



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

AISLAMIENTO DE BACTERIAS PATÓGENAS EN LA NASOFARINGE DE
NIÑOS DE LA COMUNIDAD INDÍGENA MARÍA LÓPEZ-ESTADO SUCRE
(Modalidad Investigación)

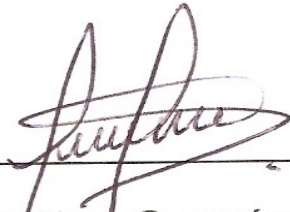
KAREN ALEJANDRA ANTÓN CÓRDOVA

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

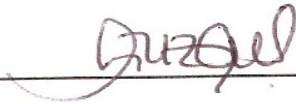
CUMANÁ, 2009

AISLAMIENTO DE BACTERIAS PATÓGENAS EN LA
NASOFARINGE DE NIÑOS DE LA COMUNIDAD INDÍGENA MARÍA LÓPEZ-

APROBADO POR:



Prof. Militza Guzmán Lista
ASESORA



ESTADO SUCRE

INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	6
Zona de estudio	6
Muestra poblacional.....	6
Aspectos éticos.....	6
Estudio clínico-epidemiológico	7
Recolección y transporte de las muestras.....	7
Siembra y valoración de los cultivos	7
Identificación bioquímica	8
Colonias alfa hemolíticas. Cocos Gram positivos dispuestos en cadenas o pares (presuntivo de <i>S. pneumoniae</i>).....	8
Colonias opacas, cremosas, convexas, blancas o amarillas. Cocos Gram positivos agrupados aislados o en cadenas (presuntivo de <i>S. aureus</i>).....	9
Colonias grises, redondas y brillantes. Diplococos Gram negativos (presuntivo de <i>M. catarrhalis</i>)	10
Colonias grises con crecimiento sólo en agar chocolate. Bacilos Gram negativos pleomórficos (presuntivo de <i>H. influenzae</i>).....	11
Susceptibilidad antimicrobiana	11
Control de calidad	13
Identificación molecular de <i>S. pneumoniae</i>	13
Extracción de ADN.....	13
Determinación del gen <i>cpsA</i>	13
Electroforesis.....	14
Análisis de datos	15
RESULTADOS.....	16
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	30
RECOMENDACIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXO 1.....	40
ANEXO 2.....	43

AGRADECIMIENTOS

A:

Dios.

La profesora Militza Guzmán, por guiarme y ayudarme, compartiendo sus conocimientos y consejos, a lo largo del desarrollo de esta investigación, siendo un ejemplo a seguir para mi persona.

Milagros Anuel, Augusto Peña y Rafael Herrera, por su ayuda en el diagnóstico clínico-epidemiológico de los niños.

La profesora Elsa Salazar, por su ayuda y colaboración.

El Instituto de Biomedicina, por la ayuda, enseñanza y por ofrecer sus instalaciones para la realización de este trabajo.

Los niños indígenas Warao, sin ellos no hubiese sido posible este estudio.

Y a todos los compañeros que de cualquier manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A:

Mi mamá y a mi melo, gracias por estar siempre conmigo, por el apoyo incondicional, la confianza y la paciencia.

Mi papá, abuelos, tío Josman y tía Joselvi, quienes siempre han estado pendiente de mí, gracias.

Mis casi hermanas Mariángela y María Francia, mis amigas y compañeras de siempre: Niurgreg, Paty y Gina, por compartir los buenos y malos momentos y siempre brindarme su comprensión.

A todos aquellos que de una u otra forma hicieron posible la culminación de esta meta.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de patógenos respiratorios en los niños de la comunidad Warao María López, según el grupo etario. Enero – marzo 2008.	18
Tabla 2. Frecuencia de patógenos respiratorios en los niños de la comunidad Warao María López, según la condición clínica. Enero – marzo 2008.	18
Tabla 3. Frecuencia de patógenos respiratorios en los niños de la comunidad Warao María López, según número de habitantes por casas. Enero – marzo 2008.	19
Tabla 4. Susceptibilidad antimicrobiana de los patógenos respiratorios aislados en los niños de la comunidad Warao María López. Enero – marzo 2008.	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frecuencia de los cuadros clínicos de los niños de la comunidad Warao María López. Enero – marzo 2008.....	16
Figura 2. Frecuencia de patógenos respiratorios aislados en los niños de la comunidad Warao María López. Enero – marzo 2008.....	17
Figura 3. Productos de la amplificación del gen <i>cpsA</i> obtenidos en cepas de <i>S. pneumoniae</i> aisladas en los niños de la comunidad Warao María López. Enero - marzo 2008.....	21

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la presencia de bacterias patógenas en el tracto respiratorio superior de niños indígenas waraos con edades comprendidas entre 0 y 10 años, que habitaban en la comunidad de María López, Municipio Benítez del estado Sucre, durante los meses enero-marzo de 2008. La identificación de las especies bacterianas se realizó mediante las técnicas microbiológicas convencionales. Para determinar la susceptibilidad antimicrobiana se empleó el método de difusión en disco, según los lineamientos del Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos. La identificación molecular de *S. pneumoniae* se determinó por la técnica de PCR, empleando oligonucleótidos específicos para el gen *cpsA*. El estudio microbiológico reveló la presencia de los siguientes microorganismos: *M. catarrhalis* (28,6%), *S. pneumoniae* (26,5%), *S. aureus* (14,3%) y *H. influenzae* (6,1%), tanto en niños con y sin sintomatología. El gen *cpsA* se identificó en 21 cepas alfa hemolíticas. Con respecto a la susceptibilidad antimicrobiana se encontraron cepas de *S. pneumoniae* resistentes a tetraciclina (46,2%), trimetoprim-sulfametoxazol (38,5%), clindamicina (33,3%) y penicilina (23,1%). Todas las cepas de *M. catarrhalis* fueron productoras de betalactamasas y resistentes a ampicilina y penicilina; el resto de los microorganismos fueron sensibles a los antimicrobianos ensayados. Se encontró asociación entre la presencia de *M. catarrhalis* con la edad y los cuadros clínicos. La presencia de bacterias patógenas a nivel nasofaríngeo en la población infantil, representa un riesgo para el establecimiento de infecciones severas del tracto respiratorio.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad generan un importante impacto clínico y económico, siendo las infecciones respiratorias agudas las más comunes en la población infantil. La Organización Mundial de la Salud estima que cada año 1,9 millones de niños menores de 5 años mueren a causa de una infección respiratoria aguda (Organización Mundial de la Salud, 2004).

La etiología de la infección respiratoria es variable y está constituida por un grupo heterogéneo de patógenos, entre los que se encuentran: *Streptococcus pyogenes*, causante de faringoamigdalitis; *Streptococcus pneumoniae*, productor de otitis media, sinusitis, bronquitis y neumonía; y *Haemophilus influenzae*, causante de otitis media y sinusitis. Otros agentes patógenos, como *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis* y *Neisseria meningitidis* también han sido valorados como productores de cuadros clínicos a nivel respiratorio (García *et al.*, 2001).

Normalmente, el tracto respiratorio superior es colonizado en forma temprana por bacterias relativamente avirulentas, tales como: *Streptococcus* del grupo viridans, *Streptococcus* no hemolíticos y difteroides. En forma transitoria pueden prevalecer patógenos potenciales como *H. influenzae* tipo b (Hib) y *H. influenzae* no tipificable (Hint) (García *et al.*, 2001). Las infecciones del tracto respiratorio superior asociadas a *H. influenzae*, especialmente los microorganismos no tipificables, son considerados como una causa de morbimortalidad en infantes y niños menores de 10 años en los países en vías de desarrollo (Pittman, 1999; Nodarse *et al.*, 2002).

La adquisición de patógenos y el estado de portador están influenciados por las condiciones socioeconómicas de la población. Las tasas de portadores de patógenos

bacterianos son muy extensas, y varían entre diversas poblaciones y una ubicación geográfica en particular; estas variaciones han sido relacionadas con antecedentes genéticos y con ciertas condiciones, como el tipo de vivienda que habitan, acceso a centros de salud, hábitos de higiene, familias numerosas, entre otros. Sin embargo, la relación entre estos factores y la resistencia individual a la colonización aun no está clara (García y Fresnadillo, 2002).

Desde el punto de vista epidemiológico, *S. pneumoniae* es considerado como el principal agente productor de cuadros de neumonías a nivel comunitario, se estima que aproximadamente el 40,0% de los niños menores de 5 años son portadores asintomáticos, encontrándose en este grupo etario las más altas tasas de portadores nasofaríngeos. En el estado de portador, los neumococos son adquiridos y transportados por el individuo en un período de semanas o meses, no obstante, cuando ocurren alteraciones del equilibrio hospedero-patógeno, ocasionados por infecciones virales, desnutrición, daño local de la mucosa, falta de vacunación y hacinamiento, la colonización nasofaríngea, precede a la enfermedad (Mulholland, 1999; Kadioglu *et al.*, 2002; Meats *et al.*, 2003; Shimada *et al.*, 2003).

La identificación de los principales patógenos del tracto respiratorio superior está fundamentada en el diagnóstico bacteriológico, considerándose como pruebas claves la susceptibilidad a la optoquina y solubilidad en bilis para *S. pneumoniae*; utilización de los factores de crecimiento X (protoporfirina) y V (nicotinamida adenina dinucleótido) para *H. influenzae*, la presencia de las enzimas coagulasa y ADNasa para *S. aureus*, y ADNasa para *M. catarrhalis* (Koneman *et al.*, 2008). La aplicación de estas pruebas permiten la identificación correcta de los microorganismos; sin embargo, desde 1987 se han reportado cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la optoquina en lugares donde se emplea la quinina como tratamiento antimalárico, hecho que ha generado la introducción de pruebas más específicas y

sensibles, como la reacción en cadena de la polimerasa, basadas en el empleo de iniciadores específicos de especie (Kontinen *et al.*, 1987; Phillips *et al.*, 1988; Pikis *et al.*, 2001).

Anualmente, en América se reportan, aproximadamente, 60 mil muertes en niños menores de 5 años, ocasionadas por infecciones en el tracto respiratorio, siendo la neumonía la causa más frecuente; sin embargo, existen escasos datos que revelen la frecuencia de las infecciones respiratorias en comunidades indígenas en América, a excepción de algunos estudios realizados en Estados Unidos y Canadá (Fuchs *et al.*, 2005).

Leach *et al.* (1994), realizaron un estudio para conocer los posibles patógenos que colonizan la nasofaringe de niños aborígenes en Australia, encontrando que durante los primeros 8 días de nacidos, los niños son colonizados en su mayoría por *M. catarrhalis*, mientras que *H. influenzae* se encuentra después de los 10 días y *S. pneumoniae* después de los veinte días de nacidos. Este mismo estudio, reportó que la presencia de estos patógenos en niños no aborígenes se presenta a partir del séptimo mes de vida.

En poblaciones indígenas de Estados Unidos se han reportado altas tasas de enfermedades respiratorias, donde la neumonía ocupa el primer lugar y en su mayoría son causadas por *S. pneumoniae*, situación que ha traído como consecuencia la aplicación de la vacuna neumocócica a los niños indígenas con edades comprendidas entre 2 y 4 años (Williams *et al.*, 2002). El estudio de bacterias patógenas que colonizan o causan infecciones respiratorias agudas en poblaciones indígenas de Norteamérica, ha estado limitado a pocas tribus, siendo las más estudiadas, las tribus de Alaska y Mapache (O'Brien *et al.*, 2004).

En el año 2003, en el estado Delta Amacuro se registraron 1 298 casos de muertes por neumonía e influenza, sin embargo, no hay datos específicos en los registros de morbilidad de la región, sobre la prevalencia de infecciones respiratorias agudas en la población Warao (Ministerio de Salud y Desarrollo Social, 2003).

Del Nogal *et al.* (2006), llevaron a cabo un estudio para determinar el estado de portador y la prevalencia de infecciones respiratorias agudas en niños menores de 5 años residentes en las comunidades indígenas de San Francisco de Guayo, Nabasanuka y Santa Catalina del estado Delta Amacuro, El estudio reveló que de 110 niños muestreados, 42,7% estaban colonizados con *S. pneumoniae*.

Rivera *et al.* (2007) reportaron 45,0% de niños waraos menores de 6 años portadores de *S. pneumoniae* en 9 comunidades indígenas ubicadas en el estado Delta Amacuro. La tipificación del microorganismo reveló que los serotipos prevalentes fueron 23F y 6A, los cuales presentaron resistencia a penicilina, tetraciclina y eritromicina.

Los estudios enfocados a determinar los posibles agentes bacterianos causantes de infecciones respiratorias a nivel nacional, se han llevado a cabo, en la mayoría de los casos, en poblaciones escolares, trabajadores del área de salud, guarderías, entre otros, pero pocos han sido los estudios realizados para establecer los posibles patógenos causantes de infecciones respiratorias en las comunidades indígenas venezolanas, sobre todo en la etnia Warao, la cual representa el segundo grupo indígena más numeroso del país.

La etnia Warao esta conformada por 33 000 individuos aproximadamente y desde hace siglos, la mayoría habita en los caños del estado Delta Amacuro y sus adyacencias, así como en algunas partes de los estados Monagas, Sucre y Bolívar

(Medina *et al.*, 2007). Debido a su forma de vida, costumbres y tradiciones, durante muchos años la mayoría de las comunidades indígenas Warao, han vivido en precarias condiciones sanitarias, principalmente, al no contar con agua potable, no tener una adecuada disposición de excretas y vivir en hacinamiento, hechos que han desencadenando, la aparición de ciertas enfermedades, como las infecciones respiratorias agudas y la tuberculosis respiratoria, ambas principales causas de morbilidad y mortalidad (Rivera *et al.*, 2007).

De acuerdo con lo señalado anteriormente, tomando en consideración los antecedentes existentes en la población indígena Warao del estado Delta Amacuro y que las infecciones respiratorias agudas representan un problema de salud pública, especialmente por contribuir a elevar los índices de morbi-mortalidad infantil, en el presente trabajo se consideró de interés identificar las bacterias patógenas presentes en la nasofaringe de niños indígenas Warao, menores de 10 años, que habitan en la comunidad María López, Municipio Benítez, del estado Sucre.

METODOLOGÍA

Zona de estudio

El estudio se realizó en la comunidad María López, ubicada en las adyacencias del pueblo de Guariquén, Municipio Benítez, al sureste del estado Sucre. De acuerdo al censo realizado en esa población durante el mes de noviembre del 2007, en la comunidad habitaban 126 individuos, de los cuales 58 eran niños menores de 10 años.

Muestra poblacional

El estudio estuvo conformado por 49 niños waraos en edades comprendidas entre 0 y 10 años, con o sin clínica de infección respiratoria aguda, que habitaban en la comunidad durante el periodo de muestreo de enero a marzo del año 2008.

Aspectos éticos

Para contar con la participación de los niños, se solicitó el consentimiento de los padres. Para tal fin, se contó con la ayuda de algunos miembros de la comunidad, quienes explicaron en su lengua nativa los objetivos y la importancia del estudio. Debido al inconveniente que se presentó al no poder tener comunicación con los indígenas, y que el nivel de lectura en la población era bajo, el consentimiento se firmó con la huella digital del padre (anexo 1).

El estudio se llevó a cabo considerando las normas de ética establecidas por la Organización Mundial de la Salud para trabajos de investigación en seres humanos y

la declaración de Helsinki, ratificada por la 52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia en el año 2000 (De Abajo, 2001).

Estudio clínico-epidemiológico

A cada representante se le aplicó una encuesta clínica-epidemiológica (anexo 2) con la finalidad de determinar los factores de riesgos asociados al establecimiento de infecciones del tracto respiratorio superior y conocer algunos antecedentes clínicos de los niños.

La evaluación clínica fue realizada por 3 médicos especialistas en salud pública, quienes colaboraron en el diagnóstico de las infecciones del tracto respiratorio superior.

Recolección y transporte de las muestras

A cada niño se le tomó dos muestras de secreción nasofaríngea (Koneman *et al.*, 2008). Para la toma se introdujo un hisopo flexible (Copan, Italia) hasta la nasofaringe, realizando ligeros movimientos de rotación para tomar una cantidad suficiente y representativa de la muestra, seguidamente, se realizó un extendido para colorear con la tinción de Gram (Huccker y Coon, 1923). Las muestras se conservaron en el medio de transporte Amies (Copan, Italia) y fueron trasladadas, bajo refrigeración, al laboratorio de bacteriología clínica del Departamento de Bioanálisis, UDO-Sucre, para ser procesadas en un tiempo no mayor de 6 horas.

Siembra y valoración de los cultivos

Las muestras fueron sembradas en agar sangre (AS) (Britania, Argentina), al

5%, agar chocolate (Ach) con 1% de isovitalex, y agar MacConkey (AMC) (Britania, Argentina). Las placas de AS y Ach se incubaron en una atmósfera de microaerofilia y el AMC en aerobiosis durante 24 horas a 37°C (Koneman *et al.*, 2008).

Se valoraron y seleccionaron las colonias con las siguientes características morfológicas, independientemente si se encontraban en cultivos puros o mixtos. Colonias pequeñas, brillantes y alfa hemolíticas en AS y Ach, sugestivas de *S. pneumoniae*. Colonias grises, pequeñas con crecimiento solo en Ach, presuntivas de *H influenzae*, colonias blancas o amarillas, hemolíticas, medianas, mucoides compatibles con *S. aureus* y colonias pequeñas, grises, brillantes y redondas características de *M. catarrhalis* (Forbes *et al.*, 2004).

A cada colonia seleccionada, se le realizó un extendido para colorear con la tinción de Gram, con el fin de verificar la morfología y tinción de los microorganismos (Huccker y Coon, 1923). De acuerdo a los resultados del Gram y de las observaciones en los medios de cultivo, se llevó a cabo la identificación bioquímica.

Identificación bioquímica

La identificación bioquímica de los microorganismos se realizó siguiendo los protocolos estándares descritos por Koneman *et al.* (2008).

Colonias alfa hemolíticas. Cocos Gram positivos dispuestos en cadenas o pares (presuntivo de *S. pneumoniae*).

Previamente se tomó una colonia alfa hemolítica y se purificó en una placa de Ach, a partir de esta placa se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas.

Prueba de la catalasa: se colocaron en un portaobjeto dos gotas de peróxido de hidrógeno al 3% y se mezclaron con 2 ó 3 colonias típicas de la bacteria, teniendo siempre presente el cuidado de no tomar agar. La no formación de burbujas en un lapso no mayor a 30 segundos, fue considerada como una reacción negativa.

Prueba de la optoquina: para esta prueba se seleccionaron de tres a cuatro colonias del microorganismo, se tocaron con un hisopo y se diseminaron en una placa de Ach. Seguidamente, se procedió a colocar un taxo de optoquina de 5 µg en el centro de la zona inoculada y se incubó durante 18 a 24 horas a 35°C en microaerofilia. El desarrollo de un halo de inhibición \geq a 14 mm alrededor del taxo de optoquina, indicó que el microorganismo es sensible, designándose el microorganismo como *S. pneumoniae*.

Prueba de solubilidad en bilis: el desoxicolato de sodio tienen la capacidad de lisis selectiva a *S. pneumoniae*. Esta prueba se realizó preparando 0,5 ml de una suspensión salina del microorganismo. Luego, en un tubo estéril se agregaron 0,5 ml de desoxicolato de sodio al 10,0%. Los microorganismos solubles en bilis producen un aclaramiento de la turbidez del cultivo dentro de un tiempo aproximado de 3 horas.

Colonias opacas, cremosas, convexas, blancas o amarillas. Cocos Gram positivos agrupados aislados o en cadenas (presuntivo de *S. aureus*)

Las colonias con morfología típica de *S. aureus* fueron purificadas en una placa de agar tripticosa soya (ATS) (Himedia, India), a partir de la cual se realizaron las pruebas bioquímicas: catalasa, fermentación del manitol, coagulasa y desoxirribonucleasa (ADNasa) (Koneman et al., 2008).

Fermentación del manitol: para esta prueba se empleó el agar manitol salado (AMS) (Himedia, India), el cual se sembró mediante la técnica de diseminación en cuatro cuadrantes. *S. aureus* tiene la capacidad de crecer en presencia de 7,5% de cloruro de sodio y de fermentar el manitol, lo cual se evidenció con la presencia de colonias amarillas, revelando la presencia de ácidos como producto final.

Prueba de la coagulasa: en un tubo estéril se colocaron 0,5 ml de plasma, seguidamente se añadieron 0,5 ml de un caldo infusión cerebro corazón que contenía al microorganismo, se incubó a 37°C por un lapso de 1-4 horas. La prueba se consideró positiva al observar cualquier grado de coagulación visible dentro del tubo.

Prueba de la desoxirribonucleasa: para la determinación de la enzima ADNasa se procedió a inocular el microorganismo en el agar ADNasa (Himedia, India), seguidamente se incubó a 37°C durante 24 horas. Un resultado positivo fue indicado por un cambio de color de azul a rosado alrededor de la colonia.

Colonias grises, redondas y brillantes. Diplococos Gram negativos (presuntivo de *M. catarrhalis*)

Las colonias sugetivas de *M. catarrhalis* fueron purificadas en AS. A partir de este medio se realizaron las pruebas bioquímicas de ADNasa, calatasa y citocromooxidasa. Las dos primeras fueron descritas anteriormente.

Prueba de la citocromooxidasa: para detectar la producción de esta enzima, se agregó sobre un papel filtro dos gotas del reactivo tetrametilparafenilendiamina, posteriormente se colocó una colonia tomada del AS con una palillo de madera, la aparición de un color púrpura en un lapso de 30 a 60 segundos indicó una reacción positiva.

Colonias grises con crecimiento sólo en agar chocolate. Bacilos Gram negativos pleomórficos (presuntivo de *H. influenzae*)

Para la identificación de *H. influenzae* se realizaron las pruebas de calatasa, citocromooxidasa y utilización de factores X y V.

Utilización de los factores de crecimiento: a partir de un aislamiento puro de cepas presuntivas de *H. influenzae*, en Ach con 2% de isovitalex, se tomaron varias colonias y se realizó una suspensión en caldo infusión cerebro corazón; posteriormente se sembró en una placa con ATS y luego se colocó en la superficie del agar un taxo del factor V y otro de factor X, con una distancia aproximado de 1 cm entre cada uno, seguidamente se incubó en microaerofilia a 37°C durante 24 horas. El crecimiento visible en el medio de los dos taxos reveló la presencia de *H. influenzae*.

La prueba de la catalasa y citocromoxidasa se aplicaron según la designación realizada anteriormente.

Susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad antimicrobiana para cada especie bacteriana se realizó mediante el método de difusión en disco (Bauer *et al.*, 1966), siguiendo los lineamientos establecidos por el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos, del inglés “Clinical and Laboratory Standard Institute” (CLSI, 2008).

A partir de un cultivo puro crecido entre 18 a 24 horas, se preparó una suspensión bacteriana en 4,5 ml de solución salina fisiológica al 0,85%, ajustando la turbidez al patrón de 0,5 en la escala de MacFarland, el cual contiene aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. Una

vez obtenida la turbidez, se procedió a impregnar un hisopo estéril, el cual se diseminó uniformemente sobre la superficie del agar indicado para cada bacteria, como se menciona a continuación:

S. pneumoniae: se empleó el agar Mueller-Hinton, suplementado con sangre al 5%, y se ensayaron los discos de tetraciclina (30 µg), eritromicina (15 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg), clindamicina (30 µg) y oxacilina (1 µg). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C en microaerofilia.

M. catarrhalis: se empleó el agar Mueller-Hinton, suplementado con sangre al 5%. Se probaron los discos de ampicilina (10 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (20/10 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg) y penicilina (10 U). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Para monitorear la producción de enzimas betalactamasas se colocaron a una distancia de 20 mm los discos de amoxicilina-acido clavulánico y ampicilina. La sinergia observada entre ambos discos reveló la presencia de la enzima.

S. aureus: se utilizó el agar Mueller-Hinton y se ensayaron los discos de oxacilina (1 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), vancomicina (30 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg) y cefotaxima (30 µg). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. El disco de vancomicina fue leído después de las 24 horas.

La lectura de los halos de inhibición se realizó empleando una regla milimetrada, los resultados fueron reportados como sensibles, intermedios y resistentes, tomando en consideración las categorías de interpretación referidas en el CLSI (2008).

Control de calidad

El control de calidad se realizó a través del empleo de las cepas de *S. pneumoniae* ATCC 49619, *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* ATCC 43300

Identificación molecular de *S. pneumoniae*

Con el propósito de identificar molecularmente a *S. pneumoniae*, se procedió a determinar mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, el gen *cpsA*, en todas las cepas productoras de alfa hemólisis, El gen *cpsA* es el primer gen de cuatro genes, que conforman el operón que codifica la cápsula en *S. pneumoniae* y participa en la regulación de la expresión de la cápsula (Guidolin *et al.*, 1994; Pai *et al.*, 2006).

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el método de ebullición. Se tomaron de 3 a 5 colonias de *S. pneumoniae* recuperadas a partir de un sub cultivo de AS, suplementado con 5% de sangre de carnero; éstas se suspendieron en 250 µl de buffer TE (10 mmol. l⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol. l⁻¹ EDTA, pH 8,0). La suspensión bacteriana fue sometida a 100°C por 10 minutos e inmediatamente se procedió a refrigerar a -20°C, hasta su utilización (Lawrence *et al.*, 2003).

Determinación del gen *cpsA*

Para identificar el gen *cpsA* se emplearon los oligonucleótidos *cpsA*-f: 5'-GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC-3' y *cpsA*-r : 5'-GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC-3', los cuales amplificaron un producto de 160 pb.

Se preparó una mezcla de reacción con un volumen final de 25 μl , la cual contenía: buffer 1X (Tris-HCl 20 mmol.l^{-1} pH 8,0; KCl 100 mmol.l^{-1} ; EDTA 0,1 mmol.l^{-1} ; dithiothreitol 1 mmol.l^{-1} ; tween 20 al 0,5%; Nonidet P-400 al 5%; (Promega Inc., Madison, Wis.), MgCl_2 2,5 mmol.l^{-1} ; desoxinucleótidos 1 mmol.l^{-1} , taq polimerasa 5 U, oligonucleótidos cpsAf y cpsAr 0,1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, en cada caso, agua libre de nucleasas 4 μl y ADN 5 μl .

Las condiciones de reacción utilizadas fueron: una fase inicial de desnaturalización a 94°C por 4 minutos, 30 ciclos de amplificación conformados por una fase de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, una de hibridación 54°C por 45 segundos y una de extensión a 65°C por 2 minutos y medio (Pai *et al.*, 2006). Como control positivo de la reacción se empleó la cepa de *S. pneumoniae* ATCC 49619.

Electroforesis

Los productos amplificados se analizaron en una corrida de electroforesis. Para esto se preparó un gel de agarosa al 2% con buffer TBE 0,5X (45 mmol.l^{-1} tris-borato, 1 mmol.l^{-1} EDTA [pH 8,0] y 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de bromuro de etidio). Este buffer se utilizó, además, para realizar las migraciones electroforéticas, agregándole la cantidad adecuada a una cámara de electroforesis Maxicell modelo EC360M. Para las corridas electroforéticas se empleó un buffer de carga (azul de bromofenol 0,25% y sacarosa 0,25%), el cual se mezcló con el producto amplificado en proporción 1:1 y fue colocado en el gel. La determinación del tamaño de los fragmentos de ADN amplificados se observaron por comparación con el marcador de peso molecular de 50 pb (Ladder Noovagen, Inc), colocado en el gel junto a las muestras.

Los geles fueron corridos en buffer TBE 0,5X a 80 V durante una hora y media aproximadamente, finalmente se observaron con un transiluminador de luz

ultravioleta. El registro fotográfico se llevó a cabo con un sistema Bio-Rad empleando el programa Quantity One.

Análisis de datos

A partir de la información obtenida se construyó una base de datos con la ayuda del programa SPSS, versión 11,5 para Windows. El análisis de resultados se realizó calculando las frecuencias relativas. Para relacionar la presencia de los factores de riesgo con la presencia del microorganismo se empleó la prueba de Chi cuadrado (Sokal y Rohlf, 1979).

RESULTADOS

En la presente investigación se estudiaron 49 niños indígenas con edades comprendidas entre 0 a 10 años, los cuales fueron distribuidos arbitrariamente en dos grupos, uno conformado por las edades de 0 a 5 y el otro con edades de 6 a 10. El grupo de 0 a 5 años representó el 59,2% de los niños evaluados. Los niños del género masculino representaron el 57,1%, mientras que los del femenino el 42,9% (Datos no mostrados).

Según las características clínicas evaluadas el 65,3% de los niños no presentaron síntomas clínicos relacionados con infecciones respiratorias, sólo el 34,7% manifestó tos, secreción nasal, estornudos, obstrucción nasal, dolor de garganta y catarro. El principal cuadro clínico diagnosticado fue el síndrome gripal (76,5%), seguido de rinofaringitis (11,8%) y, en menor número de casos faringitis y otitis (5,9%) (Figura 1).

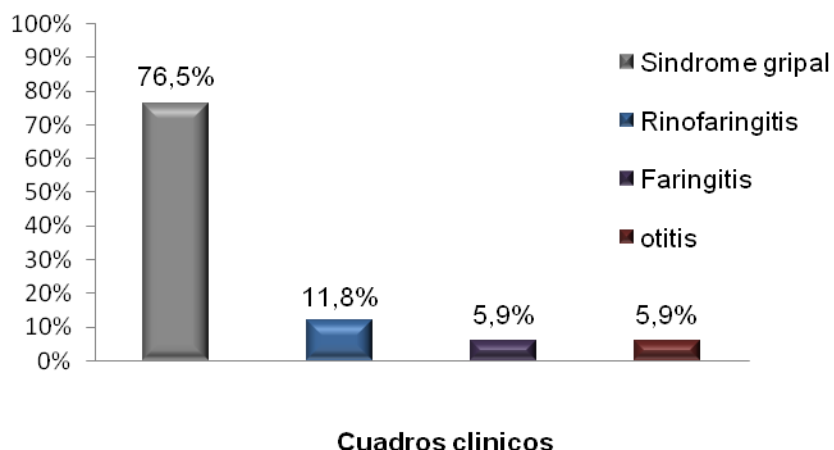


Figura 1. Frecuencia de los cuadros clínicos de los niños de la comunidad Warao María López. Enero – marzo 2008.

Del total de niños evaluados el 75,5% estaban colonizados por bacterias patógenas. La figura 2 muestra la frecuencia de las especies bacterianas identificadas en las muestras nasofaríngeas de los niños indígenas, la bacteria que se aisló con mayor frecuencia fue *M. catarrhalis* (28,6%), seguida de *S. pneumoniae* (26,5%), *S. aureus* (14,3%) y *H. influenzae* (6,1%). En el 80,0% de los casos las especies reportadas se presentaron en el cultivo como bacteria única. Dentro de las asociaciones bacterianas se detectaron la presencia de *S. pneumoniae/M. catarrhalis* (dos casos), *H. influenzae/S. pneumoniae* (un caso) y *H. influenzae/ M. catarrhalis* (un caso).

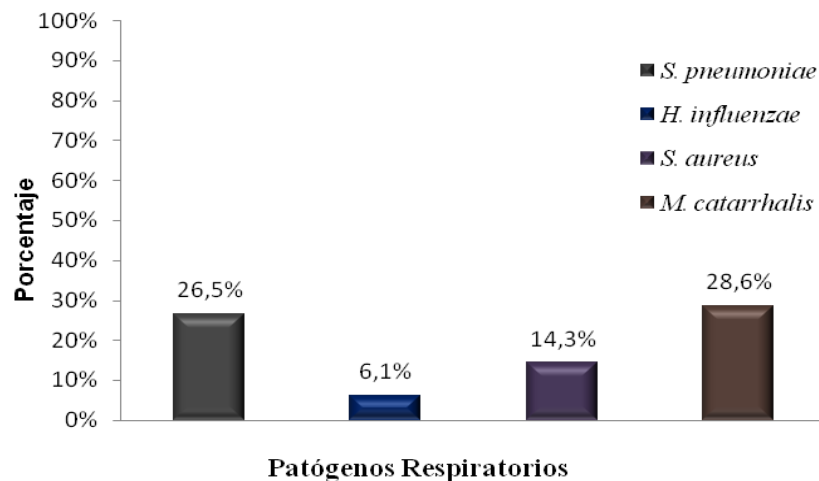


Figura 2. Frecuencia de patógenos respiratorios aislados en los niños de la comunidad Warao María López. Enero – marzo 2008

Al evaluar la frecuencia de las especies bacterianas según la edad, se observó que la mayoría de los patógenos se encuentran colonizando a los niños menores de 5 años, con una prevalencia de las especies *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis*. *S. aureus* sólo se aisló en el grupo de 6 a 10 años (Tabla 1). Al asociar la presencia de cada una de las bacterias con el grupo etáreo, se encontró asociación estadística muy significativa sólo para *M. catarrhalis* ($p < 0,01$).

Tabla 1. Frecuencia de patógenos respiratorios en los niños de la comunidad Warao María López, según el grupo etario. Enero – marzo 2008.

Bacteria	Edad (años)		Total	χ^2
	0-5	6-10		
<i>S. pneumoniae</i>	10	3	13	p >0,05
<i>H. influenzae</i>	3	0	3	ND
<i>S. aureus</i>	0	7	7	ND
<i>M. catarrhalis</i>	13	1	14	p <0,01
Total	26	11	37	

ND: no determinado

Con respecto a la frecuencia de bacterias patógenas aisladas de acuerdo a la presencia de cuadros clínicos se observó, que *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis* se aislaron en ambos grupos, mientras que *H. influenzae* y *S. aureus* se presentaron con mayor frecuencia en los niños sin clínica (Tabla 2). El análisis estadístico reveló asociación muy significativa (p <0,01) solo para *M. catarrhalis* y la presencia de cuadro clínicos.

Tabla 2. Frecuencia de patógenos respiratorios en los niños de la comunidad Warao María López, según la condición clínica. Enero – marzo 2008

Bacteria	Con clínica	Sin clínica	Total	χ^2
<i>S. pneumoniae</i>	6	7	13	p >0,05
<i>H. influenzae</i>	1	2	3	p >0,05
<i>S. aureus</i>	1	6	7	p >0,05
<i>M. catarrhalis</i>	9	5	14	p <0,01
Total	17	20	37	

La mayoría de los niños vivían en casas plurifamiliares, como mínimo se

encontró que en una casa habitaban 5 personas y como máximo 30. Al agrupar a los niños en dos categorías, basadas en el número de individuos que habitaban en cada casa, se encontró en ambos grupos la presencia de bacterias, con un predominio de las mismas en el grupo donde habitaban hasta 15 indígenas por casa (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia de patógenos respiratorios en los niños de la comunidad Warao María López, según número de habitantes por casas. Enero – marzo 2008.

Habitante por casa	n	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. catarrhalis</i>	Total
0-15	34	9 (26,3%)	2 (5,9%)	3 (8,8%)	9 (26,5%)	23
>15	15	4 (26,7%)	1 (6,7%)	4 (26,7%)	5 (33,3%)	14
Total	49	13 (53,0%)	3 (12,6%)	7(35,5%)	14 (59,8%)	37

El estudio de la susceptibilidad antimicrobiana de los microorganismos aislados se presenta en la tabla 4. En las cepas de *S. pneumoniae* se encontró un 46,2% de resistencia a tetraciclina, 38,5% a trimetoprim-sulfametoxazol, 33,3% a clindamicina y 23,1% a penicilina. Todas las cepas de *M. catarrhalis* fueron productoras de betalactamasas y resistentes a ampicilina y penicilina; no se encontró resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico. *S. aureus* presentó sensibilidad a todos los antimicrobianos ensayados. No fue posible determinar la susceptibilidad antimicrobiana en *H. influenzae* debido a que las cepas no se mantuvieron viables.

La identificación molecular de *S. pneumoniae*, realizada mediante la técnica de PCR, reveló la presencia de un producto de 160 pb en las 21 cepas alfa hemolíticas (13 sensibles a la optoquina y 8 resistentes), indicando la presencia del gen *cpsA* y demostrando la existencia de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la optoquina en aislados nasofaríngeos (Figura 3).

Tabla 4. Susceptibilidad antimicrobiana de los patógenos respiratorios aislados en los niños de la comunidad Warao María López. Enero – marzo 2008.

Antibiótico	<i>M. catarrhalis</i>		<i>S. pneumoniae</i>		<i>S. aureus</i>	
	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)
Trimetoprim sulfametoxazol	100,0	0,0	61,5	38,5	100,0	-
Clindamicina	-	-	66,7	33,3	100,0	-
Eritromicina	-	-	100,0	0,0	100,0	-
Tetraciclina	-	-	53,8	46,2	100,0	-
Penicilina	-	-	76,9	23,1	100,0	-
Vancomicina	-	-	-	-	100,0	-
Ciprofloxacina	-	-	-	-	100,0	-
Gentamicina	-	-	-	-	100,0	-
Cefotaxima	-	-	-	-	100,0	-
Penicilina	0,0	100,0	-	-	-	-
Amoxicilina-ác.clavulánico	100,0	0,0	-	-	-	-
Ampicilina	0,0	100,0	-	-	-	-

S: aislamientos susceptibles; R: aislamientos resistentes.

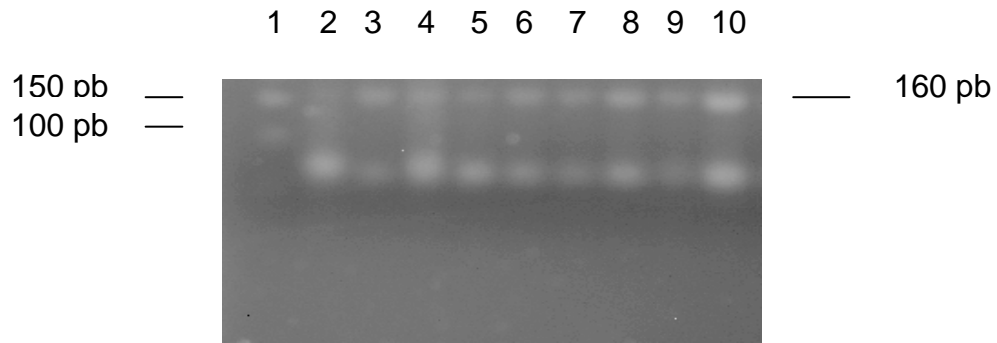


Figura 3. Productos de la amplificación del gen *cpsA* obtenidos en cepas de *S. pneumoniae* aisladas en los niños de la comunidad Warao María López. Enero - marzo 2008.

Carril 1: marcador 50 pb Ladder (Novagen, Inc.), carril 2: *S. pneumoniae* 33, carril 3: *S. pneumoniae* 27, carril 4: *S. pneumoniae* 47, carril 5: *S. pneumoniae* 60, carril 6: *S. pneumoniae* 54, carril 7: *S. pneumoniae* 34, carril 8: *S. pneumoniae* 20, carril 9: *S. pneumoniae* 52, carril 10: control positivo.

DISCUSIÓN

La nasofaringe de los niños normalmente esta colonizada por una variedad de bacterias no patógenas entre las que se encuentran: *Streptococcus* del grupo viridans, *Streptococcus* no hemolíticos y difteroides, y por patógenos como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis*. En la mayoría de los casos, estas especies se encuentran colonizando, sin producir síntomas clínicos; sin embargo, cuando ocurre un desequilibrio entre la relación bacteria-hospedero, éstas pueden establecerse como causantes de cuadros clínicos (Bogaert *et al.*, 2006).

La presente investigación reveló que a nivel nasofaríngeo el 75,5% de los niños estaban colonizados por bacterias, destacándose como los más prevalentes *M. catarrhalis* (28,6%) y *S. pneumoniae* (26,5%). Este hecho puede deberse a la existencia en la población infantil de factores de riesgos que predisponen a la colonización, tales como: la presencia de síntomas clínicos asociados a procesos infecciosos, el predominio de niños menores de 6 años, el hacinamiento, entre otros. A nivel nacional e internacional se han realizado diversos estudios con el propósito de evaluar la presencia de bacterias patógenas en la población infantil (Faden *et al.*, 1997; O'Brien *et al.*, 2004; Hanna *et al.*, 2006). No obstante, son escasos los reportes de patógenos a nivel respiratorio en las poblaciones indígenas en el país.

A nivel nacional, Del Nogal *et al.* (2006), reportaron un 42,7% de niños indígenas waraos portadores de *S. pneumoniae* en el estado Delta Amacuro. Así mismo, Rivera *et al.* (2007) reportaron un 45,0% de niños waraos menores de 6 años portadores de *S. pneumoniae* en 9 comunidades indígenas ubicadas en el estado Delta Amacuro. Los resultados de esta investigación coinciden con los reportados por los autores, ya que se demostró la presencia de portadores de *S. pneumoniae* en

los niños waraos del estado Sucre. Con respecto a *S. aureus*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis*, actualmente, no se tienen reportes a nivel nacional de la presencia de estas especies en poblaciones indígenas. A nivel internacional, el estado de portador de *H. influenzae* ha sido reportado en niños indígenas navajos de los Estados Unidos, mientras que *S. aureus* y *M. catarrhalis*, se han reportado en niños escolares de comunidades indígenas de Australia (Millar *et al.*, 2000; Vlack *et al.*, 2006; Mackenzie *et al.*, 2008)

En la población no indígena, el estado de portador para *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *S. aureus* y *H. influenzae* en niños menores de 5 años varía entre 10,0 y 55,0%. Se ha establecido que la edad es un factor epidemiológico que juega un papel relevante en la colonización, ya que la mayoría de los casos de muerte e infección respiratoria se presenta en niños menores de 5 años, especialmente, si se encuentra asociada a algunos factores de riesgo, como: hacinamiento, falta de normas higiénicas, uso de antibióticos, entre otros (Faden *et al.*, 1997; Shimada *et al.*, 2003). En este trabajo, la mayoría de las especies estaban colonizando los niños menores de 6 años, excepto *S. aureus*, el cual se presentó sólo en el grupo de niños mayores de 6 años.

La presencia de las especies en el grupo de niños de 0-5 años, está condicionada a que en este grupo etario, el sistema inmunológico no está completamente desarrollado, a la existencia de alteraciones fisiológicas y anatómicas en el tracto respiratorio superior, aunado a las condiciones en que vive esta etnia. El hecho que sólo *S. aureus* se presentó en el grupo de 6 a 10 años, contrarresta con los reportes observados en poblaciones no indígenas, donde se ha establecido que *S. aureus* se presenta con mayor frecuencia colonizando niños menores de 6 años. Debido a que no se tiene referencia sobre el estado de portador en poblaciones indígenas, en este caso, el hallazgo se puede considerar como un evento al azar.

Al asociar estadísticamente la presencia de bacterias con un grupo etario en particular se encontró asociación estadística muy significativa para *M. catarrhalis*, se ha reportado que la colonización por esta especie se establece a edades muy tempranas y disminuye paulatinamente hacia la edad adulta, esto debido a la producción de una respuesta inmune específica (IgG) en el individuo contra este patógeno (De Lencastre *et al.*, 1999). Aún cuando el análisis estadístico no reveló asociación entre *S. pneumoniae* y el grupo etario de 0-5 años, los resultados reflejan que el 76,9% (10/13) se presentó en este grupo. Estos resultados coinciden con los reportados por Leach *et al.* (1994), Del Nogal *et al.* (2006) y Rivera *et al.* (2007) en poblaciones indígenas.

El hacinamiento es considerado el mayor factor de riesgo para la colonización y diseminación de cepas patógenas a nivel respiratorio (Bogaert *et al.*, 2004). De acuerdo con los resultados obtenidos en las encuestas epidemiológicas, la mayoría de los niños vivían en casas plurifamiliares, lo que constituye, un hacinamiento natural en la comunidad, razón por la cual, en el presente trabajo no se pudo establecer la asociación estadística entre la presencia de los patógenos respiratorios aislados y esta variable epidemiológica. Sin embargo, al agrupar a los niños en dos categorías basadas en el número de individuos que habitaban en cada casa, se encontró en ambos grupos la presencia de bacterias, con un predominio de las mismas en el grupo donde habitaban hasta 15 indígenas por casa. Al respecto, Rivera *et al.* (2007) en un estudio realizado en 9 comunidades indígenas waraos del estado Delta Amacuro, reportaron diferentes tasas de colonizadores nasofaríngeos de *S. pneumoniae* en cada comunidad estudiada. En su mayoría, en estas comunidades las condiciones de hacinamiento eran similares, razón por la cual, no está claro el papel que juega el hacinamiento en la colonización por patógenos en las comunidades indígenas.

En este trabajo, se observó que el 34,7% de los niños presentaron síntomas asociados a cuadros clínicos no específicos para estos patógenos, destacándose el síndrome gripal con un 76,5% como el más frecuente en la población infantil. El síndrome gripal es causado principalmente por los virus, los cuales juegan un papel importante en la colonización de patógenos respiratorios, debido a que producen daño al epitelio del tracto respiratorio del hospedero, disminuyen de la actividad ciliar, además estructuralmente presentan ciertas proteínas virales como la neuroaminidasa, que facilita la unión de las bacterias a las células, exponiendo residuos que son utilizados por las especies patógenas como receptores de la adherencia (Arrevillaga y Gómez, 2006).

La colonización es un evento que depende de los factores de virulencia presente en las bacterias, sobre todos aquellos relacionados con la adherencia.

En *S. pneumoniae*, la unión a los receptores de las células epiteliales está determinada por la proteína de superficie A y la liberación de proteasa tipo IgA, la cual hidroliza e inactiva la IgA presente en la mucosa (Prado, 2001). Con respecto a *M. catarrhalis*, la adherencia al epitelio respiratorio, va a estar mediada por proteínas de membrana externa, como la proteína CD, la cual se une a la mucina presente en la nasofaringe y la proteína de superficie oblicua A1 (UspA₁) que se une a los receptores expuestos en las células epiteliales (Verduin *et al.*, 2002)

En relación a *H. influenzae*, la adherencia está determinada por la existencia de fimbrias, proteínas de membrana externa, proteasa IgA y adhesinas, las cuales se unen a los receptores de origen polisacárido facilitando la colonización y permanencia en la nasofaringe (Moxon y Wilson, 1997). En *S. aureus* los antígenos de la pared bacteriana como la proteína A, permiten la adherencia de esta especie bacteriana a la mucosa de las células epiteliales (McNelly y Coonrod, 1993).

En este estudio no se puede afirmar que las especies bacterianas identificadas sean responsables de los cuadros clínicos presentados por los niños, ya que la gran mayoría de ellos fueron cuadros gripales, pero si se puede inferir, que el establecimiento de los cuadros clínicos favorece la colonización por estos patógenos. La presencia de patógenos a nivel nasofaríngeo, sobre todo aquellos con capacidad invasora conocida (*S. pneumoniae* y *H. influenzae*), constituyen un riesgo en la población infantil, es por esta razón, que la identificación de patógenos a nivel nasofaríngeo, es de suma importancia para conocer las posibles bacterias asociadas a cuadros clínicos y predecir su comportamiento como responsables de cuadros invasivos en la comunidad.

La resistencia a ciertos antimicrobianos por parte de algunos patógenos respiratorios, es un problema creciente que compromete desde el punto de vista clínico el tratamiento empírico de las infecciones respiratorias a nivel comunitario. Los patógenos respiratorios aislados en esta investigación en su mayoría se mostraron sensibles a los antimicrobianos ensayados. Se encontró que *S. pneumoniae* presentó resistencia a varios antimicrobianos, entre los que se encuentran tetraciclina, clindamicina trimetoprim-sulfamatoxazol y penicilina. Rivera *et al.* (2007) reportaron menores porcentajes de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina

En *S. pneumoniae* la resistencia a la penicilina, esta mediada por alteraciones estructurales de la pared celular bacteriana. Se han identificado, al menos, cuatro proteínas fijadoras de penicilina (PBP, por sus siglas en inglés penicillin binding protein), con alteraciones a nivel estructural que disminuyen su afinidad para unirse al antimicrobiano. Estas alteraciones son generadas por mutaciones en los genes localizados en el cromosoma bacteriano, que codifican a dichas proteínas (Hermans *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2000).

La presencia de cepas de *S. pneumoniae* resistente a la penicilina, es un hallazgo que complica la conducta terapéutica de las infecciones producidas por este microorganismo a nivel comunitario (Doherty *et al.*, 2000). La penicilina ha sido el tratamiento de elección en las diferentes infecciones causadas por *S. pneumoniae*, debido a su excelente actividad bactericida (Quintero *et al.*, 2004). Encontrar cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina en la población indígena, es un hecho relevante, ya que es de suponer que la comunidad indígena está expuesta a una presión selectiva generada por el uso de penicilina. Esta hipótesis fue corroborada al observar que para el tratamiento de simples cuadros gripales a la comunidad se le administra amoxicilina y ampicilina como tratamiento.

En este trabajo se encontró que todas las cepas de *M. catarrhalis* fueron resistentes a penicilina y ampicilina con producción de betalactamasas, hecho que pudiera estar relacionado con la presión selectiva ejercida por el uso indiscriminado de amoxicilina y ampicilina. Las cepas de *M. catarrhalis*, en general, son productoras de diversas betalactamasas. La expresión de las betalactamasas en *M. catarrhalis* es inducible y se han reportado tres tipos: BRO-1, BRO-2 y BRO-3, la primera se encuentra en el 90,0% de las cepas, las dos últimas en el 10,0% restante. Las tres son de amplio espectro, hidrolizan penicilina, ampicilina, metilina y cefaclor (Christensen *et al.*, 1991; Felmingham y Gruneberg, 2000).

En la presente investigación el diagnóstico molecular realizado a las 21 cepas alfa hemolíticas reveló la presencia del gen *cpsA* en todas las cepas. Al comparar los resultados del diagnóstico molecular con los microbiológicos se observó la existencia de 8 cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la optoquina.

El diagnóstico de *S. pneumoniae* depende, principalmente, de la realización de pruebas microbiológicas, como la sensibilidad a la optoquina y solubilidad en bilis;

sin embargo, la emergencia de cepas resistentes (atípicas) a este compuesto, dificulta el diagnóstico, generando resultados falsos negativos, es por esta razón, que a todos aquellos microorganismos alfa hemolíticos resistentes a la optoquina, se les debe realizar una identificación molecular que determine la presencia de genes específicos de *S. pneumoniae*, con el propósito de confirmar los casos (Murray *et al.*, 1999).

La resistencia a la optoquina se origina por mutaciones puntuales en los genes *atp* que codifican las sub-unidades *c* y *a* de la ATPasa. Fenoll *et al.* (1994) reportaron mutaciones en los genes *atpC*, las cuales originan cambios de aminoácidos en las posiciones 48, 49 y 50 de la sub-unidad *c* de la ATPasa. Pikis *et al.* (2001), reportaron mutaciones en las posiciones 20 y 23 de la sub-unidad *a*, mientras que Cortés *et al.* (2008) reportaron la presencia de cambios de aminoácidos en ambas sub-unidades.

El origen de la resistencia a la optoquina aun no está claro, pero se infiere que al igual que todas las resistencias adquiridas por los microorganismos sea favorecida por la presión selectiva. Esta hipótesis surge del hecho de que la optoquina empleada en el diagnóstico microbiológico, tiene una composición similar a la quinina o mefloquinina utilizadas en el tratamiento y profilaxis de la malaria en zonas endémicas (Pikis *et al.*, 2001, Nunes *et al.*, 2008). Al respecto, es de interés señalar, que el municipio Benítez del estado Sucre, se caracteriza por ser zona endémica de malaria (Cáceres *et al.*, 2005), por lo que la presión selectiva generada en la zona, debido a la implementación del tratamiento malárico, pudiera ser la causa que induzca a la aparición de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la optoquina.

El presente estudio demuestra la importancia que tiene monitorear los principales patógenos causante de cuadros respiratorios en la población infantil de la comunidad indígena María López, así como conocer los patrones de susceptibilidad antimicrobiana que circulan en dicha comunidad, además señala la importancia de

realizar un diagnóstico complementario a las pruebas microbiológicas convencionales empleadas para identificar *S. pneumoniae*.

CONCLUSIONES

El 75,5% de los niños indígenas estudiados están colonizados a nivel nasofaríngeo por bacterias patógenas.

M. catarrhalis y *S. pneumoniae* fueron las especies mayormente aisladas en los niños menores de 5 años, mientras que *S. aureus* solo identificó en niños mayores de 6 años.

Sólo se encontró asociación estadística entre la presencia de *M. catarrhalis* con la edad y la presencia de clínica.

Las cepas de *S. aureus* fueron sensibles a todos los antimicrobianos ensayados. *S. pneumoniae* presentó resistencia a penicilina, clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina, y *M. catarrhalis* resistencia a ampicilina y penicilina.

La prueba de PCR permitió identificar la presencia de *S. pneumoniae* resistente a la optoquina en los niños indígenas waraos.

RECOMENDACIONES

Continuar realizando los estudios dirigidos a determinar el estado de portador de patógenos bacterianos en poblaciones indígenas, con la finalidad de incrementar y establecer datos específicos en los registros de morbilidad sobre la prevalencia de infecciones respiratorias.

Mantener una vigilancia epidemiológica para identificar los serotipos presentes entre las cepas circulantes de *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, para así implementar los programas de inmunización que beneficiarían a la población infantil Warao.

A todos los aislamientos alfa hemolíticos que presenten resistencia a la optoquina se le deben aplicar la prueba de solubilidad en bilis y, si es posible, realizar adicionalmente pruebas más sensibles y específicas.

BIBLIOGRAFÍA

Arrevillaga, G. y Gómez, B. 2006. Aspectos moleculares de coinfecciones de virus respiratorios con bacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 26(4): 115-122.

Bogaert, D.; De Groot, R. y Hermans, P. 2004. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(3): 144-154.

Bogaert, D.; Sluijter, M. Lemmens, N.; Mitchell, T.; Goessens, W. y Clarke, S. 2006. Dynamics of pneumococcal colonization in healthy dutch children. *Microbiology*, 152: 377-385.

Cáceres, J.; Pizzo, N.; Vela, F.; Pérez, W.; Rojas, J. y Mora, J. 2005. Impacto de la cura radical masiva sobre la incidencia malárica del estado Sucre, Venezuela". *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 45: 27-36.

Christensen, J.; Keiding, J.; Shumacher, H. y Bruun, B. 1991. Recognition of a new *Branhamella catarrhalis* beta-lactamase-BRO-3. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 28: 774-775.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Eightieth Informational Supplement M100-S18. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards. USA.

Cortes, P.; Albarracín, A.; Regueira, M.; Piñas, G., y Echenique, J. 2008.

Characterization of in vitro-generated and clinical optochin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Argentina. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6): 1930-1934.

De Abajo, F. 2001. La declaración de Helsinki VI. *Revista Española Salud Pública*. 75: 407-420.

De Lencastre, H.; Kristinsson, K.; Brito, A.; Sanchez, I.; Sa Leao, R. y Saldaña, J. 1999. Carriage of respiratory tract pathogens and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* colonization in healthy children attending day care centers in Lisbon, Portugal. *Microbial Drug Resistance*, 5: 19-29.

Del Nogal, B.; Vigilanza, P.; Rivera, I.; Bello, T. y Waard, J. 2006. Estado de portador de *Streptococcus pneumoniae* y morbilidad por infecciones respiratorias agudas en la población infantil Warao. *Pedicultura y Pediatría*, 69(1): 5-10.

Doherty, N.; Trzcinski, K.; Pickerill, P.; Zawadzki, P. y Dawson, C. 2000. Genetic diversity of the *tet(M)* gene in tetracycline-resistant clonal lineages of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(11): 2979-2984.

Faden, H.; Duffy, L.; Wasielewski, R.; Wolf, J.; Krystofik, D. y Tung, Y. 1997. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *Journal of Infectious Diseases*, 175: 1440-1445.

Faden, H.; Duffy, L.; Williams, A.; Krystofik, D. y Wolf, J. 1995. Epidemiology of nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* in the first two years of life. *Journal of Infectious Diseases*, 172: 132-135.

Felmingham, D. y Gruneberg, R. 2000. The Alexander project 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45: 191-203.

Fenoll, A.; Muñoz, R.; García, E. y De la Campa, A. 1994. Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: characterization of the genes encoding the F₀ complex of the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H-ATPases. *Molecular Microbiology*, 12: 587-598.

Forbes, B.; Sahn, D. y Weissfeld, A. 2004. *Bailey Scott Diagnóstico Microbiológico*. Décima primera edición. Editorial Médica Panamericana. México, DF.

Fuchs, S.; Fischer, G.; Black, R. y Lanata, C. 2005. The burden of pneumonia in children in Latin America. *Paediatric Respiratory Reviews*, 6: 83-87.

García, J. y Fresnadillo, M. 2002. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(2): 9-73.

García, J.; Muñoz, J. y Gutiérrez, N. 2001. Patrones de resistencia en patógenos respiratorios de la comunidad de España. *Medicina Clínica*, 2(2): 3-9.

Guidolin, A.; Morona, J.; Morona, R.; Hansman, D. y Paton, J. 1994. Nucleotide sequence analysis of genes essential for capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 19F. *Infection and Immunity*, 62: 5384-5396.

Hanna, J.; Humphreys, J. y Murphy, D. 2006. Invasive pneumococcal disease in indigenous people in north Queensland, 1999–2004. *The Medical Journal of Australia*, 184: 118-121.

Hermans, P.; Sluijter, M.; Dejsirilert, S.; Lemmens, N.; Elzenaar, K.; Van Veen, A.; Goessens, W. y Groot, R. 1997. Molecular epidemiology of drug-resistant pneumococci: toward an international approach. *Microbial Drug Resistance*, 3: 243-251.

Hucker, G. y Coon, H. 1923. Methods of Gram staining. *Technical bulletin New York State Agriculture Experimentation*, 93(5): 1-37.

Kadioglu, A.; Taylor, S.; Lannelli, F.; Pazzi, G.; Mitchell, T. y Andrew, P. 2002. Upper and lower respiratory tract Infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infection and Immunity*, 70(6): 2886-2890.

Koneman, E.; Allen, S.; Procop, G.; Jonda, W.; Schrenckenberger, P.; Woods, G. y Winn, W. 2008. *Diagnóstico microbiológico*. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. México, DF.

Kontiainen, S. y Sivonen, A. 1987. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from blood and middle ear fluid. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 6: 422-424.

Lawrence, E.; Griffiths, D.; Martin, S.; George, R. y Hall, L. 2003. Evaluation of semiautomated multiplex PCR assay for determination of *Streptococcus*

pneumoniae serotypes and serogroups. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 601-607.

Leach, A.; Boswell, J.; Asche, V.; Nienhuys, T. y Mathews, J. 1994. Bacterial colonization of the nasopharynx predicts very early onset and persistence of otitis media in Australian Aboriginal infants. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 13: 983-989.

Mackenzie, G.; Carapetis, J.; Leach, A. y Morris, P. 2008. Neumococcal vaccination and otitis media in Australian aboriginal infants: comparison of two birth cohorts before and after introduction of vaccination. *Biomed Central Pediatrics*, 9(14): 1-11.

McNelly, T. y Coonrod, J. 1993. Comparison of the opsonic activity of human surfactant protein A for *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* with rabbit and human macrophages. *Journal Infectious Diseases*, 167: 1-97.

Meats, E.; Brueggemann, A.; Enrigh, M.; Sleeman, K.; Griffiths, D.; Crook, D. y Spratt, B. 2003. Stability of serotypes during nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1): 386-392.

Medina, G.; Arnaboldi, P.; Natera, A.; El Halabi, Z. y Noval, C. 2007. Morbilidad en la población indígena Warao de San José de Buja, Municipio Maturín, Monagas. *XIV Congreso de la Sociedad Venezolana de Medicina Interna*: 1-13.

Millar, E.; O'Brien, K.; Levine, O.; Kvamme, S.; Reid, R. y Santosham, M. 2000. Elimination of *Haemophilus influenzae* type b carriage and disease among high-risk American Indian Children. *American Journal of Public Health*, 90(10):

Acute respiratory infections, bacterial respiratory infections, *Streptococcus pneumoniae*". "Organización Mundial de la salud." <http://www.who.int/vaccineresearch/documents/new_vaccines> (15/04/05).

Pai, R.; Gertz, R. y Beall, B. 2006. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(1): 124-131.

Phillips, G.; Barker, R. y Brogan, O. 1988. Optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *The lancet Infectious Diseases*, 2: 281.

Pikis, A.; Rodriguez, W.; Campos, J. y Keith, J. 2001. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanism, significance, and clinical implications. *The Journal of Infectious Diseases*, 184: 582-590.

Pittman, M. 1999. Variation and type specificity in the bacterial specie *Haemophilus influenzae*. *The Journal of Experimental Medicine*, 53: 471- 492.

Prado, V. 2001. Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. *Revista Chilena de Infectología*, 18: 6-9.

Quintero, B.; Araque, M.; Valeri, E. y Quintero, L. 2004. Epidemiología y caracterización fenotípica y serológica de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina provenientes de portadores nasales. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 46(1): 2-7.

Rivera, I.; Bogaert, D.; Bello, T.; Del Nogal, B.; Sluijter, M.; Hermans, P. y Waard, J. 2007. Pneumococcal carriage among indigenous Warao children in

Venezuela: serotypes, susceptibility patterns, and molecular epidemiology. *Clinical Infectious Diseases*, 45: 1427-1434.

Shimada, J.; Yamaka, N.; Hotomi, M.; Suzumoto, M.; Sakai, A. y Ubukata, K. 2003. Household transmission of *Streptococcus pneumoniae* among siblings with acute otitis media. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5): 1851-1853.

Sokal, R. y Rohlf, F. 1979. *Biometría principios y métodos estadísticos en investigación biológica*. Hernan Blume editorial. Barcelona.

Verduin, C.; Hol, C.; Fler, A.; Van Dijk, H. y Van Belkum, A. 2002. *Moraxella catarrhalis*: from emerging to established pathogen. *American Society for Microbiology*, 15: 125-144

Vlack, S.; Cox, L.; Peleg, A.; Canuto, C.; Stewart, C.; Conlon, A.; Stephens, A.; Giffard, P.; Huygens, F.; Mollinger, A.; Vohra, R. y McCarthy, J. 2006. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Queensland Indigenous community. *The Medical Journal of Australia*, 184(11): 556-559.

Williams, B.; Gouws, E. y Boschi-Pinto, C. 2002. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 2: 25-32.

Zhao, G.; Meier, T.; Hoskins, J. y McAllister, K. 2000. Identification and characterization of the penicillin-binding-protein 2a of *Streptococcus pneumoniae* and its possible role in resistance to beta-lactam antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6): 1745-1748.

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título: Diagnóstico clínico y de laboratorio en la población indígena Warao “María López, parroquia Unión, municipio Benítez, estado Sucre.

Coordinación: Profesora Militza Guzmán.

Teléfonos: 0424-8252742

Instituciones: PDVSA GAS DISTRITO SOCIAL SUCRE ESTE Y Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Sr(a): _____, antes de que usted decida tomar parte en este estudio de diagnóstico de salud, es importante que reciba la siguiente información.

Bajo la supervisión de los profesores Militza Guzmán, Del Valle Guilarte, Erika Gómez, Elsa Salazar, y José Betancourt, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, se discutirá con usted el propósito de este estudio y se le explicarán todos aquellos puntos en los que tenga dudas. Si después de haber recibido toda la información usted decide participar, deberá firmar este consentimiento en el lugar indicado.

El objetivo general del estudio es: Determinar la prevalencia de parasitosis intestinales, tuberculosis, infecciones respiratorias, dengue, HIV, infecciones urinarias, malaria y evaluar el estado nutricional en la población indígena Warao “María López” de la parroquia Unión, municipio Benítez, estado Sucre.

Su colaboración consistirá en donar de forma voluntaria una muestra de sangre (10 ml), de heces, de orina, exudado nasofaríngeo y de esputo. La sangre será extraída por punción venosa, con previa asepsia del antebrazo por un bioanalista, lo que no implica ningún riesgo para su salud.

Además, es necesario que sepa que la muestra de sangre será utilizada única y

exclusivamente para la determinación de parámetros hematológicos, bioquímicos, para la detección de *Plasmodium* (parásitos causantes de la malaria o paludismo) y de anticuerpos anti-Micoplasma. La muestra de heces.

Yo: _____, C.I:
_____, de nacionalidad _____, de estado civil:
_____ y domiciliado en: _____. Siendo mayor de edad y en pleno uso de mis facultades mentales y sin que nadie me obligue, declaro:

1. Haber sido informado(a) de forma clara y sencilla de todos los aspectos relacionados con el estudio.
2. Tener conocimiento claro de que el objetivo general del estudio.
3. Que el equipo que realiza el estudio me ha garantizado confidencialidad relacionada, tanto con mi identidad como con toda información relativa a mi persona.
4. 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 estudio.
5. Que el beneficio principal que obtendré, será recibir el reporte de los exámenes de laboratorio, el diagnóstico clínico y tratamiento en caso de requerirlo.

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO

Después de haber sido informado(a) y aclarado mis dudas con respecto al estudio, autorizo voluntariamente la toma de las muestras (sangre, heces, orina, exudado nasofaríngeo y esputo) y procesamiento de las mismas.

Nombres y Apellidos _____ C.I: _____

Firma: _____

En _____ a los _____ días del mes de _____ de
2007.

ANEXO 2

EVALUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

DATOS PERSONALES																			
FECHA DE EVALUACIÓN		DÍA:																	
		MES:																	
		AÑO:																	
NOMBRES			APELLIDOS:			EDAD		SEXO		F		M							
FECHA DE NAC.:		LUGAR:		SOLT		CAS		VIU		DIVORCI		CONCUB							
DIRECCIÓN:																			
														TELÉFONO					
OCUPACIÓN /PROFESIÓN			NIVEL DE INSTRUCCIÓN		NINGU		PRIMA		SECUND		SUPERIO								
VIDA SOCIAL		NING		OCAS		SEML		MENS		ANU		NS							
TIPO DE VIVIENDA																			
UNIFAMILIAR								PLURIFAMILIAR											
Nº DE FAMILIAS QUE VIVEN EN LA VIVIENDA.																			
Nº DE PERSONAS QUE VIVEN EN LA CASA																			
Nº DE NIÑOS QUE VIVEN EN LA CASA																			
SERVICIOS DE AGUAS:																			
DISPOSICIÓN DE EXCRETAS																			
SUFRE FRECUENTEMENTE DE CUADROS GRIPALES																			
ASISTE A LA ESCUELA																			
ANTECEDENTES FAMILIARES																			
HTA	Si		No		DM	Si		No		Asma	Si		No		Cardio	Si		No	
Convulsión	Si		No		Lumbalgia	Si		No		Lentes	Si		No		Oftalmo	Si		No	
Hospitalización	Si		No		Quirurgico	Si		No		Trauma	Si		No		Paludismo	Si		No	
Alergias	Si		No		Hemorroides	Si		No		Drogas	Si		No		TBC	Si		No	
Otros:																			
Observaciones:																			

INTERROGATORIO FUNCIONAL			
General (Peso/Fiebre)		Cabeza:	Cuello
Ojos:		O.R.L.	
Cardiopulmonar:	Gastrointestinal:	Genitourinario:	
Muscoloesqueletico (columna)		Neurológico:	Otros:
ALIMENTACIÓN: CARNES PESCADO VERDURAS			

EVALUACION MÉDICA.

EXAMEN FISICO											
T.A.	Pie	/	Sentado	/	Acostado	/	F.C.	F.R.	Peso	Talla	
IMC:				Piel:				Cabeza:			
Tensión:				Temperatura				Malestar general			
gripe				Dolor en el pecho				rinorea			
Ojos	VOD:			VOI:		Tonometria:		Daltonismo:		Lentes:	
Audición	Oído D			Oído I		Membrana Timp		CAE			
Boca:						Garganta:					
Cuello:											
Tórax				Insp. Forzada				Esp. Forzada			
Examen pulmonar						Pulso:					
Neurológico:											
Abdomen (Omblogo, inguinal, crural):											
Coordinación marcha	Rápida		Lenta		Fácil		Torpe		Recta		Oscila
Neurológico (Fuerza, reflejos, coordinación, campo visual, reflejo pupilar, marcha de Romberg, coordinación dedo nariz, etc.)											
IMPRESIÓN DIAGNÓSTICA:											
SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA:											
TRATAMIENTO APLICADO:											
FIRMA DEL MÉDICO						FECHA:					

HOJA DE METADATOS

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

Título	Aislamiento de bacterias patógenas en la nasofaringe de niños de la comunidad indígena María López-estado Sucre
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Antón C., Karen A.	CVLAC	18416225
	e-mail	aleja2602@hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Patógenos respiratorios, Nasofaringe, Warao.

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

En el presente estudio se evaluó la presencia de bacterias patógenas en el tracto respiratorio superior de niños indígenas waraos con edades comprendidas entre 0 y 10 años, que habitaban en la comunidad de María López, Municipio Benítez del estado Sucre, durante los meses enero-marzo de 2008. La identificación de las especies bacterianas se realizó mediante las técnicas microbiológicas convencionales. Para determinar la susceptibilidad antimicrobiana se empleó el método de difusión en disco, según los lineamientos del Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos. La identificación molecular de *S. pneumoniae* se determinó por la técnica de PCR, empleando oligonucleótidos específicos para el gen *cpsA*. El estudio microbiológico reveló la presencia de los siguientes microorganismos: *M. catarrhalis* (28,6%), *S. pneumoniae* (26,5%) *S. aureus* (14,3%) y *H. influenzae* (6,1%), tanto en niños con y sin sintomatología. El gen *cpsA* se identificó en 21 cepas alfa hemolíticas. Con respecto a la susceptibilidad antimicrobiana se encontraron cepas de *S. pneumoniae* resistentes a tetraciclina (46,2%), trimetoprim-sulfametoxazol (38,5%), clindamicina (33,3%) y penicilina (23,1%). Todas las cepas de *M. catarrhalis* fueron productoras de betalactamasas y resistentes a ampicilina y penicilina; el resto de los microorganismos fueron sensibles a los antimicrobianos ensayados. Se encontró asociación entre la presencia de *M. catarrhalis* con la edad y los cuadros clínicos. La presencia de bacterias patógenas a nivel nasofaríngeo en la población infantil, representa un riesgo para el establecimiento de infecciones severas del tracto respiratorio.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Militza Guzmán	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> T <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	miltzaguz@cantv.net
	e-mail	
Yasmina Araque	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	yamasi40@hotmail.com
	e-mail	
Luzmila Alvarado	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	luzalv@hotmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2009	06	26
------	----	----

Lenguaje: spa

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TG-KAAC.doc	Application/Word

Alcance:

Espacial: Universal (Opcional)

Temporal: Intemporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciada en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio:

Bioanálisis

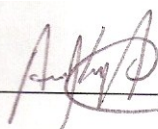
Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente

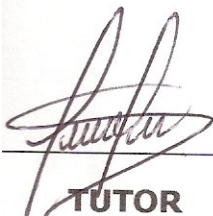
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

Para publicar título y resumen únicamente en la página web.



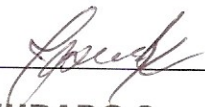
AUTOR 1



TUTOR



JURADO 1



JURADO 2

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:

