 6,3). Mediante esta prueba se comprueba la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa por la vía de la fermentación ácido mixta.
- Voges-Proskauer: Esta prueba es utilizada para determinar si el microorganismo fermenta la glucosa por la vía butanodiólica, generándose un producto intermedio (acetoína) formando un complejo de color rojizo con el α -naftol.

- Agar hierro de Kligler: Mediante esta prueba se puede determinar:
 - La capacidad de un microorganismo de metabolizar un hidrato de carbono específico (en este caso glucosa, lactosa o ambas) incorporado en un medio de crecimiento básico
 - Producción o no de gases: CO₂ y H₂ como productos finales del metabolismo de los hidratos de carbono
 - Producción de ácido sulfhídrico (H₂S). El medio de Kligler contiene como hidratos de carbono la glucosa y la lactosa. Existe otro medio, el triple sugar iron (TSI) que posee un tercer hidrato de carbono, la sacarosa
- Fermentación de azúcares: Útil para la detección de la fermentación de carbohidratos, ácidos orgánicos y gas (H₂ o CO₂). Estos pueden detectarse incluyendo en el medio un indicador de pH.
- Hidrolisis de la esculina: Prueba para detectar la capacidad de hidrolizar la esculina en esculetina y glucosa. La esculetina reacciona con una sal de hierro para formar un compuesto castaño oscuro o negro, añadiendo citrato férrico para que actúe como indicador de la hidrolisis de la esculina.
- Coagulasa: Permite determinar la capacidad de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa. Se utiliza para diferenciar *S. aureus* (coagulasa positivo) de otras especies de *Staphylococcus spp.* La prueba de la coagulasa en tubo se puede leer tras incubación de 4h, pero si es negativa debe incubarse hasta 24h.
- Fenilalanina-desaminasa: Esta prueba determina la capacidad de un microorganismo para desaminar el aminoácido fenilalanina en ácido fenilpiruvico por la actividad enzimática de la fenilalanina desaminasa, con la consiguiente acidez resultante. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de los géneros *Proteus spp.*, *Providencia spp.* y *Morganella spp.*
- ADNasa: Se basa en la capacidad que poseen ciertas bacterias para hidrolizar enzimáticamente el ADN produciendo una mezcla de mono y polinucleotidos.

- Hidrolisis de la gelatina: Esta prueba muestra la capacidad de ciertos microorganismos para hidrolizar la gelatina a péptidos y aminoácidos, mediante la acción de enzimas específicas denominadas gelatinasas.
- Descarboxilasas: La descarboxilación es un proceso en el cual las descarboxilasas atacan el extremo carboxilo de los aminoácidos, formando la correspondiente amina. Los tres aminoácidos que se ensayan en la identificación de enterobacterias son arginina, lisina y ornitina. La descarboxilación de lisina y ornitina da cadaverina y putrescina (diaminas), mientras que la descarboxilación de arginina da citrulina por acción de una dehidrolasa. Esta prueba se debe realizar con un tubo control que contiene el medio base sin aminoácido. Como la descarboxilación es una reacción anaeróbica, se debe cubrir el medio con una capa de aceite mineral estéril. El proceso se produce en dos etapas: por fermentación de la glucosa se produce una acidificación del medio (pH < 6,0), apareciendo color amarillo. La acidificación es necesaria para que ocurra la descarboxilación. Este último proceso da lugar a la formación de las aminas que elevan el pH con el consiguiente viraje del indicador a color violeta.
- Lipasa: Se basa en la capacidad que tienen ciertas bacterias de descomponer las grasas en ácidos grasos y glicerol, por acción de la enzima lipasa.
- Lecitinasa: La prueba de la lecitinasa pone de manifiesto la producción de dicha enzima por determinados microorganismos, capaces de actuar sobre la lecitina.
- Utilización de citrato: Esta prueba sirve para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio. Entre las enterobacterias estas características se dan en los siguientes géneros: *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.* y algunas especies de *Salmonella spp.* Sin embargo, *Yersinia spp.*, *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* son incapaces de crecer

utilizando citrato como única fuente de carbono.

- Prueba de CAMP: Sirve principalmente para determinar la capacidad de un microorganismo para producir una proteína conocida como factor CAMP. La proteína produce un efecto sinérgico con la β -hemolisina de *S. aureus* sobre eritrocitos ovinos y bovinos que se observa como un fenómeno lítico en la intersección de los dos microorganismos cuando se siembran en proximidad. Como alternativa se puede utilizar el CAMP inverso.

Pruebas basadas en la resistencia a ciertas sustancias

- Optoquina: El clorhidrato de etilhidroxiprelna (optoquina) inhibe a muy baja concentración (5 $\mu\text{g/ml}$ o menos) el crecimiento de *S. pneumoniae*, mientras que no afecta al crecimiento de otros *Streptococcus* alfa-hemolíticos.
- Bacitracina: Esta prueba puede utilizarse como diagnóstico presuntivo en la identificación de *Streptococcus* beta hemolítico del grupo A de Lancefield, ya que, a diferencia de la mayoría de los estreptococos, suelen ser sensibles a bajas concentraciones de bacitracina.
- Solubilidad en bilis: Se basa en la capacidad de determinadas especies bacterianas de lisarse en presencia de sales biliares, las más utilizadas son el taurocolato y el desoxicolato de sodio. Ambas provocan un descenso de la tensión superficial, que, unido a la actuación de enzimas auto líticos, destruyen la célula. El efecto de esta enzima autolítica se pone de manifiesto sobre colonias de *S. pneumoniae* crecidas en medios sólidos, en las que se aprecia una umbilicación central, y también en colonias mucoides.
- Crecimiento en caldo hipersalino: Determina la capacidad de algunos microorganismos de desarrollarse en medios de cultivo con una concentración de cloruro sódico del 6,5%.

2. 4 Técnicas de caracterización molecular, historia, avances y desarrollo.

2.4.1. Conformación molecular bacteriana.

“Cada bacteria posee un solo cromosoma que consiste en una única molécula formada por una doble cadena de ADN en forma de círculo cerrado” (56). Los ácidos nucleicos están conformados por nucleótidos, los que a su vez están conformados por:

- Un azúcar (desoxirribosa en ADN, ribosa en ARN)
- Una base nitrogenada: Base purica (Adenina-A, Guanina-G), Base pirimidinica (Citosina-C, Timina-T).
- Un grupo fosfato

Los nucleótidos se unen para formar los poli nucleótidos, y finalmente integrar los ácidos nucleicos. Existen dos tipos de ácidos nucleicos:

1. ADN (Ácido desoxirribonucleico): molécula bicatenaria, compuesta por cuatro bases nitrogenadas (A,G,C,T) y desoxirribosa.
2. ARN (Ácido ribonucleico): molécula monocatenaria, compuesta por cuatro bases nitrogenadas (A,G,C,U (uracilo)) y ribosa.

El ADN cuenta con una estructura secundaria, una doble hélice tridimensional, en donde las bases se unen por medio de puentes de hidrogeno, enfrentándose siempre en el mismo orden: adenina con timina y guanina con citosina. La información genética esta albergada en el ADN y se encuentra codificada por la secuencia en que se sitúan las bases en el polinucleotido (57).

El ARN puede ser de tres tipos:

- ARN mensajero (ARNm)
- ARN ribosómico (ARNr)
- ARN de transferencia (ARNt)

Transcripción del ADN: consiste en la síntesis de ARN, utilizando como molde el ADN, generando complementariedad entre estas dos moléculas. El ARN es un portador de la información del DNA hacia los ribosomas, donde se sintetizan

las proteínas (58).

Traducción: proceso mediante el cual el ARNt transporta los aminoácidos al ribosoma y traduce el mensaje del ARNm.

El ARNr junto con las proteínas, constituye los ribosomas.

2.4.2. Características del gen 16 S.

La comparación de la secuencia del gen rRNA 16S bacteriano ha emergido como una técnica genética preferida. El análisis de la secuencia del gen rRNA 16S puede identificar mejor, cepas mal descritas, raramente aisladas o fenotípicamente aberrantes, puede usarse rutinariamente para la identificación de micobacterias, y puede conducir al reconocimiento de nuevos patógenos y bacterias no cultivadas (59).

En la década de 1960, Dubnau et al (60). Observó la conservación en la secuencia de genes 16S rRNA con relación a *Bacillus* spp. El uso generalizado de esta secuencia de genes para la identificación bacteriana y taxonómica, fue estudiado por el pionero Woese, quien definió propiedades importantes del gen: resaltando el hecho de que parece comportarse como un cronómetro molecular, seguido de que su conservación lo sugiere como un componente crítico de la función celular. Por lo tanto, pocos otros genes son tan altamente conservados como el gen 16S rRNA.

La secuencia del gen 16S rRNA es de aproximadamente 1,550 pb de largo y se compone de ambas regiones variables y conservadas. El gen es suficientemente grande, con suficientes polimorfismos interespecíficos, como para proporcionar distintivas y estadísticamente válidas mediciones. Normalmente, los cebadores universales se eligen como complementarios de las regiones conservadas al comienzo del gen y en la región de 540 pb o al final de la secuencia completa (aproximadamente la región de 1,550 pb). Aunque 500 y 1.500 pb son longitudes comunes para

secuenciar y comparar, las secuencias en bases de datos pueden ser de varias longitudes (59).

El ARNr 16S contiene nueve regiones (V1-V9) menos conservadas o hipervariables (60), que son las que aportan la mayor información útil para estudios de filogenética y taxonomía. Las regiones conservadas son de gran ayuda para diseñar iniciadores universales que permitan la amplificación de las diversas regiones hipervariables de la gran mayoría de los ARNr 16S de los microorganismos presentes en una comunidad.

La secuencia del gen 16S rRNA se ha determinado para un gran número de cepas. GenBank, el banco de datos más grande de las secuencias de nucleótidos, tiene más de 20 millones de secuencias depositadas, de las cuales más de 90.000 son del gen 16S rRNA. Esto significa que hay muchas secuencias previamente depositadas contra las cuales comparar la secuencia de una cepa desconocida.

Por último, el gen 16S rRNA es universal en las bacterias, y es por ello que se puede medir entre todas las bacterias. En general, la comparación de las secuencias de genes 16S rRNA permite la diferenciación entre los organismos a nivel de género a través de todos los principales phylum de bacterias, además de clasificar las cepas en múltiples niveles, incluyendo lo que ahora llamamos el nivel de especies y subespecies (61).

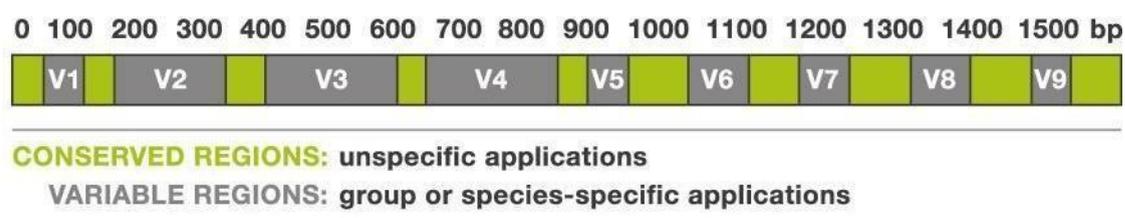


Figura 2 Regiones conservadas e hipervariables de un gen 16S rRNA. (3)

2.4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa - PCR.

Es una técnica de diagnóstico que consiste en la realización de ciclos a

repetición de procesos de: desnaturalización, hibridación y polimerización del ADN, para finalmente conseguir la amplificación del mismo en millones de copias. Esto se logra con la ayuda de una polimerasa termoestable que es capaz de sintetizar la cadena complementaria de cada una de las hebras de ADN, usando un iniciador o cebador (pequeño polinucleotido) complementario a el ADN diana. *“desde el extremo 3`del cebador, la polimerasa va incorporando los nucleótidos complementarios a la cadena de ADN para formar una nueva molécula de ADN bicatenario”* (62).

Extracción de DNA.

Consiste en el aislamiento del material genético, como primer paso para la identificación molecular, resultando imprescindible usar un método que permita la obtención de un DNA de alta pureza, integridad, y calidad(63).Las técnicas de obtención de ADN tienen como objetivo, la separación de este, de todos los componentes celulares obteniendo una preparación homogénea que represente la información genética entera del organismo en estudio (62).En general, los métodos para aislamiento y purificación de ADN comprenden cuatro pasos esenciales: ruptura celular, remoción de proteínas y ARN, concentración de ADN, y determinación de la pureza y cantidad del ADN, los cuales se detallan a continuación (64).

La fase de ruptura celular, comprende básicamente la liberación del DNA intracelular. Normalmente este proceso se realiza con ayuda de un tratamiento enzimático previo (P.ej: lisozima), seguido del uso de agentes químicos y/o mecánicos. A continuación se remueven las proteínas y ARN, o restos celulares no deseados; para este fin, son usados métodos enzimáticos, o aquellos basados en las propiedades físicas y químicas de los ácidos nucleicos y las proteínas (P.ej: la diferencia de solubilidad). La siguiente etapa consiste en realizar procesos de concentración de ADN de alto peso molecular, removiendo nucleótidos, aminoácidos e impurezas de bajo peso molecular remanentes en la solución luego de la ruptura celular, para ello se elabora una precipitación del DNA, comúnmente con alcoholes.(64)

Finalmente, el proceso puede ser evaluado, determinando la concentración y

pureza del ADN, en términos de calidad y cantidad de ADN obtenido (64).

Electroforesis.

Es una técnica que se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Esto es logrado, gracias a la capacidad de las moléculas como: aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, de poseer grupos ionizables y cargados como cationes o aniones. Estas especies cargadas se van a separar en función de su carga cuando se aplica un voltaje a través de los electrodos. El tipo de electroforesis que se usa actualmente es la electroforesis de zona, en la cual la muestra se desplaza sobre un soporte sólido, como papel de filtro, celulosa o gel (agarosa, acrilamida) y los componentes de la muestra migran en forma de pequeñas bandas, también llamadas zonas. Para la separación de moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos es comúnmente utilizada la electroforesis en gel. Para la realización de esta técnica se requieren los siguientes materiales:

- Polímeros: como la poliacrilamida o la agarosa
- Tampón de pH alrededor de 8.

La metodología consiste en sumergir el gel en el tapón y agregar la carga respectiva, para que de esta manera las moléculas de DNA o RNA se desplacen a través del gel hacia el polo positivo (ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa). Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño, van a migrar de forma distinta en un gel de electroforesis. La distancia recorrida por cada fragmento de DNA va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de DNA problema. En el caso de los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz

UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y los marcadores de peso molecular (65).

Secuenciación.

Secuenciación mediante Sanger.

La secuenciación de Sanger se basa en la polimerización del ADN y el uso de dideoxinucleótidos que sirven como terminadores de la reacción. En la actualidad la reacción de secuenciación se basa en una modificación de la PCR con dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos y se resuelve mediante una electroforesis capilar. El sistema más utilizado es el desarrollado por Applied Biosystems (66).

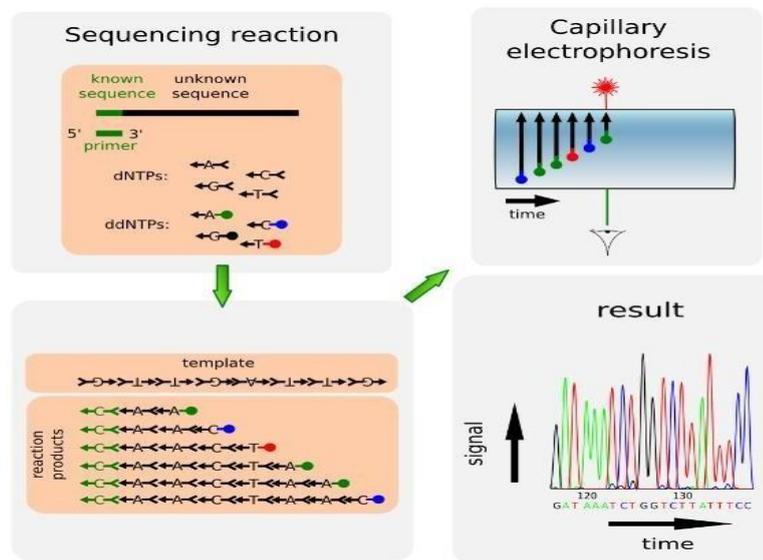


Figura 3 Técnica de secuenciación mediante el método de Sanger (67).

El inconveniente de esta estrategia, venía tras el posterior análisis, cuando las señales fluorescentes requerían de una normalización para tratar de corregir los posibles errores debidos a alteraciones en la movilidad o problemas en la intensidad de emisión. Tras la normalización, la información de la secuencia que aportaba el software quedaba recogido en formato FASTA o bien, en formato FASTQ, el cual también contenía la calidad de la secuencia. Hasta

hace relativamente poco, el método de Sanger ha sido la técnica más empleada para abordar este tipo de estudios, ya que permitía la obtención de lecturas (fragmentos de ácidos nucleicos secuenciados) de alrededor de 1 kb, y de buena calidad, con un error de menos de 1% por base. Sin embargo, no discernía en la detección de homopolímeros, y requería de unos costes que, por entonces, muchos de los laboratorios no se podían permitir. En la actualidad, la secuenciación Sanger ha sido reemplazada para los grandes proyectos por las nuevas estrategias. Sin embargo, sigue siendo utilizada a pequeña escala como método de validación de resultados de las otras técnicas de secuenciación más novedosas (67).

Aspectos de la identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S.

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S incluye tres etapas: a) amplificación del gen a partir de la muestra apropiada; b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, y c) análisis de la secuencia.

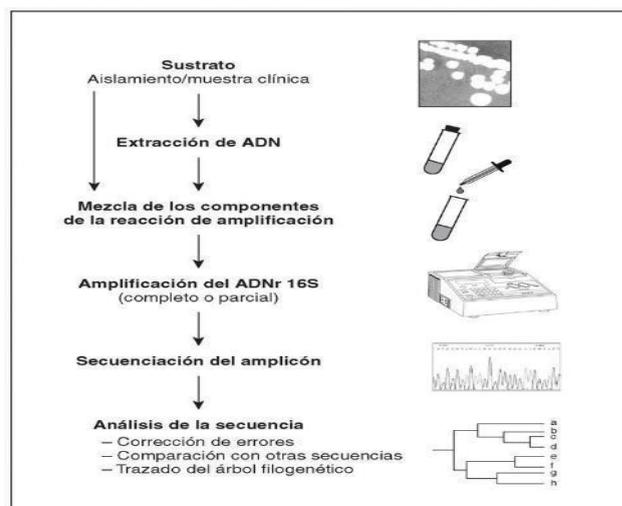


Figura 4 Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S (68).

Bases de datos y estrategias de análisis.

Debido a que la asignación taxonómica se realiza por comparación de secuencias, las bases de datos donde se almacenan estas secuencias, las

herramientas de búsqueda y las estrategias de comparación son primordiales. Existen distintas bases de datos y programas que se pueden utilizar para la asignación taxonómica; cada programa sigue diferentes estrategias de análisis y las bases de datos con las que operan muestran algunas variaciones. El nivel de desarrollo que han alcanzado los estudios sobre el ARNr 16S y sus aplicaciones, ha favorecido el establecimiento de bases de datos específicas, que son herramientas fundamentales para la clasificación taxonómica microbiana. (68)

Bases de datos generales

El Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) de los Estados Unidos es la institución con mayor número de secuencias depositadas en sus bases de datos, el GenBank, con más de 182 millones de registros (Fig. 5). Las secuencias del ARNr 16S están localizadas en dos bases de datos con secuencias de nucleótidos: la base de datos no redundante, que contiene más de 30 millones de registros, y la base de datos 16S, que contiene solamente secuencias (17,600, completas en su mayoría) del ARNr 16S de bacterias y arqueas identificadas. Si bien ambas bases de datos pueden servir como referencia para la búsqueda y comparación de secuencias nucleotídicas, mediante el algoritmo BLAST, la base de datos no redundante es más amplia y contiene las colecciones de secuencias del GenBank, del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI), del Banco de Datos de ADN de Japón (DDBJ), y del Banco de Datos de Proteínas (PDB).

Se le considera no redundante porque en algunos casos las secuencias idénticas han sido fusionadas en una sola entrada, que conserva el número de acceso, el identificador del GenBank, título e información taxonómica para cada secuencia. A través del International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC), la información del GenBank también se puede encontrar en las bases de datos de EMBL-EBI y DDBJ. La INSDC es una iniciativa de larga duración entre DDBJ, EMBL-EBI y NCBI para mantener actualizadas y accesibles las bases de datos de secuencias y la lectura de datos crudos, así como los alineamientos y

ensambles para anotaciones funcionales y con información contextual relacionada a las muestras (69).

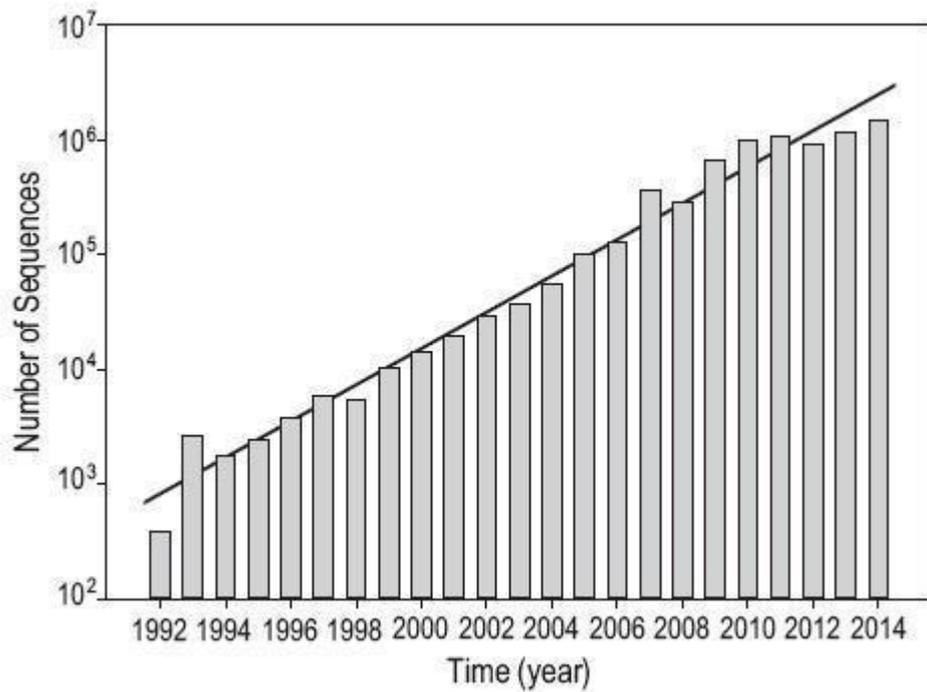


Figura 5 Crecimiento exponencial del número de secuencias ARNr 16S registradas en el GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) de los Estados Unidos (70).

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Tipo de investigación

Cuantitativa, descriptivo explorativo.

3.2 Universo, población, muestra

Universo: Cepario Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Población: Bacterias Gram negativas del Cepario

Muestra: 41 bacterias

3.3. Hipótesis, variables, indicadores

Hipótesis

El uso de microorganismos en investigación, educación y análisis clínicos a lo largo de los años, ha facilitado el estudio de las características de estas especies, conociendo así su modos de comportamiento en diferentes entornos y a diferentes grados de estrés, que facilitan sus altas tasas de mutaciones y grandes problemas en salud pública por la resistencia que se presenta en paralelo al uso de antibióticos de amplio espectro.

Se busca identificar molecularmente 41 bacterias Gram negativas tomadas del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca logrando una afinidad mayor o igual al 97% frente a las bases de datos encontradas en el Genbank.

Variable Independiente: bacterias Gram negativas a nivel fenotípico y genotípico del Cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Variable Dependiente: indicadores bioquímicos y pruebas moleculares para identificación de género y especie a las 41 bacterias Gram negativas

Indicadores

Los indicadores escogidos para evaluar y dar seguimiento a la investigación, fueron los siguientes:

1. Cumplimiento de los protocolos establecidos para la identificación microbiológica y conservación de los microorganismos en estudio
2. Resultados con un porcentaje de aceptación superior a un 95% de identidad significativa, mediante los métodos microbiológicos
3. Resultados con un porcentaje de aceptación superior a un 97% de identidad significativa, mediante los métodos moleculares
4. Divulgación de los resultados y el producto de este proyecto
5. Registro de la colección de microorganismos Gram negativos, ante el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt

En el anexo 6 se presenta el nivel de cumplimiento de los indicadores al finalizar el trabajo. (Ver anexo 1)

3.4. Técnicas y procedimientos

Todos los procesos fueron realizados en cámara de flujo laminar, para conservar la esterilidad de los materiales y evitar su posible contaminación.

FASE 1. Reconocimiento y vinculación con las cepas

- El cepario de la UCMC cuenta con una serie de 41 cepas Gram negativas, las cuales se encuentran disponibles para la realización de clases y otros procesos de importancia en la academia.

En la Fase 1 del proceso investigativo, se efectuó una siembra de inóculo primario, de cada una de las bacterias, a partir de un Agar McConkey que es un medio selectivo diferencial, con inóculos de colonias a una temperatura de 37°C, en un tiempo no superior de 18 a 24 horas, con el fin de determinar la pureza y viabilidad de los microorganismos, observando posteriormente la morfología macroscópica y microscópica de la bacteria, se realizó siembra por agotamiento e identificación con coloración Gram en tiempos: cristal violeta (2min), lugol (5 min), alcohol (30 seg), fuschina (1 min), en frotis de lámina, respectivamente.

- Aquellas cepas que una vez analizadas a nivel macroscópico y microscópico, no contaron con las características específicas de cada especie se les realizó una reactivación, mediante descongelación de semiStock, que se encuentra a una temperatura de -70°C , ya que con anterioridad se encontraban en una suspensión en un caldo con glicerol para evitar criocristalización de la membrana celular bacteriana. Se ejecutó la descongelación de acuerdo a lo mencionado en la fase 2.
- Las cepas que realizadas las verificaciones, confirmaron sus características macroscópicas y microscópicas pasaron a la Fase 3 del proyecto.

FASE 2. Activación de cepas

- La reactivación de cada una de las cepas se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Sánchez y Corrales (2005) (32), donde se seleccionó las cepas a trabajar almacenadas a -70°C . Se efectuó su correcta descongelación a una temperatura ambiente por un tiempo de 15 a 30 minutos para evitar, afectar la membrana bacteriana por los cambios fuertes de temperatura.
- Posteriormente se pasó el contenido a tubos con caldo BHI (Brain Heart Infusion), para luego, incubar a 37°C durante 18 a 24 horas.
- Pasado el tiempo de incubación se observó el crecimiento en los tubos por la presencia de turbidez, y subsiguientemente fue sembrada con asa microbiológica parte del contenido, de estos tubos, en agar McConkey, para incubar a 37°C durante 18 a 24 horas.
- Consecutivamente se verificó las siembras en agar McConkey, con el fin de analizar la pureza y la viabilidad de cada una de las cepas utilizadas, realizando el mismo proceso de la Fase 1, observando características macroscópicas de las colonias y características microscópicas a través de la coloración de Gram.

FASE 3. Confirmación del perfil bioquímico de los microorganismos

- Con el fin de determinar la correcta identificación de las cepas, y confirmar las especies de los mismos, se utilizó el sistema de identificación rápido BBLCrystal para Gram negativos.
- Se siguió el protocolo del Kit BBL Crystal para Gram negativos, partiendo de una siembra de no más de 18 horas de incubación, en condiciones asépticas, tomamos una azada del cultivo del microorganismo y se resuspendió en el líquido de inoculación que provee el kit hasta que se observó turbiedad, se realizó comparación con escala de Mcfarland 0.5.
- Fue vertido el contenido en la base de color negro del Kit. Después, se distribuyó por todo el canal, con el fin de llenar todos los pocillos. Se regresó el exceso de inóculo concentrado a un costado de la base. Se abrió el empaque que contiene los 30 pozos con los diferentes medios de cultivo para la reacción y se colocó sobre la base, alineándolo hasta que hiciera un “clic”. Posteriormente se ubicó sobre la base blanca un poco de agua, para evitar la desecación. Se incubó por 24 Horas, a 35°C.
- A continuación se efectuó lectura después de las 24 horas comparando los cambios evidenciados por el cambio de color en una tira de colores establecida por el Kit comercial para bacterias Gram Negativas.
- Luego se tomaron los resultados obtenidos en un formato de llenado suministrado por el Kit comercial, que contiene



Figura 6 Esquematización de panel de reacciones fermentativas para identificación de bacterias Gram Negativas. (71)

Cálculo del número de perfil de BBL Crystal

- A cada resultado del análisis con un resultado positivo se le asignó un valor de 4, 2, ó 1, correspondiendo a la fila donde está ubicado el análisis. Se asignó un valor de 0 (cero) a cualquier resultado negativo. Después se sumaron los números (valores) resultantes de cada reacción positiva en cada columna. Se generó un número de 10 dígitos; éste es el número de perfil.

Ejemplo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
2	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Perfil	5	4	6	0	2	4	4	3	7	1

Figura 7 Representación esquemática de perfiles bioquímicos de positividad y negatividad para bacterias Gram negativas Autores Guzmán y Moreno 2018

- El número de perfil resultante y los resultados del análisis fueron de línea con el (indol y oxidasa), se introdujeron en un software en el que se encontraba instalado el libro de códigos electrónico del sistema BBL CrystalID, para obtener la identificación. También hay disponible un libro de códigos manual.
- Para los resultados aportados por el BBLCrystal para Gram negativos, se tuvo en cuenta un porcentaje de aceptación superior al 95% de especificidad, para que las bacterias pasasen a la FASE 4 del proceso investigativo.

FASE 4. Preparación de muestras para biología molecular

- Una vez identificados bioquímicamente, los microorganismos fueron almacenados a 4°C para su posterior caracterización molecular.
- En el proceso de la Fase 4, se empleó un nuevo pase del microorganismo en agar McConkey y se incubó a 37°C durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se usaron tubos eppendorf para dispensar 800 ul de caldo LB (Luria Bernati) con el inóculo obtenido del agar y se efectuó siembra con asa microbiológica, se incubó a 37°C durante 24 horas, en agitación constante con un agitador automatizado (250 rpm).
- Tras la incubación, los tubos fueron centrifugados en una microcentrifuga *sigma*, por 10 min a 13.000 rpm. Se descartó el sobrenadante, conservando el pellet el cual fue refrigerado a 4°C.

FASE 5. Biología molecular

- De las 41 cepas analizadas se eligieron 26 para la fase de secuenciación por cuestiones presupuestales del proyecto.

- A las 41 muestras bacterianas, seleccionadas para la extracción de DNA, se usó el Kit Zymo Research Quick-DNA Universal, que permitió extraer el material genético aislándolo de proteasas y nucleasas que pudieran degradar el material genético bacteriano, mediante unas columnas de elusión en forma de Spin (Rodillo). Que facilito la obtención de productos purificados de una manera más eficiente que otros Kits comerciales.



Figura 8 Representación de Columna Kit Zymo Research DNA (98)

-Posteriormente se efectuó la amplificación del material genético mediante una PCR convencional, la amplificación de la región 16S por PCR se realizó utilizando los cebadores 16S-8F 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3 y 16S-1492R 5'- ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3 suministrados por la empresa IDT (Integrated DNA Technologies), este par de cebadores amplifica un fragmento de aproximadamente 1.500 pb del gen 16S rRNA y se considera que es universal para el dominio *Bacteria*(72), la enzima utilizada fue OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix with Standard Buffer de New England Biolabs (Inglaterra).

A continuación se describen las cantidades utilizadas de cada reactivo para la preparación de la Master Mix.

Tabla 2 Master Mix para llevar a cabo la PCR volumen final de 50 microlitros

Componente	Concentración para volumen final de 50,0µl
OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix	25,0 µl
Primer 16S-8F	1,0 µl
Primer 16S-1492R	1,0 µl
Agua Desionizada	21,0 µl
DNA (10ng/µl)	2,0 µl

Autores Guzmán y Moreno 2018

- Se utilizó el termociclador (Multigene Optimax Labnet), agregando las muestras en la base del termociclador y programando la amplificación para gen 16s DNA, se programó para efectuar ciclos de amplificación. Que se describen a continuación

Tabla 3 Condiciones de PCR para la amplificación de la región 16S

Desnaturalización	94°C, 10 min	
Desnaturalización	94°C, 30 min	35-40 ciclos
Anillamiento	50°C, 1:30 min	
Extensión	72°C, 2 min	
Extensión final	72°C, 15 min	

Autores Guzmán y Moreno 2018

A continuación se realizó un protocolo de verificación donde se comparó en un gel de agarosa al 2%, teñido con GelGreen Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in wáter (Probiotek), el éxito de la extracción de ADN y el producto de amplificación de PCR, adicionando el marcador de peso molecular Hyperlander II y un control negativo.

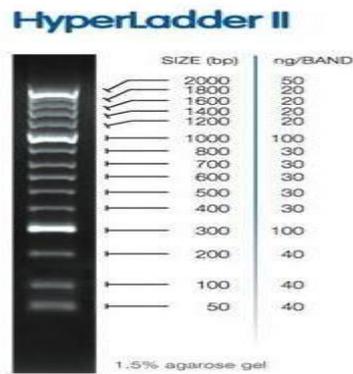


Figura 9 Rango de cobertura del marcador de peso molecular Hyperladder II (73)

- Los productos de PCR de la región 16S-8F; 16S-1492R de las 41 bacterias fueron observados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. De los 50µl de producto, fueron sembrados en los geles 15µl para su observación y los restantes 35µl fueron conservados a 4°C hasta su envío al servicio de secuenciación en Corpogen.
- Se enviaron los 26 productos de amplificación de PCR, para su respectiva secuenciación mediante método de Sanger en electroforesis capilar. Finalmente, se realizó la edición de los datos recibidos de las secuenciaciones por medio de una homología con el programa Chromas Lite (versión 2.6.5), para comparar el resultado de las secuencias obtenidas con las bases de datos pertenecientes al GenBank del NCBI (USA) con el algoritmo BLASTn, asumiendo una identidad significativa superior o igual al 97% con respecto a la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

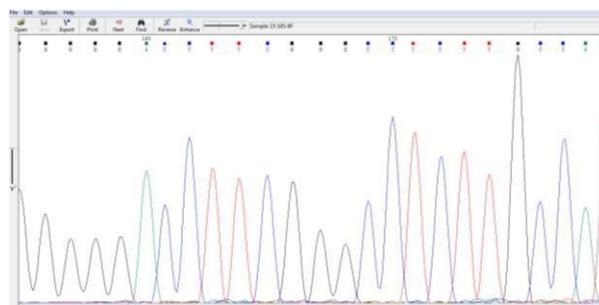
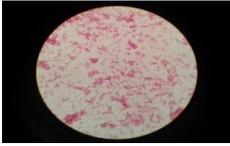
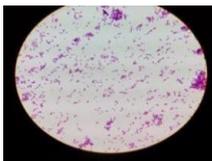
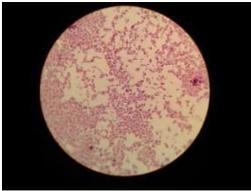
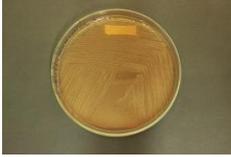
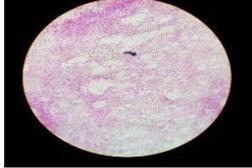
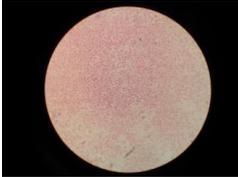
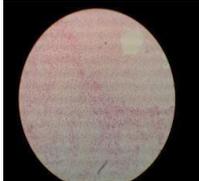
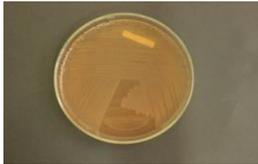
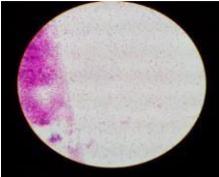
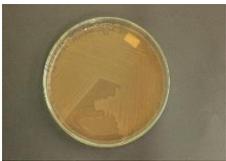
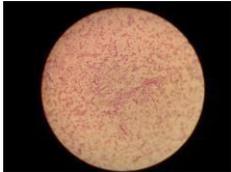


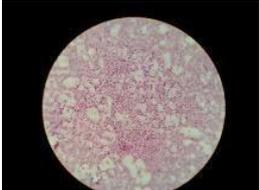
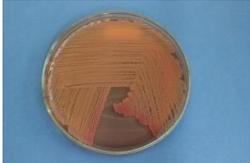
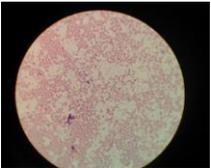
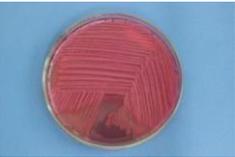
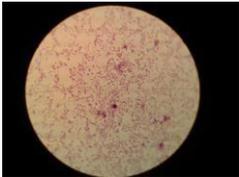
Figura 10 Representación electroferograma secuencia bacteriana Autores Guzmán y Moreno 2018.

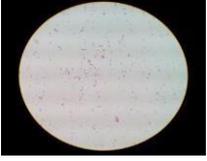
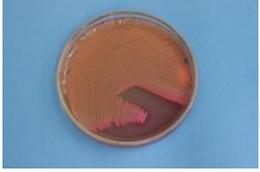
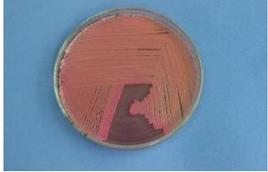
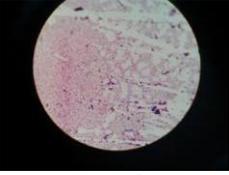
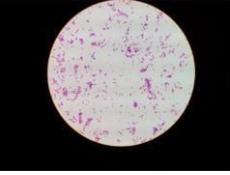
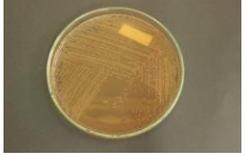
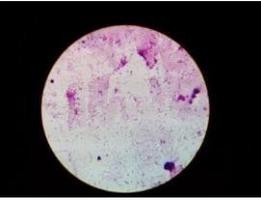
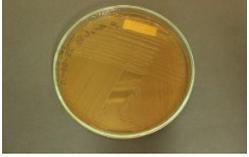
4. RESULTADOS

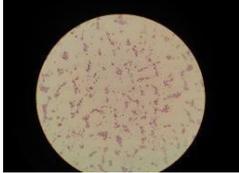
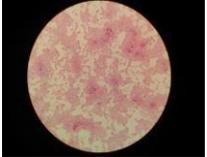
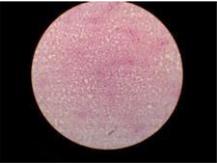
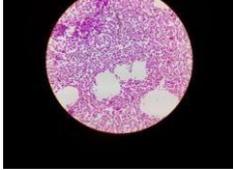
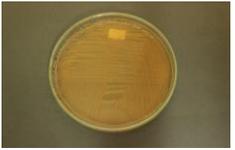
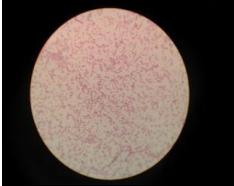
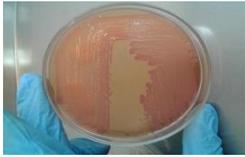
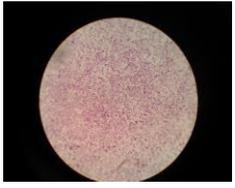
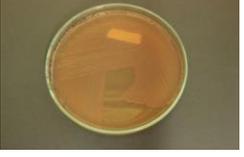
FASE 1: En esta fase se realiza aislamiento de un pase primario de Agar MacConkey a un nuevo Agar McConkey y se incubo a 37°C por 24 horas, pudiendo observar que, 41 de las bacterias mostraron características compatibles y algunas de ellas mostraron variabilidad en la fermentación de lactosa. A 3 cepas pertenecientes al género *Shigella*, se les realizo reactivación (Fase 2). Los resultados se muestran a continuación en la Figura 11.

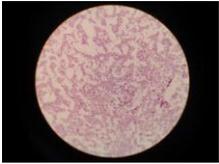
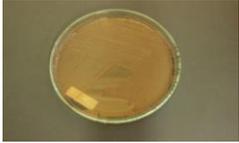
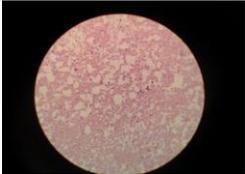
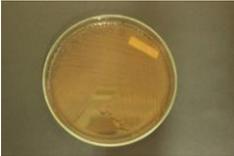
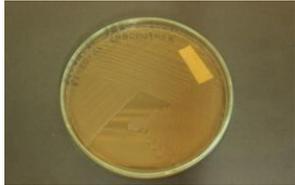
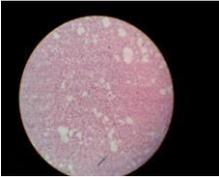
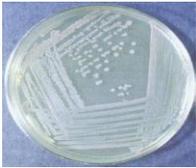
Resultado de la tinción de Gram	Resultado cultivo en agar MacConkey	Resultado de la tinción de Gram	Resultado cultivo en agar MacConkey
002 <i>Escherichia coli</i> ATCC		004 <i>Escherichia coli</i> nativa	
 <p>Bacilos gruesos Gram negativos pequeños, no esporulados.</p>	 <p>Colonias grandes y rojas con un halo turbio. Lactosa positiva.</p>	 <p>Cocobacilos Gram negativos pequeños.</p>	 <p>Colonias grandes y rojas con un halo turbio. Lactosa positiva.</p>
007 <i>Escherichia coli</i> polifenoles		016 <i>Shigella sonnei</i>	
 <p>Cocobacilos Gram negativos pequeños.</p>	 <p>Colonias grandes y rojas con un halo turbio. Lactosa positiva.</p>	 <p>Bacilos Gram negativos con extremos redondeados.</p>	 <p>Colonias incoloras y transparentes, redondas, borde irregular, no pigmentadas. Lactosa negativa.</p>

015 <i>Shigella dysenteriae</i>		017 <i>Shigella flexnerii</i>	
			
Bacilos Gram negativos con extremos redondeados.	Colonias incoloras y transparentes, redondas, borde irregular, no pigmentadas. Lactosa negativa.	Bacilos Gram negativos con extremos redondeados.	Colonias incoloras y transparentes, redondas, borde irregular, no pigmentadas. Lactosa negativa.
019 <i>Salmonella enteritidis</i>		020 <i>Salmonella typhi</i>	
			
Bacilos relativamente gruesos Gram negativos pequeños	Colonias incoloras transparentes. Lactosa negativa.	Bacilos relativamente gruesos Gram negativos pequeños	Colonias incoloras transparentes. Lactosa negativa.
021 <i>Salmonella typhimurium</i>		028 <i>Citrobacter Diversus</i>	
			
Bacilos relativamente gruesos Gram negativos pequeños.	Colonias incoloras transparentes. Lactosa negativa.	Bacilos Gramnegativos rectos.	Colonias lisas, convexas y circulares de bordes definidos. Lactosa positiva.

029 <i>Citrobacter koseri</i>		030 <i>Citrobacter freundii</i>	
			
Bacilos Gram negativos rectos.	Colonias lisas, convexas y circulares de bordes definidos. Lactosa negativa.	Bacilos Gram negativos rectos.	Colonias lisas, convexas y circulares de bordes definidos. Lactosa positiva.
032 <i>Enterobacter cloacae</i>		033 <i>Enterobacter gergoviae</i>	
			
Bacilos Gram negativos.	Colonias lisas, húmedas, grises, mucoides de color rosa pálido. Lactosa débilmente positiva.	Bacilos Gram negativos.	Colonias lisas, húmedas, grises, mucoides de color rosa pálido. Lactosa débilmente positiva.
034 <i>Enterobacter aerogenes</i>		037 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
			
Bacilos Gram negativos	Colonias lisas, húmedas, grises, mucoides de color rosa pálido. Lactosa positiva.	Cocobacilos Gram negativos.	Colonias grandes rosadas mucosas. Lactosa positiva.

040 <i>Klebsiella pneumoniae</i> suelo		038 <i>Klebsiella oxytoca</i>	
			
Cocobacilos Gram negativos	Colonias grandes rosadas mucosas, Lactosa positiva.	Cocobacilos Gram negativos	Colonias grandes, mucosas de color rosado pálido. Lactosa positiva.
039 <i>Klebsiella ozaenae</i>		041 <i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	
			
Cocobacilos Gram negativos	Colonias incoloras mucosas. Lactosa negativa.	Cocobacilos Gram negativos	Colonias grandes rosadas mucosas. Lactosa positiva.
043 <i>Serratia marcescens</i>		044 <i>Serratia liquefaciens</i>	
			
Bacilos Gram negativos.	Colonias sin pigmento, mucoides, pequeñas. Lactosa negativa.	Bacilos Gram negativos.	Colonias pigmentadas, mucoides, pequeñas. Lactosa negativa.
046 <i>Proteus mirabilis</i>		047 <i>Proteus vulgaris</i>	
			
Bacilos Gram negativos	Colonias incoloras, con crecimiento superficial extensivo (swarming). Lactosa negativa.	Bacilos Gram negativos	Colonias incoloras, con crecimiento superficial extensivo (swarming). Lactosa negativa.

048 <i>Providencia rettgeri</i>		050 <i>Pantoea agglomerans</i>	
			
Bacilos Gram negativos largos	Colonias incoloras, pequeñas, puntiformes, borde definido. Lactosa negativa.	Bacilo Gram negativo	Colonias incoloras, pequeñas, mucosas, borde definido. Lactosa negativa.
052 <i>Hafnia alvei</i>		053 <i>Morganella morganii</i>	
			
Bacilos Gram negativos.	Colonias incoloras, translúcidas, convexas. Lactosa negativa.	Bacilos Gram negativos.	Colonias pequeñas, bordes irregulares, incoloras, brillantes. Lactosa negativa.
054 <i>Yersinia enterocolitica</i>		055 <i>Aeromonas hydrophila</i>	
			
Cocobacilos Gram negativos.	Colonias puntiformes incoloras. Lactosa negativa.	Bacilos Gram negativos curvos.	Colonias incoloras, circulares, translúcidas. Lactosa negativa.
058 <i>Pseudomona putida</i>		060 <i>Pseudomona fluorescens</i>	
			
Bacilos Gram negativos cortos	Colonias incoloras, bordes irregulares, convexas, lisas, pueden producir pigmento. Lactosa negativa.	Bacilos Gram negativos cortos	Colonias incoloras, bordes irregulares, convexas, lisas, pueden producir pigmento. Lactosa negativa.

061 <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC		062 <i>Pseudomona aeruginosa</i> ambiental	
			
Bacilos Gram negativos cortos.	Colonias incoloras, bordes irregulares, convexas, lisas. Lactosa negativa.	Bacilos Gram negativos.	Colonias incoloras, bordes irregulares, convexas, lisas. Lactosa negativa
059 <i>Burkholderia cepacia</i>		063 <i>Xanthomona axonopolis</i>	
			
Bacilos Gram negativos.	Colonias pequeñas, mucoides, brillantes, bordes irregulares. Lactosa negativa.	Bacilos Gram negativos.	Colonias mucoides, convexas, bordes irregulares. Lactosa negativa.
064 <i>Vibrio alginolyticus</i>		065 <i>Vibrio metschnikovii</i>	
			
Bacilos cortos curvos Gram negativos.	Crecimiento en Agar nutritivo con adición de NaCl 1% Colonias Blanquecinas, planas con bordes definidos	Bacilos cortos curvos Gram negativos.	Crecimiento en Agar nutritivo con adición de NaCl 1% Colonias Blanquecinas, planas con bordes definidos

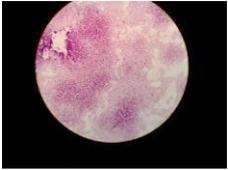
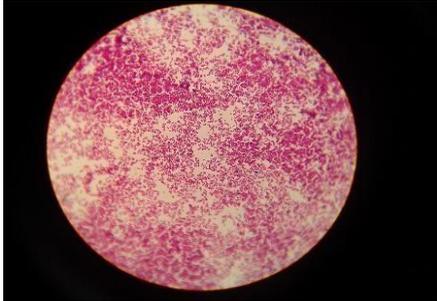
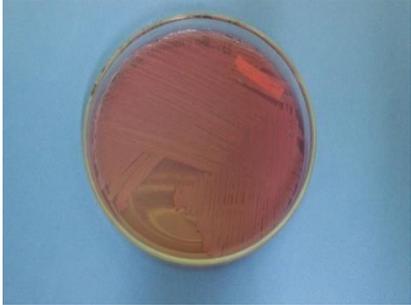
066 <i>Plesiomonas shigelloides</i>		057 <i>Stenotrophomona maltophilia</i>	
			
Bacilos Gram negativos.	Colonias pequeñas, bordes irregulares, planas. Lactosa negativa.	Bacilos Gram negativos pequeños.	Colonias rugosas, pequeñas, color amarillo verdoso, brillante. Lactosa negativo.
072 <i>Acinetobacter baumannii</i>			
			
Bacilos Gram negativos.		Colonias generalmente no pigmentadas ,mucoides, pequeñas, grises, bordes indefinidos. Lactosa negativa.	

Figura 11. Características microscópicas y macroscópicas de las bacterias en estudio. Autores. Guzmán y Moreno 2018.

FASE 3: Mediante el sistema de identificación rápido BBLCrystal, se identificaron las bacterias que se describen en la (tabla 4) y usando el método tradicional de pruebas bioquímicas en tubo se identificaron las bacterias descritas en la (tabla 5). Todas ellas tuvieron un porcentaje de aceptación superior al 95% de identidad, con lo que finalmente las 41 cepas, tuvieron nuevamente resultados correctos y fue posible continuar con la siguiente fase.

Tabla 4. Porcentaje de identificación de sistema BBL Crystal 41 bacterias Gram Negativas

Código Interno Cepario	Bacteria del Cepario	Gram	Crecimiento agar McConkey	Porcentaje de similitud sistema identificación BBL Crystal	Oxidasa	Indol
002	<i>Escherichia coli</i> ATCC	Bacilos Negativos	Lac Positiva	99.7%	Neg	Pos
004	<i>Escherichia coli</i> Nativa	Cocobacilos Negativos	Lac Positiva	99.9%	Neg	Pos
007	<i>Escherichia coli</i> Polifenoles	Cocobacilos Negativos	Lac Positiva	98.3%	Neg	Pos
016	<i>Shigella sonnei</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	Indeterminado	Neg	Neg
015	<i>Shiguella dysenteriae</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	Indeterminado	Neg	Var
017	<i>Shiguella flexneri</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	Indeterminado	Neg	Neg
019	<i>Salmonella enteritidis</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	97.2%	Neg	Neg
020	<i>Salmonella typhi</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	99.0%	Neg	Neg
021	<i>Salmonella typhimurium</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	99.0%	Neg	Neg
028	<i>Citrobacter diversus</i>	Bacilos Negativos	Lac Positiva	99.9%	Neg	Pos
029	<i>Citrobacter koseri</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	99.9%	Neg	Pos
030	<i>Citrobacter freundii</i>	Bacilos Negativos	Lac Positiva	99.9%	Neg	Var
032	<i>Enterobacter cloacae</i>	Bacilos Negativos	Lac debilmente Positiva	99.0%	Neg	Neg
033	<i>Enterobacter gergoviae</i>	Bacilos Negativos	Lac debilmente Positiva	95.9%	Neg	Neg
034	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Bacilos Negativos	Lac debilmente Positiva	95.6%	Neg	Neg
037	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cocobacilos Negativo	Lac Positiva	96.2%	Neg	Neg
038	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cocobacilos Negativo	Lac Positiva	99.2%	Neg	Neg
039	<i>Klebsiella ozaenae</i>	Cocobacilos Negativos	Lac Negativa	99.6%	Neg	Neg
041	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	Cocobacilos Negativos	Lac Positiva	99.8%	Neg	Neg
040	<i>Klebsiella pneumoniae suelo</i>	Cocobacilos Negativos	Lac Positiva	96.2%	Neg	Neg

043	<i>Serratia marcescens</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	99.9%	Neg	Neg
044	<i>Serratia liquefaciens</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	99.9%	Neg	Neg
046	<i>Proteus mirabilis</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	99.7%	Neg	Neg
047	<i>Proteus vulgaris</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	99.9%	Neg	Pos
048	<i>Providencia rettgeri</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	99.9%	Neg	Pos
050	<i>Pantoea agglomerans</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	Indeterminado	Neg	Var
052	<i>Hafnia alvei</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	99.9%	Neg	Neg
053	<i>Morganella morganii</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	96.4%	Neg	Pos
054	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cocobacilos Negativos	Lac Negativa	99.9%	Neg	Var
055	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	95.7%	Pos	Var
058	<i>Pseudomonas putida</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	95.4%	Pos	Neg
059	<i>Burkholderia cepacia</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	97.2%	Deb	Neg
060	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	Indeterminado	Neg	Neg
061	<i>Pseudomonas aeruginosa ATCC</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	99.4%	Neg	Neg
062	<i>Pseudomonas aeruginosa Ambiental</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	99.3%	Neg	Neg
063	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	Indeterminado	Neg	Neg
064	<i>Vibrio anginolyticus</i>	Bacilos curvos Negativos	Se evidencio crecimiento Agar Nutritivo 1% NaCl	99.4%	Pos	Neg
065	<i>Vibrio metschnikovii</i>	Bacilos curvos Negativos	Se evidencio crecimiento Agar Nutritivo 1% NaCl	99.9%	Neg	Neg
066	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	99.9%	Pos	Neg
057	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	Indeterminado	Neg	Neg

072	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Bacilos Negativos	Lac Negativa	99.3%	Neg	Neg
-----	--------------------------------	-------------------	--------------	-------	-----	-----

Nomenclatura: Lac: Lactosa, Pos: Resultado positivo, Neg: Resultado negativo, Var: Resultado variable i/o débilmente, Indeterminado: Señala las bacterias que durante el análisis en el sistema BBL Crystal no se logró una similitud con lo reportado en las bases de datos del programa BBL Crystal o difería la especie analizada

Autores Guzmán y Moreno 2018

Tabla 5. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas en tubo a las cepas indeterminadas en el estudio.

Codig o	MICROOR GANISMO	OXID ASA	CATAL ASA	T SI H ₂ S	LI A	MI O	U R E A	C S	F E A	M O T	N I T R	R M	V P	G L U	S A C	L A C	M A N	LI S	A R G	ORN
016	<i>Shigella sonnei</i>	N	P	H ₂ S: :N	K/A	I: N	N	N	N	N	P	P	N	V	N	N	P	N	N	P
015	<i>Shigella dysenteriae</i>	N	P	H ₂ S: :N	K/A	I: V	N	N	N	N	P	P	N	V	N	N	P	N	N	N
017	<i>Shigella flexnerii</i>	N	P	H ₂ S: :N	K/A	I: N	N	N	N	N	P	P	N	V	N	N	P	N	N	N
050	<i>Pantoea agglomerans</i>	N	P	H ₂ S: :N	K/A	I: V	V	V	V	P	P	V	P	V	V	V	V	N	N	N
060	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	P	N	H ₂ S: :N	K/K	I: N	V	P	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	N
063	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	N	P	H ₂ S: :N	K/K	I: N	N	V	N	P	N	P	N	P	P	N	A	P	P	N
057	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	N	P	H ₂ S: :N	K/K	I: N	N	V	N	P	V	P	N	V	N	A	P	N	P	N

Nomenclatura: **N:** Resultado negativo, **P:** Resultado positivo, **V:** Resultado variable i/o indiferenciable, **H₂S:** Bacterias productoras de Ácido sulfhídrico, **LIA:** Agar de hierro y lisina, **MIO:** Movilidad, Indol, Ornitina, **CS:** Simmons Citrato, **FEA:** Fenilalanina, **MOT:** Motilidad, **NITR:** Nitratos, **RM:** Rojo de Metilo, **VP:** Voges Proskauer, **GLU:** Glucosa, **SAC:** Sacarosa, **LAC:** lactosa, **MAN:** Manitol, **LIS:** Lisina, **ARG:** Arginina, **ORN:** Ornitina, **K/A:** Se observa tubo color violeta en la superficie y amarillo en el fondo, el color amarillo se debe a la fermentación de glucosa. Puede haber o no producción de gas. Se interpreta Lisina negativa. Quiere decir que no descarboxilo ni desamino la lisina. **K/K:** Se observa tubo color violeta, descarboxilación de la lisina con producción o no de gas. Se interpreta Lisina Positiva. **NA:** No aplica

Autores Guzmán y Moreno 2018

FASE 4 Y 5: Los resultados de la evaluación del producto extraído y amplificado mediante PCR, con gel de agarosa, pueden ser visualizados en las figuras 10,11.12.13:



Figura 12. Electroforesis bacteriana 1 Autores Guzmán y Moreno 2018

Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GelGreen Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water (Probiotek) de ADN genómico extraído mediante el Kit Zymo Research Quick-DNA Universal, a partir de cultivos bacterianos, 1: *E. coli* nativa, 2: *E. coli* polifenoles, 3: *S. flexneri*, 4: *E. aerogenes*, 5: *S. dysenteriae*, CN: Control negativo de la PCR (H₂O desionizada), 6: *C. koseri*, *E. cloacae*, 7: *K. pneumoniae*, 8: *S. sonnei*, 9: *K. oxytoca*, 10: *C. diversus*, 11: *E. gergoviae*, 12: *E. coli* ATCC, 13: *S.typhi*,14: *A. baumannii*, 15: *S. typhimurium*, 16: *C. freundii*, 17: *E. cloacae*, 18: *S. enteritidis*, MP: Marcador de peso molecular.

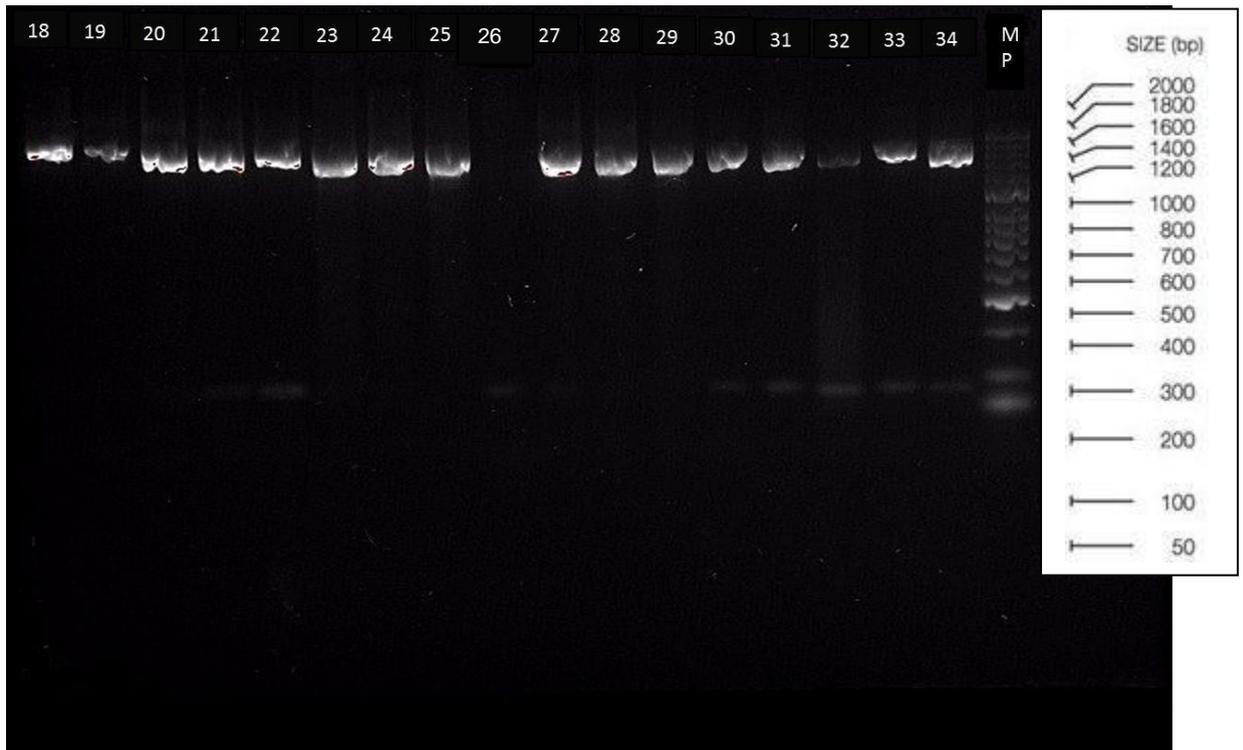


Figura 13.Electroforesis bacteriana 2 Autores Guzmán y Moreno 2018

Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GelGreen Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water (Probiotek) de ADN genómico extraído mediante el Kit Zymo Research Quick-DNA Universal a partir de cultivos bacterianos, 18:*K.ozaenae*, 19:*K. rhinoscleromatis*, 20:*K.pneumoniae* suelo, 21:*S. marcescens*, 22: *S. liquefaciens*, 23:*P. mirabilis*, 24:*P. vulgaris*, 25:*P. rettgeri*, 26: *P. agglomerans*, 27:*H. halvei*, 28:*M. morgani*, 29:*Y. enterocolitica*, 30:*A. hydrophila*, 31:*P. putida*, 32:*B. cepacea*, 33:*P. fluorescens*, 34:*P. aeruginosa* ATCC, MP: marcador de peso molecular 1500 pb, CN: Control negativo de la PCR (H₂O desionizada).



Figura 14. Electroforesis bacteriana 3 Autores Guzmán y Moreno 2018

Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GelGreen Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in wáter (Probiotek) de ADN genómico extraído mediante el Kit Zymo Research Quick-DNA Universal a partir de cultivos bacterianos, 35:*P.aeruginosa ambiental*, 36: *Xanthomona spp.*, 37:*V.angynoliticus*, 38:*V.metschnikovii*, 39:*P.shigelloides*, 40: *S. maltophilia*, 41: *K. oxytoca*, MP: Marcador de peso molecular 1500 pb, CN: Control negativo de la PCR (H₂O desionizada).

De las 41 bacterias, fueron escogidas 26 para secuenciar. Estas secuencias finalmente fueron compradas con las bases de datos pertenecientes al GenBank del NCBI (USA) con el algoritmo BLASTn, para comparar los dos algoritmos y así determinar género y especie de las bacterias estudiadas basándose en las bases de datos que contiene este programa, el cual puede ser consultado a nivel mundial y se agregan diariamente nuevos especímenes para enriquecer la información. En la tabla 6 se presenta las 26 bacterias

editadas, comparadas y confirmadas con BLAST. Ver tabla 6.

Los resultados obtenidos tras la secuenciación, se presentan como electroferogramas y pueden ser consultados en el Anexo 2.

Tabla 6. Comparación de 41 bacterias Gram negativas reconfirmadas por BBL Crystal y 26 bacterias Gram Negativas secuenciadas, editadas, comparadas y confirmadas con BBL Crystal y BLAST.

Código	Aislamiento	Nombre de bacteria	Porcentaje identidad BBL Crystal	Bacteria reportada BBL Crystal	Dirección de la secuencia	Porcentaje de Identidad	Bacteria Reportada en Blast	Acceso Gen Bank
002	Donación secretaria de salud	<i>Escherichia coli ATCC</i>	99.7%	<i>Escherichia coli</i>	Forward	98%	<i>Escherichia coli</i> strain FORC_042 chromosome, complete genome	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/C_P025318.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=1&RID=8R4EA44301R
					Reverse	98%		
004	Donación ICA	<i>Escherichia coli Nativa</i>	99.9%	<i>Escherichia coli</i>	Forward	99%	<i>Escherichia coli</i> strain 14EC033 chromosome, complete genome	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/C_P024147.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=5&RID=7ES69R6P015
					Reverse	99%		
007	Donación ICA	<i>Escherichia coli Polifenoles</i>	98.3%	<i>Escherichia coli</i>	Forward	99%	<i>Escherichia coli</i> strain XX13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MG735731.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=1&RID=7ERZVXJK015
					Reverse	98%		
016	Donación secretaria de salud	<i>Shigella sonnei</i>	Confirma da con técnica en tubo	<i>Shigella spp.</i>	Forward	98%	<i>Shigella flexneri</i> strain 9oft3aii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MG639914.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=1&RID=7ERWTA6G015
					Reverse	99%		

015	Donación secretaria de salud	<i>Shiguelia dysenteriae</i>	Confirma da con técnica en tubo	<i>Shiguelia</i> spp.	Forward	97%	<i>Shigella dysenteriae</i> strain ISO2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY971287.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=1&RID=93FYVXFP015
					Reverse	97%		
017	Donación secretaria de salud	<i>Shiguelia flexneri</i>	Confirma da con técnica en tubo	<i>Shiguelia</i> spp.	No se realizó pruebas moleculares			
019	Donación secretaria de salud	<i>Salmonella enteritidis</i>	97.2%	<i>Salmonella</i> spp.	Forward	98%	<i>Salmonella enterica</i> strain MFDS1004024 chromosome, complete genome	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP025745.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=2&RID=7ERF35F8014
					Reverse	97%		
020	Donación secretaria de salud	<i>Salmonella typhi</i>	99.0%	<i>Salmonella</i> spp.	No se realizó pruebas moleculares			
021	Donación secretaria de salud	<i>Salmonella typhimurium</i>	99.0%	<i>Salmonella</i> spp.	Reverse	99%	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> isolate VNB151-sc-2315230 genome assembly, chromosome: 1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/LT795114.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=15&RID=7ERN9AJ4014
					Forward	99%		
028	Donación secretaria de salud	<i>Citrobacter diversus</i>	99.9%	<i>Citrobacter</i> spp.	No se realizó pruebas moleculares			

029	Donación secretaria de salud	<i>Citrobacter koseri</i>	99.9%	<i>Citrobacter</i> spp.	Forward	98%	<i>Citrobacter koseri</i> partial 16S rRNA gene, strain HAMBI 1287	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/LT899939.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=2&RID=EKWAEDNH01R
					Reverse	97%		
030	Donación secretaria de salud	<i>Citrobacter freundii</i>	99.9%	<i>Citrobacter</i> spp.	Forward	97%	<i>Citrobacter freundii</i> strain W-R-4-3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KU570381.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=1&RID=8R72BSB4015
					Reverse	97%		
032	Donación secretaria de salud	<i>Enterobacter cloacae</i>	99.0%	<i>Enterobacter</i> spp.	Forward	99%	<i>Enterobacter cloacae</i> strain RCB96216S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KT261174.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=1&RID=ECSF6MW3014
					Reverse	99%		
033	Donación secretaria de salud	<i>Enterobacter gergoviae</i>	95.9%	<i>Enterobacter</i> spp.	No se realizó pruebas moleculares			
034	Donación secretaria de salud	<i>Enterobacter aerogenes</i>	95.6%	<i>Enterobacter</i> spp.	Forward	97%	<i>Enterobacter aerogenes</i> strain Z90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KF835768.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=1&RID=8R2KSSR001R
					Reverse	97%		

037	Donación secretaria de salud	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96.2%	<i>Klebsiella</i> spp.	No se realizó pruebas moleculares			
038	Donación ICA	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99.2%	<i>Klebsiella</i> spp.		99%	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain AA18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MG571764.1?report=genbank&log\$=nucletop&blast_rank=6&RID=7ER5VAX5014
						97%		
039	Donación secretaria de salud	<i>Klebsiella ozaenae</i>	99.6%	<i>Klebsiella</i> spp.	No se realizó pruebas moleculares			
041	Donación secretaria de salud	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	99.8%	<i>Klebsiella</i> spp.	Forward	98%	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain CIFT MFB 10569(4F11) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KP240959.1?report=genbank&log\$=nucletop&blast_rank=1&RID=7ESCE68H014
					Reverse	98%		
040	Donación secretaria de salud	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Suelo	96.2%	<i>Klebsiella</i> spp.	Forward	100%	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain B12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KJ160218.1?report=genbank&log\$=nucletop&blast_rank=4&RID=EBXGAZAV01R
					Reverse	100%		
043	Donación secretaria de salud	<i>Serratia marcescens</i>	99.9%	<i>Serratia</i> spp.	No se realizó pruebas moleculares			

044	Donación secretaria de salud	<i>Serratia liquefaciens</i>	99.9%	<i>Serratia</i> spp.	Forward	97%	<i>Serratia plymutica</i> . JD8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KJ191397.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=1&RID=93GD8H9Y014
046	Donación secretaria de salud	<i>Proteus mirabilis</i>	99.7%	<i>Proteus</i> spp.	Forward	100%	<i>Proteus mirabilis</i> strain AUMC B-199 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MG066449.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=1&RID=7EPXJHN1014
					Reverse	99%		
047	Donación secretaria de salud	<i>Proteus vulgaris</i>	99.9%	<i>Proteus</i> spp.	No se realizó pruebas moleculares			
048	Donación secretaria de salud	<i>Providencia rettgeri</i>	99.9%	<i>Providencia</i> spp.	No se realizó pruebas moleculares			
050	Donación secretaria de salud	<i>Pantoea aglomerans</i>	Confirma da con técnica en tubo	<i>Pantoea</i> spp.	No se realizó pruebas moleculares			
052	Donación secretaria de salud	<i>Hafnia alvei</i>	99.9%	<i>Hafnia</i> spp.	Forward	97%	<i>Hafnia alvei</i> strain SP19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JN409468.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=8&RID=7EPUN4PD014
					Reverse	98%		
053	Donación secretaria de salud	<i>Morganella morganii</i>	96.4%	<i>Morganella</i> spp.	Forward	99%	<i>Morganella morganii</i> strain wf-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KT029128.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=1&RID=7EPRY79D014
					Reverse	99%		

054	Donación secretaria de salud	<i>Yersinia enterocolitica</i>	99.9%	<i>Yersinia</i> spp.	Forward	99%	Uncultured <i>Proteus</i> sp. clone SPB-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KT633571?report=genbank&log\$=nuclalig&blast_rank=1&RID=7EPKKZ5X014
					Reverse	98%		
055	Comprada Biocol LTDA	<i>Aeromonas hydrophila</i>	95.7%	<i>Aeromonas</i> spp.	No se realizó pruebas moleculares			
058	Donada por estudiantes UCMC	<i>Pseudomonas putida</i>	95.4%	<i>Pseudomonas</i> spp.	No se realizó pruebas moleculares			
059	Comprada Biocol LTDA	<i>Burkholderia cepacia</i>	97.2%	<i>Burkholderia</i> spp.	No se realizó pruebas moleculares			
060	Donación secretaria de salud	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Confirmada con técnica en tubo	<i>Pseudomonas</i> spp.	Forward	97%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain Kasamber15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY549651.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=10&RID=EHGV4N80014
					Reverse	98%		
061	Comprada ANNAR DIAGNOSTICO LTDA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	99.4%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No se realizó pruebas moleculares			

062	Donación ICA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ambiental	99.3%	<i>Pseudomonas</i> spp.	Forward	100%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain YU_V35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MG807469.1?report=genbank&log\$=nucleotide&blast_rank=3&RID=7ENA4AZB014
					Reverse	99%		
063	Donación ICA	<i>Xanthomonas</i> spp.	Confirma da con técnica en tubo	<i>Xanthomonas</i> spp.	Forward	97%	<i>Xanthomonas</i> sp. TB8-9-II 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY599706.1?report=genbank&log\$=nucleotide&blast_rank=1&RID=7ENUKJDG014
					Reverse	100%		
064	Donación secretaria de salud	<i>Vibrio anginolyticus</i>	99.4%	<i>Vibrio</i> spp.	Forward	99%	<i>Vibrio cholerae</i> strain A1552 chromosome 1, complete sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP025936.1?report=genbank&log\$=nucleotide&blast_rank=1&RID=7EP45MC2014
					Reverse	99%		
065	Donación secretaria de salud	<i>Vibrio metschnikovii</i>	99.9%	<i>Vibrio</i> spp.	Forward	98%	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> partial 16S rRNA gene, strain MS27	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/393884
					Reverse	98%		
066	Compra de Quimirel	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	99.9%	<i>Plesiomonas</i> spp.	Forward	97%	<i>Plesiomonas shigelloides</i> strain JL5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MG655158.1?report=genbank&log\$=nucleotide&blast_rank=1&RID=93GKBM93014
057	Compra de Quimirel	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Confirma da con técnica en tubo	<i>Stenotrophomonas</i> spp.	No se realizó pruebas moleculares			

072	Donación secretaria de salud	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99.3%	<i>Acinetobacter</i> spp.	Forward	97%	<i>Acinetobacter seifertii</i> strain V6d 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MF325020?report=genbank&log\$=nuclalign&blast_rank=14&RID=ECY16K4F014&from=203&to=870
					Reverse	97%		

NOMENCLATURA: Secretaria de Salud: se refiere a aquellas cepas que fueron donadas por parte de la Secretaria de Salud, como se describió anteriormente, este proceso de donación y/o canje, fue parte importante en el desarrollo del Cepario, ya que permitió ampliar el número de cepas que conforman la colección y así mismo enriquecer cada una de las prácticas que se llevan a cabo con el uso de estas cepas. Quimirel: hace referencia a las cepas compradas. ICA: se refiere a las cepas donadas por el Instituto Colombiano Agropecuario.

5. DISCUSIÓN

La tecnología cuenta con herramientas que facilitan y fortalecen la identificación de los microorganismos. Si bien la microbiología convencional brinda un acercamiento a la identidad de un organismo vivo, y ofrece información muy importante en el ámbito investigativo, el uso de técnicas de biología molecular actualmente permite identificar la conformación genética que garantiza que un microorganismo que se quiera utilizar o preservar cuente con todas sus características, como es el caso de las bacterias ambientales donde no se cuenta con identificación fenotípica y es allí donde las estrategias moleculares han facilitado en gran medida la identificación de estas especies.

En este trabajo se quiso confirmar la identidad bioquímica de los 41 microorganismos Gram negativos del Cepario de la UCMC. Tanto el aspecto macroscópico de las colonias, como la morfología microscópica y las pruebas bioquímicas estaban acorde con lo reportado por varios autores, De la Rosa et al. (30), Orjuela et al. (68).

Las bacterias que fueron confirmadas y que por lo tanto, presentaron concordancia entre los resultados bioquímicos y genéticos fueron: las tres especies de *E.coli*(002, 004,007), *Salmonella* (019,021),*Citrobacter*(029,030), *Enterobacter* (032,034), *Proteus* (046), *Hafnia* (052), *Morganella* (053), *Xanthomona* (063), *Plesiomona*(066)

En esta investigación se trabajó con tres cepas diferentes de *Escherichiacoli*, cada una de ellas provenía de un lugar de origen diferente. Los resultados obtenidos permiten confirmar que a nivel bioquímico presentan el mismo perfil, a nivel genético todas ellas obtuvieron un porcentaje de aceptabilidad superior al 97%, sin embargo, a nivel molecular sus características son diferentes, específicamente en el número de pares de bases que presentaba cada una de ellas, teniendo que la cepa de *Escherichia coli* ATCC(002)mostraba 1441pb, la cepa de *Escherichia coli* Nativa(004)con 781 pby la cepa de *Escherichia coli* Polifenoles(007)tenía 841 pb. Este dato además puede apreciarse en la Figura 12, la cual muestra la electroforesis realizada del producto de PCR de estas

tres bacterias, y muestra claramente la diferencia de pares de bases que tienen estas bacterias.

La cobertura se refiere al número de veces que se secuencian un mismo fragmento (74), lo que permite detectar los polimorfismos. Para el estudio de *E.coli*, se buscó y se logró obtener un nivel de cobertura alto lo que permitió identificar los polimorfismos y con esto diferenciar las tres cepas. Con énfasis en la cepa de 007, catalogada por el Cepario como *Escherichia coli* polifenoles, nombrada así por su lugar de procedencia, se logró por caracterización molecular identificarla como *Escherichia coli strain XX13 16S ribosomal RNA gene - partial sequence*. Yong et al. (75), afirma que este microorganismo presenta asociaciones con compuestos nitrogenados que facilitan la nitrificación y mitigaciones potenciales de pesticidas en los suelos, siendo una cepa beneficiosa para procesos de biorremediación, adicionalmente se ha reportado que la cepa 007 contiene más de 10 genes asociados a la producción de biodiesel, gracias a su capacidad de utilización de forma natural de compuestos como azúcares y alcoholes de azúcar, que son capaces de generar energías sustentables (76, 77).

Los resultados bioquímicos rectificaron el género de las tres cepas de *Shigella*. La cepa 015 (*S.dysenteriae*) confirmó su especie y género en un 97% de identidad, a pesar de ello, los resultados moleculares arrojaron que la cepa 016 quien estaba caracterizada como *S.sonnei*, a nivel genético es realmente *S. flexneri*.

Sucede lo mismo con el género *Citrobacter*, en donde las especies *C.diversus* y *C.freundii*, presentaron fermentación positiva para lactosa (70) y *C.koseri*, arrojó un resultado negativo, Acosta et al. (79), postulan que *C.koseri*, puede ser considerado como un fermentador lento de lactosa. Esta variabilidad metabólica no es significativa ya que las pruebas moleculares confirmaron en un 97% la identidad de las especies *C.freundii* y *C.koseri*, cabe resaltar que a nivel molecular las cepas se identificaron con un porcentaje de identidad superior al 97%.

Uno de los resultados no acordes fue el del cultivo de la cepa de *Klebsiella ozaenae*, que presentó fermentación negativa de lactosa, a diferencia de las demás especies de su género, esto puede ser explicado con lo postulado por Padilla et al. (69), quien afirma que es posible que las especies de *Klebsiella* sean fermentadoras o como es el caso particular de *K.ozaenae*, ser fermentadoras variables de lactosa.

Las características bioquímicas para el género *Klebsiella* presentaron un alto porcentaje de identidad, el resultado de las pruebas moleculares confirmo las cepas 038(*K.oxytoca*) y 040 (*K.pneumoniae suelo*), a pesar de ello la cepa 041 (*K. rhinoscleromatis*) a nivel genético es realmente *K.pneumoniae*, esto puede ser explicado por Arenas et al. (80), quien menciona que *K.rhinoscleromatis* es una subespecie de *K.pneumoniae*, por lo tanto para su identificación es necesario aumentar la cobertura para detectar los posibles polimorfismos (81, 82).

La cepa 040 (*K.pneumoniae suelo*), que fue aislada de una muestra de suelo y posteriormente donada al Cepario por el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario), se diferencia a nivel molecular de la cepa de origen clínico 037 (*K.pneumoniae*), por la cantidad de pares de bases que presenta, además el BLAST confirma que su naturaleza es de orden ambiental debido a su perfil genético (83), gracias a su función celulolítica que le provee enzimas como β -glucosidasa, xilanasa, y β -xilosidasa, quienes tienen capacidad para degradar material orgánico.

La cepa 044 quien se encontraba caracterizada como *Serratia liquefaciens* a nivel molecular se confirmó como *Serratia phymuthica*, esto se puede explicar ya que estos dos tipos de microorganismos presentan relaciones estrechas en cuanto a su hibridación de ADN, están asociadas con la secreción de sustancias químicas (Enzimas lipolíticas) que favorecen el crecimiento de plantas, las dos pertenecientes al complejo *Serratia liquefaciens-proteamaculans-grimessi*, en el caso de la cepa *S.plymuthica*, presenta un pigmento rojo que se evidenció en la identificación macroscópica (Figura 11), se ha aislado de muestras de suelo, agua y esputo de pacientes con osteomielitis

crónica (84).

En el análisis de la secuencias de la cepa 054 (*Yersinia enterocolitica*), se encontró que realmente era una cepa de *Proteus* esto se sustenta en lo postulado por Lavalett et al. (85), quien encontró que podrían haber reacciones cruzadas entre los iniciadores diseñados con diferentes géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, (*Proteus spp.*, *Yersinia spp.*, *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Shigella sp* y *Aeromonas spp.*), gracias a sus grandes niveles de homología como lo presentado en el proyecto.

Uno de los resultados que no fueron acordes a lo planteado fenotípicamente fue el caso de la cepa 060 (*P. fluorescens*) quien no logro ser identificada por el sistema BBL Crystal y fue necesario hacer confirmación por técnicas en tubo. En el perfil genotípico arrojó un resultado diferente, asociándose con la especie *P. aeruginosa*, esto debido a que las dos especies bacterianas están rígidamente correlacionadas con infecciones oportunistas en los humanos y su identificación resulta muy vaga por métodos fenotípicos, es por esto que el microambiente de crecimiento propicia condiciones de mutabilidad constante favoreciendo heterogenicidad de sus secuencias y arrojando resultados diferentes por motivos de regiones hipervariables a través de las secuencias de ARNr 16S como lo comenta Bodilis et al. (86).

En el caso de las cepas de *Vibrio* ninguna de las dos cepas analizadas *V. alginolyticus*(064) y *V. metschnikovii* (065), correspondieron a las registradas anteriormente por pruebas fenotípicas del cepario, puesto que *V. alginolyticus*(064) resultó ser *V. cholerae*, y *V. metschnikovii* (065) fue descrita a nivel genotípico como *V. parahaemolyticus*. Estas cepas fueron cultivadas en Agar NaCl 0,5%, debido a sus requerimientos asociados a concentraciones de NaCl que propician sus condiciones de crecimiento, adicionalmente comparten atributos distintivos con los integrantes de la familia *Enterobacteriaceae*, que sugieren un origen evolutivo común (87). En la caracterización molecular las dos especies 064 y 065, presentaron un nivel de homología del 98% comparada con las bases de Datos BLAST, sin embargo como lo comenta Bunpa et al (88) y Nishibuchi et al. (89), las especies de *Vibrios* son difíciles de

identificar por métodos genotípicos ya que especies como *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* presentan un nivel de identidad del 99.8% en el gen 16s rRNA. Se hace necesario la utilización de cebadores como toxR y más sin embargo se suelen presentar falsos positivos en la identificación de estas especies bacterianas por la relación estrecha de sus secuencias(90). Es importante destacar que la identificación de la cepa de *V.cholerae* permitirá a la universidad realizar nuevas investigaciones acerca de un microorganismo que no se encontraba disponible en el Cepario.

La cepa *A. baumannii* (072), registró un porcentaje de identidad del 97% en el BLASTn para *A. seifertii*, siendo explicado por Nemeč et al. (91), quien menciona que existe una estrecha relación entre la especie *A. baumannii* y *A. seifertii* quienes hacen parte del complejo ACB (*Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii*), generalmente asociado a infecciones nosocomiales en niños y en adultos mayores, compartiendo aproximadamente un promedio de más del 90% de aminoácidos(92). Por esta razón es razonable hipotetizar que *A. seifertii* y *A. baumannii* comparten un repertorio común de genes de resistencia para sobrevivir en el entorno nosocomial. Este resultado concuerda con lo evidenciado en el crecimiento en agar McConkey con una fermentación de lactosa positiva sustentado en la literatura la cual argumenta que *A. seifertii* puede ser un fermentador de lactosa variable (93, 94)

Bosshard (95), comenta que en grandes laboratorios y en corporaciones de investigación muchas veces por presupuesto usan solo una secuencia, bien sea Forward o Reverse para identificar las cepas, pero aumenta el rango de inespecificidad en un 47%, es por ello que en este estudio se utilizaron las dos secuencias, con el fin de obtener un rango más amplio de exactitud y de esta manera identificar correctamente la bacteria.

Finalmente se sugiere para mejora del Cepario tener en cuenta lo realizado por este trabajo, aspectos como el nombre científico de las cepas, el cambio de identificación de aquellas cepas que mediante caracterización molecular arrojaron resultados diferentes, la codificación de todas las cepas, la

incorporación de la información de los comportamientos variables a nivel metabólico que se reportaron en esta investigación, además del uso para fines investigativos de las nueva especies encontradas y que como se ha descrito anteriormente tienen capacidades de biorremediación, degradación, absorción de nutrientes y elaboración de biocombustibles o en algunos casos son agentes patológicos de importancia clínica.

6. CONCLUSIONES

Fueron identificadas 26 bacterias Gram negativas pertenecientes a la colección de cultivos de microorganismos de la universidad colegio mayor de Cundinamarca, mediante técnicas moleculares y bioquímicas (*Escherichia coli* strain FORC_042, *Escherichia coli* strain 14EC033, *Escherichia coli* strain XX13 , *Shigella flexneri* strain 90ft3aii, *Shigella dysenteriae* strain ISO2 , *Salmonella enterica* strain MFDS1004024, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* isolate VNB151-sc-2315230, *Citrobacter koseri* strain HAMB1 1287, *Citrobacter freundii* strain W-R-4-3-1, *Enterobacter cloacae* strain RCB962, *Enterobacter aerogenes* strain Z90, *Klebsiella oxytoca* strain AA18, *Klebsiella pneumoniae* strain CIFT MFB 10569, *Klebsiella pneumoniae* strain B12, *Serratia plymutica*. JD8, *Proteus mirabilis* strain AUMC B-199, *Hafnia alvei* strain SP19, *Morganella morganii* strain wf-2, *Proteus* sp. clone SPB-4, *Pseudomonas aeruginosa* strain Kasamber15, *Pseudomonas aeruginosa* strain YU_V35, *Xanthomonas* sp. TB8-9-II, *Vibrio cholerae* strain, *Vibrio parahaemolyticus* strain MS27, *Plesiomonas shigelloides* strain JL5, *Acinetobacter seifertii* strain V6d).

Se observaron variabilidades en la fermentación de lactosa a nivel macroscópico que son importantes para entender el comportamiento de la bacteria, pero no afectan su identificación bioquímica y genética. Mediante las técnicas moleculares se identificaron especies que no habían sido reportadas en el Cepario y que cuentan con características industriales, ambientales y clínicas que las hacen importantes para el desarrollo investigativo del programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

La información suministrada por este proyecto a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, ha favorecido el mejoramiento del Cepario, dando solución al planteamiento del problema inicial y cumpliendo el principal objetivo de la investigación. Para la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca será muy valiosa esta información, pues finalmente contribuirá a que el Cepario a futuro, pueda ser registrado ante el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

BIBLIOGRAFIA

1. J. Mauricio, M. Herrera Cuadra. Filogenia Bacteriana Mediante el Análisis del rRNA 16S, Carrera de Biología, [Internet]. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México 54090, México, 2008. [Citado el 28 de nov de 2017]. Disponible en: <http://www.vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/Microbiologia/imagenes/Documentos/filogenetica.pdf>
2. S. Cowan. Principles and Practice of Bacterial Taxonomy a Forward Look, Microbiology Society [Internet]. Journals online, 01 April 1965, Microbiology 39: 143-153.[Actualizado 01 abr 1965; Citado 12 nov de 2017]. Disponible en: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/39/1/micro-39-1-143.pdf?expires=1518576109&id=id&accname=guest&checksum=AC7B275F4EF3A3ADA383CBD7C0EA3C7D>
3. J. Washington, Laboratory Approaches The Identification of Enterobacteriaceae,[Internet], Hum Pathol. 1976 Mar [Citado 10 Oct de 2017]. Disponible en: [http://scihub.tw/http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046-8177\(76\)80018-4](http://scihub.tw/http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046-8177(76)80018-4)
4. P. Ellnera, M. yers, Preliminary evaluation of the autoSCAN-3, an instrument for automated reading an interpretation of microdilution trays: identification of aerobic gram-negative bacilli,[Internet], J Clin Microbiol. 1981 Sep. [Citado 30 Nov de 2017]. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/14/3/326.long>
5. J .Jorgensen, J. Johnson, G. Alexander , R .Paxson , G .Alderson.Comparison of automated and rapid manual methods for the same-day identification of Enterobacteriaceae,[Internet]. Am J Clin Pathol. 1983 Jun [Citado 22 Nov de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6342361>

6. B. Holmes, M. Costas , T. Thaker, M. Stevens, Evaluation of two BBL Crystal systems for identification of some clinically important gram-negative bacteria,[Internet], J Clin Microbiol . 1994 Sep.[Citado 11 Oct de 2017]; 32 (9): 2221-2224.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC263971/>
7. A. Robinson , Y. McCarter ,J. Tetreault, Comparison of Crystal Enteric/Nonfermenter system, API 20E system, and Vitek AutoMicrobic system for identification of gram-negative bacilli,[Internet]. J Clin Microbiol . 1995 Feb; [Citado 10 de Oct de 2017];33 (2): 364-370. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC227949/>
8. K.Greisen , M. Loeffelholz , A. Purohit , D. Leong. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid,[Internet], J Clin Microbiol . 1994 Feb.[Citado 18 Oct de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC263034/>
9. C. Soumitesh, D. Helb ,M. Burday ,N. Connell ,D. Alland, A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria,[Internet], J Microbiol Methods. 2007 May; 69(2).[Citado 7 Nov de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2562909/>
10. J. Claesson, O. O'Sullivan, Q. Wang, J. Nikkilä, H. S,Willem, Paul Ross, et al, Comparative Analysis of Pyrosequencing and a Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial Community Structures in the Human Distal Intestine,[Internet], Journal PLoS One, Published online 2009 Aug 20 [Citado 2 de Ene de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2725325/>
11. MJ. Claesson, Q.Wang , O'Sullivan, R. Greene-Diniz , Cole JR ,et al. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions,[Internet], Nucleic Acids Res. 2010 Dec; 38(22).[Citado 2 Nov de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3001100/>

12. R. Hummelen, AD.Fernandes, J.Macklaim, R.Dickson, J Changalucha, G. Gloor, et al, Deep sequencing of the vaginal microbiota of women with HIV,[Internet], PLoS One. 2010 Aug 12. [Citado 20 Nov de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?cmd=Search&doptcmdl=Citation&defaultField=Title%20Word&term=Hummelen%5Bauthor%5D%20AND%20Deep%20sequencing%20of%20the%20vaginal%20microbiota%20of%20women%20with%20HIV>
13. J. Caporaso, C. Lauber, W. Walters, D. Berg-Lyons, C. Lozupone, P. Turnbaugh, et al , Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample,[Internet], Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 15.[Citado 12 Nov de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?cmd=Search&doptcmdl=Citation&defaultField=Title%20Word&term=Caporaso%5Bauthor%5D%20AND%20Global%20patterns%20of%2016S%20rRNA%20diversity%20at%20a%20depth%20of%20millions%20of%20sequences%20per%20sample>
14. J. Werner , Z. Dennis , J. Caporaso ,R. Knight ,L. T Angenent , Comparison of Illumina paired-end and single-direction sequencing for microbial 16S rRNA gene amplicon surveys,[Internet], the ISME journal Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology, 2012 Jul; 6(7).[Citado 1 de Ago de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3379627/>
15. E. Soerger, N. Dey, Knight, S.Brenner, Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences,[Internet], the ISME journal Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology, 2012 Jul; 6(7).[Citado 13 Nov de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3379642/>
16. O. Mizrahi-Man, R.Davenport, Y. Gilad, Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs,[Internet], Plos/ one, Published: January 7, 2013.[Citado 20 Nov de 2017]. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0053608>

[#abstract0](#)

17. R. Aquino, G. Emely, S. Samaniego, J. Rivera, V. Cedeño, Y. Urbina, et al, Molecular Characterization of Pathogenic Bacteria of the Respiratory Tract in Peruvian Patients with Cystic Fibrosis, Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, [Internet], vol. 34, núm. 3, 2017, pp. 423-435, [Citado 13 Ene de 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/363/36353391008.pdf>
18. G. Transversales, B. Agrícola, Líneas y Grupos Banco de Cepas y Genes [Internet]. Vol. 27, revista IBUN. 2017. p. 2. [Citado 10 Oct de 2017]. Disponible en: http://www.ibun.unal.edu.co/lineasGrupos/GruposTransversales/L&G_G_T_Cepario.html
19. Rnc, Lista de colecciones registradas, [Internet], Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt - Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible - Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia Licencia Creative Commons, 2017 Ene. [Citado 15 Jun de 2017]. Disponible en: <http://rnc.humboldt.org.co/admin/index.php/registros/colecciones>
20. Presidencia de la república, Decreto 309 del 2000 reglamenta la investigación científica sobre diversidad biológica. [Internet], Secretaría Jurídica Distrital de la Alcaldía Mayor de Bogotá D.C. 01/03/2000. [Citado 15 Jul de 2017]. Disponible en: <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=45528>
21. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Decreto Ley 3070 de 2011 Registro de Colecciones Biológicas, [Internet], Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2011, [Citado 15 Nov de 2017]. Pg 8. Disponible en: <http://wsp.presidencia.gov.co/Normativa/Decretos/2013/Documents/JUNIO/27/DECRETO%201375%20DEL%2027%20DE%20JUNIO%20DE%202013.pdf>
22. Alcaldía Mayor de Bogotá, Decreto Único Reglamentario 1076 de 2015 Nivel Nacional, [Internet], Secretaría Jurídica Distrital de la Alcaldía

- Mayor de Bogotá D.C, expedido 26/05/2015.[Citado 27 Nov de 2017].
Disponible en:
<http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=62511>
23. Convenio Diversidad biológica, Ley 165 DE 1994,[Internet], Convenio de las Naciones Unidas sobre Diversidad Biológica, Río de Janeiro el 5 de junio de 1992.[Citado 10 Oct de 2017].Disponible en:
<http://www.humboldt.org.co/images/documentos/pdf/Normativo/1994-ley165-1994.pdf>
- 24.L. Sánchez, Organización y proyección del centro de colección de cultivos como alternativa para la venta de servicios del programa de bacteriología y laboratorio clínico de la U.C.M.C, Colegio Mayor de Cundinamarca. Facultad de Ciencias de la Salud. Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico. 2004. [Citado 8 Jul de 2017]. Disponible en: [Proyectos cepario venta servicios plan de mejoramiento.pdf](#)
- 25.C. López de Arcila, et al, Modelo técnico para el desarrollo, manejo y mantenimiento de un cepario. Bogotá, Diciembre de 1992. U. Colegio Mayor de Cundinamarca.[Citado 24 Ago de 2017].Disponible en:
- 26.L. Sánchez Leal, Sistema de depósito de microorganismos, Colección de cultivos de microorganismos CCM-UCMC. Colegio Mayor de Cundinamarca. Facultad de Ciencias de la Salud. Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico. Protocolo. 2014; 75(1): 1-12
- 27.L. Sánchez Leal, L. Constanza, Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso.[Internet], Nova-Publicación Científica. 2005;3:[Citado 30 Jun de 2017].109–13.Disponible en:
http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ENSAYO1_3.pdf
- 28.B. Forbes, D.F Sahn, AS. Weissfeld, Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2, 2a ed, USA, BERGEY'S MANUAL® OF Systematic Bacteriology; 2007. 349 p.
- 29.W .Gaastra, Host Specific fimbrial adhesins of non-invasive enterotoxigenic *E.coli* strains. Vol 3, 1a ed, Microbiol Reviews,1982, 46, 129-161.

30. M. de la Rosa, J. Prieto, J. Navarro. Microbiología en ciencias de la salud, conceptos y aplicaciones, Vol 10, 3ra ed, Elsevier. España, Barcelona, 2011, Cap.13. Pag. 141.
31. F. Brunner, A. Margadant, R. Peduzzi, J. Piffaretti, The Plasmid Pattern as an Epidemiologic Tool for *Salmonella typhimurium* Epidemics: Comparison with the Lysotype, [Internet], The Journal of Infectious Diseases, Volume 148, Issue 1, 1 July 1983, Pages 7–11, [Actualizado 01 Jul de 2008, Citado 15 Jul de 2017]. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/infdis/148.1.7>
32. A. García, F. Mateos, Enterobacterias, [Internet], Unidad de enfermedades infecciosas. Servicio de medicina interna. Complejo hospitalario universitario de Albacete. Albacete, España. 2010. Medicine. 2010;10(51):3426-31. [Citado 30 Nov de 2017]. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf
33. K. Ranjany, N. Ranjan, Citrobacter: An emerging health care associated urinary pathogen, Urology annals, 2013, Oct-Dec; 5(4): 313–314. [Citado 30 Feb de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3836000/>
34. B. Wilcock, Experimental *Klebsiella* and *Salmonella* infection in neonatal swine. [Internet], Can J comp. Med, 1979, 43. 200-20. [Citado 22 Ago de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1319918/>
35. J. Mensa, JM. Gatell, A. Jiménez, G. Prats, A. Domínguez. Pantoea agglomerans. [Internet]. En Guía de terapéutica antimicrobiana, Vol 5, Editorial Masson. Barcelona; 2004; Pág. 236. [Actualizado 19 Jun de 2013, Citado 9 de Nov de 2017]. Disponible en: <https://www.iberlibro.com/Gu%C3%ADa-terap%C3%A9utica-antimicrobiana-Mensa-J.M-Gatell/10404759842/bd>
36. A. Kratz, D. Greenberg, Y. Barki, E. Cohen, M. Lifshitz. Pantoea agglomerans as a cause of septic arthritis palm tree thorn injury; case report and literature review. [Internet], Arch Dis Child 2003; 88: 542-544.

- [Citado 12 de Ago de 2017]. Disponible en:
<http://adc.bmj.com/content/88/6/542.long>
37. JM. García, C. Bermejo, Infecciones por enterobacterias, Vol 3, Medicine Ed, 1998; 7: Pág., 362-368. [Actualizado 28 de Sep de 2013, Citado 21 Oct de 2017].
38. SF. Marcos., R. Muñoz, M. BMJ, A Viana, Bacteriemia por *Pantoea agglomerans*, Ann Intern, Vol 2, Med. 23, 2006; Pág. 250-251.[Actualizado 11 de Abr de 2008, Citado 7 de Sep de 2017]
39. M .Pollack, P.Charache, R. Nieman, MP. Jett, JA. Reimhardt, P.Hardy, Factors influencing colonisation and antibiotic-resistance patterns of gram-negative bacteria in hospital patients. Vol 6 Ed Lancet, 1972;2:668.[Actualizado 10 de Oct de 2001, Citado 2 de Jul de 2017]
40. P.Gemski, R. Lazere, T.Casey, Presence of a virulence-associated plasmid in *Yersinia pseudotuberculosis*. [Internet], Infect Immun. 28, 1980, 1044-1047. [Citado 25 de Nov de 2017]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC551057/>
41. B.Kay, K. Wachsmuth, P.Gemski, New virulence-associated plasmid in *Yersinia enterocolitica*. [Internet], Journal of Clinical Microbiology, 15. 1982; 1161-1163.[Citado 3 de Oct de 2017]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC272273/>
42. C. Brokopp, J .Farmer, Typing, Methods for *Pseudomonas aeruginosa*. In: Doggett, RG. *Pseudomonas aeruginosa: clinical manifestations of infection and current therapy*. [Internet], New York Academic Press. 1979 P.89,[Citado 17 Jun de 2017]. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002234768680748X>
43. D. Gil, Bacteriemia de curso fatal por *Burkholderia cepacia*: Revisión de la literatura a propósito de un caso clínico. [Internet], Rev Chil Infect. 2001;18(1): 41-44,[Citado 16 de Octde 2017]. Disponible en:
https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182001000100006
44. G .Rivera. Conceptos introductorios a la fitopatología. Vol 2, Ed EUNED. Rev Argentina, 2007; 346 págs.[Actualizado 15 de May de

- 2010, Citado 10 de Jul de 2017].
45. J. Cubero, C. Redondo, P. Sabuquillo, M. Vélez, J. Garita, E. Ferragud, Xanthomonas un género de bacterias fitopatógenas con una alta especialización, [Internet], Grupo de Bacteriología. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Crta de La Coruña Km 7,5. Madrid. 2015. Pag. 38. Numero 60.[Citado 4 Nov de 2017]. Disponible en: <https://www.sem microbiologia.org/pdf/actualidad/60/16%20Plantas03.pdf>
46. J. Chrystal, A. Fernández, *Strenotrophomonas maltophilia*, [Internet], Laboratorio de Microbiología, Hospital del Salvador, Santiago, Chile. Rev Chil Infect 2006; 23 (3): 247-248, [Citado 20 Ago de 2017]. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182006000300009
47. J. Nicolet, Compendio de bacteriología medica veterinaria. Vol 3, Editorial Acribia S.A, Zaragoza, España, 1986. Cap 2; Pag 40-41, [Actualizado en 12 de May del 2000, Citado 17 May de 2017].
48. J. Rahal, Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species, [Internet] Clin Infect Dis. 43 Suppl 2:2006, Pag S95-9, [Citado 15 Ago de 2017]. Disponible en: https://academic.oup.com/cid/article/43/Supplement_2/S95/333943
49. J. Hontangas, F. Castillo, M. Salavert, Técnicas de identificación, [Internet], Vol 4, 3 edición. 2003; p. 15. [Actualizado 2003, Citado 2 Nov de 2017]. Disponible en: <http://media.axon.es/pdf/65248.pdf>
50. T. Beveridge, Use of the Gram stain in microbiology, [Internet], Journal Biotechnic & Histochemistry, Volume 76, 2001 - Issue 3, [Citado 30 Nov de 2017]. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/bih.76.3.111.118>
51. M. Prescott, Microbiology. Vol 2, 5th ed. USA: McGraw-Hill; 2002, [Actualizado Oct de 2002, Citado 3 Ago de 2017].

52. S. Woeste, P. Demchick, New version of the negative stain, [Internet], Appl Environ Microbiol, 57(6) 1991;185-189,[Citado 5 de Jul de 2017]. Disponible en: <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/57/6/1858>
53. O. Orjuela, A.E. Velez, C. Gallego, Bacteriología aplicada, manual de procedimientos, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 2014. Bogota, Colombia.[Actualizado 2016, Citado 18 de Mar de 2017].
54. A. Olmos, C. García de la Fuente, J. Saéz, S. Valdezate, Procedimientos en microbiología clínica, Recomendaciones de la sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica.. Vol 3, Ed.1, Sociedad española, 2007, [Actualizado 22 de Mar d 2008, Citado 7 de Nov de 2017].
55. U. Edwards, T. Rogall, H. Blöcker, M. Emde, EC. Böttger. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA,[Internet], Nucleic Acids Res. 1989;17(19):7843–53,[Citado 6 de Jul de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2798131>
56. J. Clarridge, C. Alerts. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases.[Internet], Clin Microbiol Rev. 2004;17(4):840–62.[Citado 9 Ago de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC523561/>
57. A. Manero, A. Blanch, Identification of Enterococcus spp. with a biochemical key.[Internet], Appl Environ Microbiol. 1999;65(10):4425–30,[Citado 28 de Ago de 2017]. Disponible en: <http://aem.asm.org/content/65/10/4425.full>
58. X. Qin, J. Emerson, J. Stapp, L. Stapp, J. Burns, P. Abe. Use of Real-Time PCR with Multiple Targets To Identify Pseudomonas aeruginosa and Other Nonfermenting Gram-Negative Bacilli from Patients with Cystic Fibrosis Use of Real-Time PCR with Multiple Targets To Identify Pseudomonas aeruginosa and Other Nonferme.[Internet], J Clin Microbiol. 2003;41(9):4312–7,[Citado 1 Nov de 2017]. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/41/9/4312.long>

59. J. Chun, F. Rainey, Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. [Internet], Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 2014; 316-324. [Citado 26 de Dic de 2018]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.054171-0Rantakokko->
60. L. Hriantkokko, K. Jalava, Optimal DNA Isolation Method for Detection of Bacteria in Clinical Specimens by Broad-range PCR. [Internet], Journal of Clinical Microbiology, 40 (11), 2002; 4211-4217, [Citado 14 Oct de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12409400>
61. S. Surzycki, Basic Techniques in Molecular Biology. Berlin, Vol 2, Ed Springer-Verlag, Journal of cell science, 2000: P 113. [Actualizado Nov 2000, Citado 18 Ene de 2018].
62. G. Zapata, Diseño y optimización de un sistema de amplio espectro basado en la amplificación de un fragmento del Gen ADN Ribosomal 16s mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para su aplicación como método de diagnóstico e identificación molecular en infecciones bacterianas locales. [Internet], Departamento de ciencias de la vida Ingeniería en biotecnología, 2011. [Citado 3 Ago de 2017]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4975/1/T-ESPE-033011.pdf>
63. C. Padilla, J. Dapena, E. Martínez, J. Bárcena, C. García, Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. [Internet], Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba. [Citado 4 Ene de 2018]. Disponible en: <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/17%20ELECTROFORESIS%20ACS%20NUCLEICOS%20GELES%20AGAROSA.pdf>
64. Bioinformatics at COMAV, Secuenciación De Sanger, [Internet], Databases, [Actualizado 2012, Citado 4 Mar del 2018]. Disponible en: https://bioinf.comav.upv.es/courses/intro_bioinf/sanger.html
65. F. Garrigues, Sanger: Estrategia de secuenciación de Primera

- Generación,[Internet], Revista Genética Médica,[Actualizado 12 de mayo de 2017, Citada 4 Mar de 2018] . Disponible en: <http://revistageneticamedica.com/blog/sanger/>
66. P. Yarza, P.Yilmaz, E.Pruesse, F.Oliver, W. Ludwig, K. Schleifer, et al, Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences,[Internet], Nature Reviews Microbiology age (2014),12, 635–645.[Citado 13 Dic de 2018]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrmicro3330>
67. J. Chun, F.Rainey, Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. [Internet], Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 2014; 316-324.[Citado 2 Mar de 2018]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.054171-0>
68. O. Orjuela, A. Velez, C. Gallego, Manual de procedimientos, Bacteriología aplicada, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca 2014. Bogotá D.C. [Actualizado el 12 de Nov de 2014, Citado 11 Mar de 2018].
69. P. Chumacero, klebsiella pneumoniae: aislamiento, identificación y resistencia a los antimicrobianos hospital "jaime mendoza" [Internet],Archivos bolivianos de medicinaC.N.S. SUCRE. 2012.[Citado 10 Mar de 2018]. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S000405252013000100005&script=sci_arttext&tlng=en
70. A. Daza, S. Arroyo, G. Bravo. Identificación de Citrobacter koseri como nuevo patógeno en pacientes con rinitis crónica.[Internet], Volumen 59, An Orl Mex., Núm. 1, diciembre 2013-febrero 2014. [Citado 8 Mar de 2018]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/anaotomex/aom-2014/aom141a.pdf>
71. Quios S.A.S, Crystal enterico /no ferment, [Internet]. [Actualizado Enero 2018]. Disponible en: <http://www.quios.com.co/producto/crystal-enterico-no-ferment/>
72. T.Schuurman, F. Boer, A. Kooistra, A.Zwet, Prospective Study of Use of PCR Amplification and Sequencing of 16S Ribosomal DNA from

- Cerebrospinal Fluid for Diagnosis of Bacterial Meningitis in a Clinical Setting, [Internet], J Clin Microbiol. 2004 Feb; 42(2): 734–740, [Citado 17 Feb de 2018]. Disponible en: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC344470/>)
73. Polyclon, Marcador de peso molecular Hyperladder II, Gentaur, [Internet], (Actualizado Jun de 2009), [Citado 15 Mar de 2018]. Disponible en: <http://www.polyclon.com/hyperl13.jpg>
74. L. Eguiarte, A. Aguirre, J. Barbolla, E. Aguirre, Genómica de Poblaciones: Nada en Evolución va a tener sentido si no es a la luz de la Genómica, y nada en Genómica tendrá sentido si no es a la luz de la Evolución, [Internet], TIP Volume 16, Issue 1, 2013, [Citado 2 Feb de 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1405888X13720771>
75. G. Yoo, Y. Yong, O. Lee, T. Tae, J. Jun, G. Ding, Variable effects of biochar application to soils on nitrification-mediated N₂O emissions, [Internet], Science of The Total Environment Volume 626, 1 June 2018, [Citado 7 Ene de 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718301189?via%3Dihub>
76. J. Ortíz, E. Escalante, R. Fócil, H. Ramírez, I. Díaz, Dinámica de poblaciones bacterianas y actividad deshidrogenasa durante la biorremediación de suelo recién contaminado e intemperizado con Hidrocarburos, [Internet], Rev. Int. Contam. Ambie. 33 (2) 237-246, 2017, [Citado 2 May de 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v33n2/0188-4999-rica-33-02-00247.pdf>
77. V. Koppolu, V. Vasigala, Role of Escherichia coli in Biofuel Production, [Internet], Microbiol Insights. 2016; 9: 29–35, [Citado 8 Abr de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4946582/>
78. C. Hamilton, V. Prado, J. Hormazábal, R. Lagos, D. Benadof, C. Mendoza et al, Shigella spp Infections In children living In the Metropolitan Region, Chile, during summer of 2004-2005, [Internet], Rev

- Méd Chile 2007, [Citado 9 Abr de 2018]. Disponible en:
https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872007001100004
79. E. Jami, C. Acosta, Evaluación de bioaerosoles asociados en el sitio de desposición final de residuos sólidos en la Empresa Pública de Aseo y Gestión Ambiental del cantón Latacunga (EPAGAL. abr-2017).[Internet], Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica.[Citado 14 Ene de 2018].Disponible en:
<http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/25304/1/BQ%20119.pdf>
80. N. Arenas, A. Gutiérrez, L. Salazar, J. Polanco, A. Gómez, Construction of a molecular phylogeny for klebsiella and Raoultella SPbased on rRNA 16S and RNA polimarase subunit genes, [Internet], Rev. Cienc. Salud vol.7 no.2 Bogotá May. 2009,[Citado 13 de Mar de 2018]. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732009000200004
81. S. Brisse, J .Verhoef, Phylogenetic diversity of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, gyrA and parC genes sequencing and automated ribotyping, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [Internet], 01 May 2001, [Citado 24 Dic de 2017]. Disponible en:
<http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/51/3/0510915a.pdf?expires=1525298054&id=id&accname=quest&checksum=99AB2EFC9AE7695EA5A215317F43F580>
82. J. Vílchez, P.González, L.Retana-Moreir, Rinoescleroma, Acta Médica Costarricense, [Internet],Mar. 2013,[Citado 16 Feb de 2018]. Disponible en:
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022013000100010
83. S.Huang, P.Sheng, H.Zhang,Isolation and Identification of Cellulolytic

- Bacteria from the Gut of Holotrichia parallela Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae), *Int J Mol Sci.* [Internet], 2012; 13(3): 2563–2577, [Citado 9 May de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3317674/>
84. Koneman, *Diagnostico Microbiologico, Texto y Atlas a color*, 6 edición, panamericana, [Internet], 2015, Pág. 255, [Citado 4 May de 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=jyVQueKro88C&pg=PA255&lpg=PA255&dq=relacion+genetica+en+tre+serratia+liquefaciens+e+serratia+marscescens&source=bl&ots=5PHh-06Tox&sig=gQopoYfydjyVazPWDS5RKn5EWe4&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjgJrUk-jaAhXiuFkKHfZVBGUQ6AEIZjAG#v=onepage&q=relacion%20genetica%20entre%20serratia%20liquefaciens%20e%20serratia%20marscescens&f=false>
85. L. Lavalett, M. Margot, N. Muñoz, J. Moreno, N. Cardona, Desarrollo y validación de una reacción en cadena de la polimerasa múltiple para la identificación de los serogrupos B, C2, D y E de Salmonella entérica, [Internet], *Biomédica* vol.29 no.2 , Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia, Bogotá Apr./June 2009, [Citado 4 Ene de 2018]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-41572009000200009&script=sci_arttext&tlng=en
86. J. Bodilis , S. Nsigue, L. Besaury , L. Quillet, Variable Copy Number, Intra-Genomic Heterogeneities and Lateral Transfers of the 16S rRNA Gene in Pseudomonas, *Plos One*, [Internet], Published: April 24, 2012, [Citado 19 Abr de 2018]. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035647>
87. R. Aycachi, *Microbiologia de Alimentos: Practica nº 12-Determinacion de especies del género Vibrio*, *Microbiología de los Alimentos I*, [Internet], 2007 – II, [Citado 6 Feb de 2018]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/6670972/Microbiologia-de-Alimentos-Practica-n%C2%BA-12-Determinacion-de-especies-del-genero-Vibrio>

88. S. Bunpa, M. Nishibuchi, J. Thawonsuwan, N. Sermwittayawong, Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* strains and design of a PCR-based identification method using *gyrB* gene sequence, Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, [Internet], 2010, [Citado 22 Abr de 2018]. Disponible en: <http://sci-hub.tw/http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/cjm-2017-0269>
89. S. Bunpa, M. Nishibuchi, J. Thawonsuwan, N. Sermwittayawong, Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* strains, and design of a PCR-based identification method using *gyrB* gene sequence, Canadian Journal of Microbiology, [Internet], 2018, Vol. 64, [Citado 11 de Mar de 2018]. Disponible en: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/cjm-2017-0269>
90. A. Narciso, W. Martins, R. Cayô, A. Pereira, S. Santos, P. Ramos, A. Gales, Detection of OXA-58-producing *Acinetobacter seifertii* recovered from black-necked swan at a Zoo Lake, American Society for Microbiology, [Internet], 2017, [Citado 8 Ene de 2018]. Disponible en: <http://aac.asm.org/content/early/2017/09/19/AAC.01360-17?related-urls=yes&legid=aac:AAC.01360-17v1>
91. Y. Yang, J. Wang, Y. Fu, Z. Ruan, Y. Yu, *Acinetobacter seifertii* Isolated from China, Medicine (Baltimore), [Internet], 2016, [Citado 21 Abr de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4782885/>
92. D. Wong, B. Travis, A. Robert. P. Langkoo, B. Spellberg, Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges, Clin Microbiol Rev, [Internet], 2017 Jan; 30(1): 409–447, [Citado 3 Mar de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5217799/>
93. M. Chávez, F. Romel B, Gómez, E. Cabrera, M. Esparza, Patrones de resistencia a antibióticos de *Acinetobacter baumannii* en un hospital de Colombia, [Internet], vol. 76, An. Fac. med. no. 1 Lima, 2015, [Citado 6 Feb de 2018]. Disponible en:

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1025-55832015000200004&script=sci_arttext

94. Bosshard, PP, S. Abels, R. Zbinden, EC Bottger y M. Altwegg, Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-negative rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). *J. Clin. Microbiol.* 2003, [Citado 19 Feb de 2018]. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/41/9/4134.full>

Anexos



Anexo 1. Análisis del cumplimiento de los indicadores del proyecto.

El gráfico anterior permite analizar el cumplimiento de los 5 indicadores postulados para la evaluación del presente proyecto de investigación.

En donde el indicador número 1, se cumple en un 100%, teniendo en cuenta los antecedentes y la literatura, de las cuales el proyecto basó su metodología.

Para el indicador número 2, hay cumplimiento en un 100%, ya que el requisito que se tuvo en cuenta para que las bacterias pasaran a la siguiente fase de la metodología (fase molecular), era tener un 95% de identidad significativa en las pruebas microbiológicas.

El indicador número 3 se cumplió en un 100% para las 26 bacterias que pudieron ser identificadas hasta especie. Sin embargo el estudio contaba con una muestra total de 41 bacterias, de las cuales 24 de ellas no pudieron ser identificadas. Por lo tanto, a nivel universal, el indicador 3, se cumple en un 41,46%.

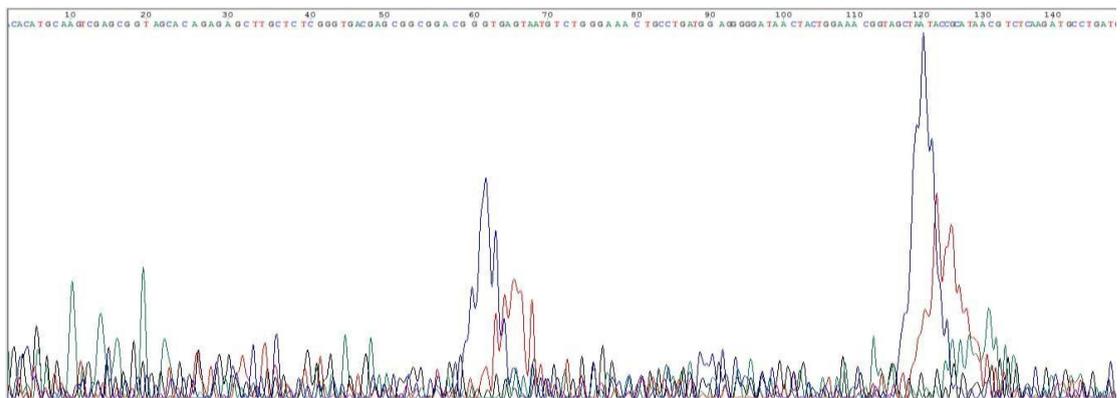
Por otra parte, el indicador número 4, se cumple en un 100%, debido a que los resultados de esta investigación, serán dados a conocer mediante la sustentación oral de manera pública del proyecto de grado, así como el trabajo escrito que se realizó del mismo. Cabe resaltar, que este proyecto, fue presentado en la *Jornada de Internacionalización del año 2017 en la*

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, en donde fueron divulgados algunos de sus resultados y la metodología y justificación del proyecto.

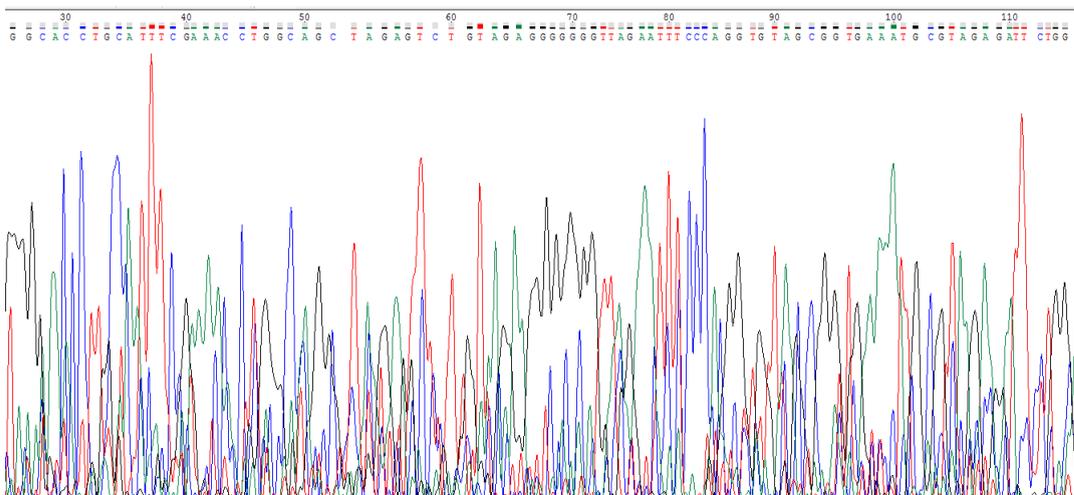
Finalmente, el indicador número 5, aún es susceptible de cambios, puesto que por cuestiones de tiempo el proceso de registro ante el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt se encuentra en transcurso; sin embargo cabe resaltar el trabajo realizado por los compañeros A. Barrera y Martínez, quienes con la secuenciación de los aislamientos micológicos, promueven el cumplimiento de este indicador en un 30%.

ANEXO 2. Resultado de la secuenciación representado en electroferogramas previamente editados por los autores para cada secuencia.

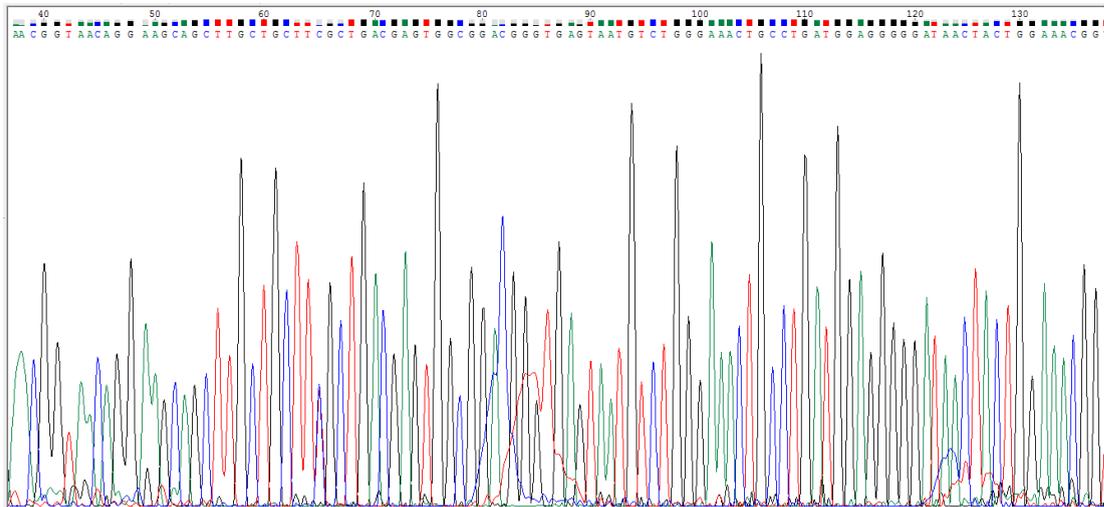
Secuencia 1 *Klebsiella pneumoniae* strain B12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



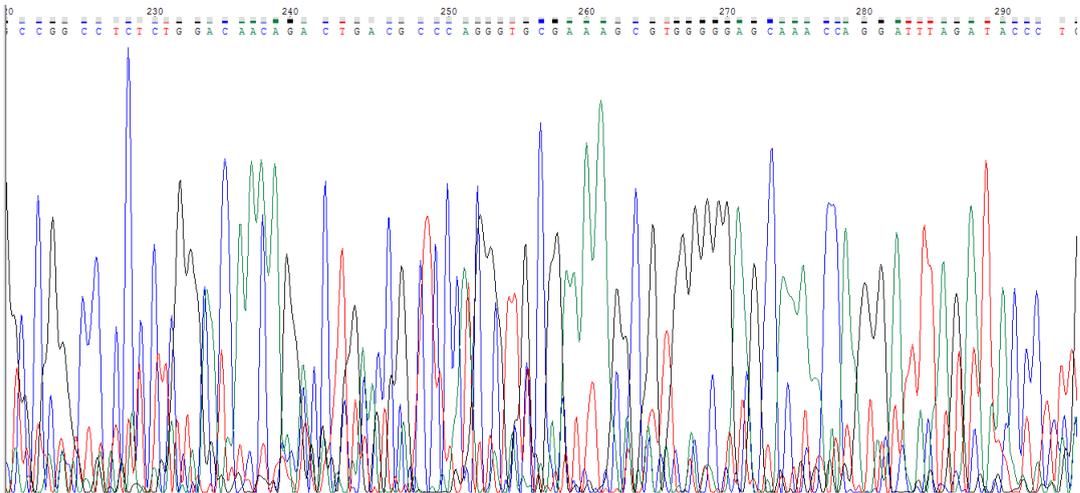
Secuencia 2 *Enterobacter aerogenes* strain Z90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



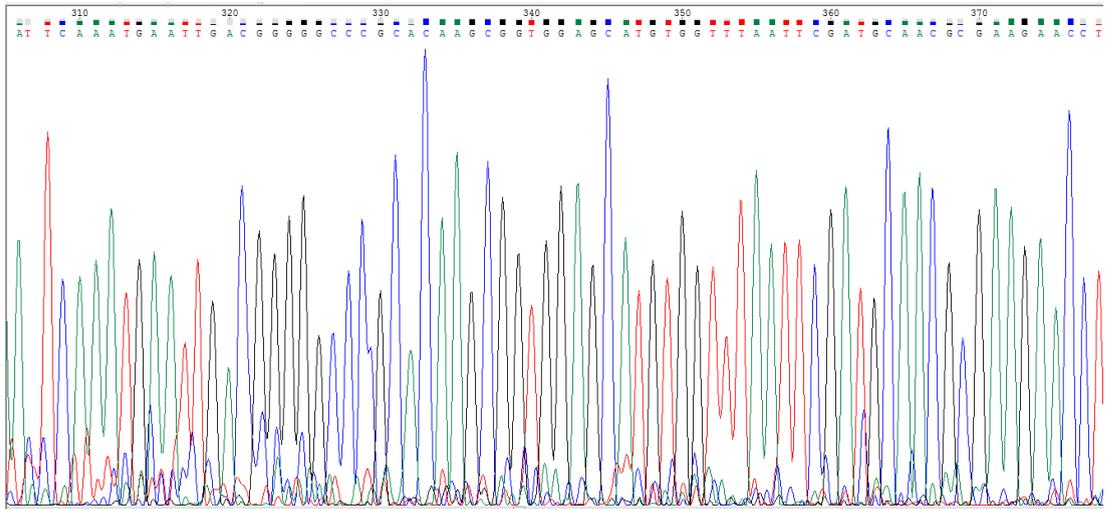
Secuencia 4 *Enterobacter cloacae* strain RCB962 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



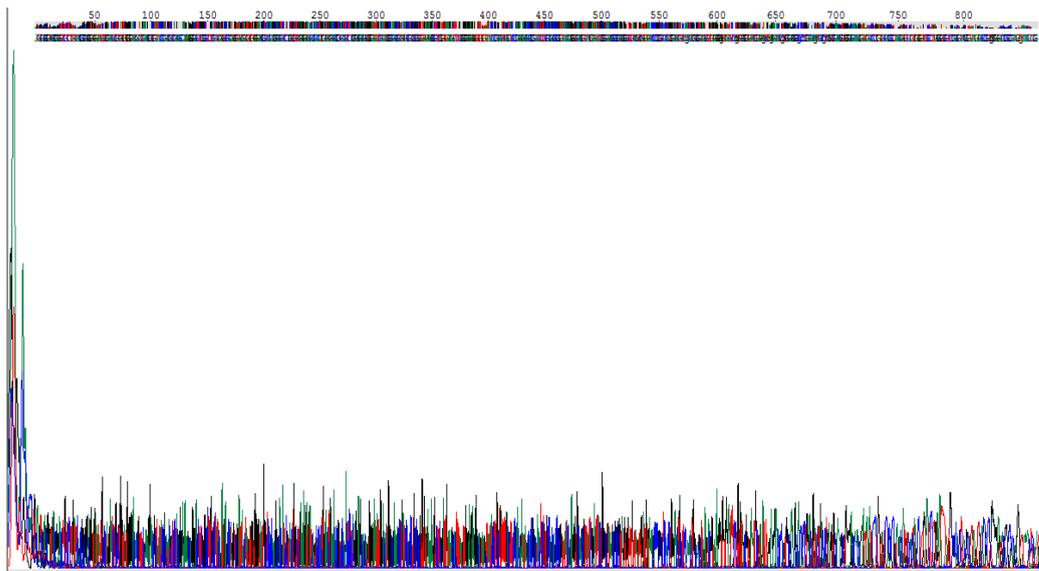
Secuencia 5 *Citrobacter freundii* strain W-R-4-3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



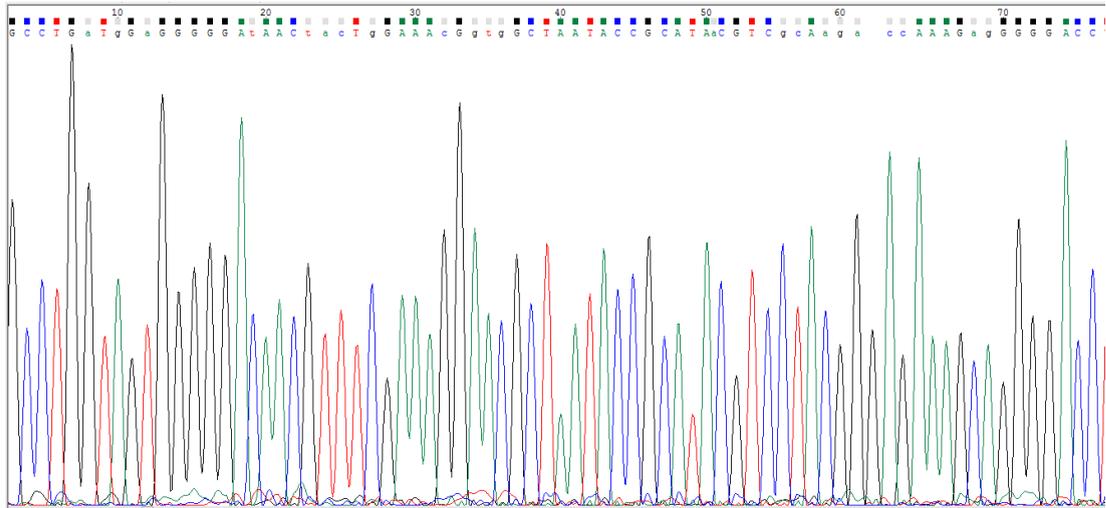
Secuencia 6 *Citrobacter koseri* partial 16S rRNA gene, strain HAMB1 1287



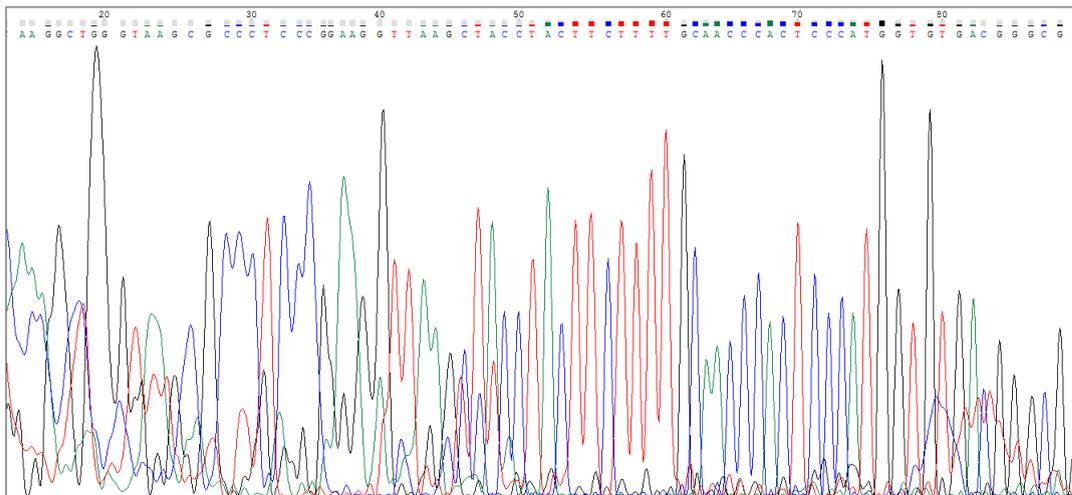
Secuencia 8 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* isolate VNB151-sc-2315230 genome assembly, chromosome: 1



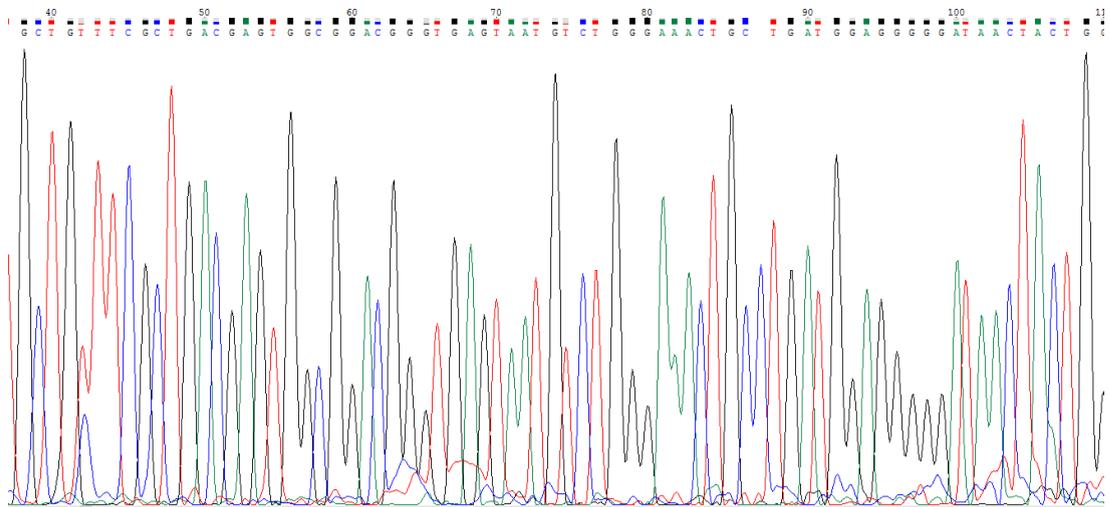
Secuencia 9 *Salmonella enterica* strain MFDS1004024 chromosome, complete genome



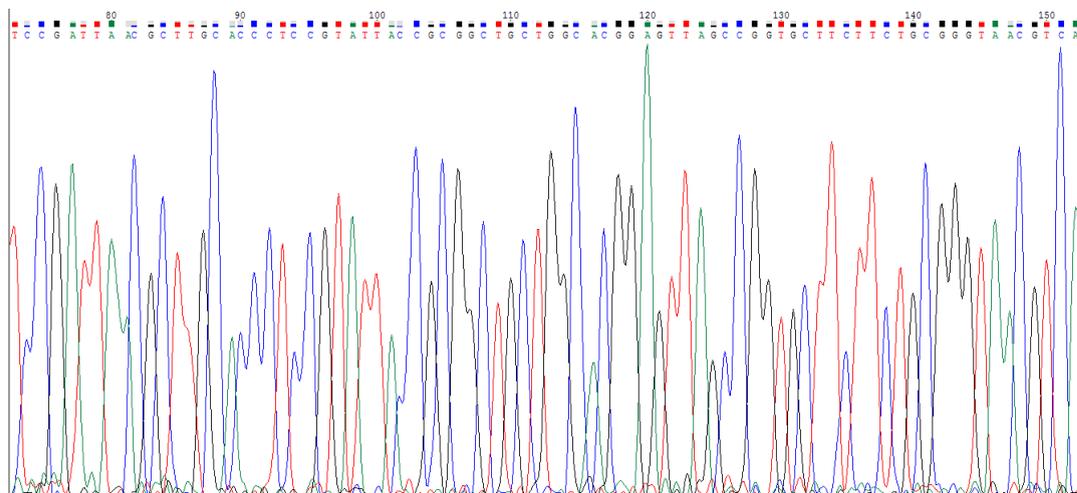
Secuencia 12 *Shigella dysenteriae* strain ISO2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



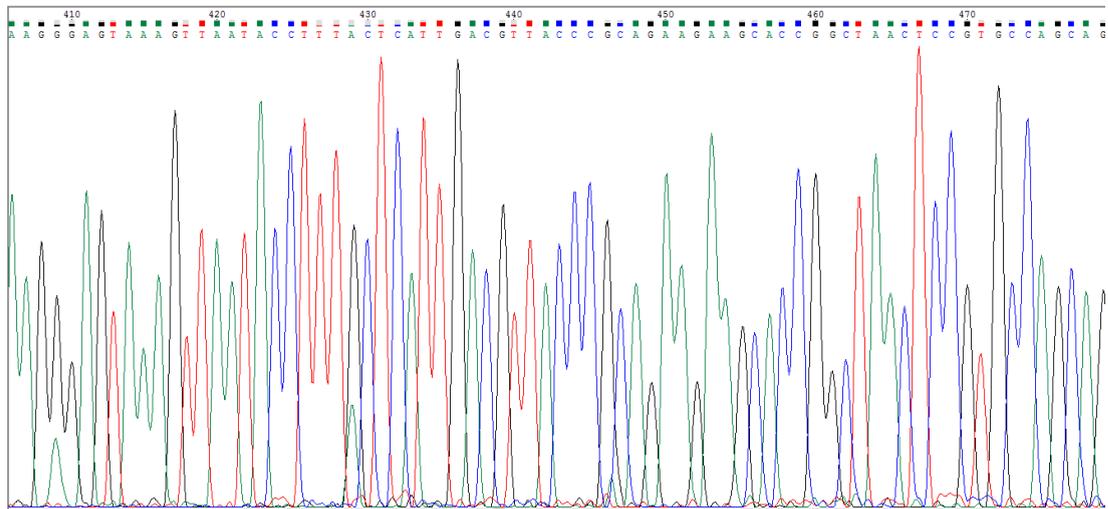
Secuencia 13 *Shigella flexneri* strain 90ft3aii16S ribosomal RNA gene, partial sequence



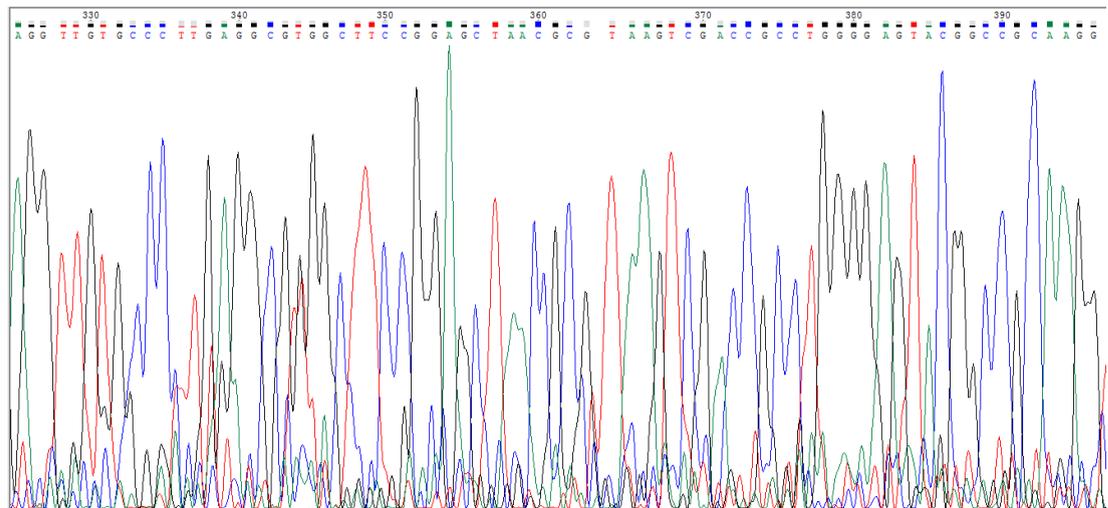
Secuencia 14 *Escherichia coli* strain FORC_042 chromosome, complete genome



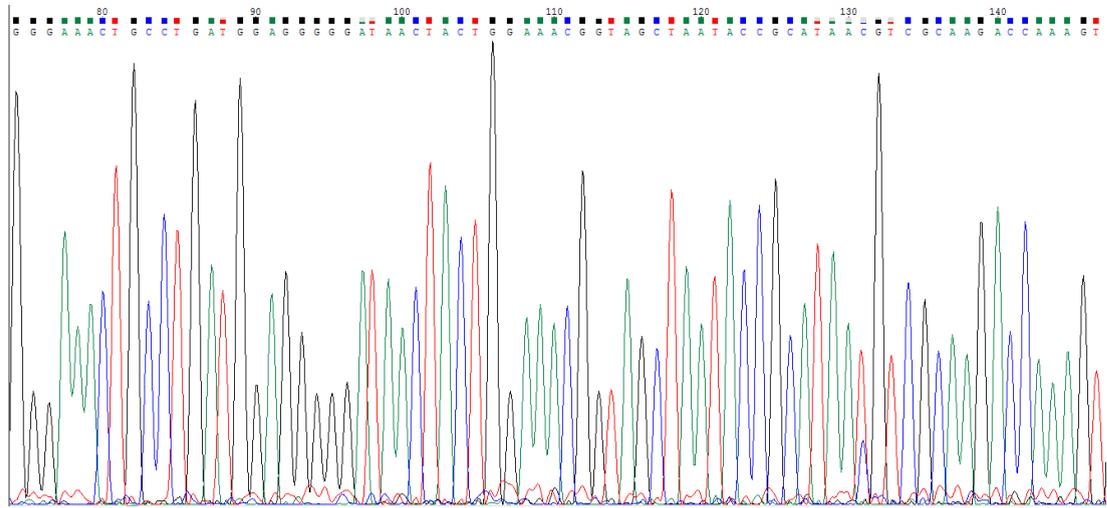
Secuencia 15 *Escherichia coli* strain 14EC033 chromosome, complete genome



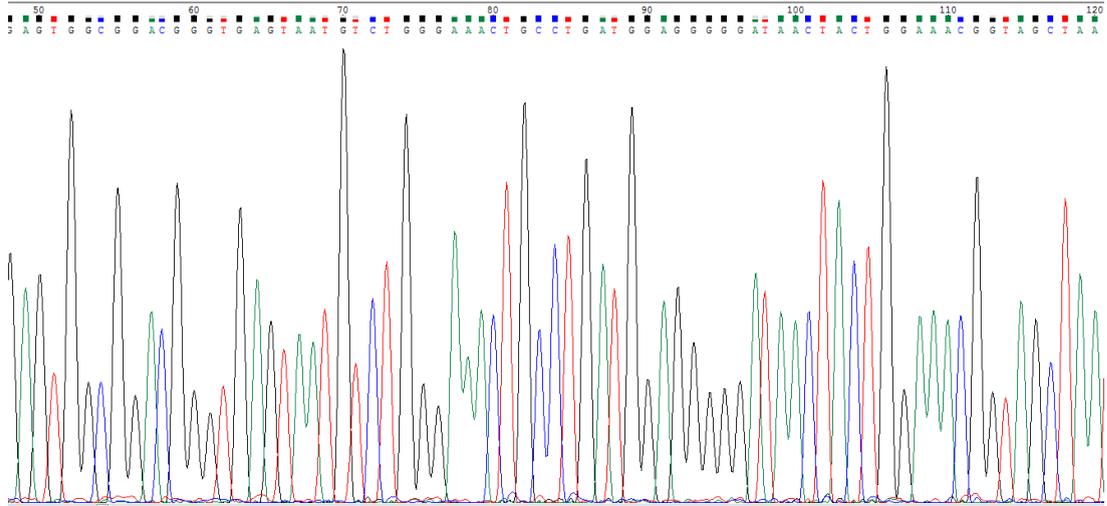
Secuencia 16 *Escherichia coli* strain XX13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



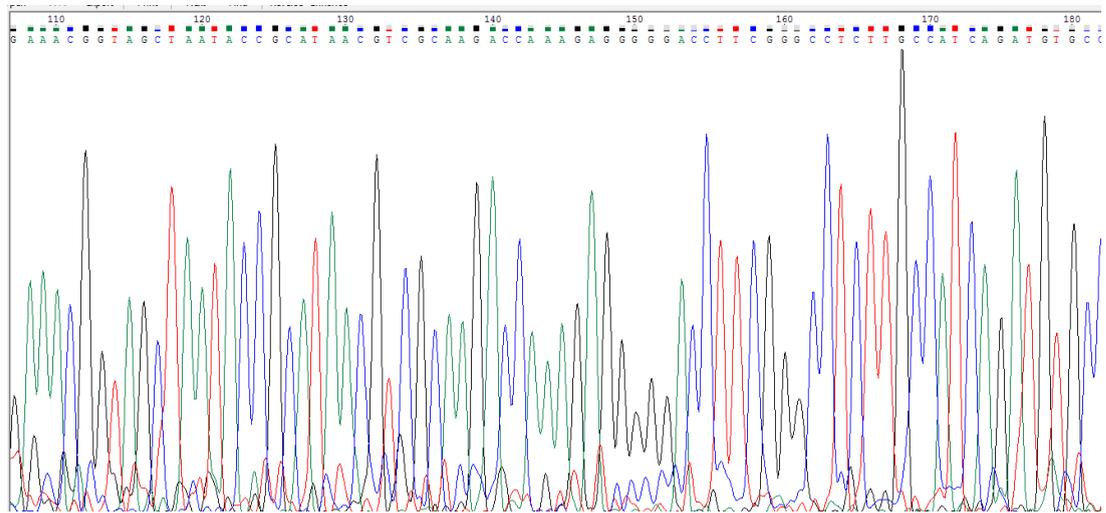
Secuencia 19 *Klebsiella pneumoniae* strain CIFTMFB10569(4F11) 16SribosomalRNA gene, partial sequence



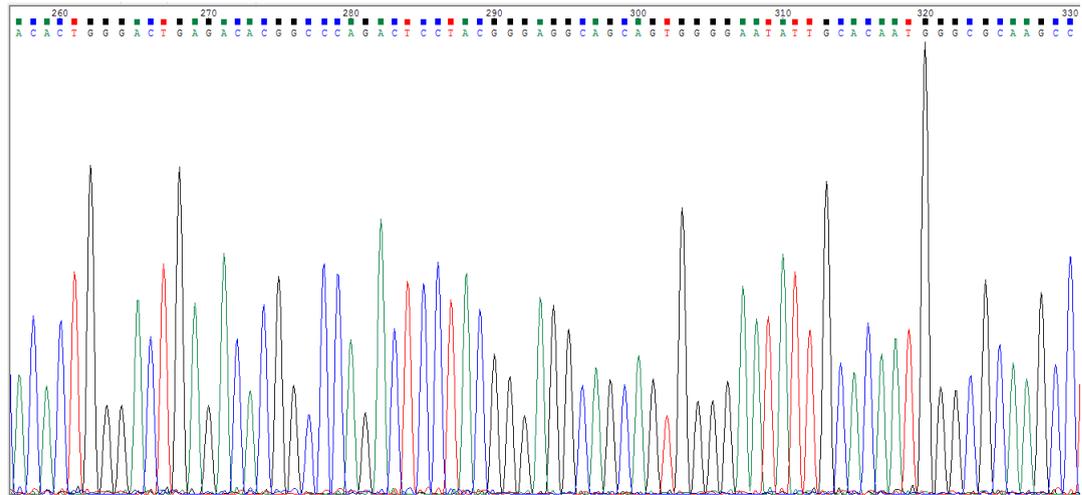
Secuencia 20 *Klebsiella oxytoca* strain AA1816Sribosomal RNA gene, partial sequence



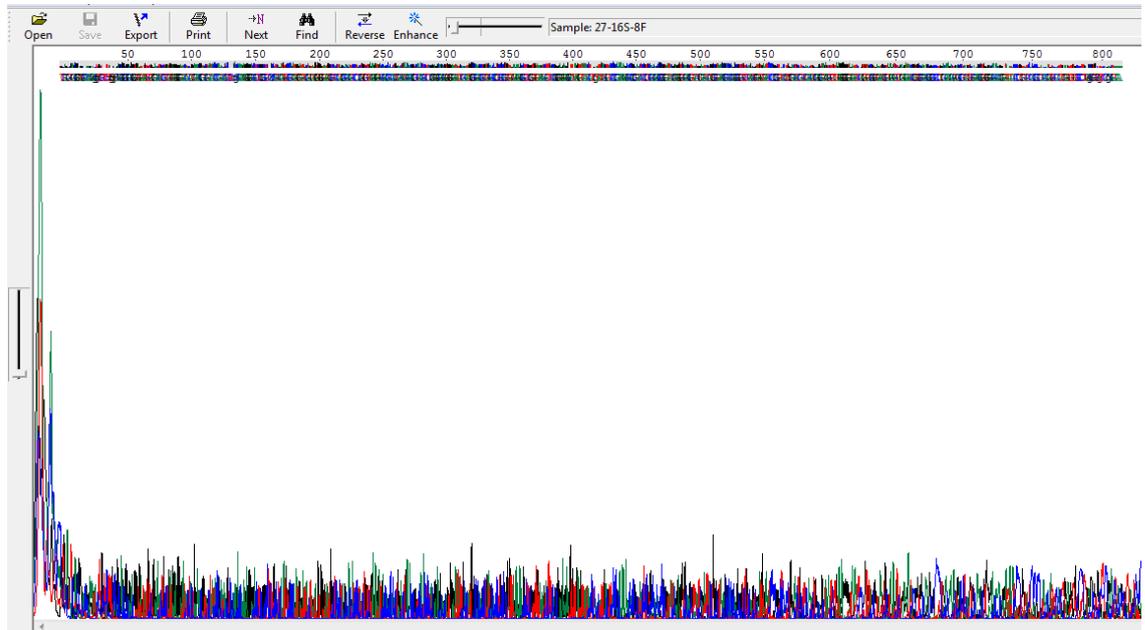
Secuencia 22 *Serratia* sp. JD8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



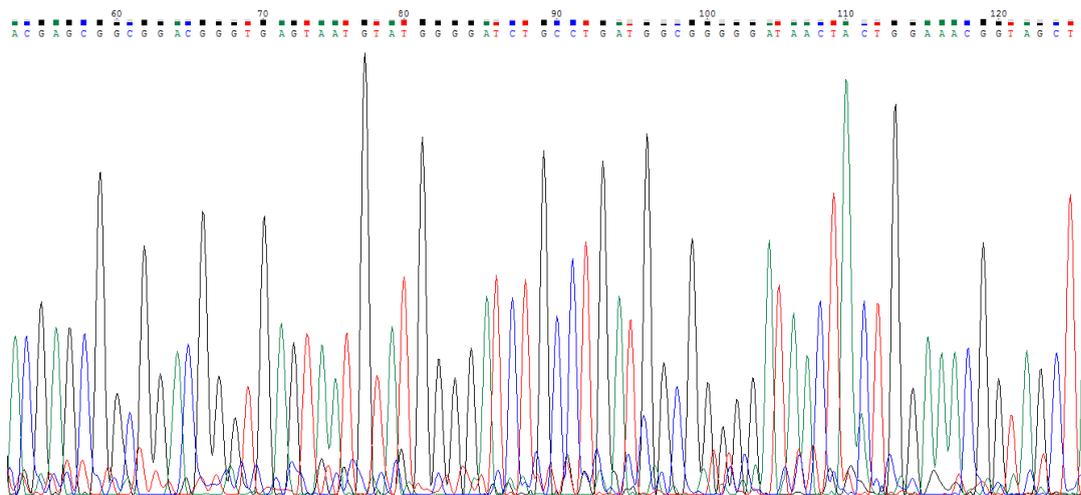
Secuencia 23 *Proteus mirabilis* strain AUMC B-199 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



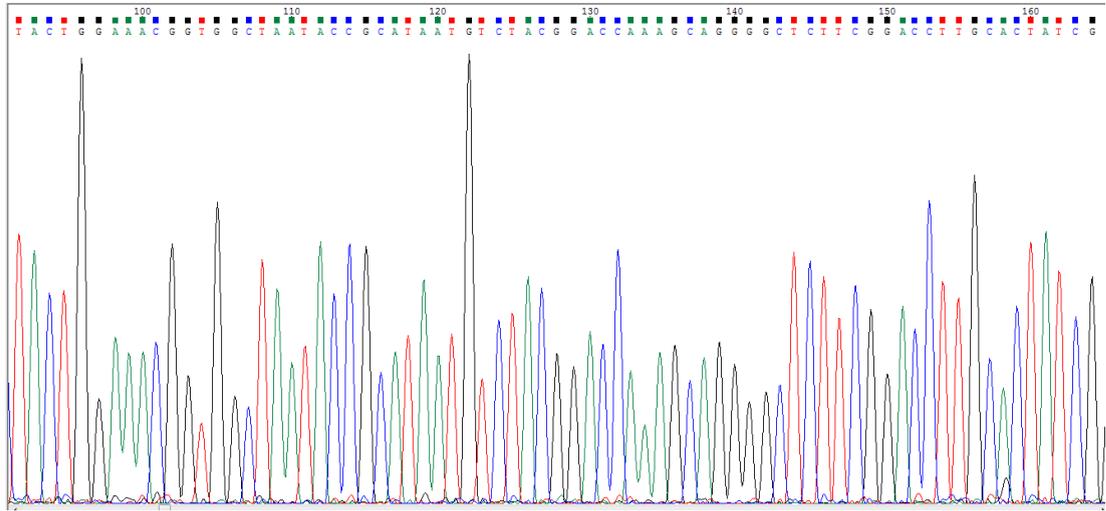
Secuencia 27 *Hafnia alvei* strain SP19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



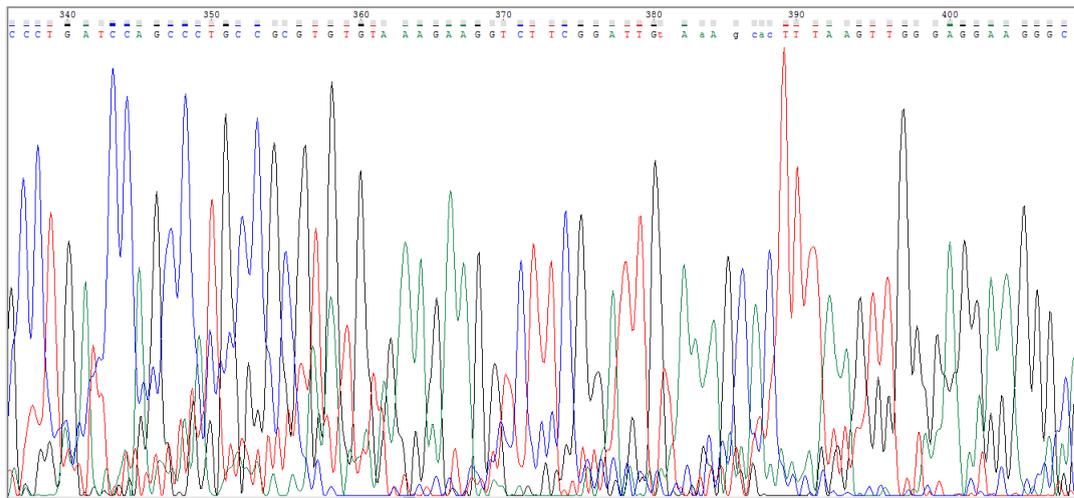
Secuencia 28 *Morganellamorganii* strainwf-216SribosomalRNAgene,partialsequence



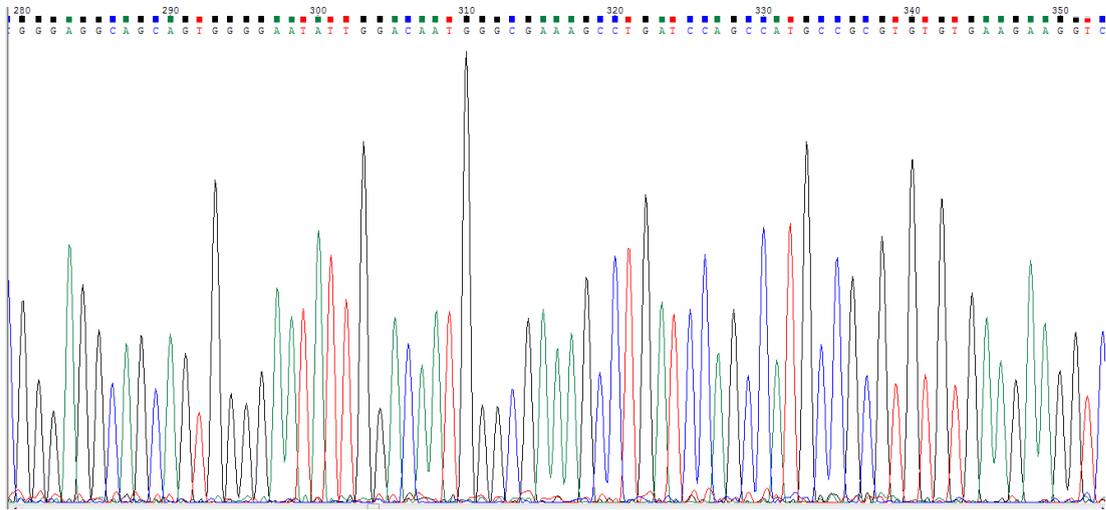
Secuencia 29Uncultured *Proteus* sp. clone SPB-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



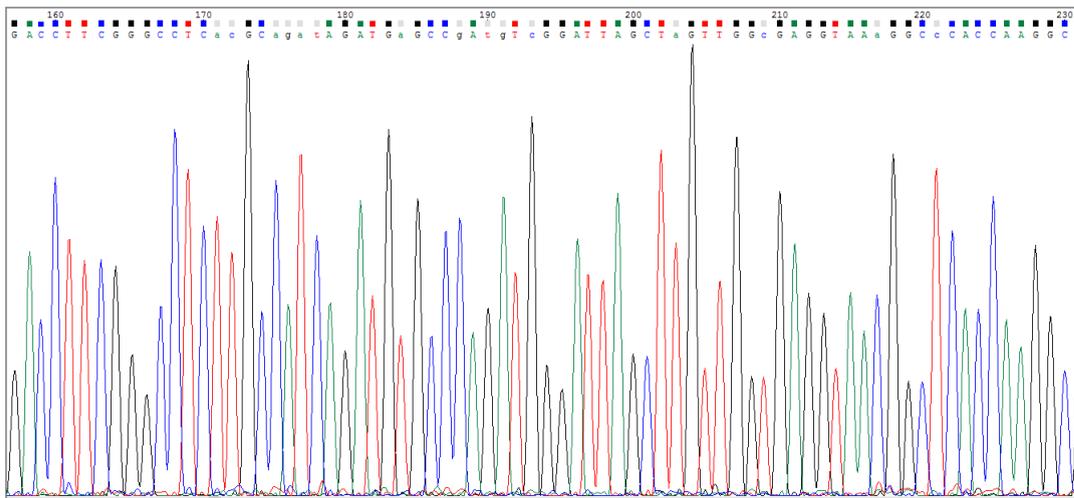
Secuencia 33*Pseudomonas aeruginosa* strain Kasamber15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



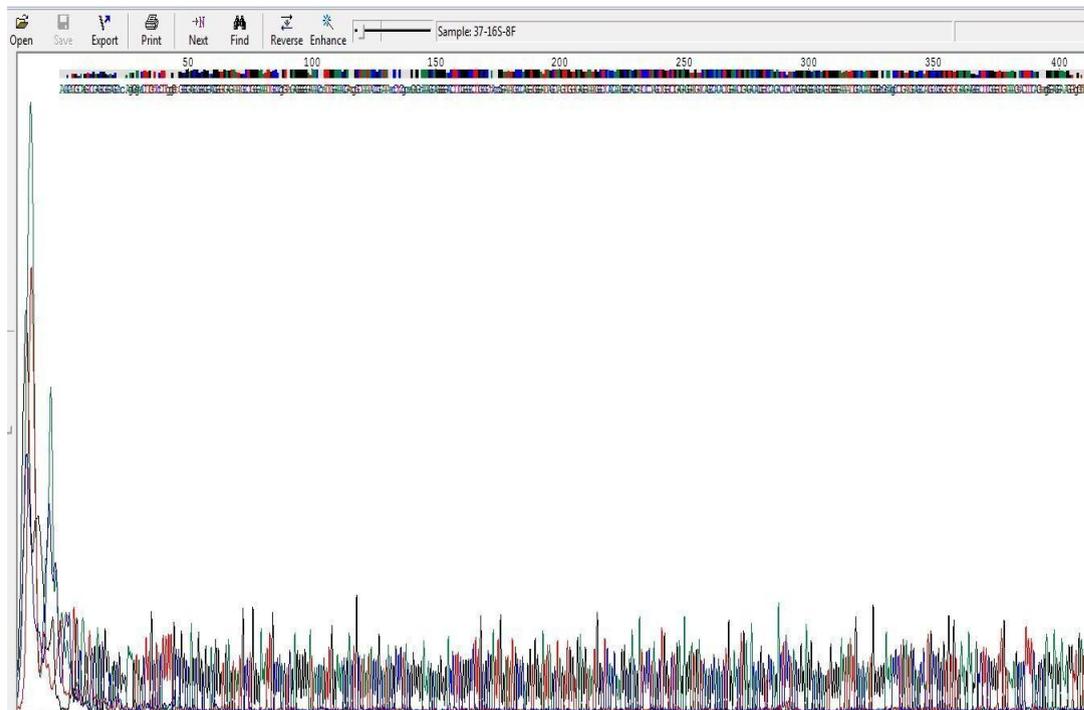
Secuencia 35 *Pseudomonas aeruginosa* strain YU_V35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



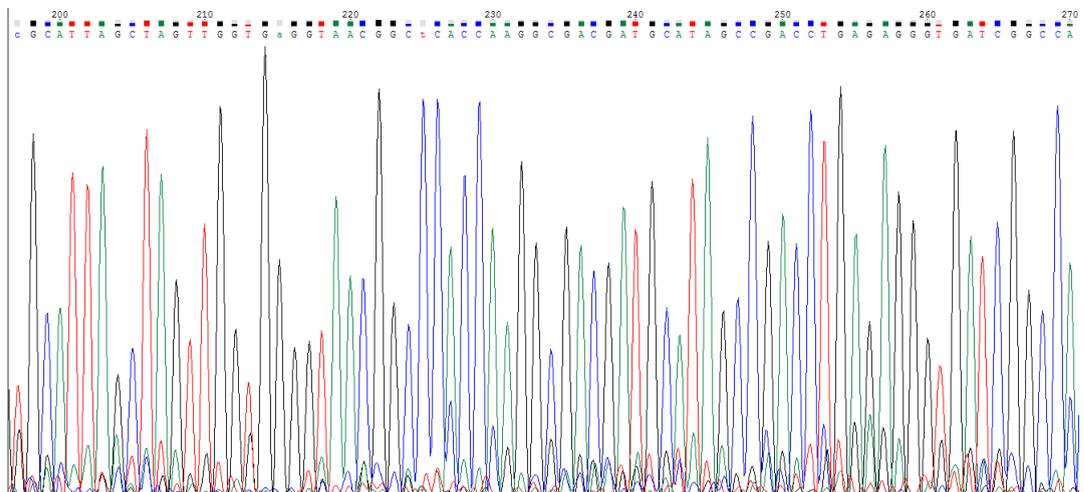
Secuencia 36 *Xanthomonas* sp. TB8-9-II 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



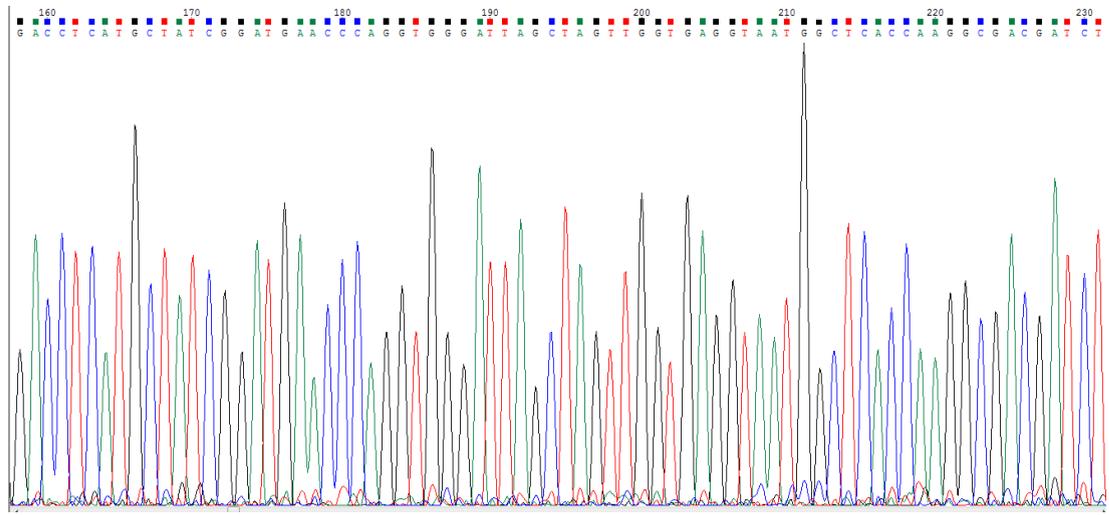
Secuencia 37 *Vibrio cholerae* strain A1552 chromosome 1, complete sequence



Secuencia 38 *Vibrio parahaemolyticus* partial 16S rRNA gene, strain MS27



Secuencia 39 *Plesiomonas shigelloides* strain JL5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



Secuencia 41 *Acinetobacter seifertii* strain V6d 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

