

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

**DETECCIÓN DE MICROSPORIDIOS EN MUESTRAS DE HECES
PRESERVADAS EN CONGELACIÓN POR TÉCNICAS DE
TINCIÓN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

Informe final de Tesis

Presentado por:

Yulma Carina Espina Sandoval

Para optar al título de

Química Bióloga

Guatemala, mayo de 2002

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

DL

06

T(600)

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS Y FARMACIA**

DECANA LICDA. HADA MARIETA ALVARADO BETETA

SECRETARIO LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA

VOCAL I DR. OSCAR MANUEL COBAR PINTO

VOCAL II DR. RUBEN DARIEL VELÁSQUEZ MIRANDA

VOCAL III DR. FEDERICO ADOLFO RICHTER MARTINEZ

VOCAL IV BR. JORGE JOSE GARCIA POLO

VOCAL V BR. LIZA LEONOR CARRANZA JUI

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

ACTO QUE DEDICO

- A DIOS: Por darme el don de la vida y acompañarme en ella.
- A MIS PADRES: Irma Esperanza y Jorge Armando por su esfuerzo, y apoyo incondicional
- A MIS HERMANOS: En especial a Vinicio por el cariño de siempre
- A MI ESPOSO: Héctor Hugo por su esmero en hacerme feliz cada día
- A MI CUÑADA: Fabiola por sus consejos
- A MI SOBRINA: María Alejandra por su ternura
- A MIS ABUELOS: Marta Luz, José Raúl (+), Adrián (+) y Mariana(+)
- A MIS TÍOS: Por su cariño
- A MIS PRIMOS: Por su compañía
- A MIS AMIGOS: Ligia, Marielos, Sergio, Omar, Boris y Osberth, por los momentos compartidos.
- A MIS PADRINOS: Ing. Romeo Espina y Lic. Héctor Rodríguez por su apoyo

AGRADECIMIENTOS

A La Universidad de San Carlos de Guatemala

A La Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

A La Escuela de Química Biológica

A todo el Personal Profesional y Técnico del Laboratorio de Microbiología y Virología "Dr. Leonardo Mata" del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) en especial a Claudia Mérida, Teresa Véliz, Esperanza de Bran, Luis Rodríguez, Faustina Leiva y Evelyn Piedrasanta por todo su apoyo y amistad

A la Licda. Olga Torres por compartir sus conocimientos

Al Lic. Rafael Pratdesaba por su asesoría, orientación y amistad

A la Dra. Elizabeth Didier del Centro de Investigaciones de Primates de la Universidad de Tulane en Covington, Lousiana y al Dr. Palmer Orlandi del Centro de Inocuidad de Alimentos y Nutrición Aplicada (CFSAN) de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de Estados Unidos de Norte América por todo su apoyo y asesoría

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACYT) por el apoyo financiero a esta investigación, a través del Proyecto FODECYT 59-98

INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
III.	ANTECEDENTES	3
	A. Generalidades	3
	B. Agente Etiológico	3
	C. Manifestaciones Clínicas	5
	D. Diagnóstico de Laboratorio	6
	D.1 Microscopía Electrónica de Transmisión	7
	D.2 Microscopía de Luz y Fluorescencia	7
	D.3 Cultivo Celular	8
	D.4 Serología	8
	D.5 Técnicas Moleculares	9
	E. Epidemiología	11
	F. Tratamiento	14
IV.	JUSTIFICACIÓN	15
V.	OBJETIVOS	16
VI.	HIPÓTESIS	17
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
VIII.	DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	25
IX.	RESULTADOS	26
X.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	27
XI.	CONCLUSIONES	30

XII. RECOMENDACIONES	31
XIII. BIBLIOGRAFÍA	32
XIV. ANEXOS	39

I. RESUMEN

Con el apareamiento de la pandemia del Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), se ha hecho necesario profundizar en el diagnóstico de agentes causales de enfermedades que normalmente no atacan al hospedero inmunocompetente. Entre estos agentes se encuentran los parásitos protozoos intracelulares obligados denominados microsporidios, los cuales producen una diarrea severa en los pacientes con SIDA o que padecen cualquier otro tipo de inmunosupresión. La microsporidiosis es considerada una enfermedad emergente verdadera, ya que la infección tomó auge a mediados de los años ochenta, por la pandemia del SIDA.

El estudio pretende dar información acerca de la presencia de microsporidios como agentes causales de diarrea en la población de niños desnutridos de la población de Santa María de Jesús a finales de los años ochenta, cuando la microsporidiosis era una enfermedad importante de diarrea en pacientes inmunosupresos.

Se analizaron 100 muestras de heces preservadas en congelación desde 1987 de una población de infantes de 0-3 años, utilizada en un estudio prospectivo longitudinal para determinar la epidemiología de diarrea persistente en estos niños.

Las técnicas de tinción empleadas para el análisis de las muestras fueron las siguientes: la tinción tricrómica modificada que permite observar los parásitos de color rojo, y el método de fluorescencia calcofluor blanco, con el cual las esporas se identifican por una coloración azul. Para detectar el ADN de los parásitos se utilizó el método molecular de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por filtros FTA (MR), los cuales rompen la espora y atrapan el ADN, el cual es purificado con soluciones de lavado, previo a su detección.

En ninguna de las muestras analizadas se determinó la presencia de microsporidios, con esto puede inferirse que estos parásitos no estaban presentes en la población en ese año, por lo cual no pueden considerarse como agentes causales de diarrea en la población analizada.

II. INTRODUCCION

La aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA) ha permitido conocer organismos que anteriormente no eran considerados patógenos para el ser humano. Actualmente se sabe que los pacientes que padecen inmunosupresión están más propensos a desarrollar enfermedades gastrointestinales, como la diarrea, la cual puede ser causada por microorganismos que normalmente se encuentran ubicuos en la naturaleza.

En las últimas décadas se han documentado muchos casos de diarrea causada por los parásitos intracelulares obligados llamados microsporidios, pertenecientes al phylum *Microspora* (1-3). Esta enfermedad se transmite principalmente por vía feco-oral y uro-oral y es la responsable del 10-30 por ciento de las diarreas en pacientes con SIDA (4, 5). Inicialmente se pensaba que estos organismos eran exclusivos de pacientes con SIDA, pero en los últimos años se han reportado casos de diarreas en pacientes inmunocompetentes o con otro tipo de inmunosupresión (6-9).

La microsporidiosis es considerada una enfermedad emergente verdadera, sin embargo en Guatemala no hay estudios epidemiológicos que lo demuestren y se desconoce si este parásito ha sido introducido en nuestra población.

Guatemala es un país con alto índice de fecalismo ambiental por lo cual existe gran posibilidad que estos parásitos estén presentes. Este estudio pretende brindar información epidemiológica acerca de la presencia de microsporidios en Guatemala hace dos décadas, cuando se reportaron los primeros casos de la enfermedad a nivel mundial. Para la investigación se utilizaron muestras de heces preservadas en congelación de una población de 321 niños de 0-3 años residentes en la aldea de Santa María de Jesús en el departamento de Sacatepéquez, las cuales fueron utilizadas en un estudio prospectivo longitudinal de dos años (1987-1989) para determinar la epidemiología de diarrea persistente (10). La determinación de microsporidios en las muestras heces se realizó por métodos de tinción y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades

El Reino Protista propuesto por Haeckel agrupa a una gran diversidad de microorganismos unicelulares eucarióticos. Incluye el Subreino *Protozoa* (protozoos o protozoarios), dentro del cual se incluyen cuatro phyla *Sarcomastigophora* (amebas y flagelados), *Ciliophora* (ciliados), *Apicomplexa* y *Microspora* (microsporidios) (11).

El término "microsporidios fue utilizado por primera vez por Balbiani en 1882 (12). Posteriormente la taxonomía de los microsporidios fue sujeta a muchas modificaciones. Larsson (13) propuso un sistema de clasificación, basado en las diferencias de la morfología ultraestructural de los parásitos, muchos caracteres fueron subdivididos en categorías bien definidas, creando así tres grupos representantes de la filogenia de los microsporidios. Weiser (14) basó su clasificación solamente en la condición nuclear de las esporas (un núcleo Pleistophorida o 2 núcleos Nosematidida). La clasificación propuesta por Sprague en 1977, es la más utilizada hasta la fecha. En este esquema, los microsporidios son divididos en dos grupos, basados en la presencia o ausencia de la membrana circundante del parásito: el grupo Pansporoblastina (membrana presente) y el Apansporoblastina (membrana ausente) (15). En sistemas desarrollados durante la última década, parece ser que las diferencias en los ciclos de los cromosomas constituyen la base fundamental para distinguir la taxonomía de los microsporidios al más alto nivel (16, 17).

La secuencia nucleotídica de la pequeña subunidad (SSU) del RNA ribosomal del microsporidio *Vairimorpha necatrix* sugiere que los microsporidios son eucariotas sumamente antiguos (18); sin embargo, las secuencias de Alfa y Beta-tubulina, sugieren que existe una gran similitud entre los microsporidios y los hongos (19).

B. Agente Etiológico

La microsporidiosis es causada por organismos protozoos intracelulares obligados, llamados microsporidios, los cuales fueron descritos por primera vez en 1857 como patógeno de gusanos de seda (20). Estos organismos pertenecen al phylum *Microspora* en el cual se incluyen más de 100 géneros con 1,000 especies o más, de los cuales 6 géneros se reconocen actualmente como patógenos para el

humano (*Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Nosema*, *Vittaforma*, *Pleistophora* y *Trachiplestophora*). Los microsporidios se caracterizan por tener un ciclo de vida único que involucra un estado proliferativo merogónico, seguido por otro esporogónico que resulta en la producción de esporas infectivas; se multiplican por fisión binaria, tienen membrana nuclear y carecen de mitocondria y aparato de Golgi por lo que son parásitos intracelulares (20- 22).

B.1. Morfología y Ciclo de Vida

B.1.a Espora: Es el estado infectivo del parásito; las esporas que infectan humanos son muy pequeñas, miden de 2.0-7.0 μm de largo por 1.5-5.0 μm de ancho, son de forma oval o piriforme y poseen una pared gruesa, compuesta de 3 capas: 1) una capa externa electrodensa llamada exospora compuesta de proteínas, 2) una capa transparente interior, la endospora, la cual está compuesta de quitina y 3) una membrana plasmática que rodea el citoplasma. También posee el núcleo (que algunas veces pueden ser dos), una vacuola posterior, membranas polaroplásmicas, y un único aparato de extrusión. El aparato de extrusión es la característica que distingue a los microsporidios de otros organismos; este consiste en un filamento polar enrollado y un disco de anclaje. El número y arreglo de los enrollados del filamento polar varía entre género y especies. En condiciones apropiadas el contenido infectivo, el esporoplasma, es inoculado dentro de la célula por medio del filamento polar, dando inicio a la infección. Los organismos pueden internalizarse por fagocitosis y los macrófagos fácilmente pueden infectarse con ellos (20-22).

B.1.a.1 Merogonia: Dentro de la célula hospedera el esporoplasma liberado de la espora, da lugar a la formación de merontes, los cuales son células simples de forma redondeada, irregular o elongada, con un pequeño citoplasma diferenciado, rodeado por la membrana plasmática. Esta fase es llamada merogonia. La división del parásito puede ser por fisión binaria (*Encephalitozoon*, *Nosemma*, *Vittaforma*) o por cariocinesis, dando lugar a la formación de formas plasmodiales multinucleadas (*Enterocytozoon*, *Pleistophora* y *Trachiplestophora*). La merogonia también puede llevarse a cabo en contacto directo con el citoplasma de la célula hospedera (*Nosema*,

Enterocytozoon) o sin contacto directo por medio de una vacuola pasitófora (*Encephalitozoon*) (20-22).

B.1.a.2 Esporogonia: Los merontes se desarrollan a esporontes, los cuales se caracterizan por tener una superficie densa, la que se convierte en la exospora de los parásitos. Los esporontes se multiplican por fisión binaria o múltiple, dando lugar a formación de esporoblastos que desarrollan a esporas maduras, las cuales son liberadas para infectar las células o pueden diseminarse a través de los macrófagos. Las esporas se excretan por las heces, orina o secreciones respiratorias dependiendo del sitio de infección (20-22).

C. Manifestaciones Clínicas:

La microsporidiosis es una infección con un amplio espectro de manifestaciones, las cuales incluyen infección gastrointestinal, pulmonar, nasal, ocular, muscular, cerebral y sistémica (1, 3, 6).

La enfermedad más común causada por estos parásitos es la diarrea, y es producida frecuentemente por *Enterocytozoon bienewisi*, especialmente en pacientes con SIDA con el conteo de linfocitos CD4 menores a 100 cel/ul. La microsporidiosis ha sido reportada en un 39 por ciento de pacientes con SIDA que presentan diarrea crónica (5, 23, 24). La diarrea producida por este parásito es severa, sin sangre ni moco con 10 o más evacuaciones por día, pérdida de peso progresiva, mala absorción de grasa, de D-xylosa y Vitamina B 12 (2, 25, 26). Originalmente se pensaba que la microsporidiosis causada por *E. bienewisi* era exclusiva de pacientes con SIDA, pero la infección intestinal también se ha sido reportada en pacientes sin infección por VIH (6-9). La infección por *E. bienewisi* también ha sido reportada en pacientes con criptosporidiosis (27), con colangitis esclerosante (28), y con infección bronqueoalveolar en pacientes con SIDA (29, 30).

Los microsporidios también pueden diseminarse y causar infección sistémica. Los miembros de género *Encephalitozoon* que incluyen *E. cuniculi*, *E. hellem* y *E. intestinalis* son los que más producen este tipo de infecciones,

especialmente en pacientes con inmunosupresión severa como pacientes con SIDA (4).

El espectro de enfermedades es amplio, incluyen conjuntivitis, bronquitis, neumonía, sinusitis, nefritis, uretritis, cistitis, prostatitis, hepatitis, peritonitis, gastroenteritis; pero existen diferencias claras en los patrones de distribución de cada especie de microsporidios. *E. hellem* produce principalmente la conjuntiva, tracto urinario, senos nasales y sistema bronquial principalmente (31-35). *E. hellem* se disemina al tracto gastrointestinal, biliar y algunas veces al tracto respiratorio (36,37) y finalmente *E. cuniculi* causa infección en todos los sistemas del organismo (38, 39).

Con menor frecuencia se ha encontrado a *E. bienewisi* causando infección diseminada (40). La microsporidiosis ocular también es producida por *Nosema comeum*, aunque con menor frecuencia (41, 42).

D. Diagnóstico de Laboratorio:

El diagnóstico de la microsporidiosis humana ha sido difícil, debido al pequeño tamaño de las esporas que infectan a los humanos. Depende de la identificación de las esporas en muestras clínicas, como muestras de heces, biopsias duodenales, líquido biliar, orina, frotis de conjuntiva, fluidos bronqueoalveolares, nasales, esputo, biopsias de tejido. Originalmente, el diagnóstico definitivo de la microsporidiosis se realizaba por microscopía electrónica de transmisión (TEM), la cual se basa en la detección de esporas en muestras de biopsia de tejido. En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas de tinción y métodos fluorescentes, que por medio de microscopía de luz y fluorescencia respectivamente, permiten detectar las esporas de los parásitos en muestras de fluidos corporales, evitando así procesos invasivos para obtener las muestras; sin embargo con estas técnicas no es posible determinar género y especie de los organismos presentes (43).

También se han desarrollado métodos serológicos, para detectar anticuerpos de microsporidios, pero poseen poca sensibilidad y especificidad. Los métodos de cultivos celulares han sido utilizados, pero esta no es una técnica de rutina. Recientemente se desarrollaron técnicas moleculares que por medio de la detección

por amplificación de la secuencia nucleotídica permiten detectar los microsporidios en cualquier espécimen y determinan género y especies de los organismos, las cuales también son técnicas altamente sensibles y específicas (43, 44).

D.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La Microscopía Electrónica de Transmisión fue la primera técnica utilizada para el diagnóstico de la microsporidiosis humana, esta se basa en la observación directa de las características ultraestructurales del parásito (forma y tamaño de la espora, configuración del túbulo polar, ciclo de vida, etc.) en muestra de biopsia y fluidos corporales (orina, aspirados sinusales, bilis o fluido cerebroespinal, heces). Este método ha sido de mucha utilidad para determinar género y especie de estos protozoos, y es altamente sensible cuando se aplica en muestras de biopsia; sin embargo, es sumamente laborioso, consume mucho tiempo y se requiere de equipo especial y de personal altamente especializado para la observación de las muestras. (36, 45-47).

D.2 Microscopía de luz y fluorescencia

En los últimos años se han desarrollado técnicas de tinción y métodos fluorescentes, que por medio de microscopía de luz y fluorescencia respectivamente, permiten detectar las esporas de los parásitos en muestras de fluidos corporales, evitando así procesos invasivos para obtener las muestras de biopsias de tejido. Sin embargo, con estas técnicas no es posible determinar género y especie, ya que solamente se observa la fase infectiva del parásito (48,50). Existe una variedad de métodos como la tinción de Gram-Chromotrope propuesta por Moura *et al* (49), en la cual los parásitos se tiñen de azul violeta con un fondo verde, y el tiempo total de tinción es de 5 min. La modificación que Weber realizó a la tinción tricrómica ha permitido una mejor identificación de los parásitos; en este método las esporas se observan de un color rojo-rosado, y las bacterias son fácilmente diferenciadas, sin embargo, el tiempo de tinción es de aproximadamente de 120 minutos (50). En 1994, Kokoskin propuso una modificación a la técnica propuesta por Weber, utilizando cambios de en la temperatura, reduciendo así el tiempo de tinción a 40 minutos brindando una coloración más intensa de las esporas en menor tiempo (51).

Las técnicas de fluorescencia también se utilizan para el diagnóstico de la infección; estas utilizan colorante luminosos como Calcofluor White o Uvitex 2B, que permiten detectar más rápida y fácilmente los parásitos en frotis de muestras cuando se observan en un microscopio de fluorescencia. Didier *et al* (52) compararon recientemente las tinciones tricrómica modificada, calcofluor White y anticuerpos monoclonales fluorescentes y encontraron que esta última es la menos sensible para detectar las esporas en muestras de heces, orina y lavados duodenales. En este estudio propusieron tamizar primero con calcofluor y luego confirmar las muestras positivas con la tinción tricrómica modificada, ya que se ha comprobado que muchas veces con la tinción de calcofluor las esporas pueden confundirse con levaduras. Así mismo, Ignatus *et al*, realizaron una comparación entre la tinción tricrómica modificada y el método Uvitex 2B para detectar números bajos de esporas de microsporidios en muestras de heces; en el estudio concluyeron que ambos métodos poseen sensibilidades y especificidades similares, por lo que pueden utilizarse como técnicas de rutina en el laboratorio (53). A pesar de esto, estas tinciones no permiten determinar género y especie de los parásitos presentes en las muestras analizadas.

D.3 Cultivo Celular

Los microsporidios han sido aislados de una variedad de especímenes y cultivados en una gran variedad de líneas celulares incluyendo células de mono y conejo (Vero y RK13), fibroblastos de riñón de feto humano (MRC-5) y otras líneas celulares (54, 55). *E. hellem*, *E. intestinalis* y *V. corneae* han sido aislados de muestras humanas y mantenido en cultivos continuos (56). Recientemente, *E. bienewisi* se cultivo *in vitro* por un período corto de 6 meses (57). Realizar el diagnóstico de microsporidiosis en cultivos celulares es laborioso, caro y lento y propenso al fallo con muestras obtenidas de sitios no estériles, por lo cual no se recomienda como técnica rutinaria para el diagnóstico de microsporidiosis (54).

D.4 Serología

Los ensayos serológicos utilizados para detectar microsporidios en suero humano incluyen: inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, ELISA y Western Blot (41, 58- 60). La sensibilidad y especificidad de estos métodos para detectar anticuerpos

contra microsporidios son desconocidas, ya que no se han reportado estudios comparativos. Ciertos estudios han demostrado incremento en el índice de seropositividad para *E. cuniculi* en personas que viven en regiones tropicales y que padecen enfermedades tropicales (58). Estudios realizados para detectar anticuerpos contra microsporidios en pacientes infectados y no infectados con VIH demuestran que los pacientes con SIDA pueden montar una respuesta inmune a la infección por microsporidios; sin embargo, los métodos serológicos no son útiles como herramientas diagnósticas, porque en estos estudios han encontrado que por lo menos la mitad de los sueros de personas sin historial de microsporidiosis han dado títulos positivos (41, 59).

D.5 Técnicas Moleculares

La caracterización del genoma del microsporidio se ha enfocado a la pequeña subunidad del gen del RNA ribosomal (SSU-rRNA) de *Vairimorpha necatrix* (61). La amplificación utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con cebadores (primers) complementarios con secuencias conservadas del gen SSU-rRNA ha sido utilizada para generar información de la secuencia de los microsporidios que infectan humanos. La secuencia de genes de SSUrRNA ha sido publicada para *E. cuniculi*, *E. hellem* (62, 63) *E. intestinalis* (64) y *E. bienusi* (65).

En los últimos años, la técnica de PCR ha sido utilizada como herramienta diagnóstica para determinar de una manera rápida y segura el género y especie de microsporidios patógenos para el ser humano. Además de ser una técnica altamente sensible y específica, tiene la ventaja de evitar adquirir especímenes por procedimientos invasivos, permitiendo utilizar muestras de fluidos humanos, como heces, orina, secreciones nasales etc. (43). Por medio de técnicas moleculares se ha podido confirmar la existencia de diferentes cepas de *E. cuniculi* (55), determinar la correcta ubicación taxonómica de *E. intestinalis* llamado antes *Septata intestinalis* (64).

El método de PCR es utilizado para detectar microsporidios en muestras de heces, Fedorko *et al.* realizaron un estudio para determinar la presencia de esporas de microsporidios en muestras de heces, utilizando los primers

PMP1(5-CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC-3') y PMP2 (5-CCTCTCCGGAACCAAACCTG-3') e identificaron especies de *Encephalitozoon* y *E. bieneusi* (66). Estos primers son aparentemente universales, pero es necesario evaluar su habilidad para amplificar el ADN microsporidial en un amplio rango de muestras clínicas. Didier *et al* (67) han utilizado primers pan-*Encephalitozoon* (int530f 5-TGCAGTTAAAATGTCCGTAGT-3') (int580r 5-TTCACTCGCCGCTACTCAG-3') que amplifican un producto aproximado de 1,000 pares de bases de longitud. Estas secuencias amplifican con éxito el ADN de *E. hellem* en muestras de orina y conjuntiva de pacientes con SIDA. Una propuesta eficiente para la detección molecular de los microsporidios en muestras de pacientes, podría ser el uso de primers universales o pan-microsporidios, y determinar las especies con primers especie-específicos (67).

La extracción de ADN de organismos cultivados y muestras de biopsia es sencilla, pero en muestras de heces se dificulta, por lo que es necesario emplear métodos severos de rupturas químicas y mecánicas para extraer el ADN de las esporas. Otro problema de la utilización de PCR en muestras de heces es la presencia de inhibidores, que afectan la efectividad de la Taq polimerasa (44). Recientemente, Palmer Orlandi y Keith Lampel (68) realizaron un estudio para determinar parásitos protozoos patógenos por medio de PCR, el cual se basa en una extracción libre de ADN a través de filtros. Estos están impregnados con agentes desnaturalizantes, quelantes y trampas de radicales libres, los cuales causan lisis celular al contacto con el filtro, secuestran el ADN dentro de la matriz y los remanentes celulares, el debris y otros factores que interfieren con el PCR son removidos efectivamente con soluciones de lavado. La preparación de la muestra es rápida, eficiente y reproducible, requiere sólo una concentración mínima de la muestra y es altamente sensible, detectando de 3-10 esporas por 100 ul de muestra. Este protocolo puede ser adaptado fácilmente para la detección de microsporidios en cualquier tipo de muestras (68).

La aplicación de técnicas moleculares para el diagnóstico de microsporidios está iniciándose y no hay publicaciones donde se comparen PCR con otros métodos para determinar realmente la sensibilidad y especificidad de esta técnica. El potencial del PCR para identificar especies de microsporidios en muestras no invasivas hace de esta una opción atractiva para el diagnóstico. Sin embargo, el PCR puede utilizarse para la detección y especiación de microsporidios en muestras de pacientes, utilizándose primero un tamizaje de los parásitos con técnicas quimiofluorescente como Calcofluor, confirmando con la tinción tricrómica modificada, seguida de la confirmación con especiación por PCR (43).

E. Epidemiología

Históricamente estos parásitos se han descrito como agentes patógenos en invertebrados, el primer caso de microsporidiosis fue descrito en 1857 en gusanos de seda; desde entonces estos parásitos han sido responsables de grandes pérdidas económicas en la industria del salmón, gusano de seda y abejas, aunque también han sido benéficos como agentes de control biológico en algunas plagas causadas por saltamontes y cigarras (1).

El primer caso de microsporidiosis humano fue reportado en 1959 y desde entonces sólo se habían documentado casos esporádicos de esta infección, hasta 1985 cuando fue encontrada una nueva especie, *Enterocytozoon bieneusi*, como causante de infección en un paciente francés con SIDA (5, 20). Desde entonces, y debido la pandemia de SIDA muchas infecciones por microsporidios han sido documentadas alrededor del mundo. En la actualidad estos parásitos son reconocidos como agentes patógenos comunes en pacientes infectados con HIV (2, 23-26, 28-41, 60). Originalmente se pensaba que estos parásitos eran patógenos oportunistas exclusivos de pacientes con SIDA, pero recientemente se han documentado casos de microsporidiosis en pacientes inmunocompetentes (6-9).

Estos parásitos son ubicuos en la naturaleza y se encuentran distribuidos alrededor del mundo. Muchas especies que infectan humanos también pueden

infectar animales, incluyendo pericas, perros domésticos, conejos y monos *rhesus* (20).

La prevalencia de la microsporidiosis intestinal entre pacientes infectados con VIH se encuentra en un rango del 10-30 por ciento, y es causada principalmente por *E. bienewisi* (3, 7). Estudios recientes indican que *E. bienewisi* también puede producir diarrea en pacientes inmunocompetentes, como el caso documentado de un paciente viajero no infectado con HIV y que presentó diarrea aguda autolimitante causada por este parásito (7). Bretagne *et al.* realizaron un estudio en 1993 para determinar la prevalencia de esporas en infantes africanos sin infección por HIV y encontraron 8 casos positivos de 990 estudiados (0.88 %) (8).

Un estudio realizado recientemente en Guatemala sobre la prevalencia de microsporidios en pacientes con SIDA que acuden al Hospital Roosevelt, indica que estos parásitos son causantes del 1 por ciento de diarrea en esta población (70).

Los datos de prevalencia sobre microsporidiosis diseminada en pacientes infectados con VIH son desconocidos, pero se han reportado casos de este tipo de infección producida principalmente por *E. cuniculi* (38, 39). Otro tipo de patologías que producen los microsporidios incluye la keratoconjuntivitis en pacientes con SIDA producida por *E. hellem* (31, 35) y microsporidiosis ocular producida por especies de los géneros *Nosema* y *Vittaforma* (4, 42).

La microsporidiosis es una infección que se transmite principalmente por vía feco-oral, las esporas son excretadas en las heces de las personas infectadas, esta infección produce una diarrea severa que puede durar varios días o semanas (1).

En Guatemala las enfermedades diarreicas afectan principalmente a los niños que viven en áreas marginales, donde no cuentan con necesidades básicas como los son el agua, vestuario, vivienda, servicios sanitarios. Estos factores junto con una alimentación escasa e inadecuada y poca higiene producen deficiencias nutricionales y por lo mismo los hace ser más propensos a padecer enfermedades intestinales con frecuencia (10).

F. Tratamiento

El albendazol es la droga más utilizada para el tratamiento de infecciones de varias especies de microsporidios. Este medicamento actúa como inhibidor del microtúbulo (tubulina), se administra en dosis de 400 mg/kg de peso por 2 a 4 semanas, aunque se ha reportado que tiene poco efecto contra las infecciones causadas por *E. bienewisi* (74, 75). La fumagalina un antibiótico derivado del *Aspergillus fumigatus*, interfiere en la síntesis de proteínas, siendo altamente efectiva contra las infecciones por microsporidios y se utiliza en forma tópica en infecciones oculares causadas por especies de *Encephalitozoon* (74, 76). El uso oral de la fumagalina en infecciones sistémicas es sumamente tóxico y puede causar trombocitopenia severa, por lo que su uso ha sido discontinuado (77). Un análogo de la fumagalina, el TNP-470, demostró ser menos tóxico y en estudios realizados en pacientes con tumores, se encontró que inhibe la replicación *in vitro* de *Encephalitozoon intestinalis* y *Vittaforma corneae* (74, 78). Otras drogas que han sido utilizadas para el tratamiento de la infección, pero con resultados variables, incluyen el metronidazol, furazolidona, azitromicina, itraconazol y sulfas (79, 80).

IV. JUSTIFICACION

Los microsporidios son parásitos intracelulares obligados que fueron reconocidos recientemente como patógenos importantes capaces de producir diarrea crónica en hospederos inmunocomprometidos. La microsporidiosis es considerada una infección emergente verdadera y es transmitida principalmente por vía feco-oral.

En Guatemala las enfermedades diarréicas afectan principalmente a los infantes que habitan en áreas marginales, donde las necesidades básicas como alimentación, agua, vivienda y servicios sanitarios son escasas o muchas veces nulas. Existen áreas rurales donde se han realizado estudios para determinar la epidemiología de diarrea persistente en infantes. En estos estudios se han descrito infecciones intestinales causadas por 1, 2, 3 ó más bacterias, parásitos y virus simultáneamente (10), por lo que es factible encontrar a los microsporidios en las muestras de heces recolectadas.

La posibilidad de analizar colecciones de muestras de heces conservadas en congelación de hace dos décadas, permitió conocer si este parásito estaba presente sin haber sido detectado, o si el mismo en realidad es un patógeno emergente que no se encontraba presente en esta población a finales de los años ochentas. Para investigar la presencia de microsporidios, las muestras de heces se analizaron por técnicas de tinción y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (52, 68).

V. OBJETIVOS

General

- ◆ Investigar la presencia de Microsporidios en muestras de heces preservadas en congelación.

Específicos

- ◆ Implementar y estandarizar técnica de Reacción en cadena de la polimerasa para investigar la presencia de Microsporidios en muestras de heces preservadas por congelación.
- ◆ Implementar y estandarizar las técnicas de tinción Calcofluor y Tricrómica Modificada para investigar la presencia de Microsporidios en muestras de heces preservadas por congelación.
- ◆ Determinar la presencia de Microsporidios en muestras de heces preservadas por congelación por el método de Reacción en cadena de la polimerasa y las técnicas de tinción Calcofluor y Tricrómica Modificada

VI. HIPOTESIS

Los microsporidios no se encontraban presentes en la población rural guatemalteca de Santa María de Jesús a finales de los años ochenta.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo de Trabajo

Las muestras pertenecen a una población de 370 niños desnutridos de 0-5 años de edad de la población de Santa María de Jesús del Departamento de Sacatepéquez.

Muestra

Cien muestras de la colección de heces conservadas en congelación, a -20°C preservadas en medio de transporte para virus. Las muestras fueron utilizadas en un estudio prospectivo longitudinal para determinar agentes causales de diarrea en el período comprendido entre marzo de 1987 a febrero de 1989. De esta población se cuenta con una ficha de registro, la cual incluye parámetro como la talla, edad, medida antropométricas, estado de salud; así como las características de las heces, (consistencia, moco, sangre, parásitos etc.).

B. Recursos

B.1 Humanos:

Yulma Carina Espina Sandoval (Tesisista)

Lic. Rafael Pratdesaba (asesor)

B.2 Materiales

B.2.a Tinciones

Viales de 1 dracma

Láminas portaobjetos

Palillos de madera

Pipetas serológicas de 1.0 ml

Tips para volumen de 1.0 ml

Crayón laminador

Erlenmeyer

Probetas

Beakers

Frascos de vidrio obscuro de 250 y 500 ml.

Cápsula de porcelana

Pistilo

Papel aluminio

Papel parafinado

B.2.b PCR

Tubos eppendorff de 1.5 ml

Tubos eppendorff de 1.0 ml estériles

Pipetas serológicas de 0-20 ul, de 10-200 ul 100-1000 ul.

Tips para volúmenes de 0-200 ul, 1,000 ul

Frascos de vidrio de 250, 500 y 1,000 ml estériles

Erlenmeyer

Beakers

Probetas

Pinzas

Tijeras

Sacabocado

Gradillas para tubos eppendorf

Papel encerado

Papel secante 9 X 10.5 cm

Maskin tape

B.3 Equipo

B.3.a Tinciones

Microscopio de luz

Microscopio de fluorescencia

Congelador a -20°C

Mechero

Balanza analítica

Potenciómetro

B.3.b PCR

Termociclador Perkin Elmer
Cámara de electroforesis Biorad
Fuente de poder Biorad
Transiluminador de Luz ultravioleta Biorad
Cámara polaroid Kodak
Incubadora
Congelador a -20°C
Agitador tipo vortex
Balanza analítica
Potenciómetro
Centrífuga para tubos eppendorff

B.4 Reactivos**B.4.a Tinciones**

Acido acético glacial
Acido clorhídrico 1.0 M
Alcohol etílico al 90 por ciento
Alcohol etílico al 95 por ciento
Alcohol etílico al 100 por ciento
Agua destilada
Acido fosfotúngstico 0.7 por ciento p/v (Fisher, Fairlaw)
Anilina azul 0.5 por ciento p/v (Fisher, Fairlaw)
Azul de Evans 0.1 por ciento p/v (Sigma Chemical)
Calcofluor Blanco M2R 0.5 por ciento p/v (Sigma Chemical)
Cromotopo 2R 6 por ciento p/v (Sigma Chemical)
Metanol absoluto
Xileno

B.4.b PCR

Trizma Base
Acido Clorhídrico concentrado
EDTA (Acido etilendiamintetracético) 0.1 mM

Acido bórico 0.9 M
 Cloruro de Sodio 0.1M
 Agarosa al 1.5 por ciento
 Dodecil sulfato de sodio (SDS) 20 por ciento
 Solución de lavado FTA (Fitzco Inc.)
 Solución EDTA 0.5 M pH 8.0
 Solución Tris.HCL 1M pH 8.0
 Solución de lavado Tris.HCL 10mM pH 8.0
 Solución de lavado Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X pH 8.0
 Solución de lavado Trisborato de EDTA (TBE) 1 X pH 8.0
 Agua estéril
 Enzimas y soluciones para PCR (solución buffer Tris-HCL 10mM pH 9.0, Cloruro de Magnesio 1.5mM, Dinucleótidos 0.2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP, Taq polimerasa 0.25U/ul(Promega Madison, WI), Diluyente de Taq. Leche descremada en polvo al 10 por ciento, aceite mineral).
 Filtros FTA (Fitzo Inc.)
 Bromuro de etidio 0.2 ul/ ml
 Cebadores: Universales: Micro F 0.05 uM (5'-CACCAGGTTGATTCTGCCTGA-3), Micro R 0.05 uM (5'-TAATGATCCTGCTAATGGTTCTCCAAC-3).
 Específicos: *Enterocytozoon* *bieneusi* EBIEF1 (5'-CACCAGGTTGATTCTGCCTGA-3) y EBIER (5'-CAATGCACCACTCCTGCCATT-3), *Encephalitozoon cuniculi* ECUNF1 (5'-ATGAGAAGTGATGTGTGTGCG-3) Y WCUNR1 (5'-TGCCATGCACTCACAGGCATC-3) *Encephalitozoon hellem* EHEL1 (5'-TGAGAAGTAAGATGTTTAGCA-3) y WHEL1 (5'-GTAAAACACTCTCACACTCA-3).

C. Métodos

C.1 Tinciones

C.1.a Tricrómica Modificada

Se fijaron los frotos de heces con metanol por 5 minutos.

Se agregó solución cromotropo 2R por 30 min a 37°C

Se lavó con alcohol ácido por 10 seg

Se lavó con alcohol etílico al 95% por 10 seg

Se lavó con alcohol etílico al 95% por 5 min

Se lavó con alcohol etílico al 95% por 5 min

Se lavó con alcohol etílico al 100% por 10 min

Se lavó con xileno por 5 min

Se dejaron secar los fotes y se observaron al microscopio en el objetivo 100 x

Los microsporidios se observaron como estructuras ovaladas rosado brillante

C.1.b Calcofluor Blanco M2R

Se fijaron los fotes de heces con metanol absoluto por 5 minutos

Se agregó 1 a 2 gotas de la solución de Calcofluor M2R

Se lavó los fotes suavemente con agua

Se agregó Azul de Evans al 0.1% por 1 min a temperatura ambiente

Se lavó con agua y se dejó secar al aire

Se observó en el microscopio de fluorescencia en el objetivo 100 x

C.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

C.2.a Aislamiento de ADN de microsporidios de las heces (68).

Preparación, obtención y purificación del ADN

- Se homogenizó la muestra y se transfirió 1 ml a un tubo de microcentrífuga
- Se centrifugó a 14,000 rpm por 2-3 minutos
- Se descartó el sobrenadante
- Se lavó 6 veces en agua destilada centrifugando a 14,000 rpm por 3 minutos cada vez
- Se decantó el sobrenadante y resuspendió el sedimento en 10-500 ul de agua destilada dependiendo del tamaño del sedimento
- Se resuspendió la muestra y homogenizó en agitador tipo vórtex
- Se transfirió 5 ul de muestra a los filtros FTA para romper la espora y atrapar el ADN.
- Se colocaron los filtros con las muestras sobre una placa caliente a 60°C por 15 minutos colocando una hoja de papel secante entre la muestra y la placa para evitar que se quemara

- Se colocaron los filtros con las muestras a un recipiente plástico y se realizaron dos lavados con agitación y con solución de lavado FTA por dos minutos cada uno.
- Se realizaron dos lavados con agitación y con solución de lavado TE de dos minutos cada uno
- Se colocaron en la placa caliente durante 45 minutos.
- Se separaron con un sacabocados el filtro con la muestra y se colocaron en un tubo para PCR.

C.2.b Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para realizar la amplificación del ARN ribosomal de los genes de microsporidios, se utilizaron cebadores seleccionados de secuencia conservada para el phylum *Microspora*. Las secuencia de estos cebadores son: Micro F (5-CACCAGGTTGATTCTGCCTGA-3') Micro R (5-TAATGATCCTGCTAATGGTTCTCCAAC-3'), con esto se obtiene un producto de 1,300 pares de bases (pb). Si alguna de las muestras resulta positiva con estos cebadores, se utilizarán cebadores específicos para la identificación de género y especie. Las especies importantes en humanos se detectan con las siguientes secuencias:

- *Enterocytozoon bieneusi* EBIEF1 (5-CACCAGGTTGATTCTGCCTGA-3') y EBIEF2 (5-CAATGCACCACTCCTGCCATT-3'), con esto se obtiene un producto de 607 pb.
- *Encephalitozoon cuniculi* ECUNF1 (5-ATGAGAAGTGATGTGTGTGCG-3') y WCUNR1 (5-TGCCATGCACTCACAGGCATC-3') con esto se obtiene un producto de 549 pb.
- *Encephalitozoon hellem* EHELF1 (5-TGAGAAGTAAGATGTTTAGCA-3') y WHELRL1 (5-GTAAAAACACTCTCACACTCA-3') con lo que se obtiene un producto de 547 pb.

La amplificación genética por PCR se realizó en reacciones de 100 μ l conteniendo 2 μ l de leche descremada al 10%, 2 μ l del cebador MicroF 0.05 μ M, 2 μ l del cebador Micro R 0.05 μ M, 2 μ l de los dinucleótidos 0.2 mM,

10 ul de Tris-HCL 10mM pH 9.0, 8 ul de MgCl₂ 1.5 mM, 1 ul de Taq DNA polimerasa, 73 ul de agua estéril para PCR, aproximadamente 100 ng de DNA genómico y 100 ul de aceite mineral.

- Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador Perkin Elmer. Se efectuaron 35 ciclos con el perfil siguiente:
 - 30 segundos a 94 °C
 - 30 segundos a 55°C
 - 90 segundos a 72°C
 - al terminar los 35 ciclos se realizó una extensión a 72°C por 10 minutos
- La electroforesis se realizó en geles con 1.5 por ciento de agarosa en TAE 1X con 2.0 ul de bromuro de etidio/100ml. Se utilizaron alícuotas de 5 ul de los productos y se visualizaron los productos con un transilumador UV.
- El resto de los productos de PCR se refrigeraron a 4°C.
- En el ensayo se incluyó como control positivo esporas formalinizadas de *E. cuniculi* , cultivadas en células RK13, donadas por la Dra. E. Didier, y como control negativo agua estéril. Además, la muestra se corrió por duplicado, inoculando una de ella con esporas provenientes del cultivo celular, para utilizarse como control positivo de la muestra. Esto evidenció la presencia de inhibidores presentes en la muestra.

VIII. DISEÑO DE INVESTIGACION

A. Tipo de Estudio

Es un estudio descriptivo de corte transversal, para determinar la presencia de microsporidios en muestras de heces preservadas en congelación, pertenecientes a niños de 0-5 años de la población de Santa María de Jesús, del departamento de Sacatepéquez

B. Tipo de Muestreo

Se seleccionaron de forma aleatoria muestras fecales (diarreicas y no diarreicas) correspondientes a 100 niños de una colección de muestras de heces de 370 niños de 0-5 años de la población de Santa María de Jesús, del departamento de Sacatepéquez.

De acuerdo al diseño experimental sugerido por el departamento de estadística de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, se utilizó la siguiente fórmula para calcular el tamaño de muestra:

$$N = \frac{pqNC^2}{d^2} \cdot \frac{1+1}{N} \cdot \frac{pqNC^2}{q^2}$$

$p = 0.5$ $d^2 = \text{error (90\% de precisión y 10\% error)}$
 $q = 0.5$
 $NC = 90\% = 1.645$

$$N = \frac{(0.5)(0.5)(1.645)^2}{(0.1)^2} \cdot \frac{1+1}{370} \cdot \frac{(0.5)(0.5)(1.645)^2}{0.1^2} = 57$$

El N obtenido de esta forma es de 57 niños como mínimo

C. Selección de la muestra: Se analizaron 100 muestras de heces diarreicas y no diarreicas pertenecientes a la colección mencionada anteriormente.

D. Análisis de Resultados: Concordancia múltiple con Kappa.

IX. RESULTADOS

Se analizaron un total de 100 muestras de heces preservadas en congelación colectadas en Santa María de Jesús en 1987-1989.

Las muestras se analizaron utilizando las coloraciones Tricrómica Modificada y Calcofluor, y por el método de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) con filtros FTA.

Se realizó la implementación y estandarización del PCR y se utilizaron como controles positivos, cultivos celulares de microsporidios y como controles negativos agua de PCR o estéril.

Para la estandarización del PCR se corrieron 15 muestras de heces al azar, provenientes del estudio y se corrieron por duplicado, el duplicado de la muestras se inoculó con más de 10^6 esporas de microsporidios/ul, para garantizar que el resultado fuera positivo, y una vez estandarizada la técnica se procedió a correr el resto de las muestras (fig 1).

En todos los geles corridos se incluyeron por lo menos un control positivo y uno negativo para garantizar que la corrida había estado bien.

En las técnicas de tinción se utilizaron como controles positivos esporas de microsporidios provenientes de cultivos celulares (fig, 2 y 3). Se utilizaron dos tipos de controles, siendo estos los siguientes:

- 1) Se inocularon 20 ul del cultivo a una muestra de heces tomada al azar, se realizaron frotos y se tiñeron con las tinciones mencionadas
- 2) Se tomaron 20 ul del cultivo, se realizaron frotos y se tiñeron con las coloraciones mencionadas.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

A. PCR-Filtros FTA: No se logró detectar ADN de esporas de microsporidios.

B. Técnicas de Coloración:

B.1 Tricrómicas Modificada: No se logró identificar esporas de microsporidios en ninguna de las muestras observadas.

B.2 Calcofluor: No se logró identificar esporas de microsporidios en ninguna de las muestras observadas.

X. DISCUSION DE RESULTADOS

Se analizaron 100 muestras de heces basándose en lo establecido en inciso VIII. B.

La microsporidiosis es considerada a nivel mundial como una enfermedad emergente verdadera y ha sido investigada en diferentes poblaciones, ya que se han reportado casos de la infección en pacientes con inmunosupresión diferente a la causada por el SIDA, así como en pacientes inmunocompetentes. Bretagne *et al*, encontraron una prevalencia de 0.88 por ciento (8 casos positivos de una población de 900 niños) de esporas de microsporidios encontradas en muestra se heces de infantes africanos sin infección por VIH (8).

En las muestras analizadas en el estudio no se determinó la presencia de esporas de microsporidos, y tampoco se detectó ADN, con ésto se puede inferir que las microsporidiosis no estaban presentes en la población analizada, por lo tanto estos parásitos no pueden considerarse como agentes causales importantes de diarrea en los niños de esta comunidad en los años de 1987 a 1989.

El diagnóstico de la microsporidios ha avanzado en las últimas décadas, a la fecha se cuentan con técnicas de tinción que son sumamente sencillas de realizar, y permiten observar por medio de microscopio las esporas de los parásitos, especialmente en muestras de heces, evitando así el uso de técnicas invasivas para adquirir muestras. Al mismo tiempo se han elaborado técnicas moleculares como la Reacción en cadena de la polimerasa que detecta el ADN del parásito y determina género y especie de organismos.

La técnica de PCR utilizada en el estudio (68), resultó ser muy simple, sencilla y rápida de utilizar en muestras de heces. El método se basa en la extracción de ADN a través de filtros, se colocan alícuotas pequeñas de la muestra ya centrifugada en los filtros, las esporas quedan atrapadas, son expuestas al calor permitiendo de esta manera el rompimiento de la espora y la siguiente liberación del ADN; los interferentes que puedan haber en las muestras son removidos con soluciones

de lavados y el método requiere de 4 a 6 horas máximo para su realización. Esta técnica tiene muchas ventajas sobre el método convencional, el cual es muy laborioso, requiere de 24 a 48 horas para su realización y cuando se utiliza en muestras de heces es necesario emplear métodos severos de rupturas químicas para extraer el ADN de las esporas, la taq polimerasa se ve afectada por la presencia de inhibidores que puedan haber en las muestras, puede perderse ADN en las extracciones, y se requiere de la preparación de muchas soluciones.

Para la estandarización del método se tomaron al azar 15 muestras de heces del estudio, se corrieron por duplicado, al duplicado se le agregaron 10^6 esporas de los cultivos de microsporidios contados con cámara de Newvauer, para garantizar que el resultado fuera positivo y al mismo tiempo evidenciar la presencia de inhibidores en las muestras, ya que si la muestra resultaba negativa y el control inoculado también, era signo de algún tipo de problema en la técnica. El resto de las muestras de heces fueron analizadas hasta que los resultados de la estandarización fueron satisfactorios. En el gel se incluyeron siempre un control positivo y un control negativo para garantizar la corrida, ya que factores como temperatura, tiempo de reacción, contaminación de reactivos y muestra, presencia de inhibidores en la muestras, estabilidad de la enzima y utilización de reactivos inadecuados, pueden afectar la reacción. En el caso de estos experimentos, el control negativo siempre resultó negativo y el control positivo siempre resultó positivo, por lo que se puede garantizar que todas las muestras fueron realmente negativas.

Respecto a los métodos de coloración empleados, la técnica de coloración de Calcofluor, es la que se utiliza normalmente como método de tamizaje para determinar la presencia de las esporas de los parásitos, las cuales deben confirmarse con otra coloración (52). El calcofluor reacciona con la quitina presente en la pared celular de las esporas y se produce una fluorescencia que se detecta en una microscopio con un filtro de 435-450 nm. La coloración es sumamente sencilla de realizar, rápida (7-10 minutos) y los reactivos pueden obtenerse por catálogo. A pesar de esto, la técnica tiene la desventaja de requerir un microscopio de fluorescencia para hacer las observaciones de los frotos. De las muestras analizadas en ninguna se observaron esporas del parásito.

La tinción de tricrómica modificada, es utilizada usualmente para confirmar la presencia de esporas después de haber tamizado con otra coloración como calcofluor. Esta coloración es más complicada de realizar y requiere aproximadamente de 60-70 minutos, pero no requiere equipo especial, solamente una incubadora a 37°C, los reactivos pueden comprarse en Guatemala, aunque algunos son solo bajo pedido. La desventaja que tiene es que deben teñirse un mínimo de 5 frotos al mismo tiempo. En este caso, en ninguna de las muestras se observaron esporas de microsporidios.

Para asegurar la calidad de las técnicas y de los reactivos utilizados, se inocularon en cinco muestras del estudio tomadas al azar, esporas de los cultivos celulares empleados en la técnica de PCR (esporas de *E. cuniculi*). Se realizaron frotos de la mismas y se utilizaron como controles positivos.

XI. CONCLUSIONES

- Los microsporidios no estaban presentes en las muestras de heces conservadas en congelación de la población de infantes de Santa María de Jesús, recolectadas en 1987-1989.
- La microsporidiosis no es una enfermedad que haya estado presente hace más de una década entre los niños de la población de Santa María de Jesús.
- Los microsporidios no pueden ser considerados como agentes causales de diarrea en la población de niños estudiada.
- La técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) es fácil y rápida para diagnosticar la enfermedad.
- La técnica de tinción Calcofluor es la más sencilla y rápida de realizar, sin embargo requiere de un microscopio con filtro de 435-450 nm.
- La técnica de tinción de Tricrómica modificada no requiere de equipo especial para su realización, sin embargo es más tardada y deben teñirse un mínimo de 5 frotos.

XII. RECOMENDACIONES

- ▶ Estudiar la presencia de microsporidios en poblaciones más grandes y estudios y durante mayor tiempo, para poder analizar efectos como precipitación pluvial, presencia de animales, cambios en temperatura, etc.

- ▶ Incluir el diagnóstico de microsporidiosis en muestras de heces por métodos de tinción tricrómica modificada y calcofluor en los laboratorios de los principales hospitales nacionales.

- ▶ Capacitar al personal de laboratorio de los principales hospitales del país en el diagnóstico de microsporidios por métodos de tinción en muestras de heces.

- ▶ Utilizar la técnica de PCR como método de confirmación de microsporidiosis ya que es más específica que determina género y especie de los parásitos.

XIII. BIBLIOGRAFIA

- 1) Bryan RT, Weber RH. Microsporidia. Emerging pathogens in immunodeficient persons. Arch Pathol Lab Med. 1993;117:1242-1245.
- 2) Molina J M *et al.* Intestinal microsporidiosis in Human Immunodeficiency Virus Infected patients with chronic unexplained diarrhea. Prevalence, clinical and biologic features. JID. 1995;16:217-221.
- 3) Canning, E.U. Hollister W.S. Human infections with microsporidia. Rev Med Microbiol. 1992;3:35-42.
- 4) Orenstein JM *et al.* Microsporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome. J Parasitol. 1991;77:843-864.
- 5) Bryan RT *et al.* Microsporidia: Opportunistic pathogens in patient with AIDS. Prog Clin Parasitol. 1991;2:1-26.
- 6) Weber RH Bryan RT. Microsporidial infections in immunodeficient and immunocompetent patient. Clin Infect Dis. 1994;19:517-521.
- 7) Sandorf JA *et al.* *Enterocytozoon bieneusi*. Infection in an immunocompetent patient who had acute diarrhea and who was not infected with the Human Immunodeficiency Virus. Clin Inf Dis. 1994;19:514-516.
- 8) Bretagne SF *et al.* Prevalence des spores d' *Enterocytozoon bieneusi* dans sidéens et d' enfants non infectés par le VIH bull. Soc Path Ex. 1993;86:351-357.
- 9) Enriquez FJ *et al.* Prevalence of intestinal Encephalitozoonosis in México. Clin Inf Dis. 1998;26:1227-1229.
- 10) Cruz J. *et al.* Epidemiology of persistent diarrhea among Guatemalan rural children. Acta Pediatr Suppl. 1992;381:22-26.
- 11) Levine ND *et al.* A newly revised classification of the protozoa. J Protozool. 1980;27:37-58.
- 12) Balbiani GR *et al.* Sur les microsporidies on psorospermier des articules. C.R. Hebd Seances Acad Sci. Paris. 188;95:1168-1171.
- 13) Larsson RC *et al.* Ultrastructure, function and classification of microsporidia. Prog Protis. 1986;1:325-390.

- 14) Weisser JM *et al.* Contribution to the clasification of microsporidia. *Vesin Cesk Spot Zool.* 1977;41:308-320.
- 15) Sprague VJ *et al.* Taxonomy of phylum microspora. *Crit Rev Microbiol.* 1992;18:285-295.
- 16) Canning EU Nuclear division and chromosome cycle in microsporidia. *Byosistems.* 1988;21:333-340.
- 17) Weiss LM *et al.* Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny: a review. *Folia Parasitol.* 1994;41:81-90.
- 18) Vossbrinck CR *et al.* Ribosomal RNA sequence suggest microsporidia are extremely ancient eukariotes. *Nature.* 1987;326:411-414.
- 19) Edlind TG *et al.* *Cryptosporidium* and microsporidial beta-tubulin sequences prediction of benzimidazole sensitivity and phylogeny. *J Euk Microbiol.* 1994;41:38S.
- 20) Canning EU. The microsporidia of vertebrates. *Parasite protozoa.* Academic Press. New York 1^a. Ed Vol 3 1986 (p215-425).
- 21) Canning E U. Microsporidia. In Kreier J.P., Kaker J.R.. *Parasitie protozoa.* 2nd ed Vol 6. Academic Press Inc New York. N.Y. 199 (p.299-385).
- 22) Franzen CD, Muller A. Molecular techniques for detection, species differentiation and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin Microbiol.* 1999;12:244-284.
- 23) Desportes LI *et al.* Ocurrance of a new microsporidian *E. bieneusi* n.g. sp. in the enterocytes of human patient with AIDS. *J Protozool.* 1985;32:250-254.
- 24) Kotler DP, Orenstein JM. *Microsporidia infections of the gastrointestinal tract.* N.Y. Raven Press. 1995;11:1129-1140
- 25) Orenstein JM *et al.* Localization of infection by the *microsporidian Enterocytozoon bieneusi* in the gastrointestinal tract of AIDS patient with diarrhea. *AIDS.* 1992;6:195-197.
- 26) Cali AP, Owen RL. Intracellular Development of *Enterocytozoon.* A unique microsporidian found in the intestine of AIDS patients. *J Protozool.* 1990;37:145-155.
- 27) García LS *et al.* Detection of microsporidial spores in fecal specimens from patients diagnosed with Criptosporidiosis. *J Clin Microbiol* 1994;32:1739-1741.

- 28) McWhinney PH *et al.* Microsporidiosis detected in association with AIDS-related sclerosin cholangitis. *AIDS*. 1991;5:1394.
- 29) Weber RH *et al.* Pulmonary and intestinal microsporidiosis in a patient with the acquires immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1992;146:1603-1605.
- 30) Del Aguila CR *et al.* Identification of *Enterocytozoon bieneusi* spores in respiratory samples from AIDS patient with a 2-years history of intestinal microsporidiosis. *J Clin Microbiol*. 1997;35:1862-1866.
- 31) Didier ES *et al.* Isolation and characterization of a new human microsporidia *Encephalitozoon hellem*, from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *JID*. 1991;163:617-621.
- 32) Desplazes PA *et al.* Dual microsporidial infection due to *Vittaforma cornea* and *Encephalitozoon hellem* in a patients with AIDS. *Clin Inf Dis*. 1998;27:1521-1524.
- 33) Orenstein JM *et al.* Microsporidian keratoconjunctivitis in patients with AIDS. *AIDS*. 1990;39:188-189.
- 34) Scaglia ML *et al.* Asyntomatic respiratory tract microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem* in the three patients with AIDS. *Clin Inf Dis*. 1998;26:174-176.
- 35) Scaglia ML *et al.* Isolation and identification of *Encephalitozoon hellem* from italian AIDS patient with disseminated microsporidiosis. *AIDS*. 1994;102:817-827.
- 36) Cali AP *et al.* *Septata intestinalis* N.G.N. sp. And intestinal microsporidia associates with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *J Euk Microbiol*. 1993;40:404-412.
- 37) Franzen CD, Muller A. Disseminated *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infection in a patient with AIDS. *N Engl J Med*. 1996;335:1610-1611.
- 38) Mertens RB *et al.* *Encephalitozoon cuniculi*. Microsporidiosis: Infection of the brain, heart, kidneys, trachea, adrenal glands and urinary bladder in a patient with AIDS. *Modern Pathol*. 1997;10:68-77.
- 39) Franzen CD *et al.* Immunologically confirmed disseminated, asymptomatic *Encephalitozoon cuniculi*. *Clin Infect Dis*. 1995;21:1480-1484.

- 40) Orenstein JM *et al.* Systemic dissemination by a newly recognized intestinal microsporidia species in AIDS patients. *AIDS*. 1992;6:1143-1150.
- 41) Didier ES *et al.* Studies of ocular microsporidia. *J Protozool*. 1991;38:635-638.
- 42) Davis RM *et al.* Corneal microsporidiosis. A case report including ultrastructural observations. *Ophthalmology*. 1990;97:953-957.
- 43) Fedorko DP, Hijazzi YM. Application of molecular techniques to the diagnosis of microsporidial infection. *EID*. 1996;2:1-15.
- 44) Franzen CD, Muller A. Molecular techniques for analysis of microsporidia. *J Clin Microbiol*. 1999;12:244-284.
- 45) Weber RH *et al.* Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *The New Engl J Med*. 1992;326:161-166.
- 46) Beauvais BC *et al.* Comparative evaluation of five diagnostic methods for demonstrating microsporidia in stool and intestinal biopsy specimens. *Ann Trop Med Parasitol*. 1993;87:99-102.
- 47) Rijpstra AC *et al.* Use of light microscopy to diagnosis small-intestinal microsporidiosis in patients with AIDS. *JID*. 1998;157:827-831.
- 48) Chrionalia GL *et al.* Relevant criteria for detecting microsporidia in stool specimens. *J Clin Microbiol*. 1998;36:2279-2283.
- 49) Moura HD *et al.* A new and improved "Quick-Hot Gram-Chromotrope" technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin embedded tissue sections. *Arch Pathol Lab Med*. 1997;121:888-893
- 50) Weber RH *et al.* Improved light-microscopical detection of microsporidian spores in stool and duodenal aspirates. *N Eng J Med*. 1992;26:161-166.
- 51) Kokoskin ET *et al.* Modified technique for efficient detection of microsporidia. *J Clin Microbiol*. 1994;1974-1975.
- 52) Didier ES *et al.* Comparison of three staining methods for detecting microsporidian in fluids. *J Clin Microbiol*. 1995;33:3138-3145.
- 53) Ignatus RS *et al.* Comparative evaluation of modified trichrome and uvitex 2B stains for detection of low number of microsporidial spores in stool specimens. *J Clin Microbiol*. 1997;35:226-229.

- 54) Weber RH, Bryan RT. Human microsporidial infection. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7:426-461
- 55) Didier ES *et al.* Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitol.* 1995;111:411-421.
- 56) Desser SS *et al.* Ultrastructure of the development of a species of *Encephalitozoon* culture from eye of an AIDS patient. *Parasitol.* 1992;78:677-683.
- 57) Visvesvara GS *et al.* Short-term *in vitro* culture and molecular analysis of microsporidian, *Enterocytozoon bieneusi*. *J Euk Microbiol.* 1995;42:506-510.
- 58) Hollister WS *et al.* Evidence for widespread occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) in man provided by ELISA and other serological tests. *Parasitol.* 1991;102:33-43.
- 59) Didier ES *et al.* Serological studies in human microsporidiosis. *AIDS.* 1993;13:8-11.
- 60) Del Aguila CR *et al.* Identification of *Enterocytozoon bieneusi* spores in respiratory samples from AIDS patient with a 2-years history of intestinal microsporidiosis. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1862-1866.
- 61) Canning EU, Hollister WS. New intestinal protozoa – coccidia and microsporidia-. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1990;84:181-186.
- 62) Schuitema AR *et al.* Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of microsporidiosis. *AIDS.* 1993;7:557-561.
- 63) Vossbrick CR *et al.* Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon cuniculi* species identification and phylogenetic construction. *J Euk Microbiol.* 1993;40:354-362.
- 64) Hartskeerl RA *et al.* Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993, reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitol.* 1995;110:277-285.
- 65) Zhu X *et al.* Small subunit rRNA sequence of *Enterocytozoon bieneusi* and its potential diagnostic role with use of the polymerase chain reaction. *JID.* 1993;168:1570-1575.
- 66) Fedorko DP *et al.* Identification of microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1739-1741.

- 67) Didier ES *et al.* Diagnosis of disseminated microsporidia *Encephalitozoon hellem* infection by PCR, Southern analysis and successful treatment with albendazole and fumagallin. *J Clin Microbiol.* 1996;34:947-952.
- 68) Palmer AO, Lampel KA. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. *J of Clin Microbiol.* 2000;38:2271-2277.
- 69) Orenstein JM *et al.* A microsporidian previously undescribed in human, infecting enterocytes and macrophages, and associated with diarrhea in an acquired immunodeficiency syndrome patient. *Human Pathol.* 1993;3:722-728.
- 70) Medina MA. Prevalencia de microsporidios en pacientes con VIH y/o SIDA que asisten a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 2001. 52p.
- 71) Cruz JR *et al.* Infection and diarrhea caused by *Cryptosporidium* sp among Guatemalan infants. *J Clin Microbiol.* 1988;26:88-91.
- 72) Cruz JR *et al.* Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. *J Clin Microbiol.* 1992;30:1140-1144.
- 73) Cruz JR *et al.* Adenovirus types 40, and 41 and Rotaviruses associated with diarrhea in children from Guatemala. *J Clin Microbiol.* 1990;28:1780-1784.
- 74) Didier ES *et al.* Effect of albendazole, fumagallin and TNP-470 on microsporidial replication *in vitro*. *Antimicro Ag Chemother* 1997;41:1541-1546.
- 75) Blanshard CD *et al.* Treatment of intestinal microsporidiosis with albenazole in patient with AIDS. *AIDS.* 1992;6:311-313.
- 76) Shaddock JA *et al.* Effect of fumagallin on *in vitro* multiplication of *Encephalitozoon cuniculi*. *J Protozool.* 1980;24:202-208.
- 77) Molina JM *et al.* Potential efficacy of fumagallin in intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with HIV-infection: results of a drug screening study. *AIDS.* 1997;11:1603-1610.
- 78) Didier ES *et al.* Screening of compounds for antimicrosporidial activity *in vitro*. *Folia Parasitol.* 1998;45:129-139.

- 79) Eeftinck SJ *et al.* Metronidazole for microsporidium associated diarrhoea in symptomatic HIV-1 infection. *AIDS*. 1991;22:2267-2269.
- 80) Canning EU, Hollister W.S. *In vitro* and *in vivo* investigations of human microsporidia. *J Protozool.* 1991;38:631-635.

XIV.ANEXOS

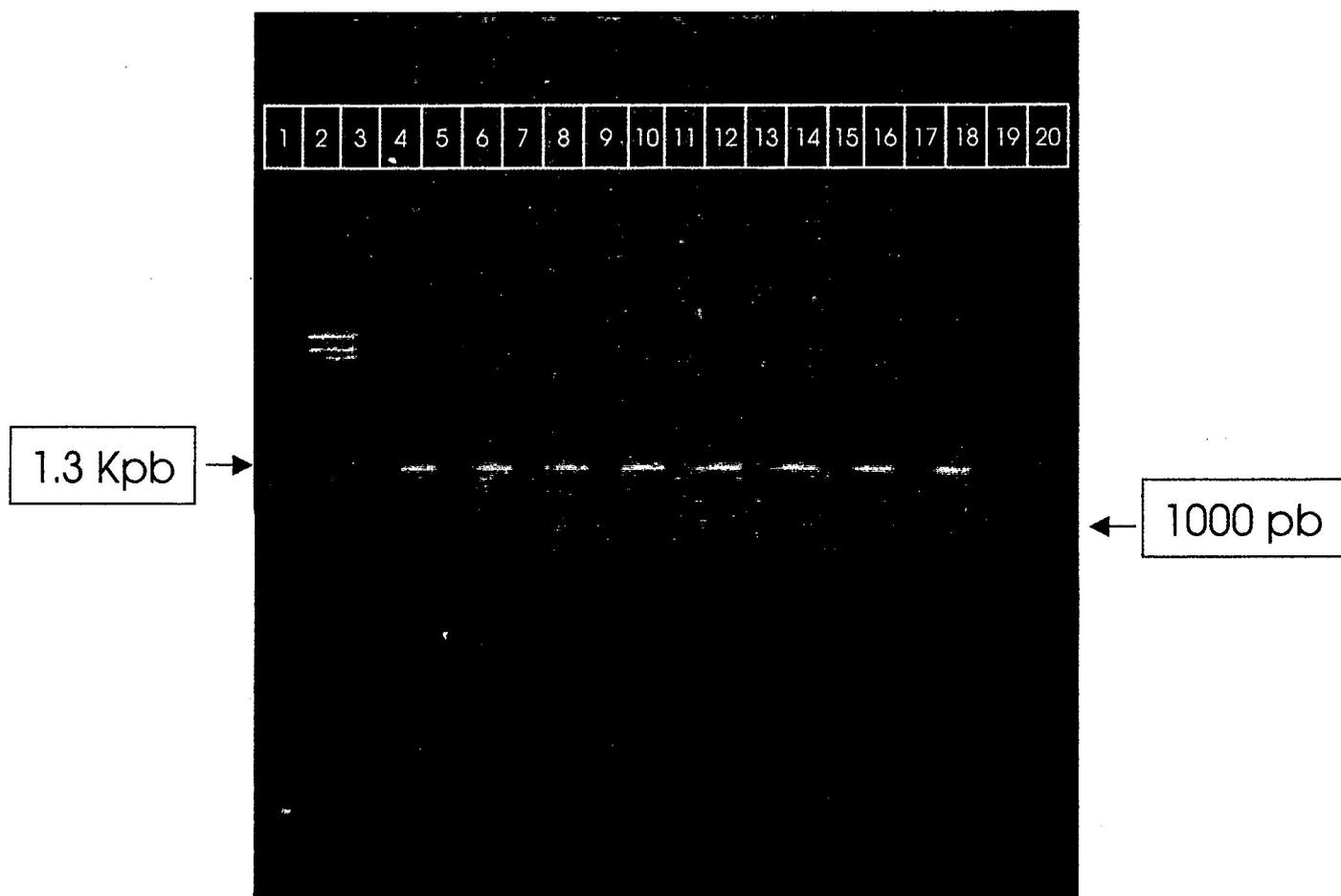


Figura No. 1 Gel correspondiente a las primeras muestras del estudio inoculadas con un control de esporas de *E. cuniculi* para la estandarización del método PCR.

Pozo	Muestra	Pozo	Muestra
1	NA*	11	4
2	Estandar(ADN)	12	5'
3	Ctrol Neg	13	5
4	1' **	14	6'
5	1	15	6
6	2'	16	7'
7	2	17	7
8	3'	18	Ctrol Pos'
9	3	19	Estandar(ADN)
10	4'	20	NA*

*No se aplicó muestra.

** Los números acompañados del apóstrofe (') señalan las muestras que fueron inoculadas con esporas para servir como control. Los números sin apóstrofes señalan las muestras fecales sin inocular artificialmente.

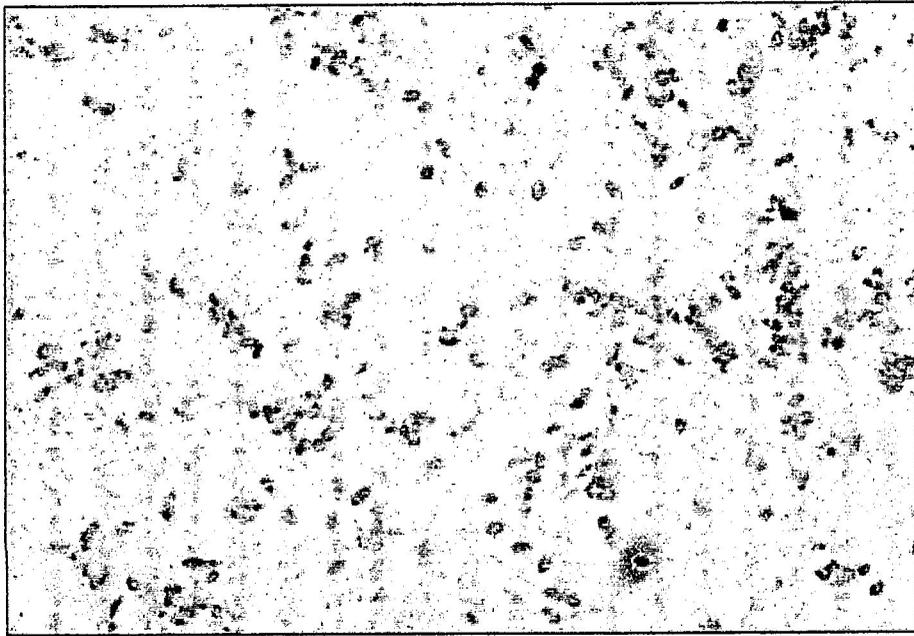


Figura No. 2 Microsporidiosis teñidos con tinción tricrómica (esporas teñidas de rojo).

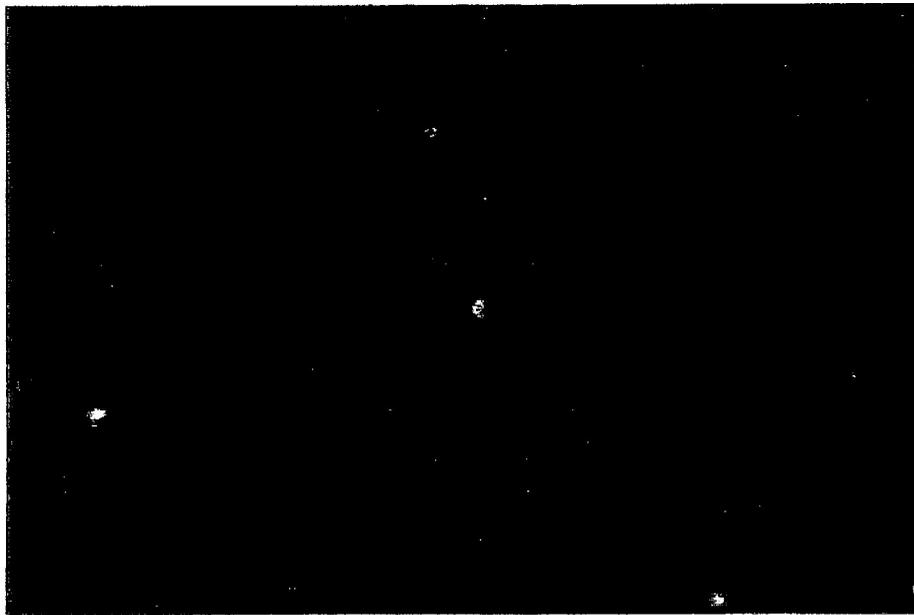
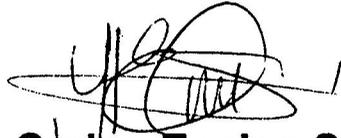


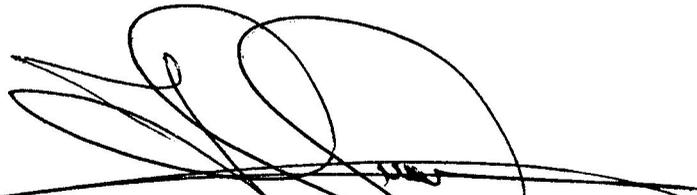
Figura No. 3 Microsporidiosis teñidos con Calcoflúor (esporas fluorescentes teñidas de color azul).



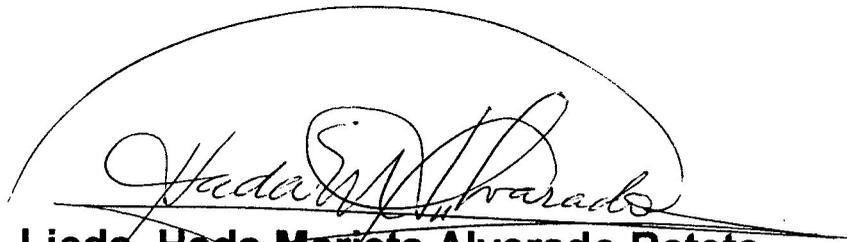
Yulma Carina Espina Sandoval
Autora



Lic. Rafael Antonio Pradesaba Zea
Asesor



Licda. Heidi Elke Logemann Lima
Directora



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta
Decana