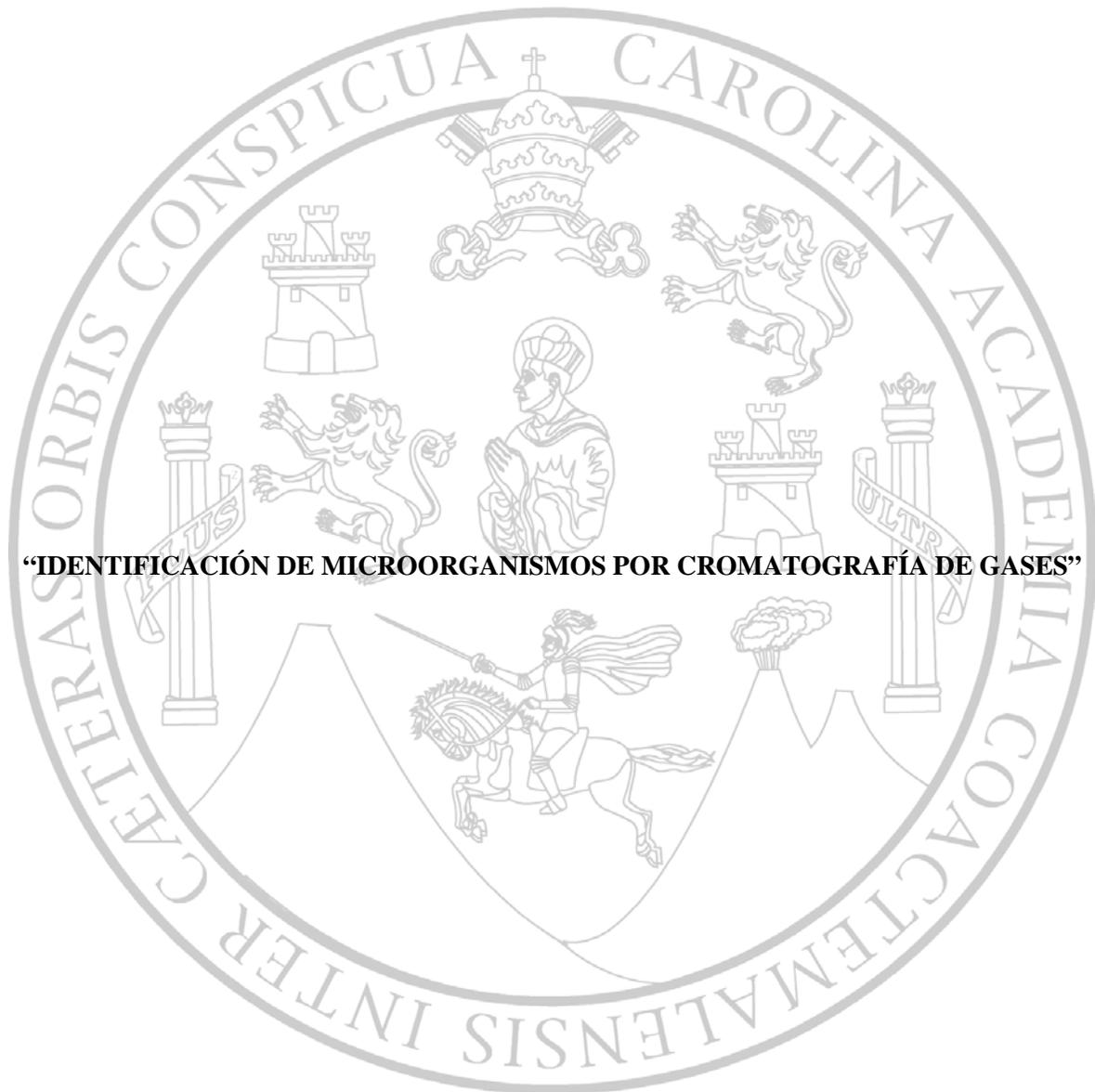


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

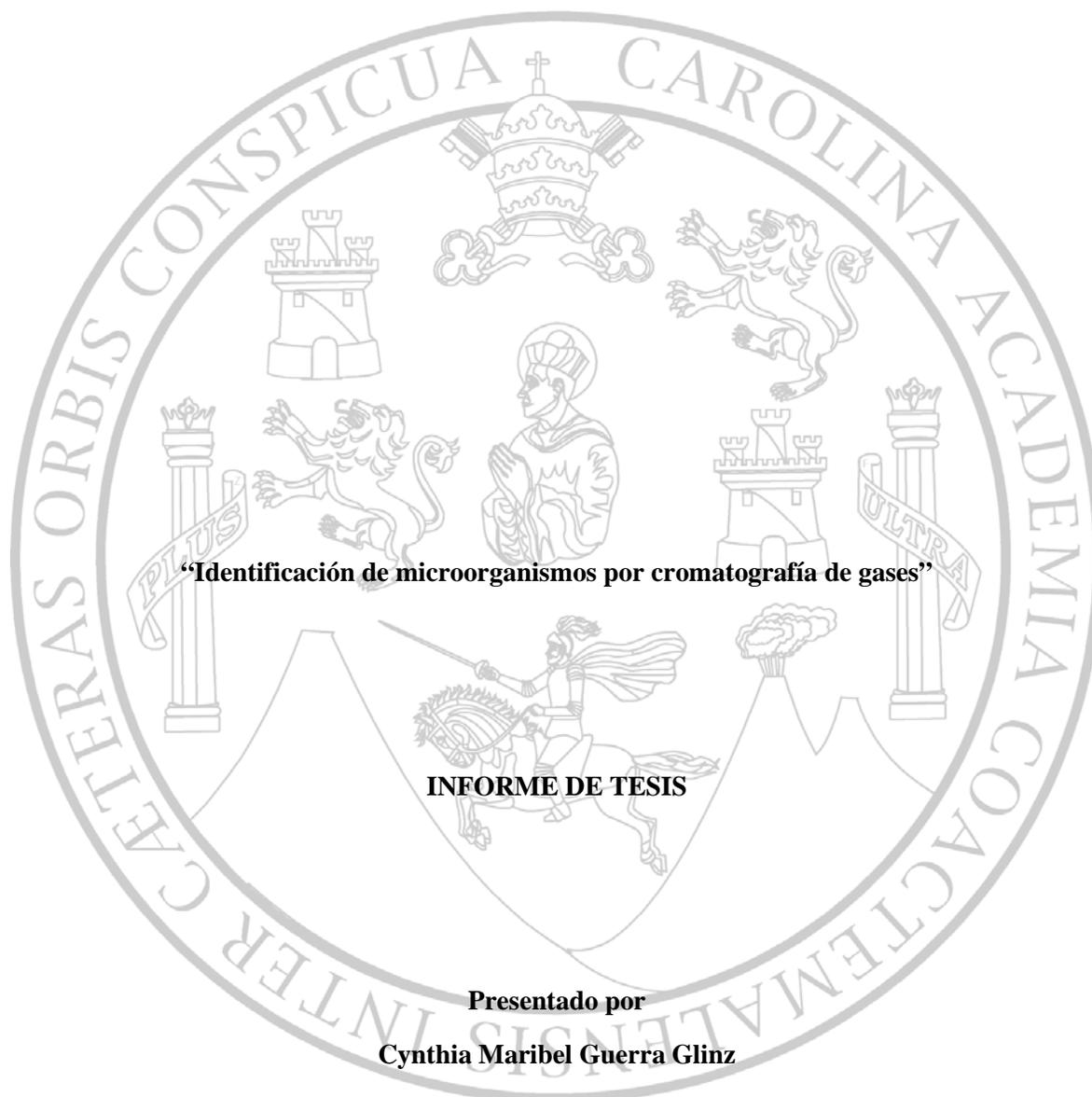


Cynthia Maribel Guerra Glinz

Química Farmacéutica

Guatemala, octubre de 2015

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



“Identificación de microorganismos por cromatografía de gases”

INFORME DE TESIS

Presentado por
Cynthia Maribel Guerra Glinz

Para optar al título de
Química Farmacéutica

Guatemala, octubre de 2015

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretario
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Br. Michael Javier Mó Leal	Vocal IV
Br. Blanqui Eunice Flores De León	Vocal V

ACTO QUE DEDICO A:

MI MADRE

Miriam Maribel Glinz Palencia por haber sido fuente de inspiración para alcanzar todas las metas en mi vida, gracias por haber estado siempre para mí.

MI PADRE

Mario Ernesto Guerra por haber estado pendiente de mi bienestar, por tu cariño y tus consejos.

MI ABUELITA

María Claribel Palencia, por haberme cuidado desde pequeña, estar pendiente que no me faltara nada, por todo tu amor y entrega.

MI ESPOSO

Pablo Solares Castillo, por siempre apoyarme incondicionalmente e instarme alcanzar mis metas y objetivos en todo momento.

MIS AMIGOS

Por apoyarme en todo momento, dándonos ánimos para cumplir nuestros objetivos y siempre estar ahí, en los momentos que se necesitan palabras de apoyo.

AGRADECIMIENTO A:

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE
GUATEMALA**

Por ser mi casa de estudios durante estos maravillosos años, dándome la oportunidad de crecer como profesional.

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y
FARMACIA**

Por ser el centro de enseñanza en estas bellas ciencias Farmacéuticas, que me ha dado las herramientas para desarrollarme como profesional.

MI ASESOR

Lic. Abraham Vásquez Mencos por toda la paciencia y el tiempo dedicado durante esta valiosa experiencia.

INDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES	3
1. Bacteria	3
2. Composición de la pared bacteriana	3
2.1 Composición química de la capa de lipopolisacáridos	4
3. Descripción de microorganismos seleccionados	5
3.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	5
3.1.1 Tratamiento antibiótico	6
3.2 <i>Salmonella enteritidis</i>	6
3.2.1 Tratamiento antibiótico	7
3.3 <i>Salmonella typhi</i>	8
3.3.1 Tratamiento antibiótico	8
3.4 <i>Neisseria meningitidis</i>	9
3.3.1 Tratamiento antibiótico	10
3.5 <i>Enterococcus faecalis</i>	11
3.5.1 Tratamiento antibiótico	11
3.6 <i>Shigella flexnerii</i>	12
3.6.1 Tratamiento antibiótico	13
3.7 <i>Listeria monocytogenes</i>	14
3.7.1 Tratamiento antibiótico	14
4. Métodos actuales para la identificación de microorganismos	15
4.1 Identificación fenotípica	15
4.2 Identificación mediante fagos específicos	16
4.3 Identificación genotípica	17
4.4 Sondas de ácidos nucleicos	17
4.5 Amplificación de secuencias de ADN específicas	18
5. La Cromatografía	18
5.1 La cromatografía como técnica analítica	18
5.2 La cromatografía de gases (CG)	19

5.2.1	Columna capilar	20
5.2.2	Detector	20
5.3	La identificación de microorganismos por CG	20
6.	Estudios previos	20
IV.	JUSTIFICACIÓN	22
V.	OBJETIVOS	23
VI.	HIPÓTESIS	24
VII.	MATERIALES Y MÉTODO	25
1.	Universo y muestra	25
2.	Materiales	25
3.	Método	26
3.1	Diseño de la Investigación	27
3.2	Procedimiento	27
VIII.	RESULTADOS	30
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	32
X.	CONCLUSIONES	35
XI.	RECOMENDACIONES	36
XII.	REFERENCIAS	37
XIII.	ANEXOS	39

I. RESUMEN

El presente trabajo de tesis tiene como principal objetivo determinar un método de identificación rápida de especies de bacterias por Cromatografía de Gases, conociendo los perfiles cromatográficos de cinco cepas de bacterias ATCC.

Esto es debido a que en la actualidad, la identificación de microorganismos patogénicos como bacterias se realiza por medio de cultivos en distintos tipos de agar, según sea necesario, los cuales demoran entre 24 a 72 horas, dependiendo del tipo de microorganismo que se desee aislar. Esta demora en la identificación y diagnóstico de la enfermedad puede tener consecuencias negativas directas en la salud de los pacientes.

Para la elaboración de este estudio, se realizó el análisis de los cromatogramas obtenidos por Cromatografía de Gases (CG) de las muestras de los microorganismos ATCC *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria meningitidis* y *Shigella flexnerii*.

A los resultados de los cromatogramas obtenidos mediante el análisis por Cromatografía de Gases a las muestras procesadas de bacterias ATCC estudiadas, se les aplicó un análisis estadístico mediante la realización de un Análisis de Varianza de 1 vía. Posteriormente, se aplicó a los datos obtenidos un análisis estadístico que se basó en realizar la comparación por parejas de los promedios de los cromatogramas entre grupos de bacterias analizados.

Se puede concluir que si bien el método utilizado para el análisis de las muestras procesadas de los cultivos de las cepas ATCC demostró diferencia para tres de las seis cepas que fueron analizadas, este debe ser actualizado para que tenga una mayor diferenciación entre las especies de bacterias que se analicen. Mediante la investigación en este campo, será posible la identificación más rápida de microorganismos patógenos que ponen en riesgo vidas humanas, siendo entonces posible la aplicación de un tratamiento antibiótico oportuno y adecuado para tratar estos padecimientos.

II. INTRODUCCIÓN

La identificación de microorganismos patogénicos como bacterias actualmente se realiza por medio de cultivos en distintos tipos de agar, según sea necesario, los cuales demoran entre 24 a 72 horas, dependiendo del tipo de microorganismo que se desee aislar. Esta demora en la identificación y diagnóstico de la enfermedad puede tener consecuencias negativas directas en la salud de los pacientes.

Recientemente, en otros países se utilizan técnicas más avanzadas de identificación microbiana, como la cromatografía de gases. Esta técnica que inicialmente se utilizó para la identificación y elucidación estructural de compuestos orgánicos, en la actualidad se ha aplicado en la identificación de microorganismos por medio de la detección de sus marcadores químicos, como los componentes de la pared celular; esto ha permitido mejorar y agilizar la identificación de los mismos. El propósito de este trabajo es demostrar si esta técnica es aplicable a nuestro medio, ya que dicha técnica puede ser de gran utilidad en la microbiología clínica, industrial, taxonómica, identificación a priori, control de calidad microbiológico, análisis de agua, etc.

La aplicación de técnicas cromatográficas para la identificación de microorganismos implica la evaluación y estandarización del método de análisis estadístico de los perfiles cromatográficos. El análisis multivariado tanto intraespecie como interespecie de los cromatogramas obtenidos para las cepas ATCC (American Type Culture Collection) y las nosocomiales más comunes en los hospitales públicos de Guatemala de las especies *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria meningitidis* y *Shigella flexnerii*., permitirá evaluar si realmente existe diferencia estadísticamente significativa que apoye la diferenciación interespecífica de las distintas cepas de bacterias, además de detectar las diferencias entre las cepas nosocomiales y las estándares o ATCC.

III. ANTECEDENTES

1. BACTERIA

Las bacterias poseen una estructura relativamente simple. Son microorganismos procariotas, unicelulares, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplásmico, que se reproducen por división asexual. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas: una pared celular grampositiva con una gruesa capa de peptidogluano y una pared celular gramnegativa con una delgada capa de peptidogluano, así como una membrana externa. (Brock, 2009)

Su clasificación preliminar se basa en su tamaño, que va de 0.5 a 5 μm o más. Poseen forma de esferas, bastoncillos, espirales y su disposición espacial puede ser células aisladas, en cadenas y formando cúmulos. Mientras que su clasificación definitiva se refiere a sus propiedades fenotípicas y genotípicas. El organismo humano está habitado por miles de especies bacterianas distintas; mientras algunas mantienen una relación parasitaria temporal, otras habitan en el ser humano de manera permanente. También se encuentran bacterias en el ambiente, como el aire que se respira, el agua que se bebe y los alimentos que se comen; aunque muchas de ellas son relativamente avirulentas, otras son capaces de provocar enfermedades potencialmente mortales. La enfermedad puede deberse a los efectos tóxicos de los productos bacterianos (toxinas) o bien a la invasión de regiones corporales que acostumbran a ser estériles. (Brock, 2009)

2. COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR BACTERIANA

Las bacterias se dividen en dos grandes grupos dependiendo de la composición de su pared celular, las grampositivas y las gramnegativas, basándose en la *tinción de Gram*. En las gramnegativas la pared está compuesta por varias capas y es bastante compleja, mientras que las grampositivas es generalmente más ancha y formada por un solo tipo de molécula. (Brock, 2009)

Las paredes celulares de bacterias presentan una capa rígida de peptidoglicano que es la responsable de la resistencia de la pared celular. Las gramnegativas presentan capas adicionales situadas en el exterior de ésta. El peptidoglicano es un polisacárido formado por dos derivados de azúcares (N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico) y un pequeño grupo de aminoácidos que

incluye L-alanina, D-alanina, D-glutámico y lisina o en su lugar ácido diaminopimélico (DAP). La mayoría de cocos grampositivos contienen lisina en lugar de DAP. (Brock, 2009)

Existen variaciones en el componente peptídico del peptidoglicano, pero el esqueleto formado por unidades repetitivas y alternantes de derivados de azúcares es el mismo en todas las especies de bacteria. La pared celular grampositiva está formada hasta de un 90% de peptidoglicano y aunque unas bacterias tienen sólo una capa de peptidoglicano rodeando la célula, muchas otras tienen varias láminas apiladas unas de otras hasta un máximo de 25. (Brock, 2009)

La membrana externa de las bacterias gramnegativas, solo presenta cerca del 10% de peptidoglicano. En cambio, la mayor parte de la pared está representada por la membrana externa. Esta capa es, de hecho una segunda bicapa lipídica, pero a diferencia de la membrana citoplasmática, no está compuesta solo por fosfolípidos y proteínas sino también contienen polisacáridos. Los lípidos y polisacáridos están unidos en la membrana externa y se presentan formando un complejo denominado Capa de Lipopolisacáridos (LPS). (Brock, 2009).

2.1 Composición química de la capa de lipopolisacáridos (LPS)

Consta de dos porciones: el núcleo del polisacárido y el polisacárido O. En el caso de Salmonella, el núcleo del polisacárido está compuesto por cetodesoxioctonato (KDO), azúcares de siete átomos de carbono (heptosas), glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina. El lipopolisacárido O está unido al núcleo y consta generalmente de galactosa, glucosa, ramnosa y manosa, así como uno o más dideoxiazúcares poco frecuentes como abeciosa, colitosa entre otras. (Brock, 2009)

La composición de lípidos y policacáridos varía entre las diferentes especies de bacterias gramnegativas, pero los componentes principales (lípidos, LDO, núcleo, antígeno O específico) suelen ser los mismos. Los ácidos grasos que se encuentran normalmente en la sección de lípidos son el ácido caproico (C6), láurico (C12), mirístico (C14), palmítico (C16) y esteárico (C18). (Brock, 2009)

EL LPS reemplaza a la mayoría de los fosfolípidos en la cara externa de la membrana externa, mientras la cara interna tiene una estructura semejante a la de la membrana citoplasmática. Sin embargo también está presente un complejo lipoproteico en la cara interna de la membrana externa. Esta lipoproteína funciona como un anclaje entre la membrana externa y el peptidoglicano. Por

tanto, aunque se considera que la membrana externa es una bicapa lipídica, su estructura difiere de la de la membrana citoplasmática, especialmente en lo que se refiere a la cara externa que está en contacto con el medio. (Brock, 2009)

3. DESCRIPCIÓN DE MICROORGANISMOS SELECCIONADOS

3.1 *Staphylococcus epidermidis*:

Reino: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Cocci

Orden: Bacillales

Familia: *Staphylococcaceae*

Género: *Staphylococcus*

Especie: *S. epidermidis*

Es un coco gram positivo, aeróbico facultativo, perteneciente al grupo de estafilococos coagulase negativos. Es una bacteria de forma esférica de 0.8 a 1.0 micrones. Ocurre aislada, en parejas, en cadenas cortas y en agregados irregulares. No tiene motilidad. No hidroliza el almidón. No utiliza $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como fuente de nitrógeno. Produce amoniaco de peptonas. (Davis, 1990)

S. epidermidis al igual que *S. aureus*, forman parte de la flora normal de la piel, pueden ingresar en el organismo a través de grietas de esta y plantear un problema importante en personas con sondas y catéteres vasculares. Las cepas varían en su habilidad para producir hemolisina, coagulasa y otros productos metabólicos. (Brock, 2009)

Las colonias de este microorganismo suelen ser blancas; en ocasiones se forman colonias amarillas o anaranjadas. El agente específico de especie es un ácido teicoico de pared celular (polisacárido B) con una estructura glicerolfosfato; los residuos glucosa están adheridos en uno u otro enlace glucosídico α ó β a algunos gliceroles y la D-alanina a otros. La glucosa es el determinante antigénico. (Davis, 1990)

Las cepas de *S. epidermidis* son clasificadas de acuerdo con las diferentes actividades bioquímicas en cuatro diversos biotipos, pero recientemente se ha desarrollado un sistema de fagotipia. No se producen la coagulasa y la amplia variedad de productos celulares formados por *S. aureus*. Algunas cepas son hemolíticas debido a la hemolisina ϵ , la cual es muy similar o idéntica a la hemolisina δ de *S. aureus*. (Davis, 1990)

S. epidermidis es un habitante frecuente de la piel normal, donde suele ser responsable de abscesos menores. No obstante, causa también en ocasiones una enfermedad general, enterocarditis postoperatoria particularmente. La resistencia a múltiples antibióticos es frecuente y el tratamiento es incluso más difícil que para las infecciones por *S. aureus*. (Davis, 1990)

3.1.1 Tratamiento antibiótico

El *S. epidermidis*, dado que es un microorganismo de transmisión nosocomial, tiene una alta tasa de resistencia a múltiples antibióticos. Cerca del 90% producen beta lactamasas, mientras que 60-80% son resistentes a la metilicina. Además, estas bacterias suelen ser resistentes a macrólidos, lincosaminas, aminoglicósidos y fluoroquinolonas. El fármaco de elección es la Vancomicina y la duración del tratamiento varía de acuerdo al tipo de infección. Se han descrito cepas con sensibilidad disminuida a la Vancomicina, por lo que la emergencia de resistencia a los glicopéptidos mostrada por el *S. epidermidis* se convertiría en un serio problema para la salud pública. Si existen dispositivos médicos involucrados en el proceso infeccioso, se procederá al retiro de éstos, cuando sea posible. (Katzung, 2010)

3.2 *Salmonella enteritidis*:

Reino: Bacteria
Filo: Proteobacteria
Clase: Gammaproteobacteria
Orden: Enterobacteriales
Familia: Enterobacteriaceae
Género: *Salmonella*
Especie: *S. enteritidis*

Es un bacilo de 0.6 a 0.7 por 2.0 a 3.0 micrones, ocurre aislado, en parejas y ocasionalmente en cadenas cortas. Es móvil con flagelos peritricos. Es una bacteria gram negativa. Es aeróbico facultativo. Se encuentra en el intestino humano. No fermenta la lactosa ni la sacarosa y, con pocas excepciones, produce abundante ácido sulfhídrico por rotura de aminoácidos azufrados o por reducción del tiosulfato. *S. enteritidis* contiene más de 1500 serotipos. (Breed, 1948)

Su temperatura óptima de incubación es de 37° C . Las colonias en gelatina son grisáceas, de transparentes a opacas, con superficie de hojuela. (Breed R., 1948)

En el hombre se dan tres formas clínicamente diferentes de salmonelosis: fiebre entérica, septicemia y gastroenteritis aguda. El prototipo de la fiebre entérica es la fiebre tifoidea causada por *S. typhi*, mientras que a las fiebres entéricas producidas por otras salmonelas se les denomina “paratifoideas”. Son generalmente menos graves, poseen un período de incubación más corto (de 1-10 días). En las fases iniciales se produce una bacteriemia; la fiebre dura de 1 a 3 semanas y la manifestación de manchas rosadas es poco frecuente. El riesgo de bacteriemia por *Salmonella* es más alto en pacientes pediátricos, geriátricos y con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). (Davis, 1990)

La gastroenteritis es una forma de la enfermedad confinada fundamentalmente al tracto gastrointestinal y es la más corriente infección por salmonelas. Los síntomas empiezan de 8 a 48 horas después del consumo de alimentos contaminados con diarrea que va desde una forma ligera hasta una fulminante con comienzo súbito violento. (Davis, 1990)

3.2.1 Tratamiento antibiótico

Bacteremia con lesiones focales y fiebre entérica requieren tratamiento antimicrobiano, no así la mayoría de casos de gastroenteritis. El tratamiento antimicrobiano es importante en la enteritis por salmonela en el neonato, porque permanecen por mucho tiempo excretando al organismo. En la gastroenteritis los síntomas clínicos y la excreción del organismo se prolongan con antimicrobianos. En la diarrea severa, es esencial la administración de fluidos electrolíticos. (Katzung, 2010)

Los antimicrobianos incluyen cloranfenicol, trimetoprim-sulfa si aún el organismo es sensible a quinolonas o cefalosporinas de tercera generación. En la mayoría de portadores los organismos

persisten en la vesícula y en el tracto biliar. Algunos portadores crónicos se han curado con ampicilina o ciprofloxacina únicamente, pero en la mayoría de los casos se debe combinar con colecistectomía. (Katzung, 2010).

3.3 *Salmonella typhi*:

Dominio: Bacteria
Filo: Proteobacteria
Clase: Gamma Proteobacteria
Orden: Enterobacteriales
Familia: Enterobacteriaceae
Género: *Salmonella*
Especie: *S. typhi*

Son bacilos gram negativos, anaerobios facultativos. Con flagelos peritricos y que desarrollan cápsula, no desarrolla esporas. Son bacterias móviles que producen ácido sulfhídrico (H₂S). Emplean glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa, y no producen ureasa ni tienen metabolismo fermentativo. (Ryan, 2004)

Si bien la mayoría de los serotipos de *Salmonella* no pueden ser distinguidos mediante reacciones bioquímicas, un serotipo, este serotipo denominado *S. typhi*, tiene algunas características bioquímicas singulares que permiten diferenciarlo de otros serotipos. Primero y ante todo está la observación de que algunas cepas de *S. typhi* producen sólo una pequeña cantidad de sulfuro de hidrógeno, el cual se suele observar como una cuña semilunar de precipitado negro que se forma en la interfaz de la porción inclinada y el extremo en los medios KIA y TSI. Además, se observa que las cepas de *S. typhi* son menos activas bioquímicamente que los serotipos más frecuentes y específicamente son negativas las siguientes reacciones: citrato de Simmon, ornitina descarboxilasa; gas proveniente de glucosa; fermentación de ducitol, arabinosa y ramnosa; y utilización de mucato y acetato. (Koneman, 2006).

3.3.1 Tratamiento antibiótico

La fiebre tifoidea se trata con antibióticos. Los regímenes típicos incluyen amoxicilina, cotrimoxazol y cloranfenicol. Sin embargo, desafortunadamente, la emergencia de cepas con resistencia a múltiples antibióticos se está convirtiendo en un problema global serio. Algunas de las

regiones donde estas cepas resistentes se han multiplicado incluyen el subcontinente Indio, Vietnam, Latinoamérica y Egipto. A pesar de estas cepas resistentes, el cloranfenicol, sigue siendo el antibiótico de elección, por su capacidad de infiltración en los tejidos. Las cefalosporinas y quinolonas de tercera generación, constituyen alternativas interesantes. (Calva, 2012)

Las vacunas principales contra la fiebre tifoidea son la oral Ty21a y la parenteral del polisacárido Vi. Ambas proveen una protección hasta del 65-70%, con una inmunidad de 3 a 7 años. Es interesante que la Ty21a es una cepa atenuada por mutagénesis química, por lo que tiene múltiples mutaciones, de las cuales se desconoce las que determinan la atenuación. Ciertamente, una mejor comprensión de los mecanismos básicos, a nivel molecular y celular, de la interacción bacteria-hospedante, permitirá la generación de cepas atenuadas en los genes clave, para obtener el balance apropiado entre la capacidad de generar una respuesta inmune y la atenuación que evite una infección virulenta. De la misma manera, la mejor caracterización de antígenos relevantes durante la fiebre tifoidea, deberá permitir el diseño de mejores vacunas parenterales. (Calva, 2012)

3.4 Neisseria meningitidis:

Dominio: Bacteria
Filo: Proteobacteria
Clase: Beta Proteobacteria
Orden: Neisseriales
Familia: Neisseriaceae
Género: *Neisseria*
Especie: *N. meningitidis*

Es un coco gramnegativo, inmóvil, que no forma esporas, crece en parejas y, ocasionalmente, en tétradas y pequeños racimos. Los cocos son de pequeño tamaño, alrededor de 0.8 micrones, adoptando generalmente formas extrañas como resultado de una autólisis parcial. Muchos meningococos tienen una cápsula que contiene polisacárido. Tanto los meningococos como los gonococos pueden llevar pili o pelos. (Davis, 1990)

Es un género esencialmente aerobio, pero se multiplicará en condiciones microaerófilas. Además, estos microorganismos oxidan rápidamente el dimetil otetrametil para fenildiamina, que

da lugar a que las colonias superficiales adopten primero un color rosado, que después se hace negro, cuando las placas son inundadas con una solución al 1% de estos reactivos. (Davis, 1990)

La resistencia de los meningococos a las condiciones físicas y químicas desfavorables es excepcionalmente baja. Son particularmente sensibles a la desecación y mueren cuando se calientan a 55°C durante 30 minutos. (Brock, 2009)

Normalmente, los meningococos se encuentran en la zona nasofaríngea humana sin producir procesos patológicos. Este estado de portador puede durar varios días o incluso meses, su importancia reside en la existencia de una reserva de meningococos que, al mismo tiempo aumenta la capacidad inmunitaria del huésped. El estado de portador en la población en general es significativo, alcanzando hasta un 90% de los individuos. Cuando un individuo que carece de la inmunidad adecuada se hace portador de meningococos, cosa que generalmente ocurre a través de un contacto con un portador sano, la infección nasofaríngea resultante puede dar lugar rápidamente a una bacteremia, que va generalmente seguida de una meningitis purulenta aguda. (Brock, 2009)

La mortalidad de la meningitis meningocócica no tratada es de alrededor del 85%, pero en los adultos jóvenes, puede ser menor al 10% cuando se le administra un tratamiento precoz e intenso con antibióticos y medios de sostén. (Brock, 2009)

3.4.1 Tratamiento antibiótico

La penicilina cristalina a dosis plenas 18 a 24 millones de unidades por día, continúa siendo el antimicrobiano de primera elección para infecciones por *N. meningitidis*. Esto debido a que la resistencia a penicilina hasta el momento es poco frecuente y por otro lado que la penicilina brinda un alto perfil de biodisponibilidad, en especial en meninges. En el tratamiento de infecciones por *N. gonorrhoeae* la penicilina ha dejado de ser útil debido al surgimiento de cepas resistentes. (Katzung, 2010)

Las cefalosporinas en especial de tercera generación como ceftriaxona y cefotaxima son altamente efectivas tanto para gonococo como para meningococo. Las dosis a utilizar van desde 125 a 500 mg de ceftriaxona en dosis única para uretritis. En gonococcemia diseminada la dosis es de 1 gramo cada 24 horas por un tiempo prudencial (48 horas después que los síntomas han cedido). (Katzung, 2010).

Ciprofloxacina 500 mg, ofloxacina 400 mg y levofloxacina 500 mg son efectivas en tratamiento de uretritis, cervicitis y proctitis por *Neisseria* en dosis única. En algunos lugares se ha reportado el apareamiento de cepas resistentes a quinolonas en elevadas proporciones, como en Asia. Por lo tanto, es importante referirse a los informes nacionales con relación al seguimiento de la resistencia a quinolonas. (Katzung, 2010)

El cloranfenicol es excelente para el tratamiento de meningitis. En especial cuando el paciente es alérgico a la penicilina o la cepa es productora de betalactamasa. Tiene una buena biodisponibilidad en el sistema nervioso central. Debe vigilarse la hemoglobina del paciente debido a que a dosis altas por largo tiempo el cloranfenicol es depresor de la médula ósea. (Katzung, 2010).

3.5 *Enterococcus faecalis*:

Reino: Bacteria
Filo: Firmicutes
Clase: Bacilli
Orden: Lactobacillales
Familia: Enterococcaceae
Género: *Enterococcus*
Especie: *E. faecalis*

Es una bacteria grampositiva aerobia formadora de endosporas que se encuentra habitualmente en el suelo. Las especies de *bacillus* crecen bien en medios definidos que contengan alguna de una serie determinada de fuentes de carbono. Muchos producen enzimas hidrolíticas extracelulares que degradan polímeros complejos como polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo utilizar dichos productos como fuentes de carbono y como donadores de electrones. Otros bacillus producen antibióticos, incluyendo bacitracina, polimixinas, tirocidina, gramicidina y circulina, antibióticos que se liberan durante la esporulación. (Brock, 2009)

Da positivo la prueba de catalasa que es la enzima que decompone el peróxido de hidrógeno lo cual permite diferenciarla entre los géneros *Colstridium*, y *Streptococcus*. (Davis, 1990)

3.5.1 Tratamiento antibiótico

Puede responder a combinaciones sinérgicas de un aminoglucósido con un antibiótico que actúe a nivel de pared celular (ampicilina, vancomicina, teicoplanina). Resistencia a la vancomicina puede observarse en *E. faecium*. En pacientes donde se aísle Enterococco resistente a la vancomicina, puede elegirse la quinupristina/dalfopristina. El *E. faecalis* es resistente a la quinupristina/dalfopristina, el linezolid ha sido utilizado como segunda opción en procesos infecciosos de Enterococcus resistentes a vancomicina. Otros antimicrobianos como tigeciclina y oritavancina están en etapa de investigación. Se sugiere utilizar daptomicina en infecciones por *E. faecalis*. (Katzung, 2010)

3.6 *Shigella flexnerii*:

Dominio: Bacteria
Filo: Proteobacteria
Clase: Gamma Proteobacteria
Orden: Pseudomonadales
Orden: Enterobacteriales
Familia: Enterobacteriaceae
Género: *Shigella*

Son bacilos gram negativos de la familia Enterobacteriaceae y pertenece al serotipo B de *Shigella* (Ryan, 2004) muy emparentadas con *Escherichia*. Tienen un 70% o incluso más hibridación genómica con *E. Coli* y por tanto probablemente ambas forman una única especie. En contraposición *Shigella* es habitualmente patógena en humanos y causa gastroenteritis grave que se denomina disentería producida por *Shigella*. Esta se transmite por alimentos y agua, es capaz de invadir las células epiteliales del intestino. Produce una neurotoxina que provoca enterotoxicidad (toxicidad gastrointestinal). (Davis, 1990)

Las shigelas son mucho menos invasoras que las salmonelas, y rara vez causan bacteriemia. Asimismo, su distribución en la naturaleza es mucho más restringida, habitando sólo en los estómagos digestivos de primates. Causan en el hombre una enfermedad llamada disentería bacilar. Las propiedades que distinguen a *Shigella* de la mayoría de las salmonelas comprenden la falta de

movilidad, la incapacidad para producir gas durante la fermentación y la falta de lisina descarboxilasa. (Brock, 2009)

Las cuatro especies de *Shigella* presentadas de manera simplificada (*S. dysenteriae*, *S. flexnerii*, *S. boydii* y *S. sonnei*) se diferencian del resto de enterobacteriáceas y entre sí mediante características bioquímicas y antigénicas. Los antígenos de *Shigella*, al igual que los salmonelósicos, pueden ser alterados por conversión lisogénica (Cambio en la célula bacteriana donde expresa genes extra portados por el bacteriófago). (Brock, 2009)

3.6.1 Tratamiento antibiótico

Los antibióticos juegan un papel muy importante en el manejo de la disentería bacilar. El tratamiento de la shigelosis con antibióticos adecuados acorta la duración de la diarrea, fiebre y toxemia, y aparentemente reduce el riesgo de complicaciones letales. El tratamiento también acorta la excreción del patógeno en las heces, reduciendo la diseminación de la enfermedad. (Katzung, 2010).

En la actualidad, el principal problema de manejo son los elevados niveles de resistencia antibiótica de *Shigella* a nivel mundial. Por esta razón, y debido a las variaciones geográficas y temporales, el tratamiento empírico inicial debe estar basado en los patrones de sensibilidad locales. (Katzung, 2010)

El tratamiento con ampicilina o trimetoprim-sulfametoxazole (TMP/SMX) es efectivo para cepas sensibles. Cuando se desconoce la sensibilidad antibiótica o en zonas con alta resistencia, se puede usar ácido nalidíxico o ceftriaxona parenteral. Otras alternativas son: cefixime, ciprofloxacina o azitromicina. Con cualquiera de estos agentes se recomienda cinco días de tratamiento. Aunque existen estudios que demuestran que cursos más cortos son igual de efectivos en aliviar los síntomas del paciente, se recomienda completar cinco días con la finalidad de disminuir la excreción del organismo en las heces y así disminuir la diseminación intrafamiliar de la enfermedad. (Katzung, 2010).

Están contraindicados los agentes antidiarreicos que inhiben el peristaltismo intestinal, porque pueden prolongar el curso clínico y bacteriológico de la enfermedad. (Katzung, 2010)

3.7 *Listeria monocytogenes*:

Dominio: Bacteria
Filo: Firmicutes
Clase: Bacilli
Orden: Bacillales
Familia: Listeriaceae
Género: *Listeria*
Especie: *L. monocytogenes*

Es un bacilo pequeño, grampositivo, aerobio a microaerófilo, no esporulado; presenta una peculiar movilidad de voltereta de extremo a extremo de 20 a 25°C, pero a menudo no a 37°C. Estos microorganismos crecen bien en agar-sangre y en otros medios de tipo general, aunque su aislamiento puede facilitarse manteniendo el material clínico a 4°C durante varios días antes de llevar a cabo la inoculación. Son productoras de ácido pero no gas a partir de glucosa. Necesita condiciones microaerobias o totalmente aerobias para crecer y produce catalasa. (Brock, 2009)

Es el agente causante de listeriosis. Enfermedad transmitida por los alimentos contaminados, normalmente con cocinados como el queso y puede producir desde una suave enfermedad hasta una forma mortal de meningitis. El sorprendentemente amplio margen de huéspedes de *Listeria* comprende gran variedad de aves y mamíferos, así como garrapatas, peces y crustáceos. La enfermedad en los animales se caracteriza por monocitosis, septicemia y la formación de múltiples abscesos focales en las vísceras. En muchas especies, incluida la humana, son frecuentes los portadores entéricos aparentemente sanos. (Brock, 2009)

3.7.1 Tratamiento antibiótico

En los pacientes alérgicos a la penicilina, el tratamiento de elección es el trimetoprim-sulmetoxazol, por su alta penetración en los tejidos, sobretodo el Líquido Cefalorraquídeo, demostrado en numerosas publicaciones. Además, es bactericida frente a *L. monocytogenes* y tiene una eficacia clínica documentada. Otras posibilidades terapéuticas, como las cefalosporinas, la vancomicina, el ciprofloxacino, el imipenem y el cloranfenicol, han demostrado menos efectividad o no se han estudiado a profundidad, por lo que lo ideal es utilizarlo como último recurso. El

tratamiento antibiótico debe mantenerse durante dos semanas, aunque se recomienda una duración de tres semanas. (Katzung, 2010)

4. MÉTODOS ACTUALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

En la década de los 70 el diagnóstico de laboratorio e identificación de especies bacterianas utilizaba técnicas tradicionales de cultivo microbiano y microscopía óptica las cuales son costosas, laboriosas, lentas y pueden llegar a ser subjetivas. (Murray, 1995)

La microbiología clínica se enfoca en la caracterización fenotípica de los microorganismos, mientras que la cromatografía entre otras técnicas, ha tomado auge ya que permite detectar distintos compuestos químicos como proteínas, carbohidratos, polisacáridos, Ácidos grasos de cadena larga, ADN, ARN entre otros dependiendo del tipo de cromatografía que se utilice. (Murray, 1995; Kunitsky, 2006)

4.1. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

Las morfologías microscópica y macroscópica de las bacterias fueron las primeras características utilizadas para identificarlas y aún constituyen unos elementos fundamentales en la mayoría de los algoritmos de identificación utilizados actualmente. Por ejemplo, las bacterias se pueden clasificar según su capacidad de retención de la tinción de Gram (microorganismos grampositivos y gramnegativos) y por la forma de cada célula (cocos, bacilos, espirilos). Además, el aspecto macroscópico de las colonias bacterianas (p. ej., las propiedades hemolíticas en un medio de agar sangre, la pigmentación, el tamaño y la forma de las colonias y el olor de las colonias) también se emplea en la identificación de las bacterias. (Fernández, 2006)

Las características morfológicas se utilizan para realizar una identificación provisional del microorganismo y poder seleccionar otros métodos de clasificación con un mayor poder de discriminación, ya que muchos microorganismos pueden presentar un aspecto muy similar en el examen macro y microscópico. Los métodos más frecuentes y que todavía se utilizan en la identificación de las bacterias consisten en determinar la presencia o la ausencia de unos marcadores bioquímicos específicos (p. ej., capacidad de fermentación de hidratos de carbono específicos o la utilización de diferentes compuestos como fuente de carbono para poder proliferar;

presencia de proteasas, lipasas o nucleasas específicas; o presencia de enzimas hidrolíticas específicas como lipasas y nucleasas). (Fernández, 2006)

El empleo de ciertas pruebas bioquímicas permite identificar con un alto grado de precisión la mayoría de las cepas clínicamente significativas. Además, estos métodos se han empleado para subdividir los grupos de microorganismos más allá del nivel de especie, principalmente con fines epidemiológicos (p. ej., para determinar si un grupo de microorganismos pertenecientes al mismo género y especie comparten un origen común o bien proceden de fuentes distintas). Estas técnicas son conocidas como determinación del biotipo o biotipado. (Fernández, 2006)

Dado que numerosas bacterias poseen antígenos característicos, los anticuerpos utilizados para su detección constituyen una potente herramienta diagnóstica. A esta técnica se le conoce como serotipado. Estas pruebas serológicas se realizan con el fin de identificar microorganismos que son inertes frente a las pruebas bioquímicas, cultivos difíciles o que deben identificarse de forma rápida. (Fernández, 2006)

Otros ejemplos de los métodos fenotípicos utilizados en la clasificación de las bacterias son el estudio de los patrones de sensibilidad del microorganismo frente a distintos antibióticos (antibiograma) y el lisotipado (susceptibilidad a determinados virus que infectan a las bacterias). Las técnicas de susceptibilidad a los antibióticos tienen un menor poder de discriminación. El lisotipado es una técnica engorrosa, por lo que actualmente ha sido sustituida por técnicas genéticas con mayor sensibilidad. (Fernández, 2006)

4.2. IDENTIFICACIÓN MEDIANTE FAGOS ESPECÍFICOS

Dentro de los nuevos métodos de identificación ha aparecido, recientemente, la aplicación de bacteriofagos con afinidad específica por las algunas bacterias. Por ejemplo, desde 1947 se han descrito más de 250 micobacteriófagos. No obstante, tan sólo dos métodos, el LRP (Luciferase Reporter Phage) y el FASTPlaqueTB® (Biotech Laboratories Ltd., Ipswich, Reino Unido) o PhageTeK® MB (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) han demostrado tener cierta utilidad clínica. Estos métodos se diferencian básicamente en la detección de las células bacterianas infectadas por el fago. En el LRP se utiliza la emisión de luz que es codificada por el gen de la luciferasa, el cual se encuentra incorporado en el genoma del fago. Esta enzima es un indicador de la presencia de células micobacterianas viables. En el FASTPlaqueTB® o PhageTeK® MB, la

detección se basa, en la presencia de múltiples células bacterianas infectadas viables tras una amplificación fágica. (Fernández, 2006)

4.3. IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

En la actualidad, la identificación genotípica parece ser la mejor alternativa para una precisa y rápida identificación de las especies tanto de bacterias como de otros microorganismos. Sus principales ventajas son: una aplicación universal sobre todos los aislamientos, la posible detección rápida (directamente de las muestras o de cultivos recientes), la identificación de microorganismos de difícil cultivo, el reconocimiento preliminar de nuevos taxones bacterianos, y la reducción del riesgo biológico derivado de la manipulación de los cultivos. Por el contrario, las pruebas de ácidos nucleicos determinan si el ADN o ARN de una bacteria en particular está presente en la muestra, pero no revela la viabilidad del organismo o si este está implicado en un proceso infeccioso. Aparte de las contaminaciones potenciales y las limitaciones de su empleo directo sobre algunos tipos de muestra, estas técnicas no pueden actualmente sustituir completamente a la metodología tradicional. Por otro lado, su comercialización está relativamente poco desarrollada y algunas de estas técnicas, como la secuenciación, requieren una inversión inicial elevada. (Fernández, 2006)

4.4. SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

En la última década han aparecido sondas comerciales de DNA (AccuProbe, GenProbe Inc., San Diego, Estados Unidos) no radiactivas que permiten identificar por hibridación con el RNA ribosómico micobacteriano, de forma rápida (2 h) y específica, el complejo *M. tuberculosis*, el grupo *Mycobacterium avium-intracellulare*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium gordonae*. Estas sondas se pueden aplicar sobre los cultivos obtenidos tanto en medios sólidos como líquidos. Así mismo, ofrecen la posibilidad de utilizarlos en medios líquidos con contenido hemático, siendo necesaria una pequeña preparación previa mediante concentración y lavado con una solución detergente (dodecil sulfato sódico y EDTA). Las sondas comerciales han sufrido, a lo largo de los años, diferentes reformulaciones debido a diversos problemas de sensibilidad y especificidad pero, en la actualidad, constituyen uno de los modelos de referencia en la detección e identificación micobacteriana clínica habitual, en combinación con los nuevos sistemas de cultivo automatizados. Sin embargo, su aplicación queda limitada a un grupo de micobacterias que, si bien es el más importante desde el punto de vista clínico, no deja de ser

reducido. Además, requiere una orientación presuntiva para la elección de la sonda correspondiente, al poder tan solo realizar una identificación por prueba. (Fernández, 2006)

4.5. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE DNA ESPECÍFICAS

Este grupo de técnicas requiere la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otro sistema, de una zona de DNA concreta (diana) y la observación directa de los fragmentos obtenidos o de un posterior análisis postamplificación mediante restricción, hibridación o secuenciación. Como en toda técnica de amplificación, hay diversos factores que influyen sobre el rendimiento final de ésta. Sin embargo, aunque son técnicas muy sensibles y objetivas, estos procedimientos no reemplazan el cultivo convencional y microscopía por varias razones. Además, resulta complicado garantizar que el material genético identificado pertenece únicamente a la muestra o si es parte de la contaminación del área o ambiente de trabajo, o si se debe a contaminantes. (Fernández, 2006)

5. LA CROMATOGRAFÍA

La cromatografía en columna fue inventada y denominada así, a principios del siglo XX, por el botánico ruso Mikhail Tswett, al aplicar la técnica para separar pigmentos vegetales. La cromatografía es un método de separación basado en las diferencias de afinidad de los diferentes compuestos (analitos) entre una fase móvil y una fase estacionaria. Dado que cada analito tiene una afinidad específica en relación a estas fases, la migración entre las fases es diferente para cada uno dando origen a la separación a lo largo del desarrollo de la cromatografía. Los componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil. Por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. La distinta movilidad permite la separación de los componentes en bandas o zonas discretas. (Skoog, 1992; Cazes, 2004)

5.1 LA CROMATOGRAFÍA COMO TÉCNICA ANALÍTICA

La cromatografía se ha utilizado por casi 40 años como método para la detección de ácidos orgánicos de cadena corta (ácidos grasos volátiles) y alcoholes producidos por anaerobios obligados (Sasser, 2006).

Dado que por su incapacidad de utilizar el oxígeno como aceptor final de la cadena de electrones los anaerobios obligados han desarrollado rutas metabólicas alternativas únicas para cada género e incluso especie (Butler, 2001).

La aplicación de la cromatografía para el análisis de los componentes de estas rutas ha demostrado ser una útil herramienta complementaria para la identificación de estas especies (Fox, 1993).

5.2. LA CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases más utilizada se basa en la distribución de un analito entre una fase móvil gaseosa inerte, comúnmente argón o helio, y una líquida inmovilizada sobre una superficie sólida inerte. La muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de la fase móvil, que no interacciona con las moléculas de analito. Las sustancias se separan en función de su punto de ebullición, por lo que el control de la temperatura de la columna es determinante. (Skoog, 1992)

La elección del gas portador a utilizar se hace en función del tipo de detector a utilizar, ya que su única función es el transporte, mientras que la elección de la columna es esencial para la separación. Existen dos tipos fundamentales de columnas para CG: empaquetadas o de relleno y las tubulares abiertas o capilares. Las columnas tubulares abiertas de sílice fundida están construidas de sílice purificada de óxidos metálicos. Los capilares así obtenidos tienen paredes mucho más delgadas que sus equivalentes mediante esta técnica son flexibles y pueden enrollarse longitudes considerables en cilindros de unos cuantos centímetros de diámetro. Al aumentar el largo de la columna se mejora la separación. Los recubrimientos de las columnas para gas-líquido suelen ser: plodimetilsiloxano, el cual alcanza una temperatura máxima de 350°C y su aplicación es de uso general, hidrocarburos, compuestos aromáticos, drogas, esterodes, etc. (Skoog, 1992)

La cromatografía de gases tiene amplia aplicación y es de uso general para analiza hidrocarburos, compuestos aromáticos, drogas, esteroides y PCBs; poli(fenilmetildifenil)siloxano 10%, para ácidos grasos, alcaloides, drogas, compuestos halogenados; polifenilmetilsiloxano 50%, para drogas, esteroides, pesticidas y glicoles; y, polietilenglicoles, para ácidos libres, alcoholes, éteres, aceites esenciales y glicoles. (Skoog, 1992)

5.2.1. COLUMNA CAPILAR

Los materiales principales del tubo capilar son la sílica fundida y el acero inoxidable; la mayoría son polímeros, líquidos o gomas, de alto peso molecular, estables térmicamente. Las fases estacionarias de este tipo más comunes son los polisiloxanos y polietilenglicoles, las otras más comunes son aquellas con fases estacionarias de pequeñas partículas porosas, compuestas de polímeros o zeolitas (Cazes, 2004).

5.2.2. DETECTOR

El detector FID (ionización de llama) permite analizar la muestra sin necesidad de tratamiento preliminar, lo que elimina errores por pérdida durante la extracción u otra manipulación de la muestra, además de que es sensible a bajos niveles de ppm, e insensible al agua (Skoog, 1992).

5.3. LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Es una herramienta de caracterización fenotípica que ha cobrado reciente importancia en muchos campos. Es una técnica extremadamente útil y rápida para identificar microorganismos de interés. (Kunitsky, 2006).

Dependiendo del tipo de compuestos a ser separados e identificados se han aplicado diferentes métodos como la separación de proteínas, de manera que no dañe las moléculas separadas en cromatografía líquido-líquido o carbohidratos complejos y polisacáridos que se separan normalmente por cromatografía líquido-sólido, al igual que fragmentos de ADN y ARN. (Pritchard, 1981).

6. ESTUDIOS PREVIOS

En Guatemala se han realizado varios estudios acerca de la identificación de microorganismos por técnicas no convencionales como la cromatografía de gases acoplada a masas de diversos microorganismos como bacterias, levadura y hongos, en donde el enfoque es la investigación de los componentes químicos, en especial lípidos presentes en la pared celular bacteriana.

El estudio más reciente relacionado con el tema, fue realizado como trabajo de tesis por Claudio, T. (2009), en el cual se determinó los compuestos lipídicos predominantes para distintos microorganismos ATCC. El estudio concluye que la metodología de caracterización de microorganismos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas tiene una reducción del tiempo de análisis del 94 % y una reducción de costos directos del 2.5% contra la metodología de caracterización convencional.

Este estudio se tomó como base para el desarrollo de la metodología analítica para la identificación taxonómica de bacterias por cromatografía de gases. Técnica que pretende la identificación rápida y confiable de bacterias con mayor reducción de tiempo y costos comparada con la metodología desarrollada por Claudio, T. (2009). Sánchez, A. (2005) realizó la determinación de la concentración de componentes volátiles (incluyendo metanol) en bebidas alcohólicas fermentadas tradicionales elaboradas en la ciudad de Guatemala, siendo su conclusión que el metanol no es una sustancia común en los vinos elaborados en Guatemala.

IV. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de una metodología estandarizada, más rápida y eficaz para la identificación de microorganismos y que sea aplicable tanto a microorganismos no patógenos como patogénicos, permitirá la identificación más certera de los mismos, en menor tiempo y con menor incertidumbre. Siendo de gran importancia en el campo del diagnóstico clínico y en biología molecular para la detección de posibles mutaciones intraespecíficas. Por lo tanto, se hace precisa la estandarización del método de análisis e interpretación cromatográfica, como la creación de bases de datos de los principales componentes de la pared celular como marcadores bioquímicos característicos de cada microorganismo con el fin de agilizar y mejorar la identificación y diferenciación de los mismos, ya que en Guatemala actualmente la identificación de microorganismos se realiza a través de métodos convencionales que generalmente incluyen cultivos que pueden tardar días o semanas, con lo que el tiempo necesario para el diagnóstico adecuado se extiende mientras empeora la salud de los pacientes. Esta situación se agrava al considerar la elevada capacidad de mutación de los patógenos, su rápida difusión a través de los medios de transporte modernos y el contacto humano con nuevos vectores al ampliar su hábitat. Es necesario, por lo tanto desarrollar e implementar nuevos métodos para la identificación de microorganismos que permita resultados más rápidos conservando la exactitud en el diagnóstico.

La información que genere este estudio servirá como base para el mejoramiento de la identificación de microorganismos, por medio del análisis multivariado de los cromatogramas obtenidos por CG y que posteriormente se puede aplicar a otros campos como la microbiología clínica, la bacteriología industrial, el control de calidad microbiológico en alimentos, agua, fármacos, entre otros.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar un método de identificación rápida de especies de bacterias por Cromatografía de Gases.
- Conocer el perfil cromatográfico de cinco cepas de bacterias ATCC y cepas nosocomiales de las mismas especies.

Objetivos específicos

- Comparar los cromatogramas de los lípidos presentes en la pared celular de *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Enterococcus faecalis* y *Shigella flexnerii*.
- Identificar en los cromatogramas los principales componentes de la pared celular bacteriana que sean característicos para cada cepa y que permitan la diferenciación inter-especies.
- Determinar por medio del análisis de los cromatogramas obtenidos por Cromatografía de Gases (CG), si existe diferencia significativa medible en la composición de la pared celular bacteriana entre la misma especie o entre las distintas especies de bacterias que puedan ser usadas como marcadores biológicos para la identificación clínica de las mismas.
- Determinar la variabilidad del método de CG aplicado a la diferenciación y clasificación taxonómica de especies.

VI. HIPÓTESIS

El análisis de los cromatogramas obtenidos por CG permite la identificación y diferenciación entre las distintas especies y cepas bacterianas.

VII. MATERIALES Y MÉTODO

1. UNIVERSO Y MUESTRA

El universo de trabajo lo constituyen las bacterias *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria meningitidis* y *Shigella flexnerii* y las cepas nosocomiales de las mismas especies a analizar.

La muestra consiste en porciones o extractos obtenidos de las bacterias, provenientes de la lisis de la pared bacteriana de las cepas anteriormente mencionadas

2. MATERIALES

2.1 CRISTALERÍA

- a) Probetas de 25 y 100ml
- b) Pipetas volumétricas de 5, 10 y 25ml
- c) Pipetas Pasteur
- d) Micropipetas automáticas de 1000 y 200 ul
- e) Bureta de 50ml con llave de teflón
- f) Beakers de 25, 50, 250 y 500ml
- g) Tubos de ensayo de 10ml
- h) Tubos de cultivo de 10ml
- i) Frascos ámbar de 4ml
- j) Frascos ámbar de 10ml
- k) Varilla de agitación

2.2 REACTIVOS

- a) Metanol grado CLAR
- b) Hexano grado CLAR
- c) Etanol
- d) Sodio metálico
- e) Helio 99.999%

2.3 EQUIPO

- a) Cromatógrafo de gases
- b) Refrigerador
- c) Microcentrífuga
- d) Agitador vórtex

2.4 BACTERIAS

- a) *Staphylococcus epidermidis*
- b) *Salmonella typhi*
- c) *Listeria monocytogenes*
- d) *Enterococcus faecalis*
- e) *Shigella flexnerii*
- f) *Neisseria meningitidis*

2.5 OTROS

- a) Asas de nicromo
- b) Pro-pipetas
- c) Bulbos para pipetas pasteur
- d) Puntas para micropipetas automáticas
- e) Jeringas para inyección en CG
- f) Gradilla para tubos de ensayo
- g) Espátulas metálicas

3. MÉTODO

3.1 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

El trabajo de tesis se basa en una investigación experimental, transversal y analítica-descriptiva.

3.1.1 DISEÑO ESTADÍSTICO DE LA INVESTIGACIÓN

Diseño del Muestreo:

Se analizarán cinco especies de bacterias ATCC y una cepa nosocomial por cada especie, para determinar la variabilidad tanto interespecífica como intraespecífica. El cultivo se hará por cuadruplicado y cada análisis cromatográfico por triplicado, para hacer un total de 96 análisis. Las cinco especies de bacterias se tomarán considerando su importancia clínica y a conveniencia, en un muestreo no probabilístico, provenientes del Laboratorio Nacional de Salud, Laboratorio Oficial de Referencia del Ministerio de Salud Pública.

3.1.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

El desarrollo del trabajo de investigación consta de siete fases las cuales se detallan a continuación:

Fase 1: Obtención de material bacteriano.

Fase 2: Extracción de componentes a analizar.

Fase 3: Derivatización de componentes a analizar.

Fase 4: Cromatografía: Análisis de muestras preparadas usando CG.

Fase 5: Interpretación de cromatogramas obtenidos.

Fase 6: Identificación y diferenciación entre especies y análisis estadístico.

Fase 7: Aplicación a Cepas nosocomiales de las mismas especies de bacterias ATCC utilizadas.

3.2. PROCEDIMIENTO

- a) Preparación de muestras: (Fase 1)
 - i. Se procede a lavar cuantitativamente toda la cristalería a utilizar, esterilizándola mediante autoclaveado.
 - ii. Se identificará una serie de frascos de 4 y 10ml para cada microorganismo los cuales contienen el extracto bacteriano.

- iii. Se preparará 50 ml de una solución de metóxido de sodio en metanol al 8% p/v como agente de derivatización.
- iv. Se agregará a cada tubo rotulado 1.500 ml de solución de metóxido de sodio.
- v. Se agregará una asada llena de asa bacteriana a cada tubo correspondiente, recolectándola con un asa de nicromo y agitándola para ser liberada en el vial.
- vi. Se agita utilizando el agitador vórtex y se deja reaccionar por un minuto.
- vii. Se agrega 0.900ml de hexano.
- viii. Se agita por un minuto y se centrifuga por tres minutos para separar las fases.
- ix. Se recolecta la fase orgánica y se trasvasa a un vial de 4 ml debidamente identificado.

b) Extracción de componentes a analizar: (Fase 2 y 3)

Para cada microorganismo se realizará la lisis celular y derivatización con metóxido de sodio 8% en metanol, agitando por 1min, seguido de una extracción con hexano.

Se realizarán pruebas para encontrar las condiciones analíticas adecuadas para la resolución de los componentes. Con los datos obtenidos en las pruebas preliminares, se desarrollará un método por Cromatografía de Gases con el que se analizarán los extractos bacterianos. En el análisis de los cromatogramas se identificarán los picos característicos de cada especie.

c) Análisis por cromatografía de gases: (Fase 4)

Se realizarán pruebas preliminares con dos de los extractos utilizando diferentes condiciones de análisis en una columna SD-1, variando la temperatura del inyector, temperatura inicial del horno, temperatura final, rampa de temperatura, modo de inyección y volumen de inyección.

Se procede a grabar en el equipo de CG el método para los extractos, tomando en cuenta las pruebas preliminares, con la siguiente descripción: inyección 1ul splitless por 30 segundos; temperatura de inyección 280 °C; temperatura inicial del horno 150 °C por 5 minutos, gradiente de 3°C/min hasta 180 °C, gradiente de 2 °C/min hasta 220 °C y temperatura final de 220°C por 10min; temperatura de interface 280 °C.

Se procede hacer las inyecciones correspondientes en el cromatógrafo de gases y se recolectan los espectros y cromatogramas correspondientes.

d) Análisis de cromatogramas: (Fase 5)

- i. Se numeran los picos de todos los cromatogramas de acuerdo a su tiempo de retención.
- ii. Se identifican picos iguales y diferentes en los cromatogramas de las bacterias analizadas obtenidos en las mismas condiciones.
- iii. Se busca la diferenciación de las especies de estudio basándose en la presencia y/o ausencia de picos característicos en sus cromatogramas, específicamente de picos excluidos de cada especie.

e) Identificación y Diferenciación entre especies y Análisis estadístico: (Fase 6)

Se elabora la clasificación sistemática de las especies en base a la discriminación entre los grupos, realizada mediante el cálculo de las funciones discriminantes de cada grupo de picos detectados en los cromatogramas.

Se analiza el significado y las dimensiones de discriminación entre los grupos de especies y entre los individuos de cada grupo, que fueron proporcionadas por las funciones discriminantes mediante el análisis multivariado de los grupos de picos prominentes característicos específicos de cada especie.

Se procede a averiguar el sentido de la discriminación entre dichos grupos, es decir, qué grupos separa cada función discriminante y en qué sentido. Este análisis se lleva a cabo mediante representaciones gráficas del espacio de discriminación de cada grupo.

Para comparar los componentes individuales entre las distintas cepas de una especie se efectuará una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) utilizando un nivel de significancia de $p < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

Tabla No. 1 – Análisis de varianza de una vía (*one way*) de los promedios de los cromatogramas entre grupos de bacterias analizados.

Fuente	SS Parcial	df	MS	F	Prob > F
Comparación de grupos	1.64927976	5	.329855953	3.47	0.0084
Residual	5.32272615	56	.095048681	---	---
Total	6.97200592	61	.114295179	---	---

FUENTE: Programa estadístico Stata versión 13.

En donde:

SS Parcial = Suma de cuadrados parcial (SS: “*Sum of Squares*”).

df = Grados de libertad (df: “*degrees of freedom*”).

MS = Media cuadrática (MS: “*Mean square*”).

F = Valor F.

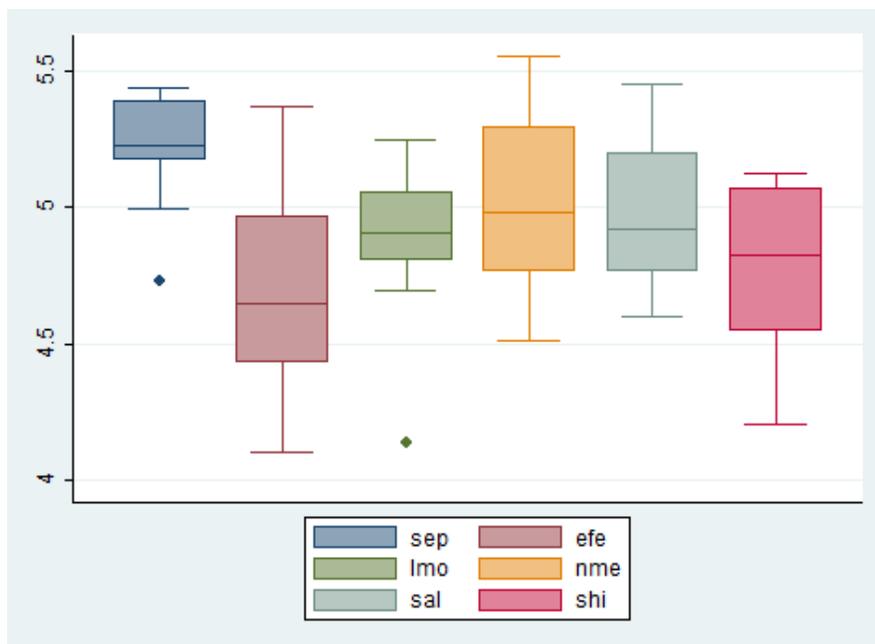
Prob > F = Nivel de significancia (*p-value*).

Tabla No. 2 – Comparación por parejas de los promedios de los cromatogramas entre grupos de bacterias analizados.

Especie	Promedio	Error Estándar	Intervalo de confianza 95% (Sin ajuste)	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5.209873	0.1027666	5.004007	5.415739
<i>Enterococcus faecalis</i>	4.699045	0.0929558	4.512832	4.885258
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.892905	0.0889984	4.71462	5.071191
<i>Neisseria meningitidis</i>	5.02532	0.0889984	4.847035	5.203606
<i>Salmonella typhi</i>	4.977214	0.1258628	4.725081	5.229348
<i>Shigella flexnerii</i>	4.792679	0.88984	4.614394	4.970965

FUENTE: Programa estadístico Stata versión 13.

Gráfica No. 1: Diagrama de caja de la comparación de los cromatogramas en los grupos de bacterias analizados.



FUENTE: Programa estadístico Stata versión 13.

En donde:

sep: *Staphylococcus epidermidis*

efe: *Enterococcus faecalis*

lmo: *Listeria monocytogenes*

nme: *Neisseria meningitidis*

sal: *Salmonella typhi*

shi: *Shigella flexnerii*

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para la elaboración de este estudio, se realizó el análisis de los cromatogramas obtenidos por Cromatografía de Gases (CG) de las muestras de los microorganismos ATCC *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria meningitidis* y *Shigella flexnerii*, las cuales fueron previamente preparadas mediante la realización de la lisis celular y derivatización con metóxido de sodio 8% en metanol, extrayendo con hexano los lípidos que componen la pared celular bacteriana.

Al momento de la realización del protocolo del estudio, se contempló la utilización de la especie bacteriana *Salmonella enteritidis*. Sin embargo, debido a que para el momento de la realización de la fase experimental del estudio, esta cepa ATCC no estaba disponible dentro del repertorio de cepas del Laboratorio Nacional de Salud (LNS), la misma no fue cultivada ni analizada, incluyéndose en su lugar la cepa ATCC de la bacteria *Salmonella typhi*, cual se cultivó, preparó y analizó con el resto de las bacterias contempladas en el estudio.

A los resultados de los cromatogramas obtenidos mediante el análisis por Cromatografía de Gases a las muestras procesadas de bacterias ATCC estudiadas, se les aplicó un análisis estadístico mediante la realización de un Análisis de Varianza de 1 vía, en la que se obtuvo un valor de significancia (valor p) de 0.0084, lo que demuestra que sí existe diferencia estadísticamente significativa en el grupo de microorganismos analizado (Ver Tabla No. 1).

Posteriormente, se aplicó a los datos obtenidos un análisis estadístico que se basó en realizar la comparación por parejas de los promedios de los cromatogramas entre grupos de bacterias analizados, en el cual se obtuvieron intervalos de confianza específicos para cada especie de bacteria que fue analizada (Ver Tabla No. 2). Con los resultados obtenidos en este análisis, se construyó un Gráfico de Cajas (Ver Gráfica No. 1) que evidencia entre cuáles de las especies analizadas se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas y cuáles especies no presentaron diferencias entre sí al ser analizadas.

Los resultados estadísticos obtenidos del estudio indican que se obtuvo una diferencia significativa entre el promedio de los resultados para la especie *Staphylococcus epidermidis* al ser comparada con las especies *Enterococcus faecalis* y *Shigella flexnerii*, lo cual se ve apoyado al realizar la comparación teórica de los componentes de la pared celular entre *S. epidermidis* (gram positivo) y *S. flexnerii* (gram negativo). Sin embargo, mediante el método utilizado para el análisis, no se evidenció diferencia estadísticamente significativa para la especie *Staphylococcus epidermidis* al ser comparada con *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes* y *Neisseria meningitidis*, lo cual no concuerda con lo establecido en la teoría, que indica que los componentes de la pared celular entre *S. epidermidis* (coco gram positivo), *S. typhi* (bacilos gram negativos) y *N. meningitidis* (coco gram negativo) son considerablemente distintos, lo cual se evidencia en los métodos de identificación básicos para cada uno de estos microorganismos (Calva, 2012; Davis, 1990).

Por otro lado, si bien el análisis demostró diferencias estadísticamente significativas al comparar los resultados de *S. epidermidis* contra los resultados de *E. faecalis* y *S. flexnerii* de forma individual con cada especie, no hubo diferencia estadísticamente significativa al comparar entre sí los resultados obtenidos entre *E. faecalis* (coco gram positivo) y *S. flexnerii* (bacilos gram negativos), lo cual va en contra de lo que se esperaría de forma teórica, ya que los componentes en la pared bacteriana de ambos microorganismos son considerablemente distintos, lo cual se demuestra a grandes rasgos mediante las diferencia en la tinción gram (Ryan, 2004; Davis, 1990).

Adicionalmente, al momento de realizar la comparación de los resultados obtenidos para las especies *Salmonella typhi* (bacilo gram negativo), *Listeria monocytogenes* (bacilo gram positivo) y *Neisseria meningitidis* (coco gram negativo) no hubieron diferencias estadísticamente significativas al comparar de forma individual cada una de estas especies ATCC entre sí, lo cual es contrario a lo que se esperaría debido a la diversidad de componentes que conforman la pared bacteriana de estos microorganismos (Brock, 2009; Davis, 1990).

Durante la planificación de la fase experimental del estudio, inicialmente se había considerado realizar también el análisis de cepas nosocomiales brindadas por el Laboratorio Nacional de Salud (LNS). Sin embargo, al momento de realizar el análisis, los resultados obtenidos fueron cromatogramas que evidenciaron contaminantes en las muestras analizadas, lo que indica que a las muestras de cepas nosocomiales se les debe aplicar un método de purificación adicional al que se le aplicó a las muestras de cepas ATCC.

Por tal motivo, se puede concluir que si bien el método utilizado para el análisis de las muestras procesadas de los cultivos de las cepas ATCC demostró diferencia para tres de las seis cepas que fueron analizadas, este debe ser actualizado para que tenga una mayor diferenciación entre las especies de bacterias que se analicen. Mediante la investigación en este campo, será posible la identificación más rápida de microorganismos patógenos que ponen en riesgo vidas humanas, siendo entonces posible la aplicación de un tratamiento antibiótico oportuno y adecuado para tratar estos padecimientos.

X. CONCLUSIONES

1. Mediante el método de identificación rápida de especies de bacterias por Cromatografía de Gases que fue determinado, fue posible realizar la diferenciación entre *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* y *Shigella flexnerii*.
2. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes* y *Neisseria meningitidis*.
3. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre *Enterococcus faecalis* y *Shigella flexnerii* de forma individual.
4. Se conoció el perfil cromatográfico de seis cepas de bacterias ATCC analizadas: *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria meningitidis* y *Shigella flexnerii*.
5. Se realizó una comparación estadística de los cromatogramas obtenidos de los lípidos presentes en la pared celular de las especies de microorganismos que fueron analizadas.

XI. RECOMENDACIONES

1. Para la actualización del método presentado, se deben realizar modificaciones en los parámetros utilizados para el análisis en el Cromatógrafo de Gases en base a mayor investigación experimental, de tal manera que sea posible obtener una mayor diferenciación estadística en los perfiles cromatográficos de las especies de microorganismos analizados.
2. Para lograr obtener mayor documentación en Guatemala respecto a esta técnica de identificación de microorganismos, se debe ampliar el análisis de muestras de otras especies bacterianas, especialmente las que representen una amenaza para la salud de la población.
3. En el análisis de las muestras nosocomiales de cepas bacterianas, se debe modificar el método de tratamiento de las muestras en relación al método utilizado para realizar los análisis en este estudio, esto para prevenir que la contaminación interfiera al momento de realizar en análisis cromatográfico.
4. Se debe continuar con la investigación de métodos alternativos para la identificación oportuna de microorganismos que permita la aplicación rápida del tratamiento adecuado para combatir los padecimientos que pongan en peligro la salud de la población.

XII. REFERENCIAS

1. Murray, P. (1995). *Manual of Clinical Microbiology*. (6a. Ed.) USA: American Society of Microbiology Press.
2. Butler, W. (2001). *High Performance Liquid Chromatography Analysis of Mycolic Acid as an Aid in Laboratory Identification of Rhodococcus and Nocardia Species*. Journal of Clinical Microbiology. (Vol 25, No.11, pág. 2126). Atlanta, USA.
3. Fox, A. (1993). *Determination of Carbohydrate Profiles of Bacillus anthracis and Bacillus cereus, including identification of O-Methyl Methylpentoses by Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. South Carolina: Journal of Clinical Microbiology. (Vol 31, No.4, pág. 887). USA.
4. Kunitsky C, Osterhout G, Sasser M. (2006). *Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the Midi Sherlock microbial identification system in Encyclopedia of rapid microbiological methods*. Newark, USA.
5. Pritchard, D. (1981). *Carbohydrate Fingerprints of Streptococcal Cells*. Journal of Clinical Microbiology. (Vol. 13, No.1, pág. 89). Alabama, USA.
6. Sasser M. (2006). *Bacterial identification by gas chromatographic analysis of fatty acids methyl esters (GC-FAME)*. Newark, USA.
7. Breed, R. (1948). *The Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (6th. Ed.) USA. The Williams & Wilkinson Company.
8. Patrick R., Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. (2002). *Medical Microbiology*. (5ª. Ed). Editorial Elsevier, España.
9. Sánchez, A. (2005). *Determinación de metanol en bebidas alcohólicas fermentadas tradicionales y populares de mayor consumo en dos regiones de la república de Guatemala por cromatografía de gases*. Tesis de graduación, carrera de Química Farmacéutica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
10. Skoog D. (1992). *Principios de Análisis Instrumental*. (5ta. Ed.) España. Editorial McGraw-Hill.
11. Fernández, F. (2006). *Nuevos Métodos de Identificación de Micobacterias*. Servicio de Microbiología, Llobregat, Barcelona.
12. Cazes, J. (2004). *Encyclopedia of Chromatography*. USA. Marcel Dekker Inc.

13. De León, C. (2004). *Implementación de un método para determinar la calidad del aceite esencial de limón (Citrus aurantifolia) por cromatografía en capa fina y espectroscopía ultravioleta como método alternativo a la cromatografía de gases*. Tesis de graduación, carrera de Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
14. Brock. (2009). *Biología de los microorganismos*. (11a. Ed.) Editorial Pearson Education. S.A. España.
15. Claudio, T. (2009). *Caracterización de Microorganismos por medio de Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas*. Tesis de graduación, carrera de Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
16. Davis, B. (1990). *Tratado de Microbiología*. (3a. Ed.) Editorial Salvat. Barcelona, España.
17. Katzung, B. (2010). *Farmacología básica y clínica*. (11ª. Ed.). Editorial McGraw-Hill Interamericana.
18. Ryan, K. (2004) *Sherris Medical Microbiology*. (4a. Edición). Editorial McGraw-Hill. Estados Unidos.
19. Koneman, et. al. (2006) *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. (6ª. Edición). Editorial Panamericana. España.
20. Calva, E. (2012) *Salmonella typhi y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública*. Instituto de Biotecnología, UNAM. México.

XIII. ANEXOS

Tinción diferencial de Gram

Las bacterias son microorganismos incoloros, por este motivo deben teñirse para poder observarlos con ayuda del microscopio. La tinción más importante para diferenciar bacterias es la Tinción diferencial de Gram. En este procedimiento, el frote bacteriano fijado al calor, se somete a las soluciones siguientes en el orden que se indica:

- ❖ Cristal Violeta.
- ❖ Lugol (solución de yodo).
- ❖ Alcohol-acetona (decolorante).
- ❖ Safranina.

Las bacterias sometidas a la tinción de Gram pertenecen a dos grupos:

- ❖ Bacterias Gram Positivo: Retienen el cristal violeta y se tiñen de color violeta-azul profundo.
- ❖ Bacterias Gram Negativo: No retienen el Cristal Violeta y por contraste se tiñen de safranina, se tiñen de color rojo.

La explicación al mecanismo de la reacción al Gram se basa en la estructura y composición de la pared celular de las bacterias. Las bacterias Gram negativo contienen un porcentaje más alto de lípidos en la pared celular, la cual es más delgada que la de las bacterias Gram positivo. El tratamiento con el alcohol-acetona extrae los lípidos con lo cual se aumenta la porosidad o permeabilidad de la pared celular Gram negativa. Así el complejo que se ha formado entre el Cristal Violeta y el Lugol puede extraerse y la bacteria se destiñe o decolora; y se teñirá con el color rojo de la safranina que se agrega como último paso de la tinción.

La pared celular de las bacterias Gram positivo por su bajo contenido en lípidos, se deshidratan durante el tratamiento con alcohol-acetona, los poros disminuyen, la permeabilidad se reduce y no se logra extraer el complejo del Cristal Violeta con el Lugol, por lo que quedan teñidas con un color azul-violeta profundo.

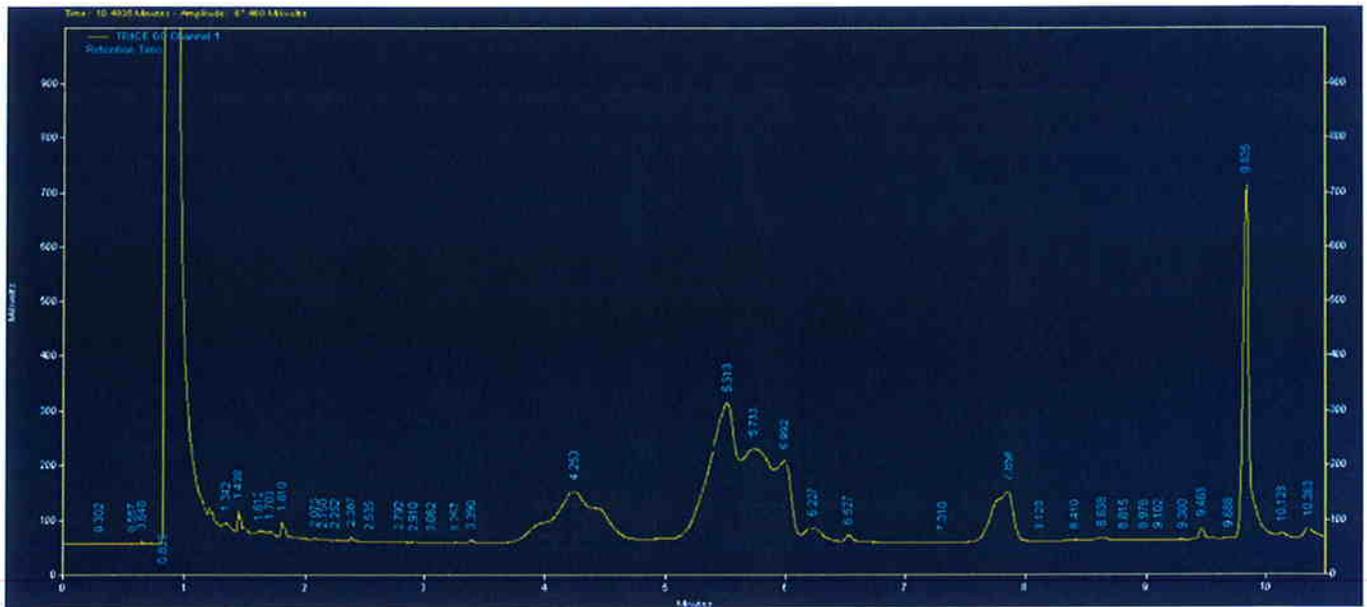
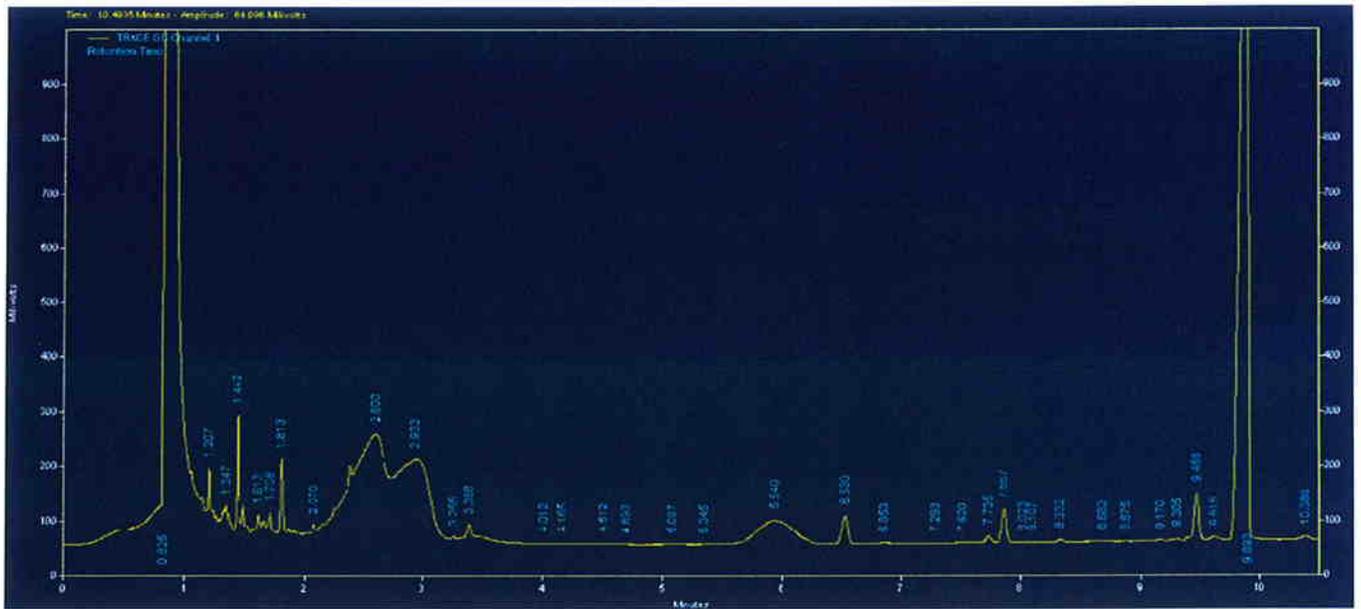
Tabla No. 1: PASOS Y RESULTADOS DE LA TINCIÓN GRAM.

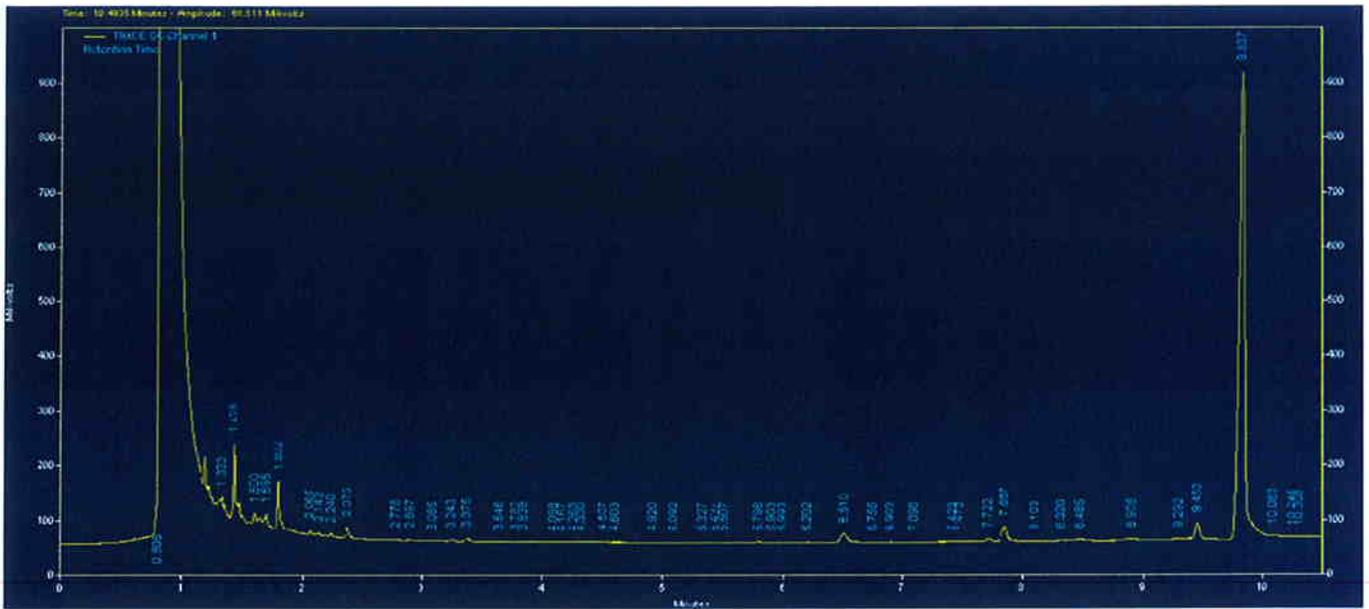
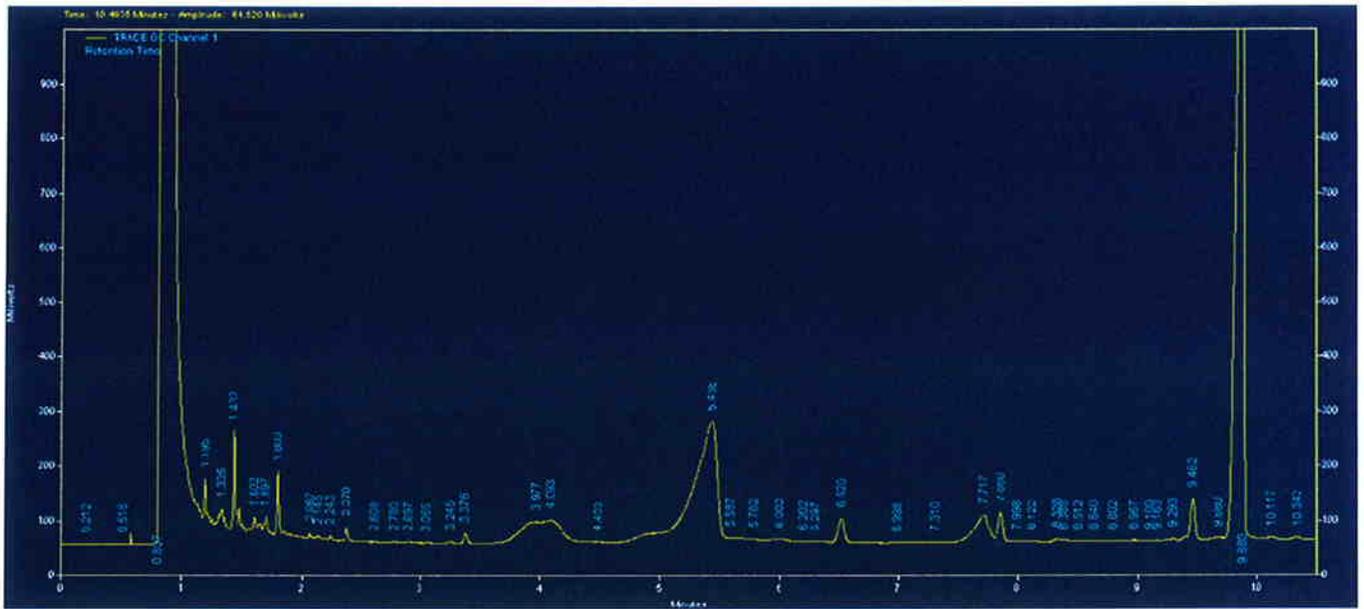
Solución aplicada en orden	Gram Positivo	Gram Negativo
1. Cristal Violeta	Las bacterias se tiñen violeta.	Las bacterias se tiñen violeta.
2. Lugol (yodo)	Se forma un complejo cristal violeta-lugol, las bacterias permanecen violeta.	Se forma un complejo cristal violeta-lugol, las bacterias permanecen violeta.
3. Alcohol-acetona (decolorante)	Las paredes celulares se deshidratan, disminuye la permeabilidad, el complejo cristal violeta-lugol no puede salir de la bacteria, permanece azul-violeta.	Extracción de lípidos de las bacterias celulares, aumento de porosidad y permeabilidad, el complejo cristal violeta-lugol sale de la bacteria y se destiñe.
4. Safranina	Las bacterias no son afectadas, permanecen azul-violeta.	Las bacterias toman este colorante y se tiñen de rojo.

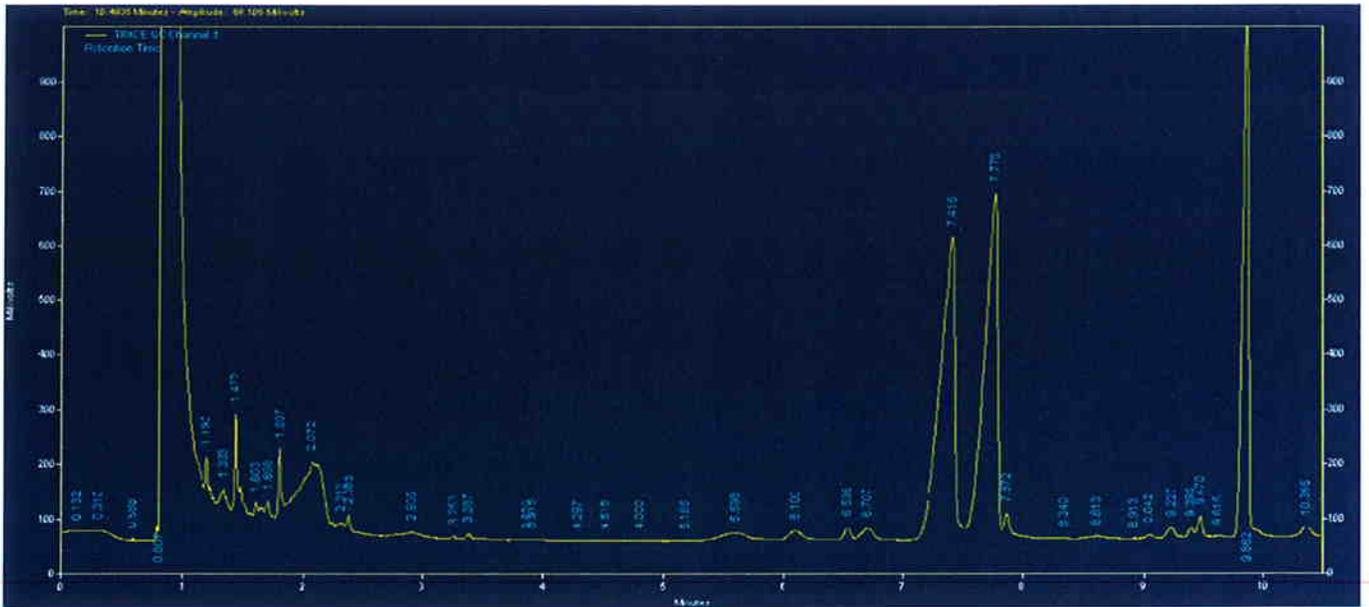
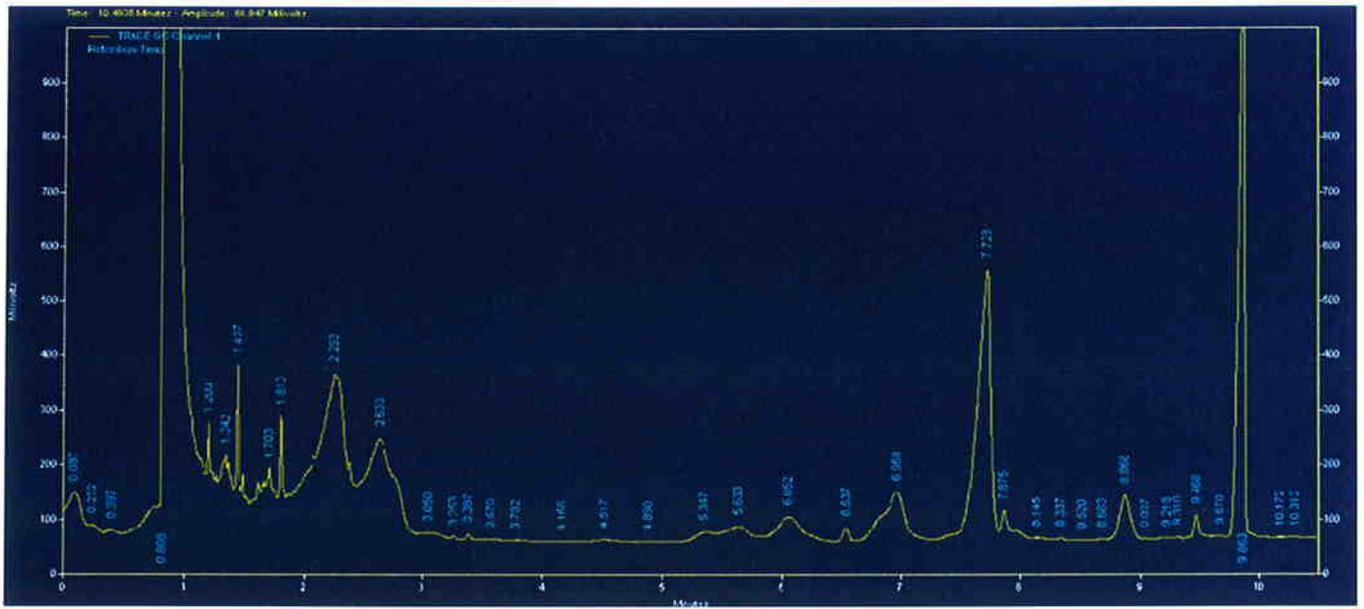
Obtenido de:

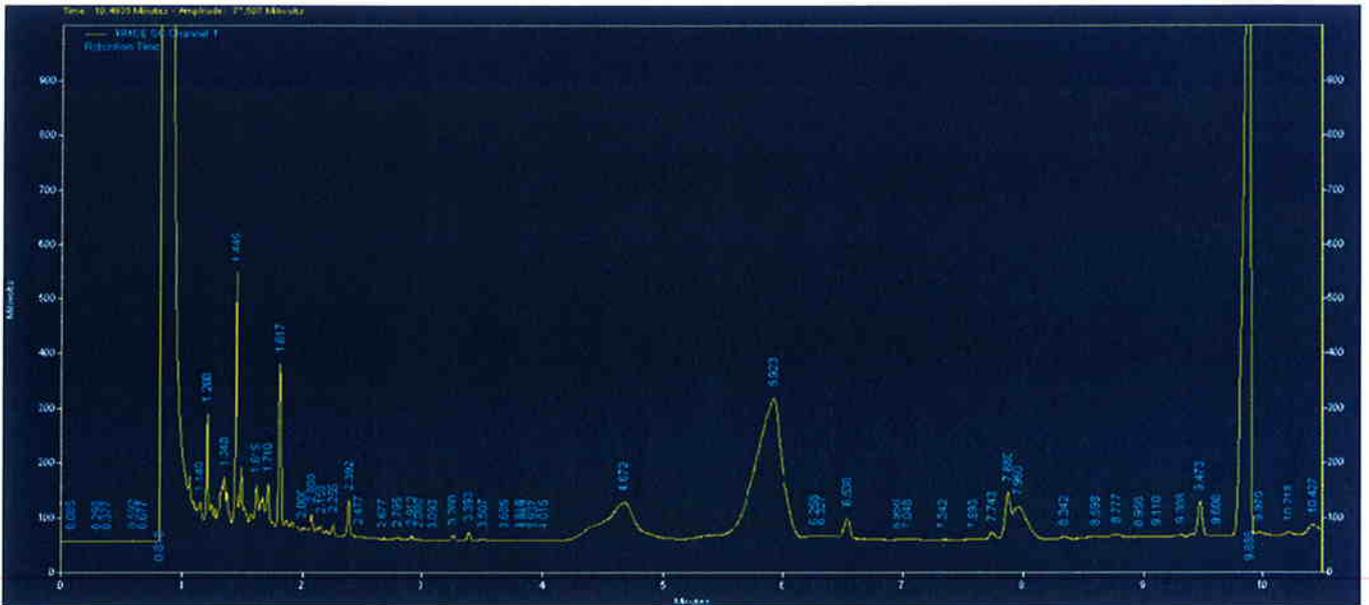
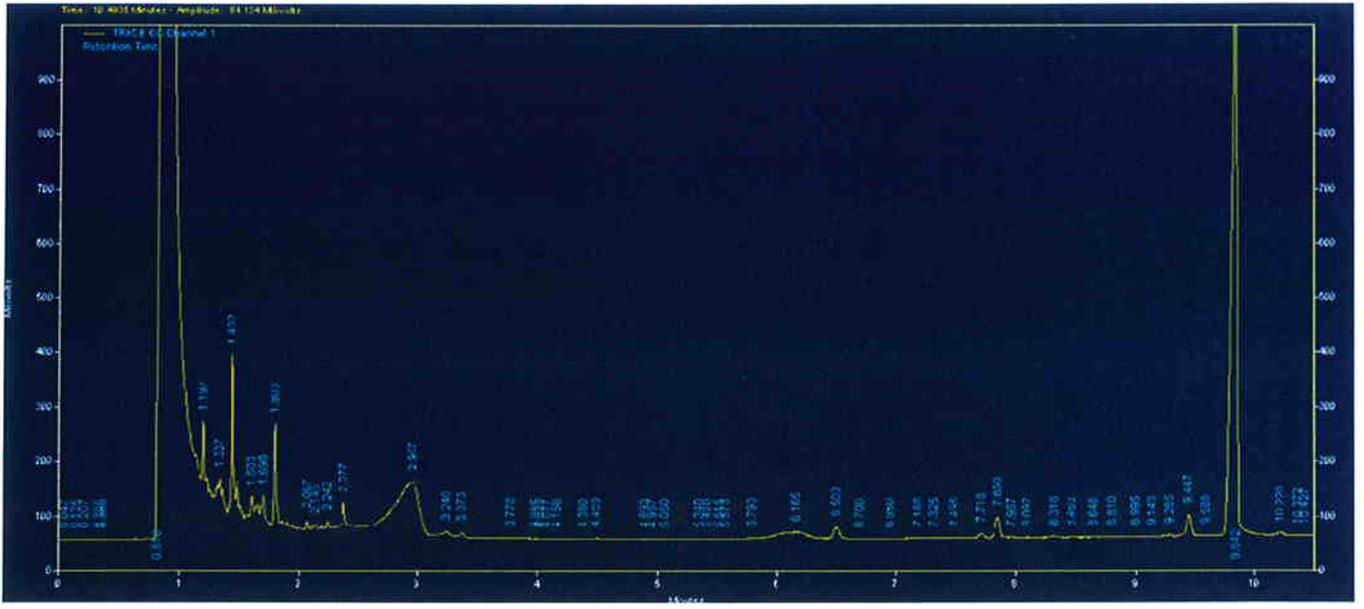
- ❖ Rodríguez, J. 2006. “Microbiología: Práctica y Esencial”. 1a. Edición. Editorial Organización Panamericana de la Salud. Washington DC, Estados Unidos de América.

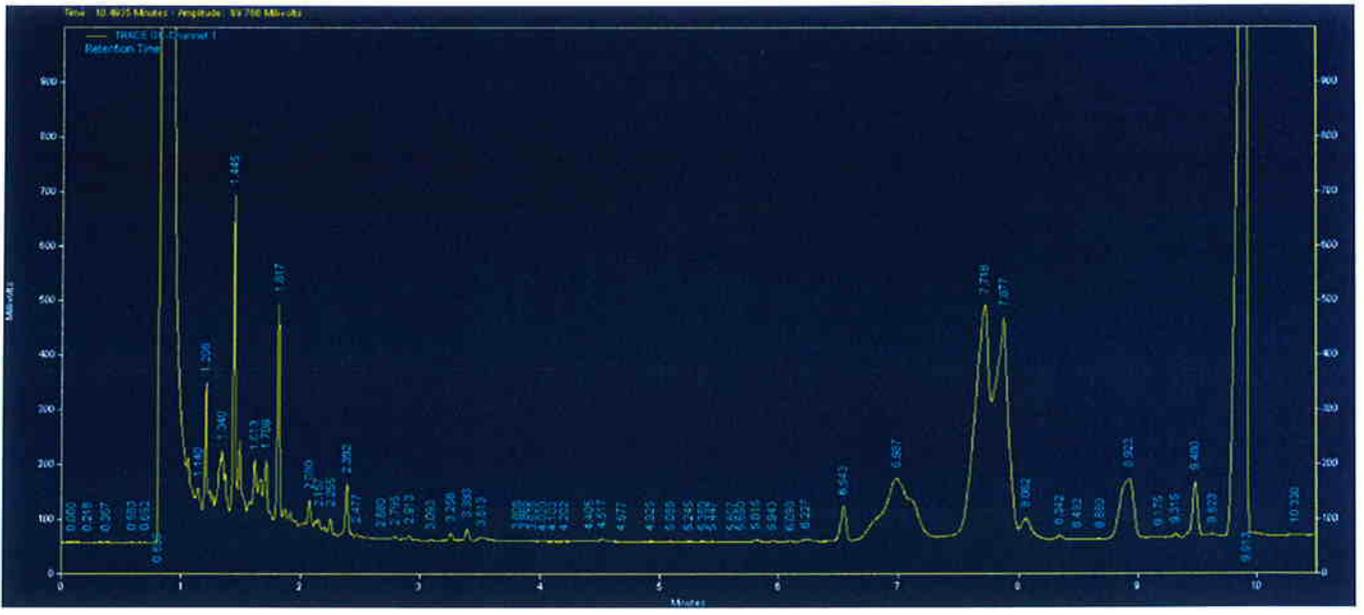
**CROMATOGRAMAS OBTENIDOS DURANTE
EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO
DE LA CEPA ATCC
*STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS***



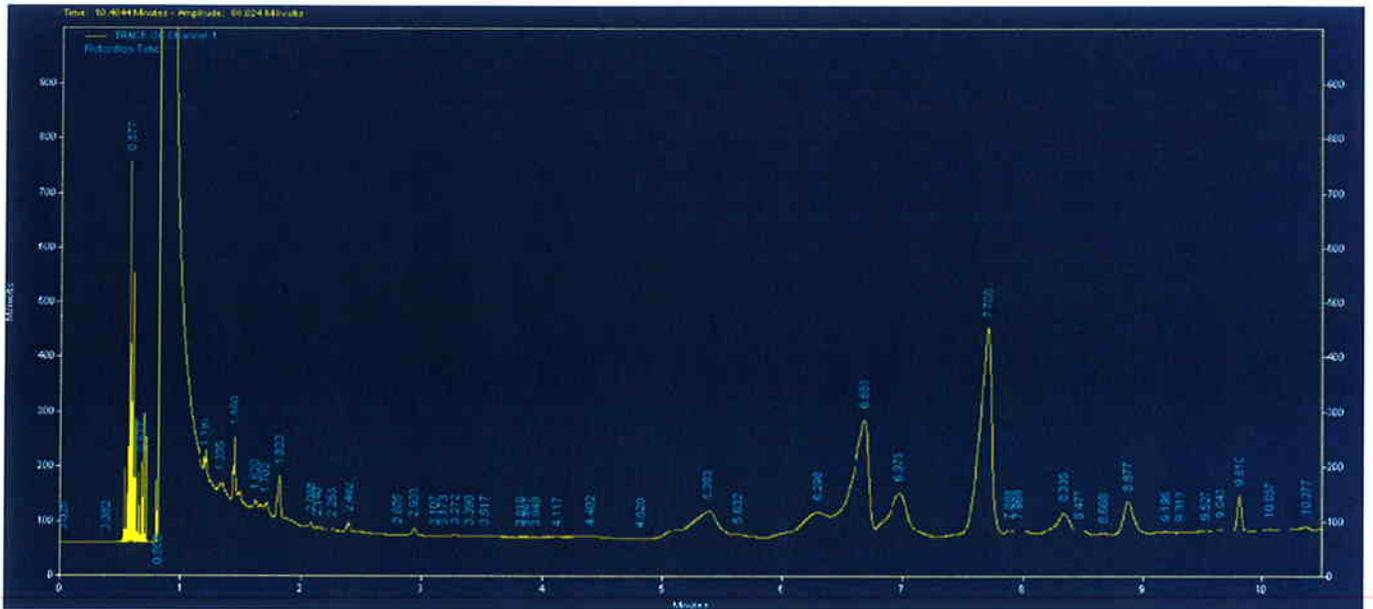
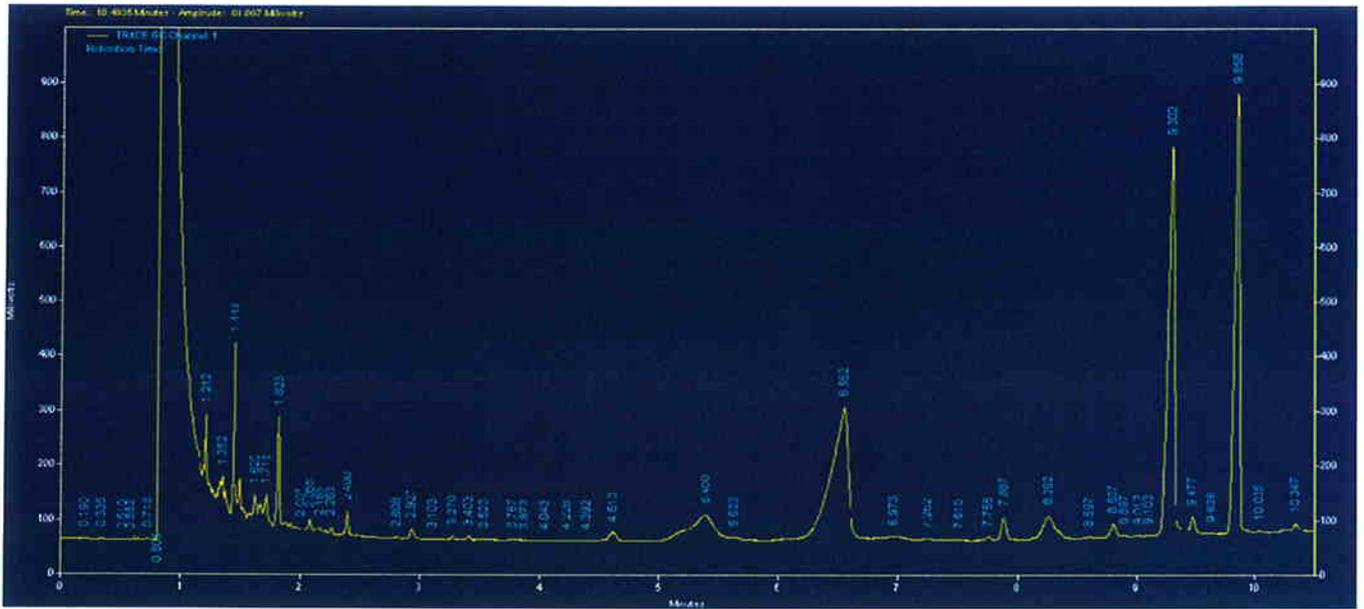


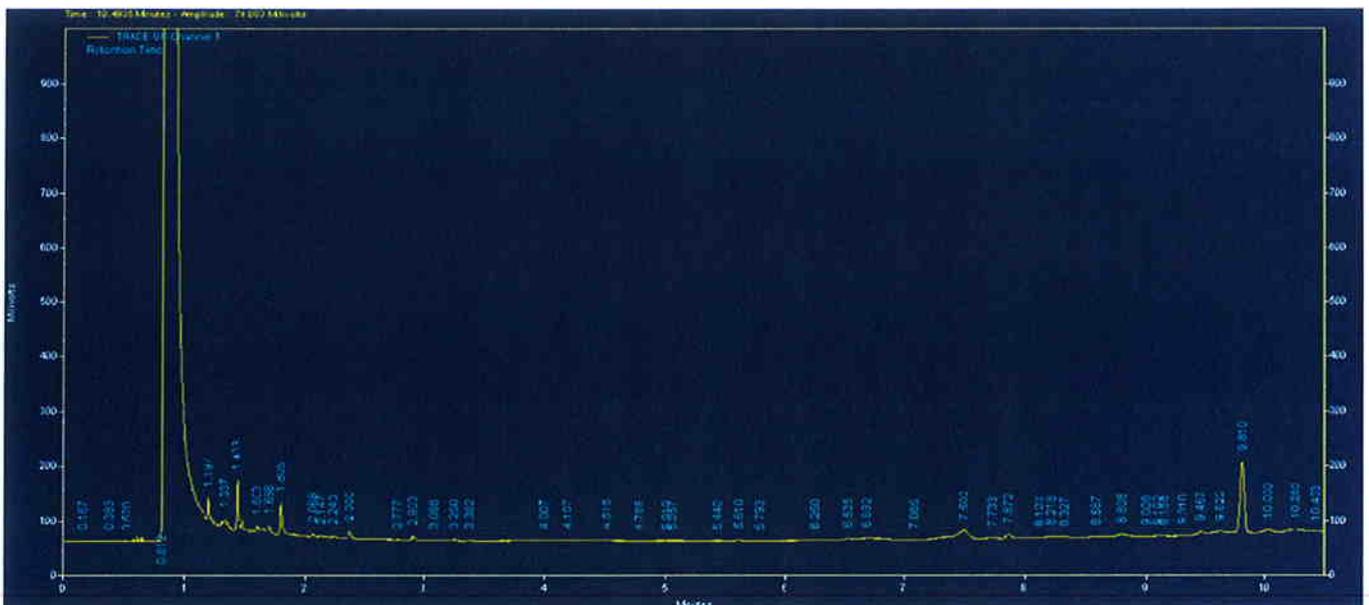
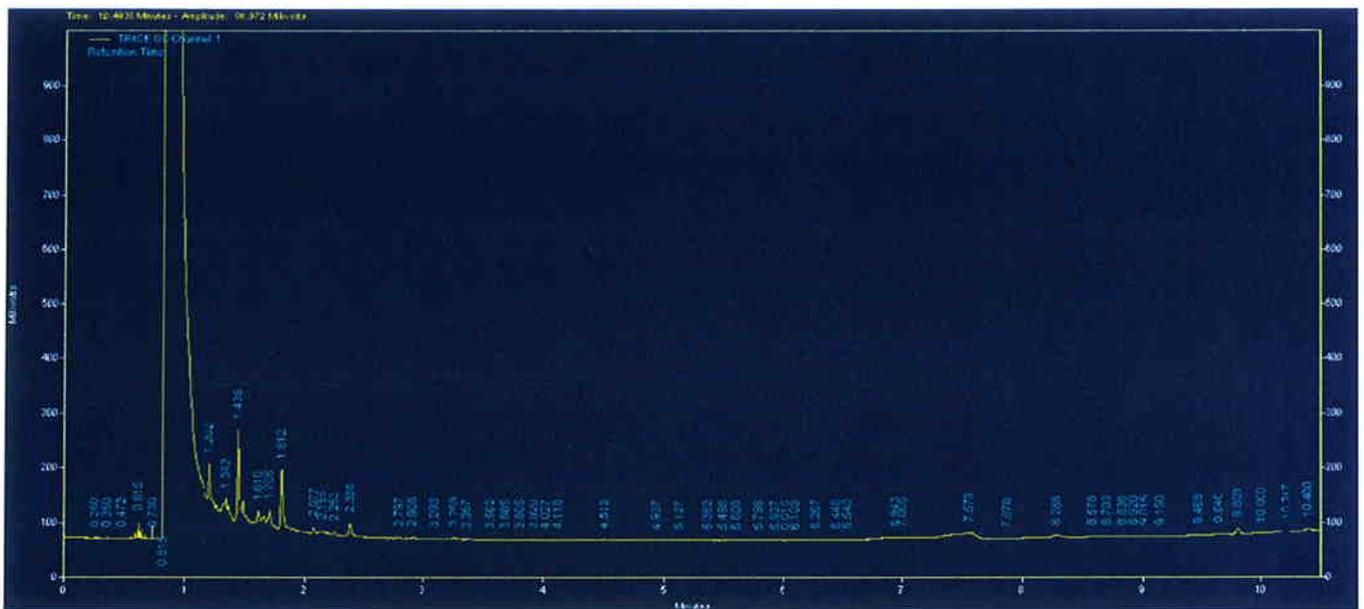


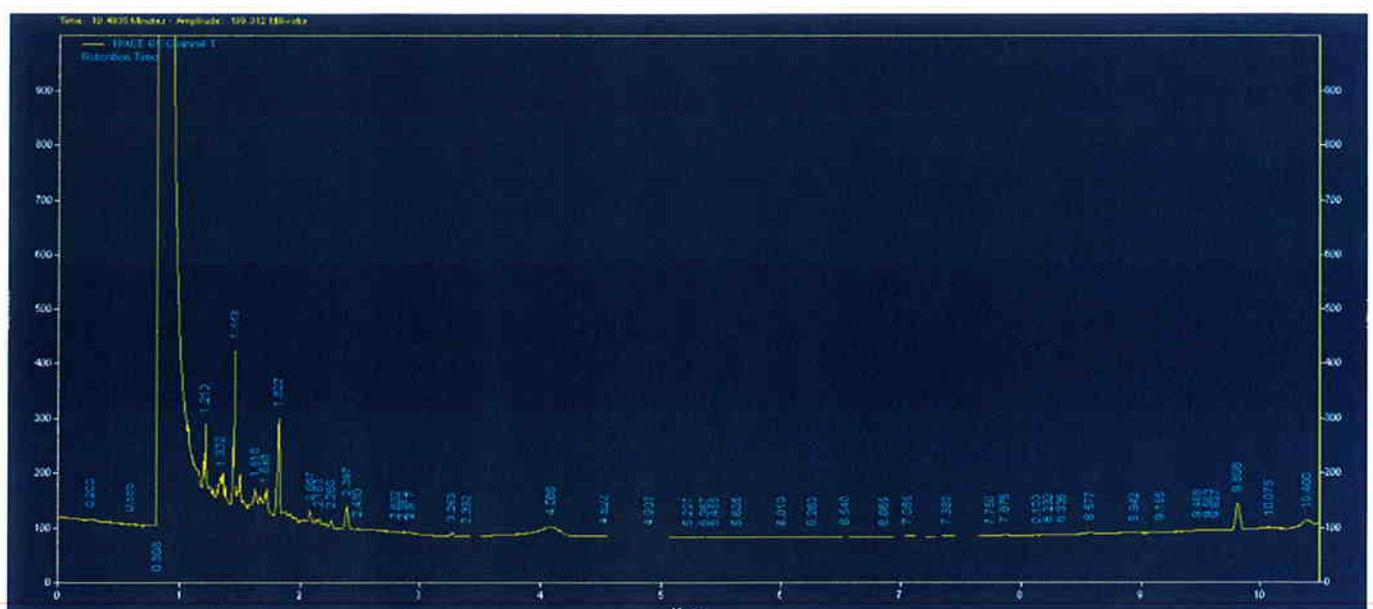
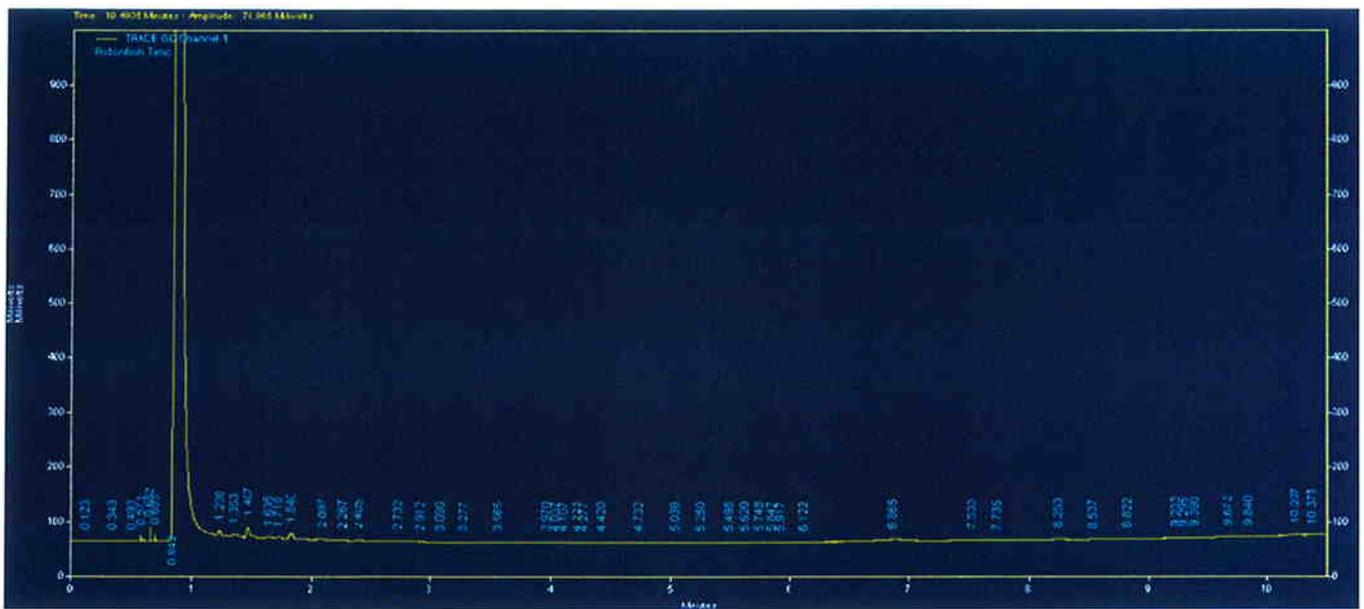


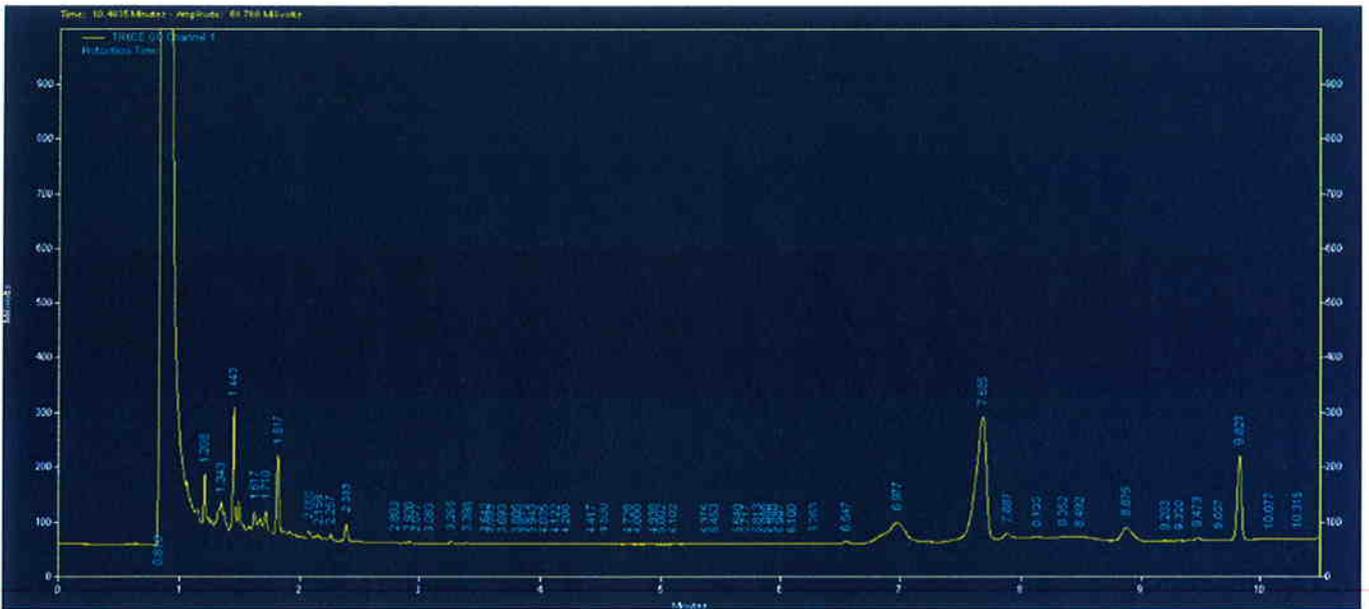
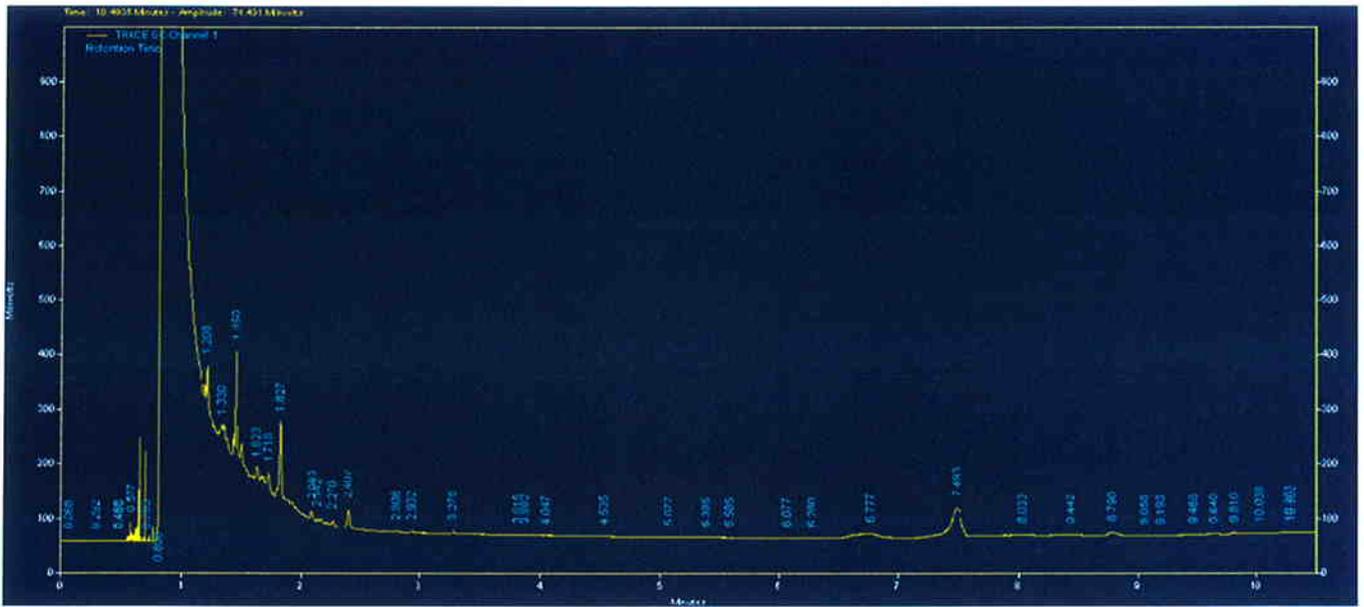


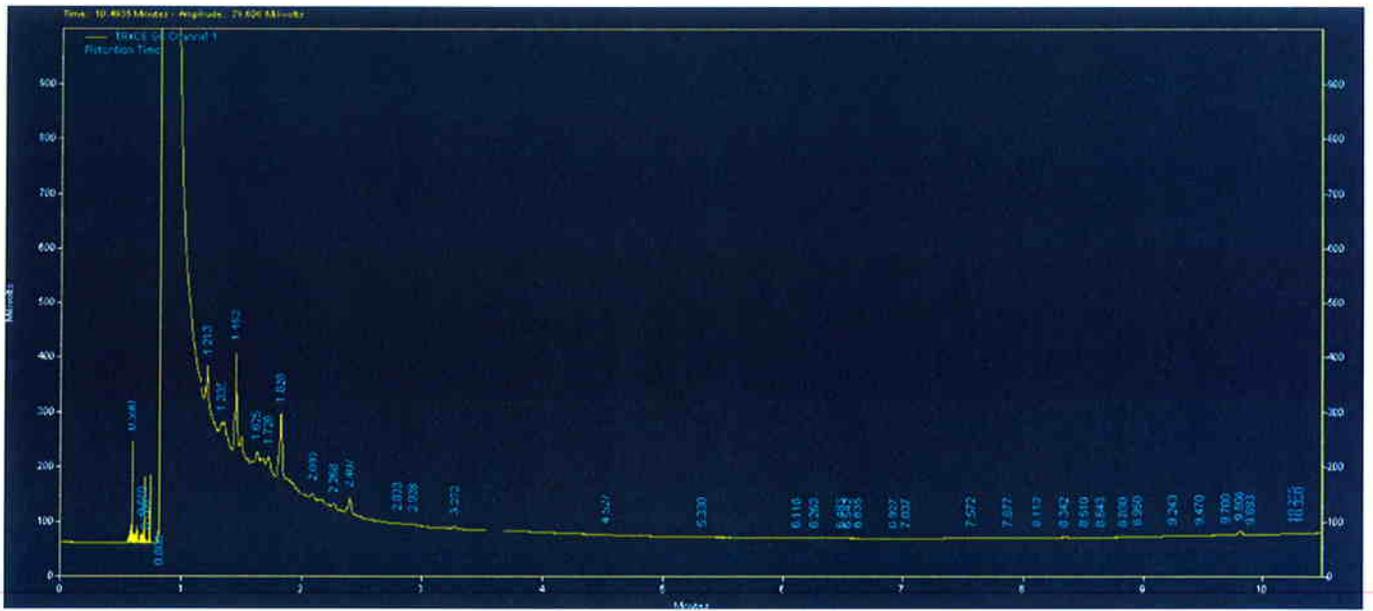
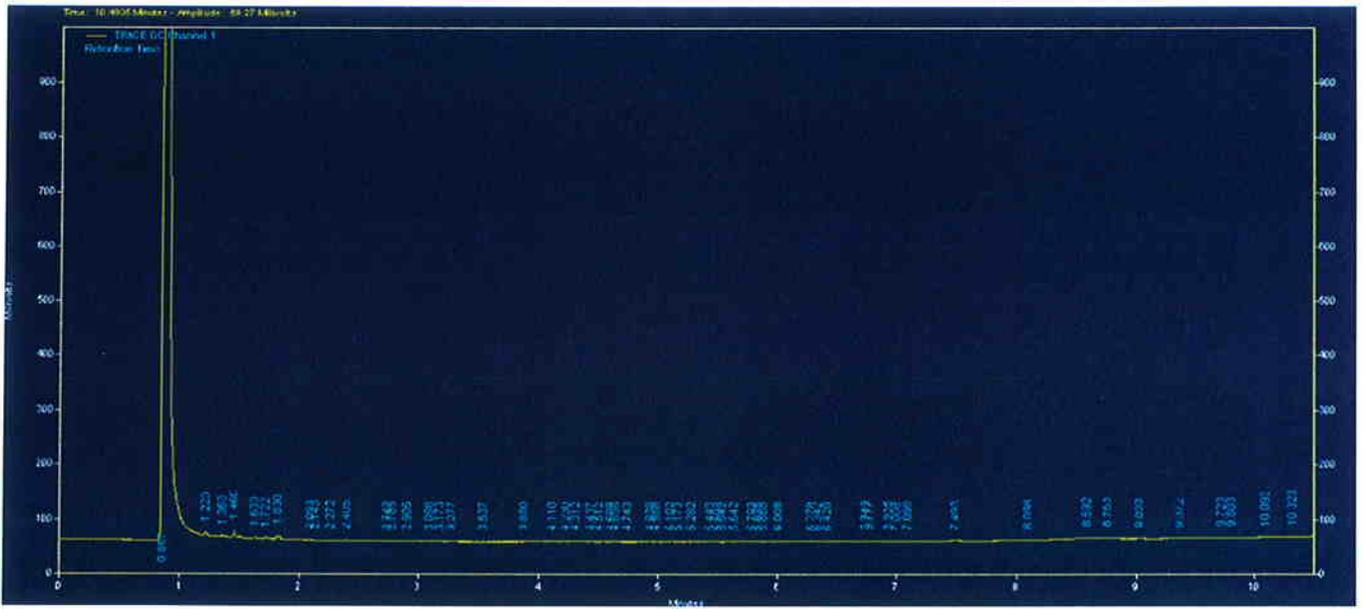
**CROMATOGRAMAS OBTENIDOS DURANTE
EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO
DE LA CEPA ATCC
*LISTERIA MONOCYTOGENES***



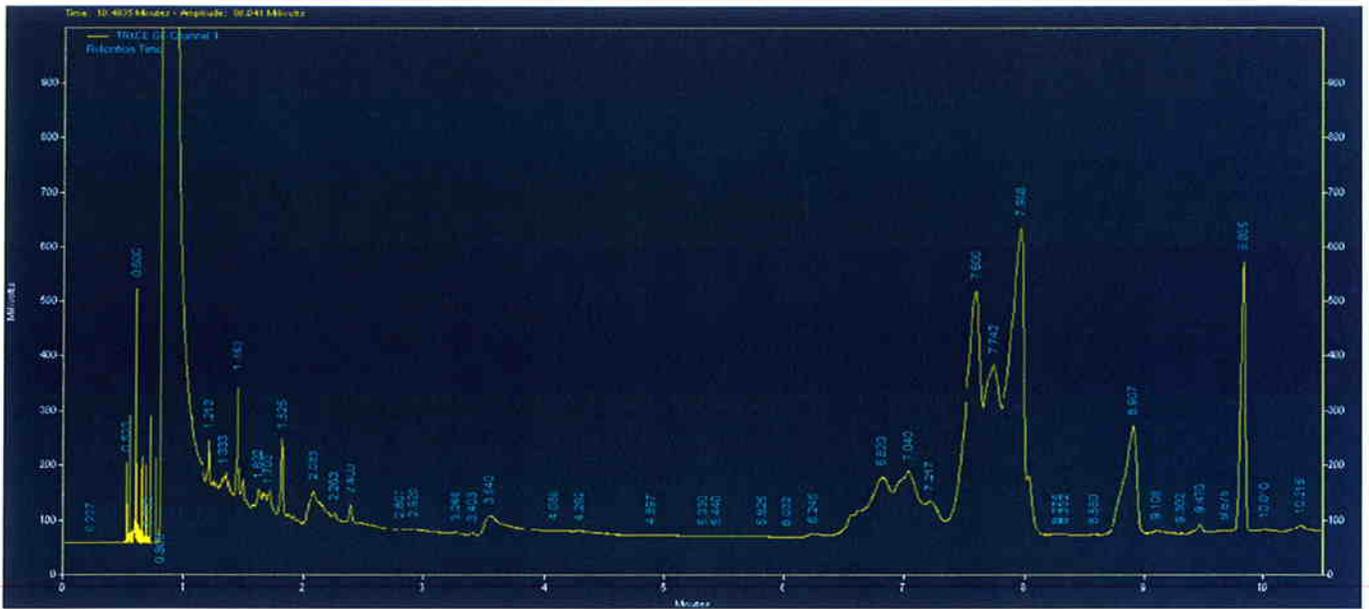
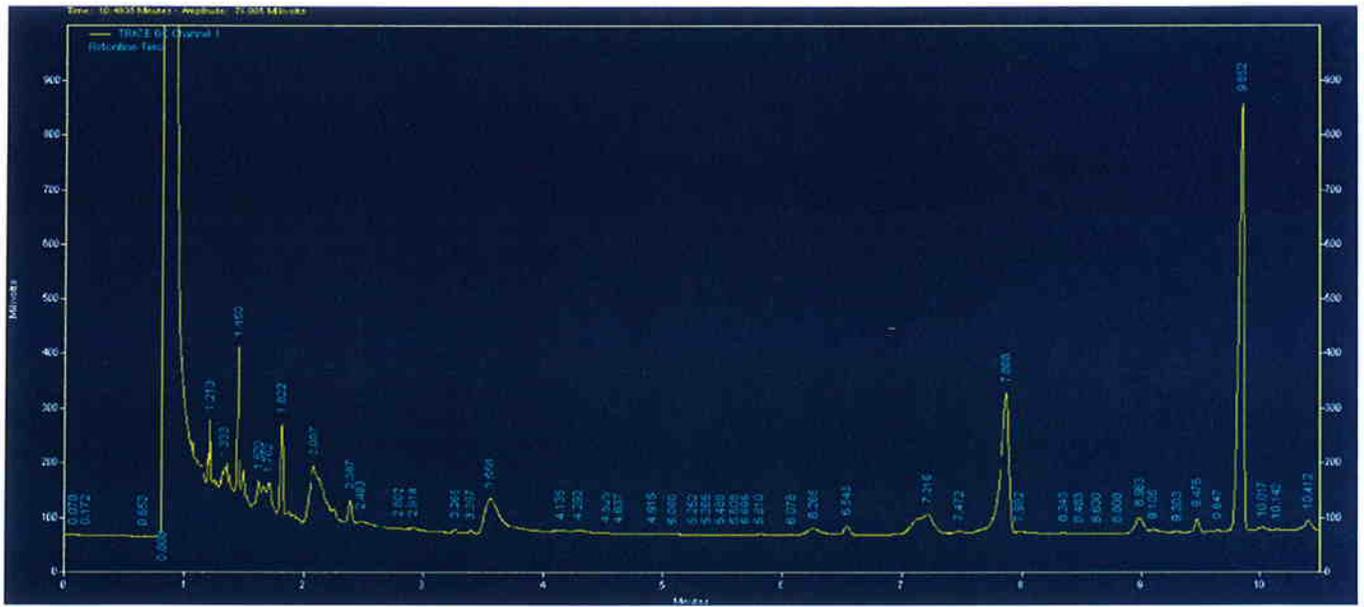


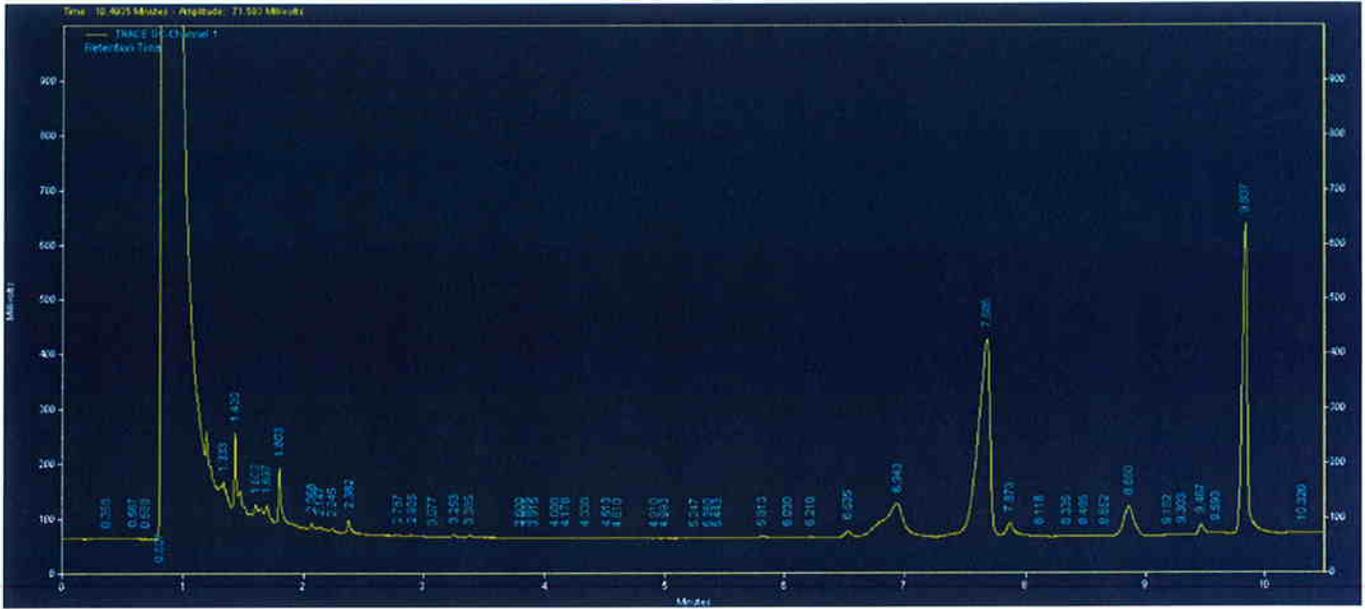
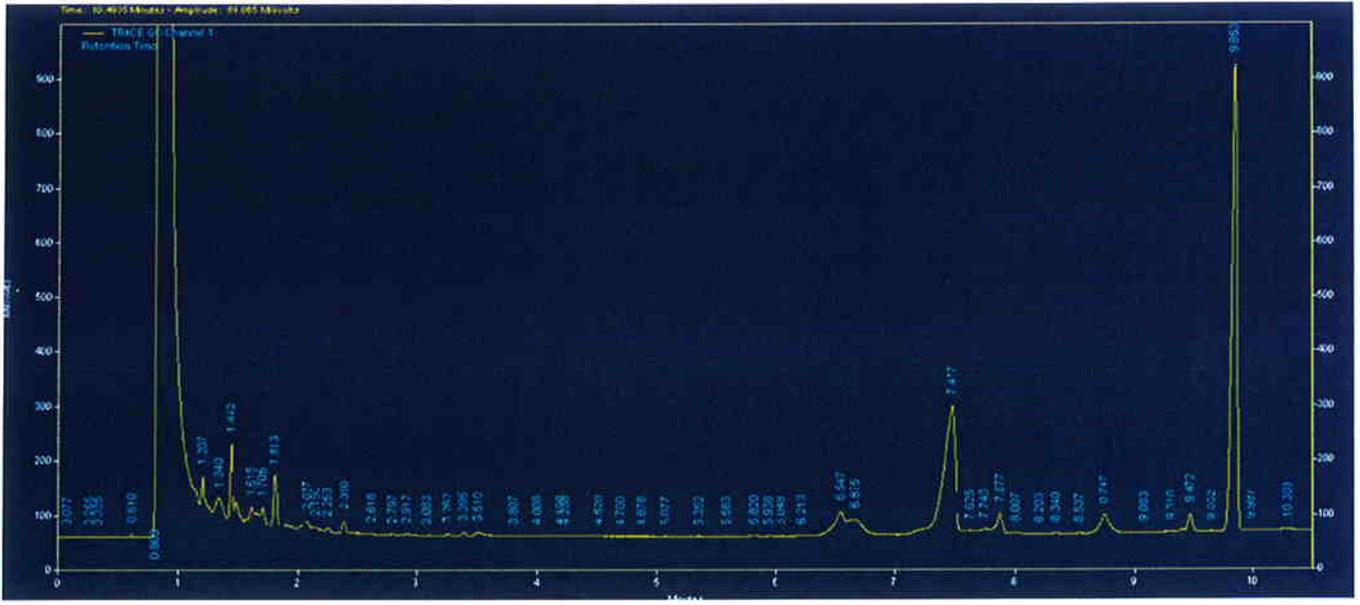


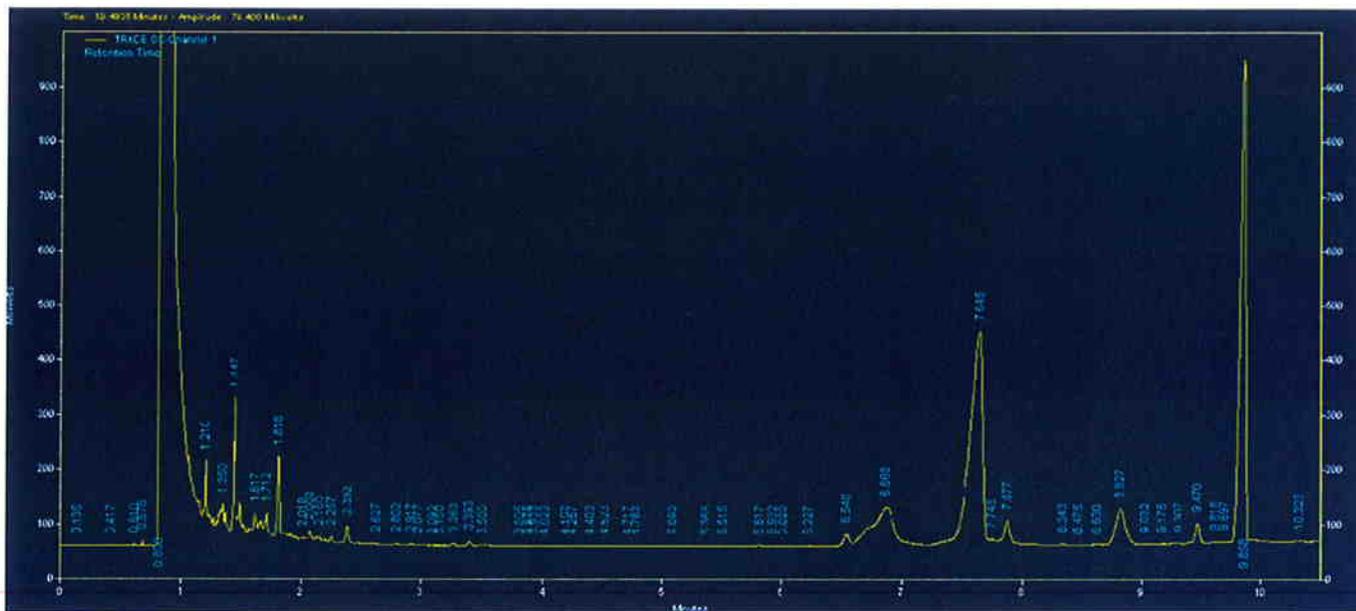
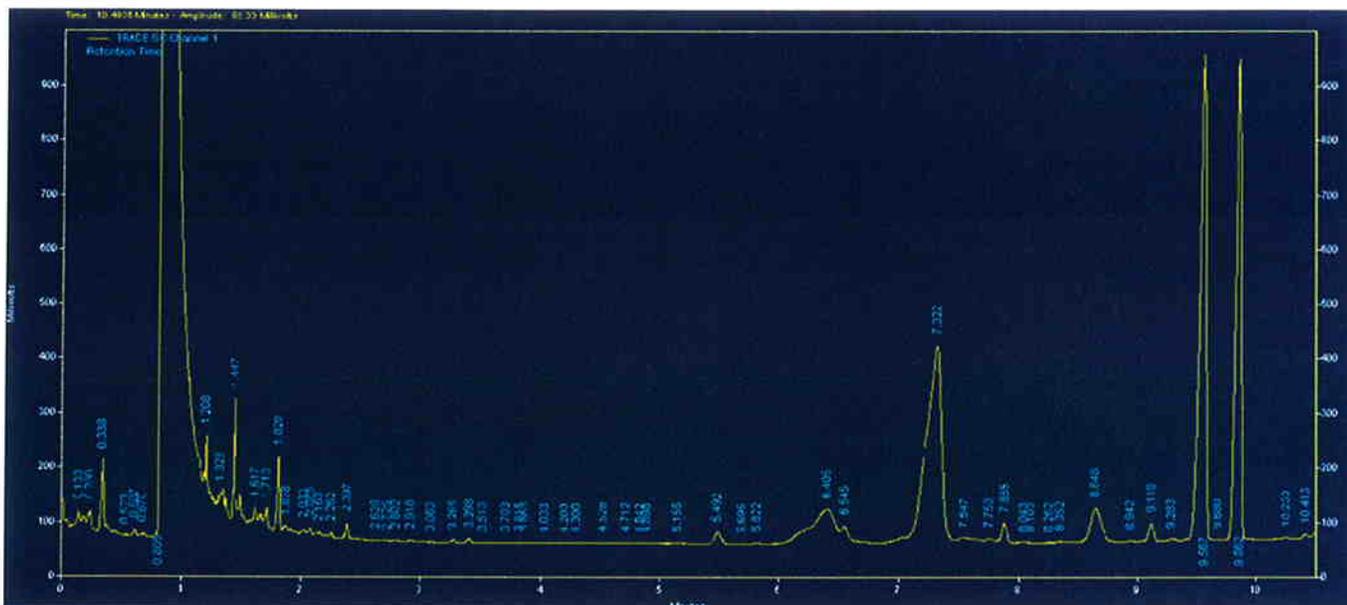




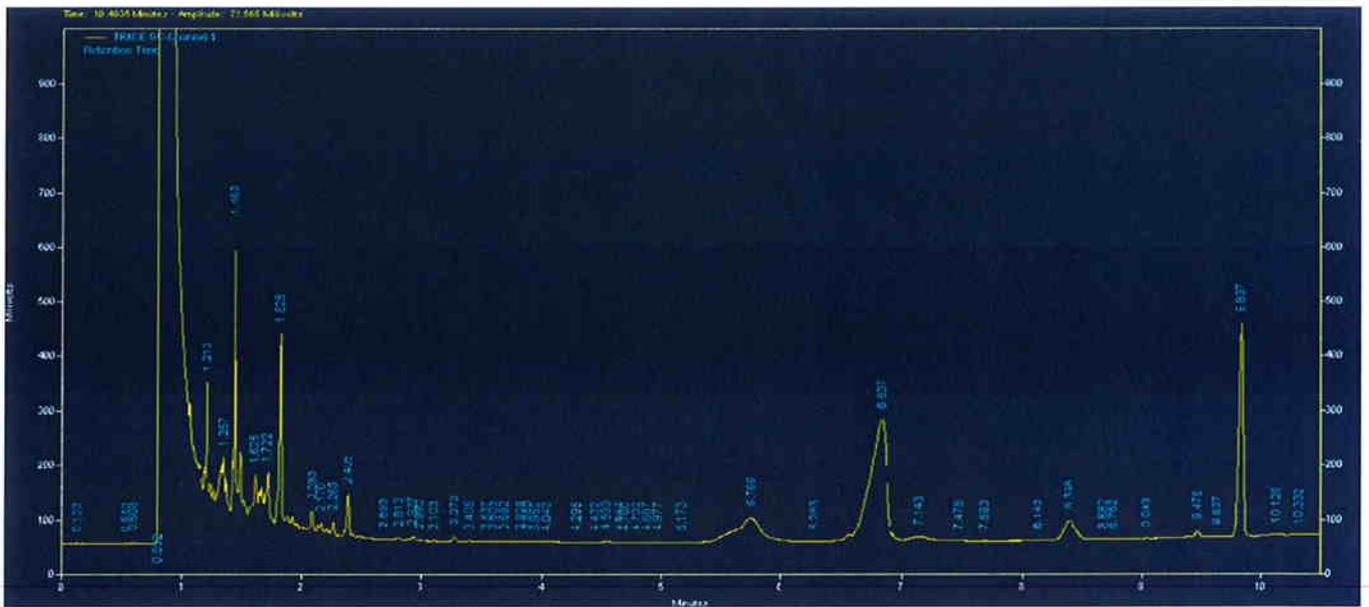
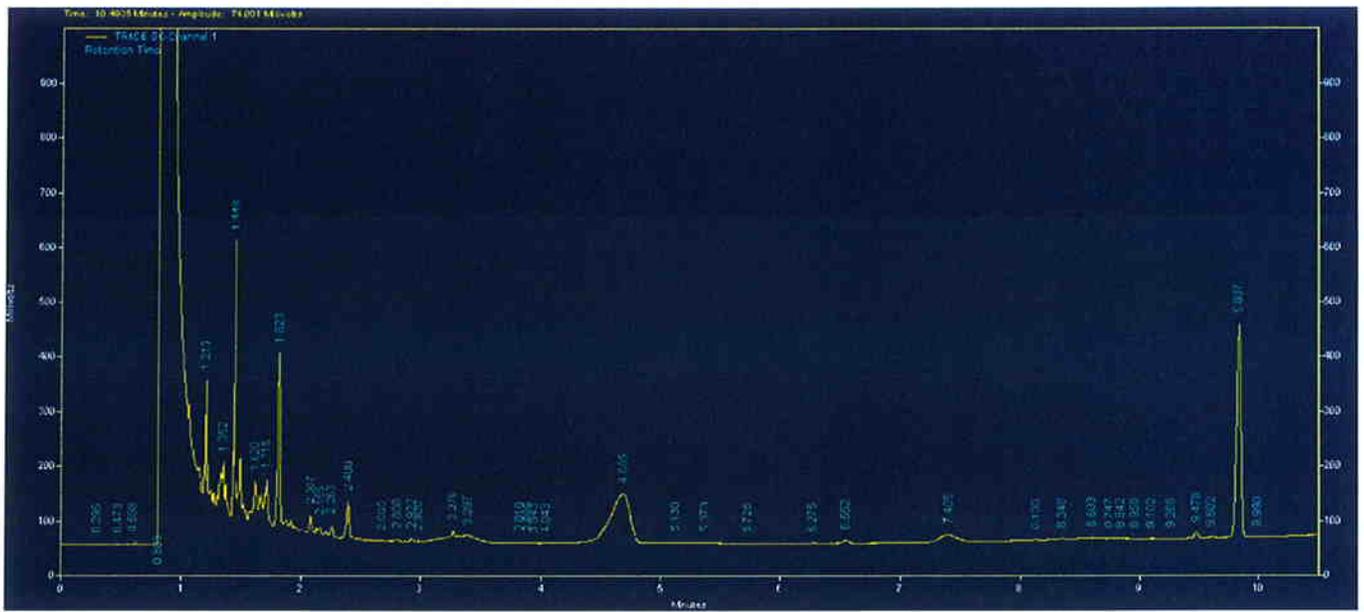
**CROMATOGRAMAS OBTENIDOS DURANTE
EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO
DE LA CEPA ATCC
*NEISSERIA MENINGITIDIS***

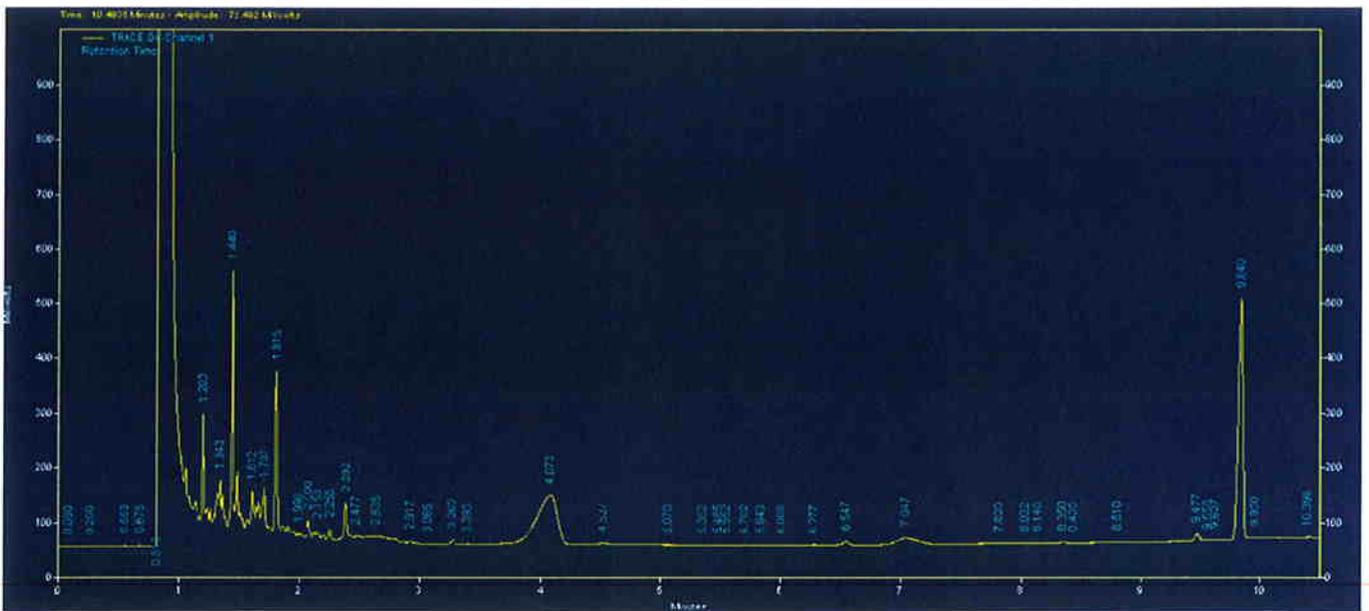
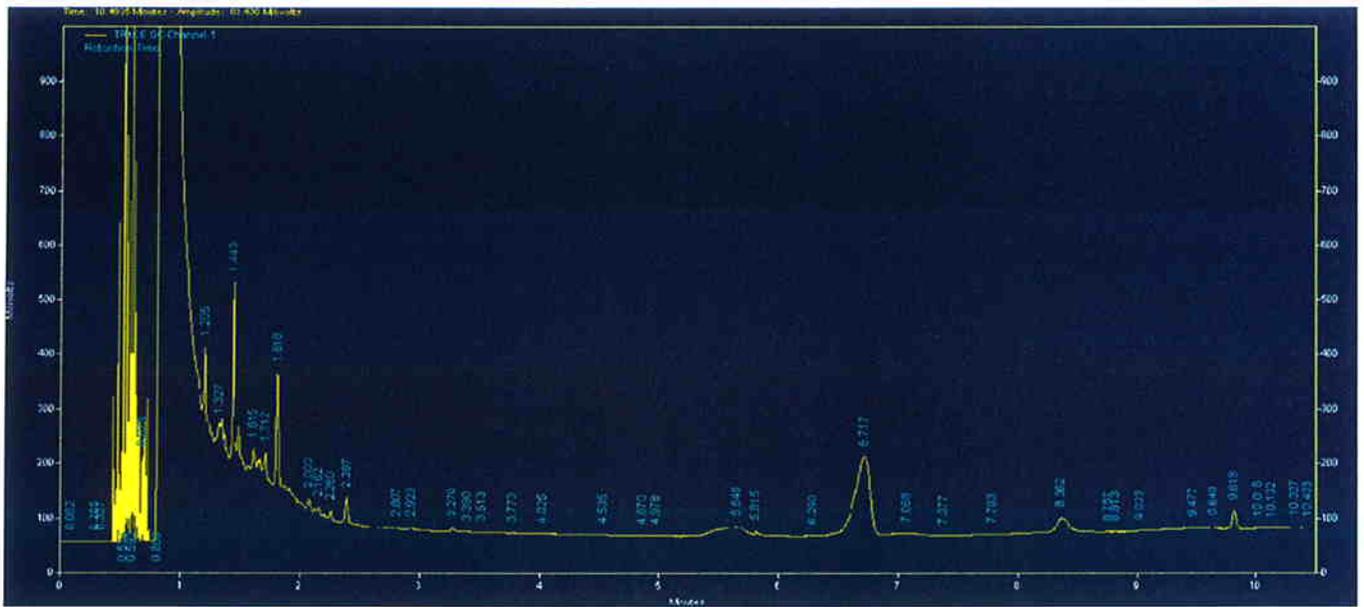


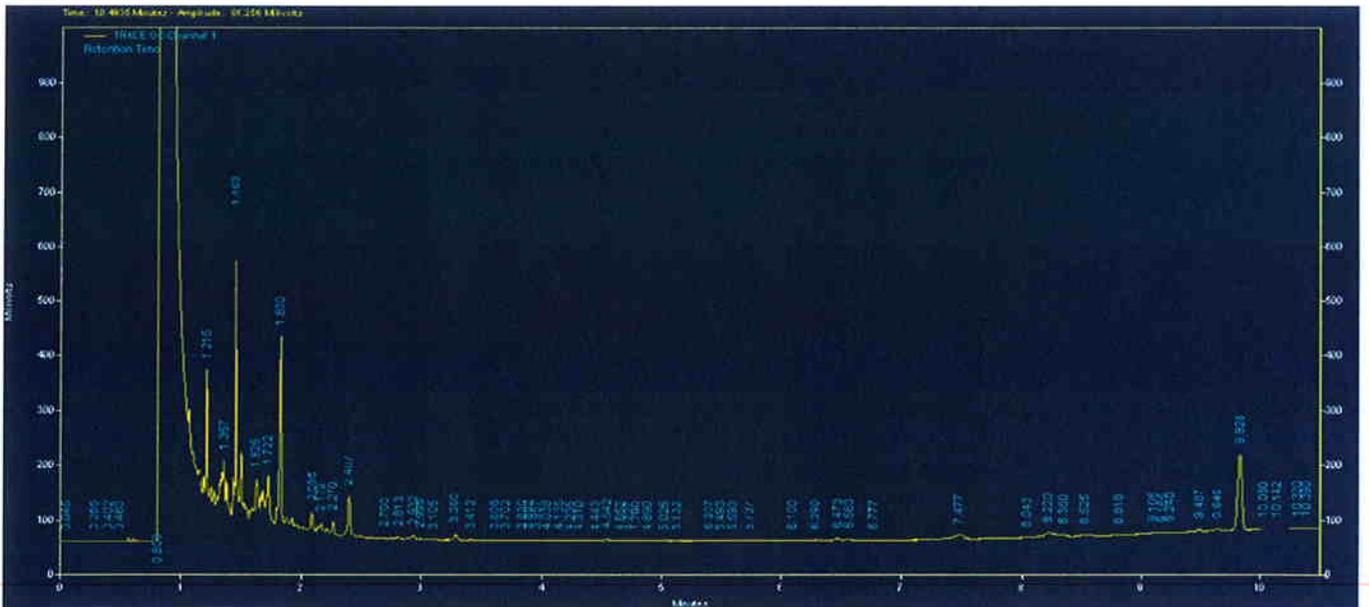
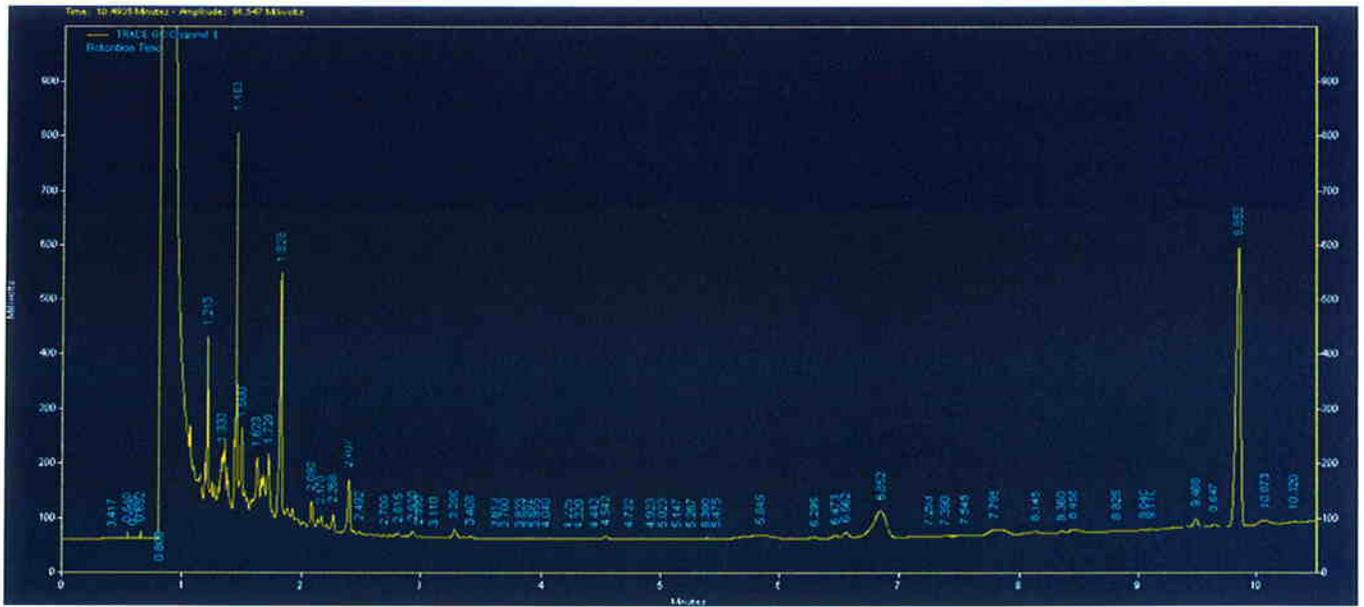


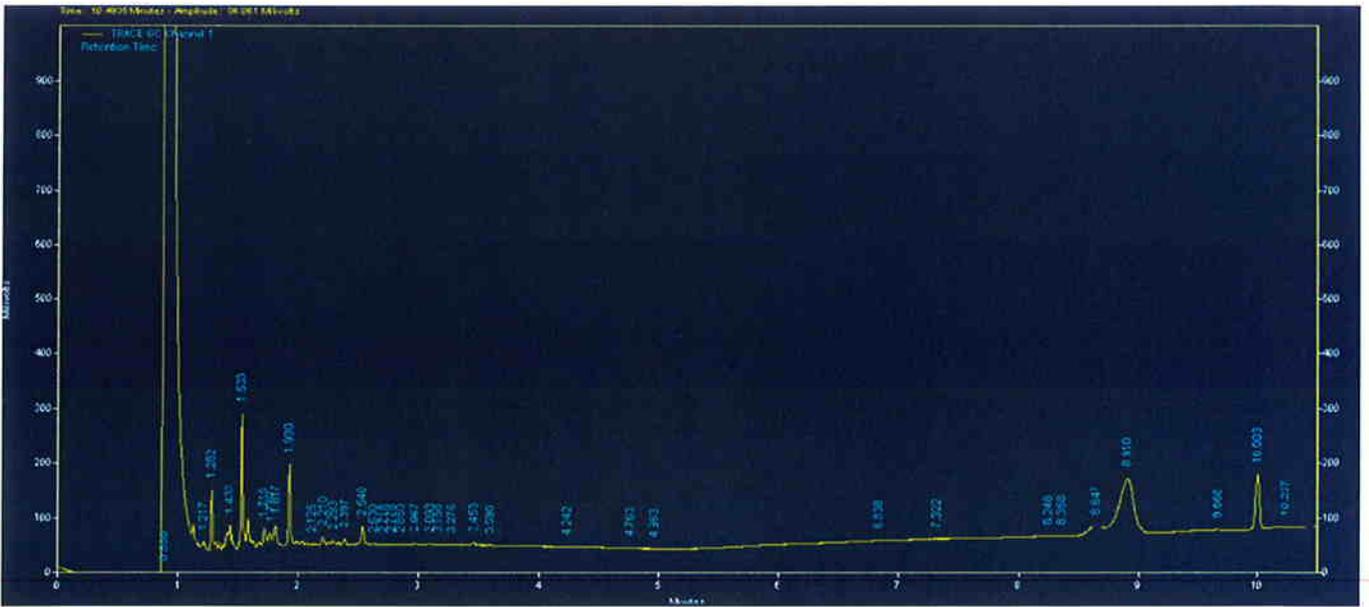
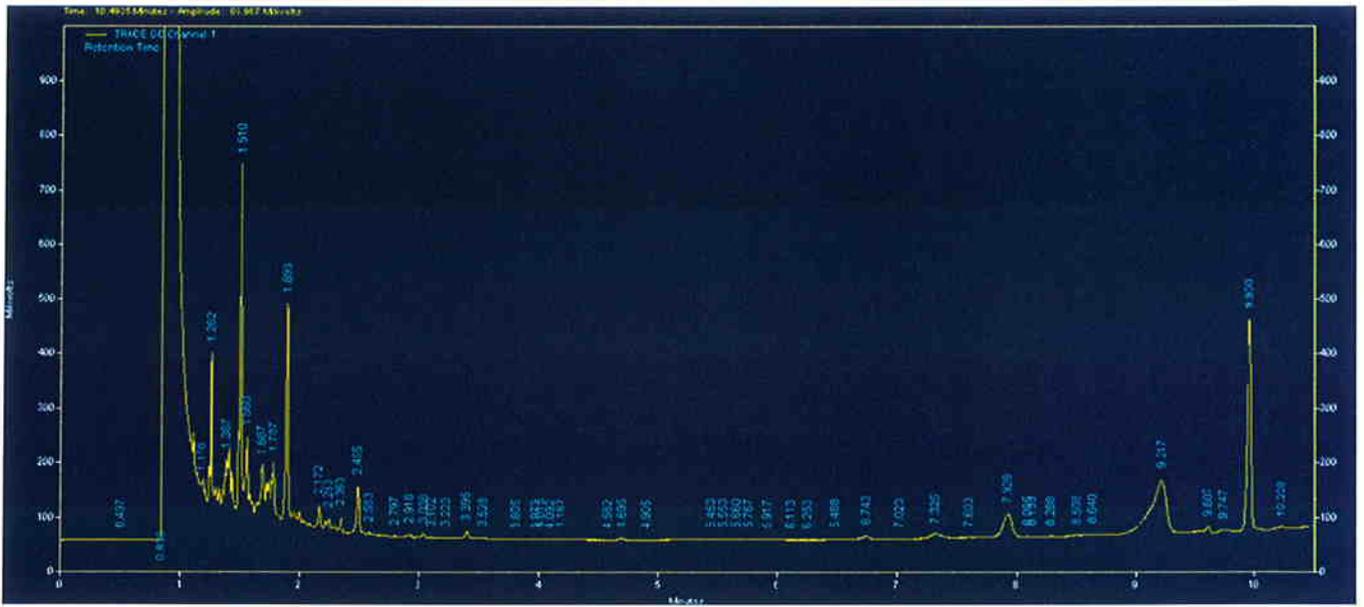


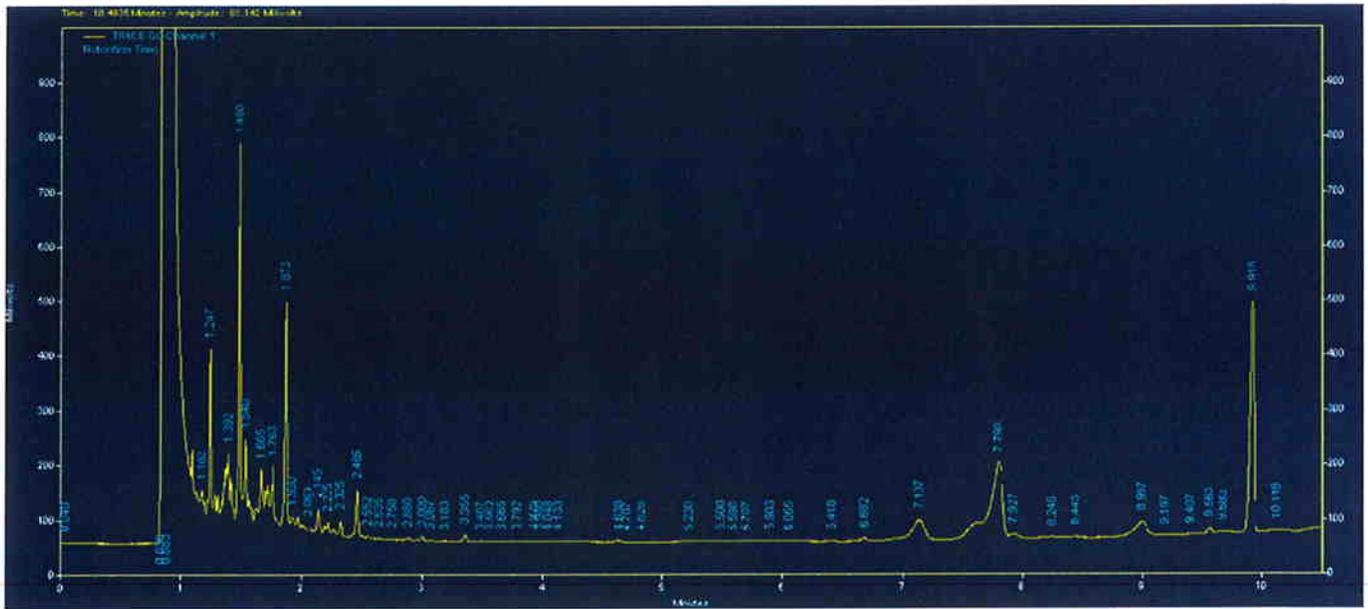
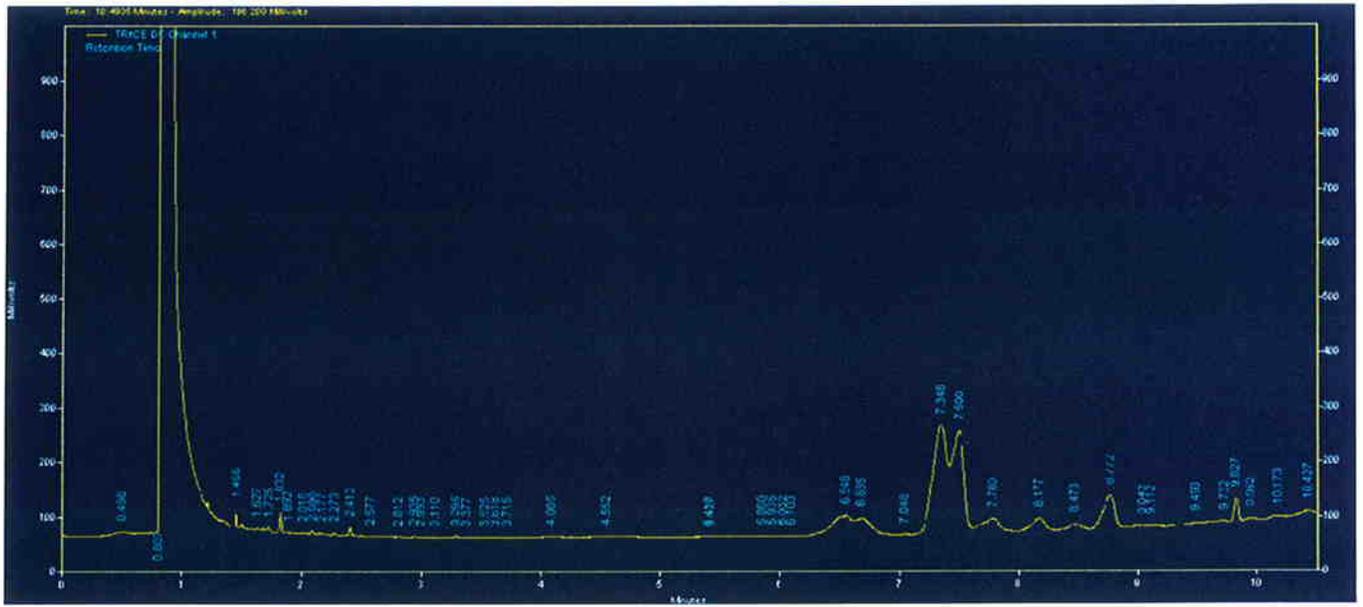
**CROMATOGRAMAS OBTENIDOS DURANTE
EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO
DE LA CEPA ATCC
*ENTEROCOCCUS FAECALIS***

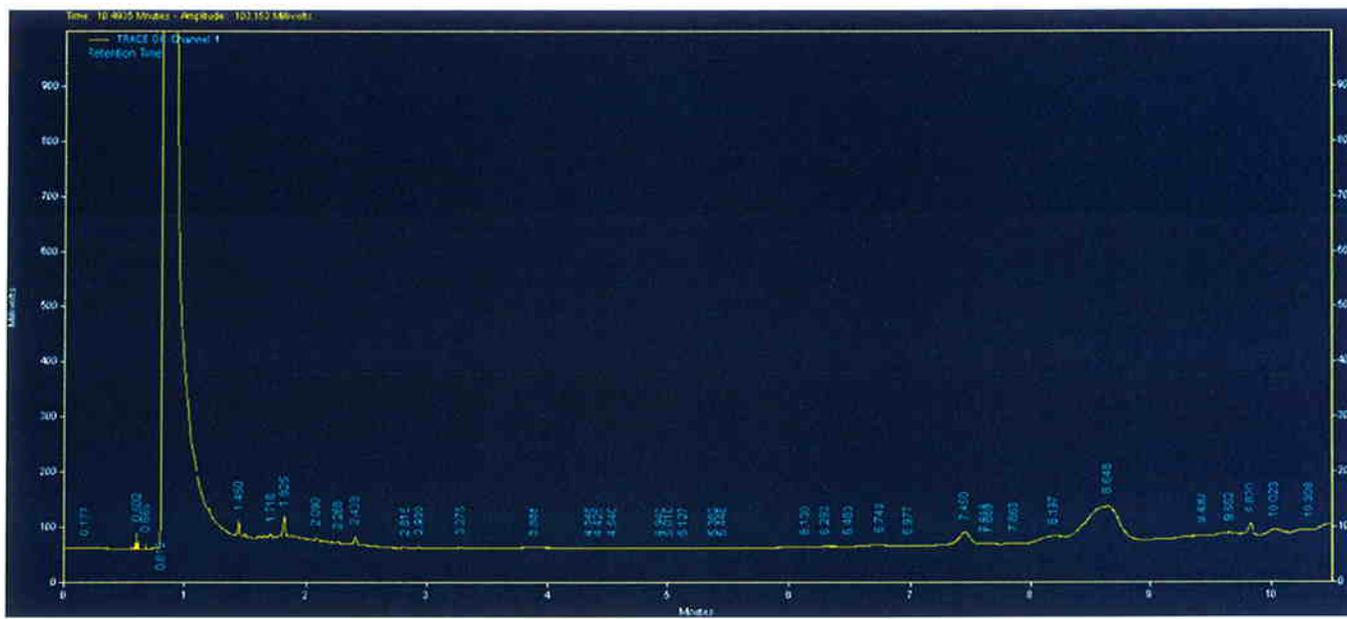




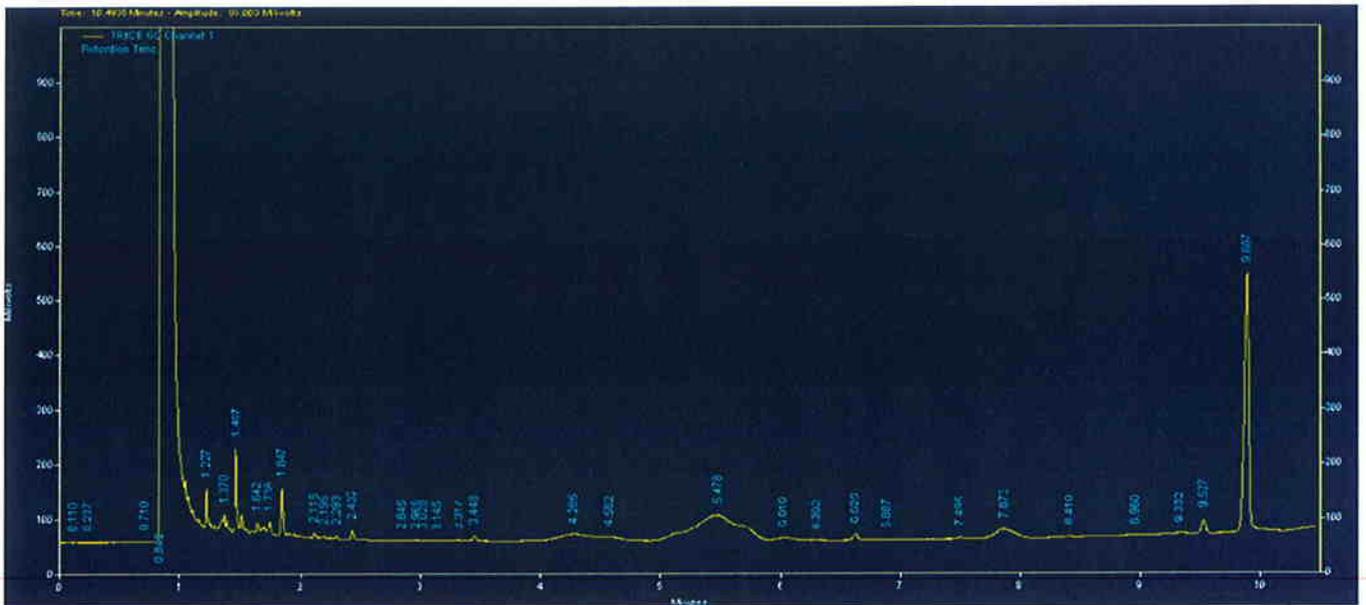
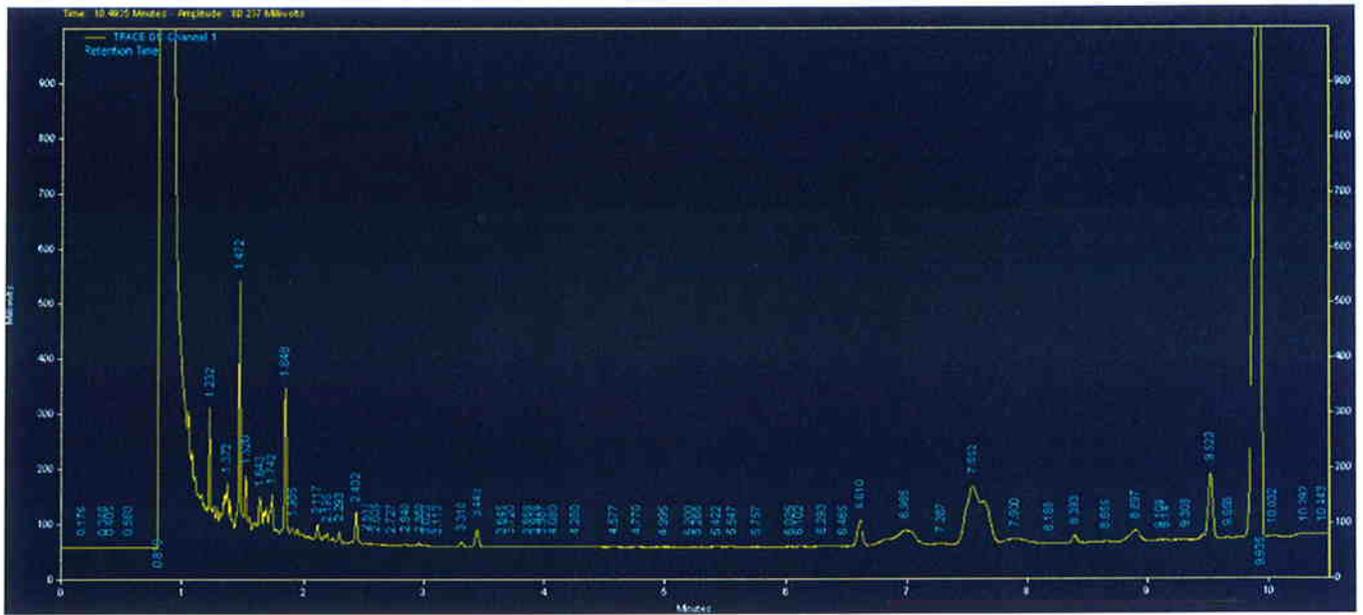


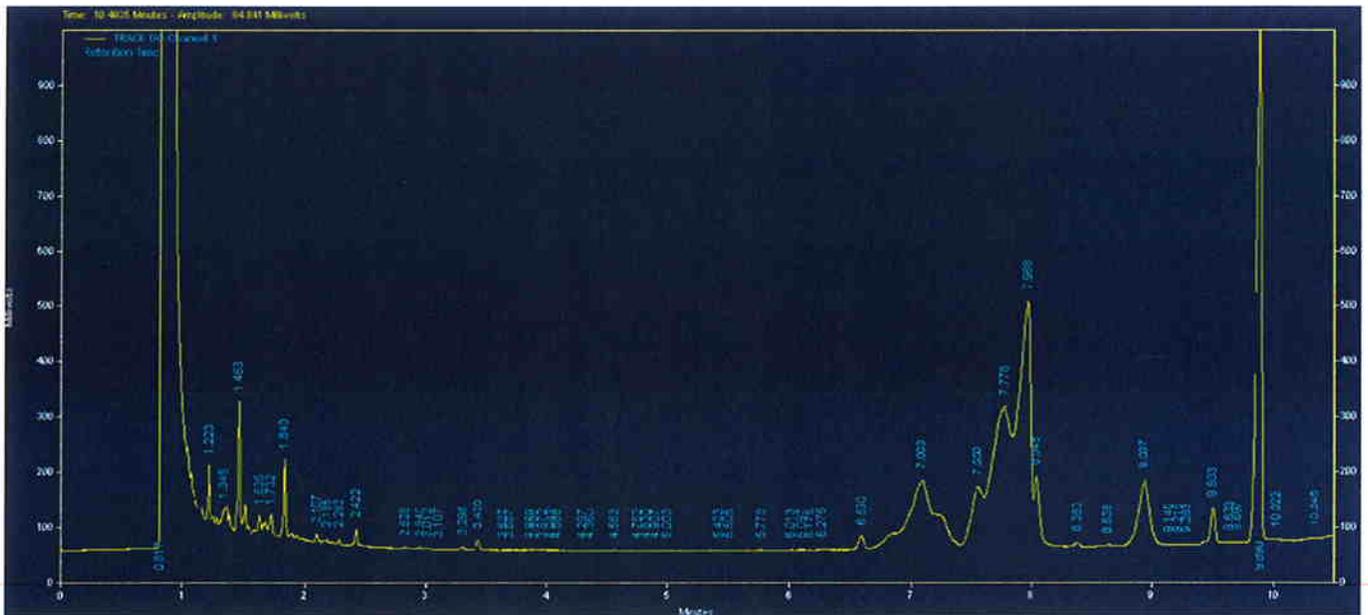
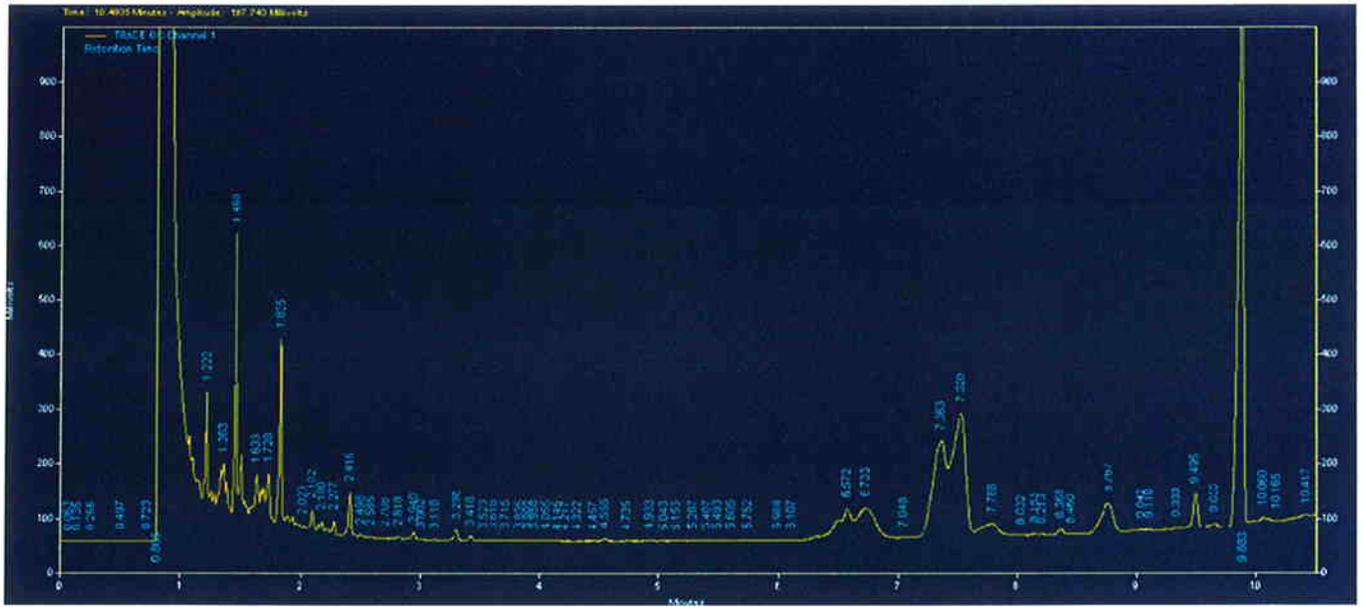


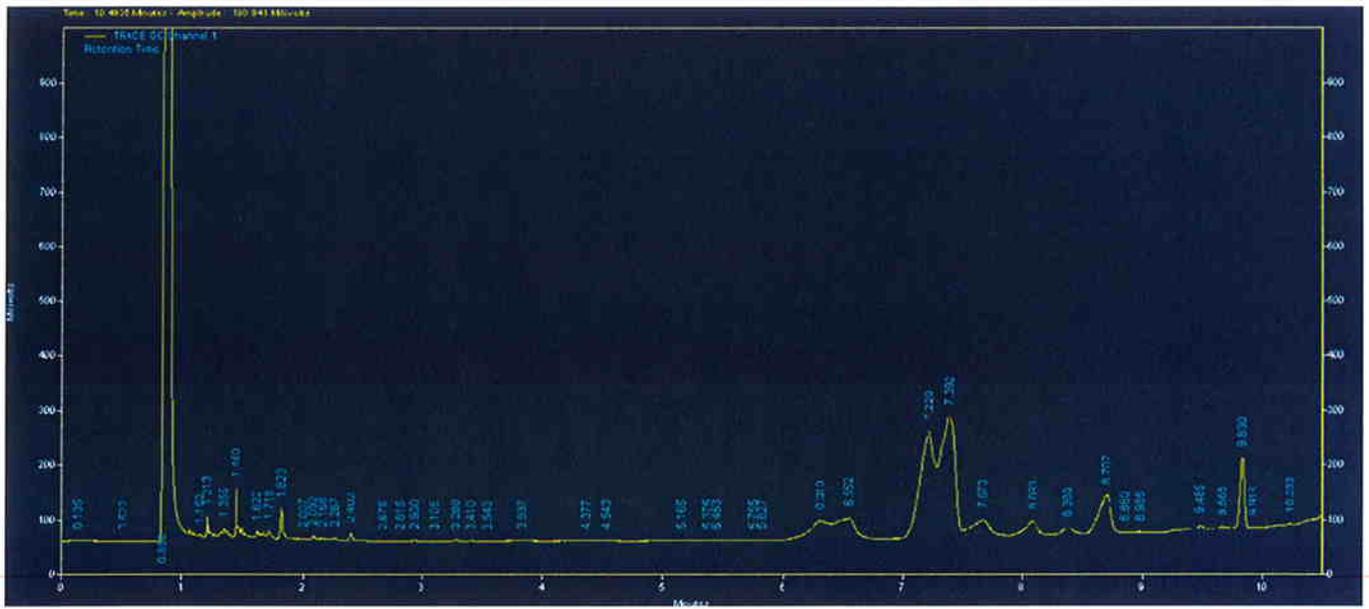
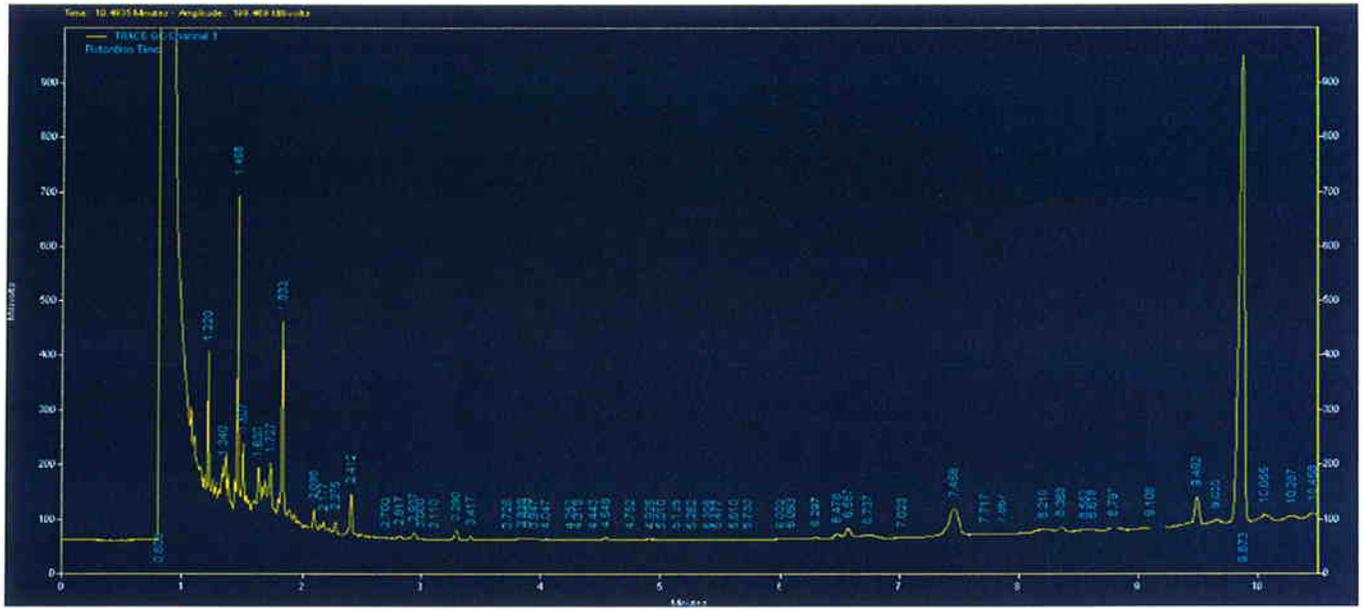




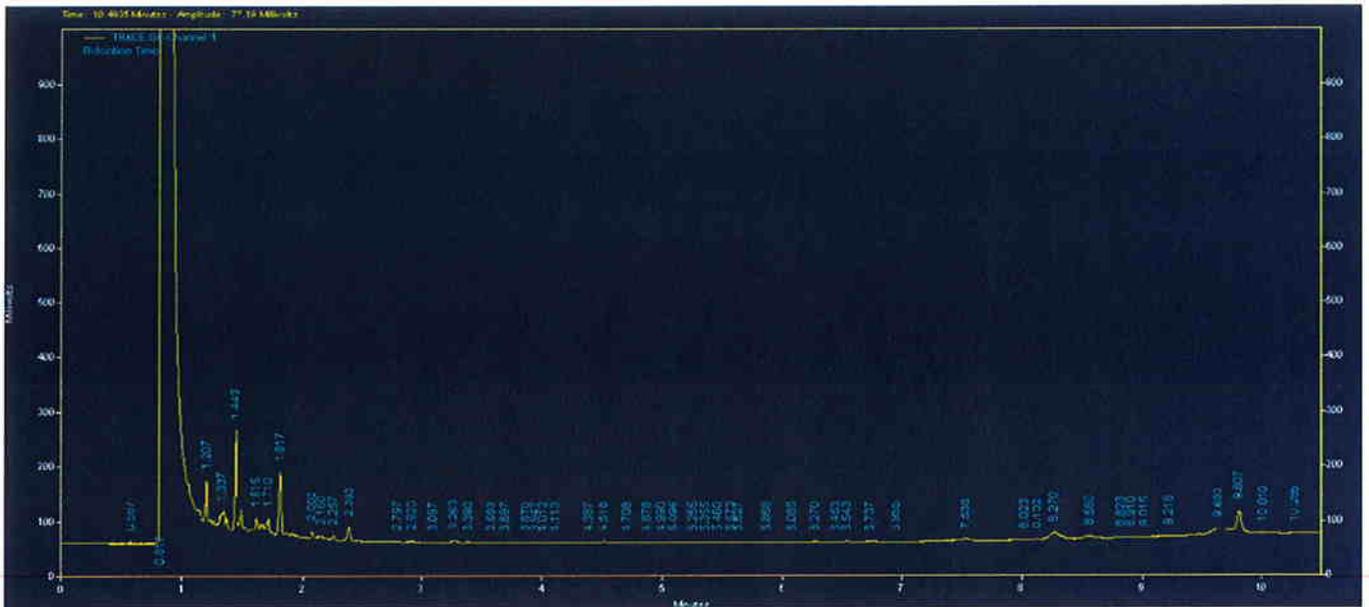
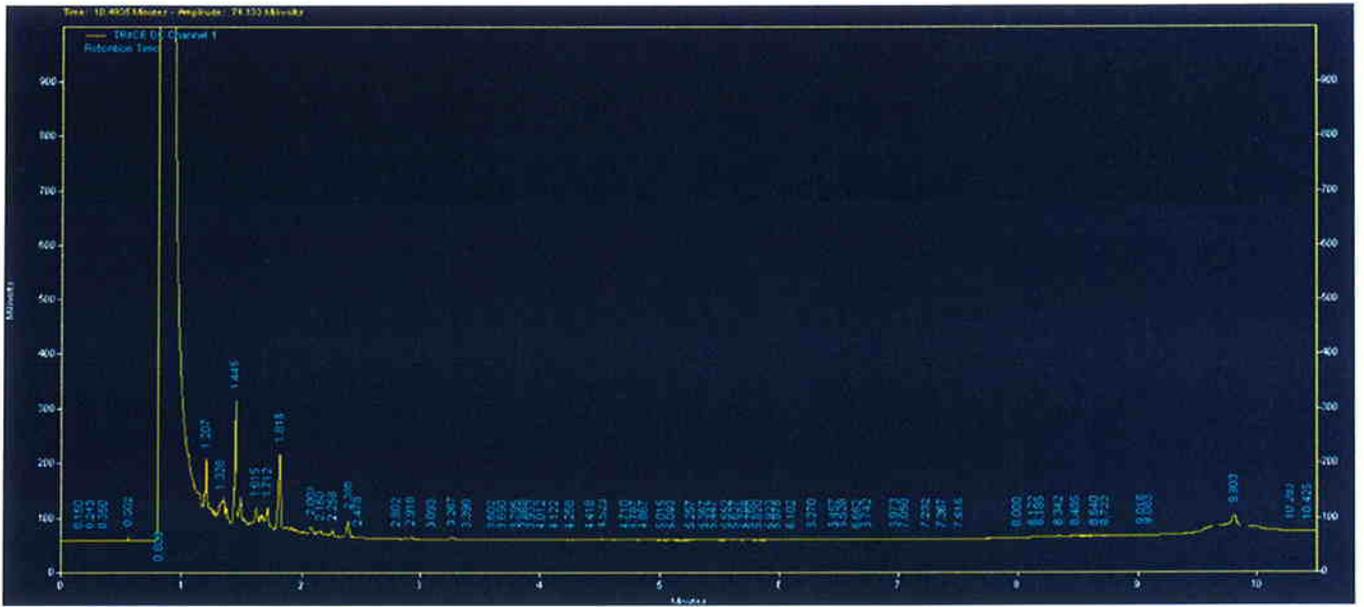
**CROMATOGRAMAS OBTENIDOS DURANTE
EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO
DE LA CEPA ATCC
*SALMONELLA TYPHI***

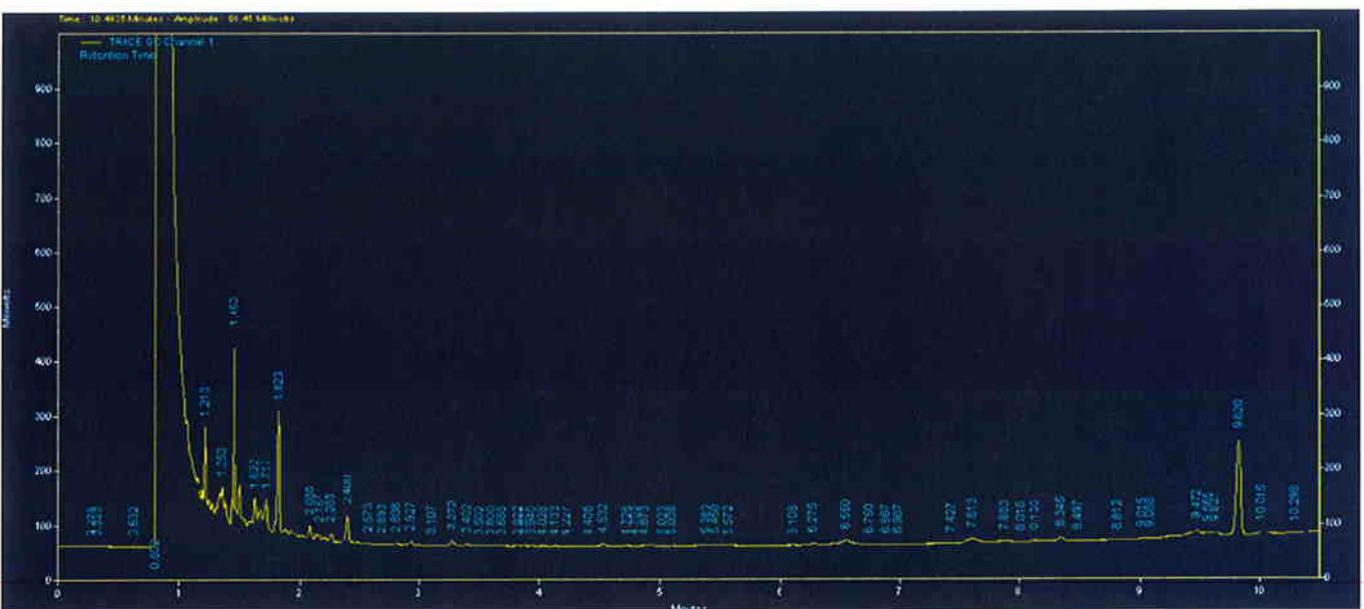
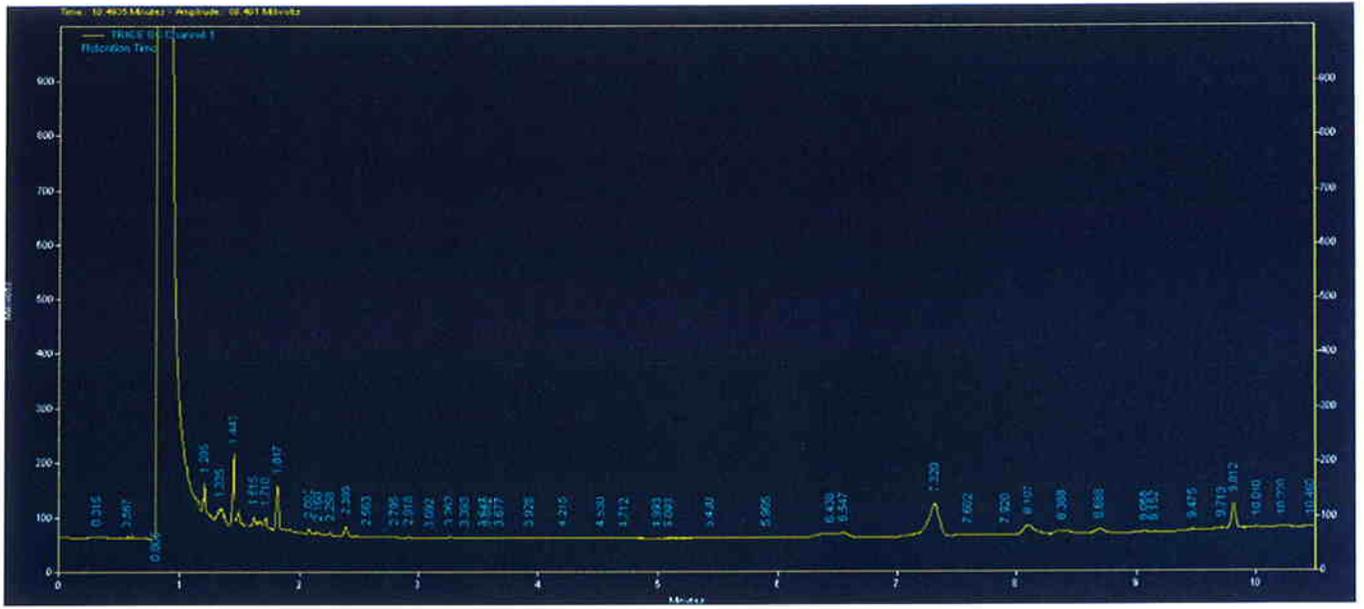


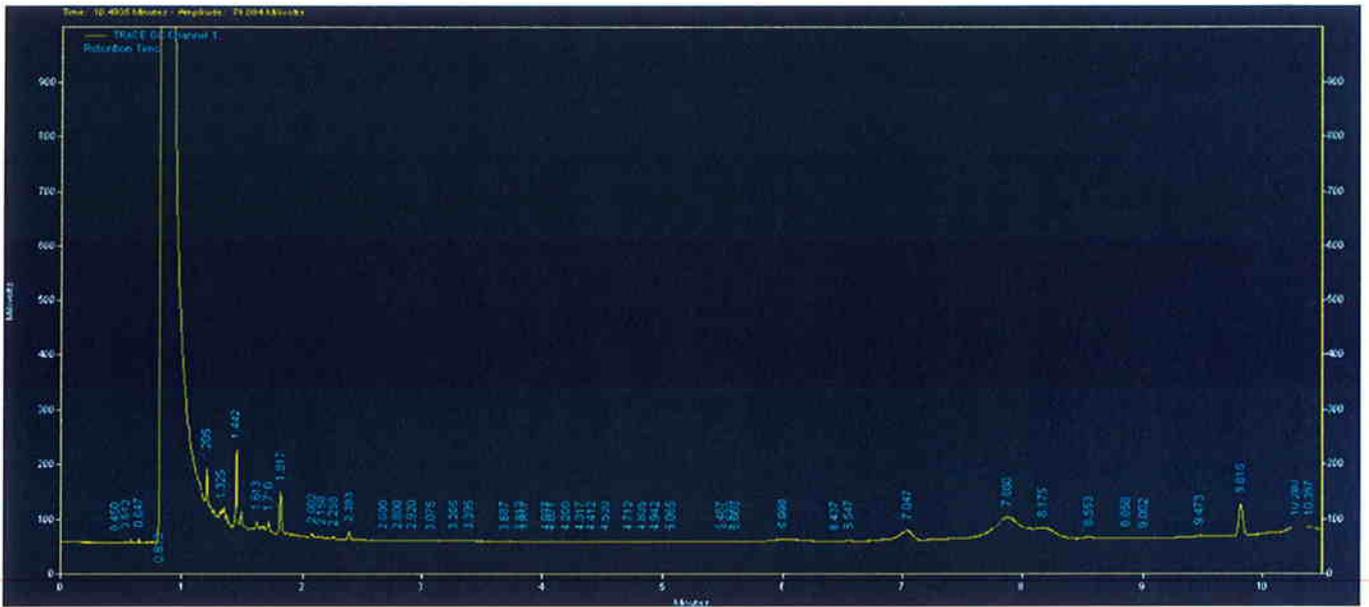
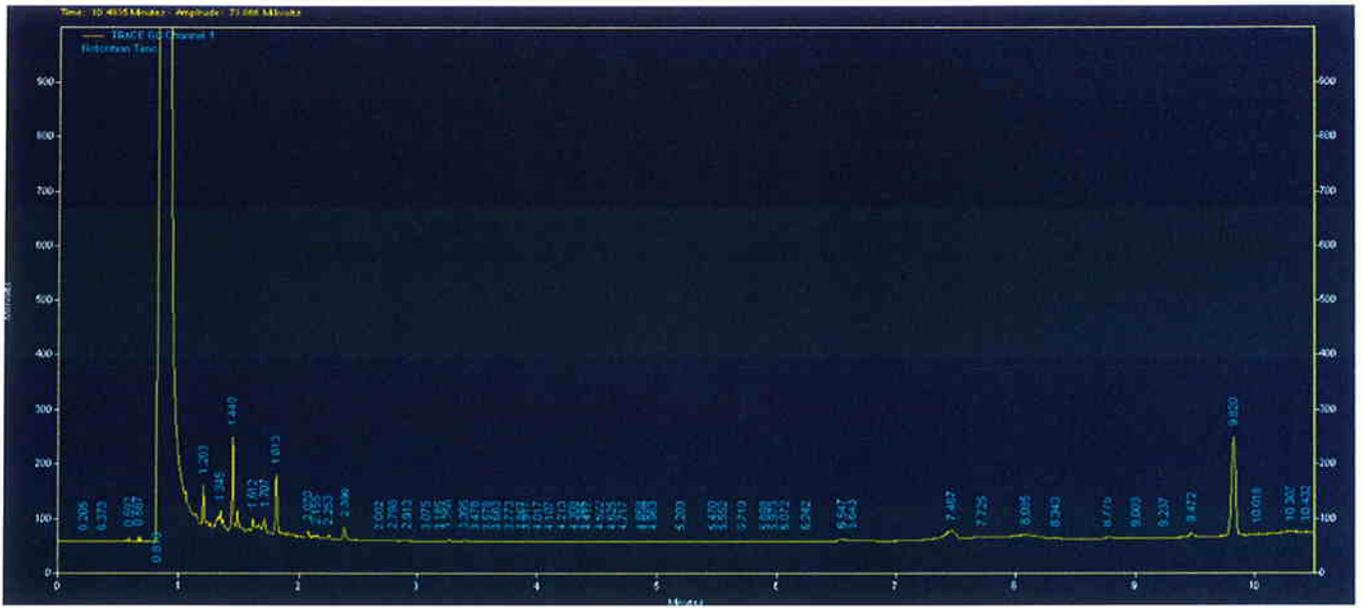


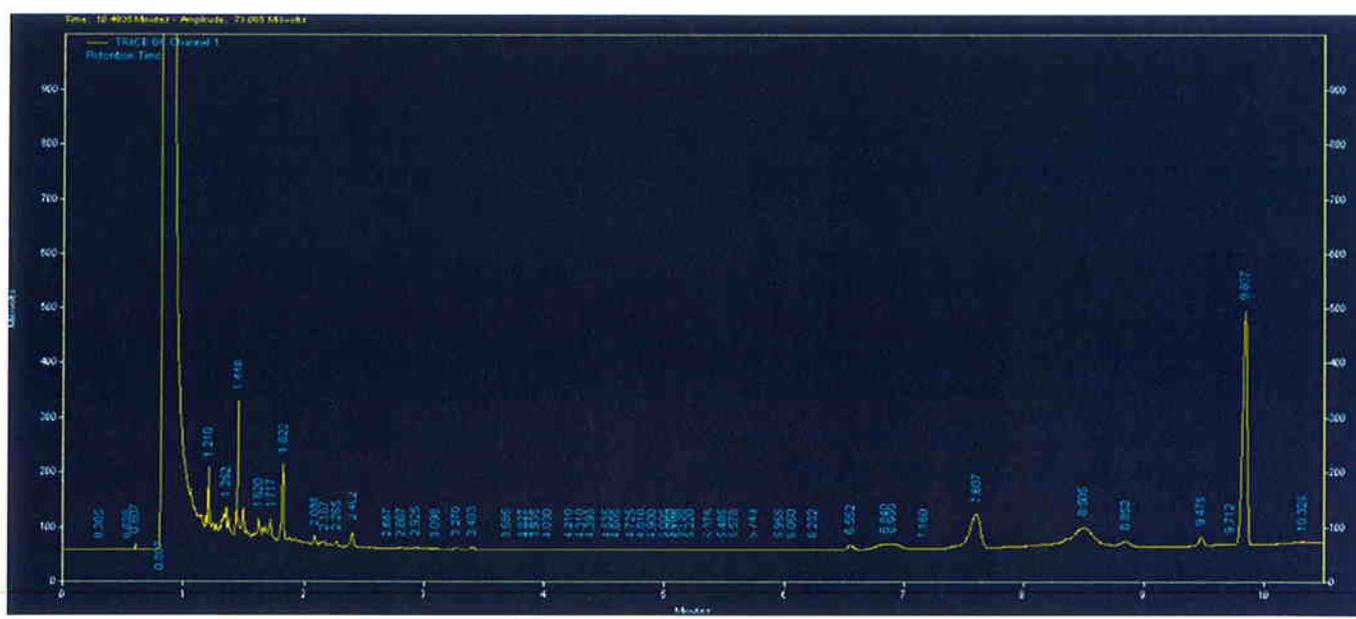
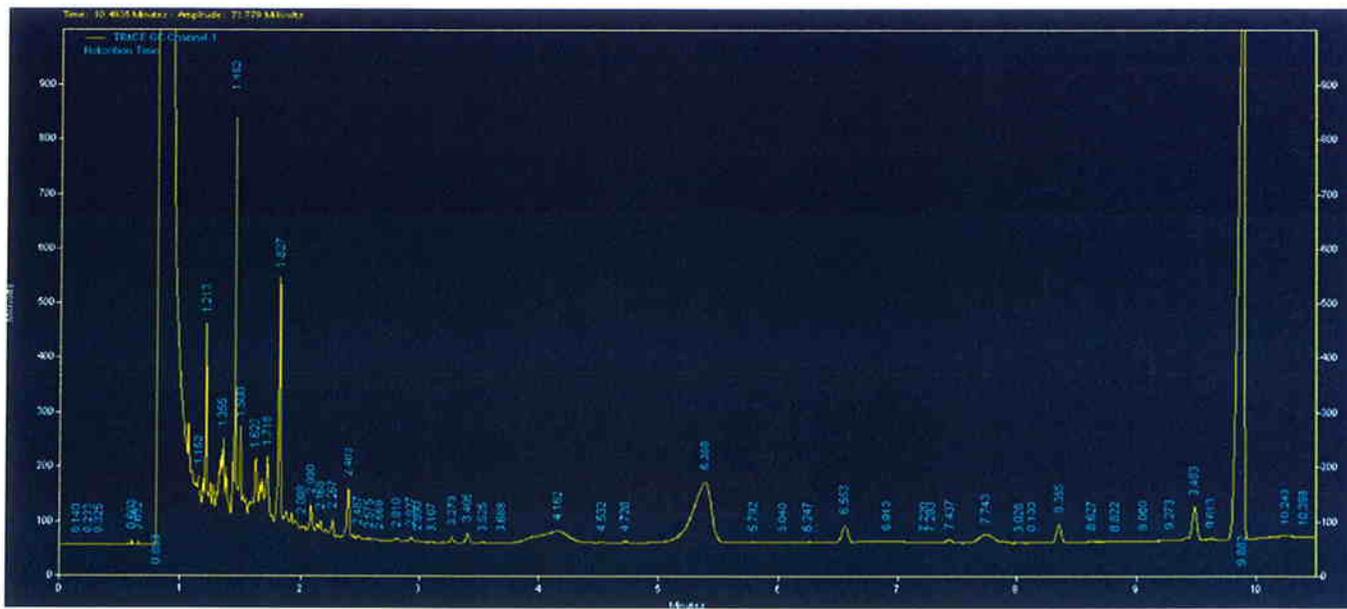


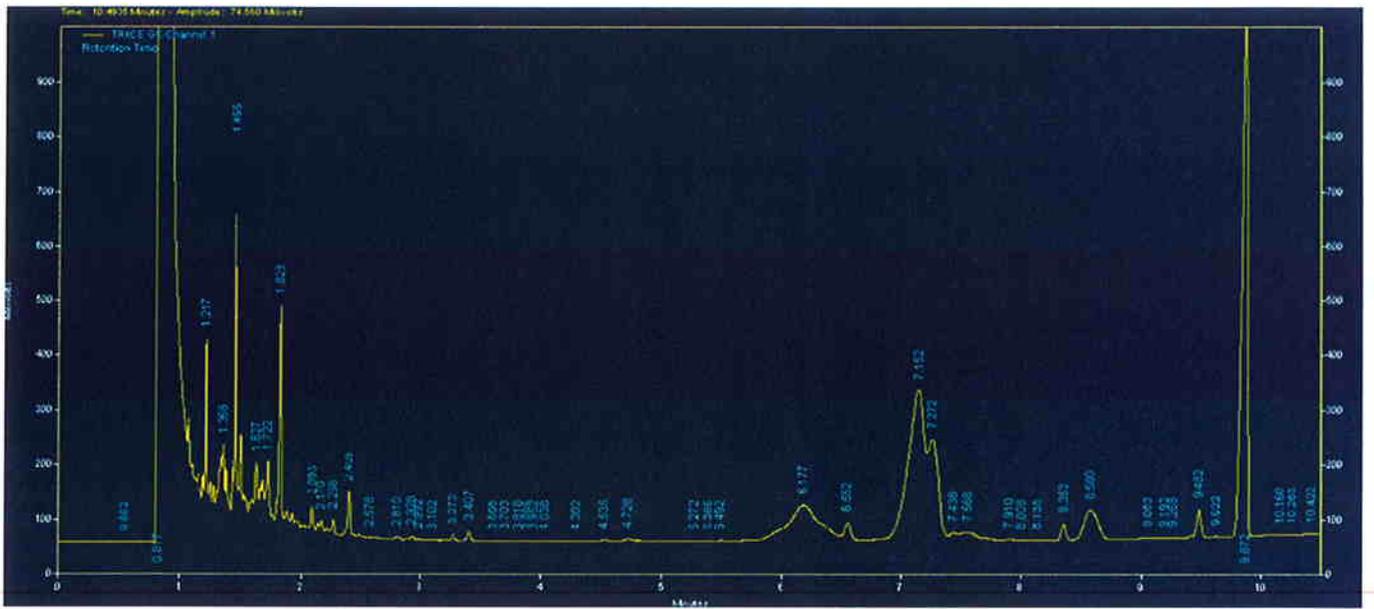
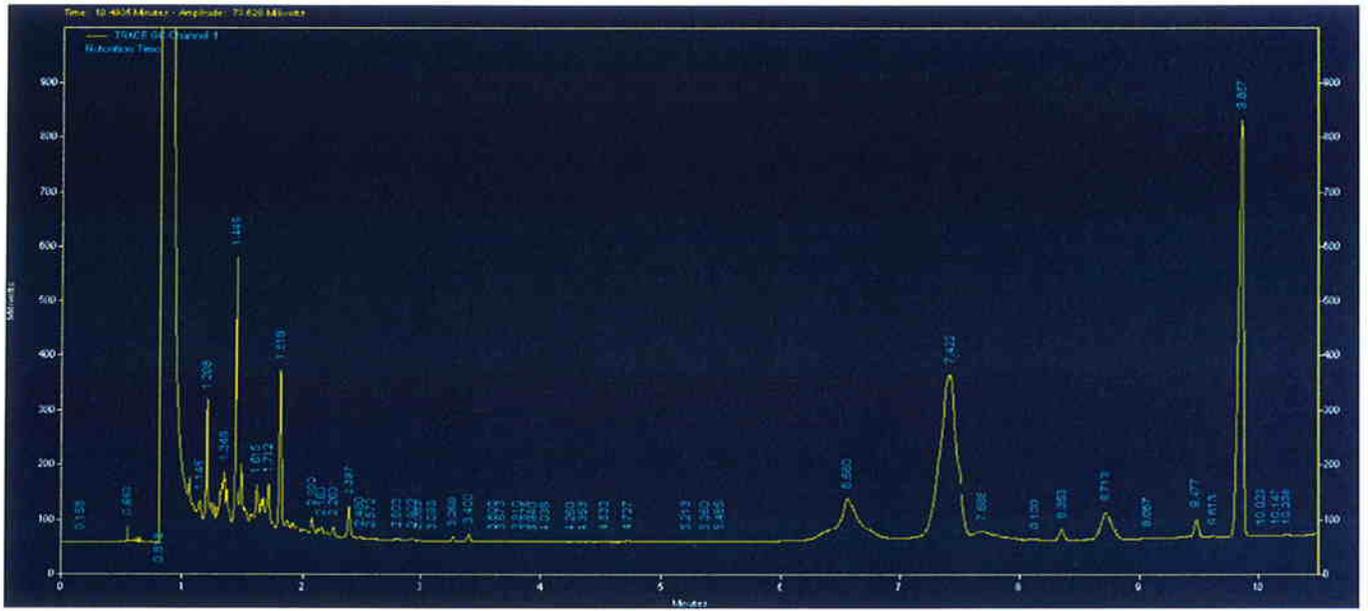
**CROMATOGRAMAS OBTENIDOS DURANTE
EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO
DE LA CEPA ATCC
*SHIGELLA FLEXNERII***





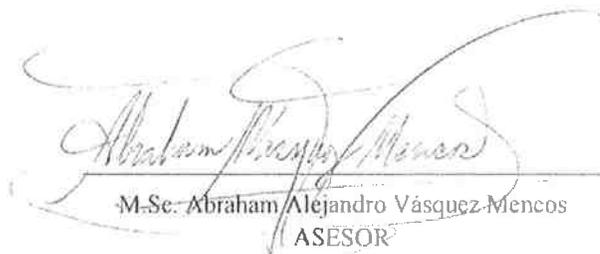








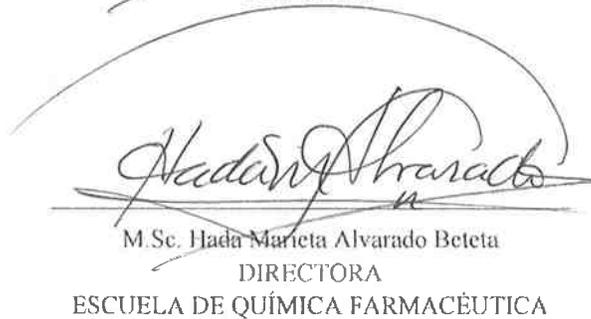
Br. Cynthia Maribel Guerra Glinz
AUTORA



M.Sc. Abraham Alejandro Vásquez Mencos
ASESOR



M.Sc. Hada Marieta Alvarado Beteta
REVISORA



M.Sc. Hada Marieta Alvarado Beteta
DIRECTORA
ESCUELA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA



Dr. Rubén Daniel Velásquez Miranda
DECANO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA