



L. Microbiología básica

L1 Recuento de *S. mutans* y *Lactobacillus spp* en niños con caries dental: especificidad del sistema CRT-Bacteria.

Gamboa, F, Departamento de Microbiología (Facultad de Ciencias) y Centro de Investigaciones Odontológicas (Facultad de Odontología). Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia, Carrere, LV, Bacterióloga-Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia, Chavés, M, Centro de Investigaciones Odontológicas (Facultad de Odontología). Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia Hoyos, JJ, Facultad de Odontología. Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia

Objetivo: en la actualidad se disponen de sistemas de cultivo comerciales que establecen los niveles de microorganismos cariogénicos en saliva. **Objetivos:** determinar los niveles de *S. mutans* y *Lactobacillus spp* en niños con caries de infancia temprana con el sistema Caries Risk Test-Bacteria; y evaluar la especificidad de este sistema en la detección de estos microorganismos. **Materiales y métodos:** se tomaron muestras de saliva en 10 niños afectados por caries de infancia temprana, antes y después del tratamiento restaurador. Las muestras de saliva fueron procesadas y sembradas en el sistema CRT-Bacteria. El sistema CRT-Bacteria se incubó a 37 °C durante 48 horas, para luego hacer el recuento de colonias. Para la evaluación de la especificidad del sistema se tomaron máximo 10 colonias, de cada muestra procesada, de las crecidas en los agares del sistema CRT-Bacteria. Las colonias seleccionadas se resembraron en agares selectivos, se incubaron y se les hizo pruebas bioquímicas para la identificación de género y especie. **Resultados y discusión:** los recuentos de *S. mutans* y *Lactobacillus spp* se correlacionaron con una escala de riesgo para caries dental: riesgo bajo, moderado y alto. Antes del tratamiento restaurador se encontraron las siguientes escalas de riesgo para *S. mutans*: cuatro niños con riesgo alto, tres con riesgo moderado y tres con riesgo bajo; y para *Lactobacillus spp*: tres niños con riesgo alto, tres con riesgo moderado y cuatro con riesgo bajo. Después del tratamiento restaurador los recuentos de *S. mutans* se redujeron en todos los niños a un nivel bajo, y para *Lactobacillus spp* los recuentos también se redujeron. La especificidad del sistema CRT-Bacteria para *S. mutans* y *Lactobacillus spp* fue, respectivamente, 91 y 98.7%. **Conclusiones:** la alta especificidad del sistema CRT-Bacteria en la detección de *S. mutans* y especies de *Lactobacillus* en saliva, lo hace confiable en la determinación de los niveles de estos microorganismos en cavidad oral.

L2 Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales específicos de lipopolisacárido (LPS) de *Porphyromonas gingivalis*.

Rodríguez, AL, Instituto de Investigación Básica Oral, Universidad El Bosque, Castellanos, JE, Instituto de Virología, Universidad El Bosque, Lafaurie, GI, Instituto de Investigación Básica Oral, Universidad El Bosque.

Objetivo: purificar el LPS de *P. gingivalis* (P.g.), inmunizar ratones y obtener anticuerpos monoclonales con reactividad específica por el antígeno. **Materiales y métodos:** el LPS de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 fue purificado por extracción en fenol-cloroformo y posterior cromatografía de exclusión. Se inmunizaron ratones BALB/c con el LPS purificado y los esplenocitos activados se usaron para obtener hibridomas, que fueron seleccionados para posteriormente producir ascites. Se determinó reactividad

específica y cruzada de los monoclonales purificados mediante ELISA utilizando otras bacterias periodontopáticas y LPS purificado de *E. coli*. Los anticuerpos fueron caracterizados mediante inmunoblot e inmunofluorescencia indirecta. **Resultados y discusión:** de 45 hibridomas encontrados, 10 presentaron reactividad por ELISA con el homogenizado de la P.g. y el LPS purificado. Cinco de ellos fueron clonados por dilución límite dos veces produciendo ocho clones secretantes de IgG y dos de ellos anticuerpos demostraron reactividad específica frente a la bacteria y el LPS purificado. Mediante inmunoblot los anticuerpos específicos reconocieron un perfil de bandas entre 63-74 kDa en el homogenizado de la bacteria en estudio. En la prueba de IFI los anticuerpos presentaron una fuerte reactividad frente a *Porphyromonas gingivalis* (bacteria completa). **Conclusiones:** se generaron dos anticuerpos específicos para LPS de *P. gingivalis* que reconocen LPS con un peso molecular de 63-74 kDa. Estos anticuerpos podrán ser usados como herramienta en investigación y/o diagnóstico.

L3 Adaptación de un modelo animal de fisiopatología de Meningoencefalitis Piógena para estudiar farmacología de antimicrobianos en el Sistema Nervioso Central (SNC) de Murinos inmunocompetentes e inmunosuprimidos.

Zuluaga AF, Salazar B, Agudelo B, Galvis W, Vesga O. GRIPE: Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Introducción: el modelo animal clásico de meningitis emplea conejos New Zeland. Gerber et al desarrollaron un modelo de neuropatología infecciosa mediante la inducción de meningitis por *S. pneumoniae* en ratones C57BL/6 (deficiente en células T). Nosotros modificamos dicho modelo en una cepa exocriada e inmunocompetente, para utilizarlo en estudios farmacológicos de antimicrobianos. **Materiales y métodos:** ratones albinos suizos, cepa Udea:ICR(CD-1), se inocularon en el lóbulo frontal derecho con *S. pneumoniae* GRP-0056 (penicilino-susceptible), 5-6 log₁₀ CFU/ml en fase logarítmica. Se determinó el éxito de la infección en animales de ambos sexos, inmunocompetentes y neutropénicos. Se sacrificaron grupos de cuatro animales a las 0, 6, 12, 18, 24, 30, y 36 horas postinoculación. Cerebro, cerebelo y LCR fueron extraídos por separado, macerados, diluidos y sembrados en medio sólido apropiado para recuento de CFU/g de tejido. El estudio de antimicrobianos en modelos de infección exige que el inóculo bacteriano crezca más de 2 log₁₀ CFU/g. **Resultados:** se indujo infección progresiva, reproducible y uniformemente fatal en 36 horas. En el grupo de hembras inmunosuprimidas, el crecimiento bacteriano promedio (CFU/g adicional al recuento de la hora 0) fue 4.5, 3.7 y 2.9 log₁₀ CFU/g de cerebro, cerebelo y LCR, respectivamente (desviación estándar máxima: 0.73 CFU/g). Resultados similares se obtuvieron con hembras inmunocompetentes. En los machos el crecimiento bacteriano fue 0.5 log₁₀ CFU/g menor que el obtenido en las hembras. Más del 80% de los animales, independiente de género o estado inmune, presentó signos de infección sistémica como erizamiento y pérdida de respuesta a estímulos externos a las 24 horas post-inoculación. **Conclusión:** el crecimiento progresivo, uniforme y reproducible del inóculo bacteriano en el SNC permite el empleo de este modelo para el estudio de la farmacodinámica y farmacodinámica de los antibióticos en el SNC. Comparado con el de conejo, este modelo es más barato, técnicamente más práctico, e igual de homogéneo en resultados. Es probable su aplicación con otras cepas bacterianas.

L4 Optimización del crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* resistente a Penicilina (PRSP) para desarrollar un modelo murino de neumonía.

Salazar B, Agudelo M, Rodríguez CA, Zuluaga AF, Restrepo A, Vesga O. *GRiPE: Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.*

Introducción: PRSP es un patógeno humano importante pero de difícil crecimiento, hecho que ha obstaculizado la creación de un buen modelo animal. Para desarrollar un modelo reproducible de neumonía aguda en ratón neutropénico que imite la fisiopatología de la enfermedad humana es necesario obtener in vitro concentraciones bacterianas en fase logarítmica superiores a $9 \log_{10}$ CFU/ml. **Materiales y métodos:** tras estandarizar crecimiento a 35°C y 18% O₂ de 9 cepas de PRSP en Trypticase Soy Agar / Broth (TSA / TSB), Brain Heart infusion (BHI) y Todd Hewitt Broth (THB), se probaron las siguientes variaciones al método de cultivo: número de pases en medio sólido (TSA + 5% sangre carnero) tras retirar la cepa del ultracongelador, nivel de anaerobiosis y tiempo de incubación en medio sólido (Fase 0), número de colonias para inocular el medio líquido (Fase I), pH y tiempo de incubación de la Fase I, adición de extracto de levadura (EL) y sangre de caballo (SC) en Fases I y II, tamaño del inóculo de Fase I a II, frecuencia del ajuste de pH y tiempo de incubación de la Fase II. **Resultados:** las siguientes variables de cultivo de PRSP produjeron $10 \log_{10}$ CFU/ml en fase logarítmica y en forma reproducible, sin necesidad de recurrir al Chemostat: THB (superior a otros medios líquidos), recuperación de ultracongelación con 2 pases en TSA suplementado con 5% sangre de carnero y 0.5% EL, 15 horas de incubación con 5% CO₂ en Fase 0, inóculo de 10 colonias para Fase I con ajuste inicial de pH a 7.8, suplemento nutricional de THB con 2% EL y 5% SC en Fases I y II, 5 diluciones seriadas 1:10 del cultivo de Fase I para inocular Fase II con ajuste de pH a 7.8 cada hora. **Conclusión:** la autólisis precoz de la fase logarítmica del cultivo en medio líquido de PRSP puede evitarse mediante manipulación de las diferentes fases, condiciones ambientales y nutricionales de la bacteria, posibilitando la obtención reproducible de $10 \log_{10}$ CFU/ml. Este método puede contribuir al desarrollo de un modelo animal de neumonía por PRSP útil para estudios terapéuticos.

L5 Efecto de la Vancomicina en la invasión de aislamientos clínicos nosocomiales de *Enterococcus faecalis* en cultivos primarios de células endoteliales.

Cháves, SM, Instituto de Biología Molecular - Universidad El Bosque/ Postgrado interfacultades Universidad Nacional. Chiriboga, CA, Instituto de Biología Molecular - Universidad El Bosque/ Postgrado interfacultades Universidad Nacional. Berrio, OM, Instituto de Biología Molecular - Universidad El Bosque. Contreras, OI, Instituto de Biología Molecular - Universidad El Bosque/ Postgrado interfacultades Universidad Nacional. Fontanilla, MR, Instituto de Biología Molecular Universidad El Bosque/ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias - Universidad Nacional.

Objetivo: determinar el efecto de la Vancomicina sobre la invasión de cepas de *E. faecalis*, sensibles y resistentes al antibiótico, a células endoteliales aisladas de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) en cultivo. **Materiales y métodos.** Materiales: cultivos HUVEC, aislamientos nosocomiales de *E. faecalis* 2890 y 1441 susceptible y resistente a Vancomicina respectivamente. Métodos: cultivos HUVEC (5 X C, se^o 104 cel/mL) infectados con las cepas 2890 y 1441 (108 UFC/mL), por 2h a 37 expusieron a las MICs de Vancomicina establecidas y se trataron con Gentamicina/Penicilina

por 2h a 37°C para eliminar bacterias extracelulares. Las HUVEC fueron lisadas con Tritón al 1% y las UFC internalizadas cuantificadas sobre agar BHI. Los pozos control no se trataron con vancomicina. **Resultados y discusión:** los cultivos HUVEC con Vancomicina no mostraron diferencias significativas en el número de UFC en relación al control, lo cual indica que este antibiótico no tiene efecto en la internalización bacteriana ($p>0.05$). La cepa 1441(resistente) mostró incremento en el número de UFC ($p<0.05$) respecto a 2890 (sensible) indicando su mayor capacidad de invadir la célula endotelial. Microscopía electrónica de los cultivos infectados muestra enterococos en contacto íntimo con la superficie de la célula endotelial y en vacuolas citoplasmáticas. **Conclusiones:** la presencia de Vancomicina no incrementa el porcentaje de invasión (PI) de *E. faecalis* sensible (2890) y resistente (1441), con respecto al tratamiento control. La cepa resistente es más exitosa que la sensible en invadir HUVEC.

L6 Detección de bacteriocinas en cepas de *Streptococcus mutans* aisladas de niños con y sin caries pertenecientes a un preescolar en Turmequé-Boyacá.

Gamboia, F, Departamento de Microbiología (Facultad de Ciencias) y Centro de Investigaciones Odontológicas (Facultad de Odontología). Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia. Cháves, M, Centro de Investigaciones Odontológicas (Facultad de Odontología). Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia.

Objetivo: *Streptococcus mutans* es el principal microorganismo implicado en caries dental. Diferentes investigaciones sugieren que las bacteriocinas producidas por esta bacteria, pueden ser muy importantes en su habilidad para desplazar cepas nativas de esta misma especie en cavidad oral. El objetivo de este trabajo fue identificar cepas de *S. mutans* productoras de bacteriocinas. **Materiales y métodos:** se tomaron 33 cepas de *S. mutans* previamente aisladas en pacientes con y sin caries. Las 33 cepas se biotipificaron con el sistema enzimático Api-ZYM (bioMérieux; Marcy-l'Étoile, France). Para detectar la producción de bacteriocinas se tomaron colonias de las cepas de *S. mutans* por evaluar (cepa productora), se sembraron en agar BHI y se incubaron durante 24 horas en dióxido de carbono a 37 °C. Al cabo de las 24 horas de incubación se adicionaron encima del agar BHI, 3 ml de agar BHI con 1.000.000 de unidades formadoras de colonia por mililitro de la cepa de *S. mutans* que va a actuar como indicadora. **Resultados y discusión:** en las 33 cepas de *S. mutans* se encontraron 10 biotipos. Los biotipos más frecuentes fueron el 10, el 15 y el 11, respectivamente con 9,8 y 4 cepas. Ocho (24%) de las 33 cepas evaluadas produjeron bacteriocinas, seis de éstas cepas provinieron de pacientes con caries y las otras dos de pacientes sin caries. Las ocho cepas productoras de bacteriocinas presentaron cinco biotipos diferentes: tres cepas con biotipo 10, dos cepas con biotipo 14, y las tres últimas fueron, respectivamente, biotipo 11, 15 y 17. Los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con la información presentada en otros trabajos realizados con *S. mutans*. **Conclusiones:** en las 33 cepas de *S. mutans* evaluadas se identificaron ocho cepas (24%) productoras de bacteriocinas, de cinco biotipos diferentes, que después de cumplir con otros requerimientos tienen gran opción de ser utilizadas en el control de infecciones orales en el que esté implicado *S. mutans*.



L7 Determinar la presencia de virus bacteriófagos (colifagos) e indirectamente de coliformes totales y fecales, como marcadores de la calidad microbiológica del agua del acueducto de Filandia (Quindío).

Aricapa, HJ, Pérez, JE, Rodríguez, A, Vega, JA, Universidad de Caldas.

Objetivo: determinar la presencia de virus bacteriófagos (colifagos) e indirectamente de coliformes totales y fecales, como marcadores de la calidad microbiológica del agua del acueducto de Filandia (Quindío). **Materiales y métodos:** trabajo descriptivo. Se muestrearon 94 viviendas estratificándolas, Muestra: 100ml de agua por vivienda, usando 20 ml, realizandocuatro alicuotas de 5 ml, se agrego cepa *E.coli* ATCC en TSA y se incubó por 24 horas (solución 1) se depositó en medio Soya Trypticase y con agar Soya Trypticase Modificado (con Nitrato de amonio y de estroncio y 2.3.5 difenil tetrazolio) se vertieron en caja de petri con la solución 1, se incubo por seis horas y se leyó la formación de calvas UFP (unidad formadora de placa) en cada cultivo, se multiplicó por las alicuotas (4) para obtener cantidad de colifagos; usando dos ecuaciones se determinaron los coliformes totales y fecales. **Resultados y discusión:** la frecuencia de colifagos en el agua del acueducto de Filandia fue de 29%, haciendo impotable dicha agua pues según Grabow citado por Dutka, 1997 las aguas para consumo humano y animal, no deben tener colifagos. La presencia de colifagos puede deberse a asentamientos humanos y animales en las cabeceras de los acueductos que caen por escorrentía a los ríos. Aplicando las ecuaciones se halló una media de 74.43 coliformes totales/ 100 ml de agua y 11,69 para coliformes fecales/ 100 ml de agua, lo que permite deducir la presencia del DNA de dichos microorganismos, los cuales por técnicas de cultivo directo no son detectables. **Conclusiones:** la frecuencia de colifagos en el acueducto de Filandia es alta y el agua no es apta para consumo El mal estado del acueducto y de sus líneas de distribución así como de sus cabeceras puede ocasionar la presencia de estos microorganismos.

L8 Presencia de *Salmonella Spp* en alimentos en el Caribe colombiano.

Torres Ávila, J, Mattar Velilla, S, Arrieta Bernate, G, Durango, J, Universidad de Córdoba.

Objetivo: determinar la presencia de *Salmonella* en alimentos de ventas callejeras de la Costa Atlántica. **Materiales y métodos:** durante los años 2002 - 2004, se analizaron 1475 muestras de alimentos provenientes de ventas de comidas rápidas tipo frituras, ventas callejeras y plazas de mercado. Las muestras fueron obtenidas de 636 sitios, de ciudades diferentes del Caribe colombiano, distribuidos así: Barranquilla (n = 355), Montería (n = 440). Sincelejo (n = 358), Cartagena (n = 322) muestras. El aislamiento de *Salmonella sp* hizo de acuerdo con el método convencional de la Food and Drug Administration. **Resultados y discusión:** se analizaron 1475 muestras de alimentos de los cuales se obtuvieron 96 aislamientos de *Salmonella spp*, que equivalen al 6.5 % de la muestras analizadas; los alimentos contaminados con el microorganismo fueron: carne de res (35%), chorizo (18%), pollo (18%), cerdo (14.5%), queso (11.5%) y arepa de huevo (3%), de los cuales el 39.58% correspondieron a alimentos crudos y el 60.42% a alimentos cocidos. La clasificación serologica mostró la presencia de varios serotipos con una distribución porcentual variada. *S. anatum* (16%), *S. uganda* (15%). *S. newport* (6%), *S. tiphymurium* (6%) y *S. gaminara* (4%), sobresaliendo el serotipo *S. anatum*. **Conclusiones:** en este estudio se demostró que en el Caribe colombiano gran cantidad de los alimentos se encontraban contaminados con *Salmonella*

(6.5%), presentando gran variedad de serotipos, entre los cuales algunos que no se habían encontrado en Colombia y a los cuales esta expuesta la población.

L9 Educación vivencial en parasitología y microbiología para ciencias de la salud en la Universidad del Cauca 2001 - 2003.

Díaz ML, Díaz, ML, Cortés, JM, Klingler, JC, Grupo de Investigación en Inmunología y Enfermedades Infecciosas Universidad del Cauca.

Objetivo: los contenidos de Parasitología y Microbiología se han abordado en asignaturas fundamentalmente teóricas para el IV semestre de Medicina y Enfermería. A partir del año 2001 se decidió transformar la metodología de la enseñanza y evaluar los resultados. **Materiales y métodos:** los contenidos de Parasitología y Microbiología se han abordado en asignaturas fundamentalmente teóricas para el IV semestre de Medicina y Enfermería. A partir del año 2001 se decidió transformar la metodología de la enseñanza y evaluar los resultados. **Resultados y discusión:** realizadas 1.390 encuestas a estudiantes durante cinco periodos se encontró cumplimiento de objetivos 93.9%, buena metodología 94.2%, tiempo suficiente 76.7%, evaluación adecuada 89.3% y buena relación profesor-estudiante 98%. Con respecto a calificaciones se encontró mayor a 4 en 26%, entre 3 y 3.9 en 69% y menor a 3 en 4.3% en Medicina. Calificación mayor a 4 en 10% entre 3 y 3.9 en 87% y menor de 3 en 3% en Enfermería. Los retiros de estudiantes en los cinco periodos evaluados fueron de 3% en Medicina y 0.69% en Enfermería. **Conclusiones:** después de la implementación de la nueva metodología hay evidentes logros: mayor aceptación del programa y metodología en más del 90%, mejor correlación clínico-microbiológica, destreza en tomas de muestras, interpretación de exámenes, creatividad y aprendizaje. El promedio de calificaciones es mejor y el porcentaje de pérdida de materia descendió de 20% a 3.5%.



L10 Determinación de *Klebsiella pneumoniae* subs. *ozaenae* Y *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* mediante la técnica de P.R.A (PCR Restriction Assay).

Arenas, NE, Polanco, JC, Gómez, A, Universidad del Quindío. Centro de Investigaciones Biomédicas.

Objetivo: diferenciar las subespecies de *Klebsiella pneumoniae*, utilizando la técnica molecular basada en el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción a partir de amplicones obtenidos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RFLP) del gen del rDNA 16S de las especies del género *Klebsiella*. **Materiales y métodos:** se utilizaron secuencias reportadas en el Genbank para el gen rDNA 16S de las especies del género *Klebsiella*. Los alineamientos fueron realizados en el programa MACAW e importados al programa GENEDOC, en el cual fue posible la predicción in silico de los patrones de restricción a partir de los alineamientos. Los primers fueron diseñados en el programa GENERUNNER teniendo en cuenta los siguientes parámetros: Longitud entre 18 y 22 pb, TM entre 55° C y 65° C y que no formaran estructuras secundarias que perjudiquen la eficiencia de la reacción. **Resultados y discusión:** se identificaron patrones de restricción con las enzimas Ban II, Sal I y Taq I que permiten diferenciar las subespecies de *Klebsiella pneumoniae* (*Spp ozaenae* y *rhinoscleromatis*) y se propuso un algoritmo para la identificación. Se diseñaron primers que permiten montar experimentalmente el ensayo de PRA, presentando in silico características óptimas para PCR. Este nuevo método permitiría el diagnóstico específico de las infecciones causadas por *Klebsiella* y presentaría las ventajas de rapidez y especificidad para identificar organismos incluso a nivel de subespecie. **Conclusiones:** este método diseñado podría constituirse en el primer ensayo molecular reportado en el mundo para diferenciar las subespecies de *Klebsiella pneumoniae*, lo cual es actualmente difícil por los métodos convencionales. Se requiere del montaje experimental del ensayo para validar los resultados obtenidos in silico.

L11 Análisis genético de la formación de biofilm del patógeno oportunista *Klebsiella pneumoniae*.

Suescún, AV, CorpoGen, Cubillos, JR, CorpoGen, Zambrano, MM, CorpoGen.

Objetivo: determinar genes que estén involucrados en la formación de biofilm del patógeno oportunista *Klebsiella pneumoniae*. **Materiales y métodos:** *K. pneumoniae* MZ2098 fue mutagenizada con miniTn10Km por conjugación con la cepa *E. coli* B2155 (pir+dap-), portadora del plásmido conjugativo pBSL180. Colonias exconjugantes KmR fueron crecidas 18 horas en microplacas de 96 pozos y analizadas para formación de biofilms por tinción con cristal violeta. Sitios de inserción del transposón se identificaron con PCR arbitraria, amplificando la región genómica adyacente al transposón. Los amplificados se secuenciaron y analizaron contra la base de datos del genoma no terminado de *K. pneumoniae* (genome.wustl.edu) y la base de datos NCBI para identificar los genes interrumpidos. **Resultados y discusión:** se generó una colección de 9,300 mutantes. 37 (0.4%) de éstos presentan biofilm reducido y 13 (0.14%) lo muestran incrementado. La secuenciación de la región flanqueante del transposón permitió identificar la mayoría de las regiones interrumpidas. Dentro de los genes que disminuyen la formación de biofilm, se encuentran genes involucrados en formación de pili, en metabolismo o en regulación. Algunos mutantes tienen inserciones en genes de función desconocida, uno de los cuales tiene al menos cinco interrupciones diferentes. La cinética de crecimiento de la mayoría de los mutantes es similar a la cepa

parental y producen biofilms con diferentes fenotipos en diferentes medios y condiciones. **Conclusiones:** el análisis mutacional de *K. pneumoniae* revela genes, no publicados aún, que pueden ser importantes en la formación de biofilms. Con el análisis individual de algunos de los genes de interés, se espera ampliar el conocimiento sobre los mecanismos empleados por *K. pneumoniae* para la formación de estas estructuras complejas y así entender los mecanismos de persistencia.

L12 Detección de microorganismos periodontopáticos y enterobacterias en pacientes afectados por periodontitis agresiva generalizada en población colombiana por medio de cultivo y PCR RNA 16S.

Lafaurie, GI, Universidad El Bosque, Mayorga, I, Universidad El Bosque, Cobo, E, Universidad El Bosque, Hurtado, PA, Universidad El Bosque, Castillo, DM, Universidad El Bosque, Eslava, GA, Universidad El Bosque, Blanco, NM, Universidad El Bosque.

Objetivo: el propósito de este estudio fue evaluar la frecuencia de aparición de microorganismos periodontopáticos y enterobacterias, en sitios con lesiones severas y en muestras tomadas de 6 sitios con bolsas mayores a 7 mm de una muestra de pacientes colombianos con diagnóstico de Periodontitis Agresiva Generalizada, por medio de Cultivo y Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR. **Materiales y métodos:** se obtuvieron muestras de placa subgingival de 108 sitios de 18 pacientes adultos con edades entre 17 y 36 años, quienes cumplieron con los criterios establecidos por la AAP 1999 y se realizó la identificación de *P. gingivalis*, *C. rectus*, *T. forsythensis*, *A. actinomycetemcomitans* y bacilos entéricos, por técnica de cultivo y por técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). **Resultados y discusión:** se encontraron prevalencias de 94.4% para *P. gingivalis*, 83.3% de *C. rectus*, 66.6% para *T. forsythensis*, 22.2% para *A. actinomycetemcomitans* y 5.5% de bacilos entéricos. La técnica de PCR logró detectar más microorganismos que la técnica de cultivo para los microorganismos estudiados a excepción de los bacilos entéricos que fueron identificados por la técnica de cultivo. **Conclusiones:** este estudio está en concordancia con algunos reportados en otros países del mundo para los microorganismos observados los cuales reportan una mayor frecuencia de aparición de *P. gingivalis* y *T. forsythensis* en pacientes con Periodontitis Agresiva Generalizada. La frecuencia de *A. actinomycetemcomitans* en estos pacientes fue baja y sustenta que este microorganismo no esta altamente asociado con esta entidad.



L13 Diferenciación de *Rhodococcus equi* de otras especies de *Rhodococcus* mediante una prueba de PCR-RFLP basada en los genes codificantes para la subunidad 16 S ribosomal.

Pavía, P, Calderón, C, Campos, I, Huertas, M, Trespalacios, A, Puerta, CJ, Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Objetivo: *R. equi* es un patógeno ambiental implicado en afecciones pulmonares en pacientes inmunocomprometidos. Dada la dificultad en diferenciar esta bacteria de otros *Rhodococcus* por métodos bioquímicos, en este trabajo se propone el uso de una prueba de PCR-RFLP para su diferenciación. **Materiales y métodos:** *R. equi* y *R. rhodnii* fueron cultivados en agar sangre y BHI a 37 y 26 °C, respectivamente. El ADN de estas y otras bacterias fue extraído y amplificado usando los iniciadores conservados para los genes 16S rRNA (Hypsa & Dale, 1997). Luego de la visualización de los productos de amplificación, los mismos fueron sometidos a digestión con diversas enzimas de restricción. Adicionalmente, se determinó mediante bioinformática el patrón de restricción diferencial del gen 16S rRNA de *R. equi* de 14 especies de *Rhodococcus*, 3 *Nocardia* y 1 *Tsakamurella*. **Resultados y discusión:** se obtuvo el fragmento de amplificación esperado de 1.300 pb en todas las bacterias estudiadas y se logró distinguir el patrón de restricción de *R. equi* de *R. rhodnii* y otros cocobacilos con las enzimas PstI, HindIII, SstI, BamHI y EcoRI. Igualmente, se elaboró un algoritmo para diferenciar *R. equi* de otras especies de *Rhodococcus* y géneros cercanos (*Nocardia* y *Tsakamurella*), a partir de la digestión del fragmento del gen 16S rRNA PCR amplificado con las enzimas Accl, Acul, All, AlwNI, Bccl, BspMI, BstEII, SacI y SacII. **Conclusiones:** la PCR-RFLP usando como blanco los genes 16S rRNA consiste en una alternativa para la diferenciación de *R. equi* de otros *Rhodococcus*, incluyendo a *R. erythropolis*, *R. fascians* y *R. rhodochorus*, los cuales han sido aislados de muestras clínicas de pacientes.

L14 Estandarización de una técnica de PCR múltiple para la identificación y serotipificación de *Streptococcus pneumoniae*.

Hernández, E, Moreno, J, Agudelo, C, Castañeda, E, Instituto Nacional de Salud.

Objetivo: *S. pneumoniae* presenta diferentes serotipos que pueden colonizar la nasofaringe de individuos sanos, de donde puede diseminarse y producir enfermedad. El objetivo del estudio fue estandarizar una metodología más sensible, menos costosa y laboriosa que la metodología estándar para el estudio de los serotipos de *S. pneumoniae*. **Materiales y métodos:** para estandarizar la técnica de identificación, se amplificó un fragmento del gen de la neumolisina y para la determinación de serotipos por PCR múltiple se utilizaron los iniciadores para los serotipos 1, 3, 4, 6B, 14, 19F, 23F, 18C, 19A y los serogrupos 6, 19, 23; la sensibilidad de las pruebas se determinó con diluciones de ADN de *S. pneumoniae* de una concentración conocida y la especificidad con el empleo de *S. mitis*, *S. bovis*, *S. intermedius*, *S. sanguis*, *S. pyogenes*, *S. canis*, *S. salivarius*, *Branhamella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*, *N. lactamica*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* y diferentes serotipos de *S. Pneumoniae*. **Resultados y discusión:** la PCR monoplex fue positiva cuando se utilizaron muestras identificadas previamente como *S. pneumoniae* (n = 30) y negativa con otros estreptococos y bacterias colonizadoras de la nasofaringe; la sensibilidad de la técnica fue de 31 pg de ADN y la especificidad de 100%. A partir de una muestra preparada que contenía todos los serotipos estudiados, la PCR múltiple pudo determinar simultáneamente

los diferentes tipos capsulares y no presentó reactividad cruzada con otros serotipos ni con las otras especies bacterianas evaluadas. **Conclusiones:** la técnica de PCR utilizada para la identificación y serotipificación de *S. pneumoniae* es una metodología útil para los estudios de vigilancia de colonización nasofaríngea por ser altamente sensible, específica, menos laboriosa y costosa que la metodología estándar.

L15 Perfil de antígenos de *Helicobacter pylori* reconocidos por pacientes con diferentes patologías gastroduodenales.

Bermúdez, OM, Peñarete, DM, Citty, DM, Instituto Nacional de Cancerología, Campos, H, Universidad Nacional, Spinel, C, Universidad Nacional, Bravo, MM, Instituto Nacional de Cancerología.

Objetivo: determinar si la respuesta inmune humoral de pacientes infectados con *H. pylori* con diferentes patologías gastroduodenales está mediada por subclases específicas de Ig G en cada patología, si existen antígenos bacterianos reconocidos por una subclase en particular y si el reconocimiento de antígenos específicos puede asociarse con alguna de las patologías estudiadas. **Materiales y métodos:** se analizaron mediante inmunotransferencia 150 sueros de pacientes infectados con *H. pylori*, con diagnóstico de gastritis no atrófica, gastritis atrófica, metaplasia intestinal, cáncer gástrico y úlcera péptica, se incluyeron 30 sueros de cada patología. Se empleó como preparación antigénica el sobrenadante de co-cultivo de *H pylori* (dos cepas nativas provenientes de pacientes con diagnóstico de úlcera y cáncer) y la línea celular de origen gástrico AGS. Se detectaron las IgG totales y subclases de Ig G1, Ig G2, Ig G3 e Ig G4. **Resultados y discusión:** los perfiles antigénicos de las dos cepas fueron similares, mostraron 23 proteínas comunes de peso molecular entre 20 y 130 kd. Aunque los sueros mostraron un reconocimiento variado de antígenos, no se observaron diferencias según la patología ni con Ig G total ni con las subclases. Los análisis multivariados para evaluar simultáneamente la respuesta de los pacientes hacia los 23 antígenos, mostraron a las proteínas de 70, 82, 86 y 90 kd como los principales antígenos implicados, su reconocimiento permitió diferenciar dos grupos de patologías: en G, GA y C se reconocieron los antígenos de 86 y 90 kd, mientras que en UD y MI se reconoció el de 70 kd. La subclase Ig G2 mostró el mayor reconocimiento de antígenos seguida por Ig G2, Ig G3 e Ig G4. **Conclusiones:** la respuesta inmune hacia *H pylori* puede ser un indicador útil de la patogénesis asociada a la infección diferenciando los procesos excluyentes de úlcera y cáncer gástrico. El mayor reconocimiento de Ig G1 respecto a Ig G2 puede ser el reflejo de una mayor activación de linfocitos Th1 que favorece la persistencia de la bacteria y el desarrollo de enfermedades gastrointestinales asociadas.