



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOTECNOLÓGICO
Y MOLECULAR (ANBIOMOL)
“Prof. Guillermo López Corcuera”**



**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGICA DE BACILOS
GRAMNEGATIVOS AISLADOS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD
RESPIRATORIA**

www.bdigital.ula.ve

Autora:

Jennifer Carolina Carrero Granadillo

C.I. V-27.632.156

Tutora:

Prof. Elizabeth Pérez

Mérida, Diciembre de 2023

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a *mis padres*; por ser fuente de inspiración y motivación durante mi formación académica.

Este logro es para ustedes.

Agradecimientos

A la profesora Elizabeth Pérez, tutora, por asumir este compromiso con dedicación.

A la profesora María Evelyn Alviárez por facilitarme las muestras y brindarme apoyo y orientación. Su colaboración y experiencia fue fundamental.

Al profesor Miguel Sulbarán, por sus acertadas observaciones y adecuación de espacios para llevar a cabo esta investigación.

A la Universidad de Los Andes, por abrirme sus puertas y proveerme de los recursos y conocimientos necesarios para ser una profesional de calidad.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	II
<i>Agradecimientos</i>	III
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
INTRODUCCIÓN	VIII
CAPITULO I	1
EL PROBLEMA	1
Planteamiento del problema	1
Justificación e Importancia de la Investigación.....	4
Objetivos de la investigación	5
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos	5
Alcances y limitaciones de la investigación	5
Alcances de la investigación	5
Limitaciones de la investigación	6
CAPITULO II	8
MARCO TEÓRICO	8
Trabajos previos	8
Antecedentes históricos	11
Bases teóricas	12
Modelo teórico sobre los criterios fenotípicos de identificación de microorganismos.....	12

Metabolismo bacteriano asociado a los métodos de identificación convencionales	12
Colonización bacteriana en el microambiente habitual	13
Bacilos gramnegativos presentes en muestras clínicas.....	14
Definición operacional de términos	15
Colonización bacteriana.....	15
Coloración bacteriana	15
Medio de cultivo	16
Operacionalización del evento de estudio	16
CAPITULO III.....	18
MARCO METODOLÓGICO.....	18
Tipo de investigación.....	18
Diseño de la Investigación.....	18
Población y Muestra	19
Unidad de Investigación.....	19
Selección del Tamaño de la Muestra.....	19
Sistema de variables	19
Instrumento de recolección de datos.....	20
Procedimientos de la investigación	20
Características micro y macro morfológicas	20
Características bioquímicas.....	21
Estudio fisiológico preliminar a la resistencia de antibióticos.....	21
Estudio fisiológico de la resistencia a sales	22
Diseño de análisis de los datos	22

Variables estadísticas	23
Sistematización de los resultados.....	23
CAPITULO IV	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
Resultados	24
Descripción de la población y de la muestra.....	24
Estudio micro y macromorfológico	25
Caracterización bioquímica.....	26
Identificación microbiológica	29
Estudio fisiológico preliminar de la resistencia de antibióticos.....	30
Estudio preliminar de la resistencia a sales	32
Discusión.....	33
Caracterización bioquímica e identificación microbiológica	33
Estudio fisiológico preliminar de la resistencia a antibióticos.....	38
Resistencia a sales.....	43
CAPITULO V	46
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
Conclusiones.....	46
Recomendaciones.....	48
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	49
ANEXOS	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización del criterio de clasificación: Caracterización bioquímica y fisiológica de bacilos gramnegativos aislados de pacientes con enfermedad respiratoria	17
Tabla 2. Variables estadísticas según la naturaleza, escala de medida e indicadores estadísticos.....	23
Tabla 3. Descripción de la población de pacientes muestreada	24
Tabla 4. Características macromorfológicas de las colonias sembradas en el medio BHI	25
Tabla 5. Características bioquímicas de las cepas bacterianas.....	26
Tabla 6. Caracterización e identificación microbiológica de las cepas bacterianas	30
Tabla 7. Estudio de la resistencia a antibióticos en medio Mueller-Hinton a las 48 horas de incubación.....	32
Tabla 8. Estudio de la resistencia a sales en medio Mueller-Hinton	33
Tabla 9. Prevalencia de resistencia a antibióticos en <i>Klebsiella pneumoniae</i> aislada de diferentes muestras clínicas	42
Tabla 10. Razones que justifican la investigación derivadas del planteamiento del problema	54
Tabla 11. Antecedentes históricos	54
Tabla 12. Tabla de identificación bacteriana.....	55



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOTECNOLÓGICO
Y MOLECULAR (ANBIOMOL)
“Prof. Guillermo López Corcuera”



CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGICA DE BACILOS
GRAMNEGATIVOS AISLADOS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD
RESPIRATORIA

Autora:

Jennifer Carolina Carrero Granadillo
C.I. V-27.632.156

Tutora:

Prof. Elizabeth Pérez

RESUMEN

Las bacterias son microorganismos susceptibles a mutaciones constantes. Esta característica les permite la adquisición de nuevos mecanismos de colonización y, por lo tanto, llegar a sitios anatómicos en los que normalmente no se solían encontrar. Además, permiten la obtención de mecanismos de resistencia a los antibióticos que nos dejan con cada vez menos opciones terapéuticas. El objetivo de este estudio fue aislar e identificar utilizando métodos microbiológicos convencionales, bacilos gramnegativos que se pudieran encontrar colonizando la faringe de pacientes con enfermedad respiratoria. Las cepas positivas, se sometieron a pruebas preliminares de resistencia a antibióticos y sales de sodio. Se encontró que, 4 de los 12 pacientes sometidos a cultivos tuvieron desarrollo de bacilos gramnegativos. Entre los microorganismos aislados, se encontró *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y dos casos de *Klebsiella* spp. Se determinó que la cepa perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae* era susceptible a casi todos los antibióticos ensayados con excepción de la amoxicilina y cefalosporinas de primera generación debido a sus mecanismos intrínsecos de resistencia y tuvo la capacidad de desarrollarse en cultivo con 2,5%^{m/v} de NaCl. Las cepas miembro de la familia *Enterobacteriaceae* mostraron resistencia en diferentes grados a las penicilinas, cefalosporinas de primera y tercera generación, fluoroquinolonas, aminoglucósidos e inhibidores de β -lactamasas. En esta misma familia, la cepa de *Proteus mirabilis* y una de las cepas de *Klebsiella* spp. (C9) mostraron tener la capacidad de resistir hasta 10%^{m/v} de NaCl mientras que la cepa restante de *Klebsiella* spp. (C10) solo resistió 2,5%^{m/v}.

Palabras clave: bacilos gramnegativos, enfermedad respiratoria, métodos microbiológicos, resistencia a antibióticos.



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOTECNOLÓGICO
Y MOLECULAR (ANBIOMOL)
“Prof. Guillermo López Corcuera”



CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGICA DE BACILOS
GRAMNEGATIVOS AISLADOS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD
RESPIRATORIA

Autora:

Jennifer Carolina Carrero Granadillo
C.I. V-27.632.156

Tutora:

Prof. Elizabeth Pérez

ABSTRACT

Bacteria are microorganisms susceptible to constant mutations. This characteristic allows them to acquire new colonization mechanisms and, therefore, reach anatomical sites where they were not normally found. In addition, they allow the development of resistance mechanisms to antibiotics that leave us with fewer and fewer therapeutic options. The objective of this study was to isolate and identify, using conventional microbiological methods, gram-negative bacilli that could be found colonizing the pharynx of patients with respiratory disease. The positive strains, underwent preliminary tests for resistance to antibiotics and sodium salts. It was found that, of the 4 of 12 patients had development of gram-negative bacilli. Among the microorganisms that were isolated, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* and two cases of *Klebsiella* spp. were found. It was determined that the strain belonging to the *Pseudomonadaceae* family was susceptible to almost all the antibiotics tested with the exception of amoxicillin and first generation cephalosporins due to its intrinsic resistance mechanisms, also, it had the ability to grow in culture with 2.5%^{m/v} of NaCl. Strains belonging to the *Enterobacteriaceae* family showed resistance in different degrees to penicillins, first and third generation cephalosporins, fluoroquinolones, aminoglycosides and β -lactamases inhibitors. In this same family, the strain of *P. mirabilis* and one of the strains of *Klebsiella* spp. (C9) showed the ability to resist up to 10% ^{m/v} NaCl while the remaining strain of *Klebsiella* spp. (C10) only resisted 2.5% ^{m/v}.

Keywords: gram-negative bacilli, respiratory disease, microbiological methods, antibiotic resistance

INTRODUCCIÓN

Los bacilos gramnegativos son bacterias que no retienen el colorante primario en la coloración de Gram y son agentes causales de múltiples patologías. Estas bacterias pueden ser identificadas por medio de los métodos microbiológicos convencionales en los cuales se evalúa la capacidad de degradar ciertos sustratos, sobrevivir en medios ricos en NaCl y su susceptibilidad a determinados antibióticos.

La identificación de bacilos gramnegativos es un procedimiento que involucra varios pasos. En primer lugar, se debe hacer un examen directo de la muestra por medio de la coloración de Gram, para observar si hay presencia o no de microorganismos. Segundo, se inoculan los medios de cultivo correspondientes y una vez que se incuban a las condiciones apropiadas se puede observar la formación de masas visibles en la superficie de los agaros cuyas características deben ser descritas. Tercero, se aíslan las colonias de interés clínico, se les realiza la prueba clave y se cultivan en medios selectivos diferenciales y es el resultado de estas pruebas el que determina de qué microorganismo se trata. Por último, se realizan pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, así como de resistencia a sales.

Se busca caracterizar bioquímicamente y fisiológicamente a los bacilos gramnegativos aislados de pacientes con enfermedad respiratoria en virtud de la capacidad de estos microorganismos de causar enfermedad y por la potencialidad que tienen los métodos convencionales para poder identificarlos y elegir el tratamiento oportuno.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

Las bacterias gramnegativas producen una amplia variedad de infecciones en diversos sitios anatómicos, tanto en sujetos sanos como inmunocomprometidos; además, han surgido nuevos síndromes infecciosos. Por ello, es necesario tener un conocimiento minucioso de los cuadros clínicos y las opciones terapéuticas apropiadas (Russo & Johnson, 2019). Esto se puede lograr mediante la observación clínica y la aplicación de los métodos convencionales de identificación bacteriana que, mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas, contribuyen a la caracterización del microorganismo para elegir el tratamiento apropiado.

En correspondencia con las bacterias gramnegativas, se les denomina con este término, a aquellas que no se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue: de ahí el nombre de "Gramnegativas". Esta característica de tinción está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, que presenta dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano y, al ser la pared fina, no retiene el colorante durante la tinción de Gram. Estas bacterias reflejan un tipo natural de organización bacteriana que cuando se trata como taxón se utiliza también el nombre de Negibacteria. Las restantes son las bacterias grampositivas que presentan sólo una membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa (Escalante & Rea, 2015).

Entre los microorganismos de importancia médica, los bacilos gramnegativos constituyen un grupo muy grande de bacterias que para fines prácticos es conveniente establecer cuatro grupos: (I) bacilos de crecimiento rápido en medios de cultivo usuales, que fermentan la glucosa (bacilos

fermentadores); (II) bacilos de crecimiento rápido en medios de cultivo usuales que no fermentan la glucosa (bacilos no fermentadores); (III) bacilos de crecimiento rápido o lento, que pueden o no fermentan la glucosa, pero que necesitan de condiciones y medios de cultivo especiales para su crecimiento; y (IV) bacilos gramnegativos anaerobios estrictos (Zepeda, 1981). Estos microorganismos pueden ser caracterizados por medio de métodos tradicionales de identificación.

En este orden de ideas, una de las tareas fundamentales del laboratorio de microbiología es la aplicación de una metodología precisa que permita la identificación de los microorganismos implicados en procesos clínicos asociados a infecciones, o de aquellos que tienen relación con el hombre. El objetivo de identificar el agente etiológico responsable del proceso infeccioso es conocer las implicaciones patogénicas/patológicas, la evolución clínica, y aplicar una terapia antimicrobiana eficaz. En tal sentido, el pilar fundamental en la práctica de la microbiología clínica lo constituye la asignación de especie a un aislamiento microbiano por medio de métodos convencionales, basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y coste los hace más asequibles (Alarcón, 2017)

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como morfología, crecimiento o desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. En tal sentido, el cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos. En el cultivo es esencial la correcta elección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación (Alarcón, 2017)

El modelo teórico y las aproximaciones teóricas que sustentan este evento de estudio son: Modelo teórico de identificación de microorganismos, el metabolismo bacteriano asociado a las pruebas de identificación y la

colonización bacteriana en el microambiente habitual. Con respecto al modelo teórico, este se encuentra basado en criterios fenotípicos de los microorganismos que implica el estudio del producto génico y no del gen propiamente (Forbes, 2009). Por otra parte, se pueden identificar a las bacterias por medio de su actividad metabólica o bioquímica, ya que cuando son inoculadas en medios de cultivo diferenciales se generan productos metabólicos que reaccionan con un indicador y proporcionan algún tipo de reacción visible a simple vista, tal como un cambio de color (Ramirez y col., 2010) Por último, la microbiota es el conjunto de microorganismos que reside en el cuerpo (bacterias, hongos, arqueas, virus y parásitos), que a su vez pueden diferenciarse en comensales, mutualistas y patógenos que cumplen con una función metabólica dentro del organismo (Alarcón, 2017).

Así pues, Hassen (2023) investigó la incidencia de infecciones bacterianas entre individuos diagnosticados con COVID-19. Entre los microorganismos aislados se encontró *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *Escherichia coli*, entre otros. Por otra parte, Ghulam y col. (2020) realizaron un estudio sobre bacterias gramnegativas que causan infecciones del tracto respiratorio superior para analizar el perfil de susceptibilidad a los antibióticos y su correlación con factores que incluyen sexo, edad y estación. Se observó el crecimiento solo de bacterias gramnegativas y el aislado más frecuente fue *Pseudomonas aeruginosa* seguido de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. Por último, Pérez y col. (2019) estudiaron la resistencia a múltiples compuestos antimicrobianos y la tolerancia a la sal de cepas aisladas en exudado nasofaríngeo de pacientes con sinusitis crónica, aislando bacilos gramnegativos como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella oxytoca*.

Una vez descrita la situación actual del problema, las autoras de esta investigación, proponen el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuáles son las características bioquímicas y fisiológicas de los bacilos gramnegativos aislados en pacientes con enfermedad respiratoria que

acuden a un laboratorio privado en Mérida, Venezuela entre junio 2023 y noviembre 2023?

Justificación e Importancia de la Investigación

La situación actual, aunada a la descripción del problema de estudio de esta investigación, fue la fuente de razones que justificaron la realización de la misma. En este sentido, Hurtado (2010) ha referido varios tipos de razones que justifican el desarrollo de una investigación, específicamente, razones de necesidad, potencialidad, interés, contradicción, oportunidad y tendencia.

Las autoras consideraron razones relacionadas con: necesidad, tendencia, oportunidad y potencialidad (Anexo 1). Al respecto, se justificará esta investigación por la necesidad de realizarla, considerando la capacidad de los bacilos gramnegativos de colonizar a individuos sanos (Alarcón, 2017) y la potencialidad de los métodos convencionales o fenotípicos para la identificación microbiológica (Bou y col., 2011). A su vez, la situación actual del problema mostró una tendencia de presencia de bacilos gramnegativos en la faringe de pacientes con enfermedad respiratoria (Hassen, 2023; Ghulam y col., 2020; Pérez y col., 2019), razón que despertó el interés de las investigadoras y justificó el objeto de estudio.

Por otra parte, se consideró la oportunidad y potencialidad que representa la disponibilidad de los métodos de identificación convencionales. Específicamente, porque estos métodos permiten identificar a las bacterias según características observables, tales como: la morfología que se evidencia por medio de la coloración de Gram, y las propiedades bioquímicas y metabólicas que se pueden visualizar con el uso de indicadores en los medios de cultivo (Ramírez y col., 2010; Bou y col., 2011). En tal sentido, la presencia de bacilos gramnegativos en exudado faríngeo puede ser detectada por medio de los métodos convencionales de identificación.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

- Caracterizar bioquímica y fisiológicamente los bacilos gramnegativos aislados en pacientes con enfermedad respiratoria que acuden a un laboratorio privado en Mérida, Venezuela entre Junio 2023 y Noviembre 2023.

Objetivos específicos

- Identificar por medio de métodos microbiológicos convencionales bacilos gramnegativos aislados de pacientes con enfermedad respiratoria.
- Determinar la resistencia preliminar a antibióticos de los bacilos gramnegativos aislados.
- Interpretar las pruebas de resistencia a sales de las cepas aisladas.

Alcances y limitaciones de la investigación

Alcances de la investigación

La situación actual del problema y la justificación de la investigación permitieron focalizar el alcance de este proceso indagatorio. Al respecto, los alcances de la investigación se relacionan con la profundidad del estudio, es decir, al grado de elaboración que las investigadoras proponen (Hurtado, 2010). En el mismo orden de ideas, Hernández-Sampieri y col. (2014) afirmaron que una vez que se haya revisado la literatura y decidido que la investigación vale la pena y se debe realizar, el siguiente paso es visualizar el alcance que tendrá.

A través del desarrollo de diferentes aspectos metodológicos se espera conseguir una descripción precisa de los bacilos gramnegativos en base al estudio de sus características fenotípicas macro y microscópicas, bioquímicas y fisiológicas. En cuanto a los rasgos fenotípicos se estudiaron las diferencias de las colonias, morfotipo en la coloración de Gram y movilidad. Por otra parte, se determinaron características bioquímicas como la capacidad de desaminar o descarboxilar aminoácidos, de fermentar carbohidratos, producción de H₂S, reducción del nitrato, producción de indol y la degradación de sustratos como urea o citrato. Por último, se observaron las particularidades fisiológicas de estos bacilos como la sensibilidad o resistencia a antibióticos y sales de sodio.

Del mismo modo, se pretende aportar con la investigación el conocimiento de nuevos hallazgos microbiológicos en el exudado faríngeo de pacientes con enfermedad respiratoria, a los cuales se deben dar seguimiento e importancia epidemiológica para optar por alternativas terapéuticas efectivas, disminuyendo con ello las tasas de resistencia a antibióticos que han ido en ascenso en los últimos años (Estévez, 2018).

En este sentido, el continuum de esta investigación estará representado por la relación de correspondencia entre los bacilos gramnegativos aislados de pacientes con enfermedad respiratoria y la caracterización bioquímica y fisiológica como criterio de análisis.

Limitaciones de la investigación

Finalmente, es importante considerar que una investigación, aunque tenga un alcance concreto, podría tener limitaciones. Al respecto, Hernández-Sampieri y col. (2014) refirieron que las limitaciones de una investigación pueden afectar su vialidad. Específicamente, están relacionadas con recursos teóricos, técnicos y presupuestarios. En esta fase de proyecto, existen limitaciones en cuanto a la disponibilidad de trabajos

previos, pues se han encontrado pocos artículos actualizados. También, limitaciones de presupuesto secundaria a la crisis económica, suscitada por la pandemia Covid-19 durante los 2 últimos años (2020-2022).

En el mismo orden de ideas, con respecto a las limitaciones de la investigación, las técnicas de biología molecular son las más utilizadas a nivel mundial para la identificación de patógenos en diferentes infecciones, siendo estas las más rápidas, precisas y exactas a la hora de comparar los resultados con otras metodologías (Bou y col., 2011). Aun cuando es viable realizar técnicas de aislamiento de ADN genómico y PCR, no es posible la realización de procesos como secuenciación de ADN en el país, debido a los elevados costos de estos procedimientos; por ello, se prefieren los métodos convencionales que siguen siendo alternativas confiables y económicas.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos previos

Hassen (2023) divulgó en *Medical and Clinical Research* un artículo original titulado: Infecciones bacterianas asociadas con la infección por COVID-19 en la provincia de Thi-Qar, Irak. El objetivo fue investigar la incidencia de infecciones bacterianas entre individuos diagnosticados con COVID-19. A su vez, una vez identificadas las bacterias, se evaluaron los patrones de susceptibilidad antimicrobiana.

Fueron recolectadas un total de 1307 muestras clínicas respiratorias (esputo, hisopados nasales e hisopados de garganta) y sangre de pacientes que dieron positivo a COVID-19. Se realizó cultivo e identificación microbiológica por los métodos tradicionales y perfil de susceptibilidad a determinados antimicrobianos mediante métodos como la difusión en disco, la microdilución en caldo o sistemas automatizados (Hassen, 2023).

De los pacientes con cultivos positivos, 226 (58,8%) fueron bacterias gramnegativas y 158 (41,2%) fueron bacterias grampositivas. En específico, 75 muestras de exudado faríngeo fueron tomadas y los agentes más comunes fueron *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, y en menor medida, *Acinetobacter* spp. Además hubo aislados de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus faecalis*, y *Streptococcus pneumoniae*. En cuanto a los perfiles de resistencia la ceftriaxona, cefepima, ciprofloxacina y amoxicilina/clavulanato, fueron efectivos contras las bacterias gramnegativas, mientras que los menos efectivos fueron la ampicilina y la gentamicina. Por lo tanto, recomiendan un estudio apropiado para el uso de antibióticos en pacientes diagnosticados con COVID-19 (Hassen, 2023).

Ghulam y col. (2020), realizaron un estudio sobre bacterias gramnegativas que causan infecciones del tracto respiratorio superior en Hyderabad, Sindh. El objetivo fue analizar el perfil de susceptibilidad a los antibióticos de las cepas aisladas y su correlación con factores que incluyen sexo, edad y estación.

Se recogieron asépticamente un total de 201 muestras (esputo e hisopados faríngeos) de los pacientes que asistieron al laboratorio de diagnóstico e investigación de Hyderabad. Todas las muestras fueron procesadas inmediatamente después de su recolección. Inicialmente, las muestras se sembraron en agar sangre y agar MacConkey. Las placas inoculadas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente, se seleccionaron colonias discretas y se cultivaron en cultivo puro para su posterior identificación por medio de pruebas microbiológicas tradicionales y pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos por el método de Kirby-Bauer (Ghulam y col., 2020).

Se recolectaron muestras de personas con edades comprendidas entre 4 y 90 años para análisis bacteriológico, y el 29,85% fueron positivas. Se observó el crecimiento solo de bacterias Gramnegativas, siendo el aislado más frecuente fue *Pseudomonas aeruginosa* que representó el 48,33% de los aislamientos, seguido de *Klebsiella pneumoniae* con 45% y *Escherichia coli* con 6,67%. La mayoría de las muestras pertenecían a pacientes masculinos, y se encontró que el grupo de edad de 31 a 40 años era el más susceptible a la infección. Por otra parte, los datos de sensibilidad a los antibióticos de los aislados demostraron que la piperacilina, tazobactam y la amikacina fueron muy eficaces contra las bacterias aisladas, mientras que la cefradina, la ampicilina, la ofloxacina y el cotrimoxazol fueron los antibióticos menos eficaces (Ghulam y col., 2020).

Pérez y col. (2019) publicaron un artículo original en la revista *CPQ Medicine*, titulado: Estudios de resistencia a múltiples compuestos antimicrobianos y tolerancia a la sal de cepas aisladas de pacientes con

sinusitis crónica. El objetivo era caracterizar fenotípicamente bacilos gramnegativos aeróbicos aislados en adultos con sinusitis crónica, que asistieron a un laboratorio privado de la ciudad de Mérida, Venezuela desde enero hasta diciembre de 2015.

Se realizaron estudios en 11 pacientes con sinusitis crónica a los cuales se les tomaron muestras de exudado nasofaríngeo con hisopos estériles y se sometieron a procedimientos microbiológicos estándar para la identificación de las bacterias que causan la sinusitis crónica. Para identificar los aislamientos en estudio y lograr una ubicación taxonómica preliminar a nivel de grupo o familia, se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: Medio de Hugh y Leifson, reducción de nitrato, MIO (Motilidad, Indol, Ornitina), prueba de oxidasa, Agar MacConkey e hidrólisis de urea. Por otra parte, La resistencia a los antibióticos se estudió en medio LB preparado con antibióticos como ampicilina, kanamicina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefalotina, cefadroxilo, ciprofloxacina, gentamicina y ceftriaxona. Se preparó una solución madre de cada uno de ellos y se empleó para preparar placas de medio MLD (25 mL) con las siguientes concentraciones de cada antibiótico: 25, 50, 100 y 200 µg/ml. Luego, las cepas se inocularon con palillos chinos y se incubaron a 37°C, tomando lecturas a 24 y 48 h de incubación. Cada experimento se realizó por triplicado. Finalmente, La tolerancia a la salinidad de las cepas frente al cloruro de sodio (NaCl) se evaluó empleando placas de medio LB suplementado con cuatro concentraciones diferentes de NaCl (2,5-15% m/v), que posteriormente se incubaron a 35°C durante 24 h (Pérez y col., 2019).

Los resultados de los estudios bioquímicos y microbiológicos mostraron que las 11 cepas caracterizadas se ubicaron taxonómicamente dentro del grupo de *Enterobacteriaceae*, y se determinó que los aislamientos estudiados fueron *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella oxytoca*. Por otra parte, todos los géneros bacterianos identificados mostraron mayor resistencia a la ampicilina, cefalotina, cefadroxilo,

ceftriaxona y amoxicilina/ácido clavulánico, mientras que fueron sensibles a ciprofloxacina, kanamicina y gentamicina. Los investigadores concluyeron que las cepas bacterianas evaluadas en este trabajo parecen haber desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir a tratamientos con antibióticos y/o soluciones salinas comúnmente prescritos en el tratamiento de la sinusitis (Pérez y col., 2019).

Antecedentes históricos

Antes de la fabricación de los microscopios, era imposible ver a las bacterias, y fue Girolamo Fracastoro quien en 1538 supuso que la combinación de un lente cóncavo con otro convexo podría aumentar las imágenes. Sin embargo, no fue hasta finales del siglo XVI, que Galileo Galilei y Zacharias Jansen de manera independiente patentaron el microscopio, aún está en discusión quien lo hizo primero. Por otra parte, fue Girolamo en 1546 quien aventuró la hipótesis de la transmisión de las enfermedades contagiosas mediante partículas o "semillas" invisibles y capaces de replicarse por sí mismas. Estas partículas invisibles fueron vistas por primera vez por Anton van Leeuwenhoek en 1676, a los que denominó "animalculus" y estos eran, efectivamente, bacterias, hongos y protozoos (Ledermann, 2012).

En cuanto a los métodos convencionales de identificación bacteriana, Robert Koch en 1881 introdujo los medios de cultivos sólidos al laboratorio para el aislamiento de microorganismos al facilitarles el sustrato para su crecimiento (Edermann, 2003; Sanchez, 2020). Por otra parte, Hans Christian Joachim Gram en 1884 desarrolló una coloración que permite distinguir a las bacterias según la composición de su pared celular (Santiago, 2003), la utilidad de la técnica se hizo tan evidente que en 1889 todos los cultivos se empezaron a someter a la tinción de Gram como primera orientación diagnóstica (Edermann, 2003) (Anexo 2).

Bases teóricas

Modelo teórico sobre los criterios fenotípicos de identificación de microorganismos

Tradicionalmente, el diagnóstico microbiológico estudia las características físicas, morfológicas o metabólicas. Es decir, se estudia el producto génico más no el gen propiamente dicho. La observación fenotípica fundamenta la investigación a través del estudio de características tintoriales, morfología de colonias, requerimientos nutricionales-ambientales y la resistencia o sensibilidad de la bacteria a los agentes antimicrobianos y concentraciones elevadas de NaCl. Por eso, la coloración de Christian Gram en 1884 es la primera y más importante clasificación microbiológica, entre bacterias grampositivas y gramnegativas, determinada por la configuración de la pared bacteriana (Forbes, 2009).

Metabolismo bacteriano asociado a los métodos de identificación convencionales

En esencia, el metabolismo bacteriano abarca todos los procesos celulares requeridos para la supervivencia y la replicación del microorganismo (Forbes, 2009). El conocimiento de la fisiología y del metabolismo bacteriano tiene algunas aplicaciones prácticas. Entre ellas, permite preparar medios de cultivo para el aislamiento e identificación de patógenos. Además, desde un enfoque terapéutico, permite conocer y entender el mecanismo de acción de algunos antibióticos que bloquean una vía metabólica o la síntesis de alguna macromolécula esencial para la bacteria (Algorta y col., 2008)

En ese orden de ideas, cuando se identifican bacterias a través de ensayos bioquímicos, se inoculan en una serie de medios de cultivo

diferenciales, se incuban por un periodo de tiempo y temperatura adecuada y se observa cada medio en busca de algún producto metabólico específico. Esto generalmente se realiza añadiendo indicadores que reaccionan específicamente con el producto y proporcionan algún tipo de reacción visible a simple vista, tal como un cambio de color (Ramírez y col., 2010).

El objetivo de la identificación microbiológica por medio de los métodos convencionales es conocer las implicaciones patogénicas/patológicas y la evolución clínica para aplicar una terapia antimicrobiana eficaz (Alarcón, 2017).

Los resultados de las pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas se comparan con tablas de identificación disponibles en la literatura tal como la disponible en el (Anexo 3).

Colonización bacteriana en el microambiente habitual

La microbiota es el conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, arqueas, virus y parásitos) que residen en el cuerpo (Alarcón, 2017) y que influyen en su desarrollo, fisiología, inmunidad y nutrición (González & Ruiseco, 2017). En las vías aéreas superiores, esta microbiota está influenciada por factores como edad, estado inmunológico, antibioticoterapia, hospitalización, y últimamente la inmunización con las nuevas vacunas frente a *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* (Alarcón, 2017)

La microbiota habitual incluye distintos microorganismos entre los que destacan los estreptococos, estafilococos, micrococos, neisserias, corinebacterias, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus* spp., *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*, entre otras. Estas comunidades tienen un comportamiento simbiótico y mutualista con las células eucariotas humanas y son imprescindibles para el correcto funcionamiento del cuerpo, mantienen un importante diálogo con el

sistema inmune y tienen funciones homeostáticas que condicionan la salud (Alarcón, 2017).

Sin embargo, bacterias potencialmente patógenas como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y algunos bacilos gramnegativos también pueden a veces colonizar a individuos sanos, principalmente si estos han estado hospitalizados o han padecido alguna enfermedad respiratoria recientemente (Alarcón, 2017).

Bacilos gramnegativos presentes en muestras clínicas

Normalmente, los bacilos gramnegativos no se encuentran fuera del tracto intestinal y suelen causar numerosas infecciones sobre todo del aparato genitourinario. Sin embargo, en enfermos hospitalizados, o cuando existe una alteración de las barreras anatómicas, estos bacilos pueden causar neumonías, meningitis, septicemia, formación de abscesos, entre otras afecciones. En tal sentido, son considerados como una de las principales causas de infección nosocomial (Álvarez, 1991) y los patógenos más importantes en este contexto son *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii* (Segura & Torres, 2022).

En general, los bacilos gramnegativos escasamente se han descrito en enfermedades comunes de la mucosa nasofaríngea. Sin embargo, no se descarta su presencia y que puedan ser agentes etiológicos de estas afecciones (Pérez y col., 2019). Por otra parte, el aislamiento de bacilos gramnegativos de sitios estériles casi siempre indica infección, mientras que su aislamiento de sitios no estériles, sobre todo de heridas abiertas en tejido blando y las vías respiratorias, requiere un cuadro clínico compatible para distinguir entre la colonización y la infección (Russo & Johnson, 2019).

Definición operacional de términos

Colonización bacteriana

Es el mecanismo mediante el cual ciertos microorganismos son capaces de invadir al hospedero. Como ejemplo de estos mecanismos, en primer lugar, están las adhesinas que se clasifican en adhesinas fimbriales o no fimbriales (proteínas o carbohidratos) y permiten que se adhieran a la puerta de entrada. En segundo lugar, están las biopelículas que son agrupaciones de microorganismos que crecen en una matriz de exopolisacáridos y se pueden formar en superficies inertes o tejidos vivos. En tercer lugar, encontramos la cápsula que es un polímero extracelular compuesto de polisacáridos o polipéptidos. Por último, están las proteasas de IgA que aumentan la supervivencia de las bacterias en la superficie de las mucosas (Ramírez, 2022).

www.bdigital.ula.ve

Coloración bacteriana

Las tinciones consisten en preparaciones orgánicas o acuosas de colorantes que proporcionan diversos colores a los microorganismos. En este sentido, los colorantes pueden usarse para teñir de forma directa materiales biológicos, permitiendo estudiar más fácilmente las bacterias. Específicamente se estudia su tamaño, forma y disposición. Además, permiten observar estructuras internas como, por ejemplo, gránulos y esporas. Por otra parte, también se pueden usar tinciones que revelen las diferencias químicas en la estructura bacteriana tal como es la coloración de Gram o la de Ziehl-Neelsen. La importancia de las coloraciones radica en que proveen información que orientan al microbiólogo a seleccionar apropiadamente los medios de cultivo (Ramírez y col., 2010).

Medio de cultivo

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que proveen condiciones bioquímicas y biofísicas apropiadas para el aislamiento, desarrollo y mantenimiento de los microorganismos. En la actualidad, los medios de cultivo se adquieren en las casas comerciales en forma de productos deshidratados, que son muy estables y resistentes al deterioro, siempre y cuando se conserven y manipulen de manera adecuada (Ramírez y col., 2010).

Operacionalización del evento de estudio

Para operacionalizar las variables o el evento de estudio con el respectivo criterio de análisis, es necesario la definición conceptual y la operacional de las mismas (Hurtado, 2010). En tal sentido, las variables se operacionalizan con la finalidad de identificar los elementos y datos empíricos que expresan su presencia. Los indicadores derivaron de las bases teóricas. El proceso de la operacionalización de las variables garantizó que los objetivos propuestos fuesen alcanzados. A continuación, se presenta la tabla de operacionalización de las variables (Tabla 1).

Tabla 1. Operacionalización del criterio de clasificación: Caracterización bioquímica y fisiológica de bacilos gramnegativos aislados de pacientes con enfermedad respiratoria

OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE			
VARIABLE	DEFINICIÓN NOMINAL	DEFINICIÓN REAL (DIMENSIONES)	DEFINICIÓN OPERACIONAL (INDICADORES E INSTRUMENTO)
Caracterización Fenotípica de Bacilos Gramnegativos	La caracterización fenotípica de los bacilos gramnegativos consta del estudio de las características físicas, macro y micro morfológicas, así como de las características funcionales microbiológicas y fisiológicas de los mismos (Forbes y col., 2009).	Caracterización macro y micro morfológica de Bacilos Gramnegativos Consta de las características físicas de los mismos. (Forbes y col., 2009).	Visualización con lupa de las características de las colonias bacterianas. Para ello los medios de cultivos deben cumplir con los requerimientos necesarios para que las bacterias se multipliquen en cantidades suficientes y observar la formación de colonias. Uso del microscopio para observar el morfotipo de las bacterias y si estas presentan o no movilidad alguna.
		Caracterización Microbiológica de Bacilos Gramnegativos Se refiere al estudio de las reacciones bioquímicas y metabólicas de los aislados bacterianos (Forbes y col., 2009).	Lectura de pruebas claves a través de tablas de identificación de microorganismos. por pruebas bioquímicas de identificación: <ul style="list-style-type: none"> • Oxidasa • Kligler • LIA • MIO • Citrato • Caldo nitratado • O/F Glucosa • O/F Maltosa • Crecimiento a 42°C
		Caracterización Fisiológica de Bacilos Gramnegativos. Representa la resistencia a sales y antibióticos (Forbes y col., 2009).	Inhibición por ausencia de crecimiento. <ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidad o resistencia a antibióticos. • Sensibilidad o resistencia a Sales de sodio.

Fuente: La autora

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

Hernández-Sampieri y col. (2014) refirieron que el conocimiento generado por un proceso investigativo define el alcance y el tipo de investigación. Adicionalmente, Hurtado (2010) refirió que existen diferentes tipos de investigación: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. Específicamente, la investigación analítica tiene como fin el estudio de la estructura interna de un fenómeno, utilizando un criterio de análisis. En este sentido, esta investigación será analítica ya que se analizarán las características bioquímicas y fisiológicas de los microorganismos, específicamente de los bacilos gramnegativos aislados en pacientes con enfermedad respiratoria dentro del contexto y período determinado.

Diseño de la Investigación

El diseño de investigación se refiere a las estrategias que se implementan para recolectar la información en una fuente determinada, en un tiempo específico y en una cantidad o amplitud asociada a lo que se quiere saber (Hurtado, 2010). Específicamente, el dónde en esta investigación está representado por un laboratorio privado de Mérida; por lo tanto, el diseño es de laboratorio. Respecto al cuándo, el diseño será contemporáneo y transeccional, ya que la información se recolectará en el presente y una sola vez en cada unidad de investigación. En cuanto a la amplitud de la información, el diseño será univariable, ya que el evento de estudio está constituido por el objeto y un solo sujeto de estudio.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La unidad de investigación está representada por las cepas de los bacilos gramnegativos aislados de pacientes con enfermedad respiratoria, que acudieron a un laboratorio privado en el estado Mérida. Las cepas deben cumplir con el criterio de inclusión: (1) Ser bacilos gramnegativos.

Selección del Tamaño de la Muestra

La muestra estuvo representada por 12 cepas que fueron aisladas en pacientes con enfermedad respiratoria, que acudieron a un laboratorio privado en Mérida, Venezuela. Las cepas que se sometieron al protocolo de identificación fueron aquellas que cumplían con los criterios de inclusión predeterminados.

Sistema de variables

Las variables de esta investigación están representadas por los tipos de morfología bacteriana, tinción Gram, morfología colonial, pruebas bioquímicas, pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y pruebas de resistencia a sales. Las dimensiones son: Morfología bacteriana (bacilos o cocos). Tinción Gram (Gram positivos o Gram negativos). Morfología colonial (crecimiento, morfología, tamaño, elevación, bordes, consistencia, color y densidad). Pruebas bioquímicas (cambios de pH, producción de H₂S, producción de CO₂, reducción del nitrato y utilización de determinados sustratos). Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (sensible, resistente). Pruebas de resistencia a sales (sensible o resistente). Sin embargo,

considerando que esta investigación es analítica, las variables no serán sistematizadas como dependiente, independiente e intervinientes.

Instrumento de recolección de datos

Según Palella & Martins (2017), un instrumento permite recolectar los datos relacionados con los objetivos y los indicadores obtenidos de la operacionalización de las variables. Por lo tanto, se diseñó un instrumento que fue evaluado por un juicio de 3 expertos (Anexo 4).

Procedimientos de la investigación

Los aspectos procedimentales de esta investigación serán realizados a través de los métodos convencionales de identificación.

Características micro y macro morfológicas

Una vez obtenidas las muestras, el procesamiento comenzó con la caracterización fenotípica fundamentada en dos procesos. Primero, el estudio micro morfológico la forma de esa célula. Además, la tinción de gram manifiesta la naturaleza de la pared celular bacteriana. Segundo, el estudio macro morfológico, que constó de la observación directa de características macroscópicas de las colonias como crecimiento, morfología, tamaño, elevación, bordes, consistencia, color y densidad. Los aislados se cultivarán en agar BHI para observar dichas características al cabo de 24 horas de incubación a 37°C.

Características bioquímicas

La caracterización bioquímica logra ubicar al microorganismo en un taxón preliminar a nivel de grupo o familia, para lo cual se realizan las siguientes pruebas bioquímicas de la casa comercial BBL: Prueba de la oxidasa, conjuntamente la siembra en agar MacConkey (MK) para evaluar la fermentación de la lactosa, agar Sangre para evaluar la hemólisis, Medio Hugh y Leifson (O/F) glucosa y maltosa, Kliger (KIA), Lisina Hierro Agar (LIA), Motilidad Indol Ornitina (MIO), Urea, Citrato de Simmons (CIT), Caldo nitrado y caldo BHI a 42°C (Koneman, 2006).

Estudio fisiológico preliminar a la resistencia de antibióticos

Una vez concluida la identificación microbiológica, se procedió a estudiar de manera preliminar la resistencia a los antibióticos (Ramírez y col., 2010). Para ello se prepararon 16 placas (divididas a la mitad) del medio Mueller-Hinton con diferentes diluciones de antibióticos comerciales (adquiridos en la farmacia) en su presentación intravenosa, los cuales se diluyeron hasta obtener una concentración stock de 100 mg/ml. Los antibióticos seleccionados fueron: Amoxicilina 100mL de Bayer, Ampicilina 1g de Calox, Cefalotina 1g de Leti, Gentamicina 160^{mg}/2_{ml} de Elter, Amoxicilina/Ácido clavulánico 1g + 200mg de SM Pharma, Ciprofloxacina 400^{mg}/mL de Bayer, Cefotaxima 1g de Vitalis; mientras que el de presentación en comprimidos fue Cefadroxilo de 500mg.

A partir de estas soluciones stock se prepararon placas de medio Mueller-Hinton (10mL cada mitad) con las siguientes concentraciones de cada uno de los antibióticos: 25, 50, 75 y 100 ^µg/ml. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C para el control de contaminación. Luego se sembraron las cepas por medio de un asa, y se incubaron a 37°C, tomando la lectura a las 24 y 48 horas de incubación, todas las pruebas se realizaron por duplicado.

Estudio fisiológico de la resistencia a sales

Una característica importante en la fisiología de un microorganismo es la capacidad de crecer en presencia de sales (Pérez y col., 2019). Para este ensayo se emplearon cuatro concentraciones distintas de NaCl (cloruro de sodio) expresadas en %^{m/v}, correspondientes a 2,5; 5, 10 y 15%, con las cuales se prepararon en placas de medio Mueller-Hinton.

Análisis de la correspondencia entre los métodos convencionales de identificación microbiológica y los bacilos gramnegativos aislados en pacientes con enfermedad respiratoria

De manera rutinaria, los laboratorios de microbiología emplean métodos tradicionales para la identificación de los microorganismos implicados en procesos clínicos asociados a infecciones o de aquellos que tienen relación con el hombre. El objetivo es conocer las implicaciones patogénicas/patológicas, la evolución clínica para aplicar una terapia antimicrobiana eficaz (Alarcón, 2017). En este sentido, los métodos convencionales se pueden aplicar para el análisis de los bacilos gramnegativos que sean aislados en muestras clínicas de pacientes con enfermedad respiratoria, ya que nos permitirán conocer las características bioquímicas y fisiológicas y así, poder identificarlos.

Diseño de análisis de los datos

Los resultados de esta investigación fueron analizados a través del enfoque cualitativo. Tal como lo propusieron Palella y Martins (2010), se recolectaron los datos relacionados con el problema de investigación: Características bioquímicas y fisiológicas de bacilos gramnegativos aislados de pacientes con enfermedad respiratoria. En tal sentido, los datos obtenidos

fueron medidos en un contexto descriptivo y se interpretaron mediante la consulta de las técnicas establecidas en el Manual Bergey, para el estudio fenotípico micro y macromorfológico, microbiológico y fisiológico del evento en estudio, bacilos gramnegativos.

Variables estadísticas

Las variables estadísticas de esta investigación fueron clasificadas desde su naturaleza y escala de medida. El fin es identificar el indicador estadístico pertinente (Tabla 2). Entre otros aspectos, estos indicadores permitieron la interpretación de los resultados.

Sistematización de los resultados

Los resultados fueron sistematizados a través de tablas. El fin de esta sistematización fue contribuir con la interpretación de los resultados. De esta manera, se contribuyó con la respuesta al enunciado holopráxico. A su vez, se obtuvo el conocimiento nuevo formulado en el objetivo general y sistematizado a través de los sub-logros presentes en los objetivos específicos.

Tabla 2. Variables estadísticas según la naturaleza, escala de medida e indicadores estadísticos

Variables	Tipo de variable			Escala de medida				Indicador estadístico
	Cualitativa	Cuantitativa		Nominal	Ordinal	Intervalo	Razón	
		Discreta	Continua					
Morfología micro y macroscópica	X			x				Frecuencia absoluta y porcentual
Pruebas bioquímicas	X			x				Frecuencia absoluta y porcentual
Susceptibilidad antimicrobiana y a sales	X			x				Frecuencia absoluta y porcentual

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Descripción de la población y de la muestra

Se tomaron muestras de exudado faríngeo a un total de 12 pacientes que asistieron a un laboratorio privado en la ciudad de Mérida, previamente diagnosticados con enfermedad respiratoria crónica. Del grupo muestreado, el 66,6% fueron mujeres y el 33,3% restante fueron hombres. Simultáneamente, se determinó que 4 de las 12 muestras analizadas, presentaron desarrollo de bacilos gramnegativos (Tabla 3).

Tabla 3. Descripción de la población de pacientes muestreada

N°	CÓDIGO CEPAS	SEXO		MUESTRA	AISLAMIENTO DE BACILOS GRAMNEGATIVOS
		M	F		
1	C1	X		Exudado faríngeo	No
2	C2		X		Si
3	C3	X			No
4	C4	X			Si
5	C5		X		No
6	C6		X		No
7	C7		X		No
8	C8		X		No
9	C9	X			Si
10	C10		X		Si
11	C11		X		No
12	C12		X		No

M: masculino; **F:** femenino.

Estudio micro y macromorfológico

El estudio micromorfológico consistió en realizar la tinción de Gram a cada uno de los patógenos bacterianos previamente aislados, concluyendo que las cepas C2, C4, C9 y C10 corresponden a bacilos gramnegativos. Para el estudio macromorfológico, las cepas se sembraron en placas de medio BHI donde se evaluaron características como extensión del crecimiento, forma, tamaño, elevación, borde, densidad, consistencia y color de las colonias aisladas.

De acuerdo con la Tabla 4 las colonias de la cepa C2 son de crecimiento abundante, redondas, medianas, convexas, con bordes irregulares, opacas, mucosas y de color verde. Por otra parte, las colonias de la cepa C4 son de crecimiento moderado, irregulares, medianas, planas, con bordes enteros, opacas, secas, color blanco y se observó un efecto swarming caracterizado por la formación de una película de crecimiento que se extiende a partir de las colonias. Por último, existe un grupo formado por las cepas C9 y C10 cuyas colonias comparten características morfológicas, siendo estas de crecimiento abundante, redondas, medianas, planas, con bordes ondulados, opacas, mucosas, de color cremoso y además poseían un aspecto brillante.

Tabla 4. Características macromorfológicas de las colonias sembradas en el medio BHI

Código cepa	C2	C4	C9	C10
Extensión	Abundante	Moderada	Abundante	Abundante
Forma	Redonda	Irregular	Redonda	Redonda
Tamaño	Mediano	Mediano	Mediano	Mediano
Elevación	Convexa	Plana	Plana	Plana
Bordes	Irregulares	Enteros	Ondulados	Ondulados
Densidad	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
Consistencia	Mucosa	Seca	Mucosa	Mucosa
Color	Verde	Blanco	Crema	Crema

Caracterización bioquímica

Para llevar a cabo una clasificación taxonómica preliminar, las 4 cepas aisladas fueron estudiadas de acuerdo a sus características bioquímicas. En primer lugar se realizó la prueba clave de la oxidasa y baterías de pruebas bioquímicas constituidas por: agar MacConkey (MK), agar Kligler (KIA), agar Lisina Hierro (LIA), agar Citrato de Simmons (CIT), agar Motilidad Indol Ornitina descarboxilasa (MIO) y Urea para las cepas oxidasa negativa. Por otra parte, para las cepas oxidasa positiva se les realizaron las pruebas de Hugh y Leifson (O/F) glucosa y maltosa, caldo BHI (Prueba de crecimiento a 42°C), caldo nitrado, KIA y CIT. En lo que se refiere a la presencia de hemolisinas, se encontró que ninguna de las cepas produce hemólisis, clasificándolas, así como γ -hemolíticas; y Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Características bioquímicas de las cepas bacterianas

Código cepa	C2	C4	C9	C10
Oxidasa	+	-	-	-
Hemólisis	γ -hemolítica	γ -hemolítica	γ -hemolítica	γ -hemolítica
Agar MacConkey	+	+	+	+
Agar Kligler	K/K--	K/A++	K/A+-	A/A+-
Agar Lisina Hierro	N/A	R/A+-	K/K+-	K/K+-
Agar Citrato de Simmons	+	+	+	+
Agar Motilidad-Indol-Ornitina	N/A	+++	+++	+++
Agar Urea	N/A	+	+	+
O/F Glucosa	+/-	N/A	N/A	N/A
O/F Maltosa	-/-	N/A	N/A	N/A
Caldo nitrado	+	N/A	N/A	N/A
Crecimiento a 42°C	+	N/A	N/A	N/A

N/A = No aplica

Una vez realizada la prueba cave de la oxidasa se observó que todas las cepas eran oxidasas negativas a excepción de C2, lo que hizo que se siguiera una marcha analítica con pruebas bioquímicas diferentes para la identificación de miembros de la familia *Pseudomonadaceae*.

Respecto al agar MacConkey, se observó el crecimiento de la totalidad de las 4 cepas inoculadas en el medio. El 25% de las cepas (1/4), en específico la C10, utiliza la lactosa ocasionando una disminución en el pH del medio, produciendo la aparición de un color fucsia característico debido a la gran cantidad de ácido. El resto de las cepas (C2, C4 y C9) ocasionaron un viraje de color amarillo debido a la ausencia de fermentación, coincidiendo además con los resultados obtenidos en el agar Kligler.

Por otra parte, en el agar Kligler se observó que las cepas C4, C9 y C10 producían gas y fermentaban la glucosa. Esta fermentación produjo un viraje del indicador rojo fenol de rojo a amarillo en todo el tubo debido al ácido producido. Sin embargo, las cepas C4 y C9 no fermentaban la lactosa por lo que la producción de ácidos era insuficiente y fue neutralizado por parte de la descarboxilación oxidativa de las peptonas que forma aminas en el bisel, provocando entonces que este se tornara de nuevo rojo. Por su parte, el taco conservó el color amarillo ya que la degradación de los aminoácidos es insuficiente para neutralizar el medio por completo. La cepa C2 no fermentaba la lactosa ni la glucosa por lo tanto el medio conservó un color rojo tanto en el taco como en el bisel. Conjuntamente, ninguna cepa producía H₂S a excepción de C4 en la que se apreció la formación de un precipitado de color negro como resultado de la reacción de H₂S con los iones férricos presentes en el medio.

Con respecto al agar Lisina Hierro, se determinó que las cepas C9 y C10 descarboxilan la lisina, reacción que se evidencia en un principio por la fermentación de la glucosa que disminuye el pH del medio produciendo un viraje del indicador púrpura de bromocresol de púrpura a amarillo. A su vez, este pH ácido induce la activación de la enzima lisina descarboxilasa que da

lugar a la formación de aminos cadaverinas que alcalinizan el medio virando el indicador de amarillo a púrpura nuevamente, conservándose este color tanto en el taco como en el bisel. Por su parte, la cepa C4 desamina la lisina y se evidenció porque al ser utilizadas las peptonas se alcalinizó el medio, lo que es estímulo para inducir la producción de la enzima lisina desaminasa. Esta reacción da lugar a la formación de un cetoácido que reacciona con las sales de hierro en presencia de oxígeno y produce un color vino en el bisel. El hecho de que se evidencie la formación de H₂S en el agar Kligler y no en el agar Lisina Hierro se explica porque las sales de hierro fueron usadas para la reacción mencionada en el bisel, por lo tanto, no hay suficientes para que puedan reaccionar con el H₂S y observar el precipitado característico.

El 100% de las cepas estudiadas pueden utilizar el citrato como única fuente de carbono. Esto se evidenció con la positividad de las pruebas en agar Citrato de Simmons, cuyos componentes principales son el citrato y el fosfato de amonio. En general, los microorganismos que pueden usar el citrato, pueden usar el amonio como única fuente de nitrógeno y al hacerlo producen amoniaco (NH₃) y este a su vez se convierte en hidróxido de amonio (NH₄OH) que alcaliniza el medio y produce un viraje del indicador azul de bromotimol de verde a azul.

Las cepas C4, C9 y C10 descarboxilan la ornitina, reacción que se evidenció por el color púrpura en el fondo del medio semisólido MIO y cuyo fundamento es el mismo que el explicado en la descarboxilación de la lisina en el agar LIA. En este mismo medio se evaluó la motilidad y la producción de indol. Se determinó que C4 y C9 eran móviles debido a la presencia de turbidez en el medio pero no producían indol. Por su parte, C10 era inmóvil y además poseía la enzima triptofanasa que actuó sobre el triptófano presente en el medio produciendo indol que al reaccionar con el aldehído del reactivo de Kovacs formó un anillo fucsia característico.

Todas las cepas sembradas en agar urea poseen la enzima ureasa que hidrolizó la urea liberando amoniaco, el cual reaccionó con la solución y

liberó carbonato de amonio, alcalinizando así el medio. Este aumento de pH conllevó a un viraje del indicador rojo fenol de amarillo a fucsia.

Al evaluar el metabolismo oxidativo y/o fermentativo en el agar Hugh y Leifson (O/F) de la cepa C2, se determinó que el microorganismo oxida la glucosa pero no la fermenta. El microorganismo al oxidar la glucosa produce gran cantidad de ácidos que disminuyen el pH del medio observándose un viraje del indicador azul de bromotimol de verde a amarillo en el tubo sin parafina del medio semisólido mientras que el tubo con parafina conservó el color verde. Siguiendo el mismo fundamento, se evaluó la oxidación y/o fermentación de la maltosa la cual fue negativa en ambos casos.

La cepa C2 tuvo la capacidad de reducir los nitratos a nitrógeno molecular ya que se observó el desplazamiento de líquido en el tubo de Durham del caldo nitrado. A su vez, se observó turbidez en el caldo BHI incubado a 42°C, lo que se interpreta como positivo.

www.bdigitalula.ve **Identificación microbiológica**

De acuerdo con los resultados de las pruebas bioquímicas preliminares, las cepas C4, C9 y C10 pueden ubicarse dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, mientras que la C2 pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, esto, considerando que se trata de bacilos gramnegativos, fermentadores de la glucosa en su mayoría, no esporulados, móviles o no, con capacidad de crecer en agar MacConkey en presencia de sales biliares y cristal violeta como inhibidores.

Para llevar a cabo la identificación mediante una caracterización microbiológica se compararon los resultados obtenidos experimentalmente en el laboratorio con las tablas de identificación disponibles en la literatura (Anexo 3). Se obtuvo entonces un aislado de *Pseudomonas aeruginosa*, un aislado de *Proteus mirabilis* y 2 aislados de *Klebsiella* spp. Los resultados están ilustrados en la Tabla 6.

Tabla 6. Caracterización e identificación microbiológica de las cepas bacterianas

Código cepa	C2	C4	C9	C10
Oxidasa	+	-	-	-
Hemólisis	γ-hemolítica	γ-hemolítica	γ-hemolítica	γ-hemolítica
Agar MacConkey	+	+	+	+
Agar Kliger	K/K--	K/A++	K/A+-	A/A+-
Agar Lisina Hierro	N/A	R/A+-	K/K+-	K/K+-
Agar Citrato de Simmons	+	+	+	+
Agar Motilidad-Indol-Ornitina	N/A	+++	+++	-+++
Agar Urea	N/A	+	+	+
O/F Glucosa	+/-	N/A	N/A	N/A
O/F Maltosa	-/-	N/A	N/A	N/A
Caldo nitrado	+	N/A	N/A	N/A
Crecimiento a 42°C	+	N/A	N/A	N/A
Identificación	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp.

N/A: No aplica

www.bdigital.ula.ve

Estudio fisiológico preliminar de la resistencia de antibióticos

Para el estudio preliminar de la resistencia de antibióticos como una característica de importancia en las cepas aisladas, se emplearon ocho antibióticos comerciales preparados a diferentes concentraciones en agar Mueller-Hinton (MH), cuyas lecturas se realizaron a las 24 y 48 horas de incubación. Se utilizaron antibióticos pertenecientes a diferentes clasificaciones; del grupo de los β-lactámicos se ensayaron: la ampicilina y la amoxicilina, esta última en combinación con el ácido clavulánico como representante de los inhibidores de β-lactamasas. También se utilizaron cefalosporinas de primera generación (cefalotina y cefadroxilo) y de tercera generación (cefotaxima). Por otra parte, como representante de las fluoroquinolonas se utilizó la ciprofloxacina (segunda generación); y del grupo de los aminoglucósidos se probó la gentamicina. Todos los antibióticos se

usaron a concentraciones de 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como se indica en la Tabla 7.

Con respecto a los ensayos realizados con antibióticos β -lactámicos se determinó que todas las cepas ensayadas eran resistentes a la amoxicilina con excepción de *Proteus mirabilis* (C4) que es sensible a concentraciones igual o mayores de 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A su vez, todas cepas eran resistentes a la ampicilina excepto *Pseudomonas aeruginosa* (C2). En cuanto a las cefalosporinas de primera generación todas las cepas eran resistentes exceptuando a *Klebsiella* spp. (C10) que es sensible a concentraciones iguales o mayores de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cefadroxilo. Por su parte, *Pseudomonas aeruginosa* (C2) fue sensible a la cefotaxima y *Proteus mirabilis* (C4) fue sensible solo a concentraciones iguales o mayores de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las cepas restantes eran resistentes a este antibiótico.

Se observó una sensibilidad media a las fluoroquinolonas por parte de las cepas estudiadas. *Pseudomonas aeruginosa* (C2) y *Klebsiella* spp. (C10) fueron sensibles a la ciprofloxacina mientras que *Proteus mirabilis* (C4) fue sensible solo a concentraciones iguales o mayores a 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por su parte, *Klebsiella* spp. (C9) resultó ser una cepa resistente a todas las concentraciones ensayadas del antibiótico.

En referencia a la sensibilidad a la gentamicina, se observó que *Pseudomonas aeruginosa* (C2) era sensible, mientras que la concentración mínima inhibitoria de *Proteus mirabilis* (C4) y *Klebsiella* spp (C9) era 50 y 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Por su parte, *Klebsiella* spp. (C10) resultó ser resistente a todas las concentraciones.

Por último, se estudió la sensibilidad a los inhibidores de β -lactamasas observándose que todas las cepas eran resistentes a la amoxicilina con ácido clavulánico y que solo *Pseudomonas aeruginosa* (C2) era sensible a este antibiótico combinado.

Tabla 7. Estudio de la resistencia a antibióticos en medio Mueller-Hinton a las 48 horas de incubación.

Antibiótico			C2	C4	C9	C10	
β-lactámicos	Penicilinas	Amoxicilina	R	75	R	R	
		Ampicilina	S	R	R	R	
	Cefalosporinas	1era generación	Cefadroxilo	R	R	R	50
			Cefalotina	R	R	R	R
		3era generación	Cefotaxima	S	50	R	R
Fluoroquinolonas	2da generación	Ciprofloxacina	S	75	R	S	
Aminoglucósidos	Gentamicina		S	50	75	R	
Inhibidores de β-lactamasas	Amoxicilina / Ácido clavulánico		S	R	R	R	

R: Resistente a todas las concentraciones ensayadas; S: Sensible a todas las concentraciones ensayadas; Los números: Representan la concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g}/\text{mL}$); C2: *Pseudomonas aeruginosa*; C4: *Proteus mirabilis*; C9 y C10: *Klebsiella* spp.

Estudio preliminar de la resistencia a sales

Una característica importante en la fisiología de un microorganismo es la capacidad de crecer en presencia de sales. Para este ensayo se emplearon cuatro concentraciones distintas de NaCl (cloruro de sodio) expresadas en $\% \text{m}/\text{v}$, correspondientes a 2,5; 5, 10 y 15% m/v , con las cuales fueron preparadas las placas de medio Mueller-Hinton. Según la Tabla 8, todas las cepas son capaces de crecer frente a concentraciones de NaCl menores del 2,5% m/v . Sin embargo, se observó que las cepas *Proteus mirabilis* (C4) y *Klebsiella* spp. (C9) soportan concentraciones más altas de sal, siendo la concentración mínima inhibitoria de 10 y 15% m/v respectivamente.

Tabla 8. Estudio de la resistencia a sales en medio Mueller-Hinton

Concentración de NaCl (% ^m / _v)	C2	C4	C9	C10
2,5	R	R	R	R
5	S	R	R	S
10	S	R	R	S
15	S	S	R	S

S: Sensible; R: Resistente; C2: *Pseudomonas aeruginosa*; C4: *Proteus mirabilis*; C9 y C10: *Klebsiella* spp.

Discusión

Caracterización bioquímica e identificación microbiológica

La microbiota del tracto respiratorio superior está principalmente compuesta por estreptococos del grupo viridans, estafilococos coagulasa negativo, *Corynebacterium* sp., *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria* sp. (No patógenas), *Lactobacillus* sp., *Veillonella* sp. y Espiroquetas (Ramírez y col, 2010). El equilibrio bacteriano de la orofaringe excluye a los bacilos gramnegativos, por lo tanto, es de interés clínico investigar por qué en este estudio se encontraron este tipo bacterias colonizando esta zona.

La colonización de estos microambientes se debe a la adherencia bacteriana, es decir, a la capacidad de las bacterias para unirse a receptores en la superficie de una célula epitelial. Se han observado cambios en los carbohidratos de las células bucales, que pueden permitir la unión de bacterias Gram-negativas con pili tipo 1. Se ha sugerido un mecanismo para estas observaciones, dado que los pacientes en estado crítico parecen tener enzimas exoglicosidasas en la saliva, que pueden eliminar los monosacáridos periféricos de los oligosacáridos de la superficie celular y, por lo tanto, exponer nuevos sitios de unión bacteriana. Esto puede ocurrir debido a la eliminación enzimática del ácido siálico y la galactosa de la superficie de las células bucales, y estos cambios en la superficie de las

células bucales se han observado en estudios de pacientes críticamente enfermos. Estos cambios pueden permitir que las bacterias se establezcan en el tracto respiratorio superior, desde donde pueden alcanzar y luego colonizar el árbol traqueobronquial uniéndose al epitelio y el moco lesionados. (Niederman, 1994).

Una vez obtenidos los aislamientos puros a partir de las muestras faríngeas de los pacientes con enfermedad respiratoria, identificadas como bacilos gramnegativos previa coloración de Gram y capacidad de desarrollo en agar MacConkey, se procedió a realizar la identificación microbiológica partiendo de una serie de pruebas bioquímicas que permiten conocer el comportamiento fisiológico del microorganismo conforme a los cambios que ocasiona en el medio. Las pruebas bioquímicas que permiten la diferenciación de las enterobacterias, se basan en la presencia o ausencia de diferentes enzimas, las cuales dirigen el metabolismo bacteriano a lo largo de varias vías que pueden detectarse al incorporar sustratos a los medios de cultivo, brindando un perfil bioquímico para la identificación (Koneman, 2006). Simultáneamente se llevó a cabo el estudio de las características macromorfológicas de las colonias en medio BHI.

Culminado el proceso de incubación de las 4 cepas para la identificación microbiológica, se verificó la prueba de la oxidasa (diferencial para enterobacterias), la cual se basa en la producción bacteriana de la enzima citocromo oxidasa intracelular, resultando negativa en todos los casos, con excepción de C2 en la cual se observó la formación de un color negro purpúreo debido a la oxidación del reactivo por presencia de la enzima (Ramírez y col., 2010).

La batería bioquímica utilizada previamente: agar MK, KIA, LIA, CIT, MIO y agar Urea permitió ubicar a los aislamientos C4, C9 y C10 dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (Tabla 6) las cuales son habitantes comunes del tracto gastrointestinal humano e incluso animal, siendo inocuas pero capaces de adquirir un alto grado de patogenicidad para el individuo una vez que

colonizan otras regiones anatómicas. Mientras que con los agares MK, KIA, O/F glucosa y maltosa, Caldo BHI a 42°C, CIT, y caldo nitrado se ubicó a la cepa C2 en la familia *Pseudomonadaceae* (Tabla 6) la cual no forma parte de la microbiota normal del ser humano, pero puede encontrarse como colonizante de las zonas corporales húmedas (axilas, conducto auditivo, región perianal y mucosas (Pesantez & Sanchez, 2021).

Tomando en cuenta que las bacterias se diferencian: 1) por los tipos de hidrato de carbono que metabolizan y 2) por la cantidad de ácido producido; los medios MK, KIA y O/F permiten observar este comportamiento a través del resultado del metabolismo de sus sustratos: lactosa, glucosa/lactosa y glucosa/maltosa, respectivamente. Además, la prueba de O/F evidencia la capacidad de oxidar y/o fermentar el carbohidrato al mismo tiempo.

En el agar CIT, la utilización del citrato de sodio como única fuente de carbono para metabolismo y crecimiento genera un color azul debido a la presencia de productos alcalinos (Ramírez y col., 2010); mientras que el medio MIO permite evidenciar la movilidad del microorganismo (debido a la presencia de flagelos, cuyo número y localización varía entre especies), el indol como producto del metabolismo del aminoácido triptófano y la descarboxilación de la ornitina basada en la detección de una alcalinización del pH del medio (Koneman, 2006).

Por su parte, el agar urea permite evaluar la producción de la enzima ureasa, la cual al reaccionar con el sustrato en el medio lo alcaliniza permitiendo observar una reacción de color. El agar LIA, es un medio sólido donde además de observar la descarboxilación y/o desaminación de la lisina, se demuestra la producción de gas (CO₂) y H₂S.

El caldo BHI es utilizado para someter al microorganismo a una temperatura de 42°C y determinar si es capaz de crecer, la reacción positiva se observa al desarrollarse turbidez en el caldo. Por último, el caldo nitrado demuestra la capacidad del microorganismo de reducir los nitratos a nitritos o nitrógeno molecular y sea por la formación de un color rojo 30 segundos

después de agregar los reactivos o por desplazamiento del líquido en el tubo de Durham. (Ramírez y col., 2010). Los resultados fueron presentados en la Tabla 6, en la que se indican las especies encontradas.

Con respecto a las características macromorfológicas de las colonias se observó que dos de las cepas (C9 y C10) eran similares con forma redonda, medianas, planas, bordes enteros, opacas, mucosas y de color crema. Sin embargo, en las pruebas bioquímicas arrojaron diferencias en cuanto a la motilidad, la producción de indol y la fermentación de la lactosa. Y esto se debe a que existen especies de *Klebsiella* móviles e inmóviles, algunas pueden producir o no indol, así como fermentar la lactosa o no (Breet y col., 1957; Cabarin y col., 2016). Dado que ambas cepas poseían reacciones bioquímicas y características macromorfológicas de las colonias parecidas, se presumió que podría tratarse de especies distintas dentro del mismo género bacteriano. Por lo tanto, se identificaron como *Klebsiella* spp. Entre los aspectos claves de identificación para este género, se observó que ambas producen cantidades abundantes de dióxido de carbono (CO₂). El género *Klebsiella* metaboliza el ácido pirúvico principalmente a través de la vía del butilenglicol (Ramírez y col., 2010). La producción de gas por parte de este microorganismo es fundamentalmente una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono que se produce por la escisión del ácido pirúvico en el proceso de fermentación (Koneman, 2006).

Por otra parte, las colonias de la cepa C2 producían un pigmento verde y emitía un olor a frutas característico de *Pseudomonas aeruginosa* (Alviares, 2023). Para confirmar esa suposición, se realizó la prueba clave para bacilos gramnegativos, la cual evalúa la producción de la enzima citocromo oxidasa intracelular. Esta resultó positiva al observarse un color negro purpúreo por oxidación del reactivo de la oxidasa (Ramírez y col., 2010). A raíz de este resultado, se siguió un esquema de identificación específico para la familia *Pseudomonadaceae*. Cada una de las pruebas a las que se sometió la

muestra señaló que nos encontrábamos en presencia de *Pseudomonas aeruginosa*, tal como se muestra en la Tabla 6.

Con respecto a las colonias de la cepa C4, se observó un efecto swarming el cual es característico de diferentes géneros de bacilos gramnegativos y ha sido ampliamente estudiado en *Proteus mirabilis*. Este efecto, implica la diferenciación de células vegetativas en *swarm cells* hiperflageladas que experimentan una migración de población rápida y coordinada a través de superficies sólidas (Fraster y col. 1999). Además, con la pruebas bioquímicas se llegó a la conclusión de que efectivamente se trataba de *Proteus mirabilis*.

El hallazgo de *Proteus mirabilis* en muestras respiratorias ha sido reportado anteriormente en estudios como el realizado por Sadoh y col. (2008) en el cual, analizaron aislamientos bacterianos de amigdalitis y faringitis en un entorno de urgencias pediátricas. En este estudio, en 3 de los 39 cultivos positivos hubo desarrollo de *Proteus mirabilis*. A pesar de que esta especie suele relacionarse con infecciones del tracto urinario (Ramírez y col., 2010), existe la evidencia de que puede colonizar el microambiente del aparato respiratorio. Sin embargo, rara vez causa infección pulmonar y neumonía porque no tiene alta virulencia; pero, en pacientes inmunodeprimidos, puede causar infección de heridas, peritonitis, infecciones del tracto urinario o infecciones del tracto biliar que pueden provocar infecciones sistémicas. (Saif ullah, 2023)

Los resultados encontrados en este trabajo coinciden con varios estudios reportados en la literatura. Por ejemplo, Hassen en el 2023 aisló bacilos gramnegativos de exudado faríngeo usando métodos tradicionales de identificación microbiológica en pacientes con COVID-19. De 75 muestras obtenidas 25 fueron aislados de *Pseudomonas aeruginosa*, 15 de *Klebsiella pneumoniae*, 8 de *Acinetobacter* spp., 4 *Escherichia coli* y 6 de *Haemophilus influenzae*, el restante fueron aislamientos de diferentes especies de cocos grampositivos.

Ghulam y col. (2020) realizaron un estudio sobre bacterias gramnegativas que causan infecciones del tracto respiratorio superior. Para ello, recolectaron asépticamente un total de 201 muestras en donde incluyeron esputo e hisopados faríngeos. Se observó el crecimiento solo de bacterias Gramnegativas y el aislado más frecuente fue *Pseudomonas aeruginosa* que representó el 48,33% de los aislamientos, seguido de *Klebsiella pneumoniae* el 45% y *Escherichia coli* 6,67%.

Pérez y col. (2019) aislaron 11 cepas de pacientes con sinusitis crónica, como muestra utilizaron tanto hisopados nasales como faríngeos. De acuerdo con las pruebas bioquímicas preliminares que realizaron (Agar Sangre, agar MacConkey, Kliger, agar Lisina-hierro, Hugh y Leifson (O/F), MIO y Citrato), todas las cepas se ubicaron dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, en específico, *Klebsiella pneumoniae* representó 4 aislados, *Escherichia coli* 4 aislados, *Enterobacter aerogenes* 2 aislados y por último *Klebsiella oxytoca* en 1 de los aislados.

www.bdigital.ula.ve

Estudio fisiológico preliminar de la resistencia a antibióticos

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico, generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de los mismos (Duarte, 2016). Partiendo de los resultados expuestos en la Tabla 7, se determinó que todas las cepas eran resistentes a las penicilinas ensayadas con excepción de *Pseudomonas aeruginosa* (C2), que mostró sensibilidad a la ampicilina, y *Proteus mirabilis* (C4) cuya sensibilidad a la amoxicilina depende de la dosis para que su crecimiento sea inhibido.

Con respecto a las cefalosporinas de primera generación (Cefadroxilo y cefalotina), todas las cepas eran resistentes con excepción de C10 (*Klebsiella* spp.) que es sensible a concentraciones iguales o mayores de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por otra parte, las cepas identificadas como *Klebsiella* spp. son

resistentes a todas las concentraciones cefalosporinas de tercera generación (Cefotaxima) ensayadas, mientras que *Pseudomonas aeruginosa* (C2) y *Proteus mirabilis* (C4) eran sensibles a todas las concentraciones y a concentraciones iguales o menores a 50 µg/mL respectivamente.

Por otra parte, las cepas mostraron sensibilidad a las fluoroquinolonas de segunda generación (Ciprofloxacina) con excepción de *Klebsiella* spp. (C9) y *Proteus mirabilis* (C4) que fueron resistentes completamente o dependía de la dosis. En relación con el ensayo de los aminoglucósidos (gentamicina), solo la cepa C10 de *Klebsiella* spp. mostró resistencia en contraste con la *Klebsiella* spp. C9 que depende de la concentración del antibiótico, además, *Pseudomonas aeruginosa* (C2) fue sensible y *Proteus mirabilis* (C4) es sensible a concentraciones iguales o mayores de 50 µg/mL. Por último, se evaluó el crecimiento en presencia de inhibidores de β-lactamasas (Amoxicilina/Ácido clavulánico) y todas las cepas fueron resistentes con excepción de *P. aeruginosa* (C2).

Pseudomonas aeruginosa tiene mecanismos de resistencia intrínsecos contra los β-lactámicos que incluyen bombas de afluencia, así como varias β-lactamasas. Específicamente, tiene β-lactamasas tipo AmpC inducibles codificadas cromosómicamente. Las AmpC pueden hidrolizar la mayoría de las penicilinas, las cefalosporinas de primera generación, combinaciones de β-lactámicos e inhibidores de β-lactamasa y, en menor medida, el aztreonam. Es una enzima inducible, por lo tanto, en tratamientos prolongados con estos antibióticos se puede producir resistencia intra-tratamiento a pesar de haberse observado sensibilidad en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana (Loukas Kakoullis, 2021). Debido a esto, la *Pseudomonas aeruginosa* aislada (C2) a pesar de haber mostrado sensibilidad a una de las penicilinas usadas (Ampicilina) y al β-lactámico combinado con inhibidor de β-lactamasas (Amoxicilina con Ácido clavulánico) puede ocurrir fracaso terapéutico a causa de la expresión de esta AmpC cromosomal, cuya

expresión es inducida por el mismo uso de antibióticos β -lactámicos. (Carlos Gómez, 2005).

Dadas las resistencias intrínsecas que posee *Pseudomonas aeruginosa* (C2) se recomienda el uso de las penicilinas antipseudomonas (piperacilina, ticarcilina, carbenicilina, azlocilina) asociadas a inhibidores de β -lactamasas, ceftazidima, cefepime, monobactámicos como aztreonam, carbapenémicos (imipenem y meropenem), quinolonas especialmente ciprofloxacina y aminoglicósidos (Gómez, 2005). De hecho, en el perfil de resistencia ensayado se observó buena respuesta ante las diferentes concentraciones de ciprofloxacina y gentamicina lo que sugiere que la cepa en cuestión no ha sufrido mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* (topoisomerasas) que le confieran resistencia a las fluoroquinolonas y que tampoco produce enzimas modificadoras como acetiltransferasas, fosfotransferasas y/o adeniltransferasas que le confieran resistencia a los aminoglucósidos (Alviarez, 2023).

Proteus mirabilis es naturalmente resistente a varios antibióticos, incluidas las polimixinas (colistina), nitrofuranos, tigeciclina, tetraciclina y muestra una susceptibilidad reducida al imipenem. Sin embargo, no produce ninguna β -lactamasa codificada cromosómicamente, lo que resulta en una susceptibilidad total a todos los β -lactámicos para un fenotipo de tipo salvaje (Girlich, 2020). Dado que la cepa de *Proteus mirabilis* aislada en este estudio fue resistente a la ampicilina, a las cefalosporinas de primera generación y al β -lactámico combinado con inhibidor de β -lactamasas, se puede sospechar que el microorganismo ha adquirido una AmpC. Es necesario realizar pruebas de difusión del disco para poder determinar si la enzima adquirida es constitutiva o inducible y así reservar el uso de antibióticos β -lactámicos y considerar otras alternativas terapéuticas. Es importante mencionar que los estudios epidemiológicos informan de un aumento de aislamientos de *Proteus mirabilis* productores de BLEE y que algunos eran coproductores de AmpC (Girlich, 2020).

Klebsiella spp. es intrínsecamente resistente a las penicilinas, como la ampicilina y a la ticarciclina (Lewis, 2022), mediante la producción de varias β -lactamasas (Girlich, 2020). Las cepas de *Klebsiella* spp. aisladas en este estudio presentaron resistencia a todos los antibióticos ensayados con excepción de la cepa C9 que fue sensible a concentraciones iguales o mayores de 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina y la cepa C10 que fue sensible a la ciprofloxacina y a concentraciones iguales o mayores de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cefadroxiilo. Este estudio preliminar, sugiere la adquisición resistencia a las cefalosporinas de primera y segunda generación mediante la producción de β -lactamasas de amplio espectro (BSBL) y la resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación que se produce mediante la producción de BLEE o AmpC (Girlich, 2020). La resistencia a la fluoroquinolonas ensayadas propone alteraciones en el sitio de acción del antibiótico por mutaciones en los genes GyrA y ParC, por la tanto se debe evitar el tratamiento con este tipo de antibióticos ya que el microorganismo posiblemente presenta una alteraciones en las topoisomerasas y puede hacerse totalmente resistente durante la terapia. Finalmente, la resistencia presentada al aminoglucósido indica producción de enzimas modificadoras como acetiltransferasas, fosfotransferasas y/o adeniltransferasas (Alviares, 2022).

El hallazgo de una *Klebsiella* spp. (C9) resistente a 7 de los 8 antibióticos ensayados es evidencia del aumento de resistencia antimicrobiana que ha adquirido este género en los últimos años. La capacidad de formación de biopelículas en esta bacteria disminuye la respuesta inmune del huésped y la eficacia de los antibióticos. Esto puede tener un enorme impacto en los pacientes y en los entornos sanitarios tal como afirmaron Karimi y col. (2021).

Karimi y col. (2021), llevaron a cabo un estudio con el objetivo de evaluar el patrón de resistencia a los antibióticos y la formación de biopelículas de 83 cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de muestras clínicas de pacientes hospitalizados. En específico, 32 (38,5%) de las muestras fueron hisopados

de faringe, de las cuales, las cepas mostraron resistencia a los carbapenemos, nitrofuranos, aminoglucósidos, las diaminopirimidinas/sulfonamidas, cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas de segunda y tercera generación y a los antibióticos combinados con inhibidores de β -lactamasa. Sin embargo, fueron sensibles a la polimixinas. Los resultados de dicho estudio se encuentra en la Tabla 9.

Tabla 9. Prevalencia de resistencia a antibióticos en *Klebsiella pneumoniae* aislada de diferentes muestras clínicas

Antibiotic	CS (%)	NIT (%)	IPM (%)	GEN (%)	AMK (%)	MRP (%)	SXT (%)	CAZ (%)	CIP (%)	CTR (%)	TM (%)	LEV (%)	AMS (%)	PTZ (%)	CTX (%)
Sample type															
Urine	0	50	40	45	42	100	100	75	62	87	100	—	100	100	100
Wound	0	—	83	100	83	83	66	83	100	—	83	100	80	80	66
Blood	0	—	50	100	100	50	60	100	80	—	100	75	100	100	—
Throat	0	—	65	100	70	64	62.1	70	83	—	82	81	93	93	100
Sputum	0	—	100	—	0	100	—	—	0	0	—	—	0	—	—
Trachea	0	—	100	75	80	100	100	100	90	100	100	100	92	75	—
Abscess	0	—	0	—	—	0	100	0	100	—	0	100	0	100	—

CS, colistín; NIT, nitrofurantoin; IPM, imipenem; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; MRP, meropenem; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; CTR, ceftriaxone; TM, tobramycin; LEV, levofloxacin; AMS, ampicillin-sulbactam; PTZ, piperacillin-tazobactam; CTX,

(Kiana Karimi, 2021)

Según Hassen 2023, las cepas de bacterias gramnegativas aisladas en sus estudios fueron sensibles en su gran mayoría a la ampicilina, ceftriaxona, ciprofloxacina y amoxicilina/clavulanato mientras que este estudio se pudo apreciar lo contrario, dado que las cepas aisladas resultaron ser en gran medida resistentes a los antibióticos mencionados o se necesitaban concentraciones iguales o mayores de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los mismos para inhibir el crecimiento del microorganismo.

Con respecto al trabajo de Ghulam y col. (2020), los β -lactámicos combinados con inhibidores de β -lactamasas y los aminoglucósidos resultaron ser muy efectivos pero las cefalosporinas de primera generación,

quinolonas de segunda generación y las sulfonamidas resultaron ser poco efectivas. En este estudio, las cepas de la familia *Enterobacteriaceae* resultaron ser resistentes a todas las concentraciones ensayadas de los inhibidores, en cuanto a los aminoglucósidos se mostró resistencia dependiendo de la concentración, lo que lleva a suponer que se han adquirido mecanismos de resistencia. Por otra parte, hay concordancia en que las cepas de bacilos gramnegativos aislados presentan poca o nula respuesta a las cefalosporinas de primera generación y quinolonas de segunda generación.

Las cepas de bacilos gramnegativos aisladas por Pérez y col. (2019), mostraron mayor resistencia a las cefalosporinas de primera y tercera generación y a los β -lactámicos combinados con inhibidores de β -lactamasas. Sin embargo, fueron sensibles a ciprofloxacina, kanamicina y gentamicina. Resultados que concuerdan con la presente investigación, con excepción de la sensibilidad a la ciprofloxacina y gentamicina, ya que la mitad de cepas aisladas necesitan concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para que su crecimiento sea inhibido.

Resistencia a sales

Las sales son factores indispensables para el crecimiento de microorganismos debido a su papel en las reacciones enzimáticas (aún en pequeñas cantidades), donde las más importantes son de sodio, potasio, calcio y magnesio. Según Prats (2005), el crecimiento de las enterobacterias al 6% de NaCl es negativo. Sin embargo, una vez realizados los ensayos con sales de NaCl a concentraciones de 2,5; 5, 10 y 15% (expresados en % $^{\text{m/v}}$), se encontró que el 50% las cepas son resistentes a concentraciones mayores o iguales del 10% de NaCl (C4 y C9). La cepa de *Proteus mirabilis* aislada (C4) no excede del 10%, pero una de las cepas de *Klebsiella* spp. (C9) es resistente a concentraciones de 15% $^{\text{m/v}}$ (Tabla 8).

La pared celular de las bacterias Gramnegativas está limitada por una membrana lipídica externa que incluye porinas. La integridad y la hidratación de la célula están dictadas por el contenido de solutos y las presiones osmóticas de sus entornos. Una disminución de la presión osmótica externa provoca entrada de agua e hinchazón o incluso lisis, mientras que un aumento de la presión osmótica externa provoca salida de agua y deshidratación. Las células expuestas constantemente a una presión osmótica muy alta deben mantener concentraciones de soluto citoplasmáticas correspondientemente altas. La evidencia sugiere que la regulación de la composición y la hidratación citoplasmáticas es un objetivo clave de la homeostasis celular (Madera, 2015).

En este estudio se observó que algunas de las cepas aisladas poseen mecanismos que les permiten crecer en ambientes con altas presiones osmóticas, características que se observan en algunos bacilos gramnegativos como *Escherichia coli* que vive en ambientes terrestres y acuáticos, así como en las meninges y los tractos intestinal y urinario de los mamíferos, *Bacillus subtilis* y *Corynebacterium glutamicum* que son bacterias del suelo (Madera, 2015).

Por otra parte, Pérez y col. (2019) al someter cepas de bacilos gramnegativos a diferentes concentraciones de sal, determinaron que la mayoría de las cepas (14/17) eran resistentes a concentraciones mayores o iguales del 5% de NaCl. Entre ellas, *Escherichia coli*, que fue resistente hasta concentraciones de 5% de sal, *Enterobacter aerogenes* fue inhibida a concentraciones del 10% de NaCl, y, finalmente varias especies de *Klebsiella* fueron aisladas, de las cuales, *Klebsiella pneumoniae* era capaz de soportar concentraciones hasta del 10% de NaCl cuyo resultado es similar a una de las cepas de *Klebsiella* spp. (C9) aisladas en este estudio que soportó 15%. Por el contrario, *Klebsiella oxytoca* solo logró desarrollarse hasta una concentración máxima de 2,5% la cual se compara con la *Klebsiella* spp. (C10) de este estudio. Los investigadores concluyeron que, no se describe

aun una concentración óptima de sal que logre inhibir a los microorganismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* puesto que, no existe un consenso entre los resultados de los diferentes estudios realizados, y que además entre bacterias de un mismo género han sido observados diferentes comportamientos.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. Se aislaron bacilos gramnegativos aerobios y anaerobios facultativos, ubicados dentro de la familia *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae*, según la morfología microscópica observada (bacterias en forma de bastón), prueba clave oxidasa positiva y negativa.
2. Las especies identificadas fueron *Pseudomonas aeruginosa* (1/4), *Proteus mirabilis* (1/4) y *Klebsiella* spp. (2/4). Los microorganismos pertenecientes a las mismas especies tienen características macromorfológicas y reacciones bioquímicas idénticas.
3. *Proteus mirabilis* a pesar de ser común en las infecciones del trato urinario se encontró colonizando en tracto respiratorio.
4. En los estudios preliminares de resistencia a antibióticos, todas las cepas fueron resistentes a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera generación.
5. La familia *Enterobacteriaceae* fue resistente, en diferentes grados, a las cefalosporinas de tercera generación, a las fluoroquinolonas de segunda generación, a los aminoglucósidos y los antibióticos combinados con inhibidores de β -lactamasas. En específico, se aisló una *Klebsiella* spp. resistente a 7 de los 8 antibióticos ensayados, hallazgo que se considera importante debido al peligro que representa para la salud pública.
6. La cepa de la familia *Pseudomonadaceae* mostró mayor sensibilidad a los antimicrobianos ensayados que los miembros de la familia

Enterobacteriaceae. Además, la actividad de resistencia antibiótica es idéntica entre miembros de la misma especie y familia.

7. Se demostró la capacidad de inhibir el crecimiento de los microorganismos mediante el uso de sales (NaCl) a diferentes concentraciones dependiendo de la cepa.

www.bdigital.ula.ve

Recomendaciones

1. Considerar el uso de todos los métodos de identificación disponibles: microbiología convencional (manual con medios de cultivos y pruebas bioquímicas), automatizada mediante sistemas VITEX, pruebas miniaturizadas o galerías API, pruebas moleculares (reacción en cadena de polimerasa (PCR) y secuenciación para lograr identificación a nivel de especie y subespecie si es necesario.
2. La obtención de múltiples muestras y de lugares anatómicos distintos para aumentar las posibilidades de recuperación de microorganismos, tomando en cuenta que se trata de infecciones polimicrobianas.
3. Es necesario realizar lectura interpretada del antibiograma para la detección de mecanismos de resistencia y no limitarse al reporte de antibiograma convencional.
4. Estudiar la resistencia a sales utilizando rangos estrechos para obtener mayor precisión, así como otras sales que pueden tener un efecto en el crecimiento bacteriano.

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Alarcón T. (2017). *Procedimientos en Microbiología Clínica* (1a ed.). Madrid, España: SEIMC.
- Alejandro Carabarin L. (2016). First evidence of polar flagella in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient with neonatal sepsis. *Journal of Medical Microbiology*, 65(8).
- Algorta, G., Amorin, B., Arbiza, J., Barrios, P., Betancor, L., Calvelo, E., & Chabalgoity, A. (2008). Fisiología y Metabolismo Bacteriano. En *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (3a ed., pág. 47). Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR. Recuperado el 21 de Enero de 2023, de https://clasesparticularesdebioquimica.files.wordpress.com/2016/05/seccion_1_libro_temas_byv_medica.pdf
- Álvarez. (1991). *Mapa Bacteriológico de bacilos gramnegativos*. Tesis doctoral, Universidad Complutense.
- Alviárez, E. (22 de Noviembre de 2022). Mecanismos de resistencia de bacilos Gramnegativos. Mérida, Mérida, Venezuela.
- Alvarez, E. (February de 2023). Bacilos Gram Negativos no fermentadores. *Unidad de aprendizaje de la Unidad Curricular Bacteriología y Virología Clínica*. Facultad de Farmacia y Bioanálisis.
- Breth, R. S., Murray, E. G., & Smith, N. R. (1957). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (7 ed.). Baltimore, United States of America: The Williams & Wilkins Company.
- Carlos Gómez, A. L. (Enero de 2005). Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. *Revista de la Facultad de Medicina*, 53(1).
- Duarte, A. (2016). Infecciones por *E.coli* y su perfil de resistencia en niños atendidos en el hospital infantil Manuel de Jesús Rivera "La Mascota" 1ero Enero 2011-Diciembre 2015.

- Escalante, N., & Rea, A. (2015). Incidencia de las infecciones causadas por bacterias Gram-negativas en infantes de 1 a 3 años de edad que acuden al hospital Jaime Roldós Aguilera de la ciudad de Ventanas, en el periodo de enero a junio del 2010. *Tesis de pregrado*. Babahoyo, Ecuador: Universidad Técnica de Babahoyo. Recuperado el 16 de Junio de 2022, de <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/1449/T-UTB-FCS-000048.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Estévez, A. (2018). La resistencia a los antimicrobianos en bacilos gram-negativos. Un fenómeno que amenaza la medicina a corto plazo. *Discurso de contestación*. Academia de Farmacia de Galicia.
- Forbes, S. D. (2009). *Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico* (12a ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Germán Boua, A. F.-O.-N. (17 de junio de 2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(8), 601-608.
- Ghulam A. Maka, S. S. (2020). Antibiotic Susceptibility Profiling of Gram-Negative Bacteria Causing Upper Respiratory Tract Infections in Hyderabad, Sindh. *Journal of Life and Bio-Science Research*, 01(01), 12-15. doi:<https://doi.org/10.38094/jlbsr112>
- Gillian M. Fraser, C. H. (1 de December de 1999). Swarming motility. *Current Opinion in Microbiology*, 2(6), 630-635.
- Girlich, D. (21 de febrero de 2020). Genetics of Acquired Antibiotic Resistance Genes in *Proteus* spp. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- González, R., & Ruiseco, G. (2017). La microbiota del humano. *Ciencia*, 68(2), 60-66.
- Hassen, T. F. (2023). Bacterial Infections Associated with COVID-19 Infection in Thi-Qar Province,. *Medical & Clinical Research*, 8(10), 01-06.

- Hurtado, J. (2010). *Metodología de la investigación holística* (4a ed.). Venezuela: Ciea Sypal y Quirón . Recuperado el 20 de febrero de 2023
- Kawalec, A. (2022). Emerging role of microbiome in the prevention of urinary tract infections in children. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 870. Recuperado el 25 de febrero de 2023, de <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/2/870#cite>
- Kiana Karimi, O. Z.-I. (15 de Junio de 2021). Investigation of Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. (C. C. Lopez, Ed.) *International Journal of Microbiology*, 2021, 6.
- Kiralba, S. (Marzo de 2020). Historia de la Microbiología. *Complemento de la Unidad de Aprendizaje 1 de la Unidad Curricular Bacteriología General*. Mérida, Mérida, Venezuela: Facultad de Farmacia y Bioanálisis.
- Koneman E., A. S. (2006). *Diagnóstico Microbiológico* (Sexta ed.). Argentina: Médica Panamericana.
- Ledermann, W. (2012). ¿Quién las vio primero? *Revista chilena de infectología*, 29(3), 348-352. Recuperado el 24 de febrero de 2023, de https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000300017
- Lewis, J. (2022). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (32nd ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Loukas Kakoullis, E. P. (10 de Abril de 2021). Mechanisms of Antibiotic Resistance in Important Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens and Novel Antibiotic Solutions. *Antibiotics*, 10(4), 415.
- Madera, J. (13 de Abril de 2015). Respuestas bacterianas a los desafíos osmóticos. *Journal of General Physiology*, 145(5), 381–388.
- Niederman, M. (1994). The pathogenesis of airway colonization: lessons learned from the. *European Respiratory Journal*, 7, 1737–1740.

- Parella, S., & Martins, F. (2017). La Metodología o Marco Metodológico. En *Metodología de la Investigación Cuantitativa* (4a ed.). Venezuela: Universidad Pedagógica Experimental Libertador.
- Pérez, E., Rojas, M., Lárez, C., Ramírez, L., Zambrano, L., & Peña, M. (2019). Studies of resistance of multiple antimicrobial compounds and salt tolerance of strains isolated from patients with chronic sinusitis. *CPQ Medicine*, 7(2), 1-8.
- Pesantez, D. I., & Sanchez, G. F. (Febrero de 2021). Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa*, aspectos clínicos y de laboratorio. *Revista chilena de infectología*, 38(1), 69-80.
- Prats, G. (2005). *Microbiología clínica*. Madrid: Medica Panamericana.
- Ramírez A., A. E. (2010). *Manual práctico de bacteriología general* (1a ed.). Mérida, Venezuela: Publicaciones Vicerrectorado Académico.
- Ramírez, A. (Junio de 2022). Mecanismos de patogenicidad de los microorganismos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Complemento de la unidad de aprendizaje 7 de la unidad curricular Bacteriología y Virología General, Mérida, Venezuela.
- Russo, T., & Johnson, J. (2019). *Harrison. Principios de Medicina Interna* (19a ed.). (D. Kasper, A. Fauci, S. Hauser, D. Longo, J. Jameson, & J. Loscalzo, Edits.) Estados Unidos: McGraw Hill.
- Saif ullah, R. S. (19 de September de 2023). *Proteus mirabilis*: A rare cause of pneumonia, radiologically mimicking malignancy of the lung. *Clinical Case Reports*, 11(9).
- Santiago, A. R. (2003). Genios de la Microbiología: Hans Christian Joachim Gram. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23(2).
- Segura, P., & Torres, A. (2022). *Perfil de resistencia antimicrobiana de los bacilos gramnegativos en pacientes pediátricos de las unidades de cuidado intensivos del INSNSB durante el periodo 2017-2019*. Tesis de pregrado, Universidad de San Martín de Porres.

W., E. (2003). In the five hundred years of the discovery: Colones and Pinzones of the Microbiology. *Revista Chilena de Infectología*, 20(1), 18-20.

Wilson E. Sadoh, A. E. (December de 2008). Bacterial isolates of Tonsillitis and Pharyngitis in a Paediatric Casualty Setting. *Journal of Medicine and Biomedical Research*, 7(1, 2), 37-44.

Zepeda, C. (1981). Bacilos Gram-negativos anotaciones de interés clínico. *Revista médica de Honduras* 1981, 49(1), 105-113. Recuperado el 16 de julio de 2022, de <https://revistamedicahondurena.hn/assets/Uploads/Vol49-3-1981-6.pdf>

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 10. Razones que justifican la investigación derivadas del planteamiento del problema

N° Párrafo	Razones o por qué	Tipo de razón
1	Los bacilos gramnegativos tienen la capacidad de colonizar a individuos sanos y se deben usar métodos convencionales o fenotípicos para su identificación. A su vez, hay una tendencia de observar presencia de bacilos gramnegativos en la faringe de niños.	Necesidad, tendencia e interés La identificación microbiológica de bacilos gramnegativos es necesaria debido a su capacidad de colonizar individuos sanos.
2	Los métodos de identificación convencionales permiten identificar a las bacterias según características observables, tales como: la morfología que se evidencia por medio de la coloración de Gram, y las propiedades bioquímicas y metabólicas que se pueden visualizar con el uso de indicadores en los medios de cultivo.	Potencialidad Representan una posibilidad para identificar los bacilos gramnegativos en muestras clínicas de niños.

Anexo 2

Tabla 11. Antecedentes históricos

Autores Año	Título de la investigación	Objetivo general	Conclusión
Ledermann W. (2012)	¿Quién las vio primero?	Realizar una revisión de literatura sobre el descubrimiento de las bacterias.	Los investigadores concluyeron que varios científicos participaron, entre ellos Fracastoro, Kircher, Van Leeuwenhoek y Zacharias Janssen, este último por la invención del microscopio
Edermann W. (2003)	En los quinientos años del Descubrimiento: Colones y Pinzones de la Microbiología	Citar algunos ejemplos conocidos en la historia de la microbiología.	Consideró a Koch, Gram y Pierre Emile como colones de la microbiología.

Anexo 3

Tabla 12. Tabla de identificación bacteriana

Microorganismo	C. en MK	Oxi.	Lact	Gluc	Gas	H ₂ S	Deam. Lis.	Deca. Lis.	Mot.	Ind.	Orn	Cit.	Urea	42 °C	O/F Gluc	O/F Xil	O/F Mal
<i>Enterobacterias</i>																	
<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+				
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-				
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+				
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+				
<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	+/+	+	+	+	+	-	+/+	-	+/+	+	+				
<i>Salmonella typhi</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-				
<i>Shigella sonnei</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-				
<i>Shigella flexneri</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+/+	-	-	-				
BGNMF																	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+/+	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+/+	+	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+/+	+	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+/+	-	-

MK: Agar MacConkey; Oxi: Oxidasa; Lact: Fermentación de lactosa; Gluc: Fermentación de glucosa; Deam Lis: Desaminación de Lisina; Deca Lis: Descarboxilación de Lisina; Mot: Motilidad; Ind: Producción de Indol; Orn: Descarboxilación de Ornitina; Cit: Utilización del citrato; 42 °C: Crecimiento a 42 °C; O/F: Oxidación/Fermentación; Xil: Fermentación de xilosa; Mal: Fermentación de maltosa; BGNMF: Bacilos gramnegativos no fermentadores.

Koneman y col. 2006

Anexo 4

Instrumento de recolección de datos

Parte I. Datos de Identificación

____ / ____ / ____
Día Mes Año

Número de identificación

____ / ____
Ciudad N° Participante

A1. Identificación

Nombre:.....
 Dirección:.....

 Teléfono:.....
 Dirección (Familiar cercano):.....

 Teléfono:.....

Parte II. Información General

B1. Fecha de Nacimiento: _____

B2. Edad: ____

Parte III. Criterios de Inclusión

C1. Cumple con los criterios de inclusión:

(1) Sí____ (2) No____

C2. Paciente con enfermedad respiratoria

(1) Sí____ (2) No____

C3. Pacientes que no hayan sido tratados con antimicrobianos en los 15 días previos a la toma de muestra

(1) Sí____ (2) No____

Parte IV. Pruebas bioquímicas

Prueba	Agar Sangre	Agar MK	Oxidasa	KIA	LIA	MIO	CIT	O/F Glucosa	O/F Maltosa	Urea	Caldo nitrado	Caldo BHI 42°C
Lectura												

Parte V. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Antibiótico	AMP	AMX	CFR	CEP	CTX	CIP	GEN	AMC
Sensible								
Resistente								

Ampicilina (AMP); Amoxicilina (Amx); Cefadroxilo (CFR); Cefalotina (CEP); Cefotaxima (CTX); Ciprofloxacina (CIP); Gentamicina (GEN); Amoxicilina / Ácido Clavulánico (AMC)

Parte V. Pruebas de resistencia a sales

Concentración de NaCl (%m/v)	2,5	5	10	15
Sensible				
Resistente				

Parte VI. Final

D4.

Comentarios _____

Responsable(s) _____