



UNIVERSIDAD ANDINA SIMÓN BOLÍVAR

SEDE CENTRAL

Sucre-Bolivia

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN

“ANÁLISIS CLÍNICOS – IV Versión”

**“MICROBIOTA EN NIÑOS DE 5 A 14 AÑOS
CON Y SIN TRIPANOMIASIS AMERICANA
DE LA POBLACIÓN DE TARABUCO BOLIVIA 2013”**

Tesis presentada para obtener el
Grado Académico de Magister
en “Análisis Clínicos”

MAESTRANTE: *Doris Patricia Maldonado Araujo*

SUCRE-BOLIVIA

2014



UNIVERSIDAD ANDINA SIMÓN BOLÍVAR

SEDE CENTRAL

Sucre-Bolivia

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN

“ANÁLISIS CLÍNICOS – IV Versión”

**“MICROBIOTA EN NIÑOS DE 5 A 14 AÑOS
CON Y SIN TRIPANOMIASIS AMERICANA
DE LA POBLACIÓN DE TARABUCO BOLIVIA 2013”**

Tesis presentada para obtener el
Grado Académico de Magister
en “Análisis Clínicos”

MAESTRANTE: *Doris Patricia Maldonado Araujo*

TUTOR: *Dra. María Gloria Domínguez Bello*

SUCRE-BOLIVIA

2014

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas de instituciones, sin cuya colaboración hubiera sido imposible la realización del presente estudio, en especial agradezco al proyecto Microbioma Humano Dr. Martin Bléiser docente de la Universidad de New York Facultad de Medicina por el financiamiento de la investigación y todas las orientaciones brindadas a Lana Mazzal por la secuenciación de las muestras en el laboratorio de Biología Molecular en la Universidad de New York.

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas Directora Dra. Mary Cruz Mojica por el apoyo brindado en la fase pre analítica y el tiempo amablemente brindado en la revisión del trabajo.

Al Hospital Dr. Ricardo Bacherer del Municipio de Tarabuco por ser una institución que me permitió realizar la presente investigación Directora Dra. Lidia Daza, Medico Dr. Enrique Melgarejo médico internista, Aux. Paulino Galarza, a mis compañeras de trabajo Lic. Nelly Martínez, Lic. Martha Estévez por el apoyo brindado

Al plantel docente de la escuela Rosalía Viuda de Antezana y colegio Aniceto Arce.

A mi familia por todo el apoyo brindado y la paciencia de mi esposo e hijos.

A mi tutora:

Doctora María Gloria Domínguez Bello por ser una excelente profesional que me brindo su colaboración en la realización del presente trabajo, quien me guio y brindo sus conocimientos de manera responsable, por la paciencia, entrega y apoyo hasta la culminación de la tesis de maestría

DEDICATORIA

A mis queridos padres:

Mario Maldonado Loayza

María Luisa Araujo Loayza

Quienes con su constante amor, apoyo, bendición

Contribuyeron a ser realidad la culminación de mis Estudios superiores.

A mis hijos:

Luis y Emanuel

Por darme cariño en los momentos más difíciles de mi vida.

A mi esposo:

Alfredo Villarreal

Por la comprensión, apoyo y paciencia brindada durante el proceso de estudio

RESUMEN

Introducción.-La enfermedad de Chagas es una enfermedad parasitaria tropical, causada por el protozoo Trypanosoma cruzi, se transmite a los seres humanos y animales a través de los insectos triatomíneos. El Chagas es un problema importante de salud pública a nivel mundial con 10 millones de personas infectadas, de los cuales, 8 millones son diagnosticados principalmente en las áreas rurales de América Latina. La mayoría de los pacientes con enfermedad crónica sufren cardiopatías, de los casos detectados el 6% presenta manifestaciones gastrointestinales tales como el megacolon (OPS 2003).

La microbiota humana ofrece importantes funciones inmunes y metabólicas, se desconoce si existe alteración de la misma en niños infectados con Chagas.

Objetivo.-Por todos los antecedentes referidos la presente investigación asumió como objetivo el determinar las diferencias en la microbiota gastrointestinal, oral y dérmica en niños con y sin la enfermedad de Chagas y el efecto del tratamiento sobre la microbiota.

Metodología.-Para tal efecto se tomó una población total de 1.102 niños que oscilan en el rango de edad de 5 a 14 años; en una primera fase una muestra de 543 a los cuales se realizó diagnóstico de Chagas resultando en 20 casos positivos y 523 negativos, por criterios de inclusión y exclusión, en una segunda fase se tomó una muestra de 16 niños positivos con Chagas y 35 negativos; finalmente se asumió en una tercera fase de investigación quedaron para la tercera fase 12 niños positivos con post tratamiento; y 22 niños como grupo negativo post tiempo.

Se obtuvieron hisopeados de varios sitios corporales (piel, oral, gastrointestinal), se extrajo y amplificó el ADN utilizando cebadores 515F806R para la región V3-V4 del 16S rRNA. Las ampliaciones fueron secuenciadas utilizando Illumina MiSeq.

De todo este proceso se arribó al análisis exhaustivo de las muestras utilizando la plataforma QIIME

Resultados.- Las muestras de piel presentan mayor diversidad de especies bacterianas, seguido de muestras de heces (gastrointestinal) y orales. No hubo diferencias significativas entre hombres y mujeres o por grupos de edad, tampoco a nivel comunitario; sin embargo cabe destacar que, a través de un análisis más profundo

gracias a la utilización del LEFSE, a nivel bacteriano algunas bacterias individuales presentaron cambios.

Conclusiones.- Se concluye que la prevalencia de Chagas en la población estudiada, es de 3,7% no existe diferencia estadística significativa entre el Chagas, la edad y el sexo

La cantidad de microbiota por sitio corporal no varía significativamente, antes y después del tratamiento. El sitio bacterial más diverso es la piel con 320 especies, seguido por gastrointestinal con 200, finalizando con la mucosa oral que presenta 100. Los niños infectados no difieren de los no infectados en la diversidad de microbiota gastrointestinal, oral o de piel a nivel de comunidades pero si a nivel del género de bacterias. Cabe destacar que si se diesen las posibilidades de continuar con mayores secuenciaciones se podría llegar a obtener mayor profundidad en análisis de datos con respecto a la microbiota con especies.

En la cantidad de especies de microbiota gastrointestinal por sexo en niños con y sin Chagas no hay variación por sexo, evidenciando una riqueza de ~200 (+ 100) especies bacterianas.

El efecto del tratamiento de Tripanosomiasis americana con Benznidazol altera la microbiota, sobre todo en piel, seguido por microbiota oral y gastrointestinal, presumiblemente sea un motivo para las reacciones adversas al tratamiento a nivel dermatológico por alteración de la microbiota.

Se recomienda por tanto incrementar investigaciones sobre la microbiota y su asociación con síntomas clínicos. Ya que la prevalencia con respecto a otros entornos internacionales es mayor, situación que convierte a esta enfermedad en prioridad de salud en el entorno nacional. Como también emprender investigaciones sistemáticas ya que el presente estudio ha llegado a estudiar el microbioma a nivel de comunidad, sin embargo se requieren nuevos emprendimientos científicos que den continuidad al estudio realizado profundizando aún más hasta el estudio de especies.

Y dar continuidad también a la resolución ministerial emitida por el presidente del estado con respecto a la enfermedad de Chagas en diagnóstico tratamiento y seguimiento, prevención y promoción con el diagnóstico

Realizar convenios con el entorno escolar de los menores para que en la curricula del proceso enseñanza aprendizaje se incluya el tema de Chagas y el cuidado de la microbiota.

ABSTRACT

Introduction.- Chagas disease is a tropical parasitic disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, humans and animals is transmitted by triatomine bugs. Chagas disease is a major public health problem worldwide with 10 million people infected, of which 8 million are diagnosed primarily in rural areas of Latin America. Most patients with chronic heart disease suffer from cases detected 6% have gastrointestinal manifestations such as megacolon (PAHO 2003).

The human microbiota provides important immune and metabolic functions is not known whether there is alteration of the same in children infected with Chagas.

Objetivo.-For all background information regarding this research took aim at determining differences in gastrointestinal, dermal and oral microbiota in children with and without Chagas disease and the effect of treatment on microbiota To this end

Metodología.-a total population of 1,102 children ranging in the age range of 5 to 14 years was taken; in a first phase, a sample of 543 to which Chagas diagnosis was performed resulting in 20 positive and 523 negative cases for inclusion and exclusion criteria in a second phase, a sample of 16 positive and 35 negative Chagas took children; finally took in a third phase of research for the third phase were 12 positive children with post treatment; and 22 boys and post time negative group.

Hisopeados various body sites (skin, oral, gastrointestinal) were collected, extracted and amplified DNA using primers 515F806R for V3-V4 region of the 16S rRNA. The extensions were sequenced using Illumina MiSeq.

Of this process is arrived at comprehensive analysis of the samples using the platform QIIME

Results.- skin samples have higher diversity of bacterial species, followed by samples (gastrointestinal) faeces and oral. There were no significant differences between men and women or by age group, either at the community level; however it should be

noted that, through a deeper thanks to the use of lefse, a bacterial level analysis, some individual bacteria were unchanged.

Conclusions.- is concluded that the prevalence of Chagas disease in the study population is 3.7% there is no statistically significant difference between Chagas, age and sex

The amount of microbiota by body site does not change significantly before and after treatment. The diverse bacterial skin site is 320 species, followed by gastrointestinal 200, ending with the oral mucosa having 100.

Infected children did not differ from uninfected gastrointestinal microbiota diversity, oral or skin community level but at the level of genus of bacteria. Note that if the chances of continuing it should give greater sequencing could reach further in depth analysis regarding the microbiota with species.

The number of species of gastrointestinal microbiota by sex in children with and without Chagas no variation by gender, showing a wealth of ~ 200 (+ 100) bacterial species.

The effect of treatment with benznidazole American trypanosomiasis alters the microbiota, especially in skin, followed by oral and gastrointestinal microbiota presumably be a cause for adverse reactions to treatment for dermatological level by altering the microbiota.

It is therefore recommended to increase research on microbiota and its association with clinical symptoms. Since the prevalence as compared to other international settings is higher, a situation that makes this disease health priority in the national environment. As also undertake systematic research and the present study has come to study the microbiome at the community level, however new scientific ventures that give continuity to study further to deepen the study of species are required.

And also give continuity to the ministerial resolution issued by the president of the state with respect to Chagas disease diagnosis and treatment monitoring, prevention and promotion with the diagnosis.

Make agreements with the school environment for children in the curriculum of the teaching-learning process and the issue of Chagas care microbiota is included.

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes del Tema de Investigación.....	1
1.2 Planteamiento del Problema.....	4
1.3. Justificación y Uso de los Resultados	4
1.4. Objetivos	5
1.4.1. General	5
1.4.2. Específicos	5
II.MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Microbioma y microbiota.....	7
2.1.1. Definición.....	7
2.1.2. Composición de la microbiota	8
2.1.3. Origen de la microbiota normal.	9
2.1.4. Funciones de la Microbiota.....	11
2.1.5. Localización de la microbiota	12
2.1.5.1. <i>Microbiota cutánea</i>	12
2.1.5.2. <i>Microbiota Gastrointestinal</i>	13
2.1.5.3. <i>Microbiota Oral</i>	16
2.1.5.4. <i>Microbiota vaginal</i>	16
2.1.5.6. <i>Técnicas de diagnóstico de microbiota</i>	17
2.1.5.7. <i>Identificación de microorganismos altamente emparentados</i>	28
2.2.- Enfermedad de Chagas	33
2.2.1 Historia.....	33
2.2.1.1 <i>Ciclo de vida de T. cruzi</i>	34
2.2.1.2. <i>Vías de contaminación</i>	35
2.2.1.3. <i>Nosología General</i>	35
2.2.1.4. <i>Diagnóstico por el laboratorio de la enfermedad de Chagas</i>	38
2.2.1.4.1. <i>Diagnóstico parasitológico</i>	39
2.2.1.4.2. <i>Diagnóstico serológico</i>	40
2.2.1.4.3. <i>Métodos parasitológicos directos</i>	40

2.2.1.4.4. Métodos parasitológicos indirectos	40
2.2.1.4.5. Métodos Serológicos.....	40
2.2.1.4.5.1. Ensayo Inmuno Enzimático E.L.I.S.A.	41
2.2.1.4.5.2. Técnica de Hemaglutinación Indirecta H.A.I.....	42
2.2.1.4.5.3. Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta I.F.I.	42
2.2.1.4.5.4. Prueba de inmunocromatografía para Chagas IC.....	42
2.2.1.4.6. Pruebas no convencionales.....	43
2.2.1.4.6.1. Métodos de Biología Molecular	44
2.2.1.4.6.2. Cultivo celular para <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
2.2.1.4.7. Tratamiento.....	44
2.2.1.4.8. Reacciones adversas al medicamento.....	44
2.3. Hipótesis.....	46
2.4. Marco Contextual.....	46
2.4.1 Bolivia	46
2.4.2 Chuquisaca	46
2.4.3. Tarabuco.....	47
2.4.3.1. Indicadores Sociales.-pobreza en el municipio de Tarabuco 61.40%.	47
2.4.3.2. Indicadores de Salud.....	48
2.4.3.3. Prevención y control de la enfermedad de Chagas	49
III. MARCO METODOLÓGICO	51
3.1. Enfoque, tipo y diseño de investigación	51
3.2. Población y Muestra.....	51
3.2.1 Población.....	51
3.2.2 Muestra.....	51
3.3 Variables de Estudio	52
3.3.1 .1 Variable dependiente:	52
3.3.1.2 Variable independiente	52
3.4. Criterios de inclusión y de exclusión	55
3.4.1. Criterios de Inclusión	55
3.4.2. Criterios de Exclusión:.....	55
3.5. Procedimientos para la Recolección de la Información.....	56
3.5.1. Fuente de recolección de Información	56
3.5.2 Descripción de los instrumentos de recojo de información utilizados.....	56

3.5.3 Procedimiento de recojo de la muestra de laboratorio	57
3.5.3.1 <i>Recolección y Tipo de Muestra</i>	57
3.6. Procesamiento y análisis de los datos	58
3.7. Delimitaciones de la investigación.....	61
3.7.1 Delimitación geográfica	61
3.7.2. Sujetos que participaron en la realización del estudio	62
3.7.3. Delimitación temporal.....	62
3.7.4. Aspectos Éticos	62
IV. RESULTADOS.....	63
4.1. Diagnóstico de la tripanosomiasis americana (Chagas) en niños de 5 a 14 años	63
4.2. Microbiota en niños diagnosticados, por lugar corporal y por sexo.	68
4.3. Comparación de la microbiota en niños con y sin tripanosomiasis americana..	70.
4.4. Comparación de la microbiota en niños con y sin tripanosomiasis americana antes y después del Tratamiento por nivel Taxonómico	73
4.5. Efecto de la infección por tripanosomiasis americana, en la microbiota.....	75
4.6. Efecto del tratamiento con Benznidazol en la microbiota	78
4.7. Discusión.....	87
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	89
5.1 Conclusiones	89
5.2 Recomendaciones.....	90
Referencias Bibliográficas	92
Bibliografía	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1	
Distribución de Pruebas de Diagnóstico de tripanosomiasis americana a través de Inmunocromatografía de niños de 5 a 14 años de la Población de Tarabuco. Bolivia 2013	63
Tabla N° 2	
Distribución de Pruebas de Diagnóstico de tripanosomiasis americana y Control de Calidad a través de Hemaglutinación Indirecta de niños de 5 a 14 años de la Población de Tarabuco. Bolivia 2013	63
Tabla N° 3	
Distribución de Pruebas de Diagnóstico de tripanosomiasis americana a través de ELISA Chagas de niños de 5 a 14 años de la Población de Tarabuco. Bolivia 2013	64
Tabla N° 4	
Distribución de niños con tripanosomiasis americana según Sexo de la Población de Tarabuco Bolivia 2013	65
Tabla N° 5	
Relación del Sexo con la presencia de tripanosomiasis americana en niños de 5 a 14 años de la población de Tarabuco Bolivia 2013.....	65
Tabla N° 6	
Distribución de tripanosomiasis americana en niños de 5 a 14 años Según edad de la población de Tarabuco. Bolivia 2013.....	66
Tabla N° 7	
Relación entre tripanosomiasis americana y la edad de niños de la población de Tarabuco. Bolivia 2013	67
Tabla No 8.	
Bacterias de heces fecales que cambian con tratamiento del Benznidazol Efecto del tratamiento con (BNZ) sobre las bacterias de hecesfecales en niños con Chagas	80

Tabla No 9.

Bacterias de piel que cambian con el tratamiento con BNZ Efecto del
tratamiento sobre las bacterias de Piel 82

Tabla No 10.

Bacterias orales que cambian con el tratamiento Efecto del tratamiento sobre
las bacterias orales..... 84

Tabla No 11

Distribución de niños con tripanosomiasis americana que recibieron
tratamiento con Benznidazol (BNZ) 85

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico No. 1	
Curvas de rarefacción de especies bacterianas observadas por sitio corporal (oral, piel y heces), en todos los niños.N=85	68
Gráfico No. 2.	
Curvas de rarefacción de especies bacterianas fecales observadas, por Sexo.N=85.....	69
Gráfico No. 3.	
Curvas de rarefacción mostrando la diversidad bacteriana en muestras oral (A), piel (B) o heces (C) de niños con y sin <i>tripanosomiasis americana</i>	70
Gráfico No. 4.	
Perfil de las comunidades microbianas por nivel taxonómico (phylum o niveles inferiores a familia) en los tres sitios corporales (piel, oral y heces fecales) de niños	73
Gráfico No. 5.	
Diferencias en las bacterias orales entre niños negativos y positivos para Chagas antes del tratamiento.....	75
Gráfico No. 6.	
Diferencias en bacterias de piel entre niños negativos y positivos para Chagas antes del tratamiento.....	76
Gráfico No. 7.	
Diferencias bacterianas en heces fecales entre niños negativos y positivos para Chagas antes del tratamiento.....	77
Gráfico No. 8.	
Diferencias bacterianas en heces fecales entre niños positivos para Chagas.....	78
Gráfico No. 9	
Diferencias bacterianas en piel entre niños positivos para Chagas tratados y no tratados	81

Gráfico No. 10

Diferencias bacterianas orales entre niños positivos para Chagas tratados y no
tratados 83

Gráfico No. 11

Distribución de niños con tripanosomiasis americana que recibieron
tratamiento con Benznidazol (BNZ) 86

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.1.

CUADRO DE SIGNOS Y SINTOMAS DE RAM AL TRATAMIENTO-BNZ DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS..... 45

Cuadro N° 2.

Matriz de operacionalización de variables..... 53

INDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1	
HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO –MADRES	
PROYECTO: Microbiota de niños de 5 a 14 años con y sin tripanosomiasis americana de la población de Tarabuco. Bolivia 2013	101
Anexo N° 2	
PLANILLA DE REGISTRO	
Microbiota en niños de 5 a 14 años con y sin Tripanosomiasis americana de la Población de Tarabuco Bolivia 2013	104
Anexo N° 3	
Permiso del Comité de Bioética del SEDES Chuquisaca (Servicio Departamental de Salud)para el presente Trabajo Investigativo y Transporte de Muestras	105
Anexo N°4	
Protocolo de Extracción de ADN (MOBIO EXTRACTION KIT)	107
Anexo N° 5	
ILLUMINA PCR CONDICIONES: REGIÓN-515F 806R DEL GEN 16S RNA	
Protocolo de reactivo completo (mezcla maestra) para la reacción de PCR 1X.....	111
Anexo N°6	
CONSENTIMIENTO INFORMADO TRATAMIENTO DE CHAGAS	113
Anexo N°7	
TARJETA DE SEGUIMIENTO AL TRATAMIENTO DE CHAGAS.....	114

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes del Tema de Investigación

La microbiota humana es el conjunto de comunidades microbianas que viven en el cuerpo humano. El microbioma se refiere a los genes de la microbiota.

Nacida a partir de las nuevas tecnologías de secuenciación genómica de alta productividad. Estudios recientes demuestran que la microbiota difiere por sitio corporal, que se adquiere al nacer y cambia en las poblaciones humanas. (1)

Ahora se conoce que el número de bacterias en un individuo es 10 veces mayor que el de las células humanas y que el microbioma tiene 150 veces más genes que el genoma humano. Se ha reconocido que la microbiota intestinal es fundamental en la protección contra la invasión de gérmenes patógenos, en el metabolismo energético y la nutrición, en el desarrollo del sistema inmune y en el mantenimiento de la integridad anatómica de la mucosa intestinal. (2)

Los mamíferos nacen a través del canal del parto materno donde adquieren las bacterias del ácido láctico, seguido por la leche materna .la interacción con los microbios autóctonos es esencial para la salud inmunológica y la programación metabólica. De hecho los nacidos por cesárea tienen mayor riesgo de enfermedad celíaca la diabetes tipo 1, el asma y la obesidad. Estas enfermedades son más frecuentes en los países desarrollados mientras en las sociedades tradicionales son poco comunes. (1)

Se está realizando estudios de Chagas en México en el que se buscan nuevos tratamientos a base de microbiota, realizando investigaciones en triatomíneos, se puede evidenciar que el estudio referencia los efectos de las bacterias residentes en el estómago de las larvas de quinto-estadio de *Rhodnius prolixus* en la lisis de los eritrocitos y la infección por *Trypanosoma cruzi*. Los resultados de esta investigación muestran que la población de bacterias se incrementa en aproximadamente 10.000

veces después de comer. La hemólisis se elevó a aproximadamente un 28% dentro de 24 horas posteriores y luego linealmente creció hasta el día 4 alcanzando así el 100%. El número de supervivientes y cepa de *T. cruzi* en el estómago se redujo drásticamente, mientras que la infección con el clon Dm28c se mantuvo estable. Cinco días después de la alimentación, se obtuvieron algunos tipos diferentes de colonias bacterianas cuando suspensiones contenido del estómago se extendieron en placas de agar BHI. Se aislaron e identificaron como *Serratia marcescens* biotipo a (referenciado como RPH), que produce el pigmento prodigiosina las bacterias hemolíticas. En experimentos in vitro, que comparan las incubaciones de RPH con *S. marcescens* SM365, un productor de pigmentos prodigiosina, y *S. marcescens* DB11, una variante que no pigmenta, como control, con eritrocitos y *T. cruzi* demostrado que: a 30 ° C, SM365 y RPH disminuyen las poblaciones de cepa Y, pero no clon DM28c y DB11 fue incapaz de lisar las dos cepas de *T. cruzi*; a 0 ° C, SM263 y RPH mataron a los flagelados, pero DB11 no lo hicieron; y todas las tres cepas de *S. marcescens* fueron capaces de lisar eritrocitos. Estos resultados sugieren que *S. marcescens* actividad tripanolítica de las cepas SM365 y RPH es distinta de la actividad hemolítica y que prodigiosina es un factor importante para la acción tripanolítica de las bacterias. (3)

Con respecto a estudios que refieran la microbiota intestinal y uso de antibióticos en humanos se conoce del estudio realizado por Les Dethlefsen y colaboradores en 2008 que reportó que la mayoría de los tipos de bacterias intestinales regresaban a sus niveles previos al tratamiento a las cuatro semanas de concluir un ciclo de cinco días de ciprofloxacina, un antibiótico de amplio espectro de uso extendido. Sin embargo unos cuantos tipos de bacterias no se habían recuperado aun seis meses después. (4)

Otro estudio publicado por La Sociedad Internacional de Microbiología Ecológica en la gestión 2007 encontró que los niveles de algunos tipos de bacterias intestinales permanecían afectados hasta dos años después de un ciclo de siete días de clindamicina, el fármaco predilecto para tratar infecciones por *Bacteroides*. (4)

De acuerdo con Janet Jansson, científica decana del equipo del Departamento de Ciencias de la Tierra del Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley y primera autora

del estudio del ISME Journal, es posible que estos cambios a largo plazo no tengan consecuencias reales para la salud. No obstante, el estudio de Jansson también reveló un incremento "drástico y persistente" en niveles de genes de resistencia específicos en los Bacteroides después del uso de la clindamicina. En las personas a quienes examinaron, al inicio los niveles de los genes de resistencia eran insignificantes, pero "se elevaron exponencialmente y permanecieron en ese nivel durante dos años". (5)

La amplia utilización de los antibióticos también puede estar afectando a la microbiota entre aquellas personas que viven en países desarrollados. Estudios realizados tanto en humanos como en animales han demostrado que incluso un tratamiento con una dosis única de antibióticos puede dar lugar a una disminución de las bacterias que suelen considerarse benéficas, como las bifidobacterias y los lactobacilos, así como a un incremento de los patógenos potenciales, tales como el *Clostridium difficile* y la levadura *Cándida albicans*. A corto plazo, estos cambios en la microbiota pueden provocar infecciones por levaduras y síntomas gastrointestinales que incluyen hinchazón, dolor abdominal y diarrea, pero un trabajo reciente sugiere que las consecuencias puede ser mucho más duraderas y graves (2).

Finalmente se conoce de la investigación realizada por Iruretagoyena que realizó una investigación para determinar si el recuento celular de 40 tipos de bacterias en saliva era común o estaban ligadas de alguna manera con el carcinoma espinocelular o si difería de aquellas encontradas en personas libres de cáncer oral. Este estudio realizado en microbiota oral tomó muestras de saliva no estimulada de 229 personas libres de carcinoma espinocelular y 45 personas con carcinoma espinocelular para una cantidad de 40 bacterias bucales identificadas por su ADN. Los resultados obtenidos demuestran que el recuento de 3 de las 40 especies bacterianas probaron ser significativas ($p < 0.001$) en su relación con el cáncer espinocelular; estas especies fueron *Capsocytophaga*, *Prevotella melaninogénica* y *Streptococcus mitis*. De tal forma se concluyó que el recuento salival alto de bacterias como *Prevotella melaninogénica*, *C. gingivalis* y *Streptococcus mitis* pueden ser indicador de carcinoma espinocelular. (6)

No se tienen datos de microbiota en personas con Chagas y sin Chagas. Se ha iniciado una investigación en la Universidad de Medellín de Colombia en octubre del 2012 para

buscar soluciones y controlar la enfermedad de Chagas. El trabajo de investigación se basa en el estudio de la microbiota (conjunto de bacterias) del intestino de los insectos triatomíneos, que son los vectores de dicha enfermedad, puesto que dentro de su cuerpo transportan el parásito que la produce. (7)

El objetivo de la investigación de microbiota en triatomíneos fue observar cómo esa microbiota que el organismo produce; ataca al parásito para controlar su población. Se cree que estas producen algunas sustancias en respuesta al sistema inmunológico del parásito. Por eso, se quiere encontrar qué es lo que modulan para poder aplicarlo a alguna técnica de control de la enfermedad en seres humanos, de esta manera los investigadores de la universidad nacional en Medellín avanzan en estudio que busca descubrir la fórmula para controlar la *tripanosomiasis americana* que afecta a los seres humanos (8)

En Sud América solo se está realizando en Colombia y aún no ha concluido el estudio por lo cual no se tienen resultados, Centro América país de México en estos países se estudia la microbiota en triatomíneos. A nivel de Bolivia no se tiene ningún estudio realizado en este sentido hasta la gestión 2011 a partir de la revisión bibliográfica realizada del programa Chagas dependiente del ministerio de salud. (9)

1.2 Planteamiento del Problema

¿Cuál es la microbiota de niños de 5 a 14 años con y sin tripanosomiasis americana en la población de Tarabuco Bolivia 2013?

1.3. Justificación y Uso de los Resultados

El presente estudio de investigación pretende conocer el tipo de microbiota en niños de 5 a 14 años con y sin tripanosomiasis americana (Chagas) en diferentes sitios corporales como ser bucal, piel y gastrointestinal con muestras de (boca, piel del brazo izquierdo y heces fecales).El efecto del tratamiento con Benznidazol sobre la microbiota en niños con Chagas.

La enfermedad de Chagas es un grave problema de salud pública en Bolivia por lo que a través de la ley 3374 del 23 de marzo del 2006 se ha declarado “prioridad nacional la prevención y lucha contra la enfermedad de Chagas en todos los departamentos del País” frente a la enorme incidencia; el Ministerio de Salud emprende diversas investigaciones sistemáticas orientadas a vislumbrar la esencia de la enfermedad es una de las enfermedades aun no controladas, a pesar de los esfuerzos se desconoce las diferencias que la infección por Chagas produce en la microbiota humana, es importante para comprender las consecuencias fisiológicas del parásito en el hospedador.

La información derivada del presente estudio de investigación; permitirá completar el cuadro clínico de la enfermedad de Chagas, incluyendo aspectos que nunca han sido estudiados antes. Es posible que la información permita mejorar estrategias de control de la enfermedad y control de la tripanosomiasis americana que afecta a los niños de 5 a 14 años. En el futuro, deberá determinarse sobre la base de los resultados de microbiota de este trabajo, si es posible normalizando la microbiota, pueda modularse la respuesta inmune para la mejora de síntomas clínicos, la erradicación del parásito con la actividad del sistema inmune. Los resultados tendrán un impacto en la investigación biomédica y clínica en términos de salud pública para poder comprender los mecanismos de desarrollo de la patología Chagásica desde una perspectiva intrínseca

1.4. Objetivos

1.4.1. General

Identificar la microbiota en niños de 5 a 14 años con y sin tripanosomiasis americana en la población de Tarabuco

1.4.2. Específicos

1. Determinar la prevalencia de Chagas en niños de 5 a 14 años de la población de Tarabuco, mediante pruebas inmunocromatográficas (IC), hemaglutinación indirecta (HAI) y ELISA Chagas según edad y sexo.

2. Determinar la cantidad de microbiota por sitio corporal (bucal, piel y gastrointestinal) en niños de 5 a 14 años con tripanosomiasis americana versus niños sin tripanosomiasis americana
3. Identificar la cantidad de especies de microbiota en muestras fecales (gastrointestinal) por sexo en niños con y sin tripanosomiasis americana
4. Determinar el efecto del tratamiento de tripanosomiasis americana con Benznidazol sobre la microbiota gastrointestinal, bucal y piel en niños con tripanosomiasis americana antes y después del tratamiento.

II.MARCO TEÓRICO

2.1. Microbioma y microbiota

El microbioma humano es el conjunto de los microbios y sus genes que pueblan nuestro cuerpo. Conocerlo es un inmenso trabajo comparable con el Proyecto Genoma Humano. Algunos ya consideran al microbioma humano como nuestro segundo genoma.

El primero fue **Antón van Leeuwenhoek**, quien con rudimentarios microscopios que él mismo fabricaba vió unos “animáluncos” que habitan en nuestra boca y otras partes del cuerpo (10)

2.1.1. Definición

La **microbiota normal**, es el conjunto de microorganismos que se localizan de manera normal en distintos sitios del cuerpo humano. Puede ser definida como los microorganismos que son frecuentemente encontrados en varias partes del cuerpo, en personas sanas. Esta microbiota normal está en relación simbiótica comensal con el hospedador, ya que también se obtienen ventajas de ellos tanto como ellos la obtienen del individuo; estos ayudan en la digestión del alimento, producen vitaminas y protegen contra la colonización de otros microorganismos que pueden ser patógenos, lo cual es llamado antagonismo microbiano. En particular, el equilibrio entre las comunidades microbianas que conforman la microbiota del tracto gastrointestinal y de la vagina es de vital importancia para la salud del ser humano. Hay pocos parámetros fisiológicos e inmunológicos que no están profundamente afectados por la presencia y naturaleza de la microbiota normal del cuerpo, siendo la resistencia del huésped a las infecciones uno de los factores más prominentes. (11)

El término microbiota hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos residentes en un nicho ecológico determinado. Los más comunes son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Cándida albicans*, algunos de los cuales pueden causar enfermedades en casos especiales, por lo que se les llama patógenos

oportunistas. Es de diferenciar que a veces, un microorganismo patógeno está incluido en esta relación, en este caso se refiere al hospedero como portador.

La microbiota humana se divide en dos categorías:

- **Microbiota autóctona:** Engloba a aquellos microorganismos que colonizan al hospedero durante un tiempo prolongado, pueden participar en las funciones fisiológicas y han evolucionado junto a la especie.
- **Microbiota alóctona:** Que incluye a los microorganismos que se pueden encontrar en cualquier hábitat y en cualquier sistema, normalmente no contribuyen a la fisiología del hospedero y están presentes de forma transitoria o latente.

Así mismo, también se les clasifica por el tiempo de estancia en el hospedero

- **Microbiota latente:** Son los microorganismos que preserva el hospedero durante casi toda la vida, no presentan fluctuaciones mayores en su población y suelen tener actividad simbiótica con el hospedero.
- **Microbiota transitoria:** Es aquella que presenta fluctuaciones continuas en su población y suele no ser indispensable para la supervivencia del hospedero. Entre los cambios que afectan la colonización por estos microorganismos se encuentran: el cambio de hábitat, la edad, la estación del año, el uso de antibióticos, etc.

2.1.2. Composición de la microbiota

En un animal sano, los tejidos internos, por ejemplo, sangre, cerebro, etc.; normalmente están libres de microorganismos. Sin embargo, en los tejidos superficiales (piel y las membranas mucosas) están constantemente en contacto con organismos del medio ambiente y son fácilmente colonizados por especies de microbios diferentes. La microbiota normal está constituida por una multitud de bacterias, hongos, protozoarios y otros microorganismos, tan solo la microbiota intestinal constituye un complejo ecosistema integrado por más de 400 especies bacterianas. Asimismo, se localiza en ambientes específicos en el humano como son: piel, oro faringe, tracto gastrointestinal y genitourinario, entre otros. La población de microorganismos que convive en contacto directo con el hombre excede al número de células corporales del ser humano en una

relación de 10:1 (por cada célula humana hay 10 microbios) Tomando en cuenta que el cuerpo humano se compone de aproximadamente 10^{13} , el organismo humano lleva consigo a 10^{14} células no propias. En el intestino grueso de mamíferos, que es donde reside la mayor parte de esta microbiota, la cifra de microorganismos se eleva a 10^{12} - 10^{14} (equivalente aproximadamente a 1-1,5 kg en peso), incluso superior a la encontrada muchas veces en el suelo, subsuelo y los océanos. En el año 2008, el número total de especies bacterianas, del tracto gastrointestinal fue extendido a 40.000 (12)

2.1.3. Origen de la microbiota normal.

El feto es estéril hasta que rompe la membrana en la que se encuentra. En su salida éste expuesto a la flora normal del tracto genital de la madre (en este momento también es posible la infección de ciertas enfermedades de transmisión madre-hijo), junto a las bacterias en el ambiente, incluso a las incluidas en la respiración que pueda poner cualquier persona cerca del recién nacido. Con los días, la flora empieza a aumentar según su exposición a organismos, ya que no hay competidores, el infante está expuesto a un alto rango de organismos, y los que mejor se adapten a cada sitio, serán los predominantes. Así por ejemplo, los cocos Gram positivos aerobios prefieren la piel y los coliformes el intestino. (10)

Mientras el feto humano se desarrolla en un ambiente estéril, el neonato se ve expuesto a microorganismos del medio ambiente y el tracto genital de su madre, en este momento también es posible la infección de ciertas enfermedades de transmisión madre-hijo, se han reportado contagios del virus del papiloma humano de esta manera. Lo primero que se coloniza es la piel del recién nacido, seguida de la buco faringe, el aparato digestivo y otras mucosas. Las bacterias que comienzan a colonizar el tracto digestivo del lactante son las productoras de ácido láctico provenientes de la leche materna.

No obstante, según su posición en el cuerpo, es difícil predecir qué microorganismos habitarán el lugar, ya que algunas partes del cuerpo no son muy afectadas o no son nada afectadas por el medio externo y el estilo de vida. Las menos complejas pueden ser todo lo externo: piel, ojos, oídos, cuero cabelludo, axilas; un nivel intermedio vendrían a ser las fosas nasales, tráquea, laringe, y bronquios. En el nivel más complejo están el tracto gastrointestinal, bucal y vaginal. Al final, lo más probable es que su microbiota sea la

misma que sus padres, personas de su misma edad y cultura. En la mayoría de los casos, después de algunos meses del nacimiento, la representación de especies microbianas en la microbiota neonatal es muy similar al patrón de colonización en el adulto.

La leche materna es una fuente importante de bacterias comensales, mutualistas o probiótica para el intestino infantil. Entre las bacterias predominantes, que parecen establecerse en la piel de la aureola, y zonas terminales de los ductos, existen diversas especies de estafilococos, estreptococos y lactobacilos, que subsisten de la leche presente en esos micro nichos. El contenido de microorganismos en la leche materna es muy reducido pero las bacterias aumentan y dominan el intestino del lactante. La microbiota intestinal aumenta con la ingestión de comida sólida. (12)

La colonización es el proceso mediante el cual los microorganismos se instalan en un determinado sitio y se inicia inmediatamente después del nacimiento. Esta puede ser por un breve período de tiempo (horas o días) o de forma permanente. La colonización nunca afecta las funciones normales del organismo hospedero y participan varios factores como el tipo de alimentación recibida y el grado de exposición al medio ambiente.

La colonización tiene a su cargo una especificidad de tejido, *las bacterias escogen donde quieren vivir*. A la preferencia bacteriana por un sitio determinado se le llama *tropismo tisular*. Una explicación para el tropismo tisular es que el hospedero proporciona los nutrientes esenciales y factores de crecimiento para la bacteria, además de oxígeno, potencial de óxido el pH adecuado y la temperatura para el crecimiento así como ácidos grasos, lisozima, acidez del jugo gástrico/orina para su control y distribución de entre sus *micro ecosistemas*. La mayoría de las bacterias pueden colonizar un tejido específico, ya que pueden adherirse a la que el tejido o en el sitio de una manera específica que implica interacciones químicas complementarias entre las dos superficies, un efecto conocido como *adherencia específica*. Esta involucra interacciones bioquímicas entre los componentes de la superficie bacteriana (ligandos o adhesinas) y receptores de la célula huésped molecular. Los componentes bacterianos que proporcionan adhesinas son parte molecular de sus cápsulas, fimbrias, o las paredes celulares. Los receptores de las células o tejidos humanos suelen ser moléculas de glicoproteína se encuentra en la célula huésped o de la superficie del

tejido. Algunas bacterias producen biopelículas en la superficie tisular. Estas bacterias producen polímeros que permiten la adherencia de otras bacterias a esta superficie. Un ejemplo de esta, es la formación de placa bacteriana. (13)

La colonización y el establecimiento de la microbiota normal es un proceso continuo que ocurre durante toda la vida de un individuo sano, de tal manera la microbiota de un recién nacido será diferente a la de un adulto o un anciano, esto puede explicarse mediante el cambio en la dieta, hábitos, vida sexual, niveles hormonales.(12)

2.1.4. Funciones de la Microbiota

La microbiota intestinal contribuye al estado de salud del huésped, por sus funciones en nutrición, protección, desarrollo y proliferación celular e inmunomodulación. La velocidad de colonización y el tipo de microorganismo que coloniza tiene una gran repercusión en el desarrollo del sistema inmune, la regulación de la permeabilidad y el mantenimiento del equilibrio intestinal en el recién nacido, así como la determinación de la susceptibilidad a las infecciones microbianas y de la sensibilidad a los antígenos o alérgenos de la dieta. (13)

El tracto gastrointestinal constituye una de las principales zonas de contacto con microorganismos potencialmente nocivos como bacterias y virus; así como de toxinas y otros alérgenos y la mucosa forma la primera barrera frente a ellos y desempeña una función primordial en la defensa del organismo frente a éstos. Su función protectora depende de los componentes estructurales y funcionales de la mucosa intestinal, del sistema inmune y de sus interacciones con la microbiota intestinal. (13)

Los patógenos normalmente alteran la permeabilidad intestinal, mientras que las bacterias comensales beneficiosas y los probióticos pueden contribuir al restablecimiento de ésta y de las uniones intercelulares, y favorecer la proliferación celular. La síntesis de defensinas y proteasas implicadas en su activación en las células de Paneth son moduladas por la microbiota intestinal y algunas bacterias probióticas. (14)

2.1.5. Localización de la microbiota

2.1.5.1. Microbiota cutánea

Este ambiente es hostil y no es favorable para la supervivencia de la mayoría de ellos, debido a la presencia de enzimas como la psoriasina.

Los organismos que se han encontrado en la piel son en su mayoría bacterias Gram positivas, por ejemplo, estafilococos coagulasa-negativo, *Staphylococcus aureus*, corynebacterium, Propionibacterineae. Organismos como *Clostridium perfringens*, Cándida, *Malassezia furfur* se pueden aislar en localizaciones húmedas. También es posible encontrar parásitos del tipo Demodex folliculorum, rodeando los folículos pilosos. (11)

La microbiota varía según las condiciones que implica cada región del cuerpo, de esta forma se pueden dividir en tres grupos (11):

- La axila, perineo, y entre los espacios interdigitales del pie
- Mano, cara y torso
- Brazos y piernas

Al ser áreas más cerradas la axila, perineo y los espacios interdigitales del pie, retienen más calor y líquidos corporales por tanto, son colonizadas más que todo por bacilos Gram negativos, al contrario que las áreas que son más secas como ser la mano, cara, brazos y piernas pero no pueden colonizar de manera permanente debido a que no son capaces de sobrevivir a ambientes secos (con excepción de *Acinetobacter*) La mayoría de los microorganismos viven en el estrato de la piel y en la parte más externa de los folículos del cabello. Sin embargo, hay bacterias que se mantienen en lo más interno de los folículos y no son alcanzados por desinfectantes; estas bacterias son las que vuelven a poblar el área luego de que las de la superficie han sido eliminadas.

Una zona que merece especial atención es el conducto auditivo externo y la oreja, donde se encuentran estafilococos coagulasa negativos y algunos patógenos potenciales como *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Esta flora cobra importancia en la ruptura de la membrana timpánica donde estos organismos pueden entrar al oído medio y causar infección.

2.1.5.2. Microbiota Gastrointestinal

Desde hace mucho tiempo, se sabe que los microorganismos del intestino humano desempeñan un papel importante en la salud digestiva. Sin embargo, investigaciones más recientes indican que la microbiota intestinal puede estar relacionada con aspectos más generales de la salud incluida la obesidad y la salud metabólica. (15)

Los microorganismos que habitan en diversas partes del cuerpo humano, incluida la piel, la nariz, la boca y los intestinos. Concretamente, el intestino humano alberga una enorme cantidad de microorganismos, aproximadamente 100 trillones de microorganismos, se estima que sobrepasando las células humanas en unas 10 veces. Los microorganismos presentes en el intestino son principalmente bacterias y pertenecen a más de 1.000 especies, el 90% de las cuales corresponden a las Firmicutes y las Bacteroidetes.(15)

Cada individuo tiene una composición de microbiota intestinal distinta y muy variable, aunque todas las personas comparten una serie de microorganismos comunes básicos.

La composición de microorganismos intestinales se denomina “microbiota” intestinal, mientras que la totalidad de los genes de la microbiota se conoce como “microbioma”. Los genes del microbioma intestinal superan a los genes del cuerpo humano en aproximadamente unas 150 veces.(14)

La microbiota humana se crea en la primera etapa de la vida: el feto en el útero es estéril y la exposición a los microorganismos empieza en el momento del nacimiento, es decir, al pasar a través del canal del parto y/o exponerse a los microbios presentes en el entorno. Los bebés que nacen por cesárea tienen una microbiota intestinal diferente. Esto se ha considerado como menos favorable y se cree que está asociado con un mayor riesgo de contraer enfermedades y de padecer sobrepeso y obesidad en el futuro, en comparación con los bebés que han tenido un parto vaginal.(12) Pese a que la microbiota se instaura en la primera etapa de la vida, puede variar posteriormente según cambios de edad, dieta, ubicación geográfica, ingesta de complementos alimenticios y fármacos, además de otras influencias ambientales. El exceso de grasa corporal y las enfermedades también se asocian con una microbiota intestinal alterada. (15)

Se sabe que la alimentación en un momento precoz de la vida, incluyendo el período de lactancia o alimentación con preparados para bebés, modula la composición de la microbiota intestinal en los humanos; asimismo, se cree que unos hábitos alimenticios prolongados repercuten de manera importante y explican algunas de las diferencias geográficas (16). Esto es así porque determinados componentes de la dieta, como, por ejemplo, la fibra, se descomponen mediante fermentación bacteriana y se utilizan como combustible. Comer niveles cada vez más elevados de determinados componentes alimenticios puede potenciar el número de bacterias que utilizan esos componentes específicos como combustible, lo que significa que los cambios en la composición de los alimentos pueden llegar a modificar la composición de la microbiota intestinal. (12) La composición de macronutrientes (es decir, la proporción de proteínas, hidratos de carbono y grasas) de los alimentos parece influir, y es posible que cualquier alteración en los hábitos alimenticios conlleve variaciones en la microbiota intestinal. Todavía se están realizando investigaciones que abordan como la dieta interactúa con la microbiota.

Con respecto a la microbiota intestinal y la salud; gran parte de la investigación que realiza el mundo científico sobre la microbiota intestinal se centra en los microorganismos intestinales, ya que se cree que influyen en la salud de diversas maneras. Existen datos que demuestran que personas con determinadas enfermedades (por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad del intestino irritable, alergia) tienen una microbiota diferente, en relación a las personas sanas, aunque en la mayoría de casos es imposible precisar si la microbiota alterada es una causa o una consecuencia de la enfermedad. Los patrones de la microbiota intestinal que están asociados con la salud son, no obstante, más difíciles de definir. La composición de la microbiota intestinal es muy variable incluso entre sujetos saludables. Los investigadores han descubierto que, incluso aunque la composición varíe entre personas, distintas composiciones pueden tener funciones similares (por ejemplo, cómo descomponen los microorganismos ciertos compuestos de los alimentos o cómo afectan al sistema inmunitario del cuerpo). En consecuencia, se ha señalado que es más importante para la salud la función de la microbiota intestinal, en vez de la composición.(17)

Los microorganismos presentes en el intestino desempeñan un papel fundamental en la salud digestiva, pero también influyen en el sistema inmunitario. Los tejidos inmunitarios del tracto gastrointestinal constituyen la parte más grande y más compleja del sistema inmunitario humano. La mucosa intestinal es una gran superficie que recubre el intestino y que está expuesta a antígenos patógenos (causantes de enfermedades) y antígenos ambientales no patógenos (sustancias que provocan que el sistema inmunitario produzca anticuerpos). En la luz intestinal, los microorganismos desempeñan un papel vital en el desarrollo de un sistema inmunitario robusto y equilibrado. Las alteraciones de la microbiota intestinal de una persona, algo que puede ocurrir, por ejemplo, al ingerir determinados antibióticos, pueden aumentar el riesgo de infecciones con la aparición de patógenos oportunistas como la especie bacteriana *Clostridium difficile*. (18)

En los últimos años, diversos estudios de investigación han relacionado la microbiota intestinal con el peso corporal. Si bien gran parte de la investigación todavía se encuentra en fases iniciales, diversos estudios han revelado que las personas obesas tienden a tener una composición de bacterias intestinales en cierto modo diferente. Actualmente se desconoce aún si la composición de la microbiota alterada es una causa o una consecuencia de la obesidad. Asimismo, los estudios reflejan que la composición de la microbiota intestinal varía con la pérdida y/o el aumento de peso; sin embargo, todavía se está debatiendo la importancia de estos cambios en la salud humana. Algunos investigadores han sugerido que la microbiota de las personas obesas puede contribuir a que el cuerpo aumente la cantidad de energía que se “cosecha” de los alimentos, señalando que es posible que determinadas estructuras de microbiota intestinal puedan incrementar la posibilidad de convertirse en obeso. No obstante, esta teoría sigue siendo objeto de debate y se necesitan más estudios para investigar si esta hipótesis es cierta (18). Hasta ahora, muchas de las pruebas sobre la asociación entre la flora intestinal y el riesgo de sufrir obesidad proceden de estudios con animales. De ellos se deduce que una microbiota “obesa” (es decir, ciertas composiciones de la microbiota encontradas en personas obesas) puede causar mayor obesidad y cambios metabólicos desfavorables en

ratones estériles delgados. (19) Si bien es cierto que los modelos animales arrojan datos interesantes, no se pueden extraer conclusiones directas sobre estas asociaciones en humanos. Este ámbito de investigación es relativamente nuevo y se precisan más y nuevos estudios, especialmente en humanos, para entender cómo y hasta qué punto la composición de los microorganismos en el intestino influye en diversas funciones metabólicas del cuerpo.

2.1.5.3. Microbiota Oral

La microbiota oral es una de las más complejas y heterogéneas en el cuerpo, la presencia de piezas dentales lo hacen aún más diferente. La microbiota bucal puede verse alterada con la llegada de diversas bacterias oportunistas. La sucesión bacteriana va incorporando grupos o complejos microbianos y modifica sus características. Se reorganizan se adhieren a los dientes integrando colonias denominados biofilm. (20) Desde el punto de vista patogénico, existe un biofilm cariogénico, que al metabolizar los azúcares de la dieta, producen ácidos orgánicos que desmineralizan la superficie dental y se forma la caries. El otro fenotipo de biofilm es caracterizado por microorganismos periodonto patógeno y que al sumarse a otros factores de riesgo pueden desarrollar una gingivitis o algún tipo de periodontitis. Se determinó también el tipo de microbiota oral a través de hisopeados por duplicado de boca en niños de 5 a 14 años con y sin Chagas que participan del trabajo de investigación.

2.1.5.4. Microbiota vaginal

La microbiota vaginal puede tener un profundo impacto en la salud de las mujeres y sus recién nacidos. La vagina es un ecosistema dinámico, que permanentemente regula su equilibrio mediante el estado hormonal de la hospedera y la microbiota bacteriana presente, se constituye de especies de *Lactobacillus* (96%) y bacterias aerobias potencialmente patógenas (4% restante), como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* grupo B y *Escherichia coli*. Las pruebas diagnósticas de vaginosis bacteriana se dividen en dos categorías a saber; criterio clínico (de Amsel) y criterio basado en laboratorio (de Nugent). En ambos casos, se requiere de la toma de muestra de secreción vaginal con un hisopo estéril. (21)

2.1.5.6. Técnicas de diagnóstico de microbiota

Sin duda, al finalizar la primera década del siglo XXI, las técnicas de biología molecular son ya un instrumento útil en la clínica, la docencia y la investigación microbiológica, pero pueden carecer de la suficiente sensibilidad cuando el microorganismo se encuentra en escasa cantidad en la muestra clínica. En estos casos se recurre, a través de métodos químicos o enzimáticos, a aumentar la cantidad de una secuencia de ácido nucleico que le pertenece, para así poder detectarlo después. Se trata de los métodos de amplificación de ácidos nucleicos, de los que existen distintas variantes. (22)

De forma genérica, se pueden describir dos grandes grupos de técnicas en función de lo que se amplifica. El primero, que comprende la mayoría de los métodos existentes, amplifica la diana; entre estos métodos hay que destacar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es la más extendida y la *Nucleic Acid Sequence Based Amplification* (NASBA), aunque además existen otras, como la reacción en cadena de la ligasa (LCR) o la *Strand Displacement Amplification* (SDA); el segundo grupo de métodos comprende aquellos que amplifican la señal obtenida tras producirse el híbrido, entre los que hay que destacar el método conocido como ADN ramificado (*branched DNA o bDNA*), que es un excelente procedimiento para la cuantificación. (22)

Desde el año 2000, han aparecido las técnicas de secuenciación masiva, que permiten secuenciar el gen amplificado 16S rRNA de bacterias, o cualquier otro, con alta profundidad y a bajo costo. Esta tecnología permite la caracterización detallada de comunidades complejas del microbioma humano.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ADN diana. Es el ADN que se desea amplificar, también se le llama ADN molde. Su cantidad y su calidad son factores determinantes de la eficacia de la reacción. El gen que se desea secuenciar se amplifica, para tener más de él. Todas las bacterias tienen este gen, por tanto el PCR amplifica todos los genes presentes en la comunidad bacteriana.(23)

Partidores o primers. También se conocen como *primers* o iniciadores; son oligonucleótidos, es decir, secuencias de ADN de 15-30 bases de longitud complementarias de los extremos 3' de cada una de las cadenas de ADN diana.

Desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP). Aportan las bases que componen el ADN (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) y deben encontrarse en cantidades iguales.

Enzima Taq polimerasa. Es una ADN polimerasa obtenida de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, que tiene una temperatura máxima de actuación de 72-90° C y es estable a las temperaturas de reacción. Su función consiste en alargar la cadena de ADN hibridada con el primer mediante la incorporación de los dNTP. Los primers permiten que la amplificación del gen ocurra, para después poder secuenciar estos genes con los secuenciadores que realizan secuenciación masiva, y permiten conocer la proporción relativa de cada especie bacteriana (identificada según la secuencia del gen 16S rRNA).(23)

Al igual que la microbiota cutánea e intestinal, la microbiota oral también se analizó en la presente investigación, a través de la recolección de hisopeado de boca y su posterior congelación en seco a menos 70 grados centígrados para su análisis genético por medio de biología molecular.

Las técnicas microbiológicas clásicas son más lentas y menos precisas que las moleculares. El cultivo *in vitro e inoculación en ratones* son técnicas costosas y los patógenos pueden presentar diferencias en infectividad dependiendo del hospedero

Anticuerpos el uso de anticuerpos para la identificación de microorganismos se ha empleado por ser una técnica simple y rápida. Se puede automatizar, y puede ser usada para trabajar con varias muestras al mismo tiempo. Sin embargo, la detección no puede ser precisa cuando existen cantidades mínimas de microorganismos, en el caso de patógenos no distingue entre infecciones activas y latentes. Además, se carece de anticuerpos y antígenos para muchos microorganismos y en algunos casos la detección no es precisa por la nula especificidad de algunos anticuerpos. Otras desventajas son que los anticuerpos tienen un costo muy elevado, o bien en algunos casos pueden ofrecer falsos positivos. (22)

Técnicas moleculares (23) se basan en el análisis de los ácidos nucleicos extraídos de los microorganismos en forma directa o bien de una muestra conteniendo el microorganismo en cuestión. En la actualidad, las técnicas moleculares para la identificación de microorganismos están teniendo un auge muy importante debido a:

1.- Especificidad (pueden identificar solo la molécula o el microorganismo de interés)

- 2.- Sensibilidad (son capaces de detectar la presencia de un solo microorganismo)
- 3.- Rapidez (se puede identificar un microorganismo en menos de 24 horas)
- 4.- Pueden ser automatizadas (permiten tener un diagnóstico en un menor tiempo y reducir los costos).

El uso de técnicas moleculares ha permitido identificar nuevos microorganismos, los cuales no habría sido posible, su cultivo e identificación, por técnicas tradicionales. Además, permiten estudiar las poblaciones microbianas sin hacer aislamientos, por lo tanto, se evitan los sesgos que pueden surgir con el cultivo de microorganismos. Así mismo, estas técnicas permiten la detección de microorganismos altamente patógenos, los cuales pueden ser identificados muertos evitando los riesgos de infección del analista. Las técnicas moleculares han demostrado ser muy útiles en situaciones clínicas donde los métodos convencionales son muy poco sensibles por ejemplo durante la etapa asintomática de las infecciones del VIH, el cultivo celular es lento y muy complicado para ser usado a gran escala en el aislamiento viral.

Otra aplicación importante es en el monitoreo del surgimiento de mutaciones en el genoma, por ejemplo, la selección de variantes resistentes durante la terapia antiviral/antibiótica

Algunas desventajas asociadas a las técnicas moleculares son:

- 1.-No distinguen entre organismos vivos y muertos, aunque algunas veces esto no es precisamente una desventaja; en el caso de *Staphylococcus aureus* la bacteria muere a temperaturas que no degradan la toxina, así la detección de la bacteria muerta es un indicativo de la presencia de toxinas en la muestra.
- 2.-Se tiene que contar con conocimientos de secuencias de nucleótidos específicas del patógeno a diagnosticar
- 3.-Se requiere de personal altamente capacitado para el desarrollo de las pruebas de identificación
- 4.- Se requiere equipo más específico para el diagnóstico, lo cual eleva la inversión inicial
- 5.- Se desarrollan procedimientos con múltiples etapas, lo que incrementa la posibilidad de errores, además de la posibilidad de obtener falsos positivos y falsos negativos. El alto costo de las técnicas moleculares tenderá a bajar a medida que se incremente el uso

de estas técnicas. Por otra parte, el problema de falsos positivos y falsos negativos se puede solucionar si se incluye en cada análisis un control positivo y un control negativo.

Una de las técnicas moleculares más sencillas para identificar bacterias, consiste en determinar el porcentaje de guaninas y citosina presente en su ADN. En este caso, se realiza la extracción del ADN de una colonia pura y por espectrometría se determina el porcentaje de guanina y citosina. En el género *Pantoea* se ha estimado un porcentaje de guanina y citosina que va del 50 al 58% y en bacterias del género *Pseudomona* un porcentaje que va del 58 al 70%. Esta técnica tiene la desventaja de no poder identificar especies, solo se pueden identificar bacterias a nivel de género, además algunos géneros de bacterias presentan porcentajes de guaninas y citosina muy similares, por lo cual, las posibilidades de obtener falsos positivos (identificar a un organismo presente cuando en realidad está ausente) se incrementan. La mayoría de las técnicas moleculares se basan en la hibridación de los ácidos nucleicos o bien en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Técnicas basadas en hibridación de ADN (24).- Estas técnicas se desarrollaron a partir del conocimiento de que dos cadenas sencillas de ácido nucleico que tengan secuencias complementarias pudiéndose unir o hibridar para formar una cadena doble. Las cadenas sencillas pueden ser de ADN o ARN, o bien una de ADN y otra de ARN. Dentro de las técnicas de hibridación más utilizadas están los **fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP's)**.

RFLPs. Esta técnica está basada en hibridación de ADN. Consiste en extraer ADN de un cultivo puro de un microorganismo o bien de una muestra infectada y digerir el ADN con enzimas de restricción (enzimas que cortan el ADN en sitios específicos), posteriormente estos fragmentos de ADN son separados en un gel de agarosa utilizando electroforesis. El ADN está cargado negativamente, por lo tanto, en un campo eléctrico el ADN migraría del polo negativo hacia el polo positivo a través de la matriz de un gel. La fricción entre el fragmento y la matriz ocasiona que fragmentos pequeños migren más rápido que fragmentos grandes. En esta técnica el ADN separado de la forma antes descrita en el gel, es transferido a un soporte sólido (membranas de nylon o nitrocelulosa), acto seguido se hibridiza el ADN de la membrana con una sonda de

ADN específica (fragmento de ADN de cadena sencilla de 150 a 300 nucleótidos) del microorganismo que se quiere identificar. La sonda se une en el fragmento del ADN que tenga su complemento. La sonda para la detección tiene que ser marcada en forma radioactiva (^{32}P) o no radioactiva (digoxigenina). La sonda puede ser aislada del genoma nuclear, del genoma mitocondrial o bien de ADN que codifica para proteínas (ADNc) del microorganismo. Esta metodología es muy específica. Sin embargo, no es muy rápida ni muy sensible (se requiere 10³ a 10⁶ copias de la molécula o secuencia de interés para dar un resultado confiable), además de que se requiere utilizar radioactividad (si no es empleada adecuadamente y bajo condiciones especiales de laboratorio, se pueden tener riesgos de salud del analista, contaminaciones de instalaciones o del medio ambiente).

Una variante de RFLP's se ha diseñado para la detección de *Listeria*. Esta consiste en fijar en un micro tubo una sonda de ADN complementaria a una región del RNA ribosomal de la bacteria. El RNA completo de la muestra es extraído y colocado en el micro tubo con la sonda, la cual se unirá al RNA ribosomal, posteriormente se agrega otra sonda de ADN complementaria a otra región del RNA ribosomal la cual está marcada con fluorescencia posteriormente se detecta la presencia del microorganismo por un anticuerpo con anti-fluorescencia (24).

Transferencia por aplastado (squash 21noté). En esta técnica la muestra a analizar se aplasta contra un soporte sólido originando una huella, la muestra se fija utilizando alcohol o exponiéndola a UV. Se hibridiza con la sonda específica para el microorganismo en cuestión. Tiene la ventaja de ser una técnica rápida, que puede ser utilizada en campo o fuera de laboratorio. Sin embargo, es una técnica sucia, lo cual a veces no permite distinguir una hibridación de ácidos nucleicos, con lo cual las probabilidades de obtener falsos negativos (diagnosticar el microorganismo como ausente cuando en realidad está presente) se incrementan. Otra de las técnicas son: Transferencia de punto (dot21nté) similar a squash 21nté y Northern21nté similar a RFLPs sin embargo lo que se separa es ARN y se hibridiza con sondas de ADN presenta ventajas y desventajas similares a RFLPs.

ARN de cadena doble. Esta técnica se utiliza principalmente para detectar células infectadas con un virus que tenga como material genético ARN (retrovirus). Dado que el ARN en una célula se encuentra como cadena sencilla, la presencia de ARN de cadena doble implica la replicación del virus dentro de la célula. Esta es una técnica relativamente sencilla, dado que incluye pocas etapas (extracción y purificación del ARN de cadena doble y su separación en geles de poliacrilamida). Sin embargo, presenta la desventaja de identificar solo células infectadas con retrovirus, sin poderse especificar la taxonomía del virus, por lo tanto, es una técnica muy limitada.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la amplificación enzimática *in vitro* de un segmento de ADN específico del microorganismo blanco. Esta es la técnica, más utilizada para la detección de microorganismos, se basa principalmente en realizar millones de copias de un segmento de ADN específico de un microorganismo y es la técnica que se utilizó en el presente trabajo de detección de microbiota de las personas de 5 a 14 años de edad con y sin Tripanosomiasis Americana en Tarabuco. En esta técnica la cadena doble de ADN es separada en dos cadenas sencillas sometiéndola a temperaturas mayores a 92 grados centígrados, después se hibridiza o alinean dos pequeños segmento de ADN complementarios uno a una cadena y el otro a la otra. Estos pequeños segmentos son llamados iniciadores, los cuales deben ser diseñados de tal manera que solo hibridise con el ADN del microorganismo que se desee y su tamaño generalmente va de 18 a 25 bases. Una vez que los iniciadores están unidos a las cadenas complementarias se adiciona a la reacción una ADN polimerasa, la cual va a formar la nueva cadena tomando como bases la cadena sencilla y uno de los extremos del iniciador (3'). Después de este primer ciclo, si se partió de una sola cadena doble de ADN se tendrían dos cadenas dobles. Esta amplificación se incrementa en forma geométrica a medida que se repite el número de ciclos, así después de dos ciclos se obtienen cuatro cadenas dobles de ADN, y después de tres, ocho y así sucesivamente, después de treinta ciclos habría una gran cantidad de ADN amplificado para ser visualizado a simple vista. Las ventajas de PCR sobre otras técnicas de detección se han reportado en varias ocasiones. La detección de *C. trachomatis* por PCR resultó ser más precisa, con sensibilidad de 90-100% y especificidad mayor al 97% que la detección por ELISA Así mismo la PCR ha ayudado a identificar microorganismos infecciosos

relacionados a enfermedades previamente identificadas como de origen no infeccioso. (25)

La técnica de PCR se ha utilizado para la identificación de virus, bacterias hongos, fitoplasmas nematodos etc. Un ejemplo es el método desarrollado por Ayala y colaboradores 2004, para la identificación de la bacteria *Clavibacter michiganensis* subs.*pnebraskensis*, la cual es causante de la enfermedad conocida como marchitez bacteriana del maíz, en este caso se diseñaron iniciadores específicos a un segmento entre los genes de rRNA 16 S y 23S. Dichos iniciadores se compararon con las secuencias de ADN reportadas en los bancos de genes para comprobar que solo se alinearían a la secuencia de *Clavibacter michiganensis* subs *pnebraskensis*. La precisión y reproducibilidad de los ensayos de PCR depende de la experiencia técnica y experiencia de analista. La especificidad de la prueba puede ser afectada por la contaminación de la muestra durante su procesamiento. Si los iniciadores no son específicos o si las condiciones de la PCR no son óptimas, se pueden amplificar productos no específicos Lo anterior puede guiar a la detección de falsos negativos, de la misma manera la contaminación de la muestra con inhibidores (ácidos húmicos, poli fenoles, carbohidratos, etanol, etc.) de la enzima polimerasa puede ocasionar también falsos negativos. Sin embargo, esto se puede solucionar incorporando siempre controles positivos. La contaminación de la muestra con otro ADN o RNA, puede conducir a la detección de falsos positivos, esto se soluciona agregando siempre un control negativo La identificación de microorganismos directamente de alimentos utilizando PCR, presenta algunos retos como es la baja sensibilidad provocada por la inhibición debida a la matriz del alimento, esto puede ser parcialmente restablecido con una etapa de enriquecimiento pero se alarga el tiempo para el diagnóstico (Grant y col., 1993). Aun con estas desventajas, la flexibilidad, automatización, rapidez y confiabilidad de las técnicas moleculares basadas en PCR son las técnicas moleculares con más aceptación en la actualidad para la detección de microorganismos en general. (26)

RT-PCR (amplificación de un segmento de ADN previamente formado a partir de ARN). Esta es una de las técnicas más utilizadas para identificar microorganismos cuyo material genético es ARN (retrovirus y viroides). En este caso se extrae primeramente ARN del microorganismo en cuestión o bien de una muestra presuntamente infectada

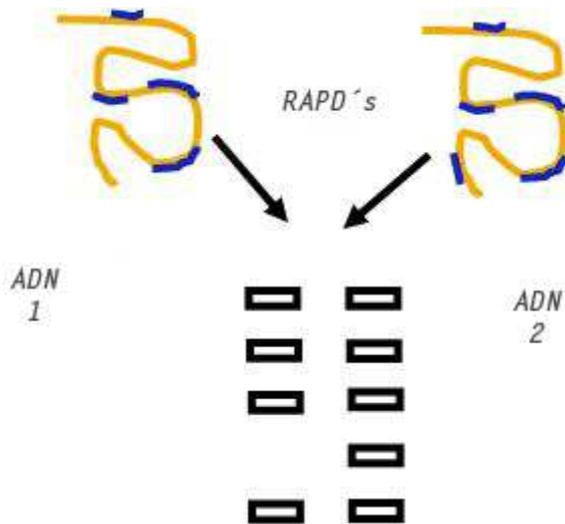
por uno de estos microorganismos, acto seguido el ARN, se somete a una temperatura generalmente de 80 °C para linearizar el ARN dado que es por lo general una cadena sencilla y tiende a formar estructuras secundarias y terciarias. Posteriormente, se le añade un iniciador complementario y se coloca a una temperatura entre 37 y 40 grados centígrados para que se alinee el iniciador con la cadena complementaria, posteriormente se coloca la reacción a 40°C con lo cual se detiene esta. Después se incorpora una enzima denominada reverso transcriptasa la cual se va a encargar de formar ADN tomando como molde el ARN de cadena simple y un extremo (3') del iniciador cuando el ADN ya ha sido formado se procede a realizar la reacción del PCR, esta técnica puede ser realizada en un solo paso si se añaden todos los reactivos en un mismo tubo y se programan las temperaturas específicas y para cada etapa. Un ejemplo de un microorganismo que puede ser fácilmente identificado utilizando esta técnica es el virus de la tristeza de los cítricos. Otra de las ventajas de esta técnica en la detección de microorganismos es que permite identificar infecciones activas (26).

PCR anidada (amplificación enzimática de un segmento de ADN interno de un segmento de ADN previamente amplificado). La PCR anidada es una técnica que se utiliza principalmente cuando un microorganismo se encuentra en muy bajas cantidades o bien cuando se quiere identificar si en una muestra existen microorganismos de un determinado grupo y después determinar que especies de microorganismos de ese grupo están presentes. Esta técnica consiste en amplificar un segmento grande de ADN (700-2000 pb) por la técnica de PCR con un par de iniciadores y posteriormente amplificar con otro par de iniciadores un segmento interno del primer fragmento amplificado, es decir, esta técnica es una PCR doble y por lo tanto se estima que es mil veces más eficiente que una PCR simple. La PCR anidada se ha utilizado con éxito para la identificación de muestras presuntamente infectadas con fitoplasmas, y si la muestra es positiva a la presencia de fitoplasmas. Se amplifica por segunda ocasión para determinar el tipo específico de fitoplasmas presente en dicha muestra. Un ejemplo del uso de esta técnica es la detección del fitoplasma del amarillamiento letal del cocotero.

RAPDs o polimorfismo del ADN amplificado al azar, en este caso se realiza una reacción de PCR con un solo iniciador el cual tiene un tamaño de 8 a 12 bases con

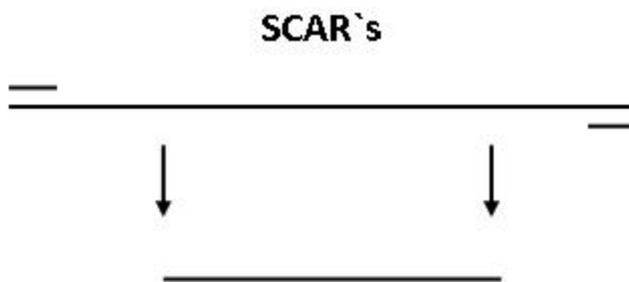
secuencia arbitraria. En la etapa de alineamiento del iniciador se emplean temperaturas bajas 37 a 40 grados Centígrados para asegurar que el iniciador se una a diferentes regiones del genoma del microorganismo que se desee identificar. Así la identificación se realiza solo de cultivos puros del microorganismo y con una sola reacción del PCR se amplifican varios segmentos a la vez (Figura 1). Tiene la ventaja de que no se requiere conocimientos previos del microorganismo para poderlo identificar, esta técnica como método de identificación a nivel comercial no es muy utilizada debido a los problemas de reproducibilidad, sin embargo, es muy útil cuando se requiere determinar diferencias entre 2 microorganismos altamente emparentados pudiéndose detectar estas diferencias aun a nivel de cepa. Padilla en el 2003 utilizando RAPD's logró identificar diferencias a nivel de ADN entre 3 cepas del *Aspergillus niger* degradadoras de taninos. Otra ventaja de los RAPDs es en el caso donde se logra identificar un fragmento de ADN amplificado que se encuentre en una cepa en particular, este se puede secuenciar y diseñar a partir de esa secuencia iniciadores específicos para esa cepa. Lo mismo aplica para el diseño de iniciadores específicos a nivel de especie o de género, esta técnica es conocida como SCAR (secuencia caracterizada de región amplificada) (Figura 2). Además de la desventaja de poca reproducibilidad, la presencia de una banda RAPD, no permite distinguir entre los estados homocigoto y heterocigoto. Una técnica similar a RAPD's es la conocida como amplificación de huellas genómicas del ADN (DAF), en esta técnica se utilizan iniciadores de 5-10 bases para amplificar ADN genómico al azar, las bandas amplificadas se separan en geles de poliacrilamida. Esta técnica se ha utilizado para el estudio de cepas de *Salmonella25 entérica* (25)

Figura 1.- Polimorfismo del ADN amplificado al azar.



Fuente: Protocolo OMS

Figura 2.- Secuencia caracterizada de una región amplificada

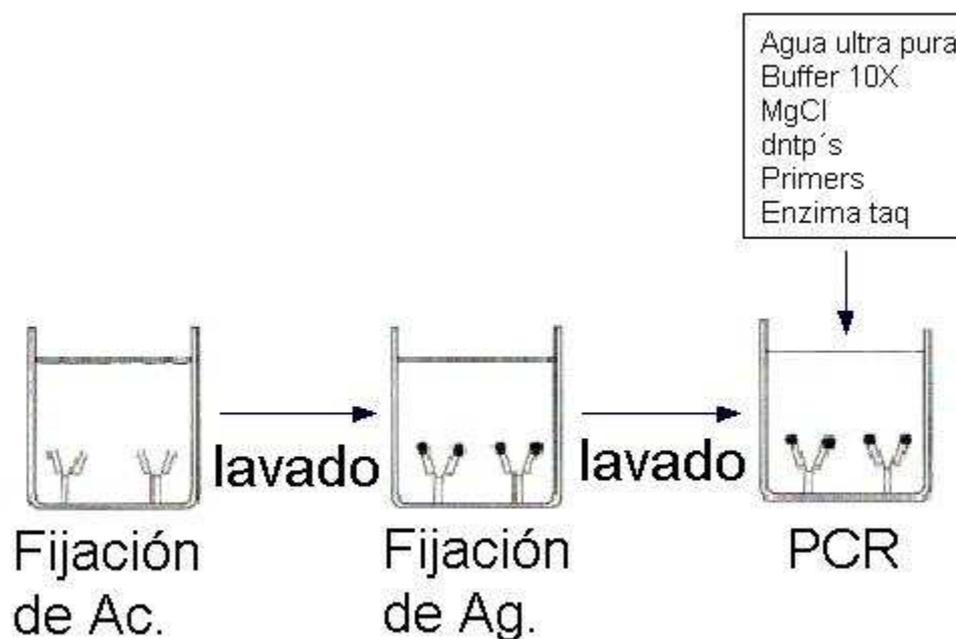


Fuente: Protocolo OMS

Inmuno-PCR (unión de un microorganismo a un soporte sólido utilizando un anticuerpo y una posterior amplificación de ADN por PCR). Es una técnica que combina las ventajas de las técnicas inmunológicas (ELISA) y de las técnicas moleculares (PCR) para que combinadas, disminuyan o eliminen las desventajas de ambas técnicas. Rocha en el 2003, menciona que ELISA es ineficiente en la detección cuando se presentan niveles muy bajos de la molécula o microorganismo de interés en la muestra a analizar, mientras que la PCR se ve inhibida por algunos componentes de la muestra (compuestos fenólicos, polisacáridos etc.). Estas características se combinan cuando se desea detectar microorganismos cuarentenados

directamente de órganos vegetales (semillas, tubérculos etc). Rocha (2003) adaptó la técnica de inmuno PCR para la detección de *Pantoeastewartii*, directamente de la semilla de maíz. En este caso fijó un anticuerpo primario a un microtubo, se lavó el exceso de anticuerpo y se colocó la muestra molida de la semilla, la cual se conocía que estaba infectada por *Pantoeastewartii*, posteriormente se deja incubando por una hora para la unión antígeno-anticuerpo, se lavó para eliminar la muestra y en el tubo con el antígeno y el anticuerpo se realizó la PCR. (25)

Figura 3.- Etapas en la técnica de inmuno-PCR



Fuente: Protocolo OMS

Inmunomagnetic PCR (similar a la anterior, en este caso el soporte es una esfera magnética, la cual es removida de la muestra con un magneto y posteriormente se realiza la PCR). En esta técnica, un anticuerpo primario se encuentra unido a perlas metálicas las cuales se colocan dentro de la muestra a analizar, se deja incubar para la unión antígeno-anticuerpo, posteriormente, se extraen estas perlas metálicas con un magneto, se lavan y se colocan en un tubo en el cual se realiza la PCR. Esta técnica se ha utilizado para la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos.

PCR-múltiple. Uno de los problemas de las técnicas de PCR discutidas anteriormente es que

solo permiten la identificación de un solo patógeno a la vez. Con la finalidad de solucionar este problema se ha diseñado la técnica conocida como PCR-múltiple la cual permite la detección de diferentes moléculas o microorganismo de interés en una sola reacción. En esta técnica, se incorporan a la reacción un par de iniciadores por cada uno de las moléculas o microorganismos a detectar, lo cual permite un ahorro en tiempo y costo para la detección de diferentes microorganismos simultáneamente. Esta técnica presenta retos como el de diseñar todos los iniciadores que se deseen agregar a la reacción con similar temperatura de alineamiento, no deben presentar homología entre ellos, además de amplificar fragmentos de diferentes longitudes. La sensibilidad de una PCR múltiple es del orden de 10^2 células o de 2.9 pg de ADN de interés. Sin embargo, esta sensibilidad puede ser afectada por el diseño ineficiente de los iniciadores (25). Esta técnica se ha utilizado para la detección de diferentes especies de *Listeria* en una misma muestra, así como para detectar diferentes microorganismos a la vez como es el caso de *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella* y *E.coli*. La PCR múltiple también ha sido usada para detectar diferentes genes de un mismo organismo en una muestra. Células infectadas no retienen todos los genes del virus del papiloma humano, usando PCR múltiple se identificó la presencia de varios genes vírales a la vez, lo cual confirmó el agente causal. Esta técnica también es usada para identificar cuales genes de resistencia a antibióticos poseen una determinada cepa bacteriana ineficiente de los iniciadores (25).

2.1.5.7. Identificación de microorganismos altamente emparentados

En algunas ocasiones uno se encuentra en una situación en la cual tiene que identificar una cepa especial de un microorganismo, ya que esta presenta características sobresalientes de producción de alguna enzima o bien de adaptación a una determinada condición, o cuando se quiere preservar la identidad de una cepa en particular, lo cual ayudaría a determinar si se contaminó, así mismo cuando se quiere establecer relaciones de parentesco genético (filogenético) entre diferentes cepas de especie, especies de género, género de familia o bien entre diferentes familias de microorganismos, se tienen las siguientes técnicas moleculares que son: Rep-PCR, PCR-RFLP, AFLP's.

Rep.-PCR esta técnica está basada en la amplificación simultánea de diferentes regiones con secuencias repetidas, se ha utilizado preferentemente en bacterias amplificando las regiones

BOX, ERIC, y Rep. En este caso, se obtienen varios fragmentos de diferentes tamaños los cuales son amplificados simultáneamente, lo cual permite distinguir dos microorganismos altamente emparentados al comparar los patrones de amplificación de estos microorganismos. Se ha propuesto que la técnica REP-PCR puede ser usada para dilucidar las bases genéticas de la variabilidad fenotípica entre diferentes especies, dado que se producen patrones de bandeo reproducibles, de complejidad similar, y permiten la diferenciación de cepas al nivel de subespecie (Johansson y col.. 2000). Esta técnica se ha utilizado para la identificación de diferentes especies de *Xanthomonas* y de *Francisella*.

PCR-RFLP esta técnica consiste en amplificar por PCR un segmento específico de un microorganismo y posteriormente digerir el ADN amplificado con enzimas de restricción, esto permite determinar diferencias entre los patrones de bandas amplificadas y/o entre los patrones de los fragmentos resultantes de la digestión del ADN. Existen diferentes variantes de esta técnica dependiendo del fragmento específico amplificado y digerido. Entre los segmentos más comúnmente amplificados y posteriormente digeridos se encuentran los genes ribosomales (16s en el caso de procariotas y 18s en el caso de eucariotas), los espacios entre el conjunto de genes ribosomales (espacios intergénicos IGS) y los espacios internos transcritos (ITS) del conjunto de genes ribosomales. El gen ribosomal 16S está altamente conservado pero con la variabilidad suficiente para hacer distinciones entre géneros y especies (26). Se han desarrollado iniciadores a partir de la secuencia del gen ribosomal 16S dentro de un rango muy amplio (universales), desde el nivel de dominio (bacterias, archaea o eucariotes), grupos (bacterias metanogénicas, bacterias sulfatoreductoras, bacterias lácticas, etc) hasta géneros individuales (*Escherichia*) (Jan y LeBorgne 2001). Sin embargo, cuando la resolución del análisis basado en el gen 16S rRNA es muy pequeña para hacer inferencias sobre el parentesco de microorganismos altamente relacionados se ha propuesto la utilización del gen *gyrB* el cual codifica para la subunidad B del poli péptido de la ADN girasa. Se ha estimado que este gen evoluciona más rápido que el gen 16S rRNA mientras que aún mantiene una alta correlación con la homología del genoma total analizada por hibridación total ADN-ADN y micro arreglos (Rodríguez y col., 2003). Se han establecido metodologías para la identificación rápida basada en PCR-RFLP de cuatro especies altamente emparentadas de *Carnobacterium*, las cuales son importantes en la industria alimentaria. La amplificación de los segmentos IGS y su posterior digestión con la enzima Hind III permitió

identificar diferentes cepas de *Penicillium purpurogenum*. La amplificación de los segmentos ITS y su posterior digestión con la enzima Xho I permitió la identificación de diferentes cepas altamente emparentadas de *Aspergillus niger* (27).

AFLP`s. Amplificación de fragmentos de longitud polimórfica. Esta técnica se basa en la amplificación de un subgrupo de fragmentos de ADN generados por la digestión con enzimas de restricción. El ADN de los microorganismos es aislado, purificado y sometido a digestión con las enzimas de restricción Eco RI y MseI. Los fragmentos de restricción son después ligados a adaptadores, los cuales contienen sitios de restricción a cada uno de los extremos del fragmento y una secuencia homologa al sitio de apareamiento del iniciador. Los iniciadores usados para la amplificación contienen secuencias de ADN homólogas a los adaptadores y contienen una a dos bases selectivas a las terminaciones 3' de los fragmentos. Así los nucleótidos selectivos, permiten la amplificación de solo un subgrupo de los fragmentos cortados. Los AFLP`s han demostrado ser reproducibles, y una buena forma de diferenciar cepas de microorganismos altamente emparentadas. La detección a nivel comercial se ve restringida por el alto costo del secuenciador que se utiliza para visualizar los fragmentos amplificados (27). Restrepo y col., en 1999 evaluaron la eficiencia de la técnica de AFLP`s para detectar la variación genética entre diferentes cepas de *Xanthomonas axonopodis*.

DGGE. Electroforesis en geles con gradiente desnaturizante. Esta técnica, es capaz de separar secuencias altamente relacionadas por su diferente movilidad en gradientes desnaturizantes (26). En esta técnica, comúnmente se amplifica alguno de los genes que codifican para el RNA ribosomal (16S rDNA, 18S rDNA etc.) El ambiente desnaturizante se crea manteniendo una temperatura uniforme (50-60 grados centígrados) y un gradiente lineal con urea y forma mida. El incremento de una concentración desnaturizante separa las cadenas dobles de ADN en dominios distintos. Cuando un dominio alcanza su temperatura de desnaturización en una posición particular del gel ocurre una transición del hélice doble a parcialmente desnaturizado, y la migración de la molécula prácticamente se detiene. Las variaciones en la secuencia de los dominios causa que sus temperaturas de desnaturización sean diferentes; por lo tanto, migran a posiciones diferentes dentro del gradiente desnaturizante, lográndose la separación de los dominios de manera efectiva (25).

Kowalchuk y col. en 1997 amplificaron el gen 18S rRNA de 20 especies fúngicas y sometieron los productos amplificados a DGGE, además secuenciaron las bandas separadas con DGGE, con esto se pudo identificar algunas cepas fúngicas.

TGGE. Electroforesis en geles con gradiente de temperatura. Similar al DGGE, sin embargo, en este caso el gradiente se crea incrementando gradualmente la temperatura durante la electroforesis. El ambiente desnaturalizante se forma por una concentración constante de urea en el gel, combinado con el gradiente de temperatura temporal (25). Esta técnica puede utilizarse para estudiar la diversidad de especies en una comunidad de microorganismos y comparar así la diversidad de especies entre comunidades. Esta comparación se basa en que el número, la posición precisa y la intensidad de las bandas reflejan el número y abundancia de los tipos dominantes de rDNA en una muestra y así se puede comparar dos comunidades de microorganismos.

Actualmente, existen técnicas que juegan sin duda un papel importante en la detección y cuantificación de un microorganismo. Las consideradas con mayor futuro

PCR en tiempo real. En la técnica de PCR en tiempo real además de los componentes tradicionales de una PCR normal se agrega una sonda de ADN, la cual en un extremo tiene un quincher y en el otro extremo un beicon, esta sonda es complementaria al ADN que se desea amplificar, por lo tanto, se alineará con todas las cadenas de ADN en donde está su complemento cuando la ADN polimerasa amplifica los fragmentos libera esta sonda del ADN la cual está unida, al liberarse se emite una fluorescencia la cual puede ser detectada, así entre más ADN se amplifique más luz se emitirá por lo tanto se puede estimar el número de fragmentos de ADN amplificado. Con esto se puede cuantificar el número de moléculas del ADN del microorganismo presente en la muestra en cuestión. Esta técnica ha sido usada para medir cuantitativamente la carga viral con el objetivo de monitorear la respuesta a la terapia por pacientes con infecciones de VIH, citomegalovirus, o virus de la Hepatitis C (24). La cuantificación de un determinado microorganismo en una muestra es de importancia pronóstica, ayuda a predecir el progreso de una enfermedad, y es usada para asistir en la decisión del tratamiento médico. Además, la técnica de PCR en tiempo real se adapta para la evaluación de un número grande de muestras al mismo tiempo, permitiendo un diagnóstico de

laboratorio, rápido, confiable, eficiente y barato (26)

Micro arreglos o microchips. Esta técnica utiliza la complementariedad de las bases nitrogenadas del ADN y consiste en un arreglo ordenado de cientos o miles de secuencias de ADN (oligonucleótidos, cDNA, etc.) depositados sobre una superficie sólida (1.2 x 1.2 cm.). Los soportes sólidos son piezas de silicio o de vidrio. Para la detección de microorganismos se puede construir un arreglo (chip) con ADN de diferentes microorganismos, posteriormente una muestra conteniendo ADN de uno o varios microorganismos puede ser depositada e hibridada sobre el arreglo y cualquier ADN no hibridado puede ser eliminado por lavados. El arreglo es después analizado y escaneado para poder determinar con que ADN específico se hibridó el ADN de la muestra e identificar el o los microorganismos presentes en la muestra. Actualmente, esta técnica es muy costosa tanto por los reactivos empleados como por el digitalizador de imágenes utilizado para escanear los micro arreglos (25).

2.1.5.7. Secuenciación.

La determinación del orden o secuencia de bases a través de un segmento de ADN es una de las técnicas centrales de la biología molecular. Se cuenta con dos técnicas para secuenciar; una basada en un método enzimático y la otra en un método químico. Los requisitos que debe tener una secuencia para poder utilizarse en la identificación de microorganismos son 1.- La secuencia debe ser conservada entre un número de organismos relativamente grande. 2.- Su proporción de cambio debe ser constante sobre largos períodos y entre diversos organismos y deberá permitir inferencia de la distancia evolutiva entre un amplio rango de formas de vida; la secuencia no debe ser sujeta a grados amplios discrepantes de la presión de evolución. Tercero, La secuencia no deberá ser compartida entre diferentes organismos por transmisión horizontal. Finalmente, la secuencia deberá ser factible de ser amplificada y detectada de variadas formas. Secuencias que cumplen con los anteriores requisitos son las regiones que codifican para las pequeñas unidades ribosomales 16S en procariotas y 18 S en eucariotas reportan un método basado en la secuencia de nucleótidos que puede simultáneamente generar secuencias cortas conocidas de nucleótidos de un número de segmentos del mismo genoma o de diferentes genomas. La secuenciación es uno de los métodos con más futuro dado que solo se puede amplificar por PCR el gen ribosomal 16S o 18S, separar las bandas amplificadas, secuenciar o mandar a secuenciar las bandas encontradas, posteriormente

comparar esas secuencias, con las secuencias depositadas en los bancos de genes y poder llegar a identificar el o los microorganismos presentes en una muestra.

2.2.- Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una infección sistémica causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Es una zoonosis en la que participan un gran número de reservorios vertebrados y transmisores Triatominos.

2.2.1 Historia

En 1909 un médico brasileño, Carlos Chagas, fue el primer designado para estudiar la incidencia del paludismo en la zona de Minas Geraes; allí se dedicó a buscar intensamente los parásitos del paludismo y llevado por la curiosidad científica, mientras analizaba la materia fecal de una vinchuca; nombre común de los insectos Reduviidae, *Panstrongylus megistus*; encontró un tripanosoma un poco más fino que los africanos. A partir de ese descubrimiento se realizaron varios experimentos entre ellos hizo picar a un mono con las vinchucas infectadas; el mono enfermo, y en su sangre se observaba abundantes tripanosomas, repitió la experiencia con varios animales y observó que se repetía el fenómeno. (28) más tarde constato los síntomas clínicos en una niña de 9 años

En 1914 se descubre en Jujuy, provincia Argentina, la existencia de tripanosomas en un *Triatoma infestans*, cuyo nombre vulgar en Argentina es vinchuca, gracias a la investigación de Magio y Rosembauch.

En 1924 Mullens y colaboradores, en Ledesma, un departamento de Jujuy, analizando sangre fresca de un niño hallaron tripanosomas, pero entonces nadie pudo interpretar los síntomas clínicos. Posteriormente ingresa el Dr. Salvador Maza, (29) sobre quien el Dr. Pedro Sierra, dijo " fue el explorador sanitario más grande que hemos tenido"; creó la MEPRA; y realizó desde allí importantes trabajos sobre la enfermedad de Chagas, entre ellos el que llamó la atención sobre la posibilidad de transmisión por transfusión de sangre. (42) Sería injusto no mencionar a Carlos Romana, que describió el síndrome oftálmico que lleva su nombre

La importancia de la enfermedad de Chagas radica en su elevada prevalencia, su incurabilidad, las grandes pérdidas económicas por incapacidad laboral, y la muerte

repentina de personas aparentemente sanas. Se contempla dentro de la lista de las principales "enfermedades desatendidas". (29).

La infección se transmite principalmente por triatomíneos de la familia Reduviidae, orden Hemiptera (vinchucas), Subfamilia Triatominae. Otros modos de transmisión son: transfusional, congénito, trasplantes de órganos y oral. Se estima que en la región de las Américas, se presenta en 21 países, afecta a unos 7 - 8 millones de personas, y se encuentran en riesgo de adquirir la infección aproximadamente 25 millones de personas, con 56.000 nuevos casos anuales y 12 000 muertes/año. (29)

2.2.1.1Ciclo de vida de *T. cruzi*

El ciclo biológico se completa al infectar la sangre y otros tejidos de los reservorios, en el tubo digestivo de los vectores sufre distintas transformaciones. En el ser humano (hospedador vertebrado) el parásito transmitido en las heces del insecto es la forma de tripomastigote metacíclico. En la sangre, el parásito se observa como un tripomastigote fusiforme, en forma de "C" o de "S" de 20 centímetros de largo por 1 centímetro de anchura. Durante esta etapa, el tripomastigote no se multiplica en la sangre del hospedero. (30)

Cuando el parásito infecta a las fibras del músculo cardíaco o a los fagocitos, acorta el flagelo y se transforman en un amastigote redondo de 2 a 5 centímetros de diámetro y un flagelo externo muy corto o inexistente, este se multiplica por medio de fisión binaria formando "racimos" o "nidos".

Los parásitos liberados de la circulación se convierten en promastigotes y tripomastigotes éstos que son liberados a la sangre circulante son de un tamaño total que varía entre 15 y 20 centímetros, tienen flagelo libre, un cinetoplasto voluminoso, terminal o subterminal que contiene el 30 % del ADN del parásito, y un núcleo oval. Estos tripomastigotes pueden infectar otras células para repetir el ciclo. (30)

Los triatomíneos nacen, libres de infección, pero adquieren al parásito al alimentarse del hombre o de los animales domésticos o silvestres infectados.

Los tripomastigotes migran al intestino medio del insecto donde se transforman en epimastigotes, flagelados anchos, muy móviles, con el cinetoplasto entre el núcleo y el flagelo libre. Allí se dividen un gran número de veces, a partir de que las vinchucas quedan infectadas de por vida.

Los epimastigotes se transforman en tripomastigotes meta cíclicos y migran al intestino de donde son excretados con las heces en el momento de la picadura. Mediante la degradación del ADN del cinetoplasto con enzimas restrictivas y en posterior análisis es posible la identificación de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*

2.2.1.2. Vías de contaminación

Las vías de contaminación son, principalmente, entomológica, transfusional y transplacentaria; existiendo otras de menor importancia que han sido descritas por varios autores a las cuales nos referiremos oportunamente.

Entomológica

El triatoma pertenece al reino animal, al filum de los artrópodos, clase de los insectos, orden de los hemípteros, familia de los reduvidae, y a la subfamilia de los triatomas.

Es el vector de la enfermedad de Chagas, pues es el responsable de la transmisión de la misma, se distingue de las otras subfamilias por el rostro recto, y por ser un hematófago, es decir se alimenta solo de sangre, aunque se han descrito casos de canibalismo.(31)

2.2.1.3. Nosología General

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una parasitosis producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, hematófago pero que se reproduce en los tejidos, por la división binaria, múltiple y progresiva, pasando por una forma no flagelada: amastigote.(30)

Triatoma infestans

Es el vector de la enfermedad. Como en todos los insectos, el cuerpo del triatoma está compuesto de tres regiones: cabeza, tórax y abdomen.

Hay más de un centenar de especies de *triatomas*, 16 de ellas habitan en nuestro país, pero no todas tienen importancia epidemiológica en la transmisión del *Trypanosoma cruzi*.

Evolución y Manifestación de la enfermedad de Chagas

Señalaremos en primer lugar su evolución en 3 periodos:

1. Agudo o de comienzo que dura alrededor de 20 a 30 días
2. Intermedio o de Latencia, cuya duración es variable y puede alcanzar varios años.
3. Crónico con una duración que depende de la gravedad que alcance el proceso

1. Período Agudo

La mayor parte de los afectados por la enfermedad son niños, no porque estos sean más susceptibles que los adultos, sino simplemente por tener antes en la vida la posibilidad de ser infectados por el triatoma.

El período de incubación (que es el lapso que media entre la introducción del tripanosoma en el organismo y la aparición de los primeros síntomas) es de duración variable, con un término medio de una semana. El inicio de las molestias es súbito, presentando el enfermo fiebre, escalofríos, dolor de cabeza y de los músculos del cuerpo, malestar general e inapetencia. Algunas veces hay signos en el organismo que delatan la puerta de entrada de la infección: son el complejo oftalmoganglionar y los habones de inoculación.

El complejo oftalmoganglionar o signo de eje, representa una manifestación de valor diagnóstico. Lamentablemente se ve solo en no más del 4% del total de formas agudas. Se caracteriza por: comienzo habitualmente súbito, hinchazón elástica e indolora de los párpados superior e inferior de un solo ojo, que toman color morado (como si fuera un "ojo en compota"); conjuntivas rojas; hinchazón moderada del lado facial correspondiente al ojo afectado. Esta inflamación ocular desaparece lentamente en el curso de la fase aguda de la afección.

Los "chagomas de inoculación", otro signo de puerta de entrada de la infección, consisten en zonas de endurecimiento cutáneo que pueden aparecer en cualquier lugar del cuerpo, especialmente en las partes descubiertas. Estas zonas generalmente tienen un color rojo y alta temperatura local; surgen como si brotara del interior de la piel. Son poco dolorosos. El habón de inoculación tiende a desaparecer espontáneamente al cabo de 2 o 3 meses; queda en ese sitio una pigmentación característica.

2. Periodo de Latencia

Pasado el primer mes, el enfermo entra en un segundo periodo, o de latencia; este periodo puede durar años y durante ese tiempo no hay ningún síntoma; solamente se puede poner en evidencia la enfermedad por medio de análisis de sangre en la que se comprueba las alteraciones provocadas por la enfermedad o también (aunque más difícilmente), viendo los tripanosomas.

La mayor parte de las personas permanece en este periodo todo el resto de sus vidas, y aún hay quienes han curado espontáneamente.

3. Periodo Crónico

La forma cardíaca es la más estudiada, conocida y fácil de diagnosticar. Las manifestaciones clínicas dependen del grado del daño miocárdico, presencia de arritmias y grado de insuficiencia cardíaca. Los síntomas más frecuentes son palpitaciones, mareos, disnea y dolor pectoral.

Mediante la radiografía del tórax se puede evidenciar el grado de agrandamiento cardíaco y a través del EC se puede apreciar los defectos típicos de la conducción ventricular y las arritmias.

El bloqueo de rama derecha es muy frecuente así como el hemibloqueo anterior izquierdo. Pueden presentarse también diferentes grados de defectos de conducción auriculoventricular (A-V) y aún un bloqueo A-V completo. Las complicaciones más frecuentes son embolismo sistémico y la muerte súbita.

El enfoque que usualmente se le da a la enfermedad está dado por la ignorancia de la misma. A pesar de que se ha descrito la cardiopatía chagásica hace más de 40 años, aún

permanece desconocida o mal diagnosticada en muchas regiones endémicas donde frecuentemente es considerada como cardiopatía idiopática.

Forma digestiva

De poca frecuencia en nuestro medio, siendo más una excepción. Se trata por lo general de infiltración parasitaria fibrosa en los plexos mioentéricos, con trastornos de la motilidad y dilatación proximal al segmento paralítico.

Los órganos más comprometidos son esófago y colon conformándose el cuadro de condiciones "mega", dilataciones gigantes de colon y esófago.

Forma neurológica

En el estado crónico se discute si se trata de secuelas de meningoencefalitis o de lesiones nerviosas de nuevo. Se han observado alteraciones de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático. Tanto en estudios histológicos como fisiológicos se han presentado alteraciones del sistema nervioso autónomo. Se ha reportado en esta fase alteración de los ganglios de la raíz dorsal y una pérdida generalizada de los axones sensoriales. (32)

2.2.1.4. Diagnóstico por el laboratorio de la enfermedad de Chagas

Inmunología.-

Los estudios de la respuesta inmunológica de la enfermedad de Chagas comienzan con la búsqueda de anticuerpos, siendo la fijación de complemento, lograda en 1913, la primera en realizarse, se han obtenido diferentes pruebas; la inmunidad celular comenzó a estudiarse, por Globe, en 1970 (33)

Los antígenos más usados para los estudios, en principio, (31) consistían en un extracto glicerinado acuoso de corazón y bazo de perros infectados, también se utilizó hígado de conejos infectados, hasta que Freitas y Almeida en 1949 usaron epimastigotes de cultivo, empleando el siguiente procedimiento: Una vez lavados con solución fisiológica, los parásitos eran congelados y secados, luego se extraía con benceno, y se los volvía a secar, nuevamente se extraía con 9 volúmenes de agua y 3 de cloroformo, agitándolos vigorosamente con perlas de vidrio, y se los guardaba congelados.

Maekelten 1960 rompe los epimastigotes congelando y descongelando, sucesivas veces, y los guarda liofilizados, los demás autores ocuparon, con ligeras variantes, la misma técnica que para fines de laboratorio clínico son buenas. (31)

Paulone y Segura obtienen fracciones sub celulares con ruptura de tripanosomas por presión y descompresión, regulada en ambiente anaeróbico, y el aislamiento por centrifugación diferencial en gradiente de sacarosa. Con esta técnica lograron fracciones de núcleo, mitocondrias, microsomas y solubles de citoplasma.

Seguidamente se iniciaron pruebas de protección y de patología inducida recurriendo a la aplicación de distintas fracciones, con respecto al primer aspecto se verifico que la fracción flagelar es la que mejor protege, bajando la parasitemia.

Y en lo que se refiere al segundo, se mostró que el pellet de 100.000 g (cmc) induce miocarditis en las ratas.

En ensayos con anticuerpos monoclonales descubiertos por segura, se verifico la lisis de tripomastigotes, además de obtenerse protección cuando se lo suministra, sugiriendo los autores que el fch-8.1 es un buen medio para aislar un antígeno que podría ser aprovechado en Inmuno protección posibilitando la creación de una vacuna. (31)

Titto y Segura estudiaron la respuesta a la linfo proliferación y revelaron que en pacientes chagásicos se registraban 79 % de respuesta positiva, en voluntarios no chagásicos la respuesta fue de 17 %.

Queda todavía mucho por hacer en el campo de la Inmunología para la enfermedad de Chagas.

El empleo correcto de determinadas técnicas serológicas permite identificar la enfermedad de Chagas en sus diferentes etapas.

2.2.1.4.1. Diagnóstico parasitológico

El diagnóstico laboratorial específico de la infección chagásica tiene características especiales, de acuerdo a la fase en que se encuentra la enfermedad, en la fase aguda la parasitemia es elevada pero se hace difícil y a veces imposible en la fase crónica donde la parasitemia es baja. (34)

2.2.1.4.2. Diagnóstico serológico

La infección por *Trypanosoma cruzi* produce una respuesta inmune estable lo que permite durante la fase crónica, el diagnóstico se efectúe mediante la detección de anticuerpos IgG específicos.

La detección de IgM no ha demostrado ser muy útil en esta enfermedad, existen los llamados test convencionales que utilizan antígenos no purificados como Hemaglutinación Indirecta HAI, Inmunofluorescencia indirecta IFI y el ensayo Inmunoenzimático Elisa.

2.2.1.4.3. Métodos parasitológicos directos

Existen métodos directos para el diagnóstico de la fase aguda como ser la técnica de tubo capilar o micro hematocrito, técnica de Strout, gota gruesa y gota Fresca que solo se menciona, ya que no se realizara el diagnóstico de Chagas agudo.

2.2.1.4.4. Métodos parasitológicos indirectos

- **Xenodiagnóstico**

Principio: Esta técnica se basa en aprovechar la capacidad que tiene el *Trypanosoma cruzi* de multiplicarse en el intestino de los triatomínos La técnica consiste en hacer picar a la persona potencialmente infectada, con vinchucas totalmente sanas y criadas en laboratorio, que al succionar la sangre del infectado pueden ingerir los parásitos, los cuáles después de un cierto tiempo de multiplicación, serán encontrados en cantidades fácilmente detectables en las heces de los triatomas.

Interpretación: La sensibilidad del Xenodiagnóstico es de 95 a 100% en la fase aguda y solo de 25 a 50 por ciento en la fase crónica de la infección.

La complejidad de la técnica ha hecho, que en la actualidad solo sea utilizada con fines de investigación.

2.2.1.4.5. Métodos Serológicos

El diagnóstico inmunológico de la parasitosis se basa en el principio según el cual ,los anticuerpos específicos contenidos en el suero u otro liquido corporal de un sujeto examinado, se unen de manera específica con los componentes antigénicos

parasitarios, dando como resultado la formación de un complejo antígeno – anticuerpo, el cual puede ser puesto en evidencia mediante diferentes técnicas .

En el caso específico de la enfermedad de Chagas es bien conocido que existe, por parte de la persona infectada, una respuesta humoral específica sólida y estable fundamentalmente después de la fase aguda, en las fases indeterminadas y crónica de la infección.

Las reacciones serológicas más comunes en el diagnóstico de Chagas, se basan en la detección de anticuerpos circulantes de la clase IgG, que pueden ser detectados a partir de la segunda o tercera semana del inicio de la infección y persisten toda la vida de la persona infectada.

Estas pruebas pueden ser utilizadas tanto en el diagnóstico individual, estudios epidemiológicos como para avalar medidas de control de transmisión, seleccionar donadores de sangre y estudiar la actividad de las drogas. (34)

2.2.1.4.5.1. Ensayo Inmuno Enzimático E.L.I.S.A.

Principio: Esta técnica se basa en la absorción del antígeno de *Trypanosoma cruzi*, en un soporte o fase sólida (superficie de poliestireno) constituido por los pocillos de las placas de micro titulación (poli cubetas).

El antígeno, adsorbido sobre una superficie de poliestireno es puesto en contacto con los anticuerpos presentes en el suero de dilución apropiada.

La unión antígeno – anticuerpo es revelada al añadir anticuerpos anti IgG con una enzima que activa una sustancia cromógena .La intensidad de color es proporcional a la cantidad de anticuerpos. ELISA, tanto convencional como la que utiliza antígenos recombinantes, es una técnica recomendada en el diagnóstico de Chagas. Por tener una sensibilidad del 100% y una especificidad de 99,7% es utilizada como prueba confirmatoria en el diagnóstico de Chagas(según protocolo ELISA Chagas) (32)

2.2.1.4.5.2. *Técnica de Hemaglutinación Indirecta H.A.I.*

Principio: La hemaglutinación indirecta se basa en la detección de anticuerpos aglutinantes específicos anti *Trypanosoma cruzi* presentes en los sueros de los infectados chagásicos.

El antígeno soluble es fijado a la superficie de glóbulos rojos que previamente ha sido dañado, comportándose como partículas inertes capaces de absorber antígenos parasitarios y que se denominan “hematíes sensibilizados “.Estos se aglutinan cuando son puestos en presencia de diferentes diluciones de los sueros estudiados si estos contienen los anticuerpos específicos. La sensibilidad en una dilución de 8 es 100%, una especificidad del 95% mientras que en una dilución de 16 la sensibilidad es de 98% y la especificidad de 99% cuando los sueros son tratados con 2 mercapto etanol la especificidad de la prueba es del 100% sin variación en la sensibilidad.(Según protocolo de HAI Chagas.)

2.2.1.4.5.3. *Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta I.F.I.*

Principio: Consiste en hacer reaccionar los anticuerpos presentes en los sueros de los infectados chagásicos con un antígeno figurado constituido por una suspensión de epimastigotes que han sido depositados sobre un portaobjetos especialmente diseñados.

Los complejos antígenos – anticuerpos formados se revelan mediante una antigamaglobulina humana marcada con un colorante fluorescente es isotiocianato de fluoresceína (fluorescencia).

El complejo formado se visualiza por excitación del fluorocromo mediante un rayo de excitación de luz ultravioleta y la observación de este fenómeno se realiza con la ayuda de un microscopio de fluorescencia.

2.2.1.4.5.4. *Prueba de inmunocromatografía para Chagas IC*

Para el tamizaje serológico:

La Inmunocromatografía es una prueba rápida y de un solo paso, para la detección de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en suero, plasma o sangre total.

Principio: La técnica emplea una combinación de un anticuerpo específico anti gammaglobulina humana unido a una proteína la cual está conjugada a partículas colorantes y antígenos recombinantes anti *Trypanosoma cruzi* que están unidos al soporte sólido.

Cuando la muestra en estudio migra, a través de la membrana, la antigamaglobulina humana conjugada con una proteína colorante forma un complejo con las inmunoglobulinas humanas anticuerpos de la muestra.

Si la muestra contiene anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi*, el complejo formado anteriormente se une a los antígenos de *Trypanosoma cruzi* del soporte sólido produciendo un complejo Ag- Ac, que se evidencia por la formación de una banda coloreada a nivel de la ventanilla del test (zona de reacción).

En la ausencia de anticuerpos específicos no se forma la banda en la zona de reacción, el líquido continúa su migración y produce una banda coloreada en la zona de control, confirmando que los reactivos y el procedimiento funcionan adecuadamente.

La sensibilidad es del 99,2% y la especificidad del 100 % (según protocolo)

2.2.1.4.6. Pruebas no convencionales

Desde hace algunos años, con el objetivo de mejorar la especificidad, de evitar las reacciones cruzadas con otras patologías o simplificar el proceso diagnóstico de la enfermedad de Chagas, se han desarrollado nuevos test que utilizan antígenos purificados, péptidos sintéticos o proteínas recombinantes.

La mayor parte de estas nuevas pruebas utilizan como técnica el ELISA, otras las tiras, o el Western Blot. Algunas de estas pruebas no están en el mercado, sin embargo, algunas de ellas ya han sido validadas en estudios multicéntricos y se caracterizan por su alta especificidad, su simplicidad y el corto tiempo de procesamiento.

2.2.1.4.6.1. Métodos de Biología Molecular

La tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR, se basa en la amplificación de secuencias específicas de ADN del parásito y por ahora se utiliza en los laboratorios de investigación únicamente.

2.2.1.4.6.2. Cultivo celular para *Trypanosoma cruzi*

El cultivo de células eucarióticas ha sido muy utilizado para intentar comprender los mecanismos moleculares del proceso de reconocimiento, señalización e invasión (y/o fagocitosis) de las formas tripomastigotes y amastigotes del *Trypanosoma cruzi*. Grandes contribuciones en este campo fueron realizadas, en investigaciones pioneras en Brasil, por la Dra. Hertha Meyer en el Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho de la Universidad Federal de Río de Janeiro. (35)

2.2.1.4.7. Tratamiento

El Programa Nacional de Chagas en Bolivia ha definido la utilización de dos medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas Crónico Reciente Infantil en niños de 9 meses a menores de 15 años; el Benznidazol (BNZ) que es el medicamento utilizado de primera elección en todos los casos con diagnóstico serológico positivo confirmado. Y el nifurtimox (NFT) como segunda alternativa en los casos que presenten reacciones adversas graves al BNZ. (36)

2.2.1.4.8. Reacciones adversas al medicamento

Existen varias clasificaciones de las reacciones adversas al medicamento (RAM) las RAM esperadas Tipo A se produce por la administración del fármaco, y reacciones inesperadas Tipo B no se produce por la administración del fármaco se produce por susceptibilidad del paciente al fármaco. (37)

Cuadro No.1.

CUADRO DE SIGNOS Y SINTOMAS DE RAM AL TRATAMIENTO-BNZ DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS				
CLASIFICACIÓN	DERMATOLÓGICA	DIGESTIVA	NEUROLÓGICA	HEMATOLÓGICA
GRAVE	Síndrome de Stevens Johnson(mortalidad menor al 5%) fiebre, estomatitis, conjuntivitis, erupción cutánea diseminada Necrólisis Epidérmica Tóxica(mortalidad 30%) pródromo catarral febril, lesiones eritematosas en cara y tronco, maculas eritematosas necrosis y desprendimiento de piel con ampollas y signo de Nicolsky(+) lesiones en mucosas digestiva, faríngea, ocular, genital, respiratorio	-Dolor abdominal intenso y continuo -Vómitos incoercibles -Pérdida de peso más del 10% -Coluria -Hepatomegalia -Ictericia	Impotencia funcional invalidante -Dolor en extremidades superiores e inferiores permanente e intenso -Acompañada o no con Cefalea -Sensación de hormigueo -Alteración de la sensibilidad	-Petequias -Hematomas -Sangrado de mucosas -Fiebre sin foco aparente
MODERADA	Fiebre Prurito o escozor intenso generalizado Maculas, pápulas, ronchas y eritema erosión cutánea por rascado	Dolor abdominal de mayor intensidad episódico Disminución y/o pérdida de apetito Nauseas, vómitos pérdida de peso menor al 5 %	Artralgias y mialgias en extremidades superiores/o inferiores con impotencia funcional Acompañada o no con cefalea Sensación de hormigueo	
LEVE	Prurito localizado Máculas y pápulas localizadas	Dolor abdominal esporádico localizado en epigastrio o difuso de intensidad leve	Dolor en extremidades superiores y/o inferiores mialgias localizadas y esporádicas sin impotencia funcional acompañada o no con cefalea sensación de hormigueo	

Fuente: Protocolo manejo de las reacciones adversas por tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas

2.3. Hipótesis

En base a las diferentes respuestas inmunológicas producidas por la infección chagásica, existen diferencias entre los niños con y sin Chagas en sus comunidades bacterianas bucal, piel y gastrointestinal

2.4. Marco Contextual.

2.4.1 Bolivia

El estado Plurinacional de Bolivia, fue fundada el 6 de agosto de 1825, desde el 18 de marzo del 2009 pasó a llamarse oficialmente Estado Plurinacional de Bolivia. Ocupa la parte central de Sud América con una extensión territorial de 1.098.581 Km², está dividido en 9 departamentos, 112 provincias, 327 secciones municipales y 11.652 cantones con una población de 10.027.254 habitantes con una densidad poblacional de 9,13 hab/Km²; 50,07% mujeres y 49,93% hombres de acuerdo al censo de la gestión 2012, comparativamente al 2001 tiene una tasa de crecimiento poblacional de 2,03%

La pobreza extrema es de 23,67% en el área urbana y 63,94% en el área rural, la tasa de alfabetización de adultos de 15 años o más es de 94,98% para el 2012. La tasa de mortalidad es de 46 por cada mil nacidos vivos. La mortalidad infantil en el país aún es alta, 75 de cada 1.000 niños y niñas mueren antes de cumplir los cinco años. De cada 100.000 mujeres, 239 mueren por año por causa materna (38)

2.4.2 Chuquisaca

El departamento de Chuquisaca está ubicado al sur de la República de Bolivia; tiene una superficie de 51.524 Km² y una población de 576.153 habitantes con una densidad poblacional de 11,18 hab/Km² (censo 2012) De esta población el porcentaje de mujeres llega al 50,34% y la población de hombres es 49,66 %, cuenta con 10 provincias que son Belisario Boeto, Hernando Siles, Jaime Zudáñez, Juana Azurduy de Padilla, Luis Calvo Calvimontes, Nor Cinti, Tomina, Sud Cinti y Yamparaez; con 29 secciones municipales y 118 cantones.

Los servicios básicos disponibles en el departamento es de 53,92% cuenta con agua por cañería de red, el 47,08% cuentan con servicio sanitario y el 47,15% disponen de energía eléctrica.

De acuerdo con los datos del INE para el 2010, la Tasa Bruta de Natalidad, es de 27,9 nacimientos por cada mil habitantes; el INE estima que la tasa de mortalidad infantil es de 44 por cada mil nacidos vivos. La esperanza de vida al nacer es de 65,5 años.

El ingreso medio de los Chuquisaqueños es uno de los más bajos del País, en tanto que los niveles de pobreza por insatisfacción de las necesidades básicas y por insuficiencia de los ingresos están entre los más altos (38) (39)

2.4.3. Tarabuco

El Municipio de Tarabuco está ubicado al norte del departamento de Chuquisaca primera sección municipal de la provincia Yamparaz se divide en dos cantones Tarabuco y Paccha Estos se subdividen en distritos que son cuatro el distrito I conformado por el centro poblado (juntas vecinales), el distrito II por las subcentrales de Pampa Lupiara, Piscili, Paredón y el pueblo originario Ayllu Puca Puca, el distrito III por las subcentralías de Sarufaya, Morado Kasa, Cororo y Lajas, el distrito IV por las subcentralías de Paccha , Ichupampa, Cienega . Ubicada a 64 Km de la ciudad de Sucre, cuenta con una altura de 3284 m.s.n.m. Tiene una extensión de 999,00 Km² según el Ordenamiento territorial Prefectural.

La población total según proyección es de hombres 9.405 y de mujeres 10.149 según datos del INE, el porcentaje de ruralidad es de 87,50% población total de habitantes 19,554, la población urbana número de habitantes 2,442 y la población rural número de habitantes 17,112. La población de 5 a 14 años en todo el Municipio de Tarabuco es de 5,743 y en la población de Tarabuco es de 1.102 niños de 5 a 14 años de edad, según el PDM datos proyectivos del Municipio de Tarabuco

2.4.3.1. Indicadores Sociales.-pobreza en el municipio de Tarabuco 61.40%.

La tasa de analfabetismo en hombres 40.44% en mujeres 64.25% y la tasa de analfabetismo total es de 53.28%

El índice de pobreza extrema del Municipio de Tarabuco es de 65,20%, los habitantes viven sin cubrir sus necesidades básicas de luz, agua, alcantarillado y se encuentra en el puesto 90 a nivel Nacional, según datos realizados por el Ministerio de Educación.

En cuanto a vivienda el 87% vive en vivienda propia y el 13% en vivienda alquilada o simplemente como cuidador en casas cuyos propietarios han migrado, la mayoría de las viviendas en comunidades concentradas cuentan con más de tres cuartos, lo contrario sucede con las familias de comunidades dispersas, donde la calidad de vivienda es pésima y apenas logran tener uno a dos cuartos que lo utilizan como dormitorio y deposito, la cocina por lo general es a campo abierto. El 60,70% de las viviendas particulares están construidas con techos de caña o paja, con paredes de adobe sin revocar, de piedra y juntado con adobe. El 27,30% de las casas tienen teja, en ningún caso los pisos tienen recubrimiento alguno (pisos de tierra). El 22% de las casas tienen revoque de yeso.

La presencia de depósitos de agua que pueden convertirse en criaderos de vectores: existen depósitos de aguas sucias procedentes de los registros de aguas albañales, lo cual contribuye a la proliferación de vectores y a la contaminación del manto freático en un total de 1278 familias atendidas por el hospital el 54,8 % está afectada por la presencia de roedores, el 23,5% moscas, 15,7% cucarachas y el 6% con vinchucas lo que está relacionado con la falta de cultura sanitaria de la población, la existencia de micro vertederos, la deficiente disposición de residuales líquidos y la existencia de una granja avícola en las cercanías de las viviendas, así como la poca disposición de los recursos para combatir estos vectores.

El suministro de agua es como promedio de una vez por semana, se tiene una cooperativa de aguas del pueblo.

El ingreso per-cápita mensual de cada familia es más de 201-400 pesos bolivianos mes para un 69,3%, ya sean pensionados, trabajadores por cuenta propia o por salario

2.4.3.2. Indicadores de Salud

En el municipio de Tarabuco gestión 2012 se tienen los siguientes indicadores

La Tasa global de fecundidad es del 4.7%, Tasa de mortalidad infantil: 23 por 1.000 nacidos vivos, Tasa de mortalidad neonatal: 0 % y la Tasa de mortalidad materna: 2 por 10,000 mujeres en edad fértil

El Hospital del Municipio de Tarabuco denominado Dr. Ricardo Bacherer ubicado en el centro de la población de Tarabuco a dos cuadras de la plaza central, ofrece sus servicios en salud desde su fundación en fecha 12 de octubre de 1983, con 10 puestos y centros de salud ubicados en comunidades estratégicas del municipio, todos bajo la responsabilidad y administración del PROSCAM-SEDES hasta diciembre de la gestión 2011. A partir de enero del 2012 pasa a ser responsabilidad del Gobierno Autónomo Municipal de Tarabuco por sus características estructurales y funcionales, es un hospital de Segundo Nivel, otorgando sus servicios al público de lunes a domingo. Comprende las cuatro especialidades básicas (Ginecología, Pediatría, Cirugía, Medicina Interna) que apoyados en los diferentes servicios de determinación Laboratorial y de gabinete ecografía y radiología cumple con los requerimientos necesarios para la atención óptima al público.

El laboratorio del hospital Dr. Ricardo Bacherer realiza análisis en las áreas de Hematología, Química Sanguínea, Serología, Citología, Orinas, Parasitología y Bacteriología. En la gestión 2012 realizo 16.069 análisis en todas las áreas de laboratorio y se procesó 8.940 muestras en las diferentes áreas de laboratorio (39)(40)

La existencia de enfermedades genéticas, metabólicas y hereditarias en la comunidad son Cardiopatías (causadas por Chagas, poliglobulia e hipertensión) síndrome de Down, Sicklemia, Diabetes mellitus, Hipotiroidismo e hipertiroidismo. Las principales causas de mortalidad en el área son las neoplasias y enfermedades terminales, el ABC, desequilibrio endócrino metabólico, por complicaciones tardías del Chagas y la anemia severa.

2.4.3.3. Prevención y control de la enfermedad de Chagas

En la población de Tarabuco centro poblado existen 2.950 pacientes con riesgo de contraer la enfermedad de Chagas y el 65,6% está con examen de HAI Chagas de controles realizados, según datos del ASIS de Tarabuco gestión 2012

Se realizó el diagnóstico de Chagas a 454 niños de 5 a 14 años en el Municipio de Tarabuco dando una prevalencia de 3,3% para la gestión 2012 según datos del programa Chagas y laboratorio SNIS 303, 302 y 301

De un total de viviendas existentes de 6,584 en el Municipio de Tarabuco se evaluaron 5,744 siendo un 87,24 % de las cuales 134 viviendas son positivas con un porcentaje global de 2,33 %

Los indicadores de infestación intra domicilio es de 0.77 % y peri domicilio 1,71 % los indicadores de Colonización como municipio de triatomínos en estadio de ninfas 17 con 12,69% y peri 74 ninfas dando un 55,22% de 69 comunidades en riesgo bajo 52 en mediano 15 y alto riesgo se tienen 2 comunidades según datos del programa ETVs, (Enfermedades de transmisión vectoriales) regional Chuquisaca para la gestión 2012.

Viviendas; el número de viviendas existentes en la población de Tarabuco centro poblado es 925 evaluadas 925 siendo un 100% número de viviendas positivas 1 el porcentaje de viviendas positivas Global 0,11

Indicadores de infestación intra domicilio positivos 0 % peri positivos porcentaje 1 siendo un 0,11%

Indicadores de colonización viviendas positivas con ninfas positivas 1 % intra domicilio positivas 100 %peri domiciliarias positivas 1 en porcentaje 100%

El rango es bajo en el centro poblado de Tarabuco por tanto se puede realizar el diagnóstico y tratamiento a niños menores de 15 años por que el índice de infestación es menor al 3% requisito indispensable para intervenir.(39)

El programa Chagas con sus diferentes componentes de Diagnostico de Chagas congénito, crónico reciente infantil , tratamiento, promoción, prevención y mejora de viviendas está interviniendo desde la gestión 2006 para cortar la cadena de transmisión materno fetal y evitar el Chagas crónico con cardiomegalias y megacolon a futuro; es por eso que se realiza el diagnóstico y tratamiento en fase aguda de Chagas congénito y Chagas crónico reciente infantil a menores de 15 años en todo Bolivia y el tamizaje a toda embarazada en el control prenatal.(40)

III. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Enfoque, tipo y diseño de investigación

Es de **tipo cuantitativo** por que se determinó la prevalencia de la tripanosomiasis americana, con el uso de técnicas que permiten contar y medir, parte de una concepción positivista

Descriptivo.- Por que se realiza una descripción de las características de la tripanosomiasis americana con la microbiota

Transversal.- Ya que se recogió y proceso simultáneamente las variables dependientes e independientes de la información durante la gestión 2013.

Explicativo.- Debido a que la investigación busca asociar la enfermedad de la tripanosomiasis americana con diferencias en la estructura de la microbiota.

Analítico.- Al determinar la asociación entre la variable dependiente e independiente.

Observacional.- porque no se busca intervenir, ni alterar el curso de la tripanosomiasis americana; solo se observara el efecto en la microbiota a partir de la presencia o ausencia de la enfermedad, y se definió las características de la muestra para el grupo de estudio con tripanosomiasis americana y el de niños de 5 a 14 años sin tripanosomiasis americana, con el objetivo de que ambos grupos sean tan idénticos como sea posible, excepto por la característica de estudio que es el efecto de la tripanosomiasis americana en la microbiota

3.2. Población y Muestra

3.2.1 Población

La población es de 1.102 habitantes en el grupo etareó de 5 a 14 años en la población de Tarabuco

3.2.2 Muestra

El tamaño de muestra para el siguiente trabajo de investigación consta de tres fases:

La **primera fase** la muestra es de 543 se obtuvo, a través del EPIDAT versión 3.1 se tiene una prevalencia esperada de 3,8 % de personas con tripanosomiasis americana en

este grupo etareó, pero no se tienen estudios de microbiota en Bolivia, Sud America y otros países de personas con y sin Chagas por lo tanto, la muestra se calculó con una proporción del 50%

Tamaño de la población 1102

Proporción esperada 50 %

Nivel de confianza 95 %

Precisión 3 %

Efecto de diseño 1

Tamaño de la muestra 543

De los 543 niños estudiados, 20 fueron positivos para Chagas y 523 negativos.

Por criterios de inclusión y exclusión, quedaron para la **segunda fase** una muestra de 16 niños positivos para Chagas y 35 Negativos para Chagas

A la **tercera fase** de estudio de los 16 niños positivos para Chagas estudiados en la segunda fase quedaron para la tercera fase 12 niños positivos con post tratamiento. Y de los 35 negativos estudiados en la segunda fase quedaron 22 niños como grupo negativo post tiempo.

3.3 Variables de Estudio

3.3.1.1 Variable dependiente:

- Microbiota (oral, piel, gastrointestinal)

3.3.1.2 Variable independiente

- tripanosomiasis americana
- Sexo
- Edad
- Tratamiento (Benznidazol)

Cuadro N° 2. Matriz de operacionalización de variables

Objetivos específicos	Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Categorías	Instrumentación
Determinar la prevalencia de Chagas en niños de 5 a 14 años de la población de Tarabuco, mediante pruebas IC, HAI y ELISA Chagas según edad y sexo	tripanosomiasis americana	Enfermedad que es una zoonosis causada por la infección con el protozooario <i>Trypanosoma cruzi</i>	Persona seropositiva para Tripanosomiasis americana diagnosticado con dos pruebas una descartar y otra confirmatoria	Independiente Cualitativa nominal	- Positivo - Negativo	Pruebas de laboratorio Hojas de registro
Determinar la cantidad de microbiota por sitio corporal (gastrointestinal, oral y piel) en niños de 5 a 14 años con tripanosomiasis americana versus niños sin tripanosomiasis americana	Microbiota fecal que representa al gastrointestinal	Conjunto de comunidades microbianas que viven en el tracto gastrointestinal y son eliminadas en las heces fecales	. Secuenciación del gen 16S ribosómico a través de Biología molecular de muestras de heces fecales	Dependiente Cualitativa nominal	- Cero sp a - 500 sp	Pruebas de laboratorio programa Qiime
	Microbiota piel	Conjunto de comunidades microbianas que viven en la superficie de la piel	-Secuenciación del gen 16S ribosómico a través de Biología molecular a partir de muestras de piel	Dependiente Cualitativa nominal	- Cero sp a - 500 sp	Pruebas de laboratorio programa Qiime
	Microbiota oral	Conjunto de comunidades microbianas que viven en la cavidad oral.	-Secuenciación del gen 16S ribosómico a través de Biología molecular de muestras de cavidad oral	Dependiente Cualitativa nominal	- Cero sp a - 500 sp	Pruebas de laboratorio programa Qiime
Identificar la cantidad de especies de microbiota en muestras fecales por sexo de niños con y sin tripanosomiasis americana	Sexo	Características biológicas que diferencia al hombre y a la mujer	Según las características de ser hombre o mujer de las personas del estudio	Independiente Cualitativa dicotónica	-Masculino -Femenino	Pruebas de laboratorio programa Qiime

Determinar el efecto del tratamiento de tripanosomiasis americana con Benznidazol sobre la microbiota fecal, oral y piel en niños con tripanosomiasis americana antes y después del tratamiento	Benznidazol	Medicamento antiparasitario específico para T cruzi	Según el análisis del LEFSE para ver el efecto del Benznidazol sobre la microbiota oral, fecal y piel determinación de taxones	Dependiente Cualitativa nominal	-Aumenta -Igual-Disminuye	Programa LEFSE Historias Clínicas
---	-------------	---	--	------------------------------------	------------------------------	--------------------------------------

3.4. Criterios de inclusión y de exclusión

3.4.1. Criterios de Inclusión

Primera fase

- Los niños de 5 a 14 años que vivan en la población de Tarabuco y asistan a la escuela Rosalía Viuda de Antezana y/o colegio Aniceto Arce
- Todos los niños de 5 a 14 años que tengan la autorización de sus padres o apoderados para el diagnóstico de Chagas

Segunda fase

- Los niños diagnosticados con Chagas, que tengan consentimiento informado autorizando el tratamiento para Chagas con Benznidazol por sus padres o apoderados
- Los niños sin Chagas que tengan consentimiento informado autorizado por su padre de familia o apoderado para participar en la investigación de microbiota
- Todo niño sano, sin ninguna enfermedad, y que no haya ingerido ningún antibiótico en los últimos tres meses.

Tercera fase

- Niños con Chagas que hayan participado de la primera fase, que recibieron tratamiento para Chagas con Benznidazol y que concluyen su tratamiento.
- Niños sin Chagas, que participaron en la primera fase y no consumieron ningún antibiótico después de la primera fase

3.4.2. Criterios de Exclusión:

Primera fase

- Todos los niños sin consentimiento informado para diagnóstico de Chagas
- Niños que ya fueron diagnosticados en la gestión 2012 y que recibieron tratamiento para Chagas
- Niños que vivan en otras comunidades, donde el índice de infestación sea mayor al 3 %

Segunda fase

- Los niños que hubieran ingerido algún antibiótico en los últimos tres meses antes del diagnóstico de tripanosomiasis americana.
- A los niños que presenten obesidad, diabetes o hipertensión es decir que tenga alguna enfermedad.
- Todos los niños sin consentimiento informado para microbiota y tratamiento de Chagas.

Tercera fase

- Los niños con Chagas que hubieran abandonado el tratamiento con Benznidazol
- Los niños sin tripanosomiasis americana que hubiesen ingerido algún antibiótico en los dos meses posteriores a la segunda fase
- Niño que decida retirarse voluntariamente de la investigación

3.5. Procedimientos para la Recolección de la Información

3.5.1. Fuente de recolección de Información

La fuente de recolección de la información es primaria porque se recogió directamente de las personas del estudio, las muestras de sangre venosa para diagnóstico de tripanosomiasis americana y las muestras de microbiota mediante hisopados oral, piel y fecal (que representa a la muestra gastrointestinal), se analizaron mediante pruebas diagnósticas y la información restante fue proporcionada en el momento del estudio plasmado en el formulario de registro

3.5.2 Descripción de los instrumentos de recojo de información utilizados

En principio se utilizó un formato de consentimiento informado que se les entregó a los padres de familia dando una breve explicación de la investigación, el procedimiento que se utiliza en la misma, los riesgos, beneficios y derechos del participante (ANEXO 1)

También se utilizó **Hoja de Registro** (ANEXO 2) donde se registraron los datos generales previos a la toma de muestra de la población en estudio. Se realizó un

pequeño estudio piloto y la capacitación cuidadosa del personal que participó y contribuyeron a una mejor calidad de los datos obtenidos.

El siguiente instrumento que permitió centralizar los resultados de la recolección de la información o de los datos corresponde a una planilla de Meta data elaborada en el programa Excel.

3.5.3 Procedimiento de recojo de la muestra de laboratorio

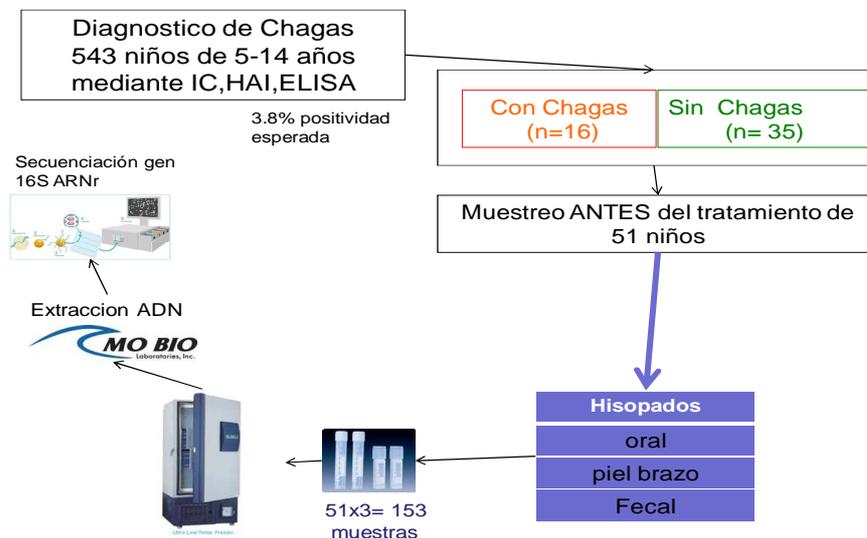
3.5.3.1 Recolección y Tipo de Muestra

La recolección y toma de muestra fue realizada por la Bioquímica responsable del proyecto de investigación en el Municipio de Tarabuco que cumple sus funciones como Bioquímica responsable del Laboratorio Hospital Dr. Ricardo Bacherer en la gestión 2013.

El tipo de muestra que se obtuvo para el diagnóstico de tripanosomiasis americana fue sangre venosa y su posterior separación de suero o plasma y la respectiva codificación.

Se realizó como tamizaje la prueba inmunocromatografica. Para confirmar el diagnóstico se procedió a realizar la prueba de ELISA Chagas y como control de calidad a todos los positivos y 10% de los negativos se realizó HAI Chagas también sirvió para confirmar los resultados y ver la sensibilidad, especificidad de los métodos de diagnóstico utilizados. Una vez confirmado el diagnóstico positivo con dos pruebas se procedió a recabar los datos de las personas seropositivos para tripanosomiasis americana y los sin tripanosomiasis americana que accedieron a participar del trabajo de investigación antes y después del tratamiento para Chagas

Figura 4.- Esquema de recolección de muestras: primera fase 543, segunda fase 51 y tercera fase 34 muestras, conservación y extracción ADN



Fuente: Elaboración propia

Una segunda recolección de muestras los niños que recibieron tratamiento para Chagas con Benznidazol y concluyeron el tratamiento de dos meses de duración 12 y niños sin tripanosomiasis americana 22 que son los mismos niños que participaron en la primera parte que no recibieron ningún tratamiento son los post tiempo, en total 34 niños también con 3 muestras corporales cada uno oral, piel y fecal (102 hisopos) por cada niño positivo con Chagas se recolectó muestras de dos niños negativos.

3.6.1. Procesamiento y análisis de los datos

Una vez obtenida la base de datos de la información se procesó mediante el paquete estadístico EPIDAT con el que se llegó a la construcción de las tablas, gráficos y el respectivo análisis de la información.

Para lo cual se realizaron las siguientes etapas: Etapa de elaboración o procesamiento de datos para su análisis, de la siguiente manera:

- **Revisión y Corrección:** Se plasmó los datos de la Hoja de Registro de datos generales y Planilla de resultados.
- **Clasificación:** Se pasaron los mismos a una Base de Datos en EXCEL con la consecuente codificación de variables y categorización de cada una de ellas.
- **Recuento:** Mediante Bioestadística descriptiva de las variables dependientes e independientes.
- **Presentación de Resultados:** los resultados están representados en forma tabular y otros mediante gráficas diseñadas tanto en EXCEL como en EPIDAT.
- **Control de calidad de los datos.-** Se realizó la supervisión de los procedimientos de recolección de datos en base al instructivo previamente llenado.
- En relación a los exámenes serológicos, la responsable de laboratorio realizó los procedimientos de control de calidad para los distintos exámenes incluidos en el estudio, siguiendo los estándares previamente especificados. Una proporción de las muestras no menor al 10 % fue verificada en un centro de referencia (Laboratorio Regional SEDES Chuquisaca programa Chagas)
- Para evitar errores de ingreso a la base de datos, se realizó doble ingreso de datos.

Para microbiota una vez obtenidas las muestras por hisopeado de mucosa oral, piel del brazo izquierdo y de heces fecales que representan al gastrointestinal por duplicado 2 hisopos de cada sitio corporal, se congelaron secos a menos 20 grados centígrados en el Laboratorio de Tarabuco para su traslado semanalmente a la UMRPSFXCH laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Bioquímica y conservar a menos 30 grados centígrados, hasta el momento del envío según normas IATA de embalado y conservación para el respectivo traslado y envió a la Universidad de New York, laboratorio de Biología Molecular; el transporte fue vía aérea con hielo seco para la conservación de las muestras; para lo cual se obtuvo permiso del Comité de Bioética del Servicio Departamental de Salud de Chuquisaca a través de una resolución después de exponer ante los miembros del Comité de Bioética el trabajo de investigación, posteriormente se obtuvo permiso del CDC de

Atlanta para la revisión por aduanas permiso tramitado por la Universidad de New York proyecto Microbioma Humano. (ANEXO 3)

Como primer paso se procedió a la extracción del DNA que se realizó con el kit MoBio Power Soil según protocolo estandarizado ver (ANEXO 4). Como siguiente paso se realizó la amplificación del ADN por PCR del gen 16S de la unidad ribosomal bacteriana según protocolo (ANEXO 5) La secuenciación se realizó a través del secuenciador Illumina, en la Universidad de New York. Finalmente se realizó el análisis de los resultados utilizando la plataforma QIIME programa (gratis en internet), para comparar las comunidades, estimar la diversidad y realizar estadísticas (análisis de coordenadas principales, ANOVA, ANOVASIN y Lefse).

Qiime.- Es un programa (canónicamente pronunciado 'campanada') es un software que realiza análisis de la comunidad microbiana y se ha utilizado para analizar e interpretar los datos de la secuencia de ácidos nucleicos a partir de hongos, las comunidades virales, bacterianas y parasitarias

A continuación, se mencionan los cuatro protocolos del programa QIIME que se puede instalar en un solo equipo y se utilizaron para analizar los datos de la secuencia 16 S ARN ribosómico microbianas de la microbiota de niños de 5 a 14 años con y sin Tripanosomiasis americana.

Protocolo básico 1.- Representa los primeros pasos de análisis realizados normalmente en 16S de datos de secuencias de ADN de las comunidades microbianas. El protocolo básico 1 consiste en adquirir un ejemplo conjunto de datos, y la asignación de las secuencias de ADN en el estudio a la microbiota en niños con y sin T. americana en comunidades microbianas incluidas en el estudio. En uso normal, un investigador podría sustituir los datos producidos por una plataforma de secuenciación de los datos.

Protocolo básico 2.- Consiste en recoger las unidades taxonómicas operacionales (Otus) similares, recogiendo una secuencia representante de cada unidad taxonómica operacional. El protocolo también asigna identidades taxonómicas utilizando bases de datos de referencia, alinea las secuencias de OTU, crea un árbol filogenético, y construye una tabla de OTU, que representa la abundancia de cada OTU en cada

muestra microbiana. Protocolo Básico 2 requiere secuencias des multiplexadas como los generados en el archivo seqs.fna de Protocolo básico 1.

Protocolo básico 3.- Consiste en el cálculo de la diversidad dentro de la comunidad bacteriana, es decir, alteraciones o cambios dentro de una misma comunidad bacteriana y se denomina (**diversidad alfa**) para cada uno de las comunidades microbianas, y la generación de curvas de rarefacción (gráficos de la diversidad frente a la profundidad de secuenciación). Protocolo básico 3 requiere una tabla de OTU y el árbol filogenético, tales como los producidos en el protocolo básico 2.

Protocolo básico 4.- Que determina las alteraciones o cambios entre comunidades se la conoce como (**diversidad beta**) representa la comparación explícita, es decir, fuera de las comunidades microbianas en función de su composición. Por lo tanto, las métricas Beta-diversidad sirvieron para evaluar las diferencias entre las comunidades microbianas. La salida fundamental de estas comparaciones es una matriz cuadrada, donde se calcula una "distancia" o disimilitud entre cada par de muestras de la comunidad, lo que refleja la disimilitud entre las muestras. Los datos de esta matriz de distancia se pueden visualizar con los análisis tales como análisis de coordenadas principales (PCoA) y la agrupación jerárquica. Al igual que la diversidad alfa, hay muchos indicadores posibles que se pueden calcular con el gasoducto QIIME. Aquí, vamos a calcular la diversidad beta entre muestras de piel, oral y fecal de niños con y sin tripanosomiasis americana, microbiota utilizando los predeterminados de beta diversidad métricas de UniFrac ponderado y no ponderado, que son medidas filogenéticos usados ampliamente en los proyectos de secuenciación de la comunidad microbiana recientes.

Al tener los resultados de la plataforma QIIME gratis en internet, se realizó la interpretación de los resultados y las respectivas conclusiones.

3.7. Delimitaciones de la investigación

3.7.1 Delimitación geográfica

El estudio se desarrolló en el Municipio de Tarabuco centro poblado que corresponde al hospital Dr. Ricardo Bacherer

3.7.2. Sujetos que participaron en la realización del estudio

La población elegida para el estudio constituyeron los niños de 5 a 14 años que viven en la población de Tarabuco y asisten al hospital Dr. Ricardo Bacherer en la gestión 2013

3.7.3. Delimitación temporal

Desde la concepción intelectual del tema de investigación hasta la entrega del informe final para su defensa transcurrieron diez meses que comprenden los meses de agosto del 2013 hasta mayo del 2014.

3.7.4. Aspectos Éticos

Se les informó a los participantes, es decir niños de 5 a 14 años de edad y a sus padres o tutores que quisieron participar de la investigación en forma verbal y escrita sobre la tripanosomiasis americana (enfermedad Chagas) y la microbiota. Se les proporciono una copia del consentimiento informado ver en (Anexo 1) para que la persona que participo tenga el apoyo de su familia. Posteriormente la Bioquímica responsable de la toma de muestra recabo toda la información requerida para el estudio, asegurando la confidencialidad de los participantes sin incluir los nombres de los mismos. Un médico especialista en medicina interna, realizó el tratamiento a los niños con tripanosomiasis americana después de firmar la autorización del tratamiento por su padre o apoderado y el respectivo seguimiento semanal dando el tratamiento gratuito por 60 días según protocolo de tratamiento y seguimiento del programa Chagas.

La ficha de tratamiento y consentimiento de tratamiento; según protocolo de tratamiento para Chagas del Ministerio de Salud y Deportes, publicación 32(ANEXOS 6 y 7)

Se realizó el examen coproparasitológico mediante Richie modificado y examen directo de todos los participantes del estudio y su tratamiento específico para el parásito encontrado, después de recolectar la segunda muestra de materia fecal como se ofreció en el consentimiento informado tratamiento dosificado por kilo peso y supervisión del médico internista.

IV. RESULTADOS

4.1. Diagnóstico de la tripanosomiasis americana (Chagas) en niños de 5 a 14 años

Tabla N° 1

Distribución de Pruebas de Diagnóstico de tripanosomiasis americana a través de Inmunocromatografía de niños de 5 a 14 años de la Población de Tarabuco. Bolivia 2013

tripanosomiasis americana	Prueba de Tamizaje IC inmunocromatografía	
	N	%
Reactivo	20	3,7
No reactivo	523	96,3
TOTAL	543	100

Fuente: Cuaderno de registro de Serología

Las pruebas de diagnóstico utilizadas para Chagas en primera instancia fueron las inmunocromatográficas que se realizó a 543 de los cuales un 3.7 % dio reactivo para Chagas.

Tabla N° 2

Distribución de Pruebas de Diagnóstico de tripanosomiasis americana y Control de Calidad a través de Hemaglutinación Indirecta de niños de 5 a 14 años de la Población de Tarabuco. Bolivia 2013

tripanosomiasis americana	Prueba de Control de Calidad HAI Hemaglutinación indirecta	
	N	%
Reactivo	20	27
No reactivo	55	73
TOTAL	75	100

Fuente: Cuaderno de registro de Serología

En la tabla 2 se evidencia que se realizó 75 determinaciones de HAI Chagas teniendo un 27% de positividad para esta prueba de un total de 75 determinaciones. Las 75 determinaciones que se realizó, fueron a los 20 positivos y el 10% de los negativos para Chagas; esto como un control de calidad

Tabla N° 3
Distribución de Pruebas de Diagnóstico de tripanosomiasis americana a través de ELISA Chagas de niños de 5 a 14 años de la Población de Tarabuco. Bolivia 2013

tripanosomiasis americana	Prueba confirmatoria ELISA	
	N	%
Positivo	20	3.7
Negativo	523	96.3
TOTAL	543	100

Fuente: Cuaderno de registro de Serología

En la tabla 3 se determinó ELISA Chagas a 543 niños dando positivos un 3,7% con un total de positivos de 20 niños, al considerar al ELISA Chagas prueba confirmatoria se realizó a los 543 niños del diagnóstico.

543 niños de 5 a 14 años fueron muestreados (50% de la población de Tarabuco entre las edades de 5 a 14 años) 20/543 fueron positivos para ELISA Chagas, 20/543 positivos IC. En el control de calidad con HAI Chagas también resultaron positivos los 20 niños. Siendo sensibles y específicos las pruebas de diagnóstico utilizadas.

La prevalencia de Chagas en niños de 5 a 14 años de edad de la población de Tarabuco es de 3,7%

Tabla N° 4
Distribución de niños con tripanosomiasis americana según Sexo de la Población de Tarabuco Bolivia 2013

Sexo	tripanosomiasis americana				Total	%
	Positivo		Negativo			
	N°	%	N°	%		
Masculino	12	60,0%	227	43,4%	239	44,0%
Femenino	8	40,0%	296	56,6%	304	56,0%
Total	20	100,0%	523	100,0%	543	100,0%

Fuente: Hoja de registro de Serología

El mayor porcentaje de tripanosomiasis americana que corresponde al 60% es en el sexo masculino en relación al femenino que es un 40%.

Tabla N° 5
Relación del Sexo con la presencia de tripanosomiasis americana en niños de 5 a 14 años de la población de Tarabuco Bolivia 2013

Edad	tripanosomiasis americana		Total
	Presencia	Ausencia	
Masculino	12	227	239
Femenino	8	296	304
Total	20	523	543

Fuente: Hoja de registro de Serología

PE	PNE	OR	Chi cuadrado	P valor
5 %	2,6%	1,95(IC95% inferior 0,80- superior 4,73)	1,5	0,1706

Según los datos estadísticos los resultados de la relación del sexo con la tripanosomiasis americana el P valor es mayor a 0.05 por lo tanto, la asociación entre el sexo y la tripanosomiasis americana no tiene significancia estadística.

PE= La prevalencia de expuestos indica que de cada 100 niños del sexo masculino el 5 % presentan tripanosomiasis americana.

PNE= La prevalencia de no expuestos indica que de cada 100 niñas del sexo femenino 2,6 presentan tripanosomiasis americana.

La probabilidad de tener tripanosomiasis americana en los niños de la población de Tarabuco del sexo masculino es 1,95 veces más en relación a los del sexo femenino, por lo tanto, el ser del sexo masculino es un factor de riesgo

Sin embargo el intervalo de confianza comprende la unidad, el Chi cuadrado es 1,5 siendo menor a 3,84 y el P valor es mayor a 0,05 por tanto, la asociación entre el sexo y la tripanosomiasis americana no tiene significancia estadística

Tabla N° 6

Distribución de tripanosomiasis americana en niños de 5 a 14 años Según edad de la población de Tarabuco. Bolivia 2013

Edad	tripanosomiasis americana				Total	%
	Positivo		Negativo			
	Nº	%	Nº	%		
5-9	8	40,0%	309	59,0%	317	58,4%
10-14	12	60,0%	214	41,0%	226	41,6%
Total	20	100,0%	523	100,0%	543	100,0%

Fuente: Hoja de registro de Serología

Tabla N° 7
Relación entre tripanosomiasis americana y la edad de niños de la población de Tarabuco. Bolivia 2013

Edad	tripanosomiasis americana		Total
	Presencia	Ausencia	
10-14	12	214	226
5-9	8	309	317
Total	20	523	543

PE	PNE	OR	Chi cuadrado	P valor
5,3 %	2,5 %	2,16(IC95%inferior 0,87- superior 5,38)	2,15	0,1421

PE= La prevalencia de expuestos nos indica que de cada 100 niños de 10 a 14 años 5,3 presentan tripanosomiasis americana.

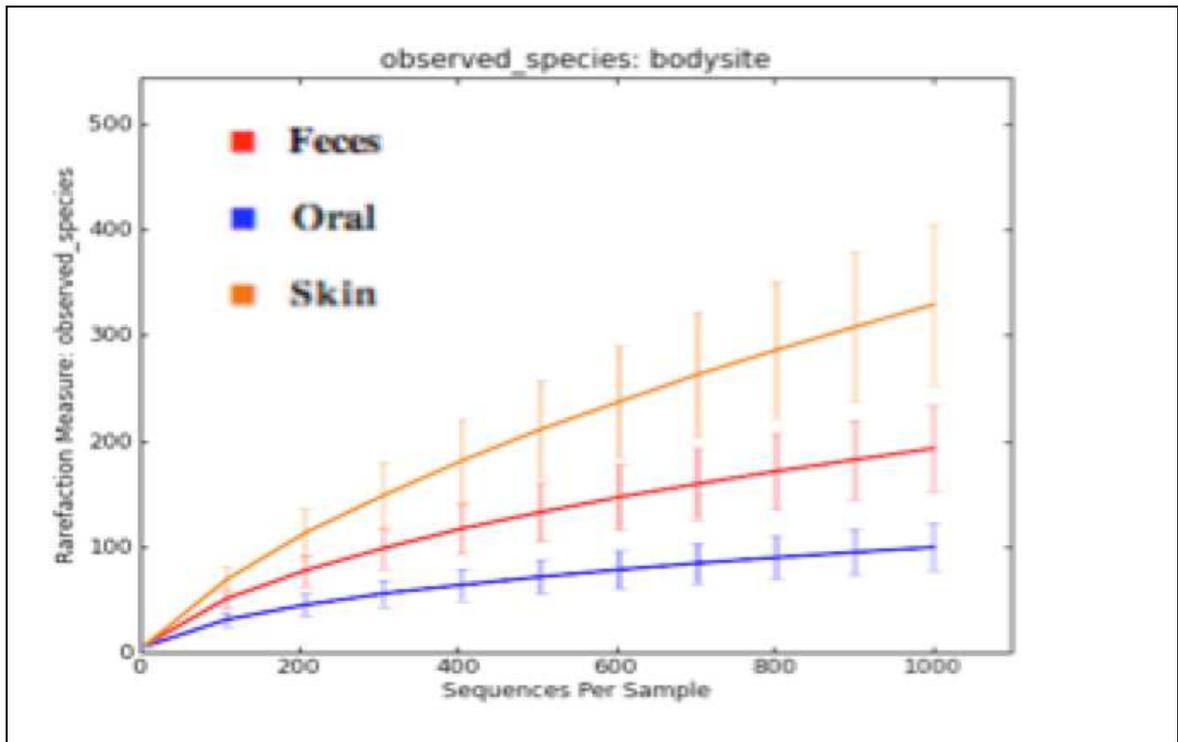
PNE= La prevalencia de no expuestos indica que de cada 100 niños de 5 a 9 años 2,5 presentan tripanosomiasis americana.

La probabilidad de tener tripanosomiasis americana en los niños de la población de Tarabuco de 10 a 14 años es 2,16 veces más en relación a los que están comprendidos entre las edades de 5 a 9 años, por lo tanto, el tener las edades de 10 a 14 años es un factor de riesgo posiblemente por que años antes las condiciones de vida eran extremadamente pobres y las viviendas eran rudimentarias sin estuco, sin embargo, el intervalo de confianza comprende la unidad, el Chi cuadrado es 2,15 siendo menor a 3,84 y el P valor es mayor a 0,05 por tanto la asociación entre la edad y la tripanosomiasis americana no tiene significancia estadística

4.2. Microbiota en niños diagnosticados, por lugar corporal y por sexo.

Gráfico No. 1

Curvas de rarefacción de especies bacterianas observadas por sitio corporal (oral, piel y heces), en todos los niños. N=85



Fuente: Programa Qiime laboratorio de Biología molecular universidad New York proyecto Chagas Tarabuco-Bolivia 2013

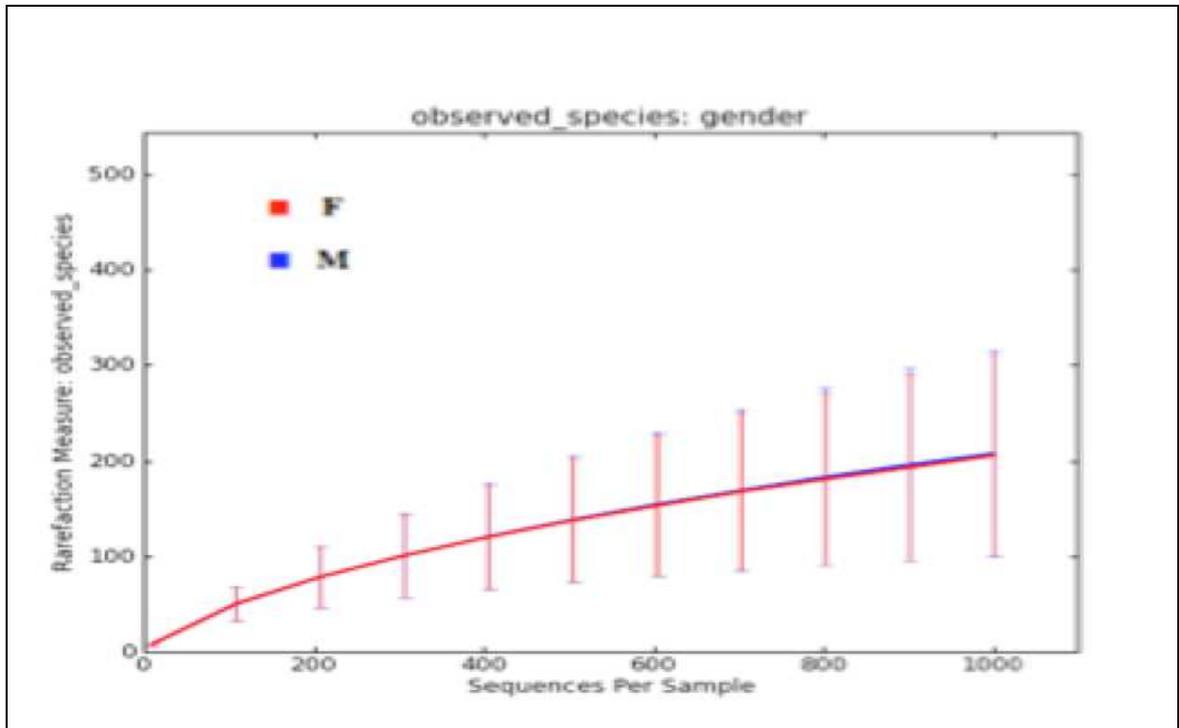
La curva de rarefacción muestra que a medida que se obtienen más secuencias, aparecen más especies bacterianas diferentes, y la curva se aplana cuando el muestreo de secuencias es suficiente para reflejar la diversidad total en cada comunidad.

El sitio más diverso desde el punto de vista bacteriano es la piel, y la curva de rarefacción se mantiene con pendiente positiva (**Gráfico No. 1**), indicando que aún pueden encontrarse más especies de las ~ 320 que aparecen. Con mayor profundidad de secuenciación se observarían más especies en piel. Por tanto, se subestima el número de especies bacterianas encontradas en piel. Sin embargo, en mucosa oral y en heces, al nivel de profundidad de secuenciación obtenido de 1,000 secuencias de ADN por

muestra, se obtiene una riqueza bacteriana que no aumenta; aumentando la profundidad de secuenciación

Gráfico No. 2.

Curvas de rarefacción de especies bacterianas fecales observadas, por Sexo.N=85



Fuente: Programa Qiime laboratorio de Biología molecular universidad New York proyecto Chagas Tarabuco-Bolivia 2013

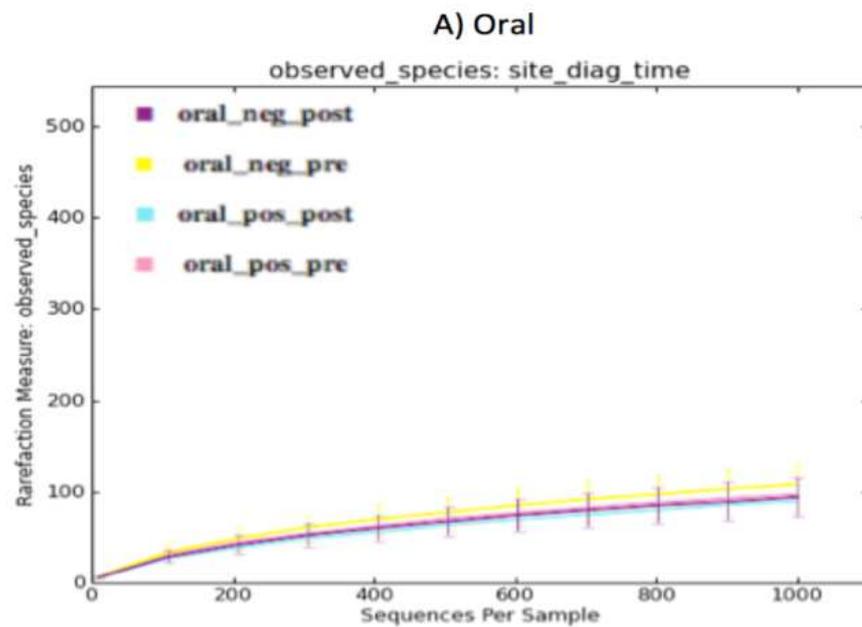
Las curvas de riqueza de bacterias en heces muestran que no hay variación por sexo (**Gráfico No. 2**), y muestran una riqueza de ~200 (± 100) especies bacterianas en las heces, sin diferencias significativas por sexo a una secuenciación de 1000

4.3. Comparación de la microbiota en niños con y sin tripanosomiasis americana.

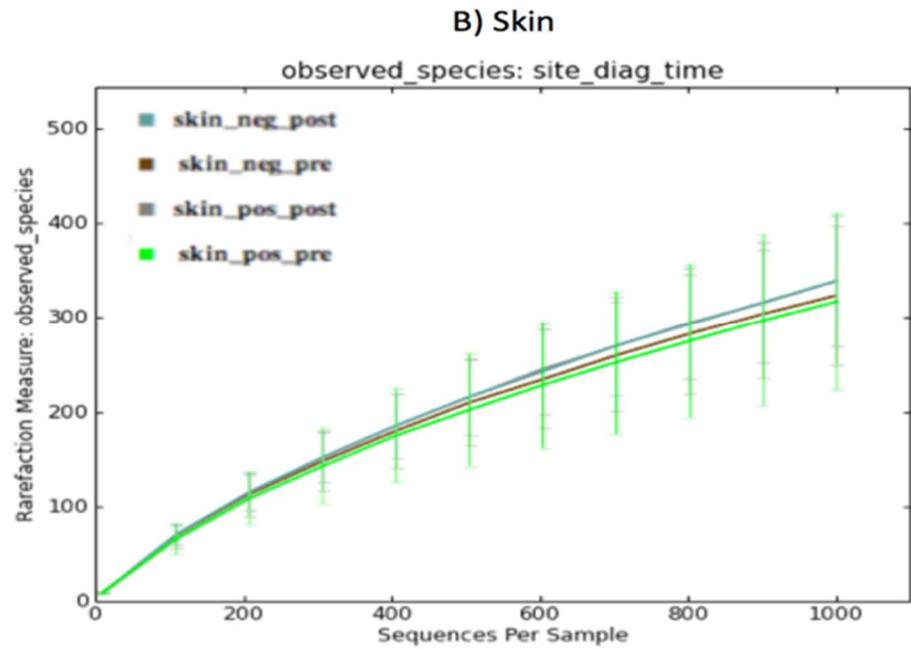
Gráfico No. 3.

Curvas de rarefacción mostrando la diversidad bacteriana en muestras oral (A), piel (B) o heces (C) de niños con y sin *tripanosomiasis americana*.

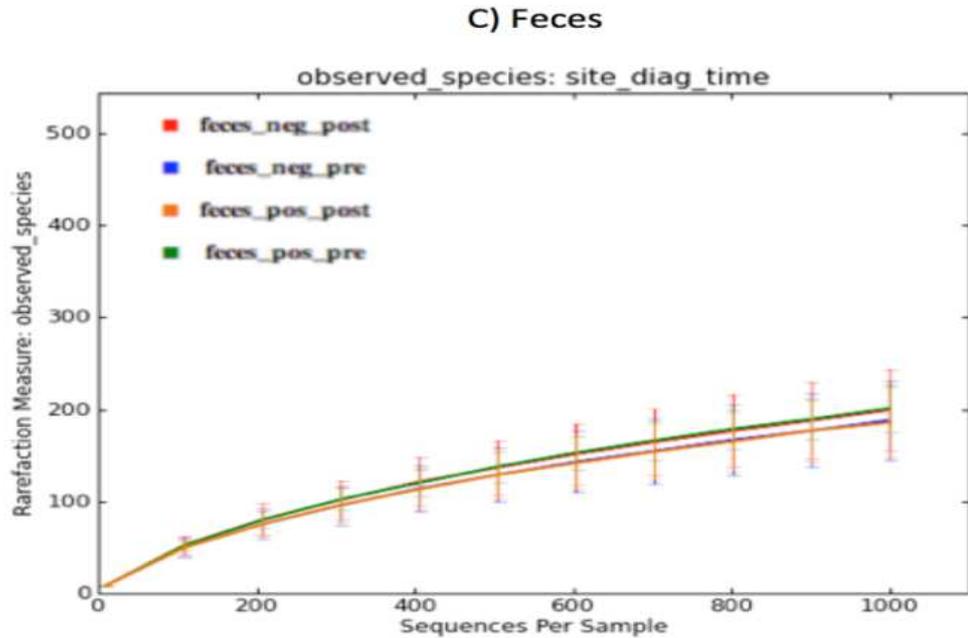
No existe diferencias significativas en la diversidad bacteriana de niños con y sin Tripanosomiasis americana



Fuente: Programa Qiime laboratorio de Biología molecular universidad New York proyecto Chagas Tarabuco-Bolivia 2013



Fuente: Programa Qiime laboratorio de Biología molecular universidad New York proyecto Chagas Tarabuco-Bolivia 2013



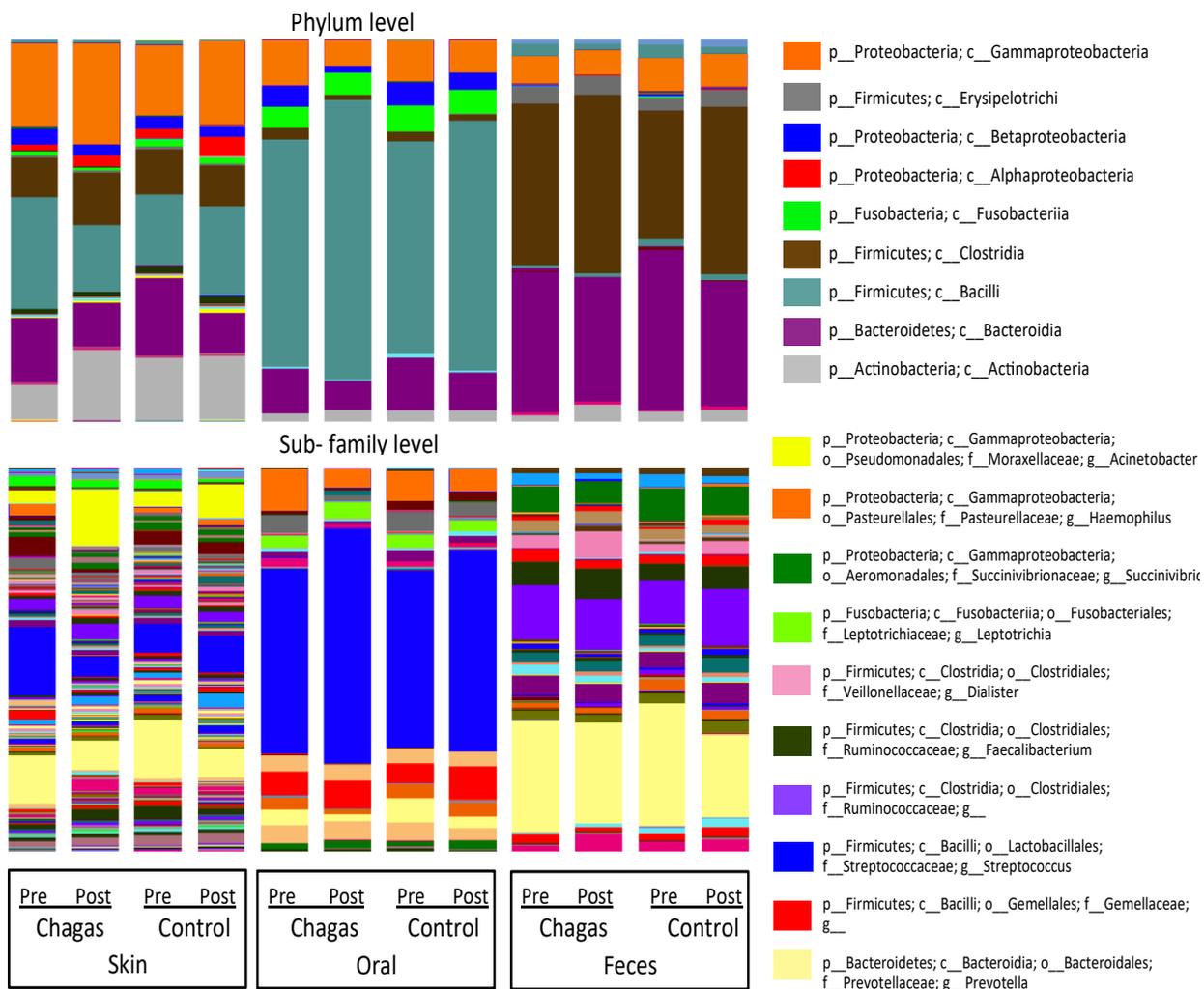
Fuente: Programa Qiime laboratorio de Biología molecular universidad New York proyecto Chagas Tarabuco-Bolivia 2013

En relación a las diferencias observadas en la microbiota según infección por *T. cruzi*, El **Gráfico No. 3** muestra la diversidad de la microbiota en diferentes sitios corporales, entre niños con o sin Chagas, utilizando la herramienta Qiime, desarrollada por Rob Knight en la Universidad de Colorado. Para cada sitio corporal, las curvas corresponden a niños Chagas positivo (pos) o negativo (neg), y el tiempo de toma de muestra, antes (pre) o después (post) del tratamiento de los niños Chagas positivos con Benznidazol. Los controles negativos tienen también, muestras tomadas a los tiempos en que a los positivos se les tomaron muestras antes y post tiempo. Las diferencias en diversidad bacteriana en la microbiota de niños infectados o no con Chagas, no son estadísticamente significativas (**Gráfico No.3 A oral, B piel y C fecal**).

4.4. Comparación de la microbiota en niños con y sin tripanosomiasis americana antes y después del Tratamiento por nivel Taxonómico

Gráfico No. 4.

Perfil de las comunidades microbianas por nivel taxonómico (phylum o niveles inferiores a familia) en los tres sitios corporales (piel, oral y heces fecales) de niños con y sin tripanosomiasis americana, antes y después del tratamiento.



Fuente: Programa Qiime laboratorio de Biología molecular universidad New York proyecto Chagas Tarabuco-Bolivia 2013

La piel de los niños aparece dominada por cuatro Phylum de bacterias: Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, y Actinobacteria, mientras la boca está fuertemente dominada por Firmicutes, y las heces por Bacteroidetes y Firmicutes (**Gráfico No.4, superior**). En la piel, los Firmicutes más importantes son bacterias del género *Streptococcus*, las Proteobacterias más dominantes son del género *Acinetobacter*, los Bacteroidetes más dominantes son bacterias del género *Prevotella*, y las Actinobacterias están constituidas por poblaciones equitativamente representadas (**Gráfico No. 4 superior**).

La mucosa oral dominada por Firmicutes, está representada predominantemente por el género *Streptococcus*. En las heces los Bacteroidetes son predominantemente del género *Prevotella*, y los Firmicutes por bacterias de la familia Ruminococcacea (**Gráfico No.4 inferior**).

Las diferencias en perfiles taxonómicos bacterianos según condición de infectados por Chagas o no, o el efecto del tratamiento no son apreciables en estos perfiles de taxonomía del (**Gráfico No. 4 inferior**).

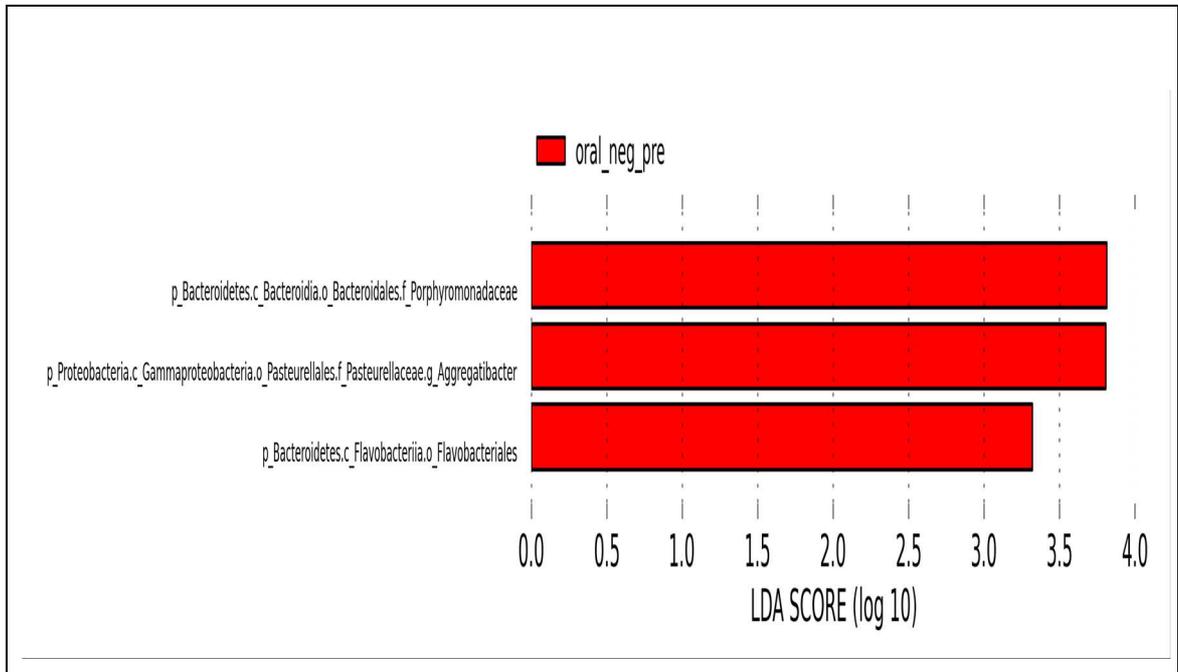
Para estudiar las bacterias que difieren de forma estadísticamente significativa entre dos grupos de muestras, se utiliza la herramienta de Lefse, desarrollada por el grupo de Curtis Huttenhower en Harvard.

El **Gráfico No. 4** muestra las diferencias antes y después del tratamiento en niños Chagas positivos y en controles negativos antes y post tiempo.

4.5. Efecto de la infección por tripanosomiasis americana, en la microbiota

Gráfico No. 5.

Diferencias en las bacterias orales entre niños negativos y positivos para Chagas antes del tratamiento

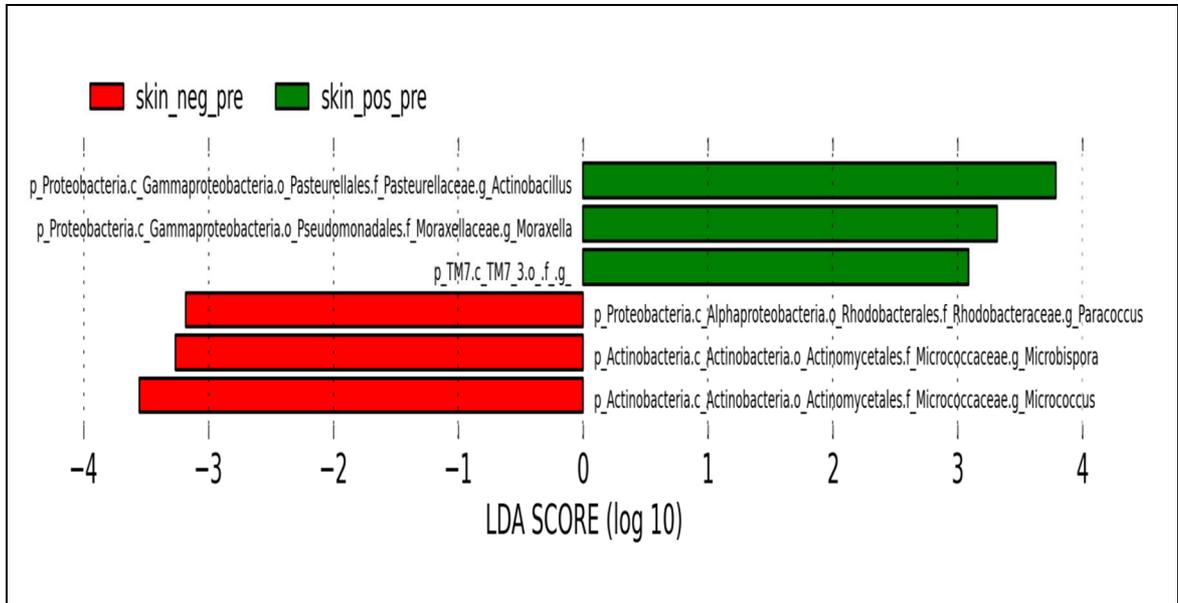


Fuente: Programa Lefse laboratorio de biología molecular Universidad New York proyecto Chagas Tarabuco-Bolivia 2013

Los niños con tripanosomiasis americana de 5 a 14 años de edad tienen disminuidas las siguientes bacterias en muestras orales: Porphyromonadaceae, Flavobacteriales (p_Bacteroidetes), Aggregatibacter (p_Proteobacteria) en muestras orales comparado antes del tratamiento en niños con y sin Chagas.

Gráfico No. 6.

Diferencias en bacterias de piel entre niños negativos y positivos para Chagas antes del tratamiento



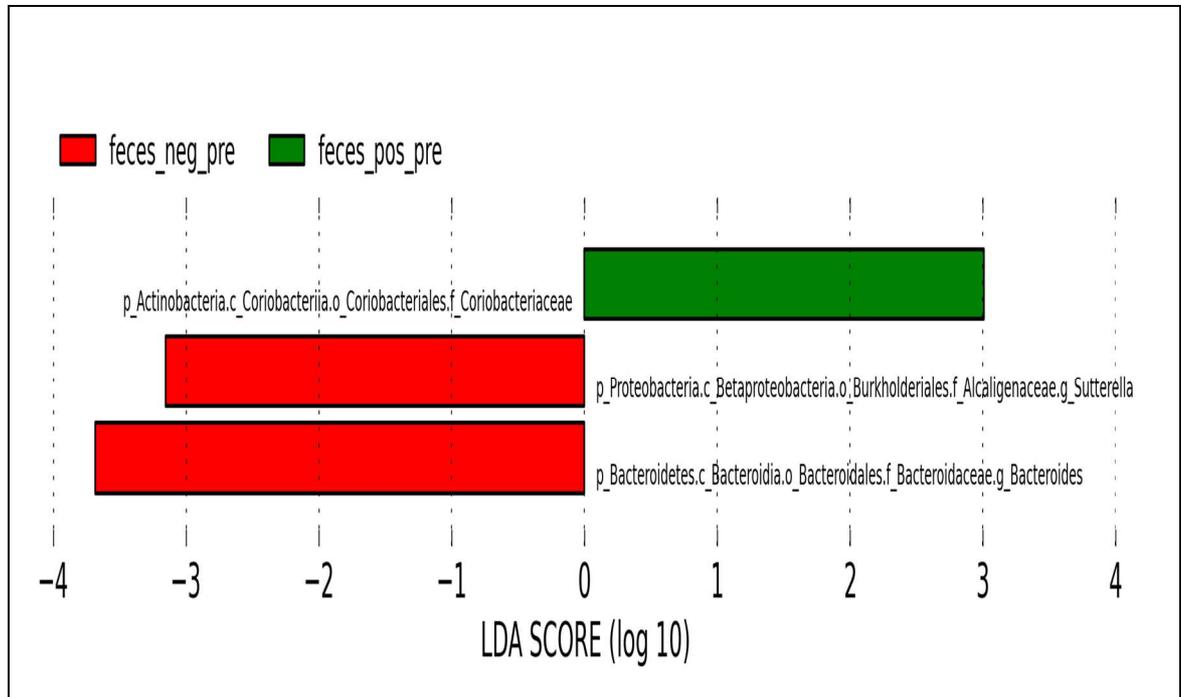
Fuente: Programa Lefse laboratorio de Biología molecular universidad New York proyecto Chagas Tarabuco-Bolivia 2013

En el gráfico 6 se observa que los niños con Tripanosomiasis Americana de 5 a 14 años de edad tienen aumentadas las siguientes bacterias en muestras de piel: Actinobacillus , Moraxella (p_Proteobacteria)

Tienen disminuidas: Paracoccus (p_Proteobacteria) y Microbispora, Micrococcus (p_Actinobacteria)

Gráfico No. 7.

Diferencias bacterianas en heces fecales entre niños negativos y positivos para Chagas antes del tratamiento



Fuente: Programa Lefse laboratorio de Biología molecular universidad New York proyecto Chagas Tarabuco-Bolivia 2013

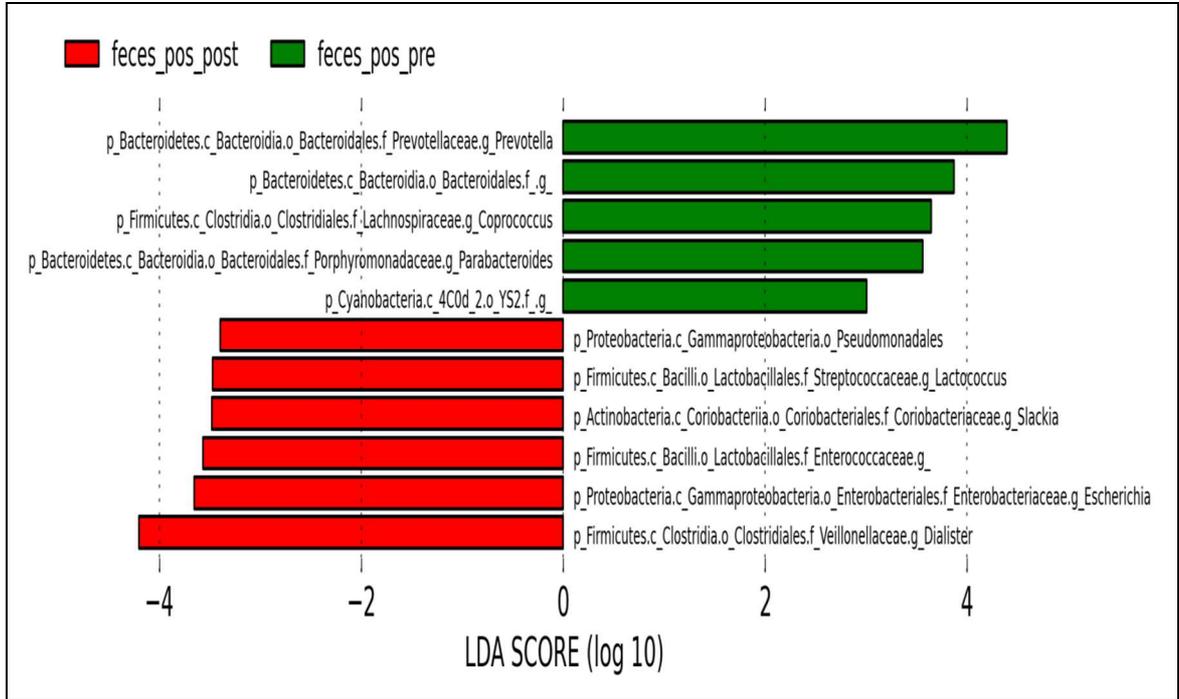
Los niños con tripanosomiasis americana tienen aumentadas las siguientes bacterias en heces fecales: Coriobacteriaceae (p_Actinobacteria)

Tienen disminuidas: Suterella (p_Proteobacteria) y Bacteroides (p_Bacteroidetes)

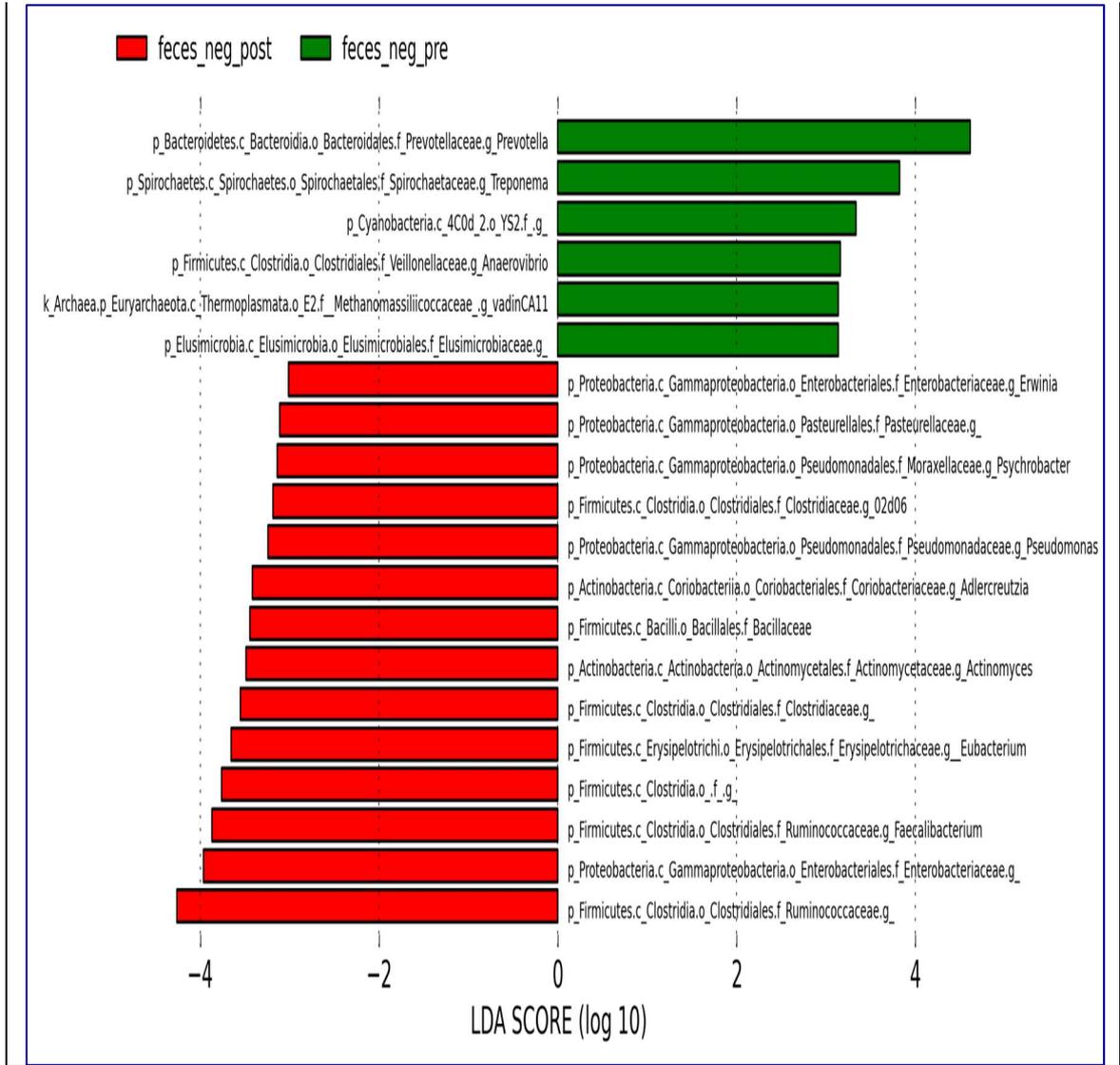
4.6. Efecto del tratamiento con Benznidazol en la microbiota

Gráfico No. 8.
Diferencias bacterianas en heces fecales entre niños positivos para Chagas

CON TRATAMIENTO



SIN TRATAMIENTO



Fuente: Programa Lefse laboratorio de Biología molecular universidad New York proyecto Chagas Tarabuco-Bolivia 2013

Tabla No 8.

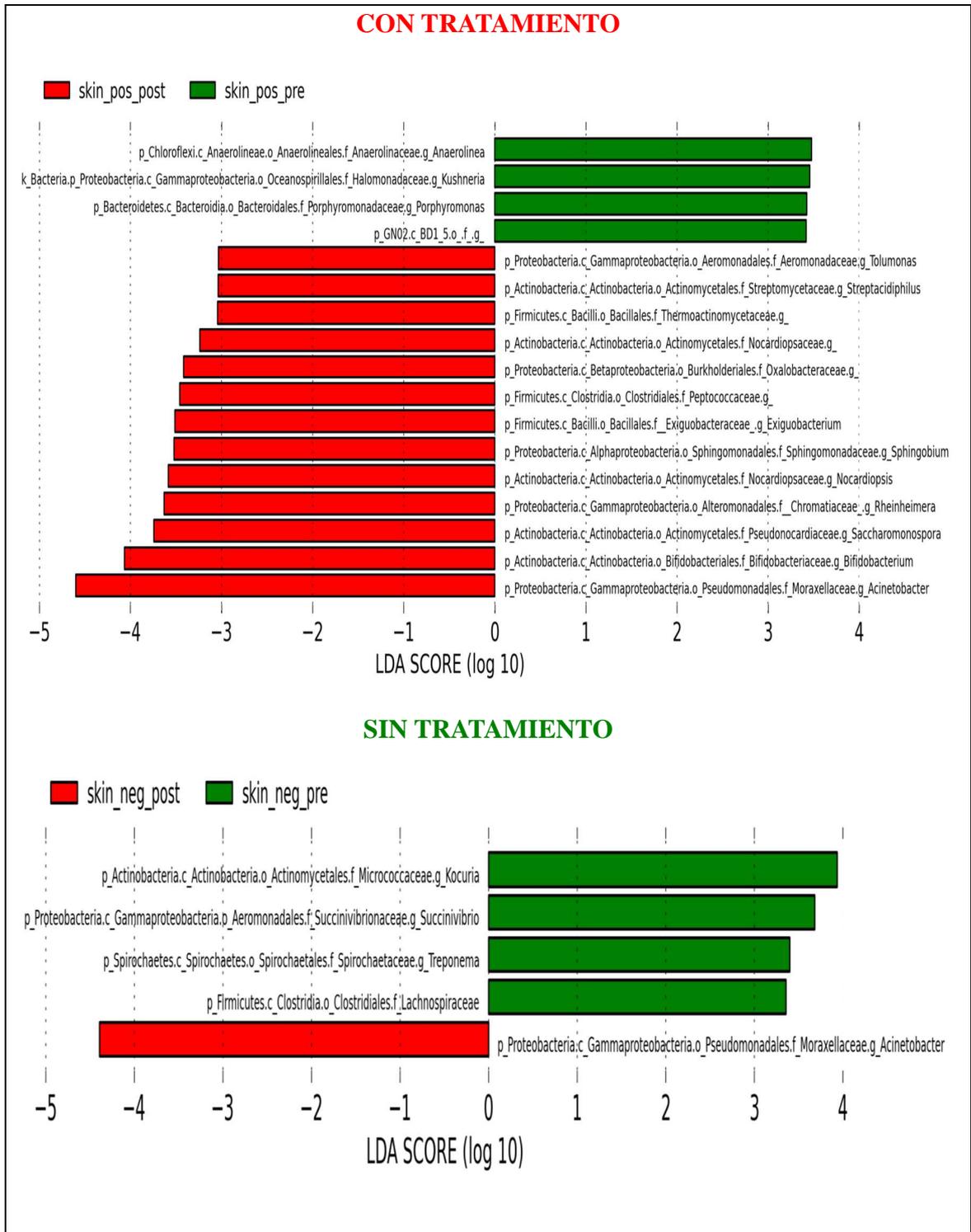
**Bacterias de heces fecales que cambian con tratamiento del Benznidazol
Efecto del tratamiento con (BNZ) sobre las bacterias de heces fecales en niños con
Chagas**

AUMENTAN
p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Veillonellaceae.g_Dialister
p_Proteobacteria.c_Gammaproteobacteria.o_Enterobacteriales.f_Enterobacteriaceae.g_Escherichia
p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Lactobacillales.f_Enterococcaceae.g_
p_Actinobacteria.c_Coriobacteriia.o_Coriobacteriales.f_Coriobacteriaceae.g_Slackia
DISMINUYEN
p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Lactobacillales.f_Streptococcaceae.g_Lactococcus

Fuente: Elaboración propia

El efecto del tratamiento con Benznidazol en la microbiota representada en el gráfico 8 y la tabla 8 en heces fecales representando al gastrointestinal nos indica que los niños que recibieron tratamiento hubo una modificación significativa a nivel de bacterias en relación a los niños sin Chagas aumentando dos phylum de Firmicutes una de Proteobacteria y Actinobacteria y disminuyo el phylum Firmicutes genero Lactococcus después de recibir el tratamiento.

Diferencias bacterianas en piel entre niños positivos para Chagas tratados y no tratados



Fuente: Programa Lefse laboratorio de Biología molecular universidad New York proyecto Chagas Tarabuco-Bolivia 2013

Tabla No 9.

Bacterias de piel que cambian con el tratamiento con BNZ
Efecto del tratamiento sobre las bacterias de Piel

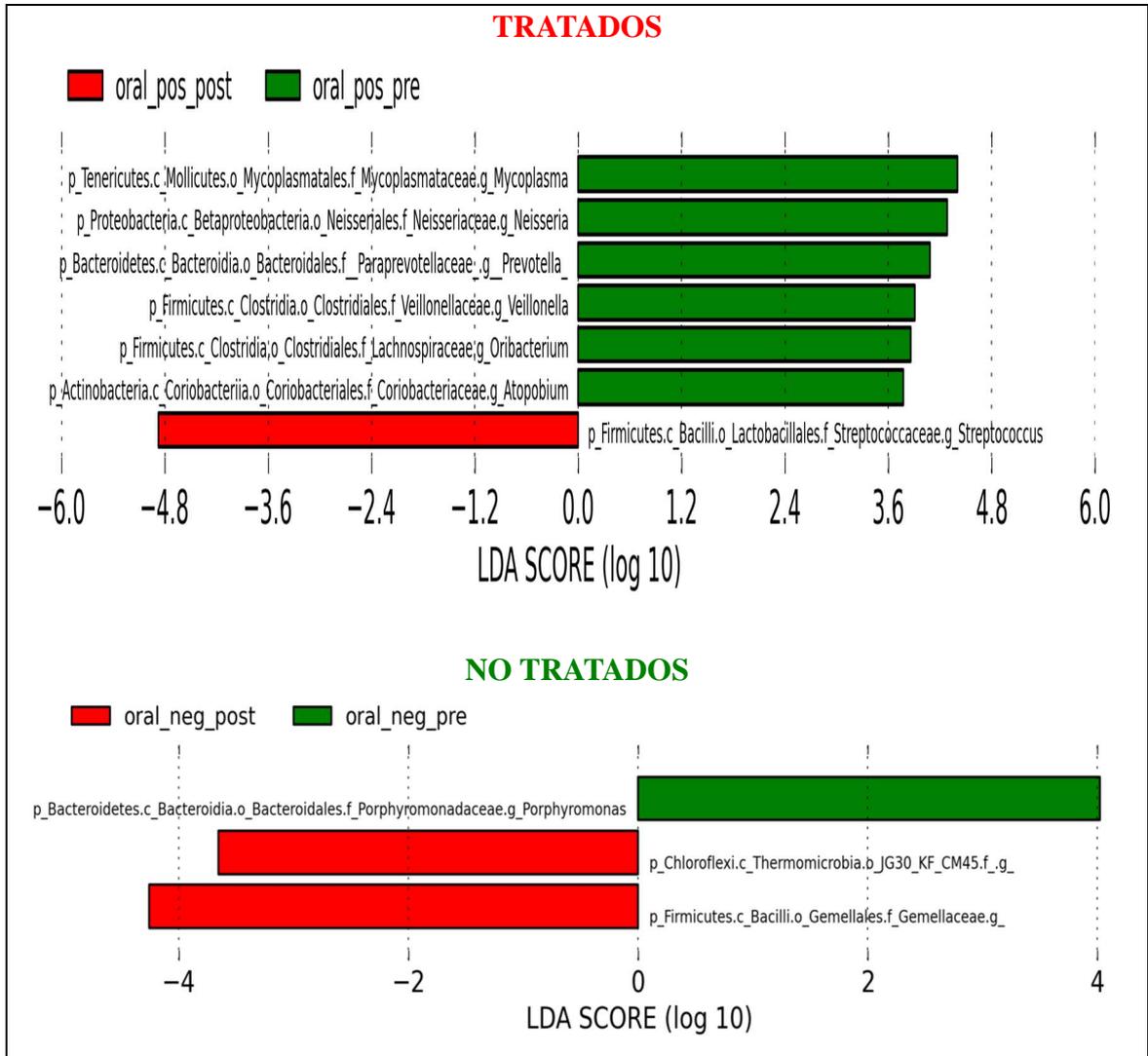
AUMENTAN
p_Actinobacteria.c_Actinobacteria.o_Bifidobacteriales.f_Bifidobacteriaceae.g_Bifidobacterium
p_Actinobacteria.c_Actinobacteria.o_Actinomycetales.f_Pseudonocardiaceae.g_Saccharomonospora
p_Proteobacteria.c_Gammaproteobacteria.o_Alteromonadales.f_Chromatiaceae.g_Rheinheimera
p_Actinobacteria.c_Actinobacteria.o_Actinomycetales.f_Nocardiopsaceae.g_Nocardiopsis
p_Proteobacteria.c_Alphaproteobacteria.o_Sphingomonadales.f_Sphingomonadaceae.g_Sphingobium
p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Bacillales.f_Exiguobacteraceae.g_Exiguobacterium
p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Peptococcaceae.g_
p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Bacillales.f_Thermoactinomycetaceae.g_
p_Actinobacteria.c_Actinobacteria.o_Actinomycetales.f_Pseudonocardiaceae.g_Saccharomonospora
p_Actinobacteria.c_Actinobacteria.o_Actinomycetales.f_Streptomyetaceae.g_Streptacidiphilus
p_Proteobacteria.c_Betaproteobacteria.o_Burkholderiales.f_Oxalobacteraceae.g_
p_Proteobacteria.c_Gammaproteobacteria.o_Aeromonadales.f_Aeromonadaceae.g_Tolomonas
DISMINUYEN
p_Actinobacteria.c_Actinobacteria.o_Actinomycetales.f_Micrococcaceae.g_Kocuria
p_Proteobacteria.c_Gammaproteobacteria.o_Aeromonadales.f_Succinivibrionaceae.g_Succinivibrio
p_Spirochaetes.c_Spirochaetes.o_Spirochaetales.f_Spirochaetaceae.g_Treponema

Fuente: Elaboración propia

La tabla y gráfico 9 reflejan que el análisis con Lefse, existió un cambio tan marcado a nivel de las bacterias de piel en niños con Chagas después del tratamiento con BNZ aumentando doce bacterias con diferentes phylum cinco Actinobacteria, cuatro phylum de Proteobacterias y tres phylum de Firmicutes posiblemente sea un factor para las reacciones adversas a nivel dermatológico y la alta sensibilidad al sol que tienen los niños al estar en tratamiento.

Gráfico No. 10

Diferencias bacterianas orales entre niños positivos para Chagas tratados y no tratados



Fuente: Programa Lefse laboratorio de Biología molecular universidad New York proyecto Chagas Tarabuco-Bolivia 2013

Tabla No 10.
Bacterias orales que cambian con el tratamiento
Efecto del tratamiento sobre las bacterias orales

AUMENTAN
p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Lactobacillales.f_Streptococcaceae.g_Streptococcus
DISMINUYEN
p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Veillonellaceae.g_Veillonella
p_Proteobacteria.c_Betaproteobacteria.o_Neisseriales.f_Neisseriaceae.g_Neisseria
p_Bacteroidetes.c_Bacteroidia.o_Bacteroidales.f__Paraprevotellaceae.g__Prevotella
p_Actinobacteria.c_Coriobacteriia.o_Coriobacteriales.f_Coriobacteriaceae.g_Atopobium
p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.g_Oribacterium
p_Tenericutes.c_Mollicutes.o_Mycoplasmatales.f_Mycoplasmataceae.g_Mycoplasma

Fuente: Elaboración propia

El Lefse a nivel de las bacterias orales refleja que los niños con Chagas que recibieron tratamiento; hubo una disminución de seis bacterias dos del phylum Firmicutes uno de Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes y phylum Tenericutes y solo se aumento un phylum que es Firmicutes del genero Streptococcus

El análisis Lefse muestra que el tratamiento de niños Chagas positivo, con Benznidazol estuvo asociado a un aumento de Actinobacterias fecales (Chagas positivo post tratamiento, en rojo), y una disminución de Cyanobacterias fecales (Chagas positivo pre tratamiento, en verde), y en piel, con un aumento de bacterias de piel del phylum Bacteroidetes, orden Sphingobacteriales.

Mientras estos cambios ocurrieron en niños tratados, en los niños no infectados ni tratados, hubo cambios temporales de menor magnitud (menos área de color), y en el mismo lapso temporal aumento ligeramente en las heces los *Clostridium* y disminuyó Archaea, mientras en piel hubo una disminución de Cyanobacterias.

El análisis Lefse de heces indica que los niños positivos para Chagas tienen mayor representación de bacterias de la familia Coriobacteriaceae, y una disminución de *Sutterella* y *Bacteroides*.

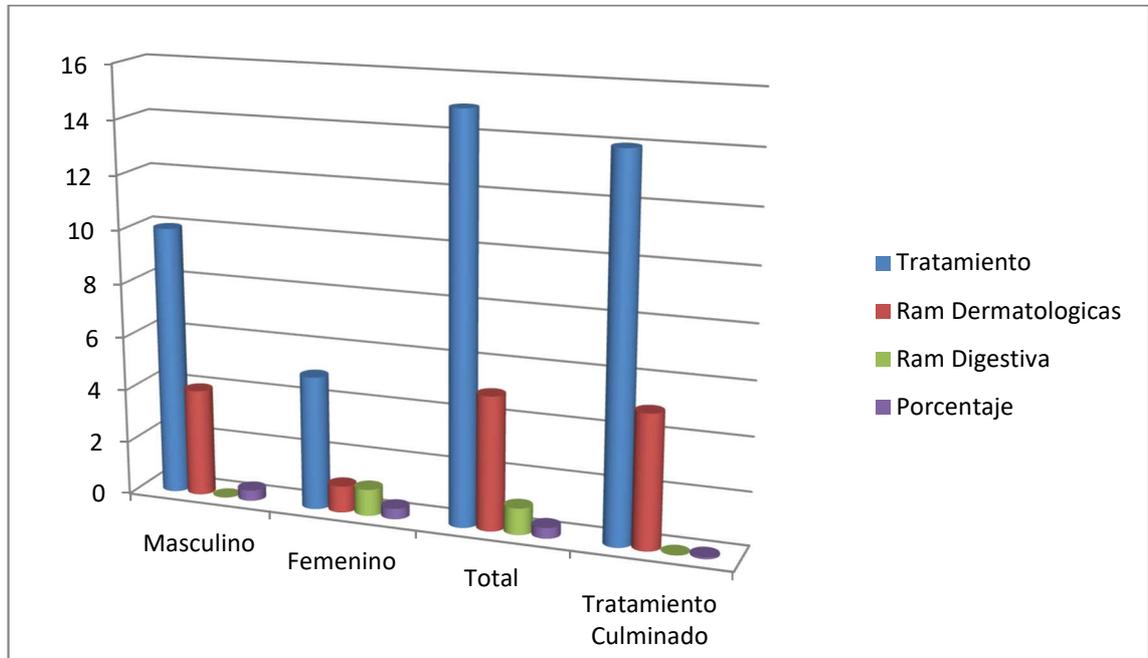
Tabla No 11

Distribución de niños con tripanosomiasis americana que recibieron tratamiento con Benznidazol (BNZ)

Niños positivos con tratamiento BNZ	Número de tratamientos	RAM dermatológica	RAM Digestiva	Por ciento de RAM
Masculinos	10	4	0	40%
Femeninos	5	1	1	40%
Total	15	5	1	40 %

Fuente: Historias Clínicas

Gráfico No. 11
Distribución de niños con tripanosomiasis americana que recibieron tratamiento con Benznidazol (BNZ)



Fuente: Historias Clínicas

Las reacciones adversas son de tipo A; se produjeron a partir de la segunda semana y son las dermatológicas 5 con un 33,3%; de las cuales 3 son leves es decir 60% y 2 moderadas con 40 %. Se suspendió el tratamiento en las reacciones moderadas de 3 a 5 días según protocolo hasta remisión de las reacciones administrando anti alérgicos, se retoma el tratamiento ajustando la dosis del tratamiento.

Al existir un aumento de las bacterias a nivel de piel a raíz del tratamiento presumiblemente en cinco Phylum de Actinobacteria, cuatro Phylum de Proteobacteria y tres del Phylum Firmicutes con un incremento de 12 bacterias diferentes.

Las RAM digestivas 1 moderada quien abandona el tratamiento del sexo femenino. Finalmente concluyeron el tratamiento 14 niños pero se retiraron de la investigación en la segunda fase 2 niños por motivos de viaje. El porcentaje de reacciones adversas es muy elevado siendo un 40% posiblemente se deba al cambio en la microbiota a nivel de piel y la hipersensibilidad que presentan los niños al estar en tratamiento.

4.7. Discusión

En relación a estos datos estadísticos la prevalencia de Chagas en la población de Tarabuco en niños de 5 a 14 años es de 3,7% siendo menor en relación a Bolivia y los cinco departamentos exceptuando el departamento de La Paz. Estudios realizados en otros países como la Argentina denotan una prevalencia de 2,84%, siendo en Tarabuco la prevalencia mayor en relación a este país.

La variación de la microbiota en niños con y sin Chagas no es significativa a nivel de comunidades pero si existe aumento y disminución de algunas bacterias a nivel de Género; posiblemente sea un factor debido al tratamiento con Benznidazol para que exista reacción adversa al medicamento anti chagásicos (RAM).

La diversidad de bacterias es diferente según el sitio corporal, siendo mayor en piel y menor en la boca. Cada sitio corporal tiene diferentes dominancias de grupos bacterianos, siendo la piel el sitio menos dominado por grupos específicos (mayor equitatividad en la dominancia) y la boca el mayormente dominado por un solo grupo.

No hay diferencias en la microbiota entre sexos.

El tratamiento con Benznidazol no cambia el microbioma a nivel de la comunidad microbiana, pero si a nivel de bacterias individuales. El tratamiento está asociado a cambios en bacterias fecales que consisten en aumento de Actinobacteria y disminución de Cyanobacteria, mientras en piel está asociada con un aumento de bacterias del phylum Bacteroidetes, orden Sphingobacteriales.

Por otro lado, el análisis filogenético del ARNr 16S presenta similares resultados, pero mostrando a Rubrobacteridae y Actinomycetales como grupos parafiléticos, en el caso de los niños bajo tratamiento con Benznidazol.

Al igual que en otros estudios de microbiota con otras enfermedades como la diabetes y la obesidad se han realizado los mismos hallazgos que refieren que existe una disminución de las bacterias del tipo firmicutes y aumento de bacteroidetes.

Se puede evidenciar con los resultados obtenidos que algunos niños cambiaron la microbiota debido a recibir tratamiento a base de Benznidazol para combatir el Chagas.

En cambio los niños asumidos en la investigación que fueron parte de la muestra y que no estuvieron expuestos al tratamiento con Benznidazol debido a que no dieron resultados positivos para tripanosomiasis americana se pudo observar que mantuvieron de forma global su microbiota en todos los tipos de sitios corporales que se han estudiado. Evidenciando que el uso de antibióticos, como es el caso del Benznidazol como antiparasitario y algunos antialérgicos entre los cuales se encuentran: clorfeniramina y loratadina que se indicaron en casos aislados en los que se demostraron reacciones adversas, han alterado la microbiota a nivel gastrointestinal y dérmico evidenciando que muchas bacterias, alrededor de doce a nivel dérmico emergieron a causa de este tratamiento; a la vez también se evidencio que disminuyeron tres tipos de bacterias.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1.-En el presente trabajo de investigación se tienen las siguientes conclusiones con respecto al primer objetivo específico la prevalencia de Chagas en niños de 5 a 14 años de la población de Tarabuco es de 3,7% diagnóstico realizado a través de pruebas de tamizaje Inmunocromatografía y HAI Chagas la confirmación se la realizo con ELISA Chagas dando una especificidad del 100% y sensibilidad también del 100%, no existe diferencia estadística significativa entre el Chagas la edad y el sexo dando un **p** valor 0.17 y de 0.14 respectivamente esto quiere decir que para tener Chagas no interesa la edad y el sexo.

2.-Al determinar la cantidad de microbiota por sitio corporal (bucal, piel y gastrointestinal) en niños de 5 a 14 años con Tripanosomiasis americana versus niños sin Tripanosomiasis americana antes del tratamiento y la diversidad de la microbiota en cada sitio corporal no varía significativamente entre niños infectados o no infectados, ni entre niños tratados o no tratados. La curva de rarefacción muestra que a medida que se obtienen más secuencias, aparecen más especies bacterianas diferentes, y la curva se aplana cuando el muestreo de secuencias es suficiente para reflejar la diversidad total en cada comunidad.

El sitio más diverso desde el punto de vista bacteriano es la piel con 320 especies bacterianas seguido por el gastrointestinal con 200 especies bacterianas y por ultimo con 100 especies bacterianas la mucosa oral en 1000 secuencias de ADN por muestra

3.- En la cantidad de especies de microbiota en muestras fecales (gastrointestinal) por sexo en niños con y sin Chagas las curvas de riqueza de bacterias en heces muestran que no hay variación por sexo y muestran una riqueza de ~200 (+ 100) especies bacterianas en las heces, sin diferencias significativas por sexo a una secuenciación de 1000

4.- Concluyendo que el efecto del tratamiento de tripanosomiasis americana con Benznidazol sobre la microbiota gastrointestinal, oral y piel en niños con tripanosomiasis americana después del tratamiento altera la microbiota, sobre todo de piel, seguido por boca y heces fecales, es decir, la microbiota gastrointestinal la significancia clínica de estas variaciones bacterianas es posible que sea la asociación con reacciones adversas al tratamiento a nivel dermatológico de los 15 niños que iniciaron tratamiento cinco tuvieron RAM reacciones adversas cuatro de ellos RAM dermatológica y uno a nivel gastrointestinal

Los microorganismos presentes en el intestino humano son cruciales para la salud humana. Todavía queda por saber exactamente cómo, hasta qué punto, y qué áreas de la salud humana se ven influidas por nuestros “huéspedes”; de igual modo, queda por esclarecer los datos sobre cómo se podría manipular la composición y/o función de la microbiota para lograr beneficios concretos para la salud

5.2 Recomendaciones

Incrementar investigaciones sobre la microbiota y su asociación con síntomas clínicos. Ya que la prevalencia con respecto a otros entornos internacionales es mayor, situación que convierte a esta enfermedad en prioridad de salud en el entorno nacional. Es importante emprender investigaciones sistemáticas ya que el presente estudio ha llegado a estudiar el microbioma a nivel de comunidad, sin embargo se recomiendan nuevos emprendimientos científicos que den continuidad al estudio realizado profundizando aún más hasta el estudio de especies.

Con respecto a la promoción prevención diagnóstico y tratamiento del Chagas se recomienda realizar diagnóstico temprano en lo posible de Chagas congénito, hacer el tamizaje a toda embarazada y seguimiento a su hijo, en cuanto al Chagas crónico reciente infantil informar primero sobre el Chagas en diagnóstico y tratamiento de los menores de 14 años de edad

Realizar convenios con el entorno escolar de los menores para que en la currícula del proceso enseñanza aprendizaje se incluya el tema de Chagas y el cuidado de la microbiota.

Orientar los padres de familia antes de iniciar el tratamiento de Chagas sobre las reacciones adversas y los cuidados que se tiene que tener para evitar reacciones adversas que afecten la microbiota en el niño.

Continuar con las estrategias del programa y el diagnóstico ya que la sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico utilizadas en el proceso de estudio demuestran alta fiabilidad, confiabilidad y validez.

Se recomienda una tarea preventiva por parte de las instancias en salud inmersas en el abordaje directo con poblaciones infantiles, ya que se pudo evidenciar el desconocimiento general que tienen los padres de familia al momento de buscar diversos tratamientos farmacológicos y caseros para tratar la enfermedad de Chagas en sus hijos.

Referencias Bibliográficas

1. Valdovinos M Á. Microbiota Intestinal en los Trastornos Digestivos. Probióticos, Prebióticos y Simbióticos. Rev. Gast. Méx. [Internet] 2013 Jun [citado 02 Ago 2013]; 78 (8) Supl 1 [aprox. 1 p.] Disponible en: <http://zl.elsevier.es/es/revista/revista-gastroenterologia-mexico-288/articulo/microbiota-intestinal-los-trastornos-digestivos--90226394>.
2. Zambrano H P (Instituto Nacional de Salud). Informe del Evento Enfermedad de Chagas 2012; [Internet] 2012 Sep 05 Informe No: FOR-R02.4000-001 [citado 20 Ago 2013]; [aprox. 14 p.] Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/CHAGAS%20Periodo%20VIII%202013.pdf>.
3. Castro D. P., Seabra S. H., García E. S., de Souza W., Azambuja P. El aislamiento de *Serratia marcescens* en el intestino medio de *Rhodnius prolixus*: impacto sobre la creación del parásito *Trypanosoma cruzi* en el vector. Investigación de Parasitología Experimental [Internet] 2007 Oct [citado 20 Dic 2013]; 107 (1-2) [aprox. 7 p.] Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489404000682>
4. Morales P, Brignardello J, Gotteland M. La Microbiota Intestinal: un nuevo actor en el desarrollo de la obesidad. Rev. Méd. Chile. 2011 06 de Junio; 38 (2): 228-233.
5. Jansson C. Salud Pública de México. [Internet] 2009 Jul [citado 30 jul 2013]; 51 (4): [aprox. 12 páginas]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-36342009000400012.3>
6. Iruretagoyena M. La microbiota salival como indicador de diagnóstico de cáncer oral. [Internet] [actualizado en 2013 23 de abril; citado 2013 20 de agosto]; Disponible en URL: <http://www.sdpt.net/PAT/salivadiagcancer.htm>
7. Agencia de Noticias UNAL Medellín-Colombia. Buscan Soluciones para Controlar Enfermedad de Chagas [Internet] [actualizado en 2012 06 de octubre; citado 2013 01 de agosto]; [aprox. 1 página]. Disponible en: <http://www.agenciadenoticias.unal.edu.co/nc/ndetalle/cat/video/pag/1/article/buscan-soluciones-para-controlar-enfermedad-de-chagas.html>.

8. Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas, Colciencias. 75 maneras de generar conocimiento en Colombia. [Internet] 2006 Oct: [citado 19 jul 2013]; [aprox. 212 páginas]. Disponible en URL: http://www.colombiaaprende.edu.co/html/investigadores/1609/articles-138367_pdf.pdf.
9. Ministerio de Salud y Deportes Bolivia. Programa Chagas. Anuario 2011 [Internet] [actualizado en 2013 11 de abril; citado 2013 01 de agosto]; [aprox. 1 página] Disponible en: http://www.paho.org/saludenlasamericas/index.php?id=24&option=com_content.
10. Vargas A, editor. Relación de la Microbiota Intestinal en la Obesidad. [Internet] 2011 agosto: [citado 2013 15 de agosto]; [aprox. 8 páginas]. Disponible en: <http://es.globedia.com/relacion-microbiota-intestinal-obesidad>.
11. Wikipedia, La enciclopedia Libre. Microbiota Normal. [Internet] [actualizado en 2013 04 de agosto; citado 2013 27 de agosto]; [aprox. 1 página]. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Microbiota_normal?veaction=edit.
12. Domínguez-Bello M. G, Costello E. K, et al. Modo de entrega da forma a la adquisición y la estructura de la microbiota inicial a través de múltiples hábitats del cuerpo en los recién nacidos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107 (26): 11.971-11.975.
13. Reciencia. Microbiota normal y principios del microbioma. [Internet] [actualizado en 2013 24 de marzo; citado 2013 13 de septiembre]; [aprox. 1 página]. Disponible en: <http://reciencia.blogspot.com/2013/03/microbiota-normal-y-principios-del.html>.
14. Murray P, Rosenthal K , Faller P. Flora microbiana comensal y patógena en el ser humano; *Rev Cient Cienc Med* 2010;13 (2): 94-98
15. Sanz M.C, Collado J, Dalmau. Contribución de la microbiota intestinal y del género «Bifidobacterium» a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales (PDF). 2006 feb. 64 (2): 74-78. ISSN 2014-2986.
16. Yatsunenکو, T., F. E. Rey, et al. Microbioma intestinal humano visto a través de la edad y de la geografía. *Naturaleza* 2012; 486 (7402): p. 222-227.

17. Ruiz Á V, Puig P Y, Rodríguez A M. Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. 2010 jul. (PDF). Rev cub inv bioméd 29 (3): p. 364-397. ISSN 0864-0300.
18. Basualdo J, et al. Microbiología Biomédica. 2° Ed. Atlante; 2006. ISBN 978950953947. p:117-22.
19. Castro D. La Microbiota Intestinal Divide a los Humanos en Tres Grupos. [Internet] [actualizado en 2011 23 de abril; citado 2013 08 de agosto]; [aprox. 1 página]. Disponible en: URL:<http://www.biounalm.com/2011/04/la-microbiota-intestinal-divide-los.html>.
20. Blaser M J, Domínguez Bello M G, et al. Conjuntos bacterianos cutáneos diferenciados en una muestra de los amerindios de América del Sur y los residentes de los Estados Unidos. 2012. La revista ISME
21. Molina L J. Sánchez C U, Uribarren B T. Vaginosis Bacteriana. [Internet] [actualizado en 2013 enero; citado 2013 12 de agosto]; [aprox. 1 página]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/vaginosis-bacteriana.html>.
22. Rodríguez M. C. Técnicas básicas de Hibridación para diagnóstico de microbiota bucal. Imbiomed [Internet] 2010 Diciembre [citado 2013 15 de agosto]; 6 (66) [aprox. 1 página]. Disponible en URL: http://www.imbiomed.com/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=60670&id_seccion=3475&id_ejemplar=6121&id_revista=144.
23. Favela R L. Preparación de medios de cultivo. [Internet]. 2008 [citado 2013 14 de septiembre] [aprox. 9 páginas]. Disponible en: URL: <http://html.rincondelvago.com/preparacion-de-medios-de-cultivo.html>
24. Caporaso J G, Kuczynski J, et al. QIIME permite el análisis de datos de secuenciación de la comunidad de alto rendimiento. Nat. Métodos 2010; 7 (5): 335-336.
25. Rodríguez R H, Aguilar C N, Ayala L A, Rocha J C, Padilla V, García H. et al. Detección de microorganismos mediante métodos moleculares. Rev de div cient. UADEC. Mex. [Internet] 2009 Enero:

- [citado 20013 16 de septiembre] [aprox. 1 pagina]. Disponible en: <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/aqm/aqmmicroorganismos.html>
26. Jan J. Le Borgue S. Uso de técnicas moleculares para realizar estudios de biodiversidad microbiana en ambientes petroleros. Rev Biotec [Internet] 2001: [citado 20014 16 de enero]; 5 (3):103-108 [aprox. 7 paginas]. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2000_3/uso%20de%20tecnicas%20moleculares.pdf
 27. R. Rodríguez H R, Aguilar G C, Ayala L L, Rocha R J C, Padilla G T, y Espinosa F T. Detección de microorganismos mediante métodos moleculares. UACSC. Mex. [Internet] c 2014 [citado 2014 09 de febrero] [aprox. 14 paginas]. Disponible en: URL: <http://es.scribd.com/doc/217016210/DETECCION-DE-MICROORGANISMOS-MEDIANTE>
 28. Martinni G W. Enfermedad de Chagas [Simposio Internacional] So. Ar, p, 155, Bs Aires; 1972.
 29. Barba C B, Cordon R C, et al. Simbiontes bacterianos de triatominos y su uso potencial en el control de la transmisión de la enfermedad de Chagas. Revisión anual de la entomología 2002 47: 123-141.
 30. Barba C B, Pye G, et al. La enfermedad de Chagas en un ciclo doméstico, el sur de Texas, EE.UU. Las enfermedades infecciosas emergentes 2003 9 (1): 103-105.
 31. Berna C, Montgomery S P, et al. Evaluación y tratamiento de la enfermedad de Chagas en los Estados Unidos: una revisión sistemática. JAMA: Rev Am Med Assoc 2007. 298 (18): 2171-2181.
 32. Cruz C M. Seroprevalencia de la Enfermedad de Chagas en Estudiantes de 5 a 14 años de la Unidad Educativa 6 de junio-La Salle. [Tesis Licenciatura U A J M S]. Tarija, Bolivia; 2009.
 33. Brener Z, Andrade Z A, et al. Trypanosoma cruzi e Doença De chagas. . Río de Janeiro, Guanabara 2000.
 34. Cornejo M E, Mayorga A, Barrionuevo J, Marcapura G. Seroprevalencia de la Enfermedad de Chagas en Gestantes en el Centro Universitario de Salud Pedro P. Díaz en Tarija – Bolivia. 2013 [Internet] 2013 [citado 2014 06 de abril] [aprox. 5 páginas] Disponible en: <http://www.buenastareas.com/ensayos/Monografia-De-Chagas-En-Bolivia/6613708.html>.

35. Carcavallo R U, et al. Los Vectores y la Docencia de Chagas en las Américas. 1999 Editar. Fio Cruz. 3: 747-890.
36. Carrasco H, Torrellas A, et al. Riesgo de Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) la transmisión por Panstrongylus geniculatus (Hemiptera: Reduviidae) en Caracas (Distrito Metropolitano) y los estados vecinos, Venezuela. 2005 Int J Parasitol 35: 1379-1384.
37. Carrasco H J, Segovia M, et al. Distribución geográfica de Trypanosoma cruzi genotipos en Venezuela. Enfermedades tropicales descuidadas 2012. PLoS 6 (6): e1707.
38. Yapu M. La Educación Rural en Chuquisaca. Elementos para futuras investigaciones. [Internet] 2011 [citado 2013 23 de enero] [aprox. 187 páginas]. Disponible en URL: http://www.pieb.com.bo/cien_anios/archivo/libro_yapu.pdf.
39. Instituto Nacional de Estadística (INE). Bolivia Características de Población y Vivienda. Censo Nacional de Población y Vivienda [Internet] 2012 [citado 2013 22 de septiembre]. Disponible en: <http://www.ine.gob.bo:8081/censo2012/PDF/resultadosCPV2012.pdf>
40. Servicio Departamental de Salud. SNIS, Hospital Tarabuco. Pág. 53-60. ASI

Bibliografía

- Aerhard E. 40: 165, 170; Medicina; Bs Aires 1980
- Acchile Lisboa Bitencourt – Instituto de Medicina Tropical , 2: 62,67; San Paulo; 1963
- Albonico S. 40: 3,6; Medicina Bs. Aires, 1980
- Álvarez Manuel; Bol.Chileno de Parasitología, 23: 4,9; Santiago de Chile , 1968
- Anales flip, Diagnostico de laboratorio de enfermedad de Chagas, Casa Cuna, Buenos aires, 1972
- Andrade Z y Perez Tamayo – Texto de Patología ,OPS; 238, México 1970
- Barrouse E, 38: 611,615; Medicina. Bs Aires, 1978
- Bejarano J. Segundas Jornadas de Epidemiología – Argentina, 3: 13, 1965
- Boyten S. Experimental Medicina, 93: 107,120; Londres, 1951
- Brumpat E. Bull, Soc, Path, Exot. 7: 706; Paris 1914
- Bosa J y Stopanni A, Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas, So. Ar, Pa; 21, Bs Aires, 1972
- Bozzini Juan Pablo; V Reunion Anual sobre Enfermedad de Chagas, SECYT; 47,49; Rosario, 1979.
- Brenner Z. Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas, So. Ar, Pa; 13, Bs Aires, 1972
- Borda C.; U.N. del Nordeste Comunicación personal
- Camargo M , Diagnostico de enfermedad de Chagas por el laboratorio, Guanabara , 1979.
- Cazullo Juan Jose , comp., biochem, phisl, 6: 301,303; Londres 1977
- Cazullo Juan, Journal of Microbiology, 99:237,241; Londres 1977
- carpintero Jose, Las especies de triatomas en Latinoamérica, Publicación Roche, Bs aires, 1972
- Cerisola Alberto, Boletín chileno de parasitología, 23: 4,9; Chile, 1968
- Cerisola A., Lugones H, Ravinovich L; Tratamiento de la enfermedad de Chagas, Premio científico Rizzuto, de la Soberana Orden de Malta , Argentina, 1972

- Cerisola A, El xenodiagnostico ,normatizacion, MBS Sec. de Salud, Bs Aires 1974 y 22' Cerisola A., Boletín OPS 73, n°3 1972
- Cerisola A, diagnostico por el laboratorio de la enfermedad de Chagas, ED Rabinovich, MSP Sec de Salud, Bs Aires , 1972
- Cerisola A. Instituto de medicina tropical, 12: 403,406; San Pablo 1970
- Cura E. y Segura E, Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas, So. Ar, Pa, 21,27, 1972
- Cichero J y Martinez A, Vectores de la enfermedad de Chagas, MBS; dto Zoonosis, Bs. Aires, 1972
- Claus c. Historia natural Zoología , tomo segundo, Zoología 1, protozoarios, Montener y Simon editores, Barcelona, 1920
- Craig y Faust , Parasitologiaclinica, ed Salvat, Barcelona, 1975
- Chagas Carlos, Nomina completa de sus publicaciones , instituto Brasileiro de Bibliografías y Documentación, Rio de Janeiro, 1959.
- Carcavallo R, y Martinez A, comunicaciones científicas de las Fuerzas Armadas, 13: 1, Buenos Aires 1968
- Deffis J, Triduo de la asociación bioquímica argentina, Bs. Aires 1953
- De Santis L. Museo de la Plata, 12: 239, 1981
- Engel JC, V Congreso latinoamericano de Parasitología, 286, Bs. Aires, 1979
- Girola R. II Jornadas de entomoepidemiologia Argentina, 1: 187, 192; Bs. Aires 1965 – 34' Jorg J, V Congreso Latinoamericano de Parasitología; Bs. Aires, 1979
- Harold F . American journal of publichealt , 41: 237,278; 1951.
- Howard R "La enfermedad de Chagas congenita", n° 16, U. De Chile, 1962
- Lhenninger A. Bioquímica, 26, ed omega, Barcelona, 1973
- Litter M. – que se espera de una droga antichagasica? , publicaciones Roche, Bs Aires1978
- Lausi L, II Jornadas de entomoepidemiologia Argentina , 3, Bs aires 1965 y 39' Lugones y Ledesma Anales Nestle , parasitosis, 134: 124, Bs Aires, 1979
- 40.
- Machado y Guerreiro ; Medicina Brasil, 27: 225,226,Brasil, 1913
- Mazza S. Recopílacion de sus trabajos, U: : de Buenos aires 1945

- Manso Soto AMEPRA, 23: 81,82, Bs Aires 1952
- Mujica Luis , actualizaciones sobre enfermedad de Chagas, U. N. del Sur, Bahia Blanca ,junio 1980
- Moreno S, V Reunion anual sobre enfermedad de Chagas, SECYT; 57, Rosario, 1979.
- Mujica Luis , Medicina, 40: 251, 252; Bs Aires, 1980; 46' Mujica Luis "Trabajo de revisión , enfermedad de Chagas", rev UNNE , vol ii, n°1 : 23, 37, Corrientes , 1987
- Paulone I. Y Segura E, Simposio internacional sobre enfermedad de Chagas, Bs Aires 1972.
- Piroski i, Progreso y destrucción del Malbran, EUDEBA, Bs Aires 1986
- Pereira Sanches; ABA,233: 12,13, Buenos Aires , 1978
- Pinto Diaz, V Reunion de pesquisas basicasdoenca Chagas , Caxambu, 1978
- Perez Tamayo, Texto de patología, la prensa mexicana, ops, México ,1970
- Romaña Carlos, Enfermedad de Chagas, Ed Lopez Librero, Bs Aires, 1963
- Rosembaum M y Cerisola A, Hspital, 60: 55,100; la Habana Cuba, 1961
- Russo carolina, ÍNDIECH; comunicación personal
- Rabinovich J, "Ecología de las poblaciones animales", OEA; eeuu, 1978
- Roche publicaciones , "Radani", 1978
- Ruiz A, Medicina, 45:539,546; Buenos Aires, 1985 Y 57' – Ruiz A. Acata Tropical, 42: 299,309, 1985
- Ruiz a. Immunologyletters, 6: 165,171; wdc, 1986
- Ros H, introduccion a la entomologia, ed omega, Bs Aires, 1964 y 59' Saleme A, Fac Medicina de Tucuman, 40:385,395, Tucuman 1968
- Segura E, immunologyletters, 6: 165,171; wdc, 1986
- Segura E, Bull of panamercianhealtorg, 19:3, 1985
- Titto E, Immunologyletters, 13, wdc 1986
- Vatuone J, Boletin chileno de Parasitologia, 26: 7, Chile, 1971
- Villaseca J, vox sang, 11:711,717, 1966
- Winivesky Coli, Medicina, 47:45,50; Buenos Aires, 1987.

- Prebichraul y otros, Problemas economicos del tercer mundo, edbelgrano, Buenos Aires, 1983
- Masalla de Brundtland, Goodland y otros , ed trota Valladolid, 1997
- Daly Herman, "Los peligros del libre comercio", investigación científica ,208: 12,17 , Barcelona, 1994
- Informes del CDC, de Atlanta EEUU, 2012

Anexo N° 1

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO –MADRES

PROYECTO: Microbiota de niños de 5 a 14 años con y sin tripanosomiasis americana de la población de Tarabuco. Bolivia 2013

Descripción

El cuerpo humano tiene más bacterias que células humanas, y las bacterias son importantes para el funcionamiento de los órganos colonizados (intestino, boca, piel, vagina). Sabemos que los bebés que nacen por parto normal, vienen al mundo con el primer inóculo natural, el de la vagina de su mamá. A partir de aquí, el bebé naturalmente desarrolla una comunidad de bacterias diferente en boca, piel e intestino.

El objetivo de esta investigación es estudiar cómo las comunidades microbianas humanas de la boca, piel e intestino, se diferencian entre personas con o sin infección con *T cruzi* (el parásito del Chagas).

Para cumplir con el objetivo necesitamos hisopados tomados de diferentes partes del cuerpo de 20 niños seropositivos y 40 seronegativos, con edades de entre 5-14 años.

Por tanto, el protocolo al que se refiere esta solicitud es el de hisopado por duplicado de boca, piel y heces. El hisopado consiste en frotar un hisopo (palo o tubo de madera con un extremo de algodón) sobre la superficie de la cual se quiere obtener muestra para recoger material bacteriológico. Los hisopados se tomarán en el Centro poblado de Tarabuco.

Los criterios de inclusión son personas sin síntomas que no estén bajo tratamiento médico para ninguna condición crónica. Los criterios de exclusión son el uso de antibióticos en los últimos 3 meses, restricciones dietéticas, obesidad y enfermedades crónicas. Para descartar obesidad, se medirán y pesarán los niños y las madres.

Las muestras se usarán solamente para el propósito de esta investigación y serán enviadas a la ciudad de New York para la secuenciación; los voluntarios y cualquier voluntario podrán retirarse del estudio cuando lo desee, sin ninguna consecuencia.

Riesgos, beneficios y derechos de los participantes

El procedimiento tiene muy bajo riesgo. La toma de muestras la hace personal capacitado. La participación en el estudio no conlleva beneficios directos personales, sino que aportara a la comprensión de los efectos que puede tener sobre los niños la infección por el parásito *T cruzi*. Los resultados tendrán un impacto en la investigación biomédica y clínica en términos de salud pública y ayudará a mejorar el entendimiento de los mecanismos de desarrollo de la patología chagásica.

Además, a todo participante se le realizará un examen coproparasitológico y tratamiento gratuito al final de la investigación

Derechos

El voluntario tiene derecho a no continuar en el estudio si así lo decide, a retirarme sin perjuicio y a tener una copia de este consentimiento informado

Voluntario

Con mi firma, demuestro que he tomado la decisión de que mi hijo(a) participe en el estudio voluntariamente después de haber leído y discutido la información presentada en este consentimiento.

Certifico que soy la madre, mayor de 21 años, y que tengo la capacidad para consentir

Nombre de la madre participante

Firma

Fecha

Nombre del hijo

Se ha discutido el contenido de esta Hoja de Consentimiento con el arriba firmante, y se le ha explicado los riesgos y beneficios del estudio.

Nombre del investigador

Firma

Fecha

ó persona designada

(se firmará en presencia del voluntario)

Anexo N° 3

Permiso del Comité de Bioética del SEDES Chuquisaca (Servicio Departamental de Salud) para el presente Trabajo Investigativo y Transporte de Muestras



Gobierno Autónomo de
CHUQUISACA

GOBIERNO AUTÓNOMO DE CHUQUISACA
SERVICIO DEPARTAMENTAL DE SALUD



**RESOLUCIÓN EXPRESA DEL COMITÉ DE BIO-ÉTICA
SEDES N° 001/2013**

VISTOS.-

Que, mediante solicitud escrita enviada por la Dra. D. Patricia Maldonado A BIOQUÍMICA – FARMACÉUTICA DEL Hospital Ricardo Bacherer del Municipio de Tarabuco, mediante la cual **Solicita Autorización del Comité de Bioética del SEDES – Chuquisaca para la Realización de un Trabajo de Investigación que lleva por Título “DETERMINAR LA MICROBIOTA MEDIANTE BIOLOGÍA MOLECULAR EN PERSONAS DE 5 A 15 AÑOS CON Y SIN SEROLOGÍA POSITIVA PARA TRIPANOSOMIASIS AMERICANA (CHAGAS) QUE ESTUDIAN EN LA ESCUELA ROSALIA VDA. DE ANTEZANA TARABUCO 2013”**. Para cuyo Efecto Adjunta consentimiento informado para los padres de familia.

CONSIDERANDO.-

- a) Llevada a cabo la reunión convocada el 05 de Noviembre de la presente Gestión en oficinas de la Unidad de Epidemiología del Servicio Departamental de Salud de Chuquisaca, con la presencia de todos los miembros del Comité de Bioética del SEDES:
 - *Dr. Hilarión Montero Irala (Jefe Unidad Planificación SEDES – CH)*
 - *Dr. Jhonny Camacho Borja (Jefe Unidad Epidemiología SEDES – CH)*
 - *Lic. Gonzalo Cervantes D. (Jefe Unidad R.R.H.H. SEDES – CH)*
 - *Dr. Juan Pablo Beltrán Q. (Coord. Dptal. de Laboratorios SEDES – CH)*
 - *Abog. Lino Valencia Montero (Asesor Jurídico SEDES – CH)*
- b) Habiéndose realizado una presentación de la logística y de los procedimientos a llevarse a cabo para dicha Investigación demostrando que la toma de muestra a realizarse no significa ningún riesgo para las personas que participaran de dicha investigación.
- c) Habiendo el compromiso de cumplir con las Normas y Políticas de Bioética y confidencialidad por parte de la Maestrante hacia las personas que participaran en la Investigación.
- d) Recomendándose el cumplimiento estricto de las Normas de Toma, Conservación, Transporte y Envío de Muestras en Vigencia asegurando un correcto transporte de muestras hacia el extranjero.
- e) Habiéndose asumido el compromiso por parte de la maestrante de presentar todos los resultados obtenidos en la Investigación a las Instancias correspondientes y en Plazos establecidos.

SUCRE, CAPITAL CONSTITUCIONAL DEL ESTADO PLURINACIONAL DE BOLIVIA

Sucre: Calle Rosendo Villa N° 202 esquina calle Urriolaogitia - Fax: 6912720 - Casilla N° 109
Teléfonos: Recepción: 64-54891 / 64-54136 - Dirección: 64-54093 - Planificación: 64-55058 - RR.HH.: 64-53146 - Administración: 64-53147

Continuación del Anexo N° 3



Gobierno Autónomo de
CHUQUISACA

SERVICIO DEPARTAMENTAL DE SALUD



POR TANTO

La Directora Técnica del SEDES – CH; en el marco de sus atribuciones conferidas por el D.S. 25233 y el Reglamento Interno del SEDES Chuquisaca, en Coordinación con el Comité de Bioética

RESUELVE.-

PRIMERO.- BRINDAR LA AUTORIZACIÓN CORRESPONDIENTE a la Dra. D. Patricia Maldonado A. BIOQUIMICA del Hospital Ricardo Bacherer del Municipio de Tarabuco, para la Realización del Trabajo de Investigación **“DETERMINAR LA MICROBIOTA MEDIANTE BIOLOGÍA MOLECULAR EN PERSONAS DE 5 A 15 AÑOS CON Y SIN SEROLOGÍA POSITIVA PARA TRIPANOSOMIASIS AMERICANA (CHAGAS) QUE ESTUDIAN EN LA ESCUELA ROSALIA VDA. DE ANTEZANA TARABUCO 2013”**.

SEGUNDO.- La solicitante deberá cumplir con las políticas de confidencialidad, respeto con las personas que participen en la Investigación

TERCERO.- La solicitante deberá presentar los resultados obtenidos en la investigación a las instancias correspondientes.

CUARTO.- La solicitante deberá prever que la ejecución de la investigación no implique ningún perjuicio a las actividades cotidianas, en respaldo y combinación con sus jefes inmediatos superiores

La presente Resolución es dada, en la ciudad de Sucre a los seis días del mes de noviembre del año dos mil trece.

REGÍSTRESE, PUBLÍQUESE Y ARCHÍVESE.

Abog. Lino Valencia Montero
ASESOR JURÍDICO
SEDES – CHUQUISACA

Dr. Juan Pablo Beltrán Q.
CODELAB
SEDES – CHUQUISACA

Dr. Gonzalo Cervantes D.
JEFE UNIDAD R.R.H.H.
SEDES – CHUQUISACA

Dr. Johnny E. Camacho Borja
JEFE UNIDAD EPIDEMIOLOGÍA
SEDES – CHUQUISACA

Dr. Hilarion Montero Brala
JEFE UNIDAD PLANIFICACIÓN
SEDES – CHUQUISACA

Dra. Gilka Guerrero Corp
DIRECTORA TÉCNICO
SEDES – CHUQUISACA

SUCRE, CAPITAL CONSTITUCIONAL DEL ESTADO PLURINACIONAL DE BOLIVIA

Anexo N°4

Protocolo de Extracción de ADN (MOBIO EXTRACTION KIT)

Modificado de MoBio 96-Bueno Método de extracción manual

Los artículos no incluidos en el kit de extracción:

- Solución descontaminante de DNA (DNAaway, 10% de lejía, etc)
- Consejos + pipeta de 8 canales de gran volumen
- Etanol de grado molecular 100%
- Depósitos de reactivos estériles
- Baño de agua ajustado a 65 ° C
- Baño de hielo
- Oscilación centrífuga cubo capaz de 4.500 xg
- Agitador de placas de metal con 4 adaptadores de placas. Este protocolo utiliza la coctelera placa de 96 pocillos (catálogo # 11996) que aparece en el sitio web MoBio.

Los artículos incluidos en el kit de extracción (para 1-96 pozo de extracción):

- (1) Placa de bolas
- (1) placa de centrifugado (filtro)
- (1) Colección de 0,5 ml
- (4) placas de recolección de 1,0 ml
- (2) las placas de recolección de 2,0 ml
- (1) de micro placas (elución de ADN)
- Cinta de sellado
- Centrífuga de cinta
- Elución Sellado Mat
- Soluciones etiquetadas

Antes de empezar:

1. Limpie todas las superficies y pipetas para eliminar el ADN
2. Las placas de identificación
 - Placa # 1 - Placa de colección 1 ml
 - Placa # 2 - placa de recolección de 1 ml
 - Placa # 3 - placa de recolección de 1 ml
 - Placa # 4 - placa de recolección de 1 ml
 - Placa # 5 - Placa de colección 2 ml
 - Placa # 6 - placa de la colección 2 ml
3. UV esterilizar y embalses de la etiqueta
 - Solución de bolas - 750ul/well
 - C1 - 60ul/well
 - C2 - 250ul/well
 - C3 - 200ul/well
 - C4 - 650ul/well
 - C5 - 500ul/well

- o C6 - 100ul/ well

Protocolo

Por favor, use guantes en todo momento.

8. ANTES DEL PRIMER USO SOLAMENTE, Solución C5-D debe estar preparado. Añadir una cantidad igual de etanol al 100% a la solución de C5-D (para los 4 Kit de preparación = 120 ml, o para el kit de preparación 12 = 360 ml). Mezclar bien. Ponga una marca en el "etanol añadido" cuadro en la etiqueta de tapa de la botella.
9. Placa centrífuga del grano por 1 min a 2.500 xg para sedimentar las perlas. Retire la placa Bueno Mat Del ®-htpPlate bolas PowerSoil y reservar. Añadir 0,1 a 0,25 gramos de muestra de suelo o un hisopo de muestra.
Nota: Este es un punto de parada adecuado y se puede almacenar el ®-htpPlate bolas Power Soil a 4 ° C cubierto de la placa Bien Mat. Este es el paso que más tiempo del protocolo. Se debe tener cuidado para evitar la contaminación cruzada entre pocillos de muestra.
10. Añadir 750 l de Power Soil ®-HTP Solución bolas a los pocillos de la placa de bolas PowerSoil ®-HTP.
11. Compruebe Solución C1. Si la solución de C1 ha precipitado, la solución se calienta a 60 ° C hasta que el precipitado se haya disuelto.
Nota: Solución C1 contiene SDS. Si hace frío, se precipitará. El calentamiento a 60 ° C se disolverá el SDS. Solución C1 se puede utilizar mientras todavía está caliente.
12. Añadir 60 l de solución de C1. Asegure la placa Bueno Mat (del paso 2) firmemente a la placa. Coloque placas selladas en 65 ° C baño de agua durante 10 min. No sumerja el PLACAS.
13. Coloque Power SoilPlatoBead ®-htp entre los adaptadores de placas de aluminio y fijarlo a la coctelera placa de 96 pocillos de forma segura.
14. Agitar a velocidad 20 durante 20 minutos.
15. Centrifugar a temperatura ambiente durante 6 minutos a 4500 x g. Aunque la centrifugación, alícuota de 250 l de solución de C2 en cada pocillo de la placa # 1 y cubra con cinta de sellado. La cinta de sellado se puede volver a utilizar cuando la centrifugación Plato # 1 en el paso 11, si se maneja con cuidado.
16. Retire y deseche la Plaza Bueno Mat de la placa del grano.
17. Retire con cuidado la cinta de sellado de la placa # 1 y transferir el sobrenadante (~ 400-500µl) de la placa de bolas en Plato # 1 y la pipeta hacia arriba y abajo 4 veces.
Nota: El sobrenadante todavía puede contener algunas partículas.
18. Vuelva a aplicar la cinta de sellado de la placa # 1. Incubar a 4 ° C durante 10 minutos. Centrifuga Placa # 1 a temperatura ambiente durante 6 minutos a 4500 x g. Aunque la centrifugación, alícuota de 200 l de solución C3 en cada pocillo de la placa # 3, luego cubra con cinta de sellado. La cinta de sellado se puede volver a utilizar cuando la centrifugación Placa # 3 en el paso 13, si se maneja con cuidado.

19. Después de centrifugar, retire con cuidado y deseche la cinta de sellado de la placa # 1.
20. Evitar el pellet, transferir todo el volumen (~ 600 l dependiendo del tipo de muestra) de sobrenadante en placa # 1 en Placa # 2.
21. Aplique cinta de sellado de la placa # 2 y centrifugar a temperatura ambiente durante 6 minutos a 4500 x g.
22. Retire con cuidado la cinta de sellado de la placa # 2 y # 3 Placa. Evitar el pellet, transferir todo el volumen de sobrenadante (~ 600 l) de la placa # 2 a la placa # 3 y la pipeta hacia arriba y abajo 4 veces.
23. Vuelva a aplicar la cinta de sellado de la placa # 3. Incubar a 4 ° C durante 10 minutos. Centrifugar a temperatura ambiente durante 6 minutos a 4500 x g.
24. Retire con cuidado y deseche la cinta de sellado de la placa # 3. Evitar el pellet, transferir todo el volumen de sobrenadante (~ 750 l) para la placa # 4.
25. Aplique cinta de sellado de la placa # 4 y centrifugar a temperatura ambiente durante 6 minutos a 4500 x g. Aunque la centrifugación, añadir 650 l de solución de C4 a la placa # 5.
26. Evitar cualquier pellet residual, transferir hasta 650 l de sobrenadante en placa # 4 a la placa # 5.
27. Añadir una segunda 650 l (1.300 l total de C4) alícuota de la solución de C4 a cada pocillo de la placa # 5.
Nota: Es seguro dejar el protocolo en este paso y almacenar las muestras cubiertas con cinta de sellado a 4 ° C. Asegúrese de centrifugar brevemente la placa para recoger el condensado en la junta de la placa después del almacenamiento durante la noche.
28. Muestras de pipetas "de arriba abajo" para mezclar.
29. Coloque la vuelta a la placa mural # 6.
30. Carga aproximadamente 650 l de la placa # 5 en cada pocillo de la placa de centrifugado y aplicar Centrífuga cinta.
31. Centrifugar a temperatura ambiente durante 5 minutos a 4500 x g. Deseche el filtrado y coloque la placa de centrifugado de nuevo en la placa # 6. Retire con cuidado y deseche la cinta centrífuga.
32. Repetir los pasos 23-24 hasta que todo el sobrenadante ha sido procesado. Deseche el flujo final a través de.
33. Coloque la placa de centrifugado de nuevo en la placa # 6.
34. **Confirmar que el etanol ha sido añadido a la solución de C5-D (ver paso 1).** Añadir 500 l de solución de C5-D a cada pocillo de la placa de centrifugado. Aplicar Centrífuga Cinta para Spin Placa..
35. Centrifugar a temperatura ambiente durante 5 minutos a 4500 x g. Deseche el filtrado y coloque la placa de centrifugado de nuevo en la placa # 6.
36. Centrifugar de nuevo a temperatura ambiente durante 6 minutos a 4500 x g. Deseche el flujo a través.
37. Coloque con cuidado la placa de centrifugado en la microplaca. Retire Centrífuga Cinta de Spin Placa y desechar.
38. Añadir 100 microlitros de solución de C6 a el centro de cada pocillo de la placa de centrifugado. Aplicar Centrífuga cinta. Vamos C6 se sientan

en el filtro durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de la centrifugación final.

39. Centrifugar a temperatura ambiente durante 7 minutos a 4.500 x g. Quite y deseche la cinta centrífuga.
40. Pozos portada de microplacas con la elución Sellado Mat siempre. ADN está listo para cualquier aplicación aguas abajo. No se requieren más pasos.

El almacenamiento prolongado a 4 ° C dará como resultado la evaporación de ADN eluido. Se recomienda almacenar el ADN congelado (-20 ° C o -80 ° C). Solución C6 no contiene EDTA. Para concentrar el ADN ver los Consejos y Guía de solución previstos en el protocolo MoBio.

Consideraciones importantes

1. Consejos normales diámetro de 1 ml de pipeta son demasiado grandes para algunos de los pasos de pipeteado. Para solucionar este problema se utiliza un Rainin 300 ul de 8 canales con puntas con filtro (Rainin # SR-L300F) y un ul 8 canales Rainin 1000 con puntas con filtro de longitud ampliada (Rainin # RTS-L1000XF).
2. Asegúrese de que todos los consumibles y reactivos necesarios están en su lugar antes de empezar la extracción. Recuerde que cada paso de pipeteo requerirá 1 caja de 96 puntas por placa.
3. Utilizamos depósitos de reactivos envueltos individualmente y exponerlos a la luz ultravioleta durante 30 minutos antes de su uso.
4. En el paso 7, es importante que la placa no roce contra ninguna superficie en la coctelera.
5. Asegúrese de que la rejilla de alfa-numérico está en la misma orientación a través de todas las placas. En algunas ocasiones nos hemos dado cuenta de que la etiqueta no está siempre en la misma posición en el plato.

Anexo N° 5

ILLUMINA PCR CONDICIONES: REGIÓN-515F 806R DEL GEN 16S RNA

Protocolo de reactivo completo (mezcla maestra) para la reacción de PCR 1X

PCR Grado H2O (nota 1, a continuación)	13,0 l
5 Primer Hot MM (nota 2, a continuación)	10,0 l
Cebador directo (10 μ M)	0.5 l
Cebador inverso (10 μ M)	0.5 l
Plantilla de ADN	1.0 l
Volumen total de reacción	25,0 l

Notas:

1. Agua grado PCR fue adquirido de MoBio Laboratorios (MoBio. Labs: Artículo # 17000-11)
2. Cinco Prime Hot Master Mix (5 prime: Artículo # 2200410)
3. Primer concentración final de mezcla de reacción: 0,2 M

Termociclador Condiciones para 96 termocicladores así:

1. 94 ° C 3 minutos
2. 94 ° C 45 segundos
3. 50 ° C 60 segundos
4. 72 ° C 90 segundos
5. Repita los pasos 2-4 35 veces
6. 72 ° C 10 minutos
7. 4 ° C ESPERA

Termociclador Condiciones para 384 termocicladores así:

1. 94 ° 3 minutos C
2. 94 ° C 60 segundos
3. 50 ° C 60 segundos
4. 72 ° C 105 segundos
5. Repita los pasos 2-4 35 veces
6. 72 ° C 10 minutos
7. 4 ° C ESPERA

Protocolo:

1. Amplificar las muestras por triplicado, es decir, cada muestra se amplifica en 3 replicados 25 reacciones de PCR I.
2. Combinar las reacciones de PCR por triplicado para cada muestra en un solo volumen. Combinación resultará en un total de 75 l de ampliación para cada muestra. No combine ampliaciones de diferentes muestras en este punto.

3. Ejecutar ampliaciones para cada muestra en un gel de agarosa. Tamaño de la banda prevista para 515f/806r es aproximadamente 300-350 pb. (pares de bases).
4. Cuantificar los amplificados con Pico Green (ver protocolo de los fabricantes; Invitrogen Artículo # P11496).
5. Combinar una cantidad igual de ampliación de cada muestra en un solo tubo, estéril. Generalmente 240 ng de ADN por muestra se agrupan. Sin embargo, cantidades más altas pueden ser utilizados si la piscina final será aisló en gel o cuando se trabaja con muestras de baja de biomasa. (*Nota: Cuando se trabaja con múltiples placas de muestras, que es típico para producir un solo tubo de ampliaciones para cada placa de muestras.*)
6. Clean pool Ampliación usando MoBio UltraClean PCR Clean-Up Kit # 12500 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Si se trabaja con más de 96 muestras, puede necesitar ser divididos en partes iguales para la limpieza y luego recombinada la piscina. (*Opcional: Si bandas espurias estaban presentes en gel (en el paso 3), la mitad de la mezcla final se puede ejecutar en un gel y luego extraídas del gel para seleccionar sólo las bandas de destino*)
7. Medida de concentración y 260/280, de grupo final que se ha limpiado. Para obtener los mejores resultados, el 260/280 debe estar entre 1,8 a 2,0.
8. Enviar una alícuota para la secuenciación junto con cebadores de secuenciación se enumeran a continuación.

IMPORTANTE: Secuenciación requiere el uso de 16S y cebadores de secuenciación índice.

Anexo N°6

CONSENTIMIENTO INFORMADO TRATAMIENTO DE CHAGAS

MINISTERIO DE SALUD
Y DEPORTES

**UNIDAD DE EPIDEMIOLOGIA
PROGRAMA NACIONAL DE CHAGAS
SERVICIO DEPARTAMENTAL DE SALUD**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO
PARA TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**

He sido informado(a), por el Personal de Salud que mi hijo(a).....
..... nacido(a) en fecha
..... años de edad, que tiene la enfermedad de Chagas y es necesario su tratamiento.
El referido personal me informo sobre las consecuencias negativas a largo plazo de esta
enfermedad, que se pueden presentar en la salud de mi hijo(a), y que debe realizarse
tratamiento con el medicamento benznidazol, a ser suministrado en forma gratuita,
comprometiéndome formalmente a vigilar que mi hijo(a) reciba las tabletas durante los
sesenta días de tratamiento.

Asimismo declaro, que el personal de salud también me ha informado sobre los posibles
efectos no deseados del medicamento. Por lo que, al aceptar el tratamiento a ser
suministrado

mi hijo(a), manifiesto que asumiré mi responsabilidad en caso de presentarse en mi
hijo(a) algún tipo de molestia o de efectos adversos.

igual manera, me comprometo a acudir con mi niño(a) a los controles cada 7 días
convenidos en la tarjeta de seguimiento y en cualquier momento al Centro de Salud,
para

recibir consejería, si es que presentare algún tipo de molestia o efecto adverso.

Por lo expuesto, a través del presente documento, declaro y manifiesto, en pleno uso de
mis facultades, libre y espontáneamente **DAR MI CONSENTIMIENTO Y
AUTORIZO**

personal de salud a realizar el tratamiento pertinente.

señal de conformidad firman:

Madre/Padre/Responsable del niño/a

Médico Responsable de tratamiento

Firma: _____

Firma: _____

Nombre: _____

Sello/Nombre _____ y

Cargo: _____

I./RUN: _____

C.I./RUN: __-

Localidad: _____ día: _____ mes: _____ de 200 _____

Anexo N°7

TARJETA DE SEGUIMIENTO AL TRATAMIENTO DE CHAGAS



MINISTERIO DE SALUD Y DEPORTES
 PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE CHAGAS
 SERVICIO DEPARTAMENTAL DE SALUD

TARJETA DE TRATAMIENTO
 PARA INCLUIR EN LA HISTORIA CLÍNICA

Código	Personal de salud Nombre	Centro de Salud
Nombre del niño(a):	Peso:	
Fecha de nacimiento:	Edad:	Comunidad:

Fecha de inicio del tratamiento:	Fecha de finalización:
¿Cumplió 60 días de tratamiento?:	Si No

Dosis: Calculada:	Mañana <input type="checkbox"/>	Noche <input type="checkbox"/>	Nombre del médico que prescribe
----------------------	---------------------------------	--------------------------------	---------------------------------

Día	Toma de la mañana	Toma de la noche	Problemas	Día	Toma de la mañana	Toma de la noche	Problemas
1				1			
2				2			
3				3			
4				4			
5				5			
6				6			
7				7			
8				8			
9				9			
10				10			
11				11			
12				12			
13				13			
14				14			
15				15			
16				16			
17				17			
18				18			
19				19			
20				20			
21				21			
22				22			
23				23			
24				24			
25				25			
26				26			
27				27			
28				28			
29				29			
30				30			