



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE ANÁLISIS
BIOTECNOLÓGICO Y MOLECULAR (ANBIOMOL)**



**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE BACILOS GRAMNEGATIVOS
AERÓBICOS AISLADOS EN ADULTOS CON SINUSITIS CRÓNICA**

Tesistas:

Luis Alfonso Ramírez Torres

C.I.V-20.828.897

Marianela Zambrano Román

C.I.V-23.541.128

Tutora:

Dra. Elizabeth Pérez

Mérida, Septiembre de 2017

C.C.Reconocimiento

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a *mis padres*; gracias por la vida, compañía y confianza durante mi formación académica.

A *mi hermano* por el ejemplo y apoyo incondicional.
Este logro es para ustedes.

Marianela.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a *mis padres*, a quienes debo lo que hoy soy como persona y profesional. Gracias por ser mi más grande apoyo ¡Los Amo!
A *mi hermana*, por ser mi ejemplo de superación y constancia, gracias por tus buenos consejos.

A *mi novia*, por caminar junto a mí a lo largo de nuestra carrera, gracias por apoyarme en todo momento.

A *mi abuelita Ponceana*; por su más grande y sincero amor, gracias por tus oraciones y bendiciones.

A *mis sobrinos*, a quienes quiero servir de ejemplo, son mi motor para salir adelante.

¡Gracias!

Luis Alfonso.

Agradecimientos

A Dios y la Virgen, por guiarnos en esta hermosa carrera.

A la profesora Elizabeth Pérez, tutora y amiga, por asumir con cariño este compromiso.

Al profesor Miguel Sulbarán, su ayuda, orientación y dedicación fue fundamental para el logro de esta meta.

A la profesora Ana Carolina González, por su sabiduría, afecto y apoyo incondicional.

A la Universidad de Los Andes, por abrirnos sus puertas y formar profesionales con excelencia.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	2
Planteamiento del Problema	2
Justificación e Importancia de la Investigación	7
Objetivos de la Investigación	9
<i>Objetivo General</i>	9
<i>Objetivos Específicos</i>	9
Alcances y limitaciones de la investigación	9
<i>Alcances de la investigación</i>	9
<i>Limitaciones de la investigación</i>	10
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	11
Trabajos Previos	11
Antecedentes Históricos	13
Bases Teóricas	14
<i>Modelo teórico sobre los criterios fenotípicos de identificación de microorganismos</i>	14
<i>Microbiota patógena de la sinusitis crónica</i>	15
<i>Klebsiella</i>	15
<i>Serratia</i>	16
<i>Pseudomonas</i>	16
<i>Moraxella</i>	16

<i>Enterobacter aerogenes</i>	17
<i>Escherichia coli</i>	17
<i>Fisiopatología de la sinusitis crónica</i>	18
<i>Diagnóstico microbiológico de la sinusitis crónica</i>	19
Operacionalización de Variables	22
CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO	23
Tipo de Investigación	23
Diseño de la Investigación	23
Población y Muestra	24
<i>Unidad de investigación</i>	24
<i>Selección del tamaño de la muestra</i>	24
Procedimientos de la Investigación	25
<i>Características fenotípicas</i>	25
<i>Estudio preliminar a la resistencia de antibióticos</i>	25
Diseño de Análisis	26
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
Resultados	27
<i>Descripción de la población y muestra</i>	27
<i>Estudio micro y macromorfológico</i>	27
<i>Caracterización bioquímica</i>	30
<i>Identificación microbiológica</i>	32
<i>Estudio preliminar de la resistencia a antibióticos</i>	33
<i>Estudio preliminar de la resistencia a sales</i>	35
Discusión	37
<i>Caracterización bioquímica e identificación microbiológica</i>	37
<i>Estudio de resistencia a antibióticos</i>	42
<i>Resistencia a sales</i>	48
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50

Conclusiones	50
Recomendaciones	52
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	53
ANEXOS	61

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Aislamiento de ADN genómico	65
Figura 2. Amplificación de los fragmentos de ADN genómico	66
Figura 3. Purificación con sales de los fragmentos amplificados	68

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Agentes causales más frecuentes de la rinosinusitis	4
Tabla 2. Operacionalización del criterio de clasificación caracterización fenotípica de bacilos gramnegativos aeróbicos aislados en pacientes con sinusitis crónica	22
Tabla 3. Descripción de la población de pacientes muestreada	28
Tabla 4. Características macromorfológicas de las colonias sembradas en medio LBD	29
Tabla 5. Características bioquímicas de las cepas bacterianas	30
Tabla 6. Caracterización e identificación microbiología de las cepas bacterianas	33
Tabla 7. Estudio de la resistencia a antibióticos en medio LBD a las 48 horas de incubación	35
Tabla 8. Estudio de la resistencia a sales en medio LBD	36



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOTECNOLÓGICO
Y MOLECULAR (ANBIOMOL) “PROF. GUILLERMO
LÓPEZ CORCUERA”



**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE BACILOS GRAMNEGATIVOS
AERÓBICOS AISLADOS EN ADULTOS CON SINUSITIS CRÓNICA**

Trabajo de Grado para Optar al Título de Licenciados en Bioanálisis.

AUTORES:

Marianela Zambrano.

Luis Alfonso Ramírez.

TUTORA:

Dra. Elizabeth Pérez.

RESUMEN

La sinusitis crónica es una enfermedad cosmopolita, causada por la inflamación de la mucosa en los senos paranasales, relacionada con ciertos microorganismos. El objetivo de esta investigación es caracterizar fenotípicamente los bacilos gramnegativos aeróbicos aislados en adultos con sinusitis crónica. Se analizaron las características micro y macromorfológicas e identificaron mediante pruebas bioquímicas claves, según el Manual Bergey. Además, se evaluó la resistencia a sales y antibióticos. De las 11 cepas identificadas las especies halladas fueron: *Klebsiella pneumoniae* (4/11), *Escherichia coli* (4/11), *Enterobacter aerogenes* (2/11) y *Klebsiella oxytoca* (1/11). En general, las cepas fueron resistentes a las cefalosporinas de primera generación, ampicilina y amoxicilina/ácido clavulánico; sensibles a fluoroquinolonas y aminoglucósidos, e inhibidas en su mayoría a concentraciones de NaCl superiores al 5%. En líneas generales, las cepas aisladas pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, fueron sensibles principalmente a la ciprofloxacina e inhibidas a concentraciones superiores al 10% de NaCl. De las cepas identificadas, B8 (*E. coli*) fue resistente a todos los antibióticos ensayados, seguida de B1 (*K. pneumoniae*) y B23 (*E. coli*) que fueron resistentes a 6/10 antibióticos en estudio. Estos resultados demuestran una amplia resistencia a antibióticos por parte de las cepas relacionadas con la sinusitis crónica, lo que hace más difícil su tratamiento mediante antibiótico terapia.

Palabras clave: sinusitis crónica, bacilos gramnegativos, enterobacterias, resistencia a antibióticos.

INTRODUCCIÓN

La microbiología estudia agentes que son imperceptibles para el ojo humano como virus, bacterias, algas, hongos y protozoos. Su importancia no solo radica en el impacto que ha ejercido en las ciencias de la salud, sino en el conocimiento de la vida microscópica, aplicado en áreas como la industria, recursos energéticos y la administración pública. Por ello, fue necesario establecer criterios para la identificación partiendo de la caracterización fenotípica, microbiológica y fisiológica de microorganismos.

Desde sus inicios, la microbiología ha caracterizado bioquímicamente patógenos causantes de enfermedades. No obstante, en los años 40, se estableció una estrecha relación con otras disciplinas biológicas, debido a los avances significativos de la genética y la bioquímica.

Hoy en día, distintos estudios microbiológicos son empleados para la identificación de microorganismos patógenos, causantes de múltiples infecciones en el organismo, combinando diferentes ensayos y reacciones bioquímicas donde se muestran resultados particulares para cada grupo de bacterias clasificadas según su género y especie; y así lograr la detección de los agentes etiológicos de las enfermedades.

En virtud del impacto que tienen estas distintas pruebas microbiológicas para la determinación de patógenos como herramienta que mejora la calidad de vida de los seres humanos, es que surge la inquietud de realizar este estudio en base a la caracterización fenotípica, microbiológica y fisiológica, de bacilos gramnegativos aerobios aislados de vías respiratorias superiores, específicamente, áreas asociadas a la sinusitis, con el propósito de realizar una correcta identificación y descripción de este tipo de patógenos.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

A pesar que la sinusitis es una enfermedad frecuente, existe una falta de consenso en su definición y en la clasificación de sus diversas formas clínicas. La sinusitis se define como el proceso inflamatorio o infeccioso de la mucosa de los senos paranasales. La inflamación de los senos paranasales se produce principalmente en su mucosa, que es una simple prolongación de la mucosa nasal con la que constituye una unidad indivisible. Por lo tanto, cualquier proceso inflamatorio de las fosas nasales, incluida la rinitis aguda simple, implica cierto grado de participación sinusal. Dada la estrecha relación con la fosa nasal, en la actualidad la mayoría de los autores prefieren el término rinosinusitis (Kennedy, 1994; García-Rodríguez y col., 2003).

Por otra parte, clásicamente la rinosinusitis se ha dividido en cuadros agudos, que duran generalmente días; y crónicos, los cuales persisten por meses. Sin embargo, esta clasificación no siempre ha estado clara desde el punto de vista clínico, por lo que se recomienda clasificarla en términos fisiopatológicos, proponiendo la siguiente clasificación: (i) rinosinusitis aguda, infección sinusal cuyos síntomas no persisten más allá de ocho semanas (entre 10 a 15 días); (ii) rinosinusitis aguda recurrente, cuadros repetidos de rinosinusitis aguda que se resuelven con tratamiento médico y cursan con intervalos libres de enfermedad; y (iii) rinosinusitis crónica, una infección

sinusal cuyos síntomas persisten por más de ocho semanas (Van Bunchen y col., 1997; García-Rodríguez y col., 2003).

Los padecimientos sinusales se deben a cierto grado de bloqueo de los pasajes o espacios de drenaje de los senos paranasales hacia el interior de la nariz. Pueden ser causados por infecciones virales, reacciones alérgicas, infecciones bacterianas o por simples irritantes como el humo del tabaco o algún otro irritante químico. Las alergias pueden causar cierta inflamación con bloqueo nasal y desencadenar algún problema sinusítico. Adicionalmente, la incidencia de sinusitis en pacientes alérgicos es más alta que en los no alérgicos (García-Rodríguez y col., 2003).

Los virus respiratorios y un reducido número de bacterias causan la inmensa mayoría de las sinusitis agudas adquiridas en la comunidad, tanto en niños como en adultos. Los virus desempeñan un importante papel, no sólo como agentes etiológicos, sino también como promotores de la infección bacteriana. Los más habituales son los rinovirus (15%), virus de la influenza (5%), virus de la parainfluenza (3%), adenovirus (2%), virus sincicial respiratorio (3%), y menor proporción coronavirus, metaneumovirus y virus del sarampión (Chow y col., 2012). En alrededor del 60% de las sinusitis se recuperan bacterias, particularmente *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, que solas o asociadas están implicadas en más del 50% de los casos. Por lo general, la etiología es polimicrobiana y sinérgica, hay organismos patógenos mezclados con gérmenes no virulentos, oportunistas o productores de betalactamasas. En caso de falla del tratamiento antimicrobiano y en pacientes inmunosuprimidos se debe sospechar infección por hongos (Hadley y col., 2010; Kaur y col., 2010). En la Tabla 1 se presenta un resumen de los agentes etiológicos de las clases de sinusitis más importantes.

En la actualidad, los estudios microbiológicos garantizan la identificación y caracterización de una amplia variedad de microorganismos a través de

diferentes ensayos, con el objetivo de lograr la detección de los agentes etiológicos de las enfermedades (Torralba y col., 2006).

Tabla 1. Agentes causales más frecuentes de la rinosinusitis

Rinosinusitis aguda bacteriana	
Niños	Adultos
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Streptococcus pneumoniae</i> 21-33% - <i>Haemophilus influenzae</i> no tipificable 31-32% - <i>Moraxella catarrhalis</i> 8-11% - Anaerobios 2-5% - Sin desarrollo bacteriano 29% 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Streptococcus pneumoniae</i> 38% - <i>Haemophilus influenzae</i> no tipificable 36% - <i>Moraxella catarrhalis</i> 16% - <i>Staphylococcus aureus</i> 13% - <i>Streptococcus pyogenes</i> 4% - Otros 4% - Sin desarrollo bacteriano 36%
Rinosinusitis crónica bacteriana	
Niños	Adultos
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Streptococcus pneumoniae</i> - <i>Haemophilus influenzae</i> no tipificable - <i>Moraxella catarrhalis</i> - Anaerobios - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y enterobacterias (pacientes inmunosuprimidos, con fibrosis quística o poliposis). 	<p>Aerobios</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Staphylococcus aureus</i> 4% - Otros <i>Staphylococcus</i> (coagulasa negativos) - <i>Streptococcus</i> α-hemolíticos 6% - <i>Streptococcus pyogenes</i> (β-hemolíticos) 3% - <i>Streptococcus pneumoniae</i> 2% - Otros <i>Streptococcus</i> 4% - <i>Haemophilus</i> spp 4% - <i>Moraxella catarrhalis</i> 4% - <i>Klebsiella pneumoniae</i> - <i>Pseudomonas</i> (poliposis y fibrosis quística) <p>Anaerobios</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Peptostreptococcus</i> sp 22% - <i>Prevotella</i> spp 15% - <i>Bacteroides</i> spp 8% - <i>Propionibacterium</i> spp 7% - <i>Fusobacterium</i> spp - Otros anaerobios menos comunes 5%
Hongos	
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Aspergillus flavus, fumigatus</i> - <i>Bipolaris specífera</i> - <i>Exserohilum rostratum</i> - <i>Curvularia lunata</i> - <i>Alternaria</i> spp 	

Fuente: Hadley y col., 2010; Kaur y col, 2010.

Como se puede deducir de la Tabla 1, en afecciones recurrentes como la sinusitis se ha descrito la presencia de virus y bacterias. Con mayor

frecuencia se detectan bacterias de morfología cocácea, predominantemente del género *Streptococcus*, y en menor proporción bacterias de tipo bacilar que no son aisladas a menos que se encuentren en gran proporción en análisis preliminares (Torralba y col., 2006).

Con respecto a estos últimos, los bacilos son células bacterianas en forma de bastón alargado, con bordes redondeados que se pueden encontrar en cualquier ambiente. Existen varias familias y géneros de interés científico y médico. Se clasifican principalmente en dos grandes grupos según la estructura de su pared bacteriana al realizar coloraciones diferenciales en: grampositivas y gramnegativas. En general, los bacilos gramnegativos se han descrito escasamente en enfermedades comunes de la mucosa nasofaríngea, aunque no se descarta su presencia; pero, se establece mayor relación con enfermedades de origen nosocomial. Sin embargo, es muy importante el estudio del comportamiento bioquímico y fisiológico de estos bacilos, así como del metabolismo, la patogenicidad y los mecanismos de resistencia (Rodríguez, 2008).

Esta investigación presenta un “criterio de clasificación y descripción”, de los bacilos gramnegativos aerobios que se encuentran presentes en pacientes con sinusitis, los cuales han sido pobremente descritos hasta la fecha. Para ello se utilizarán dos herramientas: las bioquímicas, que proporcionan información acerca del metabolismo del organismo en estudio; y las microbiológicas, que complementan a las anteriores a través de un estudio generalizado que abarca el comportamiento de las cepas bacterianas a ciertas reacciones y variables ambientales.

La identificación bacteriana depende de la interpretación correcta de los ensayos realizados: cultivos y antibiograma. Estos ensayos expresan perfiles característicos de las bacterias a través de esquemas de clasificación que marcan el orden de las pruebas a ejecutar. Específicamente, dependen de las características fenotípicas o genotípicas observadas.

El Modelo Teórico de Identificación de Microorganismos basado en Criterios Fenotípicos, respalda a esta investigación. Implica el estudio del producto génico y no del gen propiamente dicho; haciendo necesario el desarrollo de ensayos microscópicos con coloraciones bacterianas que garantizan información básica e importante para el investigador. Además, la observación directa de las características macroscópicas de las colonias como el tamaño, forma o color, evidencian la reacción metabólica de la bacteria en el medio y las propiedades nutricionales; parámetros utilizados para conocer el género y especie del microorganismo (Forbes y col., 2004).

En la actualidad, la detección del agente causal de la sinusitis se ha revolucionado por los recientes avances de la biología molecular, los cuales proporcionan excelente sensibilidad, superior a la de las técnicas microbiológicas convencionales. Además, estas pruebas moleculares permiten la detección simultánea de una amplia gama de patógenos, en su mayoría virus, pero también de bacterias atípicas. Aunque las técnicas moleculares son consideradas las más específicas a nivel mundial, es difícil identificar un método preciso como referencia para un patógeno o una familia de agentes patógenos. Adicionalmente, la sensibilidad puede variar cuando la prueba se adapta a toda la familia del microorganismo (Pillet y col., 2013).

No obstante, hoy en día en Venezuela la implementación de estos métodos sofisticados no se realiza de forma rutinaria debido a su elevado costo; por consiguiente, se opta por la identificación microbiológica convencional. La mayoría de los laboratorios se basan en la identificación a través de perfiles bioquímicos estandarizados y miniaturizados, como el esquema API-identificación.

A pesar de las ventajas significativas del diagnóstico molecular, todavía no pueden sustituir los métodos convencionales para una gama de enfermedades infecciosas, ya que muchas pruebas comunes que se realizan en el laboratorio de microbiología clínica son aún rápidas y económicas. Los

avances en las tecnologías convencionales han dado lugar a muchas pruebas antigénicas rápidas que requieren sólo de unos minutos para obtener resultados, y los sistemas de cultivo automatizados modernos permiten una rápida identificación y alta sensibilidad. Es por lo antes mencionado que para realizar una correcta identificación y caracterización de microorganismos patógenos es necesaria la combinación de las técnicas bioquímicas y microbiológicas (Speers, 2006).

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

¿Cuáles son las características fenotípicas, microbiológicas y fisiológicas propias de bacilos gramnegativos aeróbicos aislados en los adultos con sinusitis crónica, que asistirán a un laboratorio privado de la ciudad de Mérida, desde enero hasta diciembre de 2015?

www.bdigital.ula.ve **Justificación e Importancia de la Investigación**

Al igual que otras infecciones respiratorias de adquisición en la comunidad, la sinusitis ha alcanzado durante los últimos 10 a 15 años una indiscutible notoriedad, imputable en gran medida al reconocimiento de que es una enfermedad frecuente y tiene, por tanto, un impacto considerable sobre la salud pública general y los recursos económicos destinados a mantenerla (Bachert y col., 2003).

La rinosinusitis crónica afecta entre el 10 y 14% de la población mundial, tiene una alta incidencia, afecta tanto a adultos como niños, y se posiciona entre las primeras causas de morbilidad. Es una enfermedad que compromete la mucosa de la nariz y de los senos paranasales (Wang y col., 2011). Venezuela no cuenta con estadísticas relativas de la incidencia de rinosinusitis aguda o crónica en la comunidad, por lo que resulta difícil hacer estimaciones de su impacto, tanto en términos de morbilidad como

económicos. Sin embargo, puede intuirse que la situación no difiere mucho de lo que ocurre en otros países en vías de desarrollo. Teniendo en cuenta que los niños sufren de tres a ocho infecciones respiratorias virales al año, y los adultos de dos a cinco, que el 90% de estos pacientes presentan evidencia radiográfica de afectación sinusal y que alrededor del 0,5 al 2% de la rinosinusitis se complicarán con una infección bacteriana, es posible estimar en torno a un millón el número de sinusitis bacterianas al año en Venezuela. Por otra parte, aproximadamente el 90% de los pacientes acude al médico de atención primaria para su tratamiento, por lo que ocasiona grandes gastos en el sistema de salud y, en la actualidad, genera una alta prescripción de antibióticos (Revai y col., 2007; Desrosiers y col., 2011).

Los bacilos gramnegativos, aunque no son frecuentes en la mucosa nasofaríngea, pueden ser agentes etiológicos de estas afecciones. Por eso la caracterización de bacilos gramnegativos asociados a sinusitis crónica está justificada no solamente por su importancia etiológica, sino también para encontrar el método que aumente las posibilidades de identificación.

Es por lo antes mencionado, y por la falta de estadísticas confiables acerca de la incidencia de la rinosinusitis y sus agentes etiológicos en la población venezolana, que es necesario establecer metodologías bioquímicas y microbiológicas que permitan identificar y caracterizar los agentes causales de la sinusitis, especialmente los bacilos gramnegativos. Es de vital importancia la combinación entre estos dos tipos de metodologías, para ampliar las posibilidades de detección de géneros y especies de forma eficaz (Torralba y col., 2006; Millar y col., 2007).

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

- Caracterizar fenotípicamente los bacilos gramnegativos aeróbicos aislados en adultos con sinusitis crónica, que asistieron a un laboratorio privado de la ciudad de Mérida, desde enero hasta diciembre de 2015.

Objetivos Específicos

- Estudiar micro y macromorfológicamente los bacilos gramnegativos aeróbicos aislados en pacientes con sinusitis crónica.
- Identificar microbiológicamente los aislados bacterianos.
- Analizar la respuesta fisiológica de las cepas aisladas a distintas variables ambientales.

Alcances y limitaciones de la investigación

Alcances de la investigación

A través del desarrollo de diferentes aspectos metodológicos se espera conseguir una descripción precisa de los bacilos gramnegativos en estudio en base a la medición de sus características fenotípicas macro y microscópicas como: diferencias de las colonias, morfotipo del gram y movilidad. Bioquímicas y fisiológicas como la sensibilidad o resistencia de los mismos a antibióticos y sales de sodio; con la finalidad de poder caracterizarlos por medio de los resultados.

Del mismo modo, se pretende aportar con la investigación el conocimiento de

nuevos hallazgos microbiológicos en pacientes con sinusitis crónica, 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.

Limitaciones de la investigación

Actualmente 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. 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.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Joss y col. (2016), tuvieron como objetivo confirmar la hipótesis sobre la similitud existente entre las comunidades bacterianas de los diferentes senos paranasales en un mismo individuo; además, si el uso de diferentes técnicas de recolección o toma de muestra en diferentes lugares anatómicos podía generar datos equivalentes en pacientes con rinosinusitis crónica. Utilizaron técnicas convencionales de microbiología y técnicas moleculares que incluyeron extracción de ADN genómico, amplificación de la región V4 del gen que codifica para rRNA 16S mediante técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), purificación de los fragmentos amplificados y posterior secuenciación. Obtuvieron muestras de 19 pacientes, entre hisopados y muestras de tejido de los diferentes senos, para un total de 418 muestras para secuenciación y 242 para cultivo. *Corynebacterium* tuvo una presencia significativa en la comunidad bacteriana de la mayoría de los pacientes (39%), seguido de *Staphylococcus aureus* (32%) aunque en cantidades variables, así como bacterias anaerobias y bacterias gramnegativas como *Escherichia coli* (30%), *Pseudomonas aeruginosa* (24%) y *Enterobacter cloacae* (3%). En la mayoría de los casos se mantuvo la correspondencia entre los géneros identificados a través de ambos métodos, aunque las técnicas moleculares presentaron ventaja en la identificación de especies, respecto a técnicas convencionales. Finalmente, se demostró que un paciente puede tener varias comunidades bacterianas en los diferentes senos simultáneamente, comprendiendo que esta variación

(mayor o igual al 25%) podría ser crucial al seleccionar un tratamiento adecuado. Por otra parte, la técnica empleada en la recolección de la muestra (hisopados o biopsias de tejido) influye principalmente en la concentración de los microorganismos pero no en las comunidades halladas. Sin embargo, resaltan la necesidad de obtener múltiples muestras los diferentes senos para obtener resultados certeros.

En otro trabajo, Sadegh y col. (2016) estudiaron el patrón de resistencia a múltiples fármacos de agentes bacterianos aislados de pacientes con sinusitis crónica, según los estándares del CLSI 2013. Realizaron una prueba de sinergia de doble disco para la detección de bacterias productoras de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE), e identificaron cepas de *Staphylococcus* resistentes a la metilina (MRSA) mediante agar de tamiz. La tasa de bacterias productoras de BLEE fue de 28-37% entre las Enterobacterias, y la tasa de MRSA fue de 42-60% entre las cepas de *Staphylococcus*. La tasa más detectable de los aislados bacterianos fue de bacterias gramnegativas con 76,47% y *Enterobacter* spp., con 70,37%, siendo este último el aislado más resistente a múltiples fármacos entre las bacterias gramnegativas. De este modo, concluyen que la resistencia antimicrobiana está aumentando en la sinusitis bacteriana crónica.

Ese mismo año, Pourmousa y col. (2016) reportaron la frecuencia de agentes bacterianos aislados de pacientes con sinusitis crónica en el norte de Irán, debido a la alta incidencia de esta enfermedad en dicho país; realizando un estudio bacteriológico que permitió elegir los mejores antibióticos para la terapia de la sinusitis. Se estudiaron 100 pacientes con sinusitis crónica causada por bacterias, realizando un muestreo de la cavidad nasal para determinar la flora microbiana, cuya identificación se realizó empleando procedimientos microbiológicos estándar, obteniendo como resultado que las bacterias más comunes encontradas en la nasofaringe fueron: bacilos grampositivos, algunos cocos como *Staphylococcus*

coagulasa negativa y *Staphylococcus aureus* y bacilos gramnegativos como *Enterobacter aerogenes* con tasas de 20%, 16%, 15% y 10% respectivamente. Los autores concluyeron que la resistencia a algunos antibióticos como los subgrupos de penicilina que se usan en el tratamiento de la sinusitis crónica fue alta.

Antecedentes históricos

Hipócrates de Cos, médico de la Antigua Grecia, y figura destacada de la historia de la medicina, reconoció lo que actualmente se denomina *rinossinusitis* asociada a otitis media, cuando estableció la asociación entre el arco del paladar superior, la obstrucción nasal, la cefalea y descarga de los oídos (DeMuri y Wald, 2012). En la época medieval se creía que las descargas nasales emanaban del líquido de la base del cerebro, a partir de allí, que el término *hipófisis* deriva de la palabra latín fango o moco por sospechar que la glándula era el origen de la descarga amarilla de la nariz.

Pero Vesalio, considerado el fundador de la anatomía moderna, fue el primero que describió con precisión los senos paranasales en el siglo XVI, basándose en la observación directa y rechazando algunos errores anatómicos presentes en la obra de Galeno. Luego, Antonio Molinetti, también dedicado al estudio de la anatomía y disección de cadáveres, documentó los primeros casos de sinusitis supurativa en Venecia en 1697 (DeMuri y Wald, 2012). Más tarde en 1707, William Cowper reconoció el drenaje único y dificultoso de los senos maxilares y describió elocuentemente que el antro tiene pequeñas aberturas situadas muy arriba en la cavidad, por lo que las secreciones no pueden escapar hacia la nariz a no ser que el antro esté completamente lleno, o la cabeza se incline hacia un lado (DeMuri y Wald, 2012). El primer tratamiento conocido para la sinusitis era

principalmente quirúrgico y solía consistir en la punción del seno con un trocar, o en eliminar un molar y el drenaje a través del hueso alveolar.

Algunas investigaciones, desde 2003 hasta 2008, han revelado la etiología infecciosa de la sinusitis. Al respecto, Braun (2003), encontró los siguientes agentes etiológicos: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* β -hemolítico y el diplococo gramnegativo *Moraxella catarrhalis*. También, Del Río y col. (2008), encontraron en pacientes con rinosinusitis crónica los siguientes agentes etiológicos: *Staphylococcus aerus*, *Streptococcus pyogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*, además de algunas bacterias anaerobias.

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 (Forbes y col., 2004). 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 y col., 2004).

Microbiota Patógena de la Sinusitis Crónica

Los virus respiratorios, y un reducido número de bacterias, causan la inmensa mayoría de las sinusitis agudas adquiridas en la comunidad, tanto en niños como en adultos. Los más habituales son los rinovirus seguidos en orden de frecuencia por los virus *influenza*, *parainfluenza* y *adenovirus*. Entre las bacterias se recuperan, particularmente *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, implicadas en más del 50% de los casos. Otras bacterias patógenas incluyen *Staphylococcus aureus* y otras especies de estreptococos, bacterias anaerobias y, con menos frecuencia, bacterias gramnegativas (Poch, 2005). Entre los bacilos gram negativos tenemos:

- ***Klebsiella***. El género *Klebsiella* perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, llamadas comúnmente enterobacterias debido a la habitual colonización en el tracto gastrointestinal inferior. Existen tres especies asociadas a enfermedades en seres humanos: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *K. granulomatis* (López y col., 2010). El género *Klebsiella* es abundante en el medio ambiente (agua, suelo y plantas) y por lo general coloniza las mucosas en los mamíferos, donde en individuos sanos la presencia es de 5-35% en el colon, 1-5% en bucofaringe y 1-6% en nasofaringe (Ossa, 2013).

K. pneumoniae es un bacilo gramnegativo, en forma de bastón, inmóvil, fermentador de lactosa, metabolismo aerobio con formación de colonias mucoides debido a la producción de cápsula polisacárida. Tienden a crecer en medios nutritivos como agar sangre, y selectivos como agar MacConkey, recuperadas a partir de muestras extraintestinales, respiratorias, heridas y demás lugares susceptibles. Generalmente las infecciones por *Klebsiella*

afectan a pacientes inmunosuprimidos sobretodo en ambientes hospitalarios, por contacto entre personas (Ossa, 2013).

- **Serratia.** Las cepas de *Serratia* se caracterizan por ser móviles, rara vez fermentan la lactosa, y producen una ADNasa extracelular (López y col., 2010) y pigmentos de color rojo en el medio donde se desarrollan. La prueba de Vorges Proskauer es positiva, al igual que la de Citrato, ya que utiliza el carbono como única fuente de crecimiento (Brito y col., 2000). Es un patógeno esencialmente nosocomial porque la mayoría de las infecciones por su causa son adquiridas en ambientes hospitalarios, y presentan mayor tropismo hacia las vías respiratorias que digestivas. Según el Dr. Gonzalo Ossa de la Universidad de La Frontera en Temuco, Chile; los lugares más frecuentes de infección son el aparato respiratorio y genitourinario.

www.bdigital.ula.ve

- **Pseudomonas.** *Pseudomonas aeruginosa* es la principal especie patogénica de la familia *Pseudomonadaceae* (López y col., 2010). Se encuentra distribuida en la naturaleza, tiene predilección por los ambientes húmedos; coloniza la piel, oído externo, aparato respiratorio superior e intestino grueso de personas sanas. La frecuencia de portadores es baja, excepto en pacientes con alteraciones inmunológicas o patologías de base. Posee numerosos factores de virulencia, con un gran número de toxinas y diversos componentes de su superficie que contribuyen a la patogenicidad. Además, posee mecanismos que le permiten producir infecciones invasivas (Puerta y Mateos, 2010).

- **Moraxella.** Es un género de bacterias gramnegativas con forma de bacilo corto, cocobacilo, inmóviles, oxidasa positiva y catalasa positiva; unos son hemolíticos y algunas especies son capsuladas, aerobias aunque otras

pueden ser anaerobias facultativas. En el caso de *Moraxella catarrhalis* es un diplococo gramnegativo con morfología semejante a las especies de la familia *Neisseriaceae*. Aislada de nasofaringe en niños y adultos aparentemente saludables. Sin embargo, la presencia de la bacteria en el esputo de pacientes con signos de infección en el tracto respiratorio no necesariamente la establece como agente etiológico exclusivo (Mora, 1998). Se ha convertido en un patógeno bacteriano significativo de seres humanos en las últimas dos décadas. Durante este período, las técnicas de diagnóstico microbiológico y molecular se han desarrollado y mejorado lo que permite la determinación de este patógeno. Los estudios han puesto de manifiesto su implicación en las vías respiratorias produciendo sinusitis (Verduiny col., 2002).

- ***Enterobacter aerogenes***. Género de bacterias gramnegativas causantes de infecciones oportunistas, algunas causan infecciones principalmente en el tracto urinario y en las vías respiratorias. Producen una endotoxina conocida como “Lípido A”. Se caracteriza por fermentar la lactosa y descarboxilar la ornitina, desarrollando su crecimiento en medios de cultivos como agar MacConkey y agar sangre, en este último, sus colonias se presentan con aspecto mucoso y en la prueba bioquímica MIO e indol resultan ser positivas. Con pocas excepciones, las principales clases de antibióticos utilizados para tratar las infecciones son los beta-lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Puerta y Mateos, 2010).

- ***Escherichia coli***. Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos. Habitante común de la flora microbiana normal del tubo digestivo, es un microorganismo comensal, pero al adquirir ciertos genes de virulencia presentes en plásmidos y en

bacteriófagos, pueden convertirse en patógenos importantes. Para su identificación se utilizan pruebas bioquímicas estándares, se caracterizan por ser móviles, oxidasa negativo, fermentan glucosa y lactosa, descarboxilan la lisina, producen gas y no producen ácido. La presencia de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en aislamientos clínicos es cada vez mayor. Estudios demuestran un alto porcentaje de resistencia para ampicilina, cefradina y trimetoprim-sulfametoxazol y una alta sensibilidad para gentamicina y cefuroxime. Gonzalez y Algorta (2013), encontraron que los resultados de las pruebas bioquímicas pueden ser variables en cuanto a la movilidad, descarboxilación de la ornitina y utilización de la lactosa; sin embargo, reportan que todas las cepas resultan ser negativas ante la oxidasa y el citrato. Del mismo modo, concluyen que una misma cepa puede ser resistente a más de un grupo de antimicrobiano.

Fisiopatología de la Sinusitis Crónica

El mecanismo fisiopatológico básico que desencadena la sinusitis depende de tres factores: la obstrucción del orificio de salida del seno relacionado a alteraciones anatómicas, la reducción del aclaramiento ciliar y al aumento de la viscosidad de las secreciones con pérdida progresiva de la esterilidad dentro de la cavidad. En un proceso obstructivo agudo se genera hipoxia debido a alteraciones del recambio gaseoso dentro de los senos con una disminución de la presión parcial de O₂, del pH, con vasodilatación y un éxtasis en las secreciones (Poch, 2005). Esto produce estancamiento que genera un incremento en la colonización de la microflora nasal con consecuente infección una vez que el proceso obstructivo es crónico. Por otra parte, existen factores predisponentes: rinitis infecciosas, alérgicas o una desviación septal. Estas afecciones alteran la mucosa, la función ciliar y

secreción glandular por aumento en el número de células caliciformes causando síntomas como insuficiencia respiratoria nasal y cefalea (Martínez y col., 2010). El líquido obtenido de la irrigación de los senos paranasales en pacientes con sinusitis crónica contiene neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y basófilos (Río, 2009).

Diagnóstico Microbiológico de la Sinusitis Crónica

Los métodos de laboratorio directos, como la microscopía, proporcionan información preliminar acerca de las bacterias involucradas en una infección, se requiere crecimiento bacteriano para la identificación y caracterización definitiva. Específicamente, el cultivo es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de bacterias de un sitio de infección (el ambiente *in vivo*) por métodos de recolección de muestra y crecimiento en un medio ambiente artificial en el laboratorio, el ambiente *in vitro*. Una vez que los cultivos se desarrollan, la mayoría de las poblaciones bacterianas pueden ser visualizadas sin microscopía y están presentes en cantidades suficientes para permitir la realización de pruebas de laboratorio (Forbes y col., 2004).

Según Forbes y col. (2004), la transición exitosa desde el ambiente *in vivo* al ambiente *in vitro* requiere que se cumplan los requerimientos nutricionales y ambientales de los patógenos bacterianos. Las bacterias tienen numerosas necesidades nutricionales que incluyen diferentes gases, agua, diversos iones, nitrógeno, fuentes de carbono y energía.

En el laboratorio los nutrientes se incorporan a los medios de cultivo en los que se desarrollan las bacterias. Si un medio de cultivo cumple con los requerimientos de una célula bacteriana, esta se multiplicará en cantidades suficientes para permitir su visualización a simple vista. Ya que algunas bacterias patógenas tienen necesidades nutricionales especiales, se desarrollan en diferentes tipos de medios de cultivo para su uso en el

diagnóstico microbiológico. A su vez, las necesidades de la mayoría de bacterias importantes en la clínica son relativamente básicas y sencillas (Forbes y col., 2004).

El agar MacConkey es el agar primario, selectivo diferencial utilizado con mayor frecuencia. Este medio contiene el colorante violeta cristal para inhibir el crecimiento de bacterias grampositivas y de los hongos, mientras que permite el desarrollo de muchos tipos de bacilos gramnegativos. El indicador de pH, rojo neutro, le otorga a este medio su propiedad diferencial. La fermentación bacteriana de la lactosa produce la formación de ácido, que disminuye el pH del medio y hace que el indicador rojo neutro vire de un color rojo a rosa. Las bacterias no fermentadoras de la lactosa, como las especies de *Shigella*, permanecen incoloras y traslúcidas (Forbes y col., 2004).

El agar sangre de carnero es un medio que favorece el desarrollo de todas las bacterias de importancia clínica, excepto las que presentan requerimientos especiales de cultivo. Según Forbes y col. (2004), el medio consiste en una base que contiene una fuente de proteínas (triptonas), cloruro de sodio, agar y sangre de carnero al 5%. Ciertas bacterias producen enzimas extracelulares que lisan los eritrocitos en el agar. En microbiología se usa la morfología de la colonia y el grado o ausencia de hemólisis como criterios para determinar qué pasos se requieren para la identificación de un aislamiento bacteriano.

El agar chocolate es el mismo agar sangre, a diferencia que durante la preparación, los glóbulos rojos son lisados cuando se agrega un agar base fundido. Esta lisis libera nutrientes intracelulares como hemoglobina, hemina y la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) dentro del agar para ser utilizadas por las bacterias (Forbes y col., 2004).

Los cultivos de bacterias provenientes de infecciones de diversos sitios corporales se llevan a cabo mediante la siembra de muestras procesadas

directamente en medios artificiales. Para favorecer el crecimiento, el aislamiento y la selección de los agentes etiológicos, los inóculos de la muestra por lo común se siembran sobre la superficie de las placas respetando un patrón estándar, de modo que se obtengan colonias separadas y pueda realizarse un análisis semicuantitativo (Forbes y col., 2004).

Para favorecer el aislamiento de las colonias bacterianas, el asa de inoculación debe flamearse para la esterilización entre el estriado del cuadrante siguiente. Además, el estriado de las placas inoculadas con una cantidad determinada de muestra se logra mediante la diseminación del inóculo sobre la superficie completa del agar facilitando el recuento de colonias porque asegura que cada célula bacteriana será dispersa sobre la superficie del agar.

El aislamiento de las colonias individuales durante los cultivos no solo es importante para examinar la morfología y las características, también es necesario para realizar la coloración de Gram y la evaluación microscópica de los cultivos de las bacterias, junto con la morfología de la colonia, sirven para decidir los pasos de identificación necesarios. En algunos casos, la coloración puede no ser necesaria, debido a que el crecimiento en un agar selectivo determinado proporciona datos relacionados con la morfología como tamaño, pigmentación, forma, aspecto, olor de la colonia; por ejemplo los bacilos gramnegativos en esencia, son las únicas bacterias relevantes en la clínica que se desarrollan bien en agar MacConkey (Forbes y col., 2004).

Operacionalización de las Variables

Con la finalidad de poder determinar el método a través del cual será analizada la variable fenotípica en estudio, se definen a continuación en la Tabla 2, las diferentes operaciones medidas a través de indicadores.

Tabla 2. Operacionalización del criterio de clasificación caracterización fenotípica de bacilos gramnegativos aeróbicos aislados en pacientes con sinusitis crónica.

OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE			
VARIABLE	DEFINICIÓN NOMINAL	DEFINICIÓN REAL (DIMENSIONES)	DEFINICIÓN OPERACIONAL (INDICADORES E INSTRUMENTO)
Caracterización Fenotípica de Bacilos Gramnegativos Aeróbicos	La caracterización fenotípica de los bacilos gramnegativos aeróbicos 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 cols, 2004).	<p style="text-align: center;">Caracterización macro y micro morfológica de Bacilos Gramnegativos Aeróbicos.</p> <p style="text-align: center;">Consta de las características físicas de los mismos. (Forbes y col., 2004).</p>	<p>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.</p> <p>Uso del microscopio para observar el morfotipo de las bacterias y si estas presentan o no movilidad alguna.</p>
		<p style="text-align: center;">Caracterización Microbiológica de Bacilos Gramnegativos Aeróbicos.</p> <p style="text-align: center;">Se refiere al estudio de las reacciones bioquímicas y metabólicas de los aislados bacterianos (Forbes y col., 2004).</p>	<p>Lectura de pruebas claves a través de tablas de identificación de microorganismos. por pruebas bioquímicas de identificación:</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Oxidasa ❖ Kliguer ❖ LIA ❖ MIO ❖ Citrato ❖ O/F Glucosa ❖ O/F Maltosa
		<p style="text-align: center;">Caracterización Fisiológica de Bacilos Gramnegativos Aeróbicos.</p> <p style="text-align: center;">Representa la resistencia a sales y antibióticos (Forbes y col., 2004).</p>	<p>Inhibición por ausencia de crecimiento.</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Sensibilidad o resistencia a antibióticos. ❖ Sensibilidad o resistencia a Sales de sodio.

Fuente: Los autores.

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Hurtado (2010), refirió que el tipo de investigación tiene relación con la interrogante de estudio en la cual se resalta lo que se quiere saber. Pues, esto marca el logro general que se desea conseguir durante el proceso e identifica el tipo de investigación. En consecuencia, el verbo a utilizar en el objetivo tiene que implicar un logro. Arias (2006) refiere que la investigación descriptiva consiste en la caracterización de un hecho, fenómeno, individuo o grupo, con el fin de establecer su estructura o comportamiento. Específicamente, durante esta investigación se quiere observar el evento de estudio bajo el contexto de su caracterización fenotípica. Es decir, se desea realizar una descripción en base a las características micro y macro morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de los microorganismos, específicamente de los bacilos gramnegativos aislados en adultos con sinusitis crónica dentro del contexto y período determinado. Por lo tanto, esta investigación es de tipo descriptiva.

Diseño de la Investigación

Hurtado (2010) describió que 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. Arias (2006) establece que la investigación de

campo es aquella que consiste en la recolección de datos directamente de los sujetos investigados, o de la realidad donde ocurren los hechos, sin manipular o controlar variable alguna, ni alterando las condiciones existentes. En tal sentido, esta investigación tiene un diseño de campo porque los datos se recolectaron directamente de los bacilos gramnegativos en estudio sin manipulación alguna. De igual manera, esta investigación posee un paradigma positivista.

Población y Muestra

La población corresponde a todas las cepas aisladas de los pacientes adultos con sinusitis crónica.

Unidad de Investigación

El grupo de estudio estuvo representado por las cepas de los bacilos gramnegativos aislados en adultos con síntomas de sinusitis crónica, que asistieron al laboratorio privado ubicado en la ciudad de Mérida, Estado Mérida; las cuales se analizaron durante el periodo de enero a diciembre de 2015.

Selección del Tamaño de la Muestra

De la población total, el tamaño muestral fue determinado de manera no probabilística o aleatoria pues, la elección de la unidad de estudio no dependen de la probabilidad, si no de la característica de la investigación (Hernández-Sampieri, 2010). En esta investigación la muestra estará representada por los bacilos gramnegativos aeróbicos.

Procedimientos de la Investigación

Características Fenotípicas

Una vez aisladas las muestras, el procesamiento comenzó con la caracterización fenotípica fundamentada en dos procesos. Primero, el estudio micro morfológico que evaluó la motilidad y el estudio microscópico de la forma de esa célula. Además, la tinción de gram puso en manifiesto 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 color, forma, textura, aspecto y producción de pigmentos. Los aislados se cultivaron en agar BHI para observar dichas características al cabo de 24 horas de incubación a 30°C (Koneman, Allen, Schreckenberger y Winn, 1999).

La caracterización bioquímica logra ubicar al microorganismo en un taxón preliminar a nivel de grupo o familia, para lo cual se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: Prueba de la oxidasa, conjuntamente la siembra en agar MacConkey para evaluar la fermentación de la lactosa, Medio Hugh y Leifson, Kliguer, LIA, Motilidad, Indol, Ornitina (MIO), (Koneman y cols, 1999).

Estudio preliminar a la resistencia de antibióticos

Una vez concluida la identificación microbiológica, se procedió a estudiar de manera preliminar la resistencia a los antibióticos. Para ello se prepararon 10 placas del medio Luria Bertani Duro (LBD) con antibióticos comerciales (adquiridos en la farmacia), los cuales se diluyeron hasta obtener una concentración stock de 100 mg/ml. Los antibióticos seleccionados en presentación de comprimidos fueron: Cefalotina 1 g, Ceftazimida 1 g,

Gentamicina 80 mg, Amoxicilina/ Ácido clavulánico 500 mg, Cefadroxilo 500 mg, Ciprofloxacina 500 mg, Ampicilina 500 mg y Kanamicina 500mg; mientras que los de presentación intravenosa fueron Ceftriaxona 1 g y Cefotaxima 1g.

A partir de estas soluciones stock se prepararon placas de medio LBD (25 ml) 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 palillos, y se incubaron a 37°C, tomando la lectura a las 24 y 48 horas de incubación.

Diseño de Análisis

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: Caracterización fenotípica de bacilos gramnegativos aeróbicos aislado en adultos con sinusitis crónica. 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 aeróbicos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Descripción de la población y muestra

Se tomaron muestras de exudado nasal y faríngeo a un total de 17 pacientes adultos que asistieron a un laboratorio privado en la ciudad de Mérida, previamente diagnosticados con sinusitis crónica. Del grupo muestreado, el 47% fueron mujeres y el 53% fueron hombres, con edades comprendidas entre 18 a 55 años (Tabla 3). Simultáneamente, se determinó que la mayoría de las muestras (10/17) procedentes de exudado faríngeo, presentaron un desarrollo bacteriano abundante una vez cumplido el período de incubación, al observar crecimiento en los cuatro cuadrantes de las placas sembradas. Mientras que, la mayoría de las muestras de origen nasal presentaron crecimientos bacterianos con distribución moderada, desde el segundo hasta el tercer cuadrante aproximadamente (Tabla 3).

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 en estudio corresponden a bacilos gramnegativos. Para el estudio macromorfológico, las cepas se sembraron en placas de medio LBD donde se evaluaron características como extensión del

crecimiento, forma, tamaño, elevación, borde, densidad, consistencia y color de las colonias bacterianas aisladas.

Tabla 3. Descripción de la población de pacientes muestreada.

N°	CÓDIGO CEPAS	SEXO		EDAD	MUESTRA	DISTRIBUCIÓN	
		M	F			NARIZ	FARINGE
1	B1	X		18-55 Años	Nasofaringe	Abundante	Escaso
2	B3		X			Abundante	Abundante
3	B8	X				Abundante	Abundante
4	B9	X				Escaso	Abundante
5	B10	X				Escaso	Abundante
6	B11	X				Escaso	Abundante
7	B12		X			Escaso	Abundante
8	B13		X			Moderado	Moderado
9	B14		X			Moderado	Moderado
10	B16		X			Moderado	Abundante
11	B18	X				Moderado	Abundante
12	B20		X			Moderado	Moderado
13	B21		X			Moderado	Moderado
14	B22	X				Abundante	Abundante
15	B23	X				Abundante	Abundante
16	B25	X				Moderado	Moderado
17	B28		X			Moderado	Moderado

M: masculino; F: femenino.

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 4, existe un primer grupo predominante formado por las cepas B8, B11, B12, B18, B20 y B21 cuyas colonias comparten la totalidad de sus características macroscópicas, siendo estas; puntiformes, elevadas, con bordes enteros, opacas y blandas de color cremoso. Luego se encuentran dos grupos, formados cada uno por dos cepas, el grupo de las cepas B1 y B3, las cuales son puntiformes, convexas, de bordes enteros, opacas y viscosas de color cremoso; y el de las cepas B22 y B25, que se diferencian del grupo anterior por la elevación de sus colonias, ya que comparten el resto de los rasgos. Por otra parte, se encontraron cepas con algunas características distintivas que no permiten incluirlas en alguno de los grupos anteriores (Tabla 4). Tal es el caso de los aislados B9, B14, B16 y B28, las cuales presentan colonias puntiformes, elevadas y opacas con bordes discontinuos, pero se pueden diferenciar

según la consistencia y color de las mismas, siendo viscosas-amarillas para B9, blandas-amarillas para B14, blandas-cremosas para B16 y viscosas-blancas para B28 (Tabla 4).

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

CODIGO CEPAS	EXT	FOR	TAM	ELEV	BOR	DEN	CONS	CO L
B1	M	P	1mm	Co	En	Op	V	Cr
B3	A	P	1mm	Co	En	Op	V	Cr
B8	M	P	1,2mm	EI	En	Op	Bl	Cr
B9	M	P	1mm	EI	Di	Op	V	Am
B10	A	R	1mm	EI	En	Op	Bl	Cr
B11	A	P	1mm	EI	En	Op	Bl	Cr
B12	A	P	1mm	EI	En	Op	Bl	Cr
B13	A	R	1,1mm	EI	En	Op	V	Cr
B14	A	P	1mm	EI	Di	Op	Bl	Am
B16	M	P	1mm	EI	Di	Op	Bl	Cr
B18	M	P	1mm	EI	En	Op	Bl	Cr
B20	A	P	1mm	EI	En	Op	Bl	Cr
B21	A	P	1mm	EI	En	Op	Bl	Cr
B22	A	P	1mm	EI	En	Op	V	Cr
B23	M	R	1mm	Co	En	Op	Mu	B
B25	M	P	1mm	EI	En	Op	V	Cr
B28	M	P	1mm	EI	Di	Op	V	B

Extensión (EXT): M: moderado, A: abundante; **Forma (FOR):** P: puntiforme, R: redonda; **Tamaño (TAM):** mm; **Elevación (ELEV):** Co: convexa, EI: elevada; **Bordes (BOR):** En: entero, Di: discontinuo; **Densidad (DEN):** Op: opaca; **Consistencia (CONS):** V: viscosa, Bl: blanda, Mu: mucosa; **Color (COL):** Cr: cremoso, B: blanco, Am: amarillo.

Los aislados B10 y B13 comparten la misma forma, elevación, bordes, densidad y color, pero difieren por presentar una consistencia blanda y viscosa respectivamente (Tabla 4). Finalmente, la cepa B23 a pesar de presentar algunas características ya mencionadas, se clasifica de forma aislada por ser la única con colonias de consistencia mucosa. En general el tamaño aproximado corresponde a 1 mm, y la extensión del crecimiento bacteriano tuvo una variación de moderado a abundante (Tabla 4).

Caracterización bioquímica

Para llevar a cabo una clasificación taxonómica preliminar, las 17 cepas aisladas fueron estudiadas de acuerdo a sus características bioquímicas mediante baterías de pruebas bioquímicas constituidas por: agar MacConkey (MK), agar Kligler (KIA), agar Citrato (CIT), medio Motilidad Indol Ornitina descarboxilasa (MIO) y prueba de Hugh y Leifson (O/F). En lo que se refiere a la presencia de hemolisinas, se encontró que 16 de las cepas no producen ningún tipo de hemólisis, clasificándolas así como γ -hemolíticas; y solo 1, la cepa B3, fue clasificada como β -hemolítica por su capacidad de lisar los eritrocitos y formar colonias rodeadas por halos completamente claros. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Características bioquímicas de las cepas bacterianas

CÓDIGO CEPAS	HEMÓLISIS		MK	KIA	CIT	MIO	O/F
	β	γ					
B1		X	+	A/A +/-	+	---	+/+
B3	X		+ lento	A/A +/-	+	+--	+/+
B8		X	+	A/A +/-	-	+++	+/+
B9		X	+	A/A +/-	-	+++	+/+
B10		X	+ lento	A/A +/-	+	---	+/+
B11		X	+	A/A +/-	+	-+-	+/+
B12		X	+	A/A +/-	-	+++	+/+
B13		X	-	K/A --	+	+--	+/+
B14		X	+	A/A +/-	-	+--	+/+
B16		X	+ lento	A/A +/-	+	+--	+/+
B18		X	+	A/A +/-	+	+--	+/+
B20		X	+	A/A +/-	+	+--	+/+
B21		X	-	K/A --	+	+--	+/+
B22		X	+ lento	A/A +/-	+	+--	+/+
B23		X	+	A/A +/-	-	+++	+/+
B25		X	+	A/A +/-	+	---	+/+
B28		X	+	A/A +/-	+	---	+/+

MK: agar McConkey; **KIA:** agar kligler; **CIT:** agar citrato; **MIO:** agar motilidad indol ornitina; **O/F:** prueba de Hugh Leifson.

Respecto al agar MK, se observó el crecimiento de la totalidad de las 17 cepas inoculadas en el medio. En general, el 88% de las cepas (15/17) utilizan la lactosa ocasionando una disminución en el pH del medio, donde 11/15 produjeron la aparición de un color fucsia característico debido a la gran cantidad de ácido, mientras que 4/15 (B3, B10, B16, B22) fermentaron la lactosa lentamente. El resto de las cepas (B13 y B21) ocasionaron un viraje de color amarillo debido a la ausencia de fermentación, coincidiendo además con los resultados obtenidos en el agar Kligler, en el cual las 17 cepas son capaces de generar gas, pero ninguna produce ácido sulfhídrico (H₂S) (Tabla 5).

En la prueba de utilización de citrato de Simmons, el 71% de las cepas (12/17) utilizaron el citrato como única fuente de carbono para su crecimiento, generando un viraje de color verde a azul debido a la alcalinización del medio, indicando así una prueba positiva. En cuanto al medio MIO, 12 cepas se consideran móviles por presentar un crecimiento difuso, excepto los aislados B1, B10, B11, B25 y B28 cuyo crecimiento se observó solo en el área de punción (Tabla 5). La mayoría de los aislados (71%) no poseen la enzima triptofanasa, evidenciándose con la formación de anillos de color amarillo una vez agregado el reactivo de Kovacs, debido a la ausencia del indol en el medio. Igualmente, el 53% (9/17) no producen la enzima ornitina descarboxilasa, permaneciendo un color amarillo en el fondo del tubo posterior al período de incubación. Finalmente, la prueba de Hugh y Leifson (O/F) evidenció el carácter oxidativo y fermentativo de las cepas inoculadas debido al uso de la glucosa por ambos metabolismos para todos los casos (Tabla 5).

Identificación microbiológica

De acuerdo con los resultados de las pruebas bioquímicas preliminares, las 17 cepas en estudio pueden ubicarse dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, considerando que se trata de bacilos gramnegativos, fermentadores todos de la glucosa y de la lactosa en su mayoría, oxidasa negativa, 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 procedió a seleccionar un grupo heterogéneo de cepas tomando en cuenta las diferentes reacciones metabólicas obtenidas en los ensayos preliminares, con la finalidad de investigar la diversidad de géneros presentes; e igualmente se tomaron 2 pares de cepas, cuyas reacciones metabólicas fueron idénticas, pero presentaban pequeñas diferencias en sus características macromorfológicas. De esta manera, del número total de muestras (17) se procesaron 11 previamente agrupadas según los criterios mencionados.

La identificación definitiva de las especies se logró al incorporar el agar Lisina Hierro (LIA) a la batería bioquímica previa, así como la verificación de la prueba de la oxidasa (diferencial para bacilos gramnegativos, específicamente enterobacterias). Los resultados obtenidos demuestran que los microorganismos encontrados poseen la enzima lisina descarboxilasa, ya que al utilizar la glucosa disponible se producen ácidos mixtos, que inducen la acción de la misma dando lugar a la formación de aminas que alcalinizan el medio, observando así una coloración púrpura, tanto en el bisel como el taco del tubo (Tabla 6). Esto permite concluir que los microorganismos tienen la capacidad de descarboxilar la lisina, más no de desaminarla. Además, se evidenció la producción de gas, la cual se corresponde con los resultados obtenidos en el agar kligler, así como la ausencia de H₂S. Con base a los

resultados presentados en la Tabla 6, se determinó que las especies predominantes fueron *Klebsiella pneumoniae* (4 aislados) y *Escherichia coli* (4 aislados), seguidas de *Enterobacter aerogenes* (2 aislados), y por último *Klebsiella oxytoca* en 1 de los aislados seleccionados.

Tabla 6. Caracterización e identificación microbiológica de las cepas bacterianas.

CÓDIGO CEPAS	PRUEBA OXIDASA	MK	KIA	LIA	CIT	MIO	O/F	MICROORGANISMO
B1	-	+	A/A +/-	K/K+	+	---	+/+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
B8	-	+	A/A +/-	K/K+	-	+++	+/+	<i>Escherichia Coli</i>
B9	-	+	A/A+/-	K/K+	-	+++	+/+	<i>Escherichia Coli</i>
B10	-	+ lento	A/A+/-	K/K+	+	---	+/+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
B11	-	+	A/A +/-	K/K+	+	-+/-	+/+	<i>Klebsiella Oxytoca</i>
B12	-	+	A/A +/-	K/K+	-	+++	+/+	<i>Escherichia Coli</i>
B16	-	+ lento	A/A +/-	K/K+	+	+/-	+/+	<i>Enterobacter aerogenes</i>
B18	-	+	A/A +/-	K/K+	+	+/-	+/+	<i>Enterobacter aerogenes</i>
B23	-	+	A/A+/-	K/K+	-	+++	+/+	<i>Escherichia Coli</i>
B25	-	+	A/A +/-	K/K+	+	---	+/+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
B28	-	+	A/A +/-	K/K+	+	---	+/+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

MK: agar McConkey; **KIA:** agar kligler; **LIA:** agar lisina hierro; **CIT:** agar citrato; **MIO:** agar motilidad indol ornitina; **O/F:** prueba de Hugh Leifson.

Estudio 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 diez antibióticos comerciales preparados a diferentes concentraciones, cuyas lecturas se realizaron a las 48 horas de incubación. Se utilizaron antibióticos

pertencientes 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 (ceftriaxona, cefatizidima y cefotaxima). Por otra parte, como representante de las fluoroquinolonas se utilizó la ciprofloxacina (segunda generación); y del grupo de los aminoglucósidos se probaron la kanamicina y 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.

Todas las cepas fueron resistentes a la cefalotina, y la mayoría de ellas a la ampicilina, excepto las cepas B14 y B18 que son sensibles a cualquier concentración de la misma. En el caso de la amoxicilina/ácido clavulánico solo los aislados B11, B14, y B18 son sensibles, mientras que el resto de los aislados son resistentes a todas las concentraciones de este antibiótico. En el caso del cefadroxilo, solo la cepa B20 fue inhibida a una concentración de 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de este antibiótico, ya que el resto de los aislados resultaron ser resistentes. En cuanto a la ceftriaxona, 10 de los 17 aislados son resistentes a este fármaco, y de las cepas sensibles, la B11 es inhibida a concentraciones iguales o mayores de 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La mayoría de las cepas son sensibles a la ceftazidima, a excepción de las cepas B8 y B21. Para la cefotaxima, concentraciones de 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ son necesarias para inhibir el crecimiento de los bacilos; mientras que para fluoroquinolonas como la ciprofloxacina, la mayoría de los aislados son sensibles, siendo resistente solo la cepa B8. En el grupo de los aminoglucósidos, tanto para kanamicina como gentamicina, 15 de las 17 cepas son sensibles a concentraciones entre 50 y 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 7).

Tabla 7. Estudio de la resistencia a antibióticos en medio LBD a las 48 horas de incubación.

CODIGO CEPAS	β- LACTÁMICOS						FLQ	AMNG		IβLAC
	PNC	1 ^{era} G		3 ^{era} G			2 ^{da} G	KANAMICINA	GENTAMICINA	AMOXICILINA/ AC. CLAVULANICO
	AMPICILINA	CEFALOTINA	CEFADROXILO	CEFTRIAXONA	CEFTAZIDIMA	CEFOTAXIMA	CIPROFLOXACINA			
B1	R	R	R	R	100	R	S	S	50	R
B3	R	R	R	R	50	R	S	S	S	R
B8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
B9	R	R	R	S	S	S	S	75	S	R
B10	R	R	R	S	75	S	S	S	S	R
B11	R	R	R	75	75	S	S	50	S	S
B12	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
B13	R	R	R	R	75	75	S	R	R	R
B14	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
B16	R	R	R	R	S	R	50	S	S	R
B18	S	R	R	S	S	75	S	S	S	S
B20	R	R	75	R	100	R	S	S	S	R
B21	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
B22	R	R	R	R	75	R	S	S	S	R
B23	R	R	R	R	S	R	S	S	75	R
B25	R	R	R	S	S	75	S	100	S	R
B28	R	R	R	R	75	S	S	S	S	R

R: resistente a todas las concentraciones ensayadas; S: sensible a todas las concentraciones ensayadas. Los números representan la concentración mínima inhibitoria (µg/mL). G: generación; PNC: penicilinas; FLQ: fluoroquinolona; AMNG: aminoglucósidos; IβLAC: inhibidores de β-lactamasas.

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 % m/v, correspondientes a 2,5; 5, 10 y 15%, con las cuales fueron preparadas

las placas de medio LBD. Según la Tabla 8, la mayoría de las cepas son capaces de crecer frente a concentraciones de NaCl menores al 10% m/v (11/17), excepto los aislados B10 y B13, que soportan concentraciones un poco mayores pero sin exceder un 15% m/v de la sal; y otras como las cepas B11, B12 y B14 que pueden ser inhibidas con pequeños valores como 5% de NaCl.

Tabla 8. Estudio de la resistencia a sales en medio LBD.

CÓDIGO DE CEPAS																	
[Sal] (% m/v)	B1	B3	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B16	B18	B20	B21	B22	B23	B25	B28
2,5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
5	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
10	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

[Sal]: concentración de NaCl expresada en % m/v. Se resalta en color la concentración mínima inhibitoria.

Discusión

Caracterización bioquímica e identificación microbiológica

Una vez obtenidos los aislamientos puros a partir de las muestras nasales y faríngeas de los pacientes adultos con sinusitis crónica, 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. Simultáneamente se llevó a cabo el estudio de las características macromorfológicas de las colonias en medio LBD, agrupando las cepas de acuerdo con características semejantes, como se indicó en la Tabla 4.

Según la Tabla 5, las cepas bacterianas se clasificaron en cuatro grupos por presentar resultados similares en las pruebas bioquímicas. Conformados respectivamente: grupo 1) cepas: B1, B3, B10, B11, B22, B25 y B28; en el cual se observa que todos los aislados son MK positivo (fermentadores de la lactosa), citrato positivo y ornitina negativa; grupo 2) cepas: B8, B9, B12, B14 y B23; con MK positivo, citrato negativo, motilidad-indol-ornitina positivo; grupo 3) cepas: B13 y B21; con MK negativo (sin fermentación de la lactosa), citrato positivo y todas móviles con indol negativo; y el grupo 4) cepas: B16, B18 y B20; MK con lactosa positiva, citrato positivo y móviles con ornitina positiva.

En virtud de no contar con los recursos y medios necesarios para llevar a cabo la identificación microbiológica de los 17 aislados, a pesar de haber realizado exitosamente el aislamiento de ADN genómico, amplificación del ADNr 16S y purificación de los fragmentos amplificados, solo faltando la secuenciación de los mismos (Anexo 3), se seleccionaron 11 de estos para

montar las pruebas bioquímicas que permitieran una identificación a nivel de género y especie. Un criterio importante considerado al momento de seleccionar entre las cepas que conforman cada grupo con reacciones bioquímicas parecidas, fueron las características macromorfológicas de las colonias, presumiendo que podría tratarse de especies distintas dentro del mismo género (Tabla 4).

Con respecto Grupo 1, cabe resaltar que la cepa B10 es la única con colonias de forma redonda y consistencia blanda, la cepa B28 presentó bordes discontinuos y colonias de color blanco, y el aislado B1 posee elevación convexa, mientras que el resto de los rasgos, tales como forma puntiforme, densidad opaca, consistencia viscosa y color cremoso permanecen como características comunes en el grupo (Tabla 4). En lo que se refiere al Grupo 2, e incluso de las 17 cepas que conforman este estudio, los aislados B8 y B12 son los únicos bioquímica y macromorfológicamente idénticos, siendo sus colonias puntiformes, elevadas, con bordes enteros, densidad opaca, consistencia blanda y color cremoso. Dentro del mismo Grupo 2, las cepas B9 y B23 poseen rasgos distintivos: B9 se diferencia por sus bordes discontinuos, consistencia viscosa y color amarillo, y B23 por su forma redonda, elevación convexa, consistencia mucosa y blanca (Tabla 4). Finalmente, del Grupo 4, la cepa B16 presentó una fermentación lenta de la lactosa en el agar MK respecto a B18, y se diferencian por sus bordes discontinuos para B16 y enteros para B18. A su vez, ambas cepas son puntiformes, elevadas, opacas, de consistencia blanda y color cremoso. Esto permitió seleccionar un total de 11 cepas a las cuales se les podía llevar a cabo la identificación microbiológica (B1, B8, B9, B10, B11, B12, B16, B18, B23, B25 Y B28).

Culminado el proceso de incubación para las 11 cepas seleccionadas 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, al no observar la formación de un color negro purpúreo debido a la falta de oxidación en el reactivo por la ausencia de la enzima (Ramírez, 2006). 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).

La batería bioquímica utilizada previamente: agar MK, KIA, CIT, medio MIO y prueba de O/F, permitió ubicar a los aislamientos dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (Tabla 5), siendo estas pruebas clave según el Manual de Bergey (1957). 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, respectivamente. Además, la prueba de O/F evidencia la capacidad de oxidar y 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, 2006); 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 un cambio alcalino en el pH del medio (Koneman, 2006). Luego del proceso de selección de las 11 cepas a identificar, las pruebas: MK, KIA y CIT fueron confirmadas. La prueba clave en la identificación microbiológica final fue con el agar LIA, un medio sólido donde además de observar la descarboxilación de un aminoácido que en este caso es la lisina, se demuestra la producción de gas

y H₂S (Longa y Ramírez, 2006). Los resultados fueron presentados en la Tabla 6, en la que se indican las especies encontradas.

Como podía anticiparse, las cepas con reacciones bioquímicas idénticas correspondieron a las mismas especies; de este modo los aislados: B8, B9, B12 y B23 fueron identificados como *Escherichia coli*; una bacteria aerobia o anaerobia facultativa (Breed y cols., 1957) que fermenta la glucosa y la lactosa (KIA A/A) con producción de gas como resultado, esto se debe según Koneman (2006) a que este género lleva a cabo la fermentación de la glucosa por la vía de fermentación de ácidos mixtos que conduce a la producción de grandes cantidades de ácidos: acético, láctico y fórmico, con una acentuada caída del pH en el medio de prueba; son citrato negativo y móviles por medio de flagelos peritricos (Molina y Esclava, 2017). Lo mismo ocurrió con los aislados B16 y B18, identificados como *Enterobacter aerogenes*, cuyas características claves de identificación según el Manual de Bergey (1957) son indol negativo, movilidad (mediada por flagelos peritricos), lisina y ornitina positiva.

En el caso del género *Klebsiella*, la cepa B11 fue identificada como *Klebsiella oxytoca*, la cual se diferenciaba del grupo por presentar una prueba de indol positiva, mientras que las 4 cepas restantes (B1, B10, B25 y B28) reconocidas como *Klebsiella pneumoniae*, tuvieron un resultado negativo. Como aspectos claves de identificación para este género, la mayoría produce cantidades abundantes de dióxido de carbono (CO₂), tanto que la porción profunda del agar KIA es empujada hacia arriba hasta mitad de camino en el tubo. Son inmóviles, citrato positivo y ornitina negativa (Koneman, 2006). Los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* metabolizan el ácido pirúvico principalmente a través de la vía del butilenglicol (Ramírez, 2006). La producción de gas por parte de los microorganismos identificados 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).

Se presentaron algunas excepciones en cuanto a las características macromorfológicas de las colonias; por ejemplo, las cepas B10-B11, identificadas como *Klebsiella*, y B16-B18 como *Enterobacter*, mostraron colonias blandas (Tabla 4), cuando la bibliografía las describe como viscosas o mucoides por tratarse de bacterias encapsuladas (Puerta y Mateos, 2010). La literatura describe también, que las bacterias pertenecientes al género *Escherichia* no son capsuladas, pero los aislados B9 y B23, crecieron formando colonias muy viscosas, aunque según Breed y col. (1957), algunas cepas pueden presentar un color amarillento brillante, como en el caso de B9 (Tabla 4). Esto evidencia que, microorganismos pertenecientes al mismo género pueden presentar diferentes comportamientos en su crecimiento, conociendo que los géneros están constituidos por un grupo de especies íntimamente relacionadas, y que la categoría básica en la clasificación taxonómica es la especie, formada por un conjunto de individuos llamados cepas (cultivos puros derivados de un solo aislamiento) que comparten cierto número de características destacadas por presentar una afinidad del 70% en su ADN (Picazo y Prieto, 2016).

Las pruebas bioquímicas identificaron a las cepas en estudio como integrantes de la familia *Enterobacteriaceae*, 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. Los resultados encontrados en este trabajo coinciden con varios estudios reportados en la literatura. Por ejemplo, Joss y col. (2016) encontraron que la microbiota de los pacientes con sinusitis crónica de su estudio fue predominantemente anaerobia (como el género *Propionibacterium*), acompañada de *Staphylococcus aureus*, y bacilos gramnegativos como *Escherichia coli*,

Pseudomonas aeruginosa y *Enterobacter cloacae*. Por otra parte, Pérez y col. (2013) demostraron la presencia de enterobacterias en la mucosa de pacientes con enfermedades adenoideas, donde la segunda causa de importancia eran antecedentes de sinusitis; además, estas bacterias tenían la capacidad de formar biofilm, siendo algunas de ellas *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescense*, *Pseudomonas putida* y *Enterobacter cloacae*.

Zhang y col. (2014), realizaron estudios en pacientes adultos con antecedentes de cirugías sinusales, encontrando que la mayoría de los cultivos eran polimicrobianos, siendo de gran importancia bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*), y otro bacilo gramnegativo como *Pseudomonas aeruginosa*. Por tanto, una terapia antibiótica postoperatoria inapropiada podría disminuir la mejora de la calidad de vida después de este tipo de cirugía.

Estudio de 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, todos los géneros identificados (*Klebsiella*, *Escherichia* y *Enterobacter*) son resistentes a las cefalosporinas de primera generación (cefalotina y cefadroxilo), a la ampicilina y la combinación amoxicilina/ácido clavulánico, aunque la cepa B11 (*Klebsiella oxytoca*) resultó sensible a este último y una de las dos cepas pertenecientes al género *Enterobacter* (B18) es sensible tanto a la ampicilina como al inhibidor de β -lactamasas. De las tres

cefalosporinas de tercera generación ensayadas, la más efectiva fue la ceftazidima. La mayoría de las cepas (16/17), son sensibles a la ciprofloxacina (fluoroquinolona), así como a la kanamicina y gentamicina, aunque con los aminoglucósidos la respuesta del microorganismo depende de la concentración del antimicrobiano empleado. La cepa B8, correspondiente a *Escherichia coli* fue resistente a todos los antibióticos en estudio.

Las *Enterobacteriaceae* son intrínsecamente resistentes a la clindamicina, daptomicina, ácido fusídico, glicopéptidos (vancomicina, teicoplanina), lipoglicopéptidos (oritavancina, telavancina), linezolid, tedizolid, quinupristina-dalfopristina, rifampicina y macrólidos (eritromicina, claritromicina y azitromicina). Actualmente, no ha sido descrita la resistencia intrínseca de la familia para las cefalosporinas de tercera generación, cefepima, aztreonam, ticarcilina-clavulanato, piperacilina-tazobactam y los carbapenemos (CLSI, 2017). En efecto, la prevalencia de cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) como *E. coli* y especies de *Klebsiella* resistentes a penicilina y cefalosporinas, está incrementando y se convierte en una mayor preocupación clínica. Esta resistencia es transmitida de forma horizontal mediante elementos genéticos móviles como los integrones, al transferir genes de resistencia como BLEE, genes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos y los genes 16S rRNA metilasa (Woldu, 2015).

En un estudio realizado en Iran, fueron halladas bacterias gramnegativas de importancia como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus* spp. y *Klebsiella* spp., donde el 80% de los aislamientos fueron resistentes a la ampicilina y amoxicilina en un 75%, semejante al presente trabajo y demostrando que el uso de estos antibióticos podría representar un fallo terapéutico. Por otra parte, los aminoglucósidos presentaron altos porcentajes de resistencia, mientras que en esta investigación como lo indica la Tabla 7, la sensibilidad a

la gentamicina fue del 88,2% (15/17 cepas aisladas) y 94% para ciprofloxacina, la cual fue similar en ambos estudios. Contrariamente, las cefalosporinas ensayadas presentaron un efecto disminuido respecto a los resultados de Pourmoussa y col. (2016).

Klebsiella spp. forma parte de la microbiota normal del intestino humano y de la cavidad oral, aunque los pacientes portadores de este género tienen un riesgo cuatro veces mayor de contraer infección frente al no portador (Pérez y Streitenberger, 2017). Las especies de *Klebsiella* se asocian a una serie de infecciones en seres humanos que incluyen neumonía, septicemia, meningitis, rinoscleroma, sinusitis-infecciones nasales (Breed y col., 1957), otitis, enteritis, apendicitis y colicistitis (Woldu, 2015); de las cuales *K. pneumoniae*, es la principal especie aislada, seguida de *K. oxytoca*.

Según CLSI (2017), *K. pneumoniae* posee resistencia intrínseca a la ampicilina y ticarcilina, ya que, como lo describen Pérez y Streitenberger (2017), *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* presentan resistencia natural a amino y carboxipenicilinas por producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). En el caso de *K. pneumoniae* se debe a una enzima cromosómica SHV-1, LEN u OKP (clase A de Ambler, grupo 2b de Karen Bush) que puede hiperproducirse por la adquisición de plásmidos, y en *K. oxytoca* se debe a enzimas del tipo K1 (OXY-1 Y OXY-2) que se hiperproducen por mutaciones en el gen que codifica esta β -lactamasa, e hidrolizan: aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina), ureidopenicilinas (piperacilina), carboxipenicilinas (ticarcilina), cefalosporinas de primera y segunda generación (excepto cefamicinas), de tercera y cuarta generación (excepto ceftazidima), pero no a carbapenemos. A pesar de estas afirmaciones, en la actualidad *K. pneumoniae* es una de las principales enterobacterias productoras de carbapenemasas de tipo KPC, lo que conlleva al incremento de la resistencia a los fármacos antimicrobianos y,

como consecuencia, un aumento sustancial de la enfermedad y la muerte (Sánchez y col., 2013). Con la prevalencia de bacterias productoras de BLEE, la resistencia a penicilinas y cefalosporinas está incrementando, y se convierte en una mayor preocupación clínica.

Los aislamientos más alarmantes en Nigeria, India y Dinamarca indican un 100% de resistencia a cefradina (cefalosporina de primera generación); 87,5% a cefaclor (cefalosporina de segunda generación), 84% a tobramicina; 82,5% a cefotaxima (cefalosporina de tercera generación) y 80,4% a norfloxacin; así como sensibilidad de 70-80% a moxifloxacin y gatifloxacin (quinolonas) respectivamente, teniendo afinidad con esta investigación donde todos los aislados de *K. pneumoniae* fueron resistentes a cefalosporinas de primera generación (cefalotina y cefadroxi), aunque con buena respuesta a cefalosporinas de tercera generación, especialmente a la ceftazidima y cefotaxima. Todas las cepas identificadas como *Klebsiella* (*Klebsiella pneumoniae* B1, B10, B25, B28 y *Klebsiella oxytoca* B11) fueron sensibles a la ciprofloxacina, y totalmente resistentes a la combinación amoxicilina/ácido clavulánico, contrario a estudios realizados por Woldu (2015), donde obtuvieron una sensibilidad de 87,5% a este último.

Otra enterobacteria de interés en el estudio de pacientes con sinusitis crónica, fue *Enterobacter aerogenes*. Desde finales del siglo XIX, se sucedieron numerosos estudios taxonómicos para ubicar cepas que producían grandes cantidades de gas y que dieron lugar al género *Aerobacter*, con *Aerobacter aerogenes* como principal especie. Luego en 1960, Hormaeche y Edwards propusieron un nuevo género "*Enterobacter*". Las principales especies que integran el género se encuentran como comensales en el medio ambiente, en fórmulas alimentarias, en la piel y en el tracto intestinal de humanos y animales. Las infecciones adquiridas en la comunidad incluyen: infecciones urinarias, de la piel y tejidos blandos, por tanto no se consideran agentes primarios causales de infecciones humanas,

sino nosocomiales y por eventos traumáticos, principalmente (Pérez y Streitenberger, 2017).

El CLSI (2017) contempla que *Enterobacter* puede desarrollar resistencia durante la terapia prolongada con cefalosporinas de tercera generación, como resultado de la desrepresión (proceso donde se activa la expresión de un gen o conjunto de genes que anteriormente había estado reprimida) de AmpC β -lactamasas. Por consiguiente, los aislamientos que son inicialmente susceptibles pueden volverse resistentes dentro de 3 a 4 días después del inicio de la terapia. Además, posee resistencia intrínseca a la ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, cefalosporinas de primera generación (cefazolin y cefalotina), cefamicinas (cefoxitin y cefotetan), cefalosporinas de segunda generación (cefuroxima). Para *Enterobacter* spp., la resistencia a cefoxitin es el mejor marcador de la presencia de esta β -lactamasa (Pérez y Streitenberger, 2017). Sin embargo, la cepa B18 en estudio, identificada como *Enterobacter aerogenes* mostró sensibilidad total frente a la ampicilina y combinación de amoxicilina/ácido clavulánico, mientras que B16 (perteneciente a la misma especie) fue completamente resistente en ambos casos (Tabla 7). Un estudio realizado en China (2014), encontró cepas de *Enterobacter aerogenes* en secreciones de las vías respiratorias, resistentes a carbapenemos, cefalosporinas y aminoglucósidos, debido a la producción de carbapenemasas de tipo KPC, pero sin resistencia alguna a la levofloxacina, dejándola como una posible opción terapéutica. Similar a este caso y como se describe en la Tabla 7, las cepas B16 y B18 fueron completamente sensibles a la ciprofloxacina, la cual pertenece al grupo de las quinolonas al igual que la levofloxacina, siendo este hallazgo consistente con la investigación de Shougang y col. (2014). No obstante, las cepas de *Enterobacter aerogenes* identificadas en este estudio fueron sensibles a la acción de la gentamicina y la kanamicina, tomando en cuenta que según Pérez y Streitenberger (2017), los aislamientos

productores de AmpC pueden ser sensibles a aminoglucósidos. Además, presentaron un comportamiento variable respecto a las cefalosporinas, teniendo: resistencia a las de primera generación como lo expresa el CLSI (2017). En cuanto a las de tercera generación; es la cepa B16 quien expresa mayor resistencia, al ser inhibida solamente por la ceftazidima, mientras que B18 tiene una respuesta positiva frente a los 3 representantes del grupo (ceftriaxona, ceftazidima y cefotaxima).

Finalmente, una de las especies bacterianas recuperada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos es *Escherichia coli*; involucrada en enfermedades infecciosas que afectan casi cualquier tejido y sistema orgánico humano (Koneman, 2006). Según Duarte (2016), la especie se encuentra en grandes concentraciones en la microflora intestinal de las personas y los animales; pero, en otras partes del cuerpo puede originar enfermedades graves como infecciones urinarias, bacteremia y meningitis. De igual modo, ha sido recuperada en casos de artritis séptica, abscesos intrabdominales, endocarditis, osteomielitis y sinusitis (Puerta y Rodríguez, 2010), siendo el patógeno causante de las tres cuartas partes de las bacteremias por bacilos gramnegativos en la comunidad; resaltando que las cepas productoras de BLEE son mayormente extrahospitalarias; sin embargo, hasta el presente año no se describe para *E. coli* la existencia de resistencia intrínseca a los antibióticos β -lactámicos (CLSI, 2017). No obstante, en la actualidad la mayoría de las cepas son resistentes a la ampicilina, siendo necesario el uso de aminoglucósidos y cefalosporinas de segunda y tercera generación, ya que la resistencia creciente a las quinolonas puede dificultar el futuro empleo de estos fármacos (Duarte, 2016).

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 % m/v), se encontró que la mayoría de las cepas (14/17) son resistentes a concentraciones mayores o iguales del 5% de NaCl (B1, B3, B8, B9, B10, B13, B16, B18, B20, B21, B22, B23, B25 y B28), pero sin exceder del 10%, a excepción de B10 y B13 que son resistentes a concentraciones mayores o iguales del 10% pero menores al 15% m/v (Tabla 8).

Las cepas identificadas como *E. coli* (B8, B9 y B23) fueron resistentes hasta concentraciones de 5% de sal, ya que 10% fue su concentración mínima inhibitoria, a excepción de B12 que solo resiste pequeñas cantidades de NaCl, iguales al 2,5% (Tabla 8). Estudios realizados sostienen que un promedio de 3-5% de NaCl puede generar cambios en el comportamiento de las bacterias, cuyos rangos de estudio fueron desde 0% (control) hasta 6% de NaCl. En el caso de *E. coli*, Gandhi y col. (2014), determinaron que concentraciones iguales o mayores al 2,5% de NaCl eran capaces de inhibir el crecimiento bacteriano; mientras que Bae y col. (2015), encontraron que un 3% de sal era capaz de inhibir el crecimiento de esta bacteria, aunque en presencia de ácidos orgánicos simples (ácidos: acético, propiónico y láctico), la sal tenía un efecto protector sobre el microorganismo. Ese mismo año, Davey y col., definen que concentraciones mayores al 5% de sal lograban que la bacteria tuviera una menor resistencia térmica, favoreciendo a su inhibición, pero sin eliminarla por completo.

Del género *Enterobacter*, se describen cambios debido al efecto de sales en las especies *E. cloacae* y *E. sakazakii*, pero no para la especie hallada en este trabajo, *E. aerogenes* (B16 y B18). Sobre la especie *E. sakazakii*, fue probada otra sal, el KCl (cloruro de potasio), investigando si al sustituir de forma parcial o total al NaCl, se podría obtener la misma actividad antimicrobiana, para lo cual se encontraron resultados positivos (Bidlas y col., 2008). Finalmente, y en el presente año (2017), Ramasamy y col., descubrieron que el uso de 5% de NaCl sobre la especie *E. cloacae* favorecía la formación de biofilm y con ello al incremento de su capacidad para degradar otros compuestos, con esto se descarta que la sal ocasione un efecto inhibitorio sobre el microorganismo, o al menos no para esas concentraciones, considerando que las cepas de este estudio (B16 y B18) fueron inhibidas a concentraciones del 10% m/v de NaCl.

Para el género *Klebsiella* no han sido descritos posibles cambios debido al efecto de sales pero, de acuerdo con las pruebas ensayadas la cepa con mayor resistencia (de las 11 identificadas), capaz de soportar concentraciones del 10% de NaCl, pertenece a la especie *K. pneumoniae* (B10). Simultáneamente, la cepa con mayor sensibilidad B11 (*K. oxytoca*) solo logró desarrollarse hasta una concentración máxima de 2,5%. Determinando así, que la concentración mínima inhibitoria de sal de este género (3/5 identificadas: B1, B25 y B28) es de 10% m/v.

En conclusión, no se describe aun una concentración óptima de sal que logre inhibir a los microorganismos pertenecientes a esta familia 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.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. Se aislaron bacilos gramnegativos aerobios, ubicados dentro de la familia *Enterobacteriaceae* según la morfología microscópica observada (bacterias en forma de bastón), prueba clave oxidasa negativa, fermentación de lactosa y glucosa positiva.
2. Las características macromorfológicas permitieron agrupar a las cepas aisladas de acuerdo con los rasgos similares, y posteriormente llevar a cabo el proceso de selección para la identificación microbiológica de 11 cepas.
3. Las especies identificadas fueron *Klebsiella pneumoniae* (4/11), *Escherichia coli* (4/11), *Enterobacter aerogenes* (2/11) y *Klebsiella oxytoca* (1/11).
4. Los microorganismos pertenecientes a las mismas especies tienen reacciones bioquímicas idénticas, pero pueden desarrollarse con características macromorfológicas distintas.
5. En los estudios de resistencia a antibióticos, todas las cepas fueron resistentes a las cefalosporinas de primera generación (cefalotín y cefadroxilo), y en su mayoría (10/11) a la ampicilina y amoxicilina/ácido clavulánico (9/11). En general son sensibles a cefalosporinas de tercera generación (principalmente ceftazidima seguida de cefotaxima), aminoglucósidos (gentamicina y kanamicina) y fluoroquinolonas (ciprofloxacina).

6. De las cepas identificadas, B8 (*E. coli*) fue resistente a todos los antibióticos ensayados; seguida de B1 (*K. pneumoniae*) y B23 (*E. coli*) que fueron resistentes a 6/10 antibióticos en estudio. En general, microorganismos pertenecientes a las mismas especies pueden tener diferentes comportamientos frente a los mismos fármacos antimicrobianos.
7. Se demostró la capacidad de inhibir el crecimiento de los microorganismos mediante el uso de sales (NaCl) a concentraciones superiores al 5% m/v; excepto la cepa B10 (*Klebsiella pneumoniae*) que fue resistente hasta 10% m/v.

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

- Amor, E. (2006). Práctica 5: Medios de cultivo. **Manual práctico de bacteriología general**. 1era Ed. (pp.63). Mérida: Publicaciones Vicerrectorado Académico.
- Arias, F. (2012). **El Proyecto de Investigación. Introducción a la Metodología Científica**. (pp: 23-64). Caracas: Episteme.
- Bachert, C., Hörmann, K., Mösges, R., Rasp, G., Riechelmann, H., Müller, R., Luckhaupt, H., Stuck, BA., Rudack, C. (2003). An update on the diagnosis and treatment of sinusitis and nasal polyposis. **ALLERGY**, **58**, (3): 176-91.
- Bae, Y y Lee, S. (2015). Combined effects of organic acids and salt depending on type of acids and pathogens in laboratory media and acidified pickle. **Journal of Applied Microbiology**, **119**, (2): 455-464.
- Bidas, E.y Lambert, R. (2008). Comparing the antimicrobial effectiveness of NaCl and KCl with a view to salt/sodium replacement. **International Journal of Food Microbiology**, **124**, (1): 98-102.
- Braun, S. (2003). Estudio microbiológico del tracto respiratorio superior. **Revista Chilena de Infectología**, **20**, (3): 193-198.
- Breed, R., Murray, E. y Smith, N. (1957) **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 7^{ma} Ed. (pp. 336). Baltimore: The Williams & Wilkins Company.
- Brito, A., Pérez, J., Andrade, E., Cerrada, O., Tovar, L., Guzmán, M., Carmona, O. y Grupo de Vigilancia de Resistencia Bacteriana a los Antimicrobianos en Venezuela. (2000). **Resistencia de Serratia marcescens a los antimicrobianos en Venezuela**. Caracas: Universidad Central de Venezuela.

- Chiu, N., Cohen, N., Lautenbach, E. (2014). *Culture-inappropriate antibiotic therapy decreases quality of life improvement after sinus surgery. International Forum Allergy Rhinology, 4*, (5): 403–410.
- Chow, A., Benninger, M., Brook, I., Brozek, J., Goldstein, E., Hicks, L., Pankey, G., Seleznick, M., Volturo, G. y Wald, E., File, T. (2012). IDSA clinical practice guideline for acute bacterial rhinosinusitis in children and adults. *Clinical Infectious Diseases, 54*, (8): 72-112.
- Davey, K. y Chandrakash, S. (2015). Modeling the effect of pH, sodium chloride and sodium pyrophosphate on the thermal resistance of *Escherichia coli* O157:7 in ground beef. *Food Research Internacional, 75*, pp. 11-12.
- Dekio, I., Hayashi, H., Sakamoto, M., Kitahara, M., Nishikawa, T., Suematsu, M. y Yoshimi, B. (2005). Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture independent molecular profiling. *Journal of Medical Microbiology, 54*, 1231–1238.
- Del Río, B., Mitsutoshi, F. y Zepeda, B. (2008). Rinitis, Sinusitis y Alergia. *Revista Alergia México, 56*, (6): 204-216.
- DeMuri, G. y Wald, E. (2012). Sinusitis. En Mandell, G., Bennet, J. y Dolin, R. (Eds.), *Enfermedades Infecciosas, Principios y Práctica 7^{ma}* Ed. (pp: 844). Barcelona: ELVESIER.
- Desrosiers, M., Evans, G., Keith, P., Wright, E., Kaplan, A., Bouchard, J., Ciavarella, A., Doyle, P., Javer, A., Leith, E., Mukherji, A., Schellenberg, R., Small, P. y, Witterick IJ. (2011). Canadian clinical practice guidelines for acute and chronic rhinosinusitis. *Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery, 40*, (2): 99-193.
- Duarte, A. (2016). Infecciones por *E.coli* y su perfil de resistencia en niños atedidos en el hospital infantil Manuel de Jesús Rivera “La Mascota” 1ero. Enero 2011-Diciembre 2015. Managua, Nicaragua.

- Forbes, B., Sahm, D., y Weissfeld, A. (2004). **Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico.** (pp: 98-155). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Gandhi, A., Cui, Y., Zhou, M. y Shah, N. (2014). Effect of KCl substitution on bacterial viability of *E. coli* (ATCC 25922) and selected probiotics. **Journal Dairy Science, 97**, (10): 5939-5951.
- García, J. A., García, J. E., Gobernado, M., y Mensa, J. (2003). Diagnóstico y tratamiento antimicrobiano de las sinusitis. **Revista Española de Quimioterapia, 16**, (2): 239-251.
- González, M., Algorta, G. (2013). Caracterización Fenotípica de cepas de *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) en pacientes pediátricos y sus perfiles de resistencia a aminoglucósidos, quinolonas y betalactámicos. Tesis de Grado. Universidad de la República. Montevideo.
- Hadley, J., Mösges, R., Desrosiers, M., Haverstock, D., Van Veenhuyzen, D., y Herman-Gnjidic, Z. (2010). Moxifloxacin five-day therapy versus placebo in acute bacterial rhinosinusitis. **Laryngoscope, 120**, (5): 1057-62.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2010). **Definición del alcance de la investigación a realizar: exploratoria, descriptiva, correlacional o explicativa.** En **Metodología de la investigación** (pp: 75). Chile: Mc Graw Hill.
- Hurtado J. (2010). **Diseño de Investigación. En el proyecto de investigación, comprensión holística de la metodología y la Investigación** (pp: 147-151). Bogotá-Caracas: Ediciones Quirón.
- Joss, T., M. Burke, C., Hudson, B., Darling, A., Forer, M., Alber D., Charles, I., y Stow, N. (2016). Bacterial communities vary between sinuses in chronic rhinosinusitis patients. **Frontiers in Microbiology, 6**.

- Kaur, R., Adlowitz, D., Casey, J., Zen, M., Pichichero, M. y Swain, R. (2004). The microbiology and antimicrobial resistance patterns in chronic rhinosinusitis. ***American Journal of Otolaryngology***, **25**, (5): 323-8.
- Kennedy, D. W. (1994). **Sinus disease: Guide to first line management. Health Communication** (pp: 10-15). USA: Connecticut.
- Koneman, E, Allen, S, Jandon, W., Schreckberger, P.y Winn, W. (1999). **Diagnóstico Microbiológico**. 5ta Ed. (pp.178). Argentina: Medica Panamericana.
- Koneman, E., Allen, S., Schreckenberger, P. y Winn, J. (1999). **Diagnóstico Microbiológico**. 5ta Ed. (pp: 1151). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G., Allen, S., Janda, W. (2006). **Diagnóstico microbiológico**. 6ta Ed. (pp. 206, 207, 225, 226, 227). Madrid: Medica Panamericana.
- Longa, A. y Ramírez, C. (2006). Práctica 10: Metabolismo de proteínas. **Manual práctico de bacteriología general**. 1^{era} Ed. (pp. 116,117.) Mérida: Publicaciones Vicerrectorado Académico.
- López, C., Vida, E., Rivero, A., Torre, J. (2010). **Infecciones por bacilos gramnegativos no fermentadores (I): Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter sp., Serratia marcescens y otros**. Unidad de Gestión Clínico de Enfermedades Infecciosas. Córdoba: Hospital Universitario Reina Sofía.
- Martínez, M. B., Torralba, M. y Rodríguez, M. (2010). **Protocolo diagnóstico y terapéutico de la sinusitis aguda**. (pp 3870). Madrid: Universidad de Alcalá de Henares.
- Millar, B., Xu, J. y Moore, J. (2007). Molecular Diagnostics of Medically Important Bacterial Infections. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, **9**, (1): 21-39.

- Molina, J. y Esclava, C. (2017). *Escherichia coli* diarrogénica. Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>
- Montiel F. y Lamm, M. (2001). **Manual de microbiología clínica**. Chile Técnicas Mediterráneo. pp. 244, 245, 253.
- Montovani, K., Bisanha, A., Cassiano, R., Tamashiro, E., Martinez, R., Terezinha, W. y Lima, A. (2010). Maxillary Sinuses Microbiology From Patients With Chronic Rhinosinusitis. ***Brazilian Journal of Otorhinolaryngology***, **76**, (5): 548-551.
- Mora, M. (1998). *Moraxella catarrhalis* en tracto respiratorio inferior. ***Revista Costarricense de Ciencias Médicas***, **19**, (3-4): 1-5.
- Ossa, G. (2013). **INFECCIONES POR BACILOS GRAM NEGATIVOS**. Temuco: Universidad de la Frontera. Unidad de infectología.
- Parella S., Martins F. (2010). **La Metodología o Marco Metodológico. En Metodología de la Investigación Cuantitativa** (pp: 125-140). Venezuela: FEDUPEL.
- Pérez, E. (2014). **Métodos Convencionales y Moleculares para la Identificación de Microorganismos** [Material de clases]. Biología Molecular. Universidad de Los Andes, Mérida: Venezuela.
- Perez, M., Alvarado, J., Acosta, L., Bastidas, Y., Garcia, A., Arrieta, N., y Lucich (2013). Bacterias formadoras de biofilm en tejido adenoideo con infecciones del tracto respiratorio superior. ***Acta Otorrinolaringológica***, **28**, (3): 34-47.
- Pérez, S. y Streitenberger, E. (2017). **MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA**. Capítulo II: Enterobacterias. Volumen 1. (pp.114, 115, 126, 132, 138, 140).

- Picazo, J. y Prieto, J. (2016) *Capítulo 2: taxonomía y morfología. Compendio de microbiología*. 2^{da} Ed. (pp. 17). Madrid: ELSEVIER.
- Pillet, S., Lardeux, M., Grattard, F., Verhoeven, P., Le Goff, J., Vabret, A. y Pozzetto, B. (2013). Comparative Evaluation of Six Commercialized Multiplex PCR Kits for the Diagnosis of Respiratory Infections. **PLOS ONE**, **8**, (8): 1-9.
- Poch, J., Pérez, M., Iglesias, M. C., Saiz, A. Rodríguez, F. & Arrazola, J. (2005). **Otorrinolaringología y Patología Cervicofacial**. (pp: 183). Madrid: Médica Panamericana.
- Pourmousa, R., Dadashzadeh. R., Ahangarkani, F. y Rezai, M. (2016). Frequency of bacterial agents of isolated from patients with chronic sinusitis in Northern Iran. **Global Journal of Health Science**, **8**, (5).
- Prats, G. (2005). **Microbiología clínica**. (pp. 35,40). Madrid: Médica Panamericana.
- Puerta, A., Mateos, F. (2010). Enterobacterias. **Medicine**, **10**, (51): 3426-3431.
- Ramasamy, S., Arumugan, A. y Chandra, P. (2017). Optimization of Enterobacter cloacae for diesel oil degradation using Response Surface Methodology (RSM). **Journal of Microbiology**, **55**, (2): 104-111.
- Ramírez, A. (2006). *Práctica 11: Otras reacciones metabólicas útiles para la identificación bacteriana. Manual práctico de bacteriología general*. 1^{era} Ed. (pp 104,135). Mérida: Publicaciones Vicerrectorado Académico.
- Revai, K., Dobbs, LA., Nair, S., Patel, JA., Grady, JJ., Chonmaitree, T. (2007). Incidence of acute otitis media and sinusitis complicating upper respiratory tract infection: the effect of age. **PEDIATRICS**. **119**, (6): 1408-1412.

- Río, B., Mitsutoshi, F. & Zepeda, B. (2009). Rinitis, sinusitis y alergia. **Revista Alergia México, 56**, (6): 204-16.
- Rodríguez, E. (2008). **Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio**. (pp. 63-75). Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Sadegh, M., Pourmousa, R., Dadashzadeh, R., Ahangarkani, F. (2016). Multidrug resistance pattern of bacterial agents isolated from patient with chronic sinusitis. **Caspian J Intern Med, 7**, (2):114-119.
- Sambrook, J. y Russell, D. (2001). **Molecular Cloning**. Volumen 3. 3^{era} Ed. New York: CSHL PRESS
- Sánchez, G., Master, R., Clark, R., Fyyaz, M., Duvvuri, P., Ekta, G. y Jose Bordon, J. (2013) *Klebsiella pneumoniae* Antimicrobial Drug Resistance, United States, 1998–2010. **Emerging Infectious Diseases, 19**, (1): 133–136.
- Shougang K., Haifeng, S., Lihua H., Hao P., Zhonghua, L., Weiping, W., y Jun, L. (2014). KPC-2 carbapenemase and DHA-1 AmpC determinants carried on the same plasmid in *Enterobacter aerogenes*. **Journal of Medical Microbiology 63**, pp. 367-370.
- Speers, D. (2006). Clinical Applications of Molecular Biology for Infectious Diseases. **Clinical and Biochemical Review, 27**, 39-51.
- The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2017). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27^{va} Ed. Volumen 37. (pp. 33, 210).
- Torralba, M., Laínez, S., Pereira, J, y Rodríguez, M. (2006). Protocolo Diagnóstico y Terapéutico de la Sinusitis Aguda. **PROTOCOLOS DE PRÁCTICA ASISTENCIAL, 9**, (53): 3489-349.
- Turner, S., Pryer, K., Miao, V. y Palmer, J. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **The Journal of Eukariot Microbial, 46**, (4): 327-38.

- Van Buchen, F., Knottnerus, J., Schrinemaekers, V. y Peeters, M. (1997). Primary-care-based randomised placebo controlled trial of antibiotic treatment in acute maxillary sinusitis. **Lancet**, **349**, (9053): 683-687.
- Verduin, C., Hol, C., FLeer, A., Van Dijk, H. y Van Belkum, A. (2002). *Moraxella catarrhalis*: from Emerging to Established Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, **15**, (1): 125-144.
- Wang, D., Wardani, R., Singh, K., Thanaviratananich, S., Vicente, G., Xu, G., Zia, M., Gulati, A., Fang, S., Shi, L., Chan, Y., Price, D., Lund, V., Mullool, J. y Fokkens, W. (2011). A survey on the management of acute rhinosinusitis among Asian physicians. **Rhinology**, **49**, (3): 264-271.
- Woldu, M. (2015). *Klebsiella pneumoniae* and its growing concern in healthcare settings. **Clinical Experimental Pharmacology**, **5**, (6).
- Zhang, Z., Palmer, J., Morales, K., Howland, T., Doghramji y L., Adappa. (2014). Culture-inappropriate antibiotic therapy decreases quality of life improvement after sinus surge. **International Forum Allergy Rhinology**, **4**, (5): 403–410.

ANEXOS

Anexo 1

Medio rico de mantenimiento

Agar Luria-Bertani Duro (LBD)

Fórmula: **(2L)**.

Extracto de carne 20g, Levadura 10g, Cloruro de sodio 20g, Agar 36g, Agua destilada hasta completar el volumen final.

www.bdigital.ula.ve

Anexo 2

Medios usados en la identificación microbiológica

Agar MacConkey (MK)

Formula: **(1L)**.

Lactosa 10g, Peptona 3g, Sales Biliares 1,5g; Peptona de Gelatina 17g, Rojo Neutro 0,03g; Sodio Cloruro 5g, Cristal violeta 0,001g; Agar 13,5g, Agua destilada (pH final: 7,1 ±0,2).

TIPO	SUSTRATO	INDICADOR			REACCION FISIOLÓGICA	INOCULACION
Diferencial	1. Glucosa 2. Lactosa 3. Tiosulfato de sodio	1.Rojo fenol:			-Fermentación de glucosa, lactosa	Punción y estría
		pH ácido	pH neutro	pH alcalino		
		AMARILLO (pH≤6,8)	ROJO	FUCSIA (pH≥8,4)	-Producción de H ₂ S	
		2.Sulfato ferroso: Precipitado negro insoluble				

(Amor, 2006).

Agar Kligler (KIA)

Formula: **(1L)**.

Extracto de carne 3g, Extracto de levadura 3g, Peptona 15g, Proteosa peptona 5g, Lactosa 10g, Glucosa 1g, Sulfato ferroso 0,2g, Cloruro de sodio 5g, Tiosulfato de sodio 0,3g; Agar 12g, Rojo Fenol 0,024g; Aguar destilada 1L (pH final 7,4).

TIPO	SUSTRATO	INDICADOR			INHIBIDOR	REACCION FISIOLÓGICA	INOCULACION
Selectivo diferencial	Lactosa	Rojo neutro			-Sales Bilis (0.15%) -Cristal violeta	Fermentación de la lactosa	Estría en superficie
		pH ácido	pH neutro	pH alcalino			
		ROSA ROJO (pH≤6,8)	ROJO	AMARILLO (pH≥8,0)			

(Koneman, 1999).

H₂S: ácido sulfhídrico.

Agar Lisina Hierro (LIA)

Formula: **(1L)**.

Peptona de carne 5g, Tiosulfato de sodio 0,04g; Citrato férrico (III) amonio 0,5g; Extracto de levadura 3g, D(+) glucosa 1g, Purpura de Bromocresol 0,02g; L-lisina monohidroclo 10g, Agar 12,5 g, Agua destilada 1L (pH final 6,7 ± 0,1).

TIPO	SUSTRATO	INDICADOR			REACCION FISIOLÓGICA	INOCULACION
Diferencial	1.Lisina 2.Tiosulfato de sodio	1.Purpura de bromocresol:			-Desaminación/ Descarboxilación de la Lisina. -Producción de H ₂ S	Punción y estría
		pH ácido	pH neutro	pH alcalino		
		AMARILLO (pH≤5,2)	PURPURA	PURPURA (pH≥7,0)		
		2.Sulfato de hierro y amonio: Precipitado negro insoluble.				

(Montiel y Lam, 2001).

H₂S: ácido sulfhídrico.

Medio Motilidad Indol Ornitina (MIO)

Formula: **(1L)**.

Extracto de levadura 3g, L-ornitina clorhidrato 5g, Peptona 10g, Dextrosa 1g, Triptona 10g, Agar 2g, Purpura de bromocresol 0,02g; Agua destilada 1L (pH final $6,5 \pm 0,2$).

TIPO	SUSTRATO	INDICADOR			REACCION FISIOLÓGICA	INOCULACION
Diferencial	1.Ornitina 2.Triptofano	Purpura de bromocresol			-Descarboxilación de la ornitina -Producción de indol -Motilidad	Punción
		pH ácido	pH neutro	pH alcalino		
		AMARILLO (pH≤5,2)	PURPURA	PURPURA (pH≥7,0)		

(Montiel y Lam, 2001).

Agar Citrato de Simons

www.bdigital.ula.ve

Formula: **(1L)**.

Cloruro de sodio 5g, Fosfato dipotásico 1g, Citrato de sodio 2g, Sulfato de magnesio 0,2g; Agar 15g, Azul de bromotimol 0,08g; Agua destilada 1L (pH final 6,9).

TIPO	SUSTRATO	INDICADOR			REACCION FISIOLÓGICA	INOCULACION
Diferencial	Citrato de sodio	Azul de bromotimol			-Uso del citrato como fuente de carbono	Estría
		pH ácido	pH neutro	pH alcalino		
		AMARILLO (pH≤6,0)	VERDE	AZUL (pH≥7,6)		

(Montiel y Lam, 2001).

Medio base O/F de Hugh Leifson

Formula: **(1L)**.

Extracto de levadura 1g, Peptona de caseína 2g, Cloruro de sodio 5g, Agar 2,5g; Fosfato de hidrogeno dipotásico 0,2g; Azul de bromotimol 0,08g; Agua destilada 1L (pH final 7,3).

SUSTRATO	INDICADOR			REACCION FISIOLÓGICA	INOCULACION
Carbohidratos (glucosa)	Azul de bromotimol			-Fermentación u oxidación de carbohidratos.	Punción.
	pH ácido	pH neutro	pH alcalino		
	AMARILLO (pH≤6,0)	VERDE	AZUL (pH≥7,6)		

(Montiel y Lam, 2001).

Anexo 3

Métodos usados en la identificación molecular

Aislamiento de ADN genómico

A partir de un volumen de 1,5 mL de cultivo saturado de bacterias, se centrifugó a 13.000 rpm por 5 minutos y con ayuda del vórtex, se resuspendió el sedimento con 200 µl de amortiguador de lisis. Se añadieron 66 µl de NaCl al 5 M, se mezcló y calentó por 10 minutos a 65°C para eliminar la mayor cantidad de proteínas y detritus celular. Se centrifugó por 10 minutos (13.000 rpm) y se transfirió el sobrenadante a un microtubo nuevo donde se añadió 1 volumen de cloroformo, mezclando de forma gentil hasta obtener una solución blanquizca. Luego se centrifugó a la misma velocidad por 3 minutos, y se transfirió el sobrenadante a un microtubo nuevo, al cual se le añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto (100%) para precipitar el ADN. Se dejó reposar por 15 minutos para volver a centrifugar y

luego descartar el sobrenadante y añadir 500 µl de etanol al 70% para lavar el ADN y centrifugar por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió con 50 µl de agua estéril (Sambrook y Russell, 2001).

En la Figura 1 se puede observar una banda por encima de los 10 Kb, correspondiente al ADN genómico de cada cepa. Además, se presentan las bandas características del ARN ribosomal (entre 1500 y 750 pb), las cuales son típicas de cualquier aislamiento de ADN genómico.

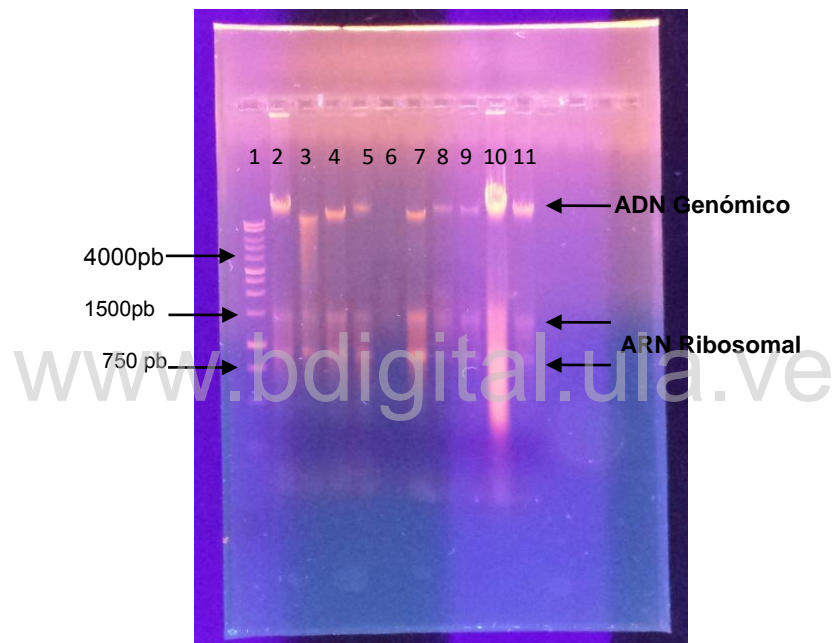


Figura 1. Aislamiento de ADN genómico. 1) 1 kb DNA ladder, 2) cepa B1, 3) cepa B3, 4) cepa B8, 5) cepa B9, 6) cepa B10, 7) cepa B11, 8) cepa B13, 9) cepa B14, 10) cepa B16, 11) cepa B18.

PCR ADN_r 16S

La amplificación del fragmento del gen que codifica para el ADN_r 16S, se inició con la preparación de los primers (cebadores) universales: 27F (5'AGAGTTTGATC CTGGCTCAG3') y 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') (Turner y col., 1999; Dekio y col., 2005),

con diluciones 1:10 para cada uno (1 μ l de primer + 9 μ l de agua estéril), utilizando (2) tubos eppendorf con capacidad de 0,5 mL. A partir de allí, se procedió a realizar una segunda dilución 1:6 (1 μ l de la dilución anterior (1:10) + 5 μ l de agua estéril). Del ADN bacteriano previamente obtenido, se realizaron diluciones dependiendo de su concentración. Luego, se preparó la reacción con: Go Taq Green Master Mix (10 μ l); 0,3 μ l de cada uno de los primers (previamente diluidos) y 5,4 μ l de agua estéril, para un total de 16 μ l, a la cual se agregaron 4 μ l de las diluciones del ADN y 15 μ l de aceite mineral. Las amplificaciones por PCR se realizaron en un Termociclador Applied Biosystems 2720 con el programa (16S51) siguiente: lisis bacteriana y desnaturalización a 95°C por 10 min, seguida por 30 ciclos de 94°C por 45 seg, 51°C por 45 seg y 72°C por 1.5 min por ciclo, y un paso de extensión final por 10min a 72°C (Dekio y col. 2005).

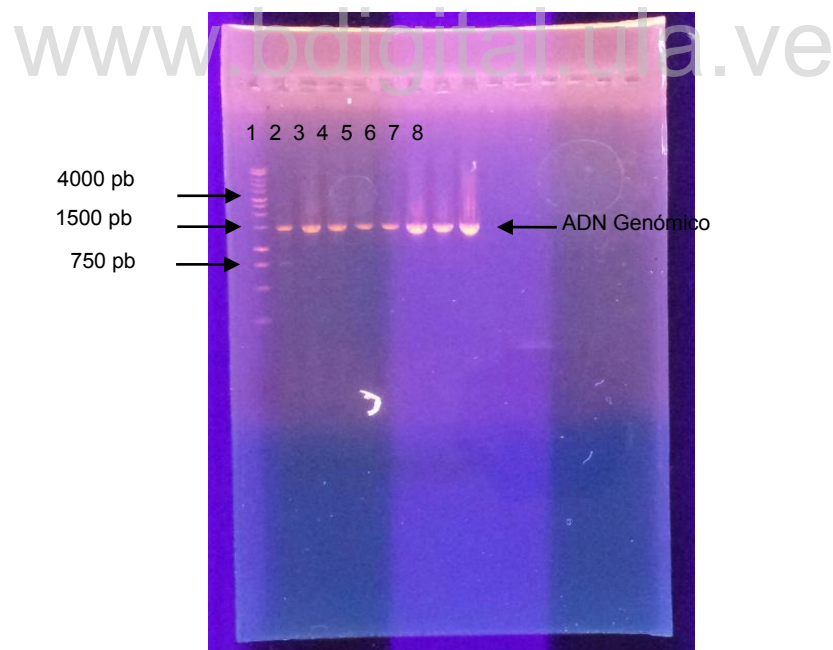


Figura 2. Amplificación de los fragmentos de ADN genómico. 1) 1 kb DNA ladder, 2) cepa B3, 3) cepa B8, 4) cepa B10, 5) cepa B11, 6) cepa B13, 7) cepa B16, 8) cepa B20.

Como se observa en la Figura 2, fueron obtenidos los fragmentos esperados de aproximadamente 1500 pb, correspondientes al fragmento del gen que codifica para el ADNr 16S.

Purificación con sales de fragmentos amplificados

Según protocolo de Sambrook y Russell (2001), luego de emplear 3 μ l para su visualización en el gel de agarosa, se completó hasta 100 μ l con agua destilada estéril y se agregó 1 volumen (100 μ l) de acetato de potasio (10 M) y 2,5 (250 μ l) volúmenes de etanol absoluto (100%v/v). Fue necesario dejar precipitar la mezcla por 10 minutos, y posteriormente centrifugar por 10 minutos a 13.000 rpm; se descartó el sobrenadante y llevó la pastilla de ADN a 1 mL de etanol al 70%v/v dos veces, centrifugando por 10 minutos y luego por 5 minutos. Se procedió a secar el sedimento (pellet), a temperatura ambiente para finalmente resuspenderlo en 11 μ l de agua destilada estéril. Es necesario verificar la presencia y calidad del ADN purificado y resuspendido en un gel de agarosa al 0,8% con 3 μ l de bromuro de etidio. Se cargó 1 μ l del producto purificado luego de combinarlo con 1 μ l de buffer de carga 6 X (Promega, Cat. G190A) y 4 μ l de agua estéril.

En la Figura 3, se observan los fragmentos de ADN genómico posterior al proceso de purificación, sin la presencia de cebadores ni proteínas.

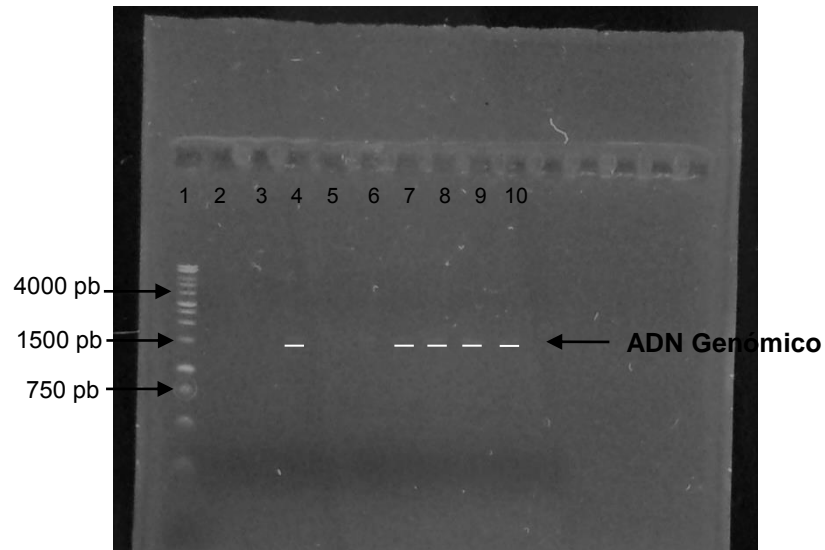


Figura 3. Purificación con sales de los fragmentos amplificados. 1) 1 kb DNA ladder, 2) cepa B1, 3) cepa B3, 3) cepa B8, 4) cepa B9, 5) cepa B10, 6) cepa B11, 7) cepa B13, 8) cepa B14, 9) cepa B16.

www.bdigital.ula.ve