

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

DIAGNÓSTICO CLÁSICO Y MOLECULAR DE *Salmonella* y *Shigella*,
EN PERSONAS CON SÍNDROME DIARRÉICO AGUDO EN LA
CIUDAD DE CUMANÁ, ESTADO SUCRE
(Modalidad: Investigación)

JESÚS MANUEL LUIGGI LIMONGI

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA.

CUMANÁ, 2009

DIAGNÓSTICO CLÁSICO Y MOLECULAR DE *Salmonella* y *Shigella*, EN
PERSONAS CON SÍNDROME DIARRÉICO AGUDO EN LA
CIUDAD DE CUMANÁ, ESTADO SUCRE

APROBADO POR:

Prof. Marcos De Donato
Asesor

Jurado

Jurado

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	8
Población de Estudio	8
Grupo Control	8
Consentimiento Informado	8
Recolección de las Muestras	8
Coproanálisis	9
Coprocultivo	9
Identificación Bioquímica	10
Diagnóstico molecular de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i>	13
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	31
ANEXOS	39
Hoja de Metadatos	43

DEDICATORIA

A

Dios creador del universo por ser mi luz y darme la fuerza necesaria para alcanzar mis metas.

Mi hija Naomi Paola

Isaurea Quijada, mi esposa, gracias por estar siempre a mi lado.

Mis padres Manuel Luigi y Nilda Limongi por tener fe y paciencia en la culminación de mi carrera, que en definitiva este logro es de ellos, gracias por confiar en mi.

Mis hermanos Jesús Eduardo, Marlenis y Gabriel, gracias por creer en mi.

Mis sobrinos queridos Samuel, Ricardo, Gabriel, Romalys, Romelys, Roman, Lenin, Víctor y Paola valentina que este logro sea de estímulo para ustedes.

La familia Kas-danouche, mi eterno agradecimiento por ser parte de mi vida y enseñarme que la sabiduría viene de Dios.

Mis suegros Freddy Quijada y Constanza Quijada por incentivar me a continuar y perseverar hasta el final.

Bruno Taglieri, Augusto Figueroa, Carlos Molina, Leonardo Ruiz, Antonio Granado, Carlos Dicurú y Diluvina Fernandez por brindarme su amistad sincera y ser mis “panas” en todo momento.

A todos ustedes MIL GRACIAS...

Jesús Luigi

AGRADECIMIENTO

A

Mi asesor profesor Marcos De Donato, por sus enseñanzas, consejos y ayuda en la culminación de esta tesis.

La M.Sc. Elvia Michelli por su colaboración en la realización de esta tesis.

La M.Sc. Hectorina Rodulfo, por ayudarme en el procesamiento de las muestras y orientarme en los momentos más difíciles y por su paciencia en la elaboración de esta tesis.

Adriana Millán y Miriam Michelli por su ayuda y colaboración en las tomas y procesamiento de muestras y brindarme su amistad sincera.

Todas aquellas personas que de una u otra forma me ayudaron a realizar este triunfo, mil gracias por aportar su granito de arena.

Jesús Luiggi

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de individuos con síndrome diarreico agudo e individuos controles de acuerdo al sexo en diferentes centros asistenciales de Cumaná, estado Sucre.....	17
Tabla 2. Frecuencia de individuos con síndrome diarreico agudo e individuos controles de acuerdo a los grupos de edad evaluados, en diferentes centros asistenciales de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.	18
Tabla 3. Frecuencia de enterobacterias aisladas en coprocultivos de individuos con síndrome diarreico agudo e individuos controles, provenientes de diferentes centros asistenciales de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.	18
Tabla 4. Frecuencia de infecciones por <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> en personas con síndrome diarreico agudo de acuerdo al sexo en la ciudad de Cumaná, estado Sucre.	18
Tabla 5. Frecuencia de cepas de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> según la edad, aisladas de individuos con síndrome diarreico agudo provenientes de diferentes centros asistenciales de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.	19
Tabla 6. Frecuencia de helmintos y protozoarios intestinales diagnosticados en individuos con síndrome diarreico agudo e individuos controles provenientes de diferentes centros asistenciales de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.....	20

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Optimización del diagnóstico molecular por PCR de *Salmonella* empleando cepas certificadas *Salmonella* Typhi (CVCM495), *Salmonella* Enteritidis (CVCM497) y *Salmonella* Typhimurium (CVCM489) como controles positivos, un aislado clínico identificado como *Salmonella* y la cepa *E. coli* (CVCM765) como control negativo. Marcador de peso molecular 100 pb (Promega). 21
- Figura 2. Optimización del diagnóstico molecular por PCR de *Shigella* empleando una cepa de *Shigella flexneri* (CVCM 634). Pozo 1: Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega), Pozo 2: Control negativo y Pozos 3, 4, 5 y 6: amplificados de la cepa control aislada a partir de caldos de cultivo BHI y Selenito y amplificados a partir de muestras de ADN no diluidas o diluidas (1:10). Se utilizó también a la cepa *E. coli* (CVCM765) como control negativo. 22
- Figura 3. Amplificación por PCR de los genes de *invA/E* (A), *sefA* (B) y *fliC* (C) de cepas controles y muestras analizadas. Se utilizó agua y *E. coli* (CVCM765) como control negativo, *Salmonella* Typhi (CVCM495), *Salmonella* Enteritidis (CVCM 497) y *Salmonella* Typhimurium (CVCM489) como controles positivos.... 23
- Figura 4. Detección e identificación de *Shigella* por PCR. Se utilizó *S. flexneri* (CVCM 634) como control positivo, y agua como control negativo. Muestras: 24

RESUMEN

En Venezuela, el Síndrome Diarréico Agudo (SDA) reviste gran importancia epidemiológica, constituyendo una de las primeras causas de morbi-mortalidad, donde los géneros *Salmonella* y *Shigella*, están frecuentemente involucrados. Se planteó detectar *Salmonella* y *Shigella* por métodos convencionales y moleculares. Se realizó coprocultivo para aislamiento e identificación de las bacterias enteropatógenas en 330 muestras de heces de individuos con SDA y 30 muestras de individuos asintomáticos (controles) de diferentes edades y ambos sexos, así como coproanálisis para observar las características físicas macroscópicas y posibles formas evolutivas parasitarias en las heces. Se encontró que ambos grupos de estudio presentaron un ligero predominio del sexo femenino. La mayor frecuencia de individuos con SDA se presentó en el grupo de 0-2 años de edad (39,39%). El grupo control presentó un 46,67% de positividad en el análisis bacteriológico. *Escherichia coli* fue la especie más frecuente en ambos grupos de estudio, seguida de *Shigella* con 16 casos (4,85%), y de *Salmonella* con 14 casos (4,24%) en los individuos con SDA, detectándose además *Proteus* y *Klebsiella* en los individuos controles, entre otras. La salmonelosis se distribuyó en ambos sexos por igual y con mayor frecuencia en los grupos de 3-4 y 9-10 años, mientras que la shigellosis predominó ligeramente en el sexo femenino (56,25%) y en niños de 5-6 y 9-10 años. Las infecciones por *Salmonella* y *Shigella* presentaron infecciones mixtas con helmintos y protozoarios intestinales patógenos en un 14,28% y 25,00% respectivamente. Se logró optimizar las condiciones de PCR para la detección molecular de *Salmonella* (genes *invA*, *sefA* y *fliC* de 457pb, 620pb y 488pb respectivamente) y *Shigella* (gen *virA* de 457pb) observando que sólo las muestras positivas a estos géneros por análisis bacteriológico mostraron las amplificaciones esperadas. Se demostró la especificidad de la técnica de PCR por la ausencia de productos amplificados en los controles empleados. Se concluye que el diagnóstico molecular constituye una herramienta alternativa que permite la detección e identificación de bacterias causantes de cuadros diarreicos, además de su gran utilidad para determinar la existencia de genes de virulencia en las cepas estudiadas.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas constituyen un problema de salud pública en el mundo, especialmente en los países en desarrollo, donde representan una importante causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años (OPS, 1999). Se ha estimado que en África, Asia y América Latina cada año mueren alrededor de 3,3 millones de niños por este síndrome y ocurren más de mil millones de episodios (Velásquez *et al.*, 2004). Actualmente, apenas el 60% de los episodios diarreicos son diagnosticados etiológicamente, permaneciendo gran número de los casos con etiología desconocida.

Al respecto, en Venezuela, datos epidemiológicos demuestran que el aumento de casos por diarrea en menores de cinco años se mantuvo hasta 1996, disminuyó en el 1997 y repuntó en 1998 y 1999 (Cermeño *et al.*, 2008). En nuestro país la enteritis y otras enfermedades diarreicas constituyen un problema de salud pública, manteniéndose entre las principales causas para el período 1998 y 1999, y se encuentra en la actualidad como la segunda causa de muerte en niñas y niños menores de cinco años (Cermeño *et al.*, 2008). Araque y Bastardo (1999) señalan que las diarreas representan una de las principales causas de muertes de niños menores de 1 año, observándose las tasas más altas en los estados Delta Amacuro, Amazonas y Zulia, siendo este último estado según Rincon *et al.* (2006) el que presentó uno de los casos de diarreas más alto para el 2003, con un registro de 46.397 casos de diarrea infantil en menores de 1 año de edad y en el cual ocurrieron 311 muertes infantiles. Por su parte, las especies de los géneros *Salmonella* y *Shigella* están frecuentemente involucradas en el síndrome diarreico agudo (González *et al.*, 1997). Urrestarazu *et al.* (1999) observaron que los enteropatógenos más importantes en casos de diarrea, en cuatro ciudades de Venezuela (Mérida, Caracas, Cumaná y Puerto Ordaz) fueron: *Campylobacter* sp. (13%), *Shigella* sp. (7%) y *Salmonella* sp. (2%). En este sentido, Rincón *et al.* (2002) destacan que las diarreas constituyen la novena causa de muerte en la población venezolana y la segunda causa de mortalidad en menores de cuatro años.

La diarrea se ha definido como la presencia de 3 o más evacuaciones líquidas o sueltas en 24 horas o una evacuación líquida con sangre en el mismo período de tiempo. Se trata de una patología de relevante importancia sanitaria, cuyo manejo es relativamente fácil por parte del personal capacitado, pero requiere para su control de provisión de agua potable, condiciones higiénicas, alimentarias y adecuado control de las excretas, ya que su propagación se realiza por vía fecal-oral (OPS, 2002).

Las manifestaciones clínicas de las enfermedades diarreicas agudas presentan variaciones debidas tanto al tipo de hospedero (lactante, anciano, inmunocomprometido) y su estado inmunológico, como a la variedad de agentes causales, tales como los virales: rotavirus, adenovirus, calicivirus y astrovirus, los bacterianos: especies de *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* diarreogénicas, *Clostridium difficile*, *Vibrio parahemolyticus* y *Vibrio cholerae*, entre otros, y los parásitos *Giardia duodenale*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium*, entre otros (Gomez et al., 2008).

Las bacterias pueden causar diarrea a través de uno o más de los siguientes mecanismos: liberación de toxinas, como enterotoxinas que estimulan la secreción de cloro, sodio y agua; citotoxinas que producen daño celular por inhibición de la síntesis de proteínas; mediante factores de adherencia como pilis, glicoproteínas u otras proteínas de superficie que favorecen la colonización de los enterocitos; mediante factores de colonización; por invasión de la mucosa y proliferación intracelular, produciendo destrucción celular, que clínicamente puede observarse como sangre en las deposiciones y por translocación de la mucosa con proliferación bacteriana en la lámina propia y los ganglios linfáticos mesentéricos (Murray et al., 1999).

Las bacterias que infectan el sistema digestivo del hombre generalmente se transmiten por alimentos y aguas contaminadas, causando cuadros clínicos que varían en intensidad dependiendo del microorganismo involucrado y de las condiciones inmunológicas y nutricionales de la persona afectada. Las manifestaciones clínicas más observadas en infecciones intestinales bacterianas son diarrea profusa, en algunos casos acuosa, síntomas del tipo disentéricos y heces sanguinolentas, de acuerdo con el agente causal de la patología (Jafari et al., 2008).

Dentro de las bacterias causantes de cuadros gastrointestinales se encuentran los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, caracterizados por ser bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, que fermentan la glucosa, crecen fácilmente en medios comúnmente usados en microbiología y son oxidasa negativos. (Fischbach, 1997).

Las cepas del género *Salmonella*, pertenecientes a las enterobacterias, producen una enfermedad infectocontagiosa denominada salmonelosis. Éstas pueden inducir cuadros clínicos cuya principal manifestación es la **gastroenteritis aguda**, una de las intoxicaciones alimentarias más comunes causadas por agua y alimentos contaminados, especialmente **carnes** (Van Loock *et al.*, 2000; Gillespie *et al.*, 2005; Shu-Xuan, 2007). Sus reservorios principales son los animales, entre los cuales destacan los **reptiles**, las **mascotas** (principalmente gatos y perros) y diversas aves (pollos, **gaviotas**, **palomas**, **pavos**, **patos**, **loros** y **aves costeras**) (Sánchez, 1998; Doyle y Erickson, 2006; Reed *et al.*, 2003).

Salmonella es uno de los patógenos más importantes reportados en los hospitales de todo el mundo, ocasionando fiebres y muertes cada año. *Salmonella enterica* es la especie que más se transmite a los seres humanos, principalmente por aguas contaminadas con materia fecal y consumo de huevos contaminados en granjas avícolas, por lo que se hace necesario el control higiénico en estos lugares; además se requieren métodos para su detección realmente rápidos y precisos (Soumet *et al.*, 1999).

La exposición humana a esta bacteria es frecuente, sin embargo, se requiere un inóculo de aproximadamente 10^8 bacterias para el desarrollo de la enfermedad sintomática. La mayor incidencia de salmonelosis mundial corresponde a los niños menores de un año de edad, y las infecciones tienen una repercusión más grave en niños y ancianos (Durango *et al.*, 2004). Las cepas de *Salmonella* han sido asociadas a cuatro cuadros clínicos diferenciados: gastroenteritis, bacteriemia, fiebre entérica y colonización asintomática, siendo el más frecuente gastroenteritis, caracterizada por diarrea, dolor abdominal y fiebre que se inicia de 6 a 72 horas después del contagio. La infección persiste de cuatro a siete días y la mayoría de los enfermos se recuperan espontáneamente. Sin embargo, existen casos en los que la diarrea puede ser tan profusa como para requerir hospitalización para rehidratación endovenosa (Koneman *et al.*, 1999).

El desarrollo de la enfermedad tras la ingestión de *Salmonella enteritidis* depende, por una parte, del número y virulencia de los microorganismos, y por otra, de factores dependientes del huésped. Una vez ingeridos, los microorganismos pasan al estómago donde se exponen al ácido gástrico, de donde los bacilos viables que sobreviven pasan al intestino delgado se enfrentan a otras barreras naturales como son la actividad antimicrobiana de la flora normal del intestino y la motilidad intestinal (Massoc, 2008)

Una vez en el intestino delgado, *Salmonella* se fija a receptores específicos que existen en un porcentaje pequeño en las vellosidades intestinales, y posteriormente penetra en la mucosa; donde éstas son transportadas a los folículos linfoides intestinales, se multiplican, y pasan al torrente sanguíneo, originando una primera bacteriemia precoz, asintomática (luego de 1 a 3 días tras la ingesta bacilar), que cede al ser fagocitadas las bacterias por las células del sistema mononuclear fagocítico. Sin embargo, al no ser eliminadas, se multiplican y con posterioridad pasan de nuevo a la corriente sanguínea, dando lugar a una nueva etapa bacteriémica, esta vez prolongada y sintomática, a partir de la cual, los gérmenes llegan a todos los órganos del organismo, por lo tanto la curación de la enfermedad depende más del establecimiento de una eficaz inmunidad celular del huésped por linfocitos T activados, que puedan destruir los microorganismos intracelulares, que del desarrollo de una inmunidad humoral (Sánchez, 1998).

La taxonomía de las especies de *Salmonella* ha sido complicada y muy debatida, dividiéndose en varias especies según el hospedador de origen, características clínicas de la enfermedad que causa y características bioquímicas (Kauffmann, 1966; Le Minor y Popoff, 1987). Actualmente, la nomenclatura oficial define sólo 2 especies: *S. bongori* y *S. enterica* (antigua *S. choleraesuis*), estando esta última dividida, según el tipo de hospedador y la inmunoreactividad de tres antígenos de superficie (O, H y Vi), en 6 subespecies: *S. enterica* subespecie *enterica*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *indica* y *S. enterica* subsp. *salamae* (Tindall *et al.*, 2005). Hasta el 2001 se describieron 2501 serovares, de acuerdo al tipo de hospedero la inmunoreactividad de los tres tipos de antígenos O, H y Vi (Popoff, 2001), de los cuales el 60% pertenece a la subespecie *enterica*, las cuales son responsables del 99% de las infecciones en humanos. En este sentido, todas las cepas identificadas anteriormente como las especies *S. enteritidis*, *S. paratyphi*, *S. typhi*, *S. typhimurium*, etc, pertenecen ahora a la subespecie *enterica* y el antiguo epíteto específico se designa como serovar, así, *S. enteritidis* corresponde a *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, o para acortar, *Salmonella* Enteritidis (Tindall *et al.*, 2005).

Los serovars de *Salmonella* requieren para el desarrollo de la enfermedad la expresión de una serie compleja de factores de virulencia que permiten a la bacteria evadir el sistema inmunológico del hospedero (Ohl y Miller, 2001; Orsi, 2007).

Por otro lado, la shigelosis constituye un importante problema de salud pública, principalmente en los países en desarrollo, donde diversas condiciones como la disponibilidad limitada de agua potable, la falta de instalaciones sanitarias adecuadas para la disposición de las heces y la escasa difusión de normas de higiene, facilitan la transmisión de la infección (Keusch y Bennish, 1989; Ferreccio *et al.*, 1991; Basualdo, 2001).

El género *Shigella* está dividido en cuatro especies: *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii*, y *S. dysenteriae*, las cuales son responsables de la shigelosis o disentería bacilar, caracterizada por fiebres altas, trastornos neurológicos y disentería hemorrágica (Sansone, 2001). Su morbilidad y mortalidad es mayor en poblaciones de riesgo altas como niños menores de cinco años y ancianos (Thong, 2005).

Las especies de *Shigella* son capaces de dañar las células epiteliales de la mucosa del intestino grueso e inducir como consecuencia de ello manifestaciones clínicas variadas, desde un franco síndrome disentérico a un proceso diarreico leve o una infección subclínica, muchas veces difícil de diferenciar. Los humanos sirven como hospederos naturales y la enfermedad es transmisible por la ruta fecal-oral. Principalmente, las especies de *Shigella* invaden los tejidos linfáticos intestinales y pueden extenderse a otros órganos (Hernández y Godoy, 2002).

Las especies virulentas de *Shigella* se caracterizan por la presencia de un plásmido de virulencia de 220 kilobases y por la capacidad de invadir las células epiteliales de la mucosa intestinal, con diseminación a otras células. La entrada de *Shigella* a las células blanco esta favorecida por factores bacterianos que inducen su internalización a las mismas (Parsot, 2005). El proceso de invasión es complejo e implica tres loci cromosómicos y cinco plasmídicos (Sansone, 2001). La virulencia plasmídica relacionada con el proceso de invasión fue descrita primero en cepas *S. flexneri* (Kopecko *et al.*, 1979; Penatti, 2007).

La cifra anual de episodios de shigelosis en todo el mundo es de 164,7 millones, de los cuales 163,2 millones se producen en los países en desarrollo y 1,5 millones en los países industrializados. En total, el 69% de todos los episodios y el 61% de todas las defunciones atribuidas a la shigelosis afectan a menores de 5 años. En el 60% de los aislamientos se identifica a *S. flexneri* y un 15% corresponde a *S.*

sonnei (Kotloff *et al.*, 1999; Sandrea *et al.*, 2007).

El método tradicional usado para la detección de bacterias enteropatógenas asociadas con diarrea, y especialmente para *Salmonella* y *Shigella*, consiste en el aislamiento de estos microorganismos para su detección fenotípica mediante la identificación por pruebas bioquímicas y serológicas, previo a un periodo de incubación (Wong y Chow, 2002). Dado que el CP es un examen laborioso y de alto costo, es necesario racionalizar su indicación, seleccionando los pacientes que clínicamente o por situación epidemiológica lo ameriten. Además este método no es conveniente para el monitoreo de un gran número de muestras (De Medici *et al.*, 1998; Vieira-Pinto, 2007).

Para la detección de *Salmonella*, *Shigella* y otros géneros de bacterias enteropatógenas, se necesitan métodos de detección rápidos, sensibles y específicos. En este sentido, la aplicación de técnicas de hibridización de ADN, junto a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), acelera el diagnóstico de laboratorio y permiten obtener exactamente el serovar causante de la infección (Wang *et al.*, 2008) El uso de PCR y la confirmación mediante sondas para la hibridización en la detección de organismos patógenos ha logrado avances comparados con la siembra de los medios de cultivos clásicos, reportándose una alta sensibilidad y especificidad para la detección e identificación de bacterias patógenas (Fang *et al.*, 2003; Vieira-Pinto *et al.*, 2005).

La PCR es una técnica enzimática *in vitro* que permite la amplificación de una secuencia específica de la molécula de ADN. En el campo del diagnóstico clínico es posible, a partir de una muestra de material genético, copiar la secuencia de interés las veces necesarias y generar suficiente cantidad de muestras para detectar la presencia o ausencia de patógenos, y en muchos casos realizar la cuantificación del mismo (Gómez *et al.*, 2002).

Por otro lado, los métodos moleculares son usados para la tipificación de bacterias, lo que permite determinar relaciones entre cepas aisladas de diferentes pacientes y ambientes, proporcionando pruebas de las posibles fuentes de transmisión del agente infeccioso (Chamberlain y Johal, 1988). Los estudios de tipificación fenotípica han sido realizados para evaluar la epidemiología de las infecciones ocasionadas por *S. enterica*, sin embargo, estos métodos tradicionales basados en biotipificación, serotipificación y pruebas de resistencia a los antimicrobianos no siempre dan una información completa

para cubrir los objetivos epidemiológicos planteados. Por ello las limitaciones de los análisis fenotípicos han conducido al desarrollo progresivo de técnicas de genotipificación (Oliveira *et al* 2007).

Con respecto al genero *Shigella*, los análisis genómicos han confirmado la existencia de 4 especies demostradas por diferenciación de ensayos bioquímicos y serotipificación (Shears, 1996; Rolland *et al.*, 1998). Sin embargo, se han utilizado métodos moleculares como: la PCR, ribotipiaje, hibridación de ADN, secuenciación de genes o combinación de estas técnicas, para la caracterización de cepas y especies y su asociación con brotes epidémicos y fuentes de contaminación (Brenner *et at.*, 1973; Brenner *et al.*, 1982; Liu *et al.*, 1995; Pupo *et al.*, 1997; Rolland *et al.*, 1998; Navia *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000; Pupo *et al.*, 2000; Surdeanu *et al.*, 2003).

Debido a los índices de morbilidad y mortalidad que ocurren en Venezuela por el síndrome diarreico agudo ocasionado por bacterias enteropatógenas y, por otro lado, el hecho de que muchos laboratorios en la actualidad han tratado de reducir el tiempo requerido para el diagnóstico bacteriológico clásico de infecciones por estas bacterias (normalmente de 2 a 4 días), porque originan un riesgo significativo para la persona infectada, se plantea detectar cepas de *Salmonella* y *Shigella* a través del diagnóstico bacteriológico clásico y mediante métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ofreciendo un método complementario que contribuya al diagnóstico e identificación específica de estos patógenos en muestras de heces, lo que contribuiría a la aplicación de una terapia antimicrobiana rápida y eficiente.

METODOLOGÍA

Población de Estudio

Para esta investigación se procesaron 330 muestras de heces de individuos de ambos sexos y sin distinción de edad, que presentaban síndrome diarreico agudo con un periodo de evolución no mayor de 72 horas, que no hubiesen recibido terapia antimicrobiana y que acudieron al servicio de emergencia de los ambulatorios: Salvador Allende, ubicado en la Avenida Perimetral, sector Caiguire; Dr Ramón Martínez, ubicado en el sector Las Palomas; La Llanada, ubicado en la Llanada, Brasil, situado en el sector Brasil; y el Laboratorio Comunitario, Parroquia Altigracia, de la ciudad de Cumaná, municipio Sucre, estado Sucre; recolectándose 66 muestras de heces en cada uno de ellos, entre los meses de abril y septiembre de 2006.

Grupo Control

Se recolectaron 30 muestras de heces de individuos de ambos sexos y sin distinción de edad, que no presentaron síntomas de alteración gastrointestinal para el momento del muestreo y que acudieron a los servicios de las consultas pediátricas y de adultos de los diferentes centros ambulatorios seleccionados para el estudio. Además, los individuos seleccionados expresaron no haber recibido tratamiento antimicrobiano en los últimos 2 meses.

Consentimiento Informado

Para la obtención de los datos del paciente y la autorización de los padres y representantes para que su representado participara en la investigación, se utilizó un consentimiento previa información que incluyó una declaración del voluntario (padres y/o representantes) y del investigador elaborado según los principios propuestos por el protocolo ético modelo para la recolección de muestras (anexo) y de acuerdo a los principios de la declaración de Helsinki (CIOMS, 2002). A cada paciente se le asignó un código, el cual lo identificó durante el estudio, con el fin de mantener la confidencialidad de los participantes.

Recolección de las Muestras

Las muestras fueron recolectadas en un envase de plástico estéril para heces, previa instrucción por parte del personal del laboratorio clínico de cada ambulatorio para una adecuada toma de muestra. La muestra fecal fue obtenida por emisión espontánea y una vez entregada al investigador, se colocaron en hielo y se trasladaron al Laboratorio de Bacteriología Clínica del departamento de Bioanálisis, dentro de un lapso no mayor de 2 horas para el procesamiento parasitológico y bacteriológico.

Coproanálisis

Se realizó un examen macroscópico que sirvió para observar las características físicas de las heces como: color, aspecto, olor, consistencia, presencia de moco, sangre o pus, así como también las formas evolutivas parasitarias intestinales que pudieran ser macroscópicamente visibles. El examen microscópico se realizó colocando en lámina porta-objetos, una pequeña porción de la materia fecal emulsionada en una gota de solución salina 0,85% estéril para poder visualizar la morfología de protozoarios y huevos de helmintos, así como también cualquier alteración en la flora bacteriana y estructuras como levaduras, eritrocitos, cristales de Charcot Leyden, celulosas, etc. También se utilizó azul de metileno, que permitió observar la presencia de leucocitos fecales; y lugol para observar y definir las características morfológicas de los protozoarios que pudieran estar presentes (Fischbach, 1997; Koneman *et al.*, 1999).

Coprocultivo

Las muestras fecales fueron inoculadas en los medios selectivos diferenciales: agar McConkey (AMCK), agar *Salmonella Shigella* (ASS) y agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (AXLD), previamente identificados con el código establecido para cada paciente. La siembra se realizó colocando un inóculo de la muestra de heces, de forma circular, con un hisopo estéril, en un extremo superior de la placa del AMCK, ASS y AXLD, rotando el hisopo con movimientos suaves; luego se diseminó con un asa calibrada aplicando la técnica de aislamiento por diseminación. Una vez realizada la siembra dichos medios fueron incubados a una temperatura de 35°C, por un periodo de 18 a 24 horas en aerobiosis. Simultáneamente, se sembró en caldo de enriquecimiento selenito cisteína, que favorece el desarrollo de microorganismos potencialmente patógenos y contiene sustancias que inhiben la flora nativa;

incubándose a 35°C, por un periodo de 18 horas y resembrándose en los agares AMCK y ASS (Koneman *et al.*, 1999).

Después de cumplirse el período de incubación de los diferentes medios de cultivo, se procedió a describir las características macroscópicas de las colonias. En el AMCK se observó la fermentación o no de la lactosa por parte de los microorganismos aislados. Las colonias presuntivas del género *Shigella* cuando son pequeñas, transparentes (lactosa negativa), redondas, convexas, con bordes estriados y consistencia gomosa; mientras que las colonias presuntivas del género *Salmonella* son pequeñas e incoloras (lactosa negativa). El medio ASS se usó para diferenciar las colonias lactosa positiva de las colonias lactosa negativa y la producción de ácido sulfhídrico, ya que el tiosulfato con iones de hierro presentes permite la formación de sulfuro y el consiguiente ennegrecimiento de las colonias. Las colonias pequeñas, incoloras (lactosa negativa), redondas, convexas y consistencia gomosa, fueron clasificadas como del género *Shigella* y colonias pequeñas, incoloras (lactosa negativa) con el centro negro fueron clasificadas como del género *Salmonella*. El AXLD permite evidenciar la degradación a ácido de la xilosa, lactosa y sacarosa, produciendo un viraje a amarillo del rojo fenol. El tiosulfato y la sal de hierro revelan la formación de ácido sulfhídrico por la precipitación de sulfato de hierro en las colonias; las bacterias que descarboxilan la lisina se reconocen por la presencia de un color rojo púrpura debido al aumento del pH alrededor de sus colonias. Las colonias del género *Shigella* son pequeñas e incoloras, mientras que las colonias pertenecientes al género *Salmonella* son pequeñas de color rosado con el centro negro debido a la producción de ácido sulfhídrico (fermentación positiva) (Koneman *et al.*, 1999).

Identificación Bioquímica

Las colonias que presentaron un diagnóstico presuntivo para *Salmonella* y *Shigella*, en los medios AMCK, ASS, AXLD se usaron para la identificación bioquímica (McFaddin, 2003). El procedimiento fue el siguiente: inoculación de un pool de 5 colonias en 5 tubos identificados con el código de la muestra, que contenían 3,5 ml de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI), se incubaron a 35°C en

aerobiosis durante 10 minutos. A partir de éstos tubos se realizaron las pruebas bioquímicas que se detallan a continuación.

Fermentación de azúcares en agar Kligler: esta prueba permite observar la capacidad de los microorganismos de fermentar la glucosa, lactosa, producción de gas y producción de ácido sulfhídrico. En éste agar, algunos microorganismos pueden degradar ambos carbohidratos, otros sólo la glucosa y algunos no son capaces de degradar ninguno de ellos. Cuando la bacteria fermenta solamente la glucosa, la baja concentración de ésta se consume por completo y el microorganismo comienza a utilizar las peptonas, cuyo catabolismo produce NH_3 que neutraliza el pH en el pico de flauta, permaneciendo de color rojo, y se forman productos terminales ácidos dando un color amarillo en el fondo del agar. Si la bacteria es capaz de fermentar tanto lactosa como glucosa, se produce gran cantidad de ácidos que no se neutralizan rápidamente por el catabolismo de las peptonas, y, por lo tanto el medio cambia de color amarillo. La producción de H_2S se evidenció mediante la presencia en el medio de indicadores como una sal de hierro (citrato férrico de amonio o sulfato ferroso) y el tiosulfato de sodio, formándose un precipitado de color negro. También se observó la presencia de gas, generalmente estos gases están constituidos por H_2 y CO_2 , producto de la degradación completa de los carbohidratos.

Presencia de la enzima citocromo oxidasa: para esta prueba, se sembró una placa de agar nutritivo a partir de cada caldo BHI; la cual fue incubada a 35°C , por 24 horas en aerobiosis y posteriormente se aplicó la prueba que consistió en el procedimiento indirecto con tira de papel de filtro Whatman N° 2, en el cual se agregó 2 gotas del reactivo tetrametil-*p*-fenilendiamina y luego se colocó una colonia con aplicador de madera sobre el papel. Las cepas de enterobacterias deben resultar oxidasa negativa. Las colonias bacterianas que presentaron actividad de citocromo oxidasa desarrollaron un color púrpura en el sitio de inoculación en 10 segundos.

Utilización del citrato: el principio de la prueba es determinar la capacidad de una bacteria para usar citrato de sodio como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento. El indicador es azul de bromotimol, que es amarillo a un pH menor de 6, y azul a un pH mayor de 7,6; una prueba positiva se presenta por la aparición de un color azul oscuro en un periodo entre 24 y 48 horas o la presencia de crecimiento en el tubo.

Hidrólisis de urea en medio de Christensen: los microorganismos que poseen la enzima ureasa hidrolizan la urea, con lo cual se libera amonio y se produce un cambio de color rosado-rojo en el medio por la porción inclinada del agar; al comienzo la superficie inclinada se pone roja porque la reacción alcalina, que resulta de dispersión de pequeñas cantidades de urea, que aumenta por las aminas formadas, provenientes de la descarboxilación oxidativa de los aminoácidos en la región del medio expuesta al aire.

Desaminación de la fenilalanina: la fenilalanina es un aminoácido que por desaminación forma un cetoácido, el ácido fenilpirúvico. La prueba depende de la detección de ácido fenilpirúvico en el medio de prueba después del crecimiento del microorganismo en estudio. La prueba es positiva por la aparición de un color verde al agregar una solución de cloruro férrico al 10%.

Prueba de indol: las bacterias que poseen la enzima triptofanasa pueden clivar el triptófano, y de este modo producir indol, ácido pirúvico y amonio. El indol puede detectarse en un medio triptófano mediante la observación del desarrollo de color rojo después de agregar un revelador que contiene p-dimetilaminobenzaldehído como el reactivo de Kovac.

Prueba de rojo de metilo: proporciona características valiosas para la identificación de especies bacterianas que producen ácidos fuertes a partir de la glucosa. Después de 18 horas de incubación en un medio que contiene peptona, fosfato monobásico y glucosa, a 35°C, se agregaron una o dos gotas de reactivo rojo de metilo, el desarrollo de color rojo indicó prueba positiva.

Descarboxilación de lisina, arginina, ornitina: las enzimas descarboxilasas remueven una molécula de dióxido de carbono de un aminoácido para formar aminas reactivas alcalinas, basado en la detección de un cambio de pH alcalino en el medio de prueba y el desarrollo de color azul púrpura después de la incubación del microorganismo.

Utilización de malonato: determina la capacidad de un organismo de utilizar malonato de sodio como única fuente de carbono y se detecta con la presencia de un medio alcalino. Cuando la bacteria usa el malonato de sodio, utiliza también el sulfato de amonio presente en el medio como fuente de

nitrógeno, formándose hidróxido de sodio que alcaliniza el medio y produce viraje del indicador azul bromotimol.

Diagnóstico molecular de *Salmonella* y *Shigella*

Extracción de ADN:

La extracción de ADN se realizó a partir de cepas identificadas bioquímicamente como *Salmonella* y *Shigella* cultivadas en caldo BHI por 24 horas a 35°C en aerobiosis. Adicionalmente se seleccionaron 30 muestras de heces analizadas por coprocultivos donde se aislaron cepas bacterianas diferentes a *Salmonella* y *Shigella* y 46 muestras de heces negativas por coprocultivo. Para ello se utilizó el Kit de Purificación de ADN Wizard Genomic (Promega), realizando el protocolo según las especificaciones del fabricante que se detallan a continuación:

Se resuspendieron 600 µl del cultivo en BHI en 6 ml de agua destilada esterilizada, se centrifugó a 5 000 g, descartándose el sobrenadante. Se agregó a la suspensión de células 450 µl de solución de lisis de núcleo y se mezcló suavemente, luego se incubó a 80°C por 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente por otros 5 minutos; una vez enfriado se añadieron 150 µl de solución precipitante de proteínas y se mezcló bien en un vórtex por 20 segundos, se incubó en hielo por 5 minutos, posteriormente se centrifugó a máxima velocidad (20 000 g) por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido cuidadosamente colocándose en un eppendorf limpio que contenía 600 µl de isopropanol, se mezcló bien, lentamente, colocándose en la centrifuga a máxima velocidad (20 000 g) por 15 minutos a 4°C; al terminar se decantó el sobrenadante y se agregaron 600 µl de etanol al 70%, centrifugando nuevamente a máxima velocidad (20 000 g) por 3 minutos, se decantó el sobrenadante y se secó a 37°C durante 10 minutos. Posterior al secado, se resuspendió el precipitado en 100 µl de solución de rehidratación del ADN e incubó a temperatura ambiente durante 24 horas, para luego guardarlo a -20°C hasta su uso.

Diez microlitros del ADN rehidratado se utilizaron para la electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando como solución electrolítica buffer TBE 1X (Tris a 89 mmol/l, ácido bórico a 89 mmol/l y EDTA a 2 mmol/l) y bromuro de etidio 0,05 µg/ml, en el cual se inocularon las muestras. Además se corrió un marcador de peso molecular de 1 Kb para verificar el tamaño y concentración del ADN extraído. La corrida electroforética se llevó a cabo en 30 minutos, a un voltaje de 100 V, utilizando

como vehículo de transmisión de corriente TBE 1X. Los colorantes azul de bromofenol y xileno xianol fueron utilizados como indicadores de la corrida. Una vez concluida la electroforesis, se sacó el gel de la cámara y se procedió a evaluarlo en un transluminador de luz UV.

PCR para la Identificación de *Salmonella*.

Para la identificación de cepas pertenecientes al género *Salmonella* se utilizaron pares de oligonucleótidos que amplificaron los genes *invA* e *invE*, que son específicos para cepas patógenas de este género y codifican proteínas necesarias para la invasión de las células epiteliales (Stone *et al.*, 1994). La secuencia de los oligonucleótidos fue: *invE* GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCA y *invA* TCATCGCACCGTCAAAGGAACC,

que amplifican un producto de 457 pares de bases, específico de todas las cepas de este género.

Aquellas cepas que resultaron positivas al gen *invE/invA* de *Salmonella*, fueron utilizadas para amplificar el gen *sefA*, específico para cepas de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (Oliveira *et al.*, 2002), el cual codifica una proteína componente de las fimbrias que juega un rol crítico en la adherencia a la superficie celular epitelial (Edwards *et al.*, 2000). La secuencia de los oligonucleótidos fue: *sefAF* GATACTGCTGAACGTAGAAGG y *sefAR* GCGTAAATCAGCATCTGCAGTAGC, que amplifican un fragmento de 488 pares de bases.

Además, las mismas cepas se utilizaron para amplificar un fragmento de 620 pb del gen *fliC* (flagelina), con secuencias específicas a cepas de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurim (Oliveira *et al.*, 2002), el cual codificó una proteína componente del flagelo que juega un papel en la patogenicidad de estas cepas. La secuencia de los oligonucleótidos fue: *fliCF* 5' CGG TGT TGC CCA GGT TGG TAA T 3' y *fliCR* 5' ACT GGT AAA GAT GGC T 3' (Soumet *et al.*, 1999).

Para la amplificación por PCR, se utilizó un volumen final de 25 µl que contenía buffer (10 mmol/l TRIS-HCl, pH 8,3, 1,5 mmol/l MgCl₂), 100 µmol de cada desoxirribonucleósido trifosfato, 1,0 µmol de cada uno de los oligonucleótido y 1 U de *taq* ADN polimerasa. La amplificación se realizó en un termociclador, programado de la siguiente manera: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos (1 ciclo consistió de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C), con una extensión final por 10 minutos a 72°C. Se visualizaron los productos amplificados

electroforéticamente en un gel de 2% de agarosa teñidos con bromuro de etidio, visualizados en un transiluminador de luz UV y fotografiados con una cámara digital (Stone *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2002).

Amplificación por PCR para la Identificación de *Shigella*.

Para la amplificación de *Shigella* sp. se aplicó una PCR, utilizando un par de primers que amplifican un gen de virulencia plasmídico (*virA*) implicados en la invasión y diseminación intercelular, presente en todas las cepas de *Shigella* sp. y *E. coli* enteroinvasiva. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados fue: *virA* F 5'-CTG CAT TCT GGC AAT CTC TTC ACA TC-3' y *virA* R 5'-TGA TGA GCT AAC TTC GTA AGC CCT CC-3', amplificando un producto final de 215 pares de bases (Villalobo y Torres, 1998).

Para la amplificación por PCR, se usó un buffer con un volumen final de 25 ml (10 mmol/l TRIS-HCl, pH 8,3, 2,5 mmol l⁻¹ MgCl₂), 0,2 mmol de cada desoxirribonucleósido trifosfato, 0,5 μmol de cada uno de los oligonucleótidos y 1,25 U de *taq* ADN polimerasa. La amplificación se realizó en un termociclador, programado de la siguiente manera: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos (1 ciclo consistió de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 63°C y 1 minuto a 72°C), con una extensión final por 10 minutos a 72°C. Se visualizaron los productos amplificados electroforéticamente en un gel de 2% de agarosa teñidos con bromuro de etidio que posteriormente se visualizó en un transiluminador de luz UV y fotografiados con una cámara digital (Villalobo y Torres, 1998).

Controles

El control de calidad para la identificación bioquímica y sus diferentes pruebas, se realizó a través del uso de cepas control de *E. coli* de la Colección Americana de Cultivos Tipo número 25922 (American Type Culture Collection ATCC) (CVCM 765) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (CVCM 787), provenientes del Centro Venezolano de Colecciones Microbiológicas (CVCM), éstas cepas están ampliamente identificadas, caracterizadas y certificadas (Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI, 2005; CVCM, 2000). Igualmente a cada medio y prueba bioquímica se le realizó su control de calidad respectivo.

Para la optimización y el control de calidad en la amplificación de los fragmentos de PCR, se utilizaron las cepas certificadas CVCM: *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi del Center for Disease Control, CDC 11 (CVCM 495), *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis CDC57 (CVCM 497), *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium CDC64 (CVCM 489), *Shigella flexneri* de la American Type Culture Collection, ATCC29903 (CVCM 634) y *E. coli* ATCC25922 (CVCM 765) (CVCM, 2000).

Análisis de los Datos

Los resultados se presentan en tablas de frecuencia (Lestón y Jonson, 1990).

RESULTADOS

Al evaluar 330 individuos con Síndrome Diarreico Agudo (SDA) y 30 individuos controles de diferentes edades y ambos sexos provenientes de diferentes centros asistenciales de la ciudad de Cumaná, se observó que de acuerdo al sexo, ambos grupos presentaron un predominio del sexo femenino (53%) (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de individuos con síndrome diarreico agudo e individuos controles de acuerdo al sexo en diferentes centros asistenciales de Cumaná, estado Sucre.

SEXO	Individuos SDA	Individuos Controles
Femenino	175 (53,03%)	16 (53,33%)
Masculino	155 (46,97%)	14 (46,67%)
Total	330 (100%)	30 (100%)

SDA: Síndrome Diarreico Agudo

En relación a la edad de los individuos con SDA, se observó que la mayor frecuencia estuvo en el grupo de 0-2 años de edad (39,39%), seguido del grupo de 9-10 años (20,61%) (Tabla 2), pero en el grupo de individuos controles la mayor frecuencia se observaron en los grupos de 5-6 y 9-10 años (30% cada uno).

En el análisis bacteriológico realizado en las muestras de heces de ambos grupos de estudio, se encontró una elevada frecuencia de coprocultivos positivos (Tabla 3) en los individuos con SDA (65,15%). Además, hay que destacar que el grupo control arrojó una frecuencia importante de coprocultivos positivos (46,67%). De las enterobacterias identificadas *E. coli* fue la más frecuente en ambos grupos de estudio. En el grupo de individuos que presentaron SDA, se encontraron 16 casos de infección por *Shigella* sp. (4,85%) y 14 de *Salmonella* sp. (4,24%) (Tabla 3, ver Anexos). Por otro lado es importante resaltar el hallazgo en el grupo de individuos controles de especies de *Proteus* sp. y *Klebsiella* sp, ya que estos individuos no refirieron presentar ningún

Tabla 2. Frecuencia de individuos con síndrome diarreico agudo e individuos controles de acuerdo a los grupos de edad evaluados, en diferentes centros asistenciales de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

Edad (años)	Individuos SDA		Individuos Controles	
	Nº	%	Nº	%
0-2	130	39,39	3	10,00
3-4	50	15,15	5	16,67
5-6	34	10,30	9	30,00
7-8	29	8,79	4	13,33
9-10	68	20,61	9	30,00
>10	19	5,76	0	0
TOTAL	330	100	30	100

SDA: Síndrome Diarreico Agudo

Tabla 3. Frecuencia de enterobacterias aisladas en coprocultivos de individuos con síndrome diarreico agudo e individuos controles, provenientes de diferentes centros asistenciales de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

BACTERIAS AISLADAS	Individuos con síndrome diarreico agudo		Individuos controles	
	Nº	Frecuencia %	Nº	Frecuencia %
<i>Escherichia coli</i>	85	25,76	6	20,00
<i>Proteus sp.</i>	27	8,18	6	20,00
<i>Shigella sp.</i>	16	4,85	0	0
<i>Salmonella sp.</i>	14	4,24	0	0
<i>Klebsiella sp.</i>	24	7,27	1	3,33
<i>Citrobacter sp.</i>	25	7,58	0	0
OTRAS	28	8,48	6	20,00
TOTAL	219	65,15	14	46,67

Otras: *Escherichia vulneris*, *E. fergusonii*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomona sp.*, *Pantoea agglomerans*, *Morganella morganii*, *Campylobacter sp.*, *Aeromonas sp.*, *Providencia sp.*, *Yersinia sp.* and *Serratia liquefaciens*.

Tabla 4. Frecuencia de infecciones por *Salmonella* y *Shigella* en personas con síndrome diarreico agudo de acuerdo al sexo en la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

ESPECIE	SEXO				TOTAL	
	FEMENINO		MASCULINO		Nº	%
	Nº	%	Nº	%		
<i>Salmonella</i>	7	50,00	7	50,00	14	100

<i>Shigella</i>	9	56,25	7	43,75	16	100
-----------------	---	-------	---	-------	----	-----

tipo de sintomatología gastrointestinal al momento de su evaluación.

Al evaluar las infecciones por *Salmonella* de acuerdo al sexo, estas estuvieron distribuidas en igual frecuencia (Tabla 4), mientras que en las infecciones por *Shigella* se observó una mayor frecuencia de aislamiento de las mismas en el sexo femenino (56,25%). En cuanto a la distribución de casos de *Salmonella* y *Shigella* según la edad, se encontró predominio de *Salmonella* en los grupos de 3-4 y 9-10 años, y de *Shigella* en los grupos de 5-6 y 9-10 años (Tabla 5).

En relación al estudio microscópico con solución salina al 0,85% realizado antes de los cultivos bacteriológicos de las muestras fecales, de los individuos analizados, se encontraron helmintos y protozoarios intestinales en 51,82% de las muestras (Tabla 6). De los protozoarios intestinales patógenos, *Blastocystis hominis* fue el más frecuente (23,64%) en los individuos con síndrome diarreico (Tabla 6), seguido de el complejo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* (14,85%) y *Giardia duodenalis* (6,36%), mientras que en los individuos controles encontramos predominio de *B. hominis* (23,30%) y *Ascaris lumbricoides* (16,60%). Los protozoarios comensales también fueron diagnosticados en los individuos con síndrome diarreico y solo un caso de *Entamoeba coli* y 3 de *Endolimax nana*, fueron encontrados en el grupo control. Cuando evaluamos la presencia de helmintos y protozoarios intestinales con respecto a las infecciones por *Shigella* y *Salmonella* se encontraron dos casos de esta última (14,28%) causando infecciones mixtas con *A. lumbricoides* y *B. hominis*; mientras que en el caso

Tabla 5. Frecuencia de cepas de *Salmonella* y *Shigella* según la edad, aisladas de individuos con síndrome diarreico agudo provenientes de diferentes centros asistenciales de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

Grupos de Edad	<i>Salmonella</i>		<i>Shigella</i>	
	Nº	Frecuencia %	Nº	Frecuencia %
0-2	3	2,71	4	3,08
3-4	4	8,00	1	2,00

5-6	1	2,94	4	11,76
7-8	0	0	0	0
9-10	6	8,82	7	10,29
>10	0	0	0	0

SDA: Síndrome Diarreico Agudo

Tabla 6. Frecuencia de helmintos y protozoarios intestinales diagnosticados en individuos con síndrome diarreico agudo e individuos controles provenientes de diferentes centros asistenciales de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

PARÁSITOS	Individuos con SDA		Individuos controles	
	Nº	Frecuencia %	Nº	Frecuencia %
<i>Ascaris lumbricoides</i>	5	1,52	5	16,67
<i>Trichuris trichiura</i>	2	0,61	0	0
<i>E. histolytica/E. dispar</i>	49	14,85	0	0
<i>Blastocystis hominis</i>	78	23,64	7	23,33
<i>Giardia duodenalis</i>	21	6,36	1	3,33
<i>Entamoeba coli</i>	5	1,52	1	3,33
<i>Endolimax nana</i>	15	4,55	3	10,00
<i>Chilomastix mesnilli</i>	2	0,61	0	0
Negativas	159	48,18	20	66,67

SDA: Síndrome Diarreico Agudo

de las infecciones por *Shigella* se observaron 4 casos (25%) de infecciones mixtas con *B. hominis* y el complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar*.

Figura 2. Optimización del diagnóstico molecular por PCR de *Shigella* empleando una cepa de *Shigella flexneri* (CVC634). Pozo 1: Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega), Pozo 2: Control negativo y Pozos 3, 4, 5 y 6: amplificados de la cepa control aislada a partir de caldos de cultivo BHI y Selenito y amplificados a partir de muestras de ADN no diluidas o diluidas (1:10). Se utilizó también a la cepa *E. coli* (CVC675) como control negativo.

La amplificación del gen *invA/invE*, produjo amplificadores característicos en las 14 cepas identificadas como del género *Salmonella*, aisladas de las muestras de heces de los individuos con SDA y purificadas a partir del BHI (Figura 3A). Posteriormente, aquellas cepas que resultaron positivas al gen *invA/invE* de *Salmonella*, fueron utilizadas para amplificar un fragmento de 620 pares de bases del gen *sefA*, específico para cepas de *Salmonella* Enteritidis, y un fragmento de 488 pb correspondiente a los genes *fliC* (flagelina) lo cual permitió la identificación de 7 cepas de *Salmonella* Enteritidis y 4 de *Salmonella* Typhimurium, respectivamente (Figuras 3B y C.). Las 3 cepas de *Salmonella* restantes fueron de otros serovares no identificados por la amplificación de estos genes. Se observó que la cepa aislada a partir de la muestra 240 amplificó tres fragmentos en el gen *sefA*, uno de los cuales corresponde al fragmento de 620 pares de bases y los otros dos son de tamaño superior. La amplificación de las muestras obtenidas de los individuos del grupo control no produjo ninguno de los fragmentos esperados para

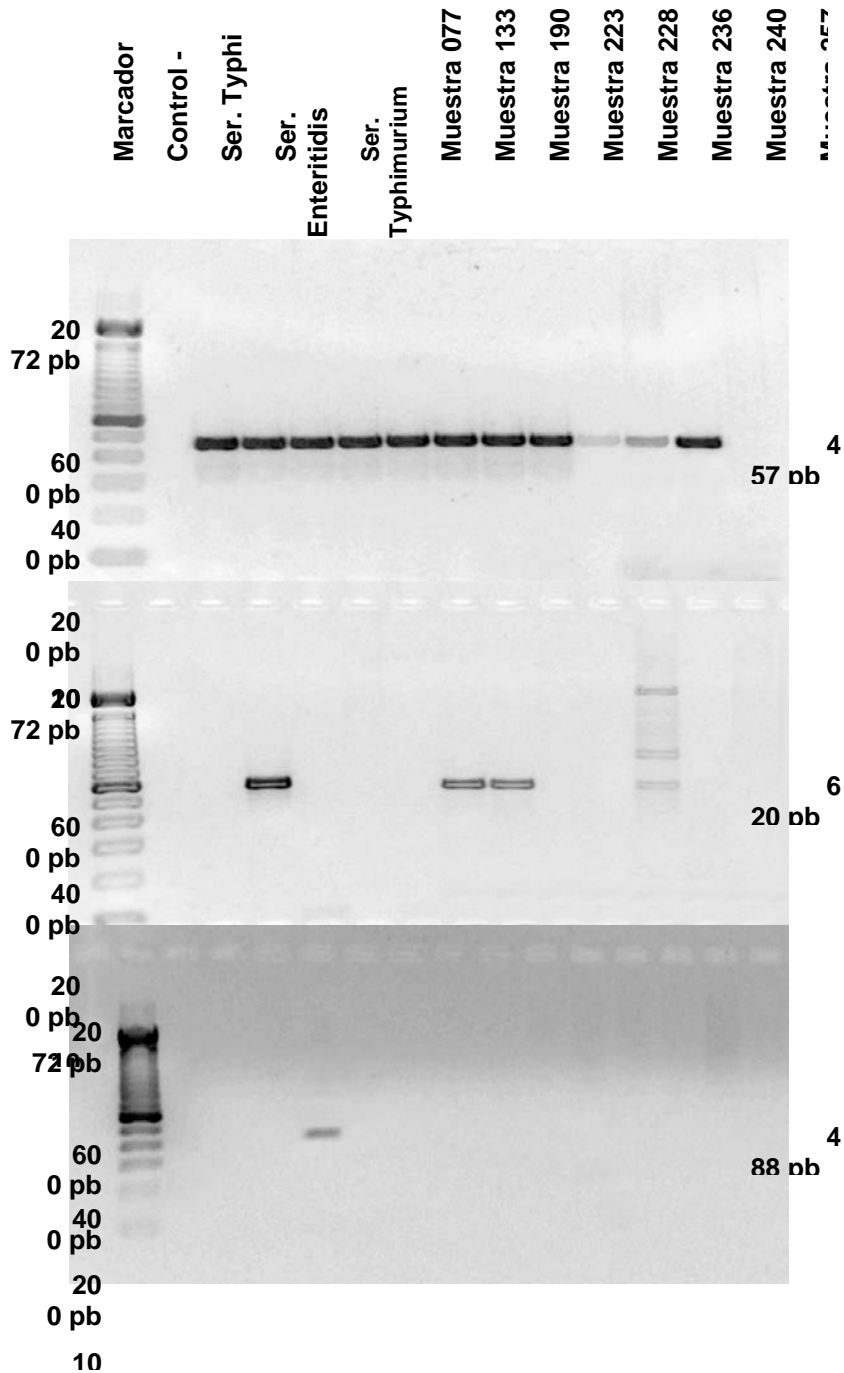


Figura 3. Amplificación por PCR de los genes de *invA/E* (A), *sefA* (B) y *fliC* (C) de cepas controles y muestras analizadas. Se utilizó agua y *E. coli* (CVCM765) como control negativo, *Salmonella* Typhi (CVCM495), *Salmonella* Enteritidis (CVCM 497) y *Salmonella* Typhimurium (CVCM489) como controles positivos.

Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). Muestras: cepas aisladas partir de muestras fecales de individuos con Síndrome diarreico agudo de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

las cepas del género *Salmonella*.

Con respecto a la detección e identificación molecular de las cepas del género *Shigella* utilizando los oligonucleótidos que amplifican los genes *virA*, se obtuvo señal de amplificación (215 pb) en las 16 cepas identificadas como pertenecientes a este género, las cuales fueron purificadas a partir de caldo BHI y aisladas de las muestras de heces de los individuos con SDA (Figura 4). Al igual que en el diagnóstico molecular de *Salmonella*, la amplificación de las muestras obtenidas de los individuos del grupo control, las cepas de especies diferentes a *Salmonella* y *Shigella* aisladas de los individuos con SDA y en las muestras de heces negativas, no se observó la presencia del gen *virA*.

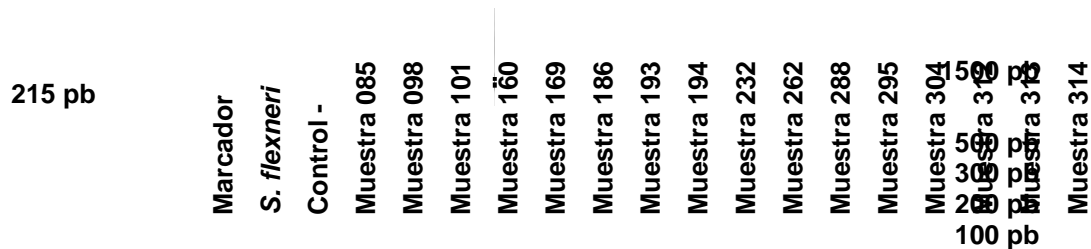


Figura 4. Detección e identificación de *Shigella* por PCR. Se utilizó *S. flexneri* (CVCM 634) como control positivo, y agua como control negativo. Muestras:

cepas aisladasa partir de muestras fecales de individuos con Síndrome diarreico agudo de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, al evaluar 330 individuos con SDA, con respecto a un grupo de individuos controles, se encontró que ambos presentaron predominio del sexo femenino y que los grupos de edad con la mayor frecuencia de SDA fueron los niños de 0-2 y 9-10 años, coincidiendo esto con los reportes de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en 2002 y con los estudios de Urbina y Pequenese (1999), quienes señalan que en Venezuela el síndrome diarreico aparece entre las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil, afectando primordialmente a infantes miembros de familias que habitan en zonas marginales de deficientes condiciones sanitarias y nutricionales. Esto contrasta con los resultados reportados por Viscaya *et al.* (1999), quienes al evaluar la enfermedad diarreica de origen bacteriano en la ciudad de Mérida, en 613 muestras de heces provenientes de niños, encontraron predominio del sexo masculino con 259 casos y 205 del femenino y una mayor frecuencia en niños menores de 2 años. Por su parte, la frecuencia de infecciones bacterianas en Ciudad Bolívar fue más frecuente en niños menores de 2 años y de sexo masculino, cuando se estudiaron 110 niños entre 0 a 5 años (Cermeño *et al.*, 2008).

El análisis bacteriológico realizado en esta investigación arrojó una alta frecuencia de coprocultivos positivos en individuos con SDA (65,15%) y en el grupo de individuos controles (46,67%). En cuanto a las bacterias enteropatógenas identificadas, *E. coli* fue la especie mas frecuente en ambos grupos de estudio. Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que *E. coli* es una bacteria saprófita que habita normalmente el intestino y que sólo en circunstancias muy excepcionales puede provocar enfermedad por la presencia de factores de virulencia (invasividad y producción de toxinas con efectos enterotóxicos). Con respecto a esto, Orlandi *et al.* (2006), en su trabajo realizado en Porto Velho, Brazil, al evaluar 470 niños menores de 6 años para definir la etiología de las infecciones diarreicas, reportan que la bacteria más prevalente fue *E. coli* (18,2%), identificándose un 6,1% de *E. coli* enteropatógena (EPEC) y 0,6% de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

Además, el estudio bacteriológico permitió la identificación de 16 casos de *Shigella* (4,85%) y 14 de *Salmonella* (4,24%) en los individuos con SDA. Estas últimas se encontraron distribuidas en ambos sexos y en los grupos de edad entre 3-4 y 9-10 años; mientras que *Shigella* presentó un predominio en el sexo femenino afectando a los niños entre 5-6 y 9-10 años. Al respecto, Rincón *et al.* (2002), al analizar

366 muestras de heces frescas de niños menores de cinco años con cuadros de diarrea aguda para investigar bacterias enteropatógenas, obtuvieron un porcentaje de positividad de 13,38%. Estos autores encontraron frecuencias de 5,74% (21), 3,28% (12), 2,19% (8) 1,91% (7), 1,37% (5) y 0,27% (1) correspondieron a *Aeromonas*, *Shigella*, *Vibrio*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Plesiomonas*, respectivamente. En cuanto a la determinación de grupos serológicos para el género *Salmonella* ellos aislaron 5 del grupo B, 1 del grupo D y 1 del grupo C2. La incidencia más alta de gastroenteritis causada por enteropatógenos correspondió al grupo de 0-2 años, con 83,33% (45/54) de los casos.

Por otra parte, Viscaya *et al.* (1999) reportan un 42,85% de infecciones por *Shigella* en 464 muestras analizadas en la ciudad de Mérida; mientras que, Hernández y Godoy (2002) reportan un 3,6% de *Shigella* en 5.076 coprocultivos analizados durante 1993-1999 en Ciudad Bolívar, mientras que Cermeño *et al.* (2008) obtuvieron una prevalencia de 0,9% para *Shigella* sp. en niños menores de 5 años con etiología de diarrea aguda. Por otro lado, Albarado *et al.* (2005) en un estudio realizado sobre la asociación de *Salmonella* y *Shigella* con síndrome diarreico agudo en niños menores de seis años de edad de la ciudad de Cumaná, encontraron una frecuencia de estas bacterias de 10,00% y 16,00% respectivamente en un total de 96 muestras fecales analizadas. Estos estudios, al igual que el presente estudio, reportan una alta frecuencia de *Shigella*, lo cual podría deberse a que este microorganismo es el único entre las bacterias patógenas entéricas, que necesita un número pequeño de bacilos (10) para infectar al hombre (Valdespino *et al.*, 1994; Keusch, 1988).

La salmonelosis afecta a todas las edades de la vida, pero con mayor incidencia en lactantes y niños de corta edad (Fisher, 1997). En este sentido, Gil *et al.* (2002), al estudiar 39.697 coprocultivos, reportan la mayor incidencia de *Salmonella* en niños menores de 1 año. En cuanto al sexo, estos investigadores encontraron un ligeramente mayor porcentaje de infectados en el sexo masculino (54,5%) en comparación con el femenino (45,5%).

El estudio de Coria *et al.* (2001) sobre aspectos microbiológicos y epidemiológicos de la gastroenteritis bacteriana aguda les permitieron concluir que la mayor parte de los casos de salmonelosis y shigelosis ocurren en países en desarrollo, con condiciones de vida en hacinamiento, baja higiene personal, falta de servicios básicos y sanitarios, y poco acceso a programas de educación sanitaria y atención preventiva, coincidiendo estas características con las comunidades estudiadas, por lo que es de

esperarse altas frecuencias de infecciones bacterianas gastrointestinales como las encontradas en este estudio.

En los individuos analizados en este estudio, a través del análisis coproparasitológico previo al cultivo bacteriológico, encontramos infecciones por helmintos y protozoarios intestinales (51,82%), siendo *Blastocystis hominis* el protozoario más frecuentemente diagnosticado tanto en los individuos con SDA como en el grupo control, estando los primeros seguidos de *E. histolytica* y/o *E. dispar* y *Giardia duodenalis*, en los individuos con SDA. Sin embargo, cuando se evaluó la presencia de helmintos y protozoarios intestinales con respecto a las infecciones por *Shigella* y *Salmonella* se observaron infecciones mixtas con helmintos y protozoarios intestinales en individuos con síndrome diarreico agudo con frecuencias de 25% y 14,28% respectivamente. Los resultados obtenidos difieren de los de Viscaya *et al.* (1999) quienes reportan un porcentaje menor (6,75%) de infecciones mixtas entre bacterias enteropatógenas de 311 muestras positivas a parásitos enteropatógenos. De igual forma Ogunsanya *et al.* (1994), al evaluar 315 muestras de heces diarreicas en niños menores de 5 años reportan un 59,1% de infecciones bacterianas como únicos agentes causales y un 2,3% de infecciones asociadas con parásitos, mientras que Guderian *et al.* (1987), al evaluar la diarrea aguda asociada a *Campylobacter* y otros agentes patógenos, reportan una frecuencia de bacterias de un 35% y una asociación con parásitos en el 6,73% de las muestras. Por otro lado, Notario *et al.* (1993), al estudiar microorganismos enteropatógenos en niños con diarrea aguda, informan que un 49,9% de los casos fueron positivos a bacterias, de las cuales el 3,6% estuvieron asociados con *Giardia duodenalis*. Estos reportes antes señalados, al igual que los resultados arrojados en esta investigación, demuestran que la mayoría de los casos de diarreas de origen infeccioso en niños es debida principalmente a agentes bacterianos.

Con respecto al diagnóstico molecular de *Salmonella* y *Shigella* por PCR, los resultados de este estudio en individuos con SDA demuestran la utilidad de estas pruebas para la caracterización de estas dos bacterias patógenas, al observar que sólo las cepas aisladas e identificadas como *Salmonella* y *Shigella* por estudio bacteriológico convencional mostraron amplificación de los fragmentos evaluados. Al respecto, muchos autores han señalado que las técnicas basadas en el fenotipo de las bacterias representan herramientas de diagnóstico laboriosas que requieren de varios días para ofrecer un diagnóstico completo, mientras que las herramientas moleculares, como la PCR e hibridación, son las mejores técnicas a usar para la detección e identificación de microorganismos de manera expedita

(Olsen *et al.*, 1995; Hill, 1996, Batt, 1997). En este sentido, Villalobos y Torres (1998), aplicando una combinación de la técnica de PCR con hibridación para la detección del gen *virA* de cepas virulentas de *Shigella* spp. y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), demostraron la alta sensibilidad y especificidad de estas metodologías en cepas puras de cultivos y en muestras de mayonesa comercial contaminadas con *S. dysenteriae*.

De igual forma, la PCR ha demostrado ser una técnica rápida, altamente sensible y específica, usando diferentes protocolos para la detección de *Shigella* en heces (Frankel *et al.*, 1990; Sethabutr *et al.*, 1993; Yavzori *et al.*, 1994; Jafari *et al.*, 2008) y en alimentos (Rafii *et al.*, 1995; Villalobo y Torres, 1998; Warren *et al.*, 2006). Estos protocolos usan iniciadores con secuencias localizadas en un plásmido de invasión presente en *Shigella* y EIEC (Frankel *et al.*, 1990; Yavzori *et al.*, 1994; Farshad *et al.*, 2006), así como también secuencias tanto plasmídicas como cromosomales (Sethabutr *et al.*, 1993; Gómez *et al.*, 2009).

En este trabajo se empleó la secuencia plasmídica del gen *virA*, la cual amplificó específicamente un fragmento de 215 pb presente en las cepas del género *Shigella* y EIEC (Villalobo y Torres, 1998). Sin embargo, Houng *et al.* (1997), utilizando una secuencia IS630, y Kingombe *et al.* (2005), amplificando los genes de virulencia *iuc*, *ipaH*, *ial* y por polimorfismo de longitud de fragmentos por restricción (RFLP), demuestran que los ensayos de PCR permiten distinguir entre *Shigella* y EIEC en muestras fecales.

Con respecto al diagnóstico molecular de *Salmonella*, se ha estandarizado protocolos de multiplex PCR con los mismos genes utilizados en este estudio y otros más, para la identificación de todos los serotipos de este género, así como también para la identificación de *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis en muestras de hisopados ambientales y granjas donde se crían pollos, demostrándose el alcance de la técnica de la PCR para estudios epidemiológicos (Soumet *et al.*, 1999).

Por otro lado, Oliveira *et al.* (2002), al usar la PCR para la detección de cepas de *Salmonella* sp. e identificación de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum y *Salmonella* Typhimurium, en muestras de pollos colectadas en el campo, reportan 100% de especificidad para la detección de *Salmonella* usando los oligonucleótidos que amplifican el gen *invA*. Sin embargo, al usar

los oligonucleótidos que amplifican el gen *fliC* (*S. Typhimurium*) y el gen *sefA* (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*) encontraron que los niveles de detección variaron dependiendo del número de células por especies que se utilizaban. No obstante, la PCR detectó mayor número de positivos en las muestras analizadas, en comparación con la técnica microbiológica empleada.

Los resultados encontrados en esta investigación guardan relación con los reportados por Oliveira *et al.* (2002), con respecto a que la detección de *Salmonella* sp. amplificando la región de *invA*, la cual se logró optimizar obteniendo un amplificado de 457 pb que no generó amplificaciones inespecíficas, ni reacciones cruzadas, al probar amplificarlo en otras especies de enterobacterias aisladas de los individuos con síndrome diarreico agudo, evaluados en este estudio, lo que demuestra alta especificidad. La alta sensibilidad de la técnica empleada se demostró al evidenciar señal de amplificación únicamente en las muestras donde estaba presente cepas del género *Salmonella*.

Los aislados de *Salmonella* son clasificados tradicionalmente por serotipificación o identificación serológica de dos antígenos de superficie: el polisacárido-O y la proteína flagelina. Estas pruebas tienen utilidad epidemiológica, sin embargo, la dificultad para la producción de antisueros, permitió el desarrollo de marcadores moleculares que ayudaran en la identificación del serotipo de *Salmonella* presente en una muestra biológica. En este sentido, la secuencia del antígeno flagelar del gen *fli* (secuencias *fliC*, *fliB* y *fliA*) utilizado en este estudio, ha sido empleada como blanco molecular para determinar el tipo de antígeno flagelar presente en una cepa por presentar una secuencia conservada, con heterogeneidad entre los alelos que codifican diferentes antígenos flagelares (McQuiston *et al.*, 2004).

En la actualidad se han desarrollado técnicas de PCR más avanzadas como la PCR tiempo real para la detección directa de *S. flexneri* y *Salmonella Typhimurium* en muestras de heces humanas, determinándose el límite de detección de esta técnica molecular en 1×10^4 ufc/g de heces para *S. flexneri* y 2×10^4 unidades formadoras de colonias (UFC)/g de heces para *S. Typhimurium*, demostrándose que la PCR tiempo real es una técnica rápida, sensible y específica para la detección simultánea de estas dos especies (Yang *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

La frecuencia de aislamiento de cepas de *Salmonella* y *Shigella* en personas con síndrome diarreico agudo es relativamente alta y representan un problema de salud para las comunidades.

Se observó total coincidencia entre la detección de cepas de *Salmonella* y *Shigella* por métodos microbiológicos clásicos y métodos moleculares.

Los métodos moleculares representan una alternativa como pruebas complementarias al diagnóstico microbiológico convencional para la identificación y caracterización de los factores de virulencia

BIBLIOGRAFÍA

- Albarado, L.; Guzman, Y.; Guzman M. y Betancourt, J. 2005. *Salmonella spp* y *Shigella spp*. Asociados con síndrome diarreico agudo en niños menores de seis años de edad. *Kasmera*, 33 (2): 132-141.
- Acuña, W. y Guevara, J. 2002. Infeccion por *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Revista de facultad de medicina humana* 3 (1): 38-41.
- Araque, Y. y Bastardo, J. 1999. Estudio bacteriológico de la diarrea aguda infantil en Cumaná, estado Sucre. *Saber*, 11 (1): 45-50.
- Basualdo, W.; Van Allende, I.; Cabrera, T. y Arbo-Sosa, A. 2001. Estudio de brote de diarrea disintérica por *Shigella sp*. en una comunidad rural. *Archivos de Pediatría Uruguay*, 72 (1): 65-71.
- Batt, C. 1997. Molecular diagnostic for dairy-borne pathogens. *Journal of Dairy Science*, 80: 220-229.
- Bluf, A.; León, E.; Roman, J.; Chanqueo, L. y Garcia, P. 2005. Evaluación del rendimiento del coprocultivo en pacientes hospitalizados. *Revista Chilena de Infectología*, 22 (1): 58-62.
- Brenner, D.; Fanning, G.; Miklos, G. y Steigerwalt, A. 1973. Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. *International Journal of Systematics Bacteriology*, 23: 1-7.
- Brenner, D.; Steigerwalt, A.; Wathen, H.; Gross, R. y Rowe, B. 1982. Confirmation of aerogenic strains of *Shigella boydii* 13 and further study of *Shigella* serotypes by DNA relatedness. *Journal of Clinical Microbiology*, 16: 432-436.
- Cermeño, J.; Hernández, I.; Camaripano, M.; Medina, N.; Guevara, A. y Hernández, C. 2008. Etiología de diarrea aguda en niños menores de 5 años Ciudad Bolívar, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 28: 55-60.
- Chamberlain, A. y Johal, S. 1988. Biofilms on meat processing surfaces. In: Houghton, D.R., Smith, R.N., Eiggins, H.O.W. (eds.) *Biodeterioration* 7. Elsevier Applied Science. 57-61.
- CIOMS (Council for International Organizations of Medical Sciences). 2002. *International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects*. CIOMS, Ginebra, Suiza.
- Coria, J.; Villapando, S.; Gomez, D.; y Treviño, A. 2001. Aspectos microbiológicos y epidemiológicos para el uso racional de antibióticos en niños con gastroenteritis bacteriana aguda. *Revista Mexicana de pediatría*, 68 (5): 200-215.
- Centro Venezolano de Colecciones Microbiológicas (CVCM) 2000. *Catálogo del Centro Venezolano de Colecciones Microbiológicas*. Instituto de Biología Experimental. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) / NCCLS. 2005. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement*. Document M100 – S15. Estados Unidos de Norteamérica. USA.

De Medici, D.; Pezzotti, G. y Marfoglia, D. 1998. Comparison between ICS-VIDAS, MSRV and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat. *International Journal Food Microbiology*, 45: 205-210.

Doyle, M. y Erickson, M. C. 2006. Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poultry Science*, 85:960–973.

Durango, J.; Arrieta, G. y Mattar, S. 2004. Presencia de *Salmonella* spp. en un área del Caribe colombiano: un riesgo para la salud pública. *Biomédica*, 24: 89-96.

Edwards, R.; Spchifferli, D. y Maloy, S. 2000. A role for *Salmonella* fimbriae in intra peritoneal infections. *American Society Tropical Medic Hygienic*, 97 (3): 1258-1262.

Fang, Q.; Brockmann, S. y Botzenhart, K. 2003. Improved detection of *Salmonella* sp. in foods by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA probes: a comparison with conventional cultural methods. *Journal Food Protection*, 66: 723-731.

Farshad, S.; Sheikhi, R.; Japoni, A.; Basiri, E. y Alborzi, A. 2006. Characterization of *Shigella* strains in Iran by plasmid profile analysis and PCR amplification of ipa genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8): 2879-2883.

Ferreccio, C.; Prado, V. y Ojeda, A. 1991. Epidemiologic patterns of acute diarrhea and endemic *Shigella* infections in children in a poor periurban setting in Santiago, Chile. *American Journal of Epidemiology*, 134: 614-27.

Fischbach, F. 1997. *Manual de pruebas diagnósticas*. Editorial McGraw-Hill Interamericana de México.

Fisher, J. 1997. Records a resurgence in *Salmonella enteritidis* infection through the European union. *Eurosurveillance Weekly*, 1: 24-26.

Frankel, G.; Riley, L. y Giron, J. 1990. Detection de *Shigella* in feces using DNA amplification. *Journal of Infectious Diseases*, 161: 1252-1256.

Gil, A.; Mazón, A.; Martín, C.; Urtiaga, M y Inza, E. 2002. Salmonelosis no tifoidea en un área de salud de Navarra, España. *Revista Especial Salud Publica*, 76: 49-56.

Gillespie, I.; O'Brien, S.; Adak, G.; Ward, L. y Smith, H. 2005. Foodborne general outbreaks of *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection, England and Wales, 1992-2002: where are the risks? *Epidemiology Infection*, 133: 795-801.

Gómez, J.; Bermúdez, L.; Tamez, R.; Adame, J. y Luna, R. 2002. Producción y purificación de la

taq DNA polimerasa a partir de *E. coli* recombinante. *Ciencia UANL*, 5 (3): 316-321.

Gomez, O.; Bai, J y Newell, E. 2008. Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella ssp.*, *Shigella ssp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *campylobacter ssp.* Enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction. *Diagnostic microbiology and infectious diseases*. 63 (1): 1-9

González, M.; Navarro, P. y Riera, I. 1997. Diarreas bacterianas en el hospital universitario de Caracas. *Boletín Venezolano de Infectología*, 7 (1): 19-20.

Guderian, E.; Ordoñez, G. y Bossano, R. 1987. Diarrea aguda asociada a *Campilobacter* y otros agentes patógenos en Quito, Ecuador. *Boletín de Sanidad Panamericana*, 102 (4): 333-339.

Hernández, I. y Godoy, G. 2002. *Shigella* sp. aisladas en Ciudad Bolivar. Prevalencia y su sensibilidad a los antimicrobianos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22: 22-26.

Hill, W. 1996. The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. *Critical Reviews in Foot Science and Nutrition*, 36: 123-173.

Houng, H.; Sethabutr, O. y Echeverria, P. 1997. A simple polymerase chain reaction technique to detect and differentiate *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* in human feces. *Diagostic Microbiology and Infection Disease*, 28: 19-25.

Jafari, F.; Shokrzadeh, L.; Hamidian, M.; Salmanzadeh, A. y Zali, M. 2008. Acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in patients at hospitals in Tehran. *Japanese journals of infectious diseases*, 61(4): 269-273.

Kauffmann F. 1966. *The bacteriology of Enterobacteriaceae*. Copenhagen: Munksgaard.

Keusch, G. 1988. Infecciones por *Shigella*. En: Torregusa L, Olarte J, Rodríguez R, Santos J, Velázquez L, eds. *Enfermedades diarreicas en el niño*. 9 ed. México D.F.: Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", 157 pp.

Keusch, G. y Bennish, M. 1989. Shigellosis: recent progress, persisting problems and research issues. *Pediatric Infection Disease Journal*, 8: 713-9.

Kingombe, C.; Cerqueira-Campos, M. y Farber, J. 2005. Molecular strategies for the detection, identification, and differentiation between enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Journal of Food Protection*, 68(2):239-245.

Koneman, E.; Allen, S.; Janda, W.; Schreckenberger, P. y Winn, W. 1999. *Diagnóstico Microbilógico*. 5^{ta} Edición. Editorial Panamericana. Argentina.

Kopecko, D.; Holcombe, J. y Formal, S. 1979. Molecular characterization of plasmids from virulent and spontaneously occurring avirulent colonial variants of *Shigella flexneri*. *Infection Immunology*, 24: 580-582.

Kotloff, K.; Winickoff, J.; Ivanoff, B.; Clemens, J.; Swerdlow, D.; Sansonetti, P.; Adak, G. y Levine, M. 1999. Carga mundial de infecciones por *Shigella*: implicaciones para el desarrollo de vacunas y la aplicación de estrategias de control. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (8): 651-666.

Lee, T.; Chang, C.; Chang, L.; Chen, W.; Wang, T. y Chang, S. 2000. One predominant type of genetically closely related *Shigella sonnei* prevalent in four sequential outbreaks in school children. *Diagnostic Microbiology Infection Disease*, 45: 173-181.

Le Minor, L. y Popoff, M. 1987. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., norn. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*. *International. Journal. Systems Bacteriology*, 37(4):465-468.

Lestón, R. y Jonson, W. 1990. *Principios de bioestadística*. Editorial El Manual Moderno. S.A. de C.V. México D.F.

Liu, P.; Lau, Y.; Hu, B.; Shyr, J.; Shi, Z. y Tsai, W. 1995. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. *Journal Clinical Microbiology*, 33: 1779-1783.

MacFaddin, J. 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Massoc, A. 2008. Enfermedades asociadas a los alimentos. *Revista Chilena de Infectología* 25 (5): 395-397.

McQuiston, J.; Parrenas, R.; Ortiz-Rivera, M.; Gheesling, L.; Brenner, F. y Fields, P. 2004. Secuencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fljB* and *flpA* from *Salmonella*. *Journal Clinical Microbiology*, 42 (5): 1923-1932.

Murray, P.; Kobayashi, G.; Pfalle, M. y Rosenthal, K. 1999. *Microbiología Médica*. 2^{da} Edición. Editorial Harcourt Brace. USA.

Navia, M.; Capitano, L.; Ruiz, J.; Vargas, M.; Urassa, H. y Schelleberg, D. 1999. Typing and characterization of mechanisms of resistance of *Shigella spp.* isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. *Journal Clinical Microbiology*, 37: 3113-3117.

Nordentoft, S.; Christensen, H. y Wegener, H. 1997. Evaluation of a fluorescence-labelled oligonucleotide probe targeting 23S rRNA for *in situ* detection of *Salmonella* serovars in paraffin-embedded tissue sections and their rapid identification in bacterial smears. *Journal Clinical Microbiology*, 35: 2642-2648.

Notario, R.; Morales, E.; Carmelengo, N.; Binsztein, N.; Depretis, A. y Gambante, T. 1993. Microorganismos enteropatógenos en niños con diarrea aguda en dos hospitales de Rosario, Argentina. *Medicina*, 53: 289-299.

Ogunsanya, P.; Otimi, V. y Adenuga, A. 1994. A study of the etiological agents of childhood

diarrhoea in Lagos, Nigeria. *Journal of medical microbiology*, 40:10-14.

Ohl, M. y Miller, S. 2001. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, 52: 259-74.

Oliveira, K.; Oliveira, T.; Teixeira, P.; Azeredo, J. y Oliveira, R. 2007. Adhesion of *Salmonella* enteritidis to stainless steel surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 318-323.

Oliveira, S.; Santos, L.; Schuch, D.; Silva, A.; Sallr, S. y Canal, C. 2002. Detection and identification of *Salmonella* from poultry-related samples by PCR. *Veterinary Microbiology*, 87: 25-35.

Olsen, J.; Aabo, S.; Hill, W.; Notermans, K.; Wernars, P.; Granum, P.; Popovic, T.; Rasmussen, H. y Olsvik, O. 1995. Probes and polymerase chain reaction for detection of foot-borne bacterial pathogens. *International Journal Foot Microbiology*, 28: 1-78.

Organización Panamericana de la Salud. 1999. *En Venezuela la diarrea es la segunda causa de mortalidad en niños menores de 4 años*. Oficina Sanitaria. Panamericana. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Comunicados de Prensa.

Organización Panamericana de la Salud. 2002. *Análisis de Salud- Datos de Salud de Países- Venezuela*. En: <http://165.158.1.110/spanish/prfflven.html>. Acceso 01 Diciembre 2005.

Orlandi, P.; Magalhaes, G.; Matos, N.; Silva, T.; Penatti, M.; Nogueira, P. y Silva, L. 2006. Etiology of diarrheal infections in children of porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39 (4): 507-17.

Orsi, R.; Sforcin, J.; Funari, S.; Fernández, J.; Rodríguez, P. y Bankova, V. 2007. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on *Salmonella* serovars. *Journal Venom of Animal and Toxins including Tropical Diseases*, 13 (4): 748-757.

Parsot, C. 2005. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiology Letters*, 252: 11-18.

Penatti, M.; Hollanda, L.; Nakazato, G.; Campos, T.; Lancellotti, M.; Angellini, M.; Brocchi, M.; Rocha, M. y Dias da Silveira, W. 2007. Epidemiological characterization of resistance and PCR typing of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* strains isolated from bacillary dysentery cases in Southeast Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40: 249-258.

Popoff, M. 2001. *Antigenic formulas of the Salmonella serovars*, 8va ed. Institute Pasteur, Paris, France.

Pupo, G.; Karaolis, D.; Lan, R. y Reeves, P. 1997. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. *Infection Immunity*, 65: 2685-2692.

Pupo, G.; Lan, R. y Reeves, P. 2000. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proceeding of the National Academic Sciences*, 97: 10567-10572.

Raffi, F.; Holland, M.; Hill, W. y Cerniglia, C. 1995. Survival of *Shigella flexneri* on vegetables of detection by polymerase chain reaction. *Journal Food Protection*, 58: 727-732.

Reed, K.; Meece, J.; Henkel, J. y Shukla, S. 2003. Birds, migration and emerging zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. *Clinical Medicine and Research*, 1(1):5-12.

Rincón, G.; Ginestre, M.; Harris, B.; Romero, S. y Martinez, A. 2002. Frecuencia de bacterias enteropatógenas en niños menores de cinco años. *Kasmera*, 30(1): 33-41.

Rincon, W.; Acurero, E. y Serrano, E. 2006. Enteroparasitos asociados a diarrea aguda en niños menores de 12 años de edad. *Kasmera*, 34(1): 31-39.

Rohner, P.; Pittet, D.; Pepey, B.; Nije-Kinge, T. y Auckenthaler, R. 1997. Etiological agents of infectious diarrhea: implications for requests for microbial culture. *Journal Clinical Microbiology*, 35: 1427-32.

Rolland, K.; Lambert-Zechovsky, N.; Picard, B. y Denamur, E. 1998. *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains are derived from distinct ancestral strains of *E. coli*. *Microbiology*, 144(9): 2667- 2672.

Sánchez, L.; Rodríguez, M.; Álvarez, P. y Garrido, M. 1998. Salmonelosis: fiebre tifoidea. Otras formas clínicas sistémicas. *Medicina Kinesiología*, 7(79): 3659-3665.

Sandrea-Toledo, L.; Avila-Roo, Y.; Paz-Montes, A.; Corpas-Guerrero, C.; Petit-Capriles, K. y Ocando-Vilchez, N. 2007. *Salmonella* y *Shigella* a partir de muestras fecales en la población Santa Rosa, Maracaibo-Venezuela. *Kasmera*, 35(2): 127-136.

Sandrea, L.; Martínez, A.; Valero, K. y Ávila, Y. 1998. Prevalencia de shigelosis en niños menores de 6 años de edad en una institución privada. (resumen). *Memorias XXV Jornadas Nacionales de Microbiología "Dr Gustavo Prieto"*. Puerto La Cruz. Venezuela.

Sansonetti, P. 2001. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 3-14.

Sethabutr, O.; Venkatesan, M.; Murphy, G.; Eampokalap, B.; Hoge, C. y Echeverria P. 1993. Detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. *Journal Infection. Disease*, 167: 458-461.

Shears, P. 1996. *Shigella* infections. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 90: 105-114.

Shu-Xuan, D.; An-Chun, C.; Ming-Shu, W. y Ping, C. 2007. Gastrointestinal tract distribution of *Salmonella enteritidis* in orally infected mice with a species-specific fluorescent quantitative polymerase chain reaction. *World Journal Gastroenterology*, 13 (48): 6568-6574.

Siegel, D.; Edelstein, P. y Nachamkin, I. 1990. Inappropriate testing for diarrheal diseases in the hospital. *JAMA*, 263: 979-82.

Soumet, C.; Ermel, G.; Rose, N.; Drovin, P.; Salvat, G. y Colin, P. 1999. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* from environmental swabs of poultry houses. *Letters in Applied Microbiology*, 28: 113-117

Surdeanu, M.; Ciudin, L.; Pencu, E. y Straut, M. 2003. Comparative study of three different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Shigella flexneri* strains isolated in Romania. *European Journal Epidemiology*, 18: 703-710.

Thong, K.; Hoe, S.; Puthucheary, S. y Yasin, R. 2005. Detection of virulence genes in Malaysian *Shigella* species by multiplex PCR assay. *BMC Infection Diseases*, 5: 8.

Tindall, B.; Grimont, P.; Garrity, G. y Euzéby, J. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal Systems Evolution. Microbiology*, 55: 521-524.

Urbina, G. y Pequenese, M. 1999. *Agentes bacterianos de diarrea aguda. Manual de laboratorio*. Fuvesi. Insalud. Caracas, 1999; 36.

Urrestarazu, M.; Liprandi, F.; Pérez, E.; Gonzalez, R. y Schael, I. 1999. Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en Venezuela. *Public Health*, 6(3): 149-153.

Van Loock, F.; Ducoffre, G.; Dumont, JM. ; Libotte-Chasseur, ML. ; Imberechts, H.; Gouffaux, M.; Houins-Roulet, J.; Lamsens, G.; De Schrijver, K.; Bin, N.; Moreau, A.; De Zutter, L. y Daube, G. 2000. Analysis of foodborne disease in Belgium in 1997. *Acta Clinica Belgica*, 55: 300-306

Valdespino, J.; Garcia, A.; Glono, S.; Salcedo, A.; Alvarez, R. y Sepulveda, J. 1994. Epidemiología y etiología de las diarreas infecciosas: el caso de Mexico. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 36:307-24.

Velásquez, F.; García-Lozano, H.; Rodríguez, E.; Cervantes, I.; Gómez, A. y Melo, M. 2004. Diarrhea morbidity and mortality in Mexican children: impact of rotavirus disease. *Pediatric Infection Disease Journal*, 23(10): 49-55.

Vieira-Pinto, M.; Oliveira, M. y Bernardo, F. 2005. Evaluation of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) as a rapid screening method for detection of *Salmonella* in tonsils of slaughtered pigs for consumption: a comparison with conventional culture method. *Journal of Food Safety*, 25: 109-119.

Vieira-Pinto, M.; Oliveira, M.; Bernardo, F. y Martins, C. 2007. Rapid detection of *Salmonella* sp. in pork samples using fluorescent *in situ* hybridization: a comparison with VIDAS®-SLM system and

ISO 6579 cultural method. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 59(6): 1388-1393.

Villalobo, E. y Torres, A. 1998. PCR for detection of *Shigella* spp. in mayonnaise. *Applied Environmental Microbiology*, 64(4): 1242-1245.

Viscaya, L.E.; Flores, A.; Hernandez, J.G.; Nieves, B. y Perez, I. 1999. Origen bacteriano de la enfermedad diarreica aguda en Mérida. Venezuela. *Revista Cubana Medicina Tropical*, 51 (1): 14-19.

Wang, Q.; Kong, F.; Jelfs, P y Gilbert, GL. 2008. Extended phage locus typing of *Salmonella enterica* serovars *typhimurium*, using multiplex PCR-based reverse line blot hybridization. *Journal of Medical Microbiology* 57(7): 827-838.

Warren, B.R.; Parish, M.E. y Schneider, K.R. 2006. *Shigella* as a foodborne pathogen and current methods for detection in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(7): 551-567.

Wong, R. y Chow, A. 2002. Identification of enteric pathogens by heat shock protein 60 kda (HSP60) gene sequences. *Fems Microbiology Letters*, 206: 107-113.

Yang, Y.; Song, M.; Park, S. y Kim, S. 2007. Direct detection of *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium* in human feces by real-time PCR. *Journal Microbiology Biotechnology*, 17(10): 1616-1621.

Yavzori, M.; Cohen, D.; Wasserlauf, R.; Ambar, R.; Rechavi, G. y Ashkenazi, S. 1994. Identification of *Shigella* species in stool specimens by DNA amplification of different loci of the *Shigella* virulence plasmid. *Journal Clinical Microbiology Infection Disease*, 13: 232-237.

Zoetendal, E.; Collier, C.; Koike, S.; Mackie, R. y Gaskins, H. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. *Journal of Nutrition*, 134: 465-472

ANEXOS

5. Que el equipo de personas que realizan esta investigación coordinado por el Dr. Marcos De Donato y la Lic. Elvia Michelli, me ha garantizado confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como a la de mi representado y cualquier otra información a la que tengan acceso por concepto de su participación en el proyecto antes mencionado.
6. Que bajo ningún concepto podré restringir el uso para fines académicos de los resultados obtenidos en el presente estudio.
7. Que la participación de mi representado en dicho estudio no implica riesgo e inconveniente alguno para su salud.
8. Que cualquier pregunta que tenga en relación con este estudio me será respondida oportunamente por parte del equipo de personas antes mencionadas con quienes me puedo comunicar por el teléfono 0416-1133501 con el Br. Jesús Luiggi.
9. Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir ningún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación.
10. Además se le pide el consentimiento para que los datos generados puedan ser utilizados para el presente estudio, sin revelar sus nombres.

**Resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas de *Salmonella*
y *Shigella* aisladas de personas con síndrome diarreico agudo
de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.**

	<i>Salmonella</i>		<i>Shigella</i>	
Pruebas	Resultado	N	Resultado	N
Motilidad	+	14	-	16
Indol	-	14	-	16
Citrato	+	14	-	16
Ornitina	+	14	-	11
			+	5
Lisina	+	14	-	16
Kligler	K/A		K/A	
Gas	+	14	-	16
H ₂ S	+	14	-	16
Urea	-	14	-	16
FAD	-	14	-	16

Hoja de Metadatos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

o Título	DIAGNÓSTICO CLÁSICO Y MOLECULAR DE <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i>, EN PERSONAS CON SÍNDROME DIARRÉICO AGUDO EN LA CIUDAD DE CUMANÁ, ESTADO SUCRE (AGOSTO-SEPTIEMBRE 2006)
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
LUIGGI LIMONGI JESUS MANUEL	C VLAC	12529365
	e -mail	nao- pao@hotmail.com
	e -mail	
	C VLAC	
	e -mail	
	e -mail	
	C VLAC	
	e -mail	
	e -mail	
	C VLAC	
	e -mail	
	e -mail	

Palabras o frases claves:

Diagnostico
Síndrome diarreico agudo
<i>Salmonella- Shigella</i>

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias Basicas	Biologia

Resumen (abstract):

En Venezuela, el Síndrome Diarréico Agudo (SDA) reviste gran importancia epidemiológica, constituyendo una de las primeras causas de morbi-mortalidad, donde los géneros *Salmonella* y *Shigella*, están frecuentemente involucrados. Se planteó detectar *Salmonella* y *Shigella* por métodos convencionales y moleculares. Se realizó coprocultivo para aislamiento e identificación de las bacterias enteropatógenas en 330 muestras de heces de individuos con SDA y 30 muestras de individuos asintomáticos (controles) de diferentes edades y ambos sexos, así como coproanálisis para observar las características físicas macroscópicas y posibles formas evolutivas parasitarias en las heces. Se encontró que ambos grupos de estudio presentaron un ligero predominio del sexo femenino. La mayor frecuencia de individuos con SDA se presentó en el grupo de 0-2 años de edad (39,39%). El grupo control presentó un 46,67% de positividad en el análisis bacteriológico. *Escherichia coli* fue la especie más frecuente en ambos grupos de estudio, seguida de *Shigella* con 16 casos (4,85%), y de *Salmonella* con 14 casos (4,24%) en los individuos con SDA, detectándose además *Proteus* y *Klebsiella* en los individuos controles, entre otras. La salmonelosis se distribuyó en ambos sexos por igual y con mayor frecuencia en los grupos de 3-4 y 9-10 años, mientras que la shigellosis predominó ligeramente en el sexo femenino (56,25%) y en niños de 5-6 y 9-10 años. Las infecciones por *Salmonella* y *Shigella* presentaron infecciones mixtas con helmintos y protozoarios intestinales patógenos en un 14,28% y 25,00% respectivamente. Se logró optimizar las condiciones de PCR para la detección molecular de *Salmonella* (genes *invA*, *sefA* y *fliC* de 457pb, 620pb y 488pb respectivamente) y *Shigella* (gen *virA* de 457pb) observando que sólo las muestras positivas a estos géneros por análisis bacteriológico mostraron las amplificaciones esperadas. Se demostró la especificidad de la técnica de PCR por la ausencia de productos amplificados en los controles empleados. Se concluye que el diagnóstico molecular constituye una herramienta alternativa que permite la detección e identificación de bacterias causantes de cuadros diarreicos, además de su gran utilidad para determinar la existencia de genes de virulencia en las cepas estudiadas.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
De Donato Marcos	R OL	A <input type="text"/> S <input type="text"/> U <input type="text"/> U <input type="text"/>
	C VLAC	7259865
	e -mail	marcosdedonato@yahoo.com
	e -mail	
	R OL	A <input type="text"/> S <input type="text"/> U <input type="text"/> U <input type="text"/>
	C VLAC	
	e -mail	
	e -mail	
	R OL	A <input type="text"/> S <input type="text"/> U <input type="text"/> U <input type="text"/>
	C VLAC	
	e -mail	
	e -mail	
	R OL	A <input type="text"/> S <input type="text"/> U <input type="text"/> U <input type="text"/>
	C VLAC	
	e -mail	
	e -mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2009	07	06

Lenguaje: spa _____

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis_JL	Application/Word

Alcance:

Espacial : _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado en Biología

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio:

Biología

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente
