



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTA
Noviembre de 2018



***CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS
DEL BANCO DE CEPAS DE LA UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE
CUNDINAMARCA***

YURY HASBLEIDY MENDEZ DIMATE

**LIGIA CONSUELO SÁNCHEZ LEAL M.Sc.
Asesor Interno**

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

Noviembre de 2018

DEDICATORIA

En primera instancia quiero dedicar esta tesis a Dios por permitirme llevar a cabo de su mano este proyecto, por guiarme y darme las herramientas como persona y profesional para enfrentar este nuevo reto y culminar con éxito.

A mi madre, familia y amigos por el apoyo incondicional, por su compañía, su amor, su paciencia y su buena energía.

A el amor que es el pilar y la esperanza que me acompaño a recorrer este camino, siendo la receta perfecta y enseñándome que lo que se hace con amor trasciende.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los formadores que hicieron parte de esta etapa, quienes con sabiduría y esfuerzo han contribuido grandemente a mi formación como profesional y a quienes guardo mucha admiración. A las maestras Ligia Consuelo Sánchez y Martha Lucia Posada, de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, que han confiado, abriéndome las puertas del cepario, siendo siempre una guía constante, y con quienes llevamos de la mano de Dios el desarrollo de este proyecto.

A la Universidad colegio mayor de Cundinamarca por enriquecer mi vida en muchos ámbitos, permitiéndome ser partícipe de esta nueva investigación, enriqueciendo mis conocimientos y permitiéndome hacer uso de sus instalaciones, insumos y profesionales calificados.

A mi familia, amigos y amor que sin ustedes las cosas no hubiesen sido igual, regalándole ese sabor dulce a este éxito. Gracias.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	- 3 -
OBJETIVOS	- 5 -
Objetivo general.....	- 5 -
Objetivos específicos.....	- 5 -
1. ANTECEDENTES	- 6 -
2. MARCO REFERENCIAL	- 11 -
2.1. Colecciones biológicas	- 11 -
2.2. Generalidades de las bacterias Gram positivas en estudio.....	- 11 -
2.2.1. Cocos Gram positivos	- 13 -
<i>Staphylococcus spp.</i>	- 13 -
<i>Streptococcus spp.</i>	- 14 -
<i>Enterococcus spp.</i>	- 16 -
<i>Identificación bioquímica de Staphylococcus spp</i>	- 18 -
<i>Identificación bioquímica de Streptococcus spp.</i>	- 19 -
2.2.2. Bacilos Gram positivos	- 20 -
<i>Listeria spp.</i>	- 21 -
<i>Corynebacterium spp.</i>	- 22 -
<i>Bacillus spp.</i>	- 22 -
<i>Características bacilos Gram positivos(Corynebacterium, Listeria, Bacillus)</i> -	23 -
<i>Identificación bioquímica de Listeria, Corynebacterium y Bacillus.</i>	- 23 -
2.3. Sistema BBL CRYSTAL para Gram Positivos	- 24 -
2.4. Identificación molecular de bacterias Gram positivas	- 24 -
2.4.1. Estructura molecular de las bacterias	- 24 -
2.4.2. ARN 16S.....	- 25 -

2.4.3. Etapas de identificación bacteriana	- 25 -
2.4.4. Secuenciación del DNA mediante el método de Sanger	- 26 -
3. DISEÑO METODOLÓGICO	- 27 -
3.1. Tipo de investigación	- 27 -
3.2. Universo, población, muestra.....	- 27 -
3.3. Hipótesis, variables, indicadores Hipótesis	- 27 -
3.4. Técnicas y procedimientos	- 28 -
4. RESULTADOS	- 36 -
5. DISCUSIÓN.....	55
6. CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFIA.....	62
ANEXOS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura de la pared celular de la bacteria Gram positiva. (22) - 11 -
- Figura 2.** Esquema general que representa el corte transversal de una célula bacteriana. (22) - 12 -
- Figura 3.** Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S. (22) - 25 -
- Figura 4.** Secuenciación del DNA mediante el método de Sanger o de los terminadores de cadena. (22) - 26 -
- Figura 5.** Rango del marcador Hyperlander II - 33 -
- Figura 6.** Programa Chromas, representa electroferogramas de las secuencias bacterianas. Autora Méndez Yury, 2018 - 35 -
- Figura 7.** Características microscópicas y macroscópicas de las bacterias Gram positivas del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca Autora. Mendez 2018. - 42 -
- Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% a partir de cultivos bacterianos. Autora Méndez, 2018 49
- Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% a partir de cultivos bacterianos (2) Autora Méndez, 2018 50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación de <i>Streptococcus</i> y <i>Enterococcus</i> según	- 17 -
Tabla 2. Pruebas de Identificación para <i>Staphylococcus</i>	- 18 -
Tabla 3. Pruebas de Identificación para <i>Streptococcus</i> y <i>Enterococcus</i>	- 20 -
Tabla 4. Master Mix para llevar a cabo la PCR	- 32 -
Tabla 5. Porcentaje de identificación de sistema BBL Crystal 19	- 43 -
Tabla 6. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas en tubo a las cepas indeterminadas en el estudio.	46
Tabla 7. Comparación de las bacterias Gram Positivas reconfirmadas por BBL Crystal y secuenciadas, editadas, comparadas y confirmadas con BBL Crystal y BLAST.	52



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

***CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS DEL
BANCO DE CEPAS DE LA UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE
CUNDINAMARCA***

RESUMEN

Actualmente en el cepario la caracterización de las bacterias Gram positivas, se ha llevado a cabo solo por pruebas bioquímicas y microbiológicas, por lo cual el objetivo de este proyecto fue caracterizar a nivel molecular las bacterias Gram positivas del banco de cepas de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, utilizando técnicas moleculares. La metodología incluyó la evaluación de las características fenotípicas de las cepas Gram positivas, e identificación bioquímica. Se obtuvo ADN total con el kit “QUICK-DNA™ Universal Kit – DE ZYMO RESEARCH” Fluidos biológicos y protocolo celular. La amplificación con PCR del producto se evaluó por electroforesis en gel de agarosa 2% con buffer TAE 1X. Los productos obtenidos fueron secuenciados con los primers 16S-8F y 16S-1492R. Los resultados se editaron en el programa Chromas 2.6.5, y se compararon con las que se encuentran en las bases de datos del GenBank del NCBI (USA) con un porcentaje de identidad igual o mayor al 97%. A partir de los resultados se

identificaron 7 bacterias Gram positivas, que concuerdan con los datos fenotípicos del cepario y 3 bacterias que presentaron resultados erráticos (<60pb). Con base a los resultados obtenidos, el presente proyecto fortalece el Banco de cepas de la UCMC, posibilitando la participación en diferentes investigaciones u otros escenarios, incidiendo en el reconocimiento de otras universidades e instituciones, con el fin de generar espacios para consolidarla económicamente. Con estos resultados se pretende, registrar las cepas caracterizadas ante el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos “Alexander von Humboldt”.

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

Estudiante Yury Hasbleidy Mendez Dimate

Docentes Ligia Consuelo Sánchez Leal

Fecha 2018 – II
UCMC

Institución

INTRODUCCIÓN

Hasta hace dos años, en el cepario del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, la identificación de las bacterias Gram positivas se ha llevado a cabo por pruebas microbiológicas basada en la capacidad enzimática. Este método se basa en la identificación de características fenotípicas de las bacterias, microscópicas y macroscópicas, cultivos, pruebas bioquímicas y pruebas basadas en resistencia a ciertas sustancias. El requisito para realizar estas pruebas es el crecimiento en medios de cultivo, que es una técnica *in vitro*.

11

Para la caracterización genotípica, se necesita ARN ribosómico 16S (rRNA) y secuenciación de genes, que le brindan especificidad, lo cual es una gran ventaja a la identificación de microorganismos. Los métodos como el análisis de los ARNr 16S, se han utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en la visión de la evolución y como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana. En este sentido, la identificación bacteriana proporcionada por el análisis del ARNr 16S es más certera, sólida y reproducible que los análisis fenotípicos, autenticando aproximadamente el 90% de las identificaciones.^{1,10.}

La colección microbiológica, la cual permite identificar la variabilidad de las especies, debe contar con el registro que la valida frente al Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humboldt". Sin este requisito, no se puede ofrecer el servicio, ni intercambiar cepas con otras colecciones biológicas nacionales o internacionales. Adicionalmente, tampoco pueden recibirse en colección, si algún grupo de investigación lo requiere.

Las cepas bacterianas no cuentan con la caracterización molecular, por lo

cual se hace necesario realizar el procedimiento para llevarla a cabo y hacer el registro, esta caracterización molecular complementara la identificación fenotípica que ya tienen las cepas de la Colección de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Por lo tanto, es absolutamente necesario realizar esta tipificación para que el Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, la Facultad de Ciencias de la Salud y la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca se beneficien y se visibilicen en el ámbito académico e investigativo. Es importante como los microorganismos, en este caso las bacterias Gram positivas, se convierten en un recurso de apoyo educativo y de investigación. Por otra parte, el beneficio sería también económico por cuanto ofertar e intercambiar cepas generaría recursos frescos.

En este proyecto se trabajó con la colección de microorganismos de la UCMC, específicamente con 19 bacterias Gram positivas. Las fases del desarrollo del proyecto comprendieron: la confirmación de las características microscópicas utilizando la Coloración de Gram, macroscópicas con el cultivo de los microorganismos usando el agar sangre y metabólicas, mediante el montaje de pruebas rápidas BBL Crystal y técnica tradicional con tubo. La identificación genética de 7 de estas bacterias se hizo mediante técnicas moleculares, usando el gen 16S rRNA, por medio de extracción de ADN con el kit Zymo Research Quick-DNA universal, posterior amplificación del producto de la extracción mediante PCR convencional y su evaluación por electroforesis en gel de agarosa al 2% con Buffer TAE 1X, para finalmente secuenciar el producto de PCR, con la técnica de Sanger, editando su secuencia con el programa Chromas Lite y comparándola con el GenBank con el algoritmo BLASTn.

Finalmente, el estudio definió las características genéticas que permitieron identificar las cepas entre especie y género.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar las bacterias Gram positivas del banco de cepas de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, para fortalecer la Colección de Microorganismos, utilizando técnicas moleculares.

Objetivos específicos

- Validar las características fenotípicas de las cepas Gram positivas de la colección de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, utilizando identificación bioquímica.
- Confirmar mediante técnicas moleculares los géneros y especies de los microorganismos en estudio, pertenecientes a la colección de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Generar, el registro de las cepas evaluadas en este estudio teniendo en cuenta las recomendaciones de la normatividad, con el fin de contribuir al proceso de presentación de la colección biológica de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

1. ANTECEDENTES

Woese en 1977 a partir de sus análisis filogenéticos, introdujo el término dominio para sustituir al reino como categoría taxonómica de rango superior y distribuyó a los organismos celulares en tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya, el último de los cuales engloba a todos los seres eucariotas. Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S se han utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana, provocando de esta manera que ARN ribosómico (ARNr) 16S sea la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas.¹

A finales de 1980, pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) presentaban lesiones que contenían invariablemente grupos de bacilos pleomórficos denominándose Angiomatosis bacilar. Fue en este caso, cuando se utilizó por primera vez el ADNr 16S para la identificación, independiente de cultivo, de un agente patógeno.¹ Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.²

C. Appelbaum en 1984, realizó pruebas rápidas con el sistema Rapid Strep (API System S.A., Montalieu-Vercieu, Franciaantes, el cual les permitió identificar el perfil bioquímico de los microorganismos sin pruebas adicionales, en este estudio identificaron 209 estreptococos entre estos β -Hemolíticos, del grupo D, *S. pneumoniae* y del grupo viridans. Durante todo el proceso verificaron la pureza mediante tinción de Gram y morfología

colonial. El estudio demostró que las tasas de identificación de organismos β -hemolíticos y del grupo D por este sistema Rapid Strep son comparables a los informado con otros sistemas, igualmente con excelente identificación, se observaron las tasas de los grupos A, B y D, pero el serogrupo fue necesario diferenciar entre los grupos C y G. Los resultados insatisfactorios con *S. pneumoniae* en este estudio pueden explicarse la preparación de suspensiones para el sistema, según lo recomendado inicialmente debieron ser mayores.³

El ácido ribonucleico ribosomal 16S (ARNr 16S), originalmente propuesto por Pace et al. (1986), fue presentado como una buena opción para la clasificación de bacterias. Desde el descubrimiento de PCR y secuenciación de ADN, la comparación de las secuencias de genes de especies bacterianas mostró que el gen 16S rRNA es altamente conservadas dentro de una especie y entre especies del mismo género, y por lo tanto puede ser utilizado como el nuevo “patrón oro” para identificación de las bacterias a nivel de especie.

C. Knapp en 1994, evaluó el sistema de identificación BBL Crystal (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Maryland) por su precisión en la identificación de la resistencia a oxacilina para *S. aureus* y por primera vez utilizado en *S. epidermidis*, los resultados se observaron entre las 2, 4 y 6 h en incubación a 35°C. Preparando un inóculo para la prueba de ID MRSA suspendiendo varias colonias de cada aislado en solución salina y llevando aproximadamente 0.5ml a la placa. La identificación precisa de la resistencia a la metilicina en estafilococos es de considerable importancia clínica, se demostró que la utilidad final del sistema de identificación MRSA dependerá de una comparación de su precisión con otras metodologías para esta prueba, sin embargo, la identificación coincidió teniendo una variabilidad con esta prueba que, debido a los tiempos de respuesta, y en coste relativo es conveniente.⁴

H. Baum en 1998, evaluó el rendimiento de un nuevo sistema comercial para la identificación de los diferentes grupos de cocos grampositivos [de BBL Crystal Gram-positiva (GP) Sistema de identificación; en comparación con dos sistemas comerciales utilizados en ese entonces, la Staph API y el API Strep (bioMérieux Diagnostic, Alemania). Se analizaron un total de 191 cepas de siete géneros Gram positivas diferentes que comprenden 32 especies diferentes. Para el sistema de BBL Crystal GP, la tasa de identificación correcta sin pruebas adicionales era 89,5% a nivel de especie y 97,9% a nivel de género. Cuatro cepas fueron identificadas erróneamente pertenecientes a los estafilococos, sin embargo, los resultados sugieren que el sistema de BBL Crystal GP ID recién introducido proporciona un método preciso para la identificación de cocos grampositivos. Su principal ventaja el espectro extendido de taxones incluidos en un único panel de prueba en contraste con los dos kits de ensayo. Además, la simplicidad de uso y el manejo seguro y rápido en un sistema cerrado.^{5,6}

Con relación al manejo de la Biodiversidad en Colombia, el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial en el año 2000, emitió el decreto 309 sobre la investigación científica en materia de biodiversidad en el territorio nacional; así mismo, creo la Resolución 1115 de 2000, por medio de la cual *“determina el procedimiento para el registro de colecciones biológicas con fines de investigación científica, según el cual toda persona natural o jurídica que posea una colección biológica cuyo objeto implique en forma total o parcial actividades de investigación científica, existentes antes de la entrada en vigencia del decreto 309, así como las que se organicen con posterioridad a dicho decreto, deberá registrarla ante el Instituto Alexander von Humboldt”*. Como resultado de esto a la fecha se tienen registradas 170 colecciones biológicas en Colombia.^{7,8}

Continuando con los estudios realizados para la identificación de microorganismos, Bosshard en 2003, evaluó la idoneidad de la secuenciación del 16S rDNA para la identificación de bacilos Gram positivos aerobios en condiciones de rutina en un laboratorio de microbiología clínica. 136 aislamientos clínicos que tenían identificación fenotípica, por medios convencional, se investigaron mediante análisis de secuencia 16S ADNr con la posibilidad de reconocer rápidamente taxones aún no descritos. Los datos actuales sugieren que el análisis de secuencia de 16S rDNA no sólo es más preciso y más objetiva que la identificación convencional. En el estudio se demuestra que la secuenciación ADNr es un medio eficaz para la identificación de bacilos Gram positivos aerobios. Realizaron la búsqueda FASTA permitiéndoles detectar problemas en cualquiera de los extremos dentro de la secuencia y así corregirlos y realizar la búsqueda en BLASTN. Las secuencias resultantes a menudo no mostraron o sólo unos pocos desajustes a las entradas de base de datos, lo que permite el uso exitoso de los criterios para las especies y la asignación de género⁹.

Al siguiente año, PP Bosshard en 2004, evaluó el uso de 16S análisis de ADN ribosomal secuencia (ADNr) pero para la identificación de cocos catalasa-negativa Gram positivos en el laboratorio clínico. Evaluaron 171 cepas. En comparación con otros métodos mejoró en un 81% identificando 138 de 171 cepas más. Se llegó a la conclusión de que la secuenciación del 16S rDNA es un medio eficaz para la identificación de cocos Gram positivos catalasa-negativos aerobios.¹⁰

En el año 2006, Mignard y Flandrois, investigaron la utilidad del método de secuenciación de 16S rDNA para identificar un rango de bacterias en un laboratorio clínico en condiciones de rutina. Durante un período de 30 meses, 683 aislamientos de diferente tipo se obtuvieron a partir de muestras clínicas,

secuenciados y analizados. Como resultado se identificaron 568 (83,1%) aislados a nivel de especie y 108 (15,6%) a nivel de género, entre cocos y bacilos Gram Positivas y Gram Negativas. ¹¹

Algunos trabajos realizados dentro del cepario de la Universidad Nacional, por ejemplo el realizado por Cruz y Rodríguez en 2011, se llevó a cabo el aislamiento, caracterización y conservación de bacterias presentes en terrarios con petróleo crudo, y en el que al finalizar de los 12 morfotipos bacterianos biodegradadores de petróleo, se lograron identificar 4 cepas bacterianas, las cuales correspondían 2 al género *Bacillus sp.* 1 a *Aeromonas* y 1 a *Staphylococcus*. Una de las colecciones de Microorganismos es la del Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana (CMDM-PUJ) en Bogotá, DC, Colombia, cuyo consolidado demuestra que se encuentra depositado en la actualidad, una colección que tiene aproximadamente 582 microorganismos entre hongos y bacterias. ^{12,13,14}

J. Barb en 2016, comenta que hay especulaciones sobre qué región hipervariable proporciona la especificidad bacteriana más alta en la secuenciación del 16S rRNA. Esto los lleva a examinar un nuevo proceso de siete regiones hipervariables o V de los ARNr 16S (seis amplicones: V2, V3, V4, V6-7, V8, V9 y). Además, menciona que el diseño de los cebadores se facilita debido regiones conservadas a través de taxones gracias a sus nueve regiones hipervariables (V1-V9). Como conclusión determinaron que la región hipervariable V4 produce la más baja divergencia de Kullback-Leibler pero V2 y V6, V7 también dio resultados comparables. ¹⁵

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. Colecciones biológicas

Las colecciones de microorganismos son una fuente de conocimiento para el mantenimiento de la biodiversidad, y, para el avance de investigaciones que contribuyen al desarrollo de la educación y científico. ¹⁶

2.2. Generalidades de las bacterias Gram positivas en estudio

La pared celular de las bacterias Gram positivas contienen elevados niveles de glucopéptidos y bajos niveles de lípidos, haciéndolas susceptibles al efecto de algunos antibióticos. Tiene varias capas de peptidoglucano llegando a ser el 40% hasta el 80% del peso seco de una bacteria Gram positiva, se encuentran proteínas, polisacáridos y molecular como los ácidos teicoicos ²²

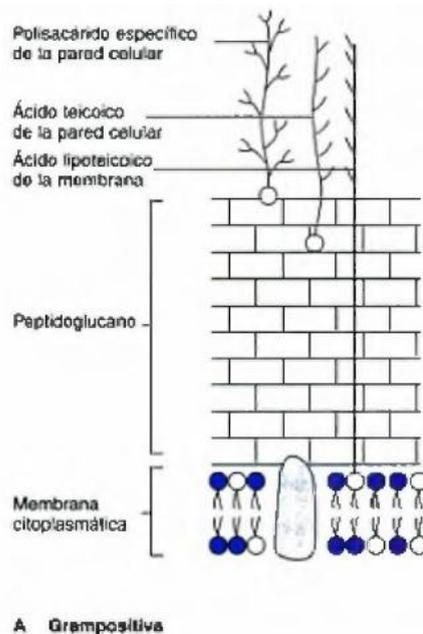


Figura 1. Estructura de la pared celular de la bacteria Gram positiva. (22)

Inicialmente, se decía que el género *Staphylococcus* hacía parte de la familia *Micrococcaceae*, pero de acuerdo con la “hoja de ruta” de la nueva edición del manual de bacteriología sistemática de Bergey están en el filo *Firmicutes* y son el género I en la Familia V *Staphylococcaceae* y Taxonómicamente el género *Streptococcus* hace parte de la familia *Streptococcaceae* y el género *Enterococcus* hace parte de la familia *Enterococcaceae*.¹⁷

El género de *Listeria* ha sido relacionado taxonómicamente con varias familias pero en el manual de bacteriología sistemática de Bergey sus especies se clasifican en la familia *Listeriaceae*. Lo que corresponde al género *Corynebacterium* se encuentra dentro de la familia *Corynebacteriaceae*. El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae*, comprende entre sus especies más reconocidas a *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. subtilis*. En su estructura nuclear se encuentra ausente la membrana nuclear. Contiene DNA de doble cadena circular, cerrado y único, con membrana citoplasmática y es de reproducción sexual ausente.¹⁸

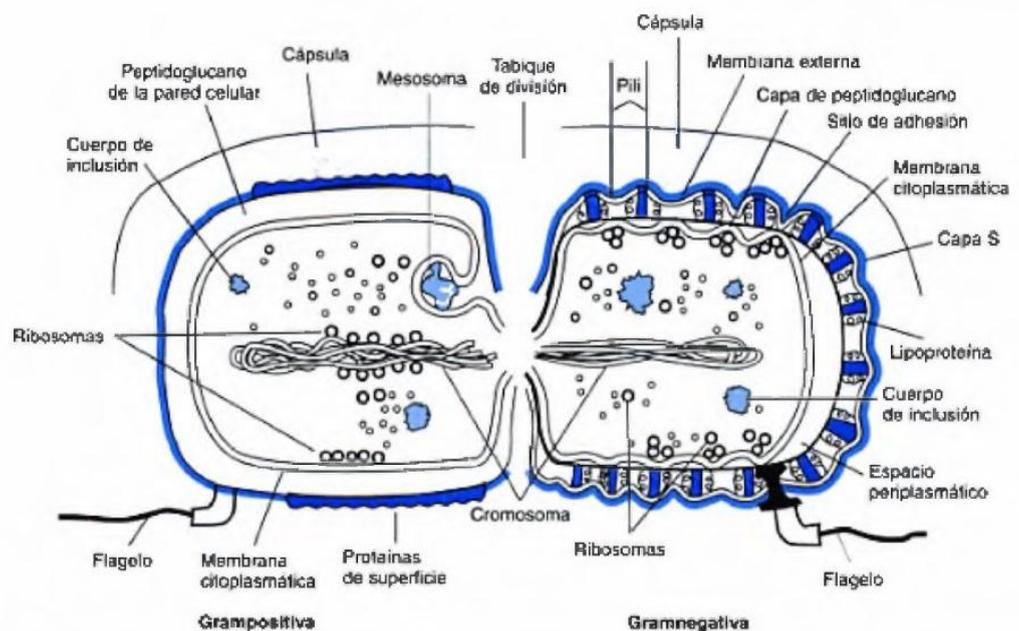


Figura 2. Esquema general que representa el corte transversal de una célula bacteriana. (22)

2.2.1. Cocos Gram positivos

Los cocos Gram positivos poseen un metabolismo respiratorio aerobio y anaerobio facultativo, toleran la sequía y la salinidad. Utilizan los azúcares como fuente de carbono, carecen de movilidad, no son formadores de esporas, en su ADN el contenido de guanina (G) y citosina (C) son bajos. Después de las enterobacterias los cocos Gram positivos son los que con mayor frecuencia se asocian a infecciones en humanos.

Staphylococcus spp.

Este género presenta características de producir enzimas como lipasas, las cuales hidrolizan los lípidos de la piel y favorecen la diseminación bacteriana. Proteinasas que hidrolizan proteínas, B-Lactamasas que hidrolizan el anillo betalactámico de los antibióticos, estafilocinasas, como la fibrinolisisina que activa el plasminógeno, nucleasas que son enzimas que actúan como factor de difusión, actuando sobre el ADN y ARN y nucleasas termoestables, hialuronidasas y fosfolipasa C.¹⁸

Además produce toxinas como las hemolisinas, causando letalidad en células animales y humanas, la toxina alfa produce lisis de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, ocasiona daño al músculo liso y también actúa como neurotóxica. La toxina beta degrada la esfingomielina, y es tóxica para las células. La toxina gamma y delta, actúan como surfactantes y activadoras de la acción de la adenilato ciclasa, confiriéndoles importancia en los cuadros de diarrea. También las toxinas epidermolíticas, facilitan la penetración bacteriana en la piel produciendo ampollas y escaras en epidermis. Las Leucodinas, son tóxicas ubicadas sobre la membrana de los neutrófilos, importantes en la virulencia de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina. Las enterotoxinas causa importante en la intoxicación por ingestión de alimentos ricos en carbohidratos y proteínas.¹⁸

Streptococcus spp.

Cuentan con sistemas que lo hacen patógeno como la producción de hemólisis y del antígeno específico; *S. pneumoniae* cuenta con capsula dentro de su estructura, puede evadir la opsonización, la fagocitosis y la destrucción intracelular de las células fagocíticas. *Streptococcus* también cuentan con la proteína M, siendo más común en el *S. pyogenes*, la cual es resistente al calor y a la acción de ácidos e inhibe la fagocitosis. La proteína F les da mayor adherencia a la superficie de las mucosas. La hialuronidasa le ayuda a penetrar mejor los tejidos y las proteasas se asocian a necrosis de tejidos blandos. ¹⁹

También hay producción de toxinas por parte de los *Streptococcus* entre estos las exotoxinas pirógenas tipos A, B y C, que producen el exantema en la escarlatina. La difosfopiridina nucleotida que facilita la destrucción de leucocitos. Las leucocidinas con efecto sobre los eritrocitos. Los enterococos son altamente resistentes a eritromicina; se dice que el gen *erm(A)* y otros denominados *msrC* son los que le confieren esta resistencia ²⁰

Generalmente, se ubican ampliamente en la naturaleza, suelen ser recuperados a partir de muestras humanas, animales y ambientales entre estos pisos, paredes y polvo. Pueden hacer parte de la flora normal de humanos y animales, aunque a veces terminan siendo perjudiciales en las muestras que se encuentran con proceso infeccioso, como también pueden ser útiles en ciertas áreas. ²¹

Son de mucha importancia a nivel médico, veterinario e industrial. Su hábitat normal es mucosas de animales y hombres (Tracto intestinal, genital y respiratorio). En hombres causa en su gran mayoría cuadros infecciosos como erisipela, artritis, meningitis entre otros. Frente a animales suele desencadenar procesos sépticos, abortos y mastitis, entre otros. Cuando se encuentran en agua son considerados factor de contaminación fecal. Su beneficio se encuentra en la industria, especialmente en los lácteos. ^{22, 23}

Staphylococcus son colonizadores de la piel y mucosa nasal en humanos. Pueden causar infecciones graves mediadas por la producción de enzimas y toxinas extracelulares, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* son los más importantes en infecciones humanas. *Staphylococcus aureus* se encuentran en mucosas nasales y otros sitios como pliegues cutáneos, axilas, vagina, pueden ser causantes de infecciones oportunistas cutáneas como: foliculitis, forúnculos, impétigo en su mayoría en extremidades, tronco y pliegues, erisipela, celulitis, maculas eritematosas con vesículas, signos inflamatorios locales y adenopatías. También suele causar infecciones purulentas secundarias como: osteomielitis y abscesos. Se presenta en enfermedades por toxinas como síndrome de piel escaldada, intoxicaciones y síndrome de shock toxico y septicemias.

Staphylococcus epidermidis es muy importante ya que representa entre el 50 hasta el 80% de los hallazgos clínicos, causa infecciones en catéteres intravenosos e implantaciones de prótesis, sepsis en neonatos, bacteriemia y endocarditis. También se encuentran como flora normal de la piel, vías respiratorias, y gastrointestinales de los humanos.²³ *Staphylococcus saprophyticus*, suele encontrarse en infecciones en las vías urinarias, se ha comprobado que esta infección la causa en mujeres jóvenes sanas sexualmente activas. Es la segunda causa más común de cistitis no complicada en mujeres jóvenes y adolescentes. *S. warneri* representa el 1% en la piel humana. Se conoce por causar bacteriemia relacionada con el catéter endocarditis de válvula nativa, osteomielitis vertebral hematogena y meningitis. *S. cohnii*, ha sido solo aislado en seres humanos, siendo flora normal de la piel, ha sido informado como causa de neumonía adquirida en la comunidad, artritis séptica primaria y sepsis relacionada con el catéter en pacientes inmunosuprimidos.²⁴ Por último, el *S. sciuri* se encuentran ampliamente distribuido en la naturaleza y alimentos, animales de granja, roedores, mamíferos, rara vez en seres humanos, se relaciona con infecciones en de tejidos blandos y en 1998 se reportó como causante de una endocarditis en un paciente.²⁴

Streptococcus es un género de microorganismos que hacen parte de la flora normal y/o patógena, siendo la faringitis estreptocócica la infección más frecuente causada por ellos, entre estos se encuentran:

Streptococcus pyogenes; su reservorio está limitado a los seres humano es normal en vías respiratorias superiores y en zonas húmedas y calientes de la superficie cutánea, donde puede producir infección. También causa infecciones en recién nacidos, faringoamigdalitis, neumonía, sepsis puerperal. Puede causar cuadros post-infecciosos de base inmune como la fiebre reumática y la glomerulonefritis postestreptococica. *Streptococcus agalactiae* tiene como reservorio el tracto gastrointestinal, es oportunista en hombres y animales. Las enfermedades que causan son precoces, las mujeres embarazadas pueden infectarse y presentar colonización vaginal llegando al feto a través del canal de parto. Son importantes ya que son una causa importante de enfermedad en los periodos neonatal y perinatal.²³ *Streptococcus viridans* son flora normal de la cavidad oro faríngea. Causan entre el 30 al 40% de los casos de endocarditis bacterianas subaguda; la endocarditis ocurre principalmente en pacientes con enfermedad preexistente de válvulas protésicas. También causan bacteriemias transitorias y caries dental. Facilitan la producción de caries. *S. pneumoniae* hace parte de la flora normal del aparato respiratorio superior. Puede causar enfermedades como neumonía lobar, bronconeumonía, abscesos en pulmón, pleuresías purulentas, meningitis, bacteriemias, otitis, entre otras.

Enterococcus spp.

Se encuentran en la flora normal en menor cantidad en la vagina, uretra masculina y en mayor cantidad en el tracto digestivo y las vías biliares. La importancia clínica es cada vez mayor, debido a su resistencia a los antibióticos. Pueden causar bacteriemia endocarditis, sepsis neonatal, e infecciones de tracto urinario, intraabdominales, pélvicas y nosocomiales. Es la causa principal de neumonía bacteriana extrahospitalaria, las infecciones

graves ocurren en lactantes menores de 3 años y mayores de 65 años. También es la causa más frecuente de meningitis bacteriana en adultos. Es la segunda causa de infecciones intrahospitalarias urinarias y de heridas y la tercera causa de bacteriemia intrahospitalaria.²³ Dentro de los *Enterococcus*, se encuentra la especie *E. faecalis*, considerada como la cepa más frecuente en muestras clínicas representando entre el 80 al 90% de las infecciones por *Enterococcus* humanos y *E. faecium* se ubica en segundo lugar aislándose entre el 10 al 15% de las infecciones.²⁵

Tabla 1. Identificación de *Streptococcus* y *Enterococcus* según su hemolisis

GENERO	PRUEBAS
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Hemolisis beta: Colonias transparentes pequeñas, convexas, lisas. (Grupo A)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Hemolisis beta: Colonias transparentes pequeñas, convexas, lisas. (Grupo B)
<i>Streptococcus viridans</i>	Hemolisis alfa: Colonias pequeñas , traslucidas, convexas, lisas y verdes.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Hemolisis alfa: Colonias pequeñas , traslucidas, convexas, lisas y verdes.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Hemolisis gamma: Colonias pequeñas , transparentes, convexas, lisas. (Grupo D)
<i>Enterococcus faecium</i>	Hemolisis gamma: Colonias pequeñas , transparentes, convexas, lisas. (Grupo D)

Identificación bioquímica de *Staphylococcus* spp

Los *Staphylococcus* descomponen el peróxido de hidrogeno (catalasa positiva) debido a que poseen catalasa, permitiendo su diferenciación de los *Streptococcus*. Existen diversas pruebas bioquímicas que permiten la diferenciación entre especies como la prueba de coagulasa que es positiva para *S. aureus* ya que posee la enzima coagulasa con la capacidad de transformar el fibrinógeno en fibrina, provocando la formación de un coagulo visible, la fermentación del manitol, susceptibilidad a la novobiocina antibiótico con una concentración de 5 mcg y al cual es resistente *S. saprophyticus*; pruebas confirmatorias como la ureasa, oxidasa y esculina y pruebas rápidas de identificación.²⁶

Tabla 2. Pruebas de Identificación para *Staphylococcus*

GENERO	PRUEBAS
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coagulasa + ; Fermenta manitol; Sensible a la novobiocina
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coagulasa - ; No Fermenta manitol; Sensible a la novobiocina
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Coagulasa - ; No Fermenta manitol; Resistente a la novobiocina
<i>Staphylococcus cohnii</i>	Coagulasa -; Resistente a la novobiocina. Ureasa +
<i>Staphylococcus warneri</i>	Coagulasa -; Sensible a la novobiocina
<i>Staphylococcus sciuri</i>	Coagulasa -; Resistente a la novobiocina. Oxidasa +. Esculina +. Ureasa -.

Identificación bioquímica de *Streptococcus* spp.

Como se dijo, la catalasa es una prueba diferenciadora de géneros resultando negativa para *Streptococcus* y *Enterococcus*. Para la diferenciación de *Streptococcus* beta hemolíticos son útiles la prueba de bacitracina en donde se usa este antibiótico con una concentración de 0.04 U, al cual los *S. pyogenes* son sensibles y los *S. agalactiae* son resistente. La prueba de CAMP positiva para *S. agalactiae* por su actividad hemolítica de la beta lisina del grupo B o factor de CAMP frente al *S. aureus* viéndose la formación de una flecha en el punto de unión entre las dos bacterias. La prueba del hipurato de sodio se observa la producción de la enzima hidrolítica hipuricasa por *S. agalactiae* y *E. faecalis*.²⁷

Para la diferenciación de los *Streptococcus* alfa hemolíticos son útiles la prueba de sensibilidad a la optoquina, la cual se fundamenta en que la quinina, un derivado de la optoquina, actúa sobre la pared sensible del *S. pneumoniae* lisándola e inhibiendo su crecimiento, siendo así sensible a esta prueba por lo contrario los *S. viridans* son resistentes. Por otra parte, la prueba de solubilidad en bilis, algunas sales biliares lisan la capsula del *S. pneumoniae*, permitiendo que se presente un aclaramiento de la turbidez en el tubo mostrando la solubilidad que tiene el *S. pneumoniae* en bilis.²⁸

Para la diferenciación de los *Enterococcus* y los del grupo D son útiles la prueba de tolerancia al cloruro de sodio al 6.5%, permite el crecimiento de *Enterococcus* ya que crecen a alto contenido salino. La prueba de bilis esculina en donde los *Enterococcus* tiene la capacidad e hidrolizar esculina en presencia de bilis al 1% o 4%, produciendo glucosa y glucosa esculina, que al unirse con las sales de hierro presentes en el medio se forma un complejo negro²⁹. Las pruebas bioquímicas se deben realizar en cámara de flujo laminar, se deben llevar a incubación a 37°C por 24 a 48 horas. Algunas

se realizan en tubo y otras en caja dependiendo de la prueba que se realice.

Tabla 3. Pruebas de Identificación para *Streptococcus* y *Enterococcus*

GENERO	PRUEBAS
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Catalasa -; Prueba de CAMP -; Prueba de bacitracina +; Hidrolisis del hipurato -.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Catalasa -; Prueba de CAMP +; Prueba de bacitracina -; Hidrolisis del hipurato +.
<i>Streptococcus viridans</i>	Catalasa -; Sensibilidad a la optoquina Resistente; Solubilidad en bilis -.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Catalasa -; Sensibilidad a la optoquina Sensible; Solubilidad en bilis +.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Catalasa -; Prueba de bilis esculina +; Prueba de tolerancia al NaCl 6.5% +; Fermentación de arabinosa -. Hidrolisis de piruvato de sodio +.
<i>Enterococcus faecium</i>	Catalasa -; Prueba de bilis esculina +; Prueba de tolerancia al NaCl 6.5% +; Fermentación de arabinosa +. Hidrolisis de piruvato de sodio -.

2.2.2. Bacilos Gram positivos

Dentro de los bacilos Gram positivos están los géneros *Lysteria* y el *Corynebacterium* denominados no esporulados y los *Bacillus* que hacen parte de un grupo de bacterias que son formadoras de esporas, por esto se les considera cosmopolitas ya que viven muchos años en el ambiente. Dentro de los no esporulados están los regulares (*Lysteria*) y los irregulares (*Corynebacterium*).²⁹ *Lysteria* se encuentra la especie *L. monocytogenes* y

L. innocua. Son aerobios con borde redondeado que se agrupa en cadenas cortas o empalizadas que forman letras L y V. Móvil a 22°C y movilidad mínima a 35-37°C Dentro del género de *Corynebacterium* se encuentra la especie *C. diphtheriae* son bacilos inmóviles rectos o un poco curvos, no forman esporas lo contrario a los *Bacillus* que si forman esporas, son aerobios, pueden ser móviles o inmóviles, se desarrollan fácilmente en agar sangre.

B. anthracis produce unas toxinas compuestas por tres proteínas la unión de PA y EF forman un complejo denominado toxina de edema (ET), que tiene actividad de adenilato ciclasa. LF y PA forman un complejo llamado toxina letal (LT), importantes factores de virulencia.

Los bacilos Gram positivos se encuentran como parásitos y patógenos en animales y humanos, también se encuentran como saprofitos en el suelo o en las plantas. Son oportunistas y causan enfermedades en pacientes inmunosuprimidos.²⁹

Lysteria spp.

Se encuentra generalmente en alimentos vegetales, plantas en descomposición, suelos aguas dulces y saladas, en alimentos de origen animal, en productos lácteos crudos como el queso y leche. Debido a su amplia distribución es patógena para los hombres y animales es especial *L. monocytogenes*, esta puede transmitirse por el consumo de alimentos contaminados o también aparecer esporádicamente causando enfermedades. Es una especie que fácilmente se multiplica fácilmente en la cadena alimenticia. Causa en hombres listeriosis neonatal por infección transplacentaria de una madre infectada, abortos repetitivos, meningitis, conjuntivitis en recién nacidos por contacto con el canal vaginal infectado.³⁰

L. monocytogenes es un patógeno intracelular facultativo que invade y

sobrevive dentro de las células de los mamíferos, incluidos los macrófagos y varias líneas celulares de cultivo tisular humano. Poseen una proteína de superficie de 80 kDa denominada internalina que con la interacción de E-caderona (Receptor en las células epiteliales humanas) acción que promueve la entrada a estas células. *L. innocua* fue comunicado por primera vez como causa de bacteriemia mortal en un paciente de 62 años no inmunodeprimido con colangitis y shock séptico.

Corynebacterium spp.

Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza en el suelo, agua y como flora normal en humanos y animales. Es oportunista y puede causar cuadros infecciosos en el hombre y en los animales. *C. diphtheriae* es importante clínicamente ya que produce la enfermedad infectocontagiosa llamada difteria.³¹

Bacillus spp.

Debido a que se encuentra ampliamente distribuidos en la naturaleza conviven sin causar muchos problemas de salud en animales ni hombres. Pero hay excepciones, algunos son oportunistas como *B. cereus* y *B. subtilis* produce mastitis y abortos e intoxicación alimentaria.³¹

B. anthracis causa una enfermedad denominada ántrax usada como arma biológica en humanos, bovinos u ovinos también se llama fiebre carnosa (Enfermedad que afecta a mamíferos atacando cuello y faringe) en perros, cerdos y equinos produce enteritis. En de gran importancia clínica ya que los humanos se pueden contaminar por los animales por medio del pelo, lana o cuero que producen el “Carbunco”, lo que hace el *Bacillus* es penetrar su espora por vía cutánea, digestiva o aérea, siendo atrapada la espora por

macrófagos que no la destruyen. *Bacillus* tiene propiedades a nivel industrial, ya que con ellos se producen antibióticos como la gramacidina, bacitracina polimixina, proteasa e insecticidas.³⁴

Características bacilos Gram positivos (*Corynebacterium*, *Listeria*, *Bacillus*)

Los bacilos Gram positivos de genero *Listeria*, se observan en agar sangre colonias grisáceas, pequeñas, traslucidas y beta hemolíticas.

El *Corynebacterium* en agar sangre se observan colonias blancas, opacas, secas no hemolíticas. En medios selectivos como el de Loeffler con suero y el Cistina-telurito, se observan colonias pequeñas negras, redondas y convexas.

Bacillus en agar sangre se observan como colonias grandes y extendidas, grises de bordes irregulares³³

Identificación bioquímica de *Listeria*, *Corynebacterium* y *Bacillus*.

Para el género de *Listeria* la prueba de Catalasa es positiva, CAMP positivo (*L. monocytogenes*) negativo (*L. innocua*) siendo una prueba diferenciadora entre especies. Fermentan glucosa, trehalosa y salicina e hidroliza la esculina. Motilidad en sombrilla a 20-25°C positiva y a 35°C negativa para *L. monocytogenes*.³³

Las características bioquímicas del genero *Corynebacterium* incluyen catalasa positiva, la ureasa para el caso de *C. diphtheriae* es negativa diferenciándolo de otras especies del género, reducción de nitratos positivo para *C. diphtheriae*, Hidrolisis de esculina negativa al igual que la motilidad, licuefacción de gelatina y fermentación de carbohidratos.

Las pruebas bioquímicas en el género de *Bacillus* más representativas y diferenciadoras de especies es la motilidad positiva para *B. cereus* lo contrario a *B. anthracis* negativa.³²

2.3. Sistema BBL CRYSTAL para Gram Positivos

Este sistema es un panel de identificación en miniatura que consiste en 29 pruebas convencionales fluorogénicas, cromogénicas y modificadas para la identificación de cepas Gram positivas pertenecientes a diversos géneros. El sistema se inocula con suspensión de microorganismos (0.5 del estándar de turbidez de Mc Farland), se incuba durante 18-24 horas 35-37°C y se lee con visor especial del panel del sistema cristal. Von Baum y cols., evaluaron el sistema usando 77 cepas las cuales se identificaron correctamente por el sistema.³¹

La principal ventaja del sistema de BBL Crystal GP es su espectro extendido de taxones en comparación con otros sistemas para la identificación de microorganismos Gram-positivos. Se encuentra este sistema denominado BBL Crystal GP fácil de manejar y requiere sólo una pequeña cantidad de material de prueba.

2.4. Identificación molecular de bacterias Gram positivas

2.4.1. Estructura molecular de las bacterias

Las características heredables de unos organismos están dadas por el material genético, que está compuesto por ácido desoxirribonucleico (ADN) organizado en cromosomas. En las bacterias este material genético o también conocido como el genoma, está compuesto por un cromosoma circular, libre en el citoplasma. El peso molecular del ADN celular bacteriano es de casi 10^6 kDa, mide de 300 a 1400 micrómetros de longitud, encontrándose en la célula super enrollado.³⁰

2.4.2. ARN 16S

Es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas sustituyendo a la secuenciación de catálogos de oligonucleótidos. En la actualidad la clasificación e identificación se basan en el análisis de esta macromolécula.

2.4.3. Etapas de identificación bacteriana

- Para realizar la parte metodológica se realizaron todos los pasos que se describen en la figura 1. Todas y cada una de ellas tienen que realizarse teniendo en cuenta las buenas prácticas de laboratorio, ya que es fundamental que la muestra no se contamine en ninguno de los pasos del procedimiento.

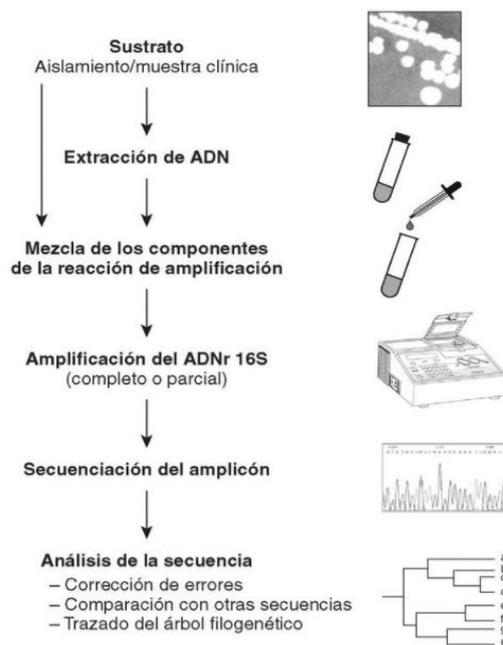


Figura 3. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S. (22)

2.4.4. Secuenciación del DNA mediante el método de Sanger

Es una técnica desarrollada en los años 70 por Frederick Sanger y colaboradores. En el método original de Sanger, la detección de las moléculas de DNA en la reacción de secuenciación se realiza utilizando un DNA iniciador marcado radioactivamente.

La aparición, en 1986, de terminadores marcados con colorantes fluorescentes permite la realización de una reacción de secuenciación en un solo tubo, en lugar de los cuatro que eran necesarios en la técnica original de Sanger.³¹

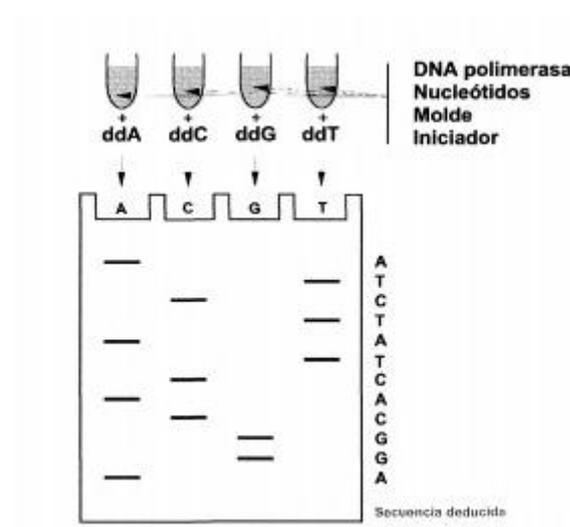


Figura 4. Secuenciación del DNA mediante el método de Sanger o de los terminadores de cadena. (22)

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Tipo de investigación

Cuantitativa, descriptivo explorativo.

3.2. Universo, población, muestra

Universo: Cepario Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Población: Bacterias Gram positivas del Cepario

Muestra: 19 cepas bacterianas

3.3. Hipótesis, variables, indicadores

Las bacterias Gram positivas han sido un apoyo educativo para el aprendizaje y desarrollo de instituciones a lo largo de los años, siendo protagonistas de múltiples estudios investigativos, que han facilitado conocer las características de todas sus especies. La caracterización molecular de las bacterias Gram positivas permite una pronta y certera identificación, brindando al cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca opción de mejoramiento.

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

Variable Dependiente: Indicadores bioquímicos y pruebas moleculares para identificación del género y especie de 19 bacterias Gram positivas del Cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Indicadores

Los indicadores escogidos para evaluar y dar seguimiento a la

investigación fueron los siguientes:

1. Cumplir y revisar los protocolos establecidos para la identificación microbiológica y conservación de los microorganismos en estudio
2. Contar con resultados con un porcentaje de aceptación superior a un 95% de similitud significativa, mediante los métodos microbiológicos
3. Contar con resultados iguales o superiores a un 97% para la aceptación e identidad significativa, mediante los métodos moleculares
4. Divulgación de los resultados y el producto de este proyecto
5. Registro de la colección de bacterias Gram positivas, ante el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt

3.4. Técnicas y procedimientos

FASE 1. Evaluación de las características fenotípicas de las cepas Gram positivas

- Se tomaron las 19 cepas a caracterizar del cepario sembrándolas en un agar selectivo en este caso (agar-sangre) y se incubaron en atmósfera de CO₂ para (*Streptococcus pneumoniae*) y a 37°C para las demás cepas Gram positivas tomando un asada del microorganismo y sembrando por agitación.
- Después de 18 a 24 horas máximo de incubación, se observaron las características macroscópicas en el agar sangre forma, color de las colonias y hemólisis. Se observan las características microscópicas realizando la tinción de Gram así: Cristal violeta por 1min; Lugol 1min; Alcohol de Gram 30sg y Fucsina 1min, con el fin de verificar la pureza y viabilidad de las mismas.

- Posteriormente, se tomaron estos cultivos de agar sangre y se realizó la siembra en tubos para identificación bioquímica acorde a cada cepa o identificación rápida mediante el uso del BBL Crystal para Gram positivos. Se siguió el protocolo del kit BBL Crystal de Gram positivos, se tomó una asada del cultivo del microorganismo y se resuspendió en el líquido de inoculación que provee el kit hasta que se observó turbidez, comparando con escala de McFarland 0.5. El líquido es vertido por el canal, llenando todos los pocillos y regresando el sobrante a un costado de la base. Se llena la base con un poco de agua y se coloca allí la prueba, se incuba por 24 horas a 37. Se examinan los pocillos para determinar cambios de color o presencia de fluorescencia que resultan de las actividades metabólicas de los microorganismos. Después de leer en el sistema, se obtiene un porcentaje de confiabilidad y pruebas acordes a la cepa mayor al 95%.
- Cuando se encuentran cepas no viables o que no cumplen con sus características macroscópicas y microscópicas comunes. Se toman nuevos viales que se encuentran en congelación, permitiendo conservar microorganismos viables por un tiempo sin sufrir cambios genotípicos. Se realizó el procedimiento de descongelación. Según protocolo Sánchez y Corrales (2005). Con estos nuevos viales se realizará de nuevo el procedimiento anteriormente descrito.²⁶

FASE 2. Preparación de las muestras para biología molecular

- Se tomó la cepa del banco de cepas, se realizó siembra en agar sangre, las cepas que se toman congeladas, se aíslan en caldo BHI, se inoculo el microorganismo e incuba a 37 °C por 24-48 horas.

- En tubos eppendorf, debidamente marcados se añadió 800uL de LB, tomando una asada de la colonia. Teniendo la precaución de tapar bien. Todo el procedimiento debe realizarse en cámara de flujo laminar
- Los tubos se dejan en agitación por 24 horas, luego se separan los residuos por centrifugación (13.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente) y el ADN disuelto en el sobrenadante se recuperon en el tubo eppendorf estéril, el cual se almacenó a -20 ° C hasta el momento de su uso. ³²

FASE 3. Biología molecular

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S incluyo tres etapas: a) amplificación del gen a partir de la muestra apropiada; b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, y c) análisis de la secuencia.³³

EXTRACCION DE ADN

Los ADN genómicos para la secuenciación se extrajeron utilizando el protocolo para las bacterias Gram-positivas. ¹⁹

- Se tomaron 19 cepas bacterianas Gram positivas previamente cumpliendo con lo mencionado en la fase 2.
- Para la extracción de bacterias Gram positivas de este proyecto se utilizó el “QUICK-DNA™ Universal Kit – DE ZYMO RESEARCH” Fluidos biológicos y protocolo celular. Al igual que el kit, contamos con materiales como: Vortex, puntas estériles, pipetas, beaker, tubos eppendorf estériles, microcentrifuga, agua des ionizada estéril, gradilla.

- Se tomaron los tubos eppendorf con el microorganismo, el cual se encontraba almacenado a -20°C , se adicionó 200 μL de Bio fluid & cell-Buffer rojo y 20 μL de proteinasa K (Esta debe estar congelada y utilizar de inmediato) a cada tubo. Luego se mezcló cada tubo en el vortex por 2 minutos.
- Se incubaron a 55°C por tres horas continuas. Luego se tomó el sobrenadante del tubo centrifugado un tubo eppendorf nuevo estéril, se añadió el mismo volumen (1/1) de muestra y de Genomic Binding Buffer y mezclaron en el vortex por un minuto.
- Se transfirió la mezcla a una columna Zymo-SpinTM IIC-XL en tubo de recolección, se centrifugó a 13000g por 1 minuto 20 segundos. Se descartó el líquido del tubo recolector.
- Se colocaron las columnas en tubos recolectores nuevos y se añadieron 400 μL de DNA Pre-wash buffer, se centrifugó a 13000g por 1 minuto 20 segundos. Se descartó el tubo recolector.
- Después se añadieron 700 μL de g-DNA wash buffer y centrifugarlo a 13000g por 1 minuto 20 segundos. Se vació el líquido del tubo recolector. Luego se añadió 200 μL de g-DNA wash buffer y centrifugó a 13000g por 1 minuto 20 segundos. Se descartó el tubo recolector con el contenido. Después, se transfirió la columna a un tubo eppendorf nuevo, se añadieron 100 μL de DNA elution buffer, y se incubó por 5 minutos a 37°C . Para terminar la extracción se guardó en congelación de 4°C a -20°C , obteniendo el ADN genómico.

AMPLIFICACION DE ADN GENOMICO

- Se realizaron los cálculos correspondientes dependiendo del procedimiento realizado en la extracción para la master mix.

**Tabla 4. Master Mix para llevar a cabo la PCR
volumen final de 15 y 35 microlitros**

COMPONENTE	CONCENTRACION PARA 15 µl	CONCENTRACION PARA 35 µl
OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix	7.5 µl	17.5 µl
Primer 16S – 8F	0.3 µl	0.7µl
Primer 16S – 1492R	0.3 µl	0.7 µl
Agua desionizada	6.3 µl	14.7 µl
ADN	0.6 µl	1.4 µl

- Se tomaron los tubos marcados de la extracción de ADN realizada marcados con el nombre de la bacteria, agregando a cada tubo la master mix y la cantidad de ADN correspondiente.

- Se llevaron las muestras al termociclador (Multigene Optimax Labnet) por 2 horas aproximadamente. Se programó la amplificación para gen 16s DNA, realizando los siguientes ciclos de amplificación:

Desnaturalización: 94°C por 10 min

Desnaturalización: 94°C por 30 min con 35-40 ciclos

Anillamiento: 50°C por 1:30 min con 35-40 ciclos

Extensión: 72°C por 2 min con 35-40 ciclos

Extensión final: 72°C por 15 min

ELECTROFORESIS

- Se preparó un gel de agarosa al 2%, se tiñó con 1 µL de GelGreen Nucleid

Acid Gel Stain, para verificar si la extracción de ADN se obtuvo; para esto, se hace un corrido electroforético tomando 15µL del producto de la PCR de cada bacteria en los pozos del gel. Posteriormente, se toma la misma cantidad del marcador de peso molecular (Hyperlander II) para verificar que la preparación del gel funciona y visualizar la migración del ADN, se corre un control negativo por 2 horas. Programando el equipo:

V:80-90

mA: 400

Tiempo 120 (2 horas)

RUN (Correr)

Por último, se observa que salgan burbujas para estar seguros de que la electroforesis está corriendo bien.

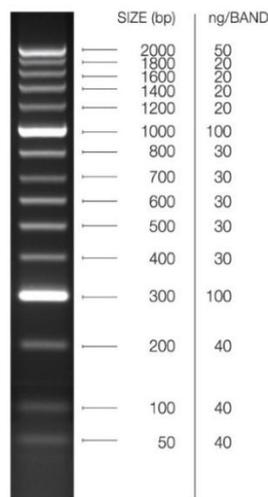


Figura 5. Rango del marcador Hyperlander II

- Corridas las 2 horas los productos de la PCR convencional (19 bacterias Gram positivas), se observaron las bandas en el gel de agarosa 2%. Se

realizó otra Master mix con 40 μL , se corrieron nuevamente en gel agarosa 2% 8 μL , observándose bandas claras.

- Se prepararon primers 16S-8F; 16S-1492R con una concentración de 10pmol/ μL , para las 19 bacterias, se conservan a 4°C para el envío a secuenciar. Los 33 μL de la master mix de las 19 bacterias se conservaron a 4°C hasta su envío a secuenciar, mediante método de sanger con purificación en electroforesis capilar.

FASE 4. Secuenciación y bases de datos

- De las 19 cepas bacterianas a secuenciar, se enviaron 10, así:
 - 6 cepas bacterias para secuenciar los fragmentos de 16S-8F
 - 4 cepas bacterias para secuenciar los fragmentos de 16S-8F y 16S-1492R
- Se recibieron los resultados emitidos de las secuenciaciones y se realizó la edición de los datos recibidos de las secuenciaciones por medio de una homología con el programa Chromas Lite (versión 2.6.5), se empleó la base de datos centralizada de MLST (Multilocus Sequence Typing). La Base de datos GenBank se usó para las comparaciones de homología entre las secuencias obtenidas y los presentes en la base de datos. La comparación se realizó mediante el uso básico de alineación herramienta de búsqueda local (BLAST), disponible en línea en www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, asumiendo una identidad de igual o superior al 97%.³⁴

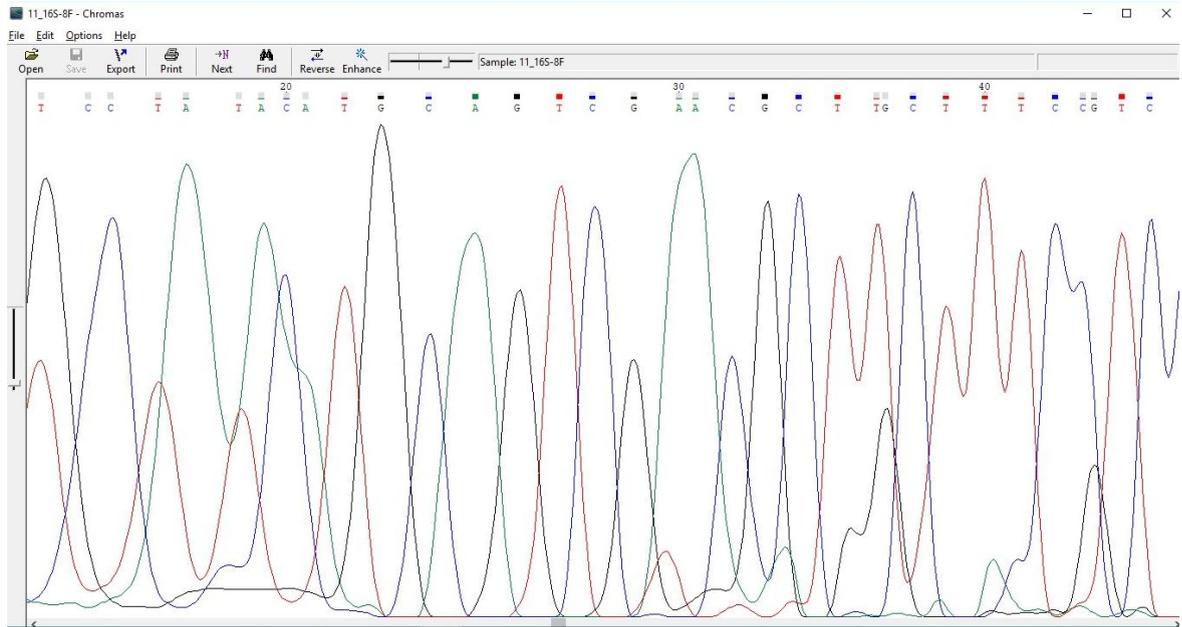


Figura 6. Programa Chromas, representa electroferogramas de las secuencias bacterianas. Autora Méndez Yury, 2018

4. RESULTADOS

FASE 1

Para determinar las características microscópicas, se realizó una tinción de Gram, la cual permite identificar la taxonomía de las cepas bacterianas en estudio, llegando a observar cocos y bacilos Gram positivos (color violeta azulado). Coincidiendo con lo esperado para cada cepa.

Se realizó un aislamiento en agar sangre a todas las cepas bacterianas Gram positivas con una siembra por agotamiento y se incubó a 37°C por 24 horas, observando las características macroscópicas, observándose la morfología esperada para las 19 cepas bacterianas descritas a continuación así: Grupo de cocos Gram Positivos: Genero *Staphylococcus*. Especies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus sciury*, *Staphylococcus warnerii* y *Staphylococcus cohni*, colonias blanquecinas, elevadas. Coincidiendo con sus características.

El género *Streptococcus*. Especies: *Streptococcus agalactiae*, *streptococcus pyogenes*, presentaron colonias lisas y beta hemolíticas, características de estos. *Streptococcus viridans*, presento colonias pequeñas y alfa hemolíticas al igual que *Streptococcus pneumoniae* pero con colonias lisas.

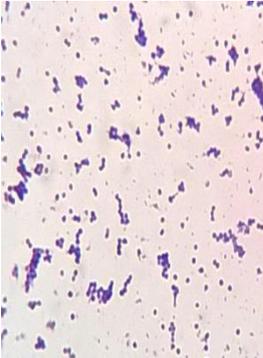
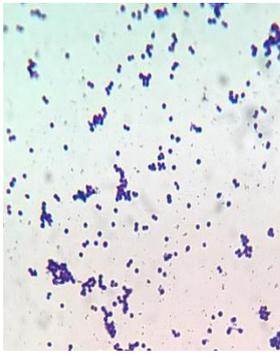
El género *Enterococcus*. Especies *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, sus colonias se caracterizan por ser pequeñas y cremosas.

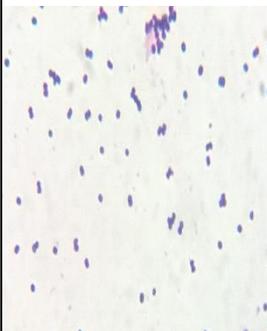
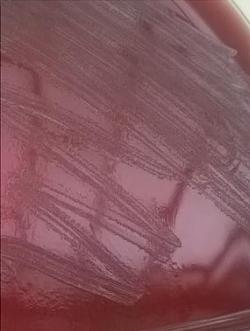
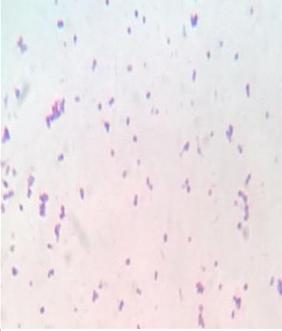
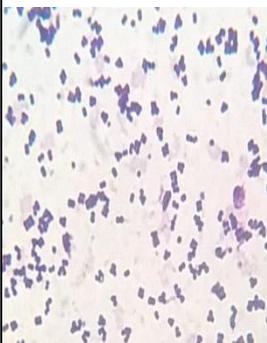
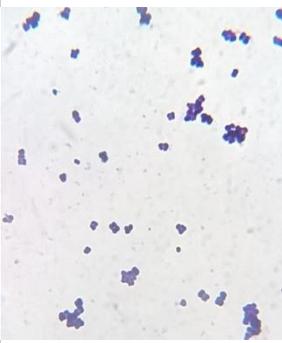
Las cepas del género *Bacillus* Especies: *Bacillus pumilus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*. Sus colonias son grandes y uniformes, blanquecinas y cremosas.

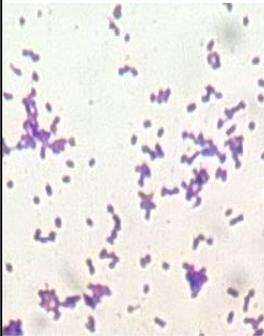
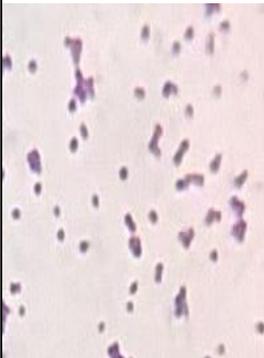
Para el género *Listeria*. Especies: *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*, se caracteriza por ser colonias pequeñas, estrechas y lisas.

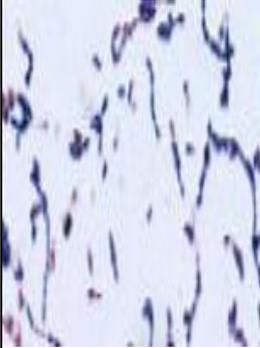
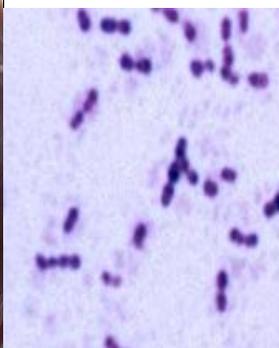
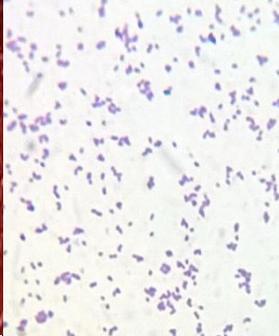
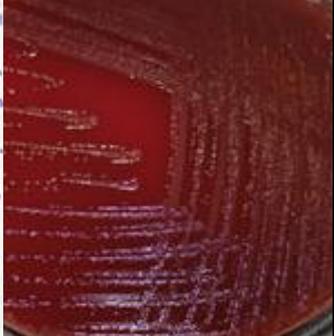
El género *Corynebacterium*. Especie; *Corynebacterium diphtheriae*. Sus colonias se presentaron grisáceas y puntiformes.

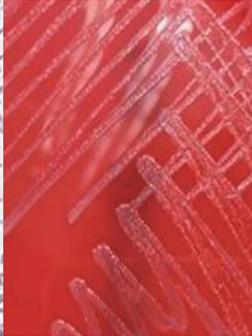
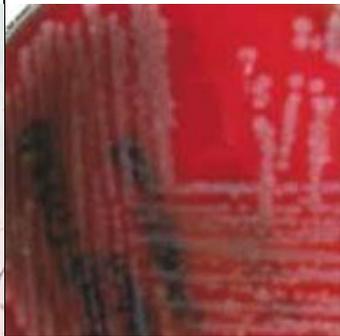
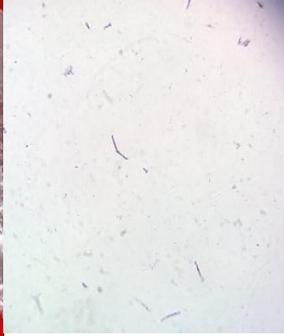
Las características descritas se pueden observar en la Figura 7.

Resultado de la tinción de Gram	Resultado cultivo en agar Sangre	Resultado de la tinción de Gram	Resultado cultivo en agar Sangre
073 <i>Staphylococcus aureus</i>		076 <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
			
Cocos que forman racimos irregulares parecidos a uvas.	Colonias traslucidas, enteras y elevadas. B hemolisis.	Cocos que forman racimos irregulares parecidos a uvas.	Colonias traslucidas, enteras y elevadas. B hemolisis.

078 <i>Staphylococcus epidermidis</i>		079 <i>Staphylococcus sciuri</i>	
			
Cocos que forman racimos irregulares parecido s a uvas.	Colonias traslucidas, enteras y elevadas. B hemolisis.	Cocos que forman racimos irregulares parecidos a uvas.	Colonias traslucidas, enteras y elevadas. B hemolisis.
080 <i>Staphylococcus warnerii</i>		081 <i>Staphylococcus cohnii</i>	
			
Cocos Gram positivos en racimos de a cuatro	Colonias traslucidas, enteras y elevadas. B hemolisis.	Cocos Gram positivos agrupados en racimos	Colonias traslucidas, enteras y elevadas. B hemolisis.

082 <i>Streptococcus agalactiae</i>		083 <i>Streptococcus pyogenes</i>	
			
Cocos Gram positivos.	Colonias blancas brillantes con beta hemolisis.	Cocos Gram positivos de 0,5-1,2um en pares o cadenas.	Colonias beta hemoliticas.
084 <i>Enterococcus faecalis</i>		085 <i>Enterococcus faecium</i>	
			
Cocos Gram positivos en pares o cadenas cortas.	Colonias pequeñas cremosas blancas lisas no hemolitica	Cocos Gram positivos en pares o cadenas cortas.	Colonias pequeñas cremosas blancas lisas no hemoliticas.

088 <i>Streptococcus viridans</i>		090 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
			
Cocos Gram positivos en pares o cadenas cortas	Colonias alfa hemolíticas.	Cocos Gram positivos en pares o cadenas cortas	Colonias lisas, pequeñas, brillantes, circundadas por un halo verde alfa hemolíticas..
091 <i>Listeria monocytogenes</i>		093 <i>Listeria innocua</i>	
			
Bacilos Gram positivos cortos en cadena o solos	Zona estrecha de hemolisis, colonias lisas y pequeñas	Bacilos Gram positivos cortos en cadena	Zona estrecha de hemolisis, colonias lisas y pequeñas.

095 <i>Corynebacterium diphtheriae</i>		100 <i>Bacillus subtilis</i>	
			
Bacilo Gram positivo pleomorfo con estructuras claviformes similares a letras chinas	Colonias son puntiformes y grisáceas.	Bacilos Gram positivos esporulados	Colonias en agar sangre B hemolisis
102 <i>Bacillus cereus</i>		104 <i>Bacillus anthracis</i>	
			
Colonias cremosas, blanquecinas, grandes y uniformes.	Colonias cremosas, blanquecinas, grandes y uniformes. Hemolisis variable.	Bacilos Gram positivos.	Colonias de 3-5 mm, bordes irregulares, pegajosas con aspecto de cabezas de medusa, gris blancas.

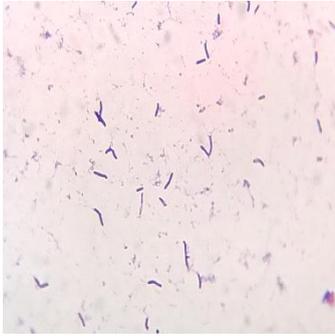
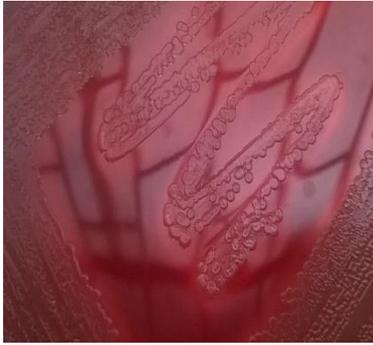
108 <i>Bacillus pumilus</i>	
	
<p>Bacilos Gram positivos en forma de bastones</p>	<p>Colonias grandes y extendidas, lisas beta hemolíticas, que con mayor tiempo de incubación se ven amarillas.</p>

Figura 7. Características microscópicas y macroscópicas de las bacterias Gram positivas del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca Autora. Mendez 2018.

La identificación con el sistema rápido BBL Crystal, presento para 15 cepas porcentajes de aceptación iguales y superiores al 95% de similitud. Para *Streptococcus pneumoniae*, no se realizaron pruebas rápidas. En el caso de *Listeria innocua*, se identificó dentro de las bases de datos con un porcentaje de 99.6% para el género de listeria. *Bacillus anthracis*, no coincidió con la cepa en estudio por lo cual se esperó a la identificación bioquímica en tubo. *Corynebacterium diphteriae*, obtuvo un porcentaje de

similitud del 55%. Los datos obtenidos se pueden encontrar en la tabla 5.

**Tabla 5. Porcentaje de identificación de sistema BBL Crystal 19
bacterias Gram positivas del cepario de la Universidad
colegio mayor de Cundinamarca**

Código Cepario	Bacteria del Cepario	Gram	Porcentaje de confiabilidad sistema identificación BBL Crystal
073	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos Positivos	99%
076	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Cocos Positivos	99%
078	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cocos Positivos	99%
079	<i>Staphylococcus sciuri.</i>	Cocos Positivos	98%
080	<i>Staphylococcus warnerii</i>	Cocos Positivos	98%
081	<i>Staphylococcus cohnii</i>	Cocos Positivos	98%
082	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Cocos Positivos	99%
083	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Cocos Positivos	99%
084	<i>Enterococcus faecalis</i>	Cocos Positivos	99%
085	<i>Enterococcus</i>	Cocos	99%

	<i>us faecium</i>	Positivos	
088	<i>Streptococcus viridans</i>	Cocos Positivos	99%
090	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cocos Positivos	Indeterminado
091	<i>Listeria monocytogenes</i>	Bacilos positivos	99%
093	<i>Listeria innocua</i>	Bacilos positivos	99,6% para L. monocytogenes
095	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Bacilos positivos	85%
100	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilos positivos	98%
102	<i>Bacillus cereus</i>	Bacilos positivos	99%
104	<i>Bacillus anthracis</i>	Bacilos positivos	Indeterminado*
108	<i>Bacillus pumilus</i>	Bacilos positivos	99.9%

* Bacterias que durante el análisis en el sistema BBL Crystal no lograron similitud con lo reportado en las bases de datos del programa BBL Crystal o difería la especie analizada.

Mediante pruebas bioquímicas de tubo se reconfirma los resultados obtenidos con las pruebas rápidas y las cepas que obtuvieron porcentajes bajos (*Corynebacterium diphtheriae* y *Bacillus anthracis*). Las especies de *Staphylococcus* coincidieron con las pruebas características de estas mostradas en la tabla 2.

Al igual las especies de *Streptococcus* y *Enterococcus* descritas en la tabla 3.

Para el caso de *Corynebacterium diphtheriae* las pruebas representativas en tubo son motilidad, bilis, gelatina negativa y fermentación de azúcares y nitritos positivos. Logrando coincidir con los registros bibliográficos. *Bacillus anthracis*, presenta similitud con otros *Bacillus* más sin embargo no se puede identificar con pruebas bioquímicas, y es recomendable realizar pruebas genotípicas debido a su similitud.

Las cepas bacterianas de *Bacillus subtilis* y *Streptococcus viridans* fueron descongeladas según protocolo Sánchez y Corrales (2005), por presentar variabilidad en algunas pruebas bioquímicas. Después de este proceso se realizó de nuevo todo el proceso de identificación macroscópica y microbiológica. Los resultados más detallados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas en tubo a las cepas indeterminadas en el estudio.

CODIGO	MICROORGANISMO	TSI H2S CO2	INDOTILIDAD	BILIS ESCOLINA	GELATINA	C S	U R E A	ALMIDON	MANITOL	XILOSA	ARABINOSA	MALTOSA	GLUCOSA	SACAROSA	NA CL7.5%	NITRATOS
073	<i>Staphylococcus aureus</i>	A/A - -	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
076	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	A/A + -	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
078	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	A/A - -	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
079	<i>Staphylococcus sciuri</i>	A/A - -	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
080	<i>Staphylococcus warnerii</i>	K/K - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
081	<i>Staphylococcus cohnii</i>	A/A - -	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+

082	<i>Streptococcus agalactiae</i>	A/A - -	-	-	-	-	-	-	-	+	-	N.A	+	+	-	-
083	<i>Streptococcus pyogenes</i>	K/K - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.A	+	+	-	-
084	<i>Enterococcus faecalis</i>	A/A - -	-	+	-	-	-		+	-	-	+	+	+	+	+
085	<i>Enterococcus faecium</i>	A/A - -	-	+	-	-	-		+	-	-	+	+	+	+	+
088	<i>Streptococcus viridans</i>	K/K - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
091	<i>Listeria monocytogenes</i>	A/A - -	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
093	<i>Listeria innocua</i>	A/A - -	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
095	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	A/A - -	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+

100	<i>Bacillus subtilis</i>	A/A - -	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
102	<i>Bacillus cereus</i>	K/K - -	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
104	<i>Bacillus anthracis</i>	K/K - -	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	N.A
108	<i>Bacillus pumilus</i>	K/K - -	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	N.A	-	+	-	+

Nomenclatura: **N:** Resultado negativo, **P:** Resultado positivo, **V:** Resultado variable i/o indiferenciable, **H₂S:** Bacterias productoras de Ácido sulfhídrico, **TSI:** Hierro triple azúcar, **K/A:** Se observa tubo color violeta en la superficie y amarillo en el fondo, el color amarillo se debe a la fermentación de glucosa. Puede haber o no producción de gas. Se interpreta Lisina negativa. Quiere decir que no descarboxilo ni desamino la lisina. **K/K:** Se observa tubo color violeta, descarboxilación de la lisina con producción o no de gas. Se interpreta Lisina Positiva. **NA:** No aplica. **CS:** Simmons Citrato

FASE 3: Los resultados de la evaluación del producto extraído (ADN bacteriano) de las 19 bacterias y amplificado mediante PCR, con gel de agarosa al 2%, se corrió en el siguiente orden 1:*L. innocua* 2:*L. monocytogenes* 3:*S. warnerii* 4:*S. cohnii* 5:*S. aureus* 6:*S. epidermidis* 7:*S. saprophyticus* 8:*S. sciuri* 9:*B. subtilis* 10:*B. pumilus* 11:*E. faecalis* 12:*B. cereus* 13:*S. pyogenes* 14:*S. pneumoniae* 15:*C. diphtheriae* 16:*S. agalactiae* 17:*S. viridans* MP: Marcador de peso molecular 1500 pb, CN: Control negativo (H₂O desionizada). Pueden ser visualizados en la figura 8.

Dentro del corrido se evidencio que el pozo 8, correspondiente a *S. sciuri* no corrio, por lo cual no había material genético dentro de la muestra de la PCR amplificada, y se tuvo en cuenta para realizar una nueva PCR. La electroforesis se tiñeo con GelGreen Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in wáter (Probiotek) de ADN genómico extraído mediante el Kit Zymo Research Quick-DNA Universal, para todas las cepas bacterianas.



Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2% a partir de cultivos bacterianos. Autora Méndez, 2018

En la figura 9 se presentan 5 pozos los cuales contienen en el pozo 1: *S. sciuri* 2: *E. faecium* 3: *B. anthracis* MP: Marcador de peso molecular 1500 pb, CN: Control negativo (H₂O desionizada). En este segundo corrido se repitió la PCR con *S. sciuri*, se corrigió aumentando la concentración de ADN bacteriano para la PCR y *B. anthracis*, el cual corrió sin ningún problema.

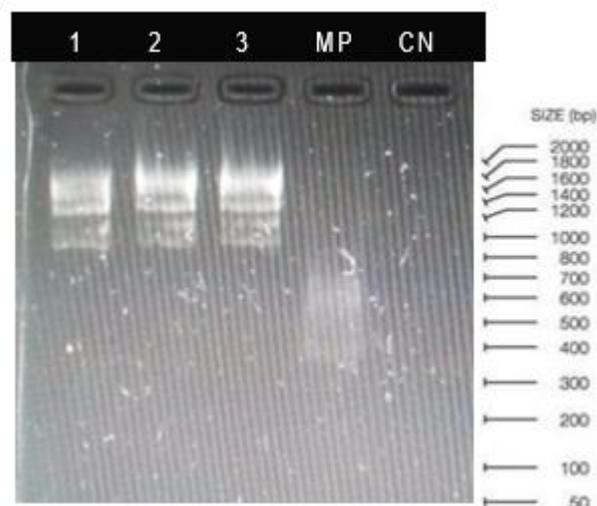


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% a partir de cultivos bacterianos (2) Autora Méndez, 2018

De las 19 cepas bacterianas estudiadas hasta esta fase en el proyecto, fueron escogidas 10 para secuenciar:

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus Saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium diphthiae* y *Bacillus subtilis*

En el caso de estas cuatro cepas *Staphylococcus Saprophyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Corynebacterium diphthriae* la secuenciación para el primer forward no se realizó debido a que el ADN presente en la muestra no registro tener más de 50pb, haciendo imposible la identificación molecular.

Las secuencias con altos porcentajes de similitud, finalmente fueron comparadas con las bases de datos pertenecientes al GenBank del NCBI (USA) con el algoritmo BLASTn, y así determinar género y especie de las bacterias estudiadas basándose en las bases de datos que contiene este programa, el cual puede ser consultado a nivel mundial y se agregan diariamente nuevos especímenes para enriquecer la información. En la tabla se presenta las 10 cepas bacterianas editadas, comparadas y confirmadas con BLAST. Ver tabla 6

Los resultados obtenidos tras la secuenciación se presentan como electroferogramas y pueden ser consultados en el Anexo 1

Tabla 7. Comparación de las bacterias Gram Positivas reconfirmadas por BBL Crystal y secuenciadas, editadas, comparadas y confirmadas con BBL Crystal y BLAST.

Código	Nombre de bacteria	Porcentaje identidad BBL Crystal	Bacteria reportada BBL Crystal	Dirección de la secuencia	Porcentaje de Identidad	Bacteria Reportada en Blast	Acceso Gen Bank
073	<i>Staphylococcus aureus</i>	99%	<i>Staphylococcus aureus</i>	Forward	99%	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ATCC 41577 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KF495200.1?report=genbank&log\$=nucleotide&blast_rank=3&RID=RTBP13DJ015
				Reverse	99%		
076	<i>Staphylococcus Saprophyticus</i>	99%	<i>Staphylococcus Saprophyticus</i>	Forward	<50pb	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. bovis strain 43Ls.4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KP745565.1?report=genbank&log\$=nucleotide&blast_rank=1&RID=RTE9T9W3014
				Reverse	99%		
				Forward	99%	<i>Staphylococcus</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/

078	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Reverse	99%	<i>S. epidermidis</i> strain CSF41498 chromosome, complete genome	m.nih.gov/nucleotide/CP030246.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=9&RID=RV86J7T6014
083	<i>Streptococcus pyogenes</i>	99%	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Forward Reverse	<50pb 100%	<i>Streptococcus pyogenes</i> M1 GAS, complete genome	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AE004092.2?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=1&RID=RVAX3NBV015
082	<i>Streptococcus agalactiae</i>	99%	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Forward	99%	<i>Streptococcus agalactiae</i> ILRI112 complete genome	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/HF952106.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=1&RID=RW7AN9Z4015
084	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%	<i>Enterococcus faecalis</i>	Forward	<50pb	No aplica	No aplica
090	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	99%	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Forward	99%	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain M26365 chromosome, complete	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP031248.1?report=genbank&log\$=nucltop&blast_rank=1&RID=RVAX3NBV015

						genome	=RW5YENKJ015
091	<i>Listeria monocytogenes</i>	99%	<i>Listeria monocytogenes</i>	Forward	<50pb	No aplica	No aplica
095	<i>Corynebacterium diphthiae</i>	85%	<i>Corynebacterium diphthiae</i>	Forward	<50pb	No aplica	No aplica
100	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillus subtilis</i>	Forward	99%	<i>Bacillus subtilis</i> strain Cu31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY085997.1?report=genbank&log\$=nucleotide&blast_rank=18&RID=RW886WVF015

5. DISCUSIÓN

Actualmente existen herramientas tecnológicas que facilitan la caracterización de los microorganismos por medio del ARN 16S, fragmento que estudiado en distintas investigaciones no presenta variabilidad en los ácidos nucleicos y por lo tanto es utilizado para los procesos de secuenciación, por estas características se encuentra viable para la identificación de las especies mencionadas en este estudio.³⁴

En este trabajo se busca confirmar las características macroscópicas y microscópicas y la identidad bioquímica de las 19 cepas bacterianas Gram positivas del Cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Por esta razón, se hizo una búsqueda amplia de estas características en textos científicos.

Las cepas bacterianas confirmadas bioquímicamente y que no presentaron variabilidad en sus características macroscópicas fueron 17 de un total de 19, exceptuando *Corynebacterium --diphtheriae* y *Listeria monocytogenes*, que presentaron porcentajes bajos en las pruebas rápidas BBL Crystal.

Las bacterias que fueron confirmadas y por lo tanto, presentaron concordancia entre los resultados bioquímicos y genéticos fueron: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*, *S. aureus*

Las cepas del género *Staphylococcus* secuenciadas fueron *S. aureus* (073), *S. saprophyticus* (076), *S. epidermidis* (078). Para el perfil bioquímico en el caso de *S. aureus* se obtuvo un porcentaje del 99% en las pruebas rápidas, confirmado

con pruebas de tubo sustentado en la literatura. De las cepas de *saprophyticus* (078), *S. epidermidis* (078) se obtuvieron pruebas específicas como novobiocina que permitieron diferenciar entre las dos especies y su comportamiento bioquímico.³⁶ En la caracterización molecular las cepas 073,076 y 078 presenta un nivel de similitud del 99% comparada con las bases de Datos BLAST, como lo comenta Shukla et al (078).³⁵

Bosshard, comenta que en grandes laboratorios y en corporaciones de investigación muchas veces por presupuesto usan solo una secuencia, bien sea Forward o Reverse para identificar las cepas, pero aumenta el rango de inespecificidad en un 47%. Para este estudio las cepas *S. aureus* (073), *S. saprophyticus* (076), *S. epidermidis* (078) e incluida *Streptococcus pyogenes* se hicieron las dos secuencias Forward y Reverse, con el fin de obtener un rango más amplio de exactitud y de esta manera identificar correctamente la bacteria.³⁶

Por otro lado, las especies del género de *Staphylococcus*, identificadas como *S. sciuri* (079), *S. warnerii* (080), *S. cohnii* (081), se dejaron a una temperatura de 4°C para mandar a realizar el proceso de secuenciación, por tanto no se obtienen resultados en el BLAST en este estudio. Sin embargo, el perfil bioquímico que se obtuvo de la cepa 079 sustentada por Dakic et al.³⁷ es muy similar al de la cepa 080, varia en que la 079 puede hidrolizar esculina las demás pruebas son las mismas que sustenta Kuvhenguhwa et al.³⁸ Por lo cual se recomienda realizar BBL Crystal para obtener una similitud >95% o caracterizar estas especies. Zawahry et al.³⁹ sustentan que *S. cohnii* se diferencia por tener la enzima ureasa de las demás especies.

Cabe resaltar la importancia de la secuenciación forward (16S-8F) y su complemento reverse (16S-1492R) simultanea, para aumentar la especificidad,

que puede llegar a ser baja en la secuenciación, al realizarse solo una de ellas secuenciaciones pueden no obtenerse buenos resultados. Por tanto se debe recordar que en este estudio de las 14 secuenciaciones realizadas para *Enterococcus faecalis* (084), *Streptococcus pneumoniae* (090), *Streptococcus agalactiae* (082), *Corynebacterium diphtheriae* (095), *Listeria monocytogenes* (091) y *Bacillus subtilis* (100), en total 6 bacterias de las 10 caracterizadas se secuenciaron únicamente con el primer forward (16S-8F).

Uno de los resultados que no fue acorde con lo planteado fenotípicamente, fue el caso de la cepa 090 (*S. pneumoniae*) la cual no logro ser identificada por el sistema BBL Crystal, pero al realizar la prueba de sensibilidad a la optoquina los resultados confirmaron su similitud, como lo citan (M. Martínez y G. Ortiz) ⁴⁰ Al secuenciar utilizando el primer 16S-8F su identidad en el BLAST fue del 99%, confirmando género y especie de la cepa a disposición. En el caso de *S. viridans* (088), se obtuvo un porcentaje del 99% para la identificación fenotípica, sin embargo, las muestras como en otros casos se dejaron listas para secuenciar a 4°C, sin obtener resultados genotípicos para este estudio.

Otras especies caracterizadas fueron *S. agalactiae* (082) y *S. pyogenes* (083), se obtuvieron los resultados fenotípicos postulados por Crespo et al. ⁴¹ y Guerrero et al. ⁴² resaltando la prueba de CAMP positivo (082). La identificación por BBL Crystal fue del 99% de confiabilidad para las dos especies.

En los resultados del Blast se obtuvo para la cepa 082 una similitud del 99%. La cepa (083) presento una similitud del 99% con el primer reverse, mientras con el primer forward el ADN arrojó 60pb cantidad muy baja para la caracterización.

En el caso de las cepas de *Listeria* no se obtuvieron resultados genotípicos en el caso de *L. monocytogenes* (091) se realizó la secuenciación del

fragmento16S-8F, con el ADN purificado, este análisis arrojó que se trataba de un género diferente *Staphylococcus equorum* strain KS1039, complete genoma con una similitud del 93% en el BLAST; sin embargo las pruebas macroscópicas y microscópicas y un % de 99 de confirmación en el BBL Crystal indicaba que se trataba de la cepa 091 (2). Se recomienda según el instituto de investigaciones biomédicas “Alberto Solís”, realizar una nueva extracción de ADN, ya que muy posiblemente hubo contaminación cruzada en este procedimiento. Se debe partir de la cepa ya identificada fenotípicamente correctamente o del vial. Sin embargo, puede haber interferencias y deben tenerse en cuenta al realizar nuevamente su caracterización. ⁴³

Por otro lado, la cepa de *L. innocua* (093) presentó pruebas bioquímicas en el BBL cristal con un 99% de confiabilidad para *L. monocytogenes* y en tubo correspondientes a este microorganismos, revisadas y mencionadas por Milillo et al. ⁴⁴ Presentó una variación con respecto a *L. monocytogenes* en la fermentación de sacarosa. Por tanto, es recomendable realizar la genotipificación ya que permitirá que la cobertura que se refiere al número de veces que se secuencia un mismo fragmento permita detectar los polimorfismos.

Para las bacterias del género *Bacillus*, se ha realizado caracterización genotípica con un porcentaje de identidad del 99% para la cepa de *B. subtilis* (100) y un BBL Crystal con un 98% de confiabilidad para el mismo, coincidiendo su bioquímica con lo mencionado por corrales et al ³⁵ y Williams ⁴⁵. Para las demás especies de *Bacillus*, se realizaron pruebas bioquímicas y se dejaron preparadas para realizar la secuenciación.

En la prueba de BBL Crystal se obtuvo para *B. cereus* (102) una confiabilidad del 99%, para *B. anthracis* <95% y para *B. pumilus* una confiabilidad del 99.9%,

mientras que en las baterías de identificación bioquímica fueron idénticas para estas tres cepas, sin posibilidad de identificarlas, se realizó una búsqueda en las investigaciones realizadas por Mamou et al. ⁴⁶, Tena et al ⁴⁷ y las diferencias no son representativas. Por lo cual, la identificación genotípica se hace muy útil en este caso aportando al cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Por otro lado, la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* (095), presento bajos porcentajes en las identificaciones. Para la prueba de BBL Crystal obtuvo un 85%. Este se divide en cuatro biovares: gravis, intermedius, mitis y belfanti. La diferenciación bioquímica depende del operador, siendo la caracterización genómica más confiable. Es una especie genéticamente diversa. Mencionado por Tapia et al. ⁴⁸ La secuenciación fallo ya que en el producto se encontró un producto con 50pb lo que no permite un resultado confiable. Por lo cual se recomienda realizar de nuevo una electroforesis, indicando que el corrido se vea claro y corra entre 1800-2000pb.

Por el lado del género de los *Enterococcus*, se secuenció *E. faecalis* (084), pero los resultados arrojaron que el producto contaba con 60pb dificultando la identificación. Con las pruebas bioquímicas, se encontró un 99% de confiabilidad; para *E. faecium* (085) no se realizó una genotipificación, pero dentro del perfil bioquímico descrito por Fernández et al. ⁴⁹. Coincidió con estos postulados presentando un 99% de confiabilidad y una hidrólisis de esculina característica de este género.

Finalmente, se sugiere para mejora del Cepario realizar las secuenciaciones de los productos faltantes y como se mencionaba, en lo posible, que sea de ambos fragmentos Forward y Reverse. Tener en cuenta el proceso y resultados

obtenidos en esta investigación para la continuación de este proceso La codificación de todas las cepas, el registro de la información de los comportamientos variables a nivel metabólico que se reportaron en esta investigación.

6. CONCLUSIONES

Fueron identificadas 7 bacterias Gram positivas pertenecientes a la colección de cultivos de microorganismos de la universidad colegio mayor de Cundinamarca, mediante técnicas moleculares y bioquímicas (*Staphylococcus aureus* strain ATCC 41577, *Staphylococcus saprophyticus* subsp. bovis strain 43Ls, *Staphylococcus epidermidis* strain CSF41498, *Streptococcus pyogenes* M1 GAS, *Streptococcus agalactiae* ILRI112, *Streptococcus pneumoniae* strain M26365, *Bacillus subtilis* strain Cu31).

Fueron identificadas 12 bacterias Gram positivas pertenecientes a la colección de cultivos de microorganismos de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, mediante pruebas bioquímicas y se dejan pendientes para enviar a secuenciar (*Staphylococcus sciury*, *Staphylococcus warnerii*, *Staphylococcus cohni*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus viridans*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus pumilus*)

La caracterización molecular de las cepas, suministró información encontrada en este proyecto a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, con la cual el cepario fortalece sus bases, dando solución al planteamiento del problema inicial y cumpliendo el principal objetivo de la investigación. Esta información, finalmente contribuirá a que el Cepario en un futuro, pueda ser registrado ante el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

BIBLIOGRAFIA

1. Rodicio M, Mendoza M. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. [Internet] 2004; 22 (4): 238-245. [Consultado 2017 Mar 15]. Disponible en:
<http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-identificacion-bacteriana-mediante-secuenciacion-del-13059055>
2. Valenzuela F, Casillas R, Villalpando E, Vargas F. The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*. [Internet] 2015; 41 (4): 297-313. [Consultado 2017 Mar 15]. Disponible en:
<http://www.scielo.org.mx/pdf/ciemar/v41n4/0185-3880-ciemar-41-04-00297-en.pdf>
3. Jensen, T. G., Konradsen, H. B., & Bruun, B. (1984). Evaluation of the Rapid ID 32 Strep system. *Clinical Microbiology and Infection*, 5(7), 417–423. [Consultado 2018 Abr 15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7814506>
4. Knapp C., Ludwig M. y Washington J. Evaluation of BBL Crystal MRSA ID System. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994. 32 (10); 2588-2589 [Consultado 2018 Abr 15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7814506>
5. Baum H., Klemme F, Geiss HK, Sonntag H. Comparative evaluation of a commercial system for identification of gram-positive cocci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998 Dec;17(12):849-52. [Consultado 2018 Abr 15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10052548>
6. Bosshard P, Abels S, Zbinden R, Bottger EC, y Altwegg M. Secuenciación de DNA ribosómico para identificación de aeróbico
7. Bacilos grampositivos en el Laboratorio Clínico (Una Evaluación 18 meses). Instituto de Microbiología Médica, Universidad de Zurich, 2003. 41(9);4134-4140. [Consultado 2018 Abr 15].
8. Mignard S, Flandrois J.P. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *J Microbiol Methods*. 2006 Dec;67(3):574-81. [Consultado 2018 Abr 15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16859787>

9. Barb JJ, Oler AJ, Kim SA, Chalmers N, Wallen GR, Cashion A, et al. Caracterización de múltiples regiones hipervariables de 16S rRNA utilizando muestras simuladas. Desarrollo de un análisis de tuberías PLoS ONE 11 (2): e0148047. doi:10.1371 / journal.pone.0148047
10. Deutscher A, Burke M., Darling Aa, Riegler M, Reynolds O and Chapman T. Near full-length 16S rRNA gene next-generation sequencing revealed *Asaia* as a common midgut bacterium of wild and domesticated Queensland fruit fly larvae. 2018 Microbiome 6(85): 2-22. [Consultado 2018 Abr 15]. <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-018-0463-y>
11. Patrick C, et al. Usefulness of the MicroSeq 500 16S Ribosomal DNA-Based Bacterial Identification System for Identification of Clinically Significant Bacterial Isolates with Ambiguous Biochemical Profiles. J Clin Microbiol. [Internet] 2003; 41(5): 1996–2001. [Consultado 2017 Mar 15]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154750/>
12. Colombia. Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible. Decreto 1375 de 2013, junio 27, por el cual se reglamentan las colecciones biológicas. Bogotá: El ministerio 2013.
13. Colombia. Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible. Decreto 1376 de 2013, junio 27, por el cual se reglamenta el permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial. Bogotá: El ministerio 2013.
14. Barb JJ, Oler AJ, Kim SA, Chalmers N, Wallen GR, Cashion A, et al. Caracterización de múltiples regiones hipervariables de 16S rRNA utilizando muestras simuladas. Desarrollo de un análisis de tuberías PLoS ONE 11 (2): e0148047. doi:10.1371 / journal.pone.0148047
15. Deutscher A, Burke M., Darling Aa, Riegler M, Reynolds O and Chapman T. Near full-length 16S rRNA gene next-generation sequencing revealed *Asaia* as a common midgut bacterium of wild and domesticated Queensland fruit fly larvae. 2018 Microbiome 6(85): 2-22. [Consultado 2018 Abr 15].

<https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-018-0463-y>

16. Gutiérrez-Jiménez; Luna L, Mendoza M, Díaz G, Gutiérrez B, Feliciano J. Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. [Internet] 2015; 35:95-102. [Consultado 2017 Mar 21]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Javier_Gutierrez-Jimenez/publication/293213124_Organizacion_mantenimiento_y_preservacion_de_la_coleccion_de_cultivos_bacterianos_del_Instituto_de_Ciencias_Biologicas_de_la_Universidad_de_Ciencias_y_Artes_de_Chiapas_UNICACH_Mexico/links/56b6b3a908ae5ad36059b72a.pdf
17. Navarro A; Townsend A, Nakazawa Y, Liebig I. Colecciones biológicas, modelaje de nichos ecológicos y los estudios de la biodiversidad. Researchgate. [Internet] 2017; 115-122. [Consultado 2017 Mar 23]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Andrew_Peterson10/publication/230709870_Colecciones_biologicas_modelaje_de_nichos_ecologicos_y_los_estudios_de_la_biodiversidad/links/589bdfc192851c942ddaf62c/Colecciones-biologicas-modelaje-de-nichos-ecologicos-y-los-estudios-de-la-biodiversidad.pdf
18. Simmons J, Muñoz Y, Cuidado, Manejo y Conservación de las Colecciones Biológicas. [Internet]. Bogotá D.C., Panamericana formas e Impresos S.A., 2005. [Fecha de acceso 28 de marzo de 2017]. Disponible en: http://www.ibiologia.unam.mx/pdf/directorio/c/cervantes/clases/sistem/Cuidado_Manejo_y_Conservacion_de_las_Colecciones_Biologicas.pdf
19. Cifuentes L, Quispe I. Manual de Prácticas de Microbiología del Cepario del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Pedagógica Nacional [línea de investigación biotecnología y educación]. Bogotá D.C: Universidad Pedagógica Nacional.; 2014.
20. Parra S, Pérez M, Morales M, Suárez Z, Montoya D. Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de

- Colombia (IBUN). Nova-publicación científica. [Internet]. 2006; 4(5); 39-49. [Consultado 2017 Mar 30]. Disponible en:
http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTORIG3_5.pdf
21. Olaya D, Pérez D. Colección digital de microorganismos del cepario de bacterias de la pontificia universidad javeriana. [Profesional en Ciencia de la Información - Bibliotecólogo]. Bogotá D.C: Pontificia universidad javeriana; 2014.
 22. Fernández A, García C, Saéz J, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica. Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón. 2010
 23. Stephen J. Salipante et al. Rapid 16S rRNA Next-Generation Sequencing of Polymicrobial Clinical Samples for Diagnosis of Complex Bacterial Infections. PLoS ONE [Internet]. 2013; 8(5): e65226. [Consultado 2017 Mar 31]. Disponible en:
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0065226>.
 24. Janda J, Abbott S. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. J Clin Microbiol. [Internet]. 2007; 45(9); 2761-2764. [Consultado 2017 abr 15]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2045242/>
 25. Olarte N et al. Colonización por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en una unidad de cuidados intensivos de adultos de un hospital colombiano: caracterización fenotípica y molecular con detección de un clon de circulación en la comunidad. Biomedica. [Internet]. 2010; 30(3). [Consultado 2017 abr 15]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572010000300008.
 26. Sánchez L, Corrales L. Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. Nova- publicación científica [internet]. 2005; 3(3); 109-113. [Consultado 2017 Abr 15]. Disponible en:
http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ENSAYO1_3.pdf
 27. Sánchez L, Corrales L. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Nova-publicaciones científicas [Internet]. 2005; 3(4); 21-29. . [Consultado 2017 Abr 15]. Disponible en:
http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTORIG2_4.pdf

28. Guillén L, Millán B, Araque M. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. Elsevier España. [Internet]. 2014; 18(3); 100-108. . [Consultado 2017 Abr 25]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v18n3/v18n3a05.pdf>
29. Nir Dover, Barash J, Hill K, Xie G, Arnon S. Molecular Characterization of a Novel Botulinum Neurotoxin Type H Gene. J Infect Dis. [Internet]. 2014; 209(2); 192-202. [Consultado 2017 Abr 25]. Disponible en: <https://academic.oup.com/jid/article/209/2/192/828352/Molecular-Characterization-of-a-Novel-Botulinum>
30. Ocampo A, Vargas C, Sierra P, Cienfuegos A, Jiménez J. Caracterización molecular de un brote de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos en un hospital de alto nivel de complejidad de Medellín, Colombia. Biomedica. [Internet]. 2015; 35; 496-504. [Consultado 2017 Abr 25]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v35n4/v35n4a07.pdf>
31. Pieniz S, Andrezza R, Okeke B, Camargo F, Brandelli A. Antimicrobial and antioxidant activities of Enterococcus species isolated from meat and dairy products. Braz. J. Biol. [Internet]. 2015; 75(4); 923-931. [Consultado 2017 Abr 25]. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842015000600923
32. Orjuela O, Vélez A, Gallego C. Bacteriología aplicada manual de procedimientos. Colombia. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 2008
33. Corrales L, Avila S, Estupiñan S. Bacteriología teoría y práctica. Colombia. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 2013
34. Koneman N et al.. Diagnostico microbiológico: Texto y atlas en color 6ta edición. Editorial medica pana americana. 2006
35. Corrales L. Sánchez L, Arévalo Z. Moreno V. Bacillus: Género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. NOVA. 2014. 12(22). [Consultado 2018 Ago 5]. Disponible en: <http://www.unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/276/529>

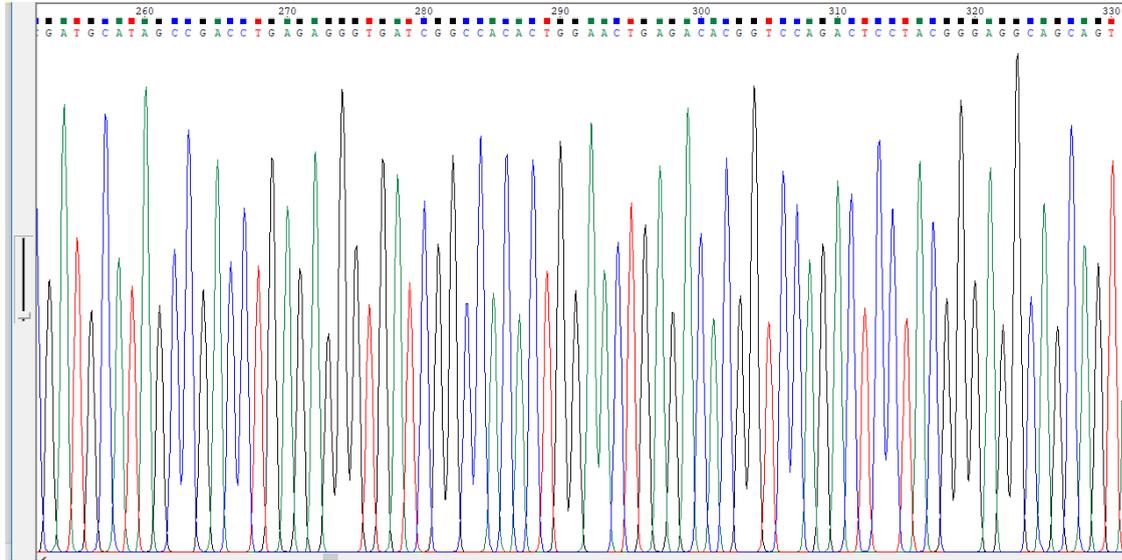
36. Rodríguez M, Lin S, González J. Foliculitis infecciosas estafilocócicas. (Parte II). 2017. Rev Cent Dermatol Pascua. 26(3):92-95. [Consultado 2018 Ago 5]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/derma/cd-2017/cd173b.pdf>
37. Kuvhenguhwa M, Belgrave K, Shah S, Bayer A, and Miller L. A Case of Early Prosthetic Valve Endocarditis Caused by *Staphylococcus warneri* in a Patient Presenting With Congestive Heart Failure. *Cardiol Res.* 2017 Oct; 8(5): 236–240. [Consultado 2018 Ago 5]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5667712/>
38. Martínez M. Ortiz G. Seminario de graduación para optar al título de la Licenciatura en Bioanálisis Clínico. 2014 Director: Arbizu O. Managua Nicaragua.
39. Crespo MP, Vélez J. Importancia clínica del *Streptococcus agalactiae* como causante de infección. 1996. *Colombiamedica.* 27(2). [Consultado 2018 Ago 5]. Disponible en: <http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/19/14>
40. Guerrero S., Marín F. Enfermedad invasora por *Streptococcus pyogenes* como coinfección en un paciente con influenza A H1N1. 2015. *Rev. méd. Chile.* 143 (8): 1070-1075. [Consultado 2018 Ago 5]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v143n8/art16.pdf>
41. Martínez M. Ortiz G. Seminario de graduación para optar al título de la Licenciatura en Bioanálisis Clínico. 2014 Director: Arbizu O. Managua Nicaragua.
42. Servicio de secuenciación automática. Instituto de investigaciones Biomedicas "Almerto Solis". PDF 1-18.
43. L. Eguiarte, A. Aguirre, J. Barbolla, E. Aguirre, Genómica de Poblaciones: Nada en Evolución va a tener sentido si no es a la luz de la Genómica, y nada en Genómica tendrá sentido si no es a la luz de la Evolución, [Internet], TIP Volume 16, Issue 1, 2013, [Citado 2 Feb de 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1405888X13720771>
44. Padmapriya M. and Williams C. Purification and characterization of neutral protease enzyme from *Bacillus Subtilis*. *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 2012, 2

- (4):612-618. [Consultado 2018 Ago 5]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/318452212_Purification_and_characterization_of_neutral_protease_enzyme_from_Bacillus_Subtilis
45. Mamou G. Mohan G. Rouvinski A. Rosenberg A. Yehuda S. Early Developmental Program Shapes Colony Morphology in Bacteria. 2016. Cell Reports. 14(8): 1850-18575. [Consultado 2018 Ago 5]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221112471630064X>
46. Tena D. Cutaneous Infection Due to Bacillus pumilus: Report of 3 Cases. Clinical Infectious Diseases, 44(4), 2007:40–e42. [Consultado 2018 Ago 5]. Disponible en: <https://academic.oup.com/cid/article/44/4/e40/342766>
47. Tapia C. Stuardo C. Troncoso R. Corynebacterium diphtheriae no toxigénico Rev. chil. infectol. 35 (2). 2018. [Consultado 2018 Ago 5]. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S071610182018000200189&script=sci_arttext&tlng=es
48. Flores E., Albarado L. Ciclo celular por Gram y tinción de fluorescencia modificada en bacterias con aspecto morfotintorial semejante a Neisseria gonorrhoeae aisladas de muestras perianales y uretrales. NOVA. 2009. 7(11): 27-33. [Consultado 2018 Ago 5]. Disponible en: <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/6625>
49. L. Eguiarte, A. Aguirre, J. Barbolla, E. Aguirre, Genómica de Poblaciones: Nada en Evolución va a tener sentido si no es a la luz de la Genómica, y nada en Genómica tendrá sentido si no es a la luz de la Evolución, [Internet], TIP Volume 16, Issue 1, 2013, [Citado 2 Feb de 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1405888X13720771>

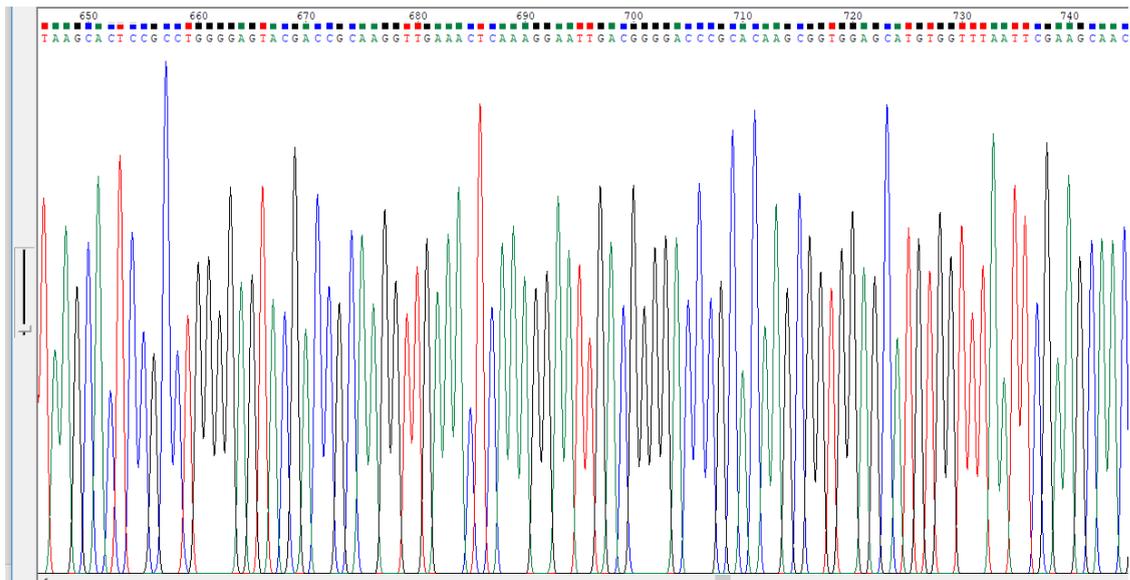
ANEXOS

ANEXO 1. Resultado de la secuenciación representado en electroferogramas previamente editados por la autora para cada secuencia.

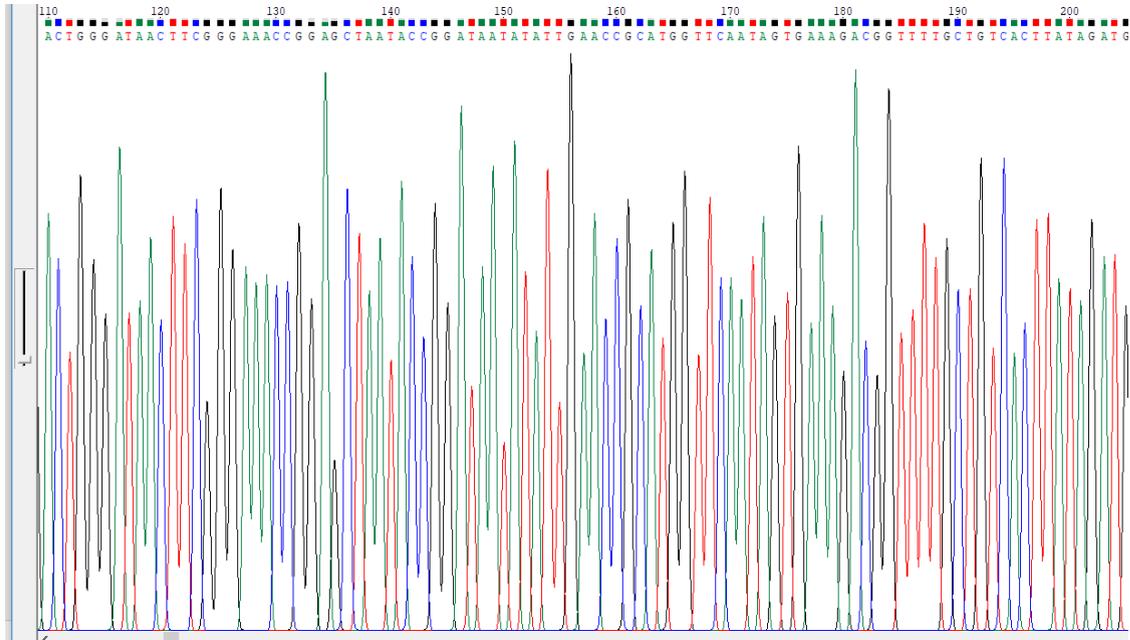
Secuencia1 *Staphylococcus* sp. CAS513-86-0-HNYZ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.16S-8F



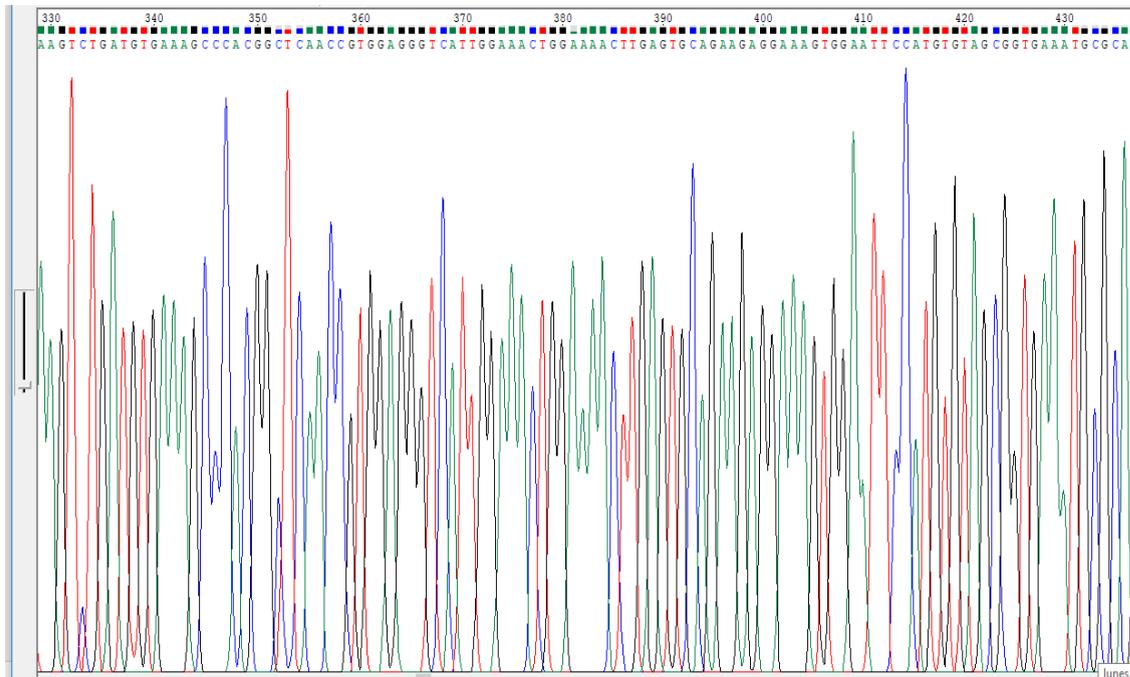
Secuencia2 *Staphylococcus aureus* strain LZ-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. 16S-1492R



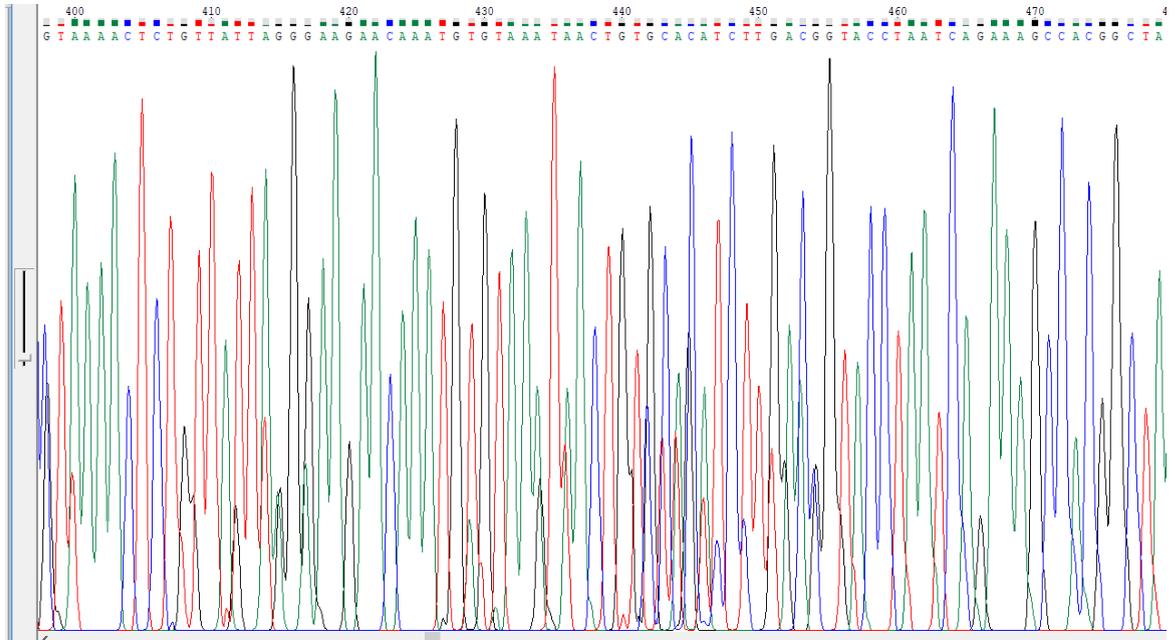
Secuencia3 *Staphylococcus epidermidis* strain CM2_AKZM_29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. 16S-8F



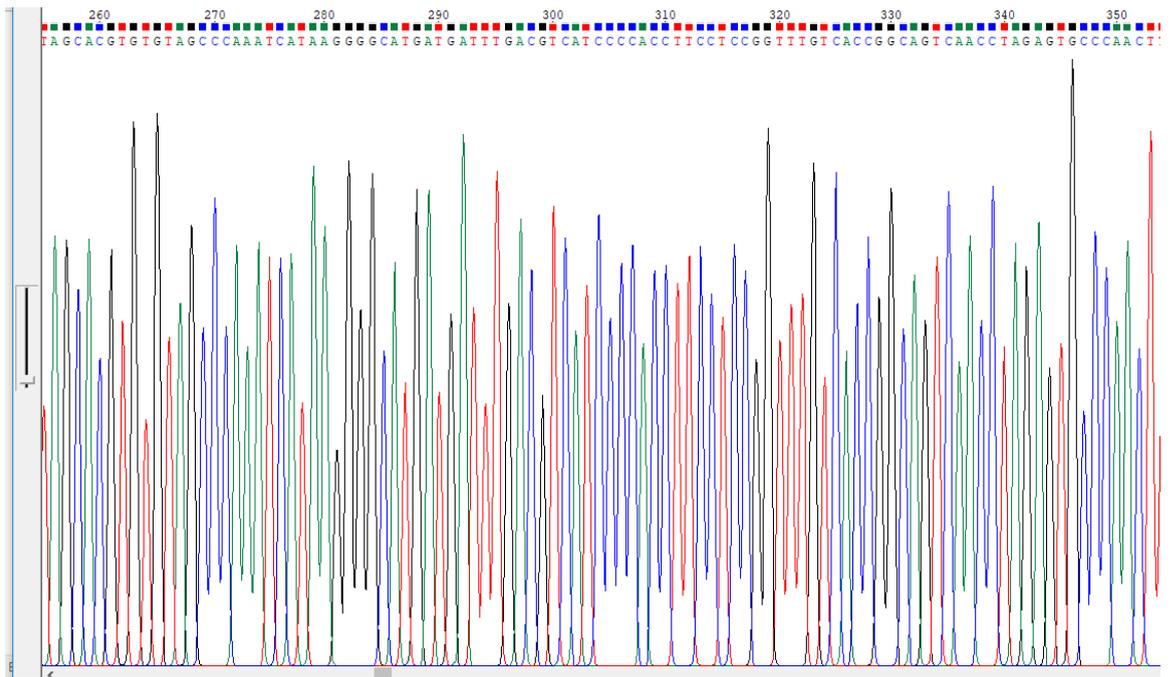
Secuencia4 *Staphylococcus epidermidis* strain 200 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 16S-1492R



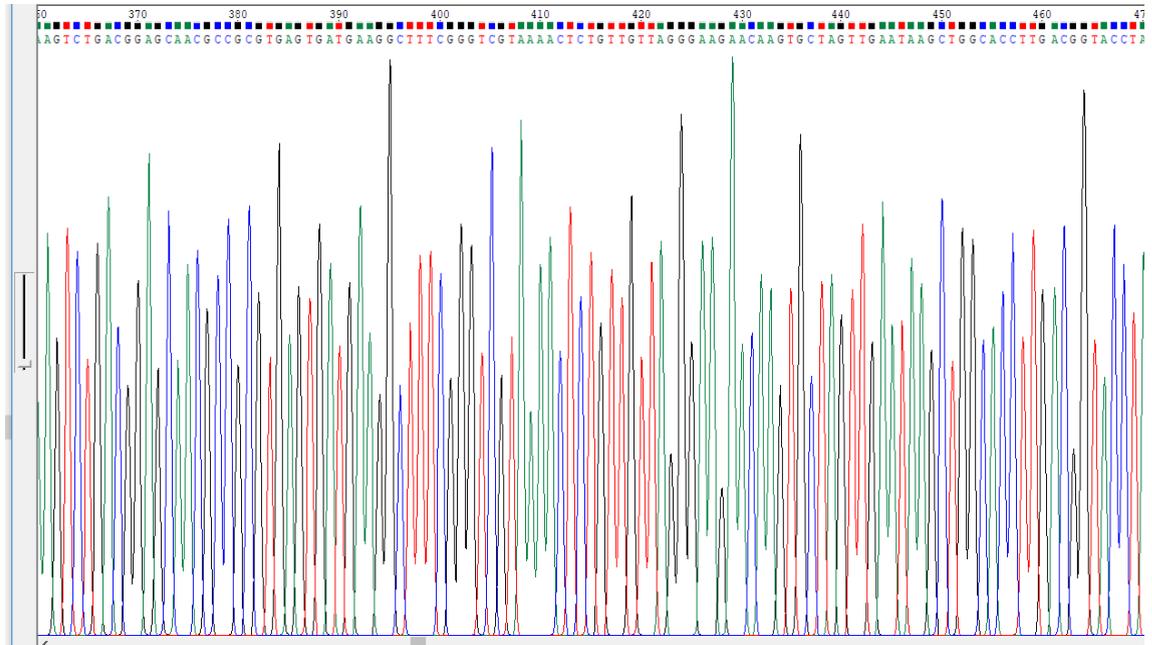
Secuencia5 *Staphylococcus* sp. NCCP-647 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence



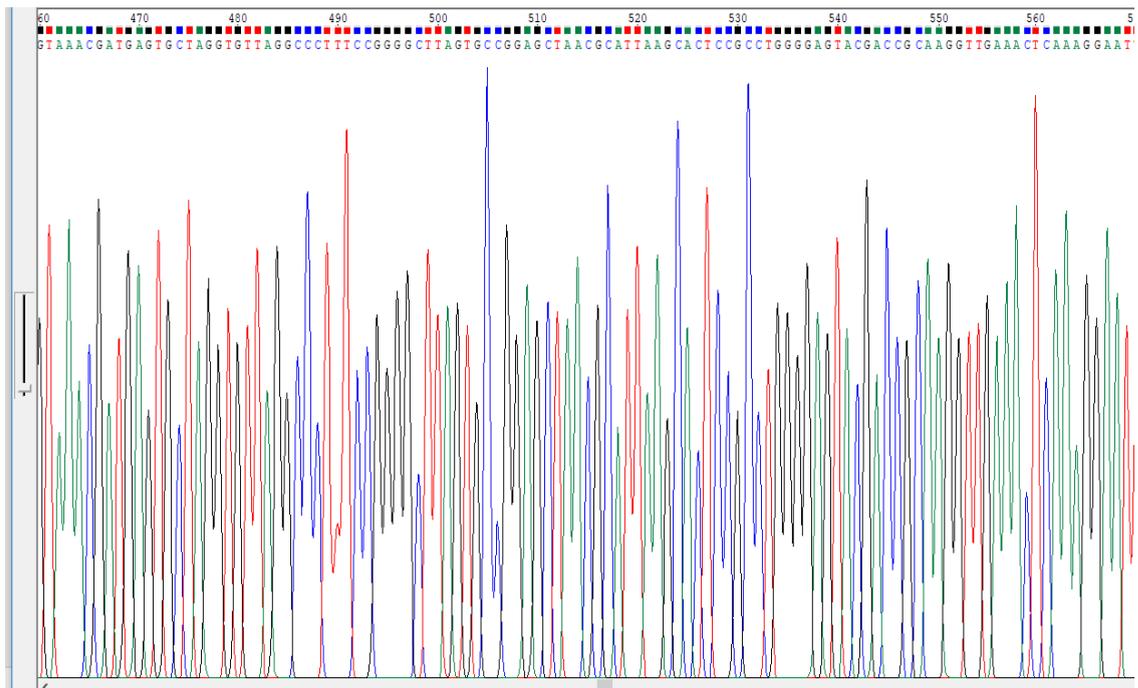
Secuencia6 *Staphylococcus saprophyticus* subsp. bovis strain 43Ls.4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. 16S-1492R



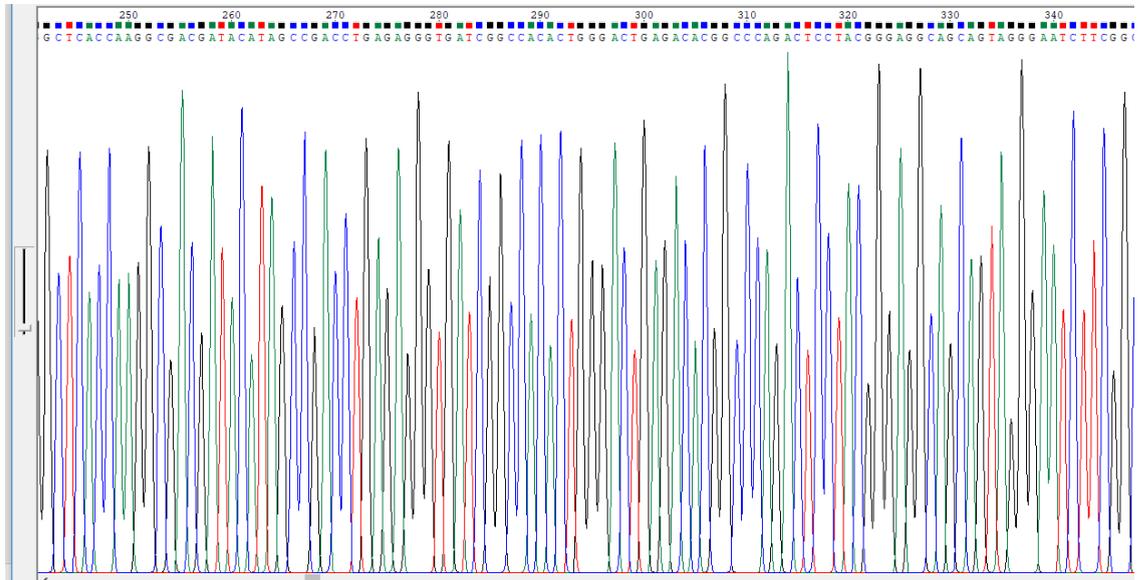
Secuencia7 *Bacillus subtilis* strain Cu31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 16S-8F



Secuencia8 *Streptococcus pyogenes* M1 GAS, complete genome. 16S-1492R



Secuencia 9 *Streptococcus pneumoniae* strain M26365 chromosome, complete genome. 16S-8F



Secuencia 10 *Streptococcus pneumoniae* strain M26365 chromosome, complete genome. 16S-8F

