

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**Prevalencia de Microsporidios en Pacientes VIH
y/o SIDA que acuden a la Clínica No. 8 del
Hospital Roosevelt**

Informe de tesis
Presentado por:
María de los Angeles Medina Monzón

Para optar el título de:

Química Bióloga

Guatemala, febrero del 2,001

DL
06
+(2114)

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Decana:	Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta
Secretario:	Lic. Oscar Federico Nave Herrera
Vocal I:	Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto
Vocal II:	Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
Vocal III:	Dr. Federico Adolfo Richter Martínez
Vocal IV:	Br. César Alfredo Flores López
Vocal V:	Br. Manuel Anibal Leal Gómez

AGRADECIMIENTO

- A DIOS** Por permitirme vivir y compartir el mundo con los que amo
- A MIS PADRES** Por su entrega incondicional, amor, confianza y comprensión
- A MIS HERMANOS** Por su cariño, confianza y apoyo en todo momento.
- A MI ABUELITA** Por su cariño y ejemplo
- A MI ESPOSO** Por hacer más hermosa mi existencia
- A MIS AMIGOS** Por creer en mí
- A MI ASESORA** Licda. Beatriz López por su apoyo y amistad

ACTO QUE DEDICO

A DIOS Y A LA VIRGEN SANTÍSIMA

A MIS PADRES Héctor y Teresa con todo mi amor

A MIS HERMANOS Karla, Ingrid, Velvet y Héctor con mucho cariño

A MI ABUELITA Rosa

A MI ESPOSO Jhoni con inmenso amor

A MI FAMILIA En especial a mi tía Martha Coralia y a mi tío Jaime

A MIS AMIGOS Manolo, Faraón, Javier, Gloriandré, Pablo, Nancy, Ángel, Carina, Ligia, Lilian, Sayira, Claudia, Roxana, Tatiana, Mercy, Osbert y Paola

A MI MADRINA Licda. Waleska Argueta de Oliva

INDICE

	Página
1. Resumen	2
2. Introducción	4
3. Antecedentes	6
4. Justificación	32
5. Objetivos	33
6. Materiales y Métodos	34
7. Resultados	40
8. Discusión de Resultados	42
9. Conclusiones	44
10. Recomendaciones	45
11. Referencias	46
12. Anexos	52

1. RESUMEN

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) se reconoció por primera vez en 1981. A la identificación del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) como agente causal del SIDA, en 1984, siguió rápidamente la caracterización de este virus y las células blanco que infecta así como la aclaración de las múltiples consecuencias de la infección. Los estudios epidemiológicos han identificado las principales poblaciones en riesgo de adquirir la infección y las vías de transmisión del virus. Los síntomas gastrointestinales que se presentan en este tipo de pacientes son frecuentemente causados por parásitos, entre otros microorganismos que se han aislado con mayor frecuencia son *Mycrosporidium* sp y *Cryptosporidium parvum* (1). El primer caso de microsporidiosis humanas fue reportado en 1959 (5), y sólo se han documentado 10 infecciones en humanos en 1985, hasta que nuevas especies como *Enterocytozoon bieneusi* fueron encontradas en pacientes con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (6-8).

Con el objetivo de establecer la prevalencia de microsporidios en el sistema digestivo de pacientes con VIH y/o SIDA, se analizaron 108 muestras de heces diarreicas y no diarreicas en un período de seis meses.

Las muestras fueron seleccionadas por muestreo no aleatorio por conveniencia hasta completar n (100), además a cada paciente se le aplicó un cuestionario cuyos datos se ingresaron en una base de datos del programa Epi Info 6 y cuyos resultados se encuentran en el anexo 12, tabla 8. Para los factores de riesgo se realizó un análisis multivariado de la presencia de microsporidios por regresión logística.

Las muestras se analizaron con tres diferentes coloraciones: Calcofluor, Gram-cromotropo y Tricrómica Modificada.

Entre las principales conclusiones se encontró que la prevalencia de infecciones intestinales debidas a microsporidios en pacientes VIH y/o SIDA que asisten a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt fue del 1% con un nivel de confianza del 95%, ya que solamente una de las muestras fue positiva para microsporidios (confirmada en el Centro para el Control de Enfermedades, CDC de Atlanta, Georgia, E.E.U.U.) y que el Calcofluor

es la coloración que ofrece mayores ventajas para el diagnóstico de las infecciones producidas por microsporidios en pacientes con VIH y/o SIDA .

Se recomienda que debido a la baja prevalencia de infecciones intestinales producidas por microsporidios en pacientes con VIH y/o SIDA se deben llevar a cabo estudios con un mayor número de muestras, para observar el grado de significancia de los factores de riesgo relacionados, que se realicen investigaciones de microsporidios en el mismo y en otros grupos de población a riesgo y que no presenten otra causa aparente de infección y que se utilice el Calcofluor como tamizaje para las muestras positivas para microsporidios y luego Gram cromotropeo y Tricrómica modificada para confirmar su presencia.

Adicionalmente y aunque no constituía un objetivo de esta investigación se realizó un análisis coprológico a las muestras en el cual los parásitos más frecuentes fueron *Entamoeba coli* que se encontró en un 10.19%, *Giardia lamblia* y *Endolimax nana* que se encontraron en un 6.48%, *Blastosistis hominis* y *Strongyloides stercoralis* se encontraron en un 2.78%, *Trichuris trichura* y *Entamoeba histolítica* se encontraron en un 0.93% de las muestras examinadas (Anexo 10, tabla 7).

2. INTRODUCCION

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) se reconoció por primera vez en 1981. A la identificación del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) como agente causal del SIDA, en 1984, siguió rápidamente la caracterización de este virus y las células blanco que infecta, y la aclaración de las múltiples consecuencias de la infección. Los estudios epidemiológicos han identificado las principales poblaciones en riesgo de adquirir la infección y las rutas mediante las cuales se puede transmitir el virus. Para 1985, se habían desarrollado paquetes diagnósticos para la detección de anticuerpos contra el VIH, se analizaban compuestos terapéuticos en potencia para la actividad *in vitro* contra este virus, y se desarrollaron análisis clínicos para evaluar la seguridad y eficacia de estos medicamentos (1).

Las cifras mundiales actuales, señalan que más de 34 millones de personas alrededor del mundo están infectadas con el virus o padecen de SIDA, siendo las regiones más afectadas Africa, Asia, Norte, Centro y Sur América. En los Estados Unidos más de 44,000 nuevos casos se detectaron en 1998, y globalmente, hubo un estimado de 16,000 nuevos casos por día (1).

El SIDA es una enfermedad de grandes proporciones que afecta a la mayoría de países del mundo. En Guatemala, el primer caso confirmado del que se tiene registro fue en 1984, y a partir de esta fecha el registro de casos ha ido en aumento (Anexo 1, Tabla 1).

Como puede observarse en la tabla 1 de los 2,893 casos de SIDA diagnosticados en Guatemala hasta el 28 de febrero de 1999, el 77% son varones y el 90% se encuentra entre las edades de 15 a 49 años. De estos el 93.81% fue infectado por vía sexual, el 3.5% por vía materno-fetal y un 2.7% por medio de transfusiones. Desde su inicio se han registrado 589 muertes causadas por la enfermedad (1).

La infección con VIH, provoca un defecto adquirido en la función inmunitaria, en especial en la inmunidad celular. Los individuos afectados pueden ser asintomáticos o presentar enfermedad progresiva relacionada con infecciones oportunistas recurrentes, los

síntomas gastrointestinales son frecuentemente causados por parásitos, causando diferentes tipos de presentación: diarrea aguda, diarrea crónica, diarrea crónica aguda etc. Los microorganismos que se han aislado con mayor frecuencia son *Mycrosporidium* sp y *Cryptosporidium parvum* (1). El primer caso de microsporidiosis humana fue reportado en 1959 (5), y sólo se han documentado 10 infecciones en humanos desde 1985, hasta que nuevas especies, como *Enterocytozoon bieneusi* fueron encontradas en pacientes con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (6-8). Los microsporidios han sido reportados en Africa, Asia, Norte y Sur América, pero no existe ningún reporte en Centro América (1). Los pacientes con VIH y/o SIDA, que asisten a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt, constituyen un grupo adecuado para conocer la prevalencia de infecciones intestinales y los factores de riesgo asociados a las infecciones producidas por microsporidios, principalmente las causadas por *Encephalitozoon intestinalis* y *Enterocytozoon bieneusi*, que son las especies de microsporidios que se encuentran con mayor frecuencia en este tipo de pacientes. Para alcanzar los objetivos propuestos en esta investigación se colectaron muestras de heces de los pacientes referidos a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt en un período de 6 meses. A cada muestra se le realizaron las siguientes coloraciones: Calcofluor, Tricrómica modificada y Gram cromotropo, de las cuales se pudo observar que Calcofluor es mucho más efectiva que las otras 2 coloraciones, porque consume menos tiempo y reactivos, además facilita la observación e interpretación de los resultados ya que las esporas de los microsporidios fluorescen con esta tinción. Se analizaron un total de 108 muestras de heces diarreicas y no diarreicas, de las cuales se encontró 1 caso positivo para microsporidios el cual correspondía a una mujer de 36 años de edad, que presentaba diarrea de 3 días de evolución y con un máximo de 4 deposiciones por día, además la muestra no presentaba sangre pero si moco. El resultado fué confirmado por el Centro para el Control de Enfermedades. CDC, Atlanta. Georgia, E.E.U.U.

3. ANTECEDENTES

3.1 GENERALIDADES

Los microsporidios son parásitos protozoos intracelulares obligados, que afectan un gran rango de vertebrados e invertebrados. En 1857 estos parásitos fueron reconocidos como patógenos en gusanos (2), y mucho tiempo después fueron descritos como patógenos en humanos, además de otros hospederos que incluyen insectos, mamíferos y peces (2-5).

El primer caso de microsporidiosis humana fue reportado en 1959 (5), y sólo se han documentado 10 infecciones en humanos desde 1985, hasta que nuevas especies, como *E. bienewisi* fueron encontradas en pacientes con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) en Francia (6-8). Después de esto, muchas infecciones con microsporidios se han reportado en todas partes del mundo, y estos parásitos son reconocidos actualmente como patógenos comunes en pacientes con VIH (9-25).

El término microsporidia es una designación no taxonómica utilizada para organismos que pertenecen al filum Microspora. Este filum tiene 100 géneros con más de 1,000 especies. Pero sólo 6 géneros (*Enterocytozoon*, *Encephalitozoon* [incluyendo *Septata*] *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Vittaforma* y *Nosema*), son patógenos para los humanos.

Para pacientes con enfermedades infecciosas, el aislamiento microbiológico y técnicas de identificación proporcionan un diagnóstico rápido, pero esto no ocurre con los microsporidios los cuales requieren de cultivos celulares para crecer ya que son parásitos intracelulares obligados. La observación de los microsporidios en secreciones, secciones de tejido o ambas es comúnmente usado para el diagnóstico de esta infección. Sin embargo, el análisis ultraestructural por microscopía electrónica es necesario para la diferenciación de especies, ya que esta técnica es bastante sensible.

Durante los últimos 10 años, la detección de los agentes infecciosos se realiza usando métodos moleculares. Actualmente se usan técnicas moleculares para la detección, diferenciación y análisis filogenético de las especies que infectan al humano (9-25).

3.2 MORFOLOGIA

Todos los microsporidios son parásitos intracelulares obligados y no presentan estadios activos fuera de las células del hospedero. Los microsporidios presentan algunas características típicas de los eucariotes. El ribosoma (70S), subunidades ribosomales (30S y 50S), y rARNs (16S y 23S) son del tamaño de los procariotes. Carecen de mitocondria, peroxisomas y aparato de Golgi, pero presentan un sistema de membranas intracitoplásmicas y cromosoma separado por el huso mitótico; la poliadenilación ocurre en mARN (27,28).

- **Espora:** las esporas de los microsporidios miden entre 1 y 20 μm de largo. Las especies que infectan a los mamíferos son usualmente pequeñas, con diámetros de 1 a 3 μm . Las esporas están compuestas de 3 partes:
 - a. **Exospora:** con material electro-denso
 - b. **Endospora:** con quitina
 - c. **Membrana plasmática:** que encierra el citoplasma, el núcleo (algunas poseen 2 núcleos), una vacuola posterior, las membranas del polaroplasto y el aparato de extrusión. Este aparato consiste en un filamento polar y un disco de succión, que es característico de todos los microsporidios (Anexo 2, Figura 1). El número y el arreglo de los enrollamientos del filamento polar varía con el género y especie. Cuando las condiciones son apropiadas en el hospedero, el filamento polar penetra la célula e inocula el esporoplasma (material infectivo) (3,9-11).

3.2.1 CICLO VITAL

La infección da inicio cuando el estadio infectivo (la espora) ingresa al hospedero, y por influencia del aumento de pH y la presencia de polianiones, hay penetración de la pared de la espora por iones Ca^{+2} y las membranas del polaroplasto se hinchan, dando inicio a una serie de pasos que se detallan a continuación:

- **Merogonia:** en las células susceptibles del hospedero, los esporoblastos se convierten en merontes, los cuales pueden ser ovoides, irregulares o simplemente células elongadas con una pequeña diferenciación en el citoplasma, el cual está rodeado por una membrana plasmática. Los merontes pueden tener un solo núcleo o un diplocarion. Dentro de la célula del hospedero se dan divisiones repetidas por fisión binaria o fisión múltiple llamada merogonia. La división nuclear puede ocurrir conjuntamente con la división celular, produciendo formas plasmodiales multinucleadas (3,9-11).
- **Esporogonia:** los merontes se convierten en esporontes, los cuales se caracterizan por poseer una superficie densa. Esta superficie da lugar a la exospora de la espora. Los esporontes se multiplican por fisión binaria o múltiple, tienen 1 ó 2 núcleos y se dividen en esporoblastos que finalmente se convierten en esporas maduras. Los esporoblastos son cuerpos ovoides los cuales maduran a esporas, las cuales son liberadas a las secreciones o la conjuntiva y salen al medio ambiente para infectar nuevas células (3,9-11).

3.3 TAXONOMIA

El término microsporidios es una designación no taxonómica comúnmente usada para designar a organismos del *filum* Microspora, el cual contiene al subreino Protozoa (26-28). En 1882 Balbiani (29), clasificó a estos parásitos en grupos separados y los denominó Microsporidios. Antes de este siglo, la taxonomía utilizada era simple y no tomaba en cuenta muchos aspectos que hoy en día se conocen acerca de estos parásitos.

Subsecuentemente, la taxonomía de los microsporidios estuvo sujeta a varias modificaciones (26-28).

Larson (27), consideró que varias de las características usadas tradicionalmente para los sistemas taxonómicos (el diplocarión, la meiosis, etc.), no tomaban en cuenta otros aspectos relevantes. Por lo que Larson (27) creó un sistema, basado en las diferencias observadas en la morfología ultraestructural, y subdividió en categorías bien definidas a los microsporidios para crear un árbol que representara su filogenia. Weiser (32), basó su clasificación sólo en la posición de los núcleos en las esporas (1 en *Pleistophora* y 2 en *Nosema*), mientras que Issi (55), usó la morfología de la espora y los estadios. El sistema de clasificación propuesto por Sprague (26), en 1977 y modificado en 1982, fue la más utilizada (26,28). En este esquema los microsporidios fueron divididos en 2 grupos, basados en la presencia o ausencia de una membrana alrededor del parásito; la pansporoblastina (membrana presente) y apansporoblastina (membrana ausente) (26,28). Basados en este concepto, Sprague *et al.* (28), propusieron un sistema de clasificación en el cual las diferencias en el estado del núcleo y en el ciclo del cromosoma eran las características taxonómicas fundamentales (Anexo 3, Diagrama 1). El árbol filogenético construido en base, a la secuencia de ADN, muestra que esta y otras clasificaciones no reflejan las verdaderas relaciones entre los microsporidios y que deben ser completamente revisadas (26-28).

Se sugiere que los microsporidios son organismos muy antiguos ya que los datos sobre la secuencia de nucleótidos de pequeñas subunidades SSU rARN de los microsporidios aisladas de insectos (*Vairimorpha necatrix*) así lo demuestran (28). Datos de secuenciación del ADN respaldan esta tesis (30,31), pero los árboles filogenéticos construidos en base, a la secuencia de α y β -tubulina sugieren que los microsporidios están estrechamente relacionados con los hongos, posiblemente derivados de formas degeneradas (30,31).

Recientemente se identificó el gen Hsp 70 en *Nosema locustae*, *V. necatrix*, *E. hellem* y *E. cuniculi*, pero los análisis filogenéticos muestran que este gen está

estrechamente relacionado con el de la mitocondria de otros eucariotes, y por lo tanto sugieren que los microsporidios se desarrollaron de formas superiores (31).

Los genes SSU y LSU rARN se descubrieron en los microsporidios, incluyendo los 6 géneros que infectan a los humanos. La taxonomía de los microsporidios fue corregida significativamente cuando esta y una nueva secuencia de nucleótidos se desarrollaron para este fin. Por ejemplo, los análisis moleculares mostraron la reclasificación de *Septata intestinalis* dentro de *Encephalitozoon intestinalis*. Sin embargo, esta clasificación es controversial (28-31).

3.4 CARACTERISTICAS DE GENERO Y ESPECIE

3.4.1 *Enterocytozoon sp.*

Hasta la fecha, el único miembro en el género *Enterocytozoon*, es *E. bienewisi*. Este organismo se desarrolla en contacto directo con el citoplasma de las células del hospedero.

Los merontes a menudo presentan inclusiones electrolucidas, las cuales están presentes en todo el ciclo de vida. Los esporontes presentan filamento polar y disco de succión, los esporontes se convierten en esporoblastos. Los múltiples esporoblastos se forman por la invaginación de la membrana plasmática del plasmodio esporogonial. Las esporas son pequeñas y ovales, miden entre 1.1 a 1.6 μm por 0.7 a 1.0 μm , con 5 a 7 enrollamientos en el filamento polar dispuestos en 2 filas (Anexo 8, Tabla 6) (13,27).

E. bienewisi fue el primer microsporidio encontrado por Modigliani *et al.* (7), y descrito en detalle por Desportes *et al.* (6), en 1985 luego de examinar a un paciente haitiano de 29 años con SIDA, el cual presentaba diarrea crónica y vivía en Francia. Un caso similar fue descrito en Estados Unidos en el mismo año. Desde entonces, el número de casos reportados ha incrementado en Europa, Norte y Sur América, África y Australia (9-25). El parásito usualmente infecta los enterocitos intestinales de pacientes con VIH, pero también se ha detectado en células de la lámina propia del intestino en biopsias, en el árbol biliar, células del hígado, ducto pancreático, epitelio traqueal, bronquial y nasal (22,33-36,48).

El siguiente miembro de la familia Enterocytozoidae es *Nucleospora salmonis*, este microsporidio fue descrito originalmente por Hedrick *et al.* (48), en 1991, pero poco tiempo después fue descrito por Chilmonczyk *et al.* (65). Exámenes ultraestructurales muestran similitud entre *E. bieneusi* y *N. salmonis*, mostrando características de la familia Enterocytozoidae. Sin embargo, en contraste con *E. bieneusi*, *N. salmonis* crece más en el núcleo que en el citoplasma de las células y parasita con mayor frecuencia a los peces (38,46). Desportes-Livage *et al.* (6), describieron varias diferencias ultraestructurales en el desarrollo de estos 2 géneros, basados en la secuencia de rARN, reglas de taxonomía, morfología y la localización intranuclear del organismo (38,46).

3.4.2 *Encephalitozoon spp.*

Todas las especies de *Encephalitozoon* se desarrollan dentro de vacuolas. Los merontes se dividen por fisión binaria y usualmente permanecen en la membrana vacuolar. Los esporontes desarrollan una cubierta gruesa la cual proviene de la exospora, y los esporontes se subdividen en esporoblastos y posteriormente en esporas. Las esporas miden 2.0 a 2.5 μm por 1.0 a 1.5 μm y el filamento polar tiene de 5 a 7 enrollamientos dispuestos en una fila (Anexo 8, Tabla 6) (3,15,31,56).

E. cuniculi fue el primer organismo reconocido como parásito en mamíferos. El primer hallazgo se hizo en conejos en 1922 (45), y por Levaditi *et al.* (36), en 1923. Subsecuentemente ha sido detectado en varios hospederos mamíferos, incluyendo humanos (3,4). A la fecha, *E. cuniculi* es la especie más conocida de los microsporidios y mucho de lo que se conoce acerca de ellos se deriva de los estudios realizados en este organismo (3,4,45).

E. cuniculi y *E. hellem*, producen infecciones en el humano y por microscopía electrónica se determinó que son morfológicamente similares, por lo que se requiere de análisis antigénicos, bioquímicos y moleculares para su diferenciación (32,33).

Varios casos de infección por *Encephalitozoon* fueron reportados en pacientes con y sin SIDA en 1991 y fueron comprobadas por microscopía de luz y microscopía electrónica. Sin embargo en 1991 Didier *et al.* (34), usó métodos antigénicos y bioquímicos para

descubrir nuevas especies de *Encephalitozoon* (*E. hellem*), la cual fue encontrada en 3 pacientes con SIDA. Desde entonces publicaciones subsecuentes reportaron casos de infección en humanos producidas por *E. hellem*. Sin embargo en 1995 De Groote *et al.* (50), y Franzen *et al.* (68), reportaron infección diseminada causada por *E. cuniculi* en 2 hombres homosexuales con SIDA; la identificación fue confirmada por inmunofluorescencia. Recientemente *E. cuniculi* fue detectada en varios pacientes con VIH (21,33,49,59).

Una tercera especie de *Encephalitozoon*, *E. intestinalis*, infecta pacientes con VIH y fue descrita por Orenstein *et al.* (35,36) como un microsporidio parecido ultraestructuralmente al género *Encephalitozoon*. Más tarde fue clasificada dentro de un nuevo género y se llamó *Septata intestinalis*. Esta reclasificación es un poco controversial ya que *E. intestinalis* muestra una red fibrilar secretada durante su desarrollo (Anexo 2, Figura 1) (15,61).

3.4.3 *Nosema* spp.

La mayoría de especies de *Nosema* son parásitos de invertebrados (29,31). Su desarrollo toma lugar en contacto directo con el citoplasma de las células del hospedero, y su núcleo es diploide durante todo el ciclo de vida (29, 31).

Aunque los microsporidios de este género son parásitos encontrados en diversas especies, causan pocas infecciones en humanos, como la que se observó en un infante de 4 meses con deficiencia en el timo. En autopsias, se han encontrado numerosas esporas maduras e inmaduras, las cuales miden de 4.0 a 4.5 μm por 2.0 a 2.5 μm con núcleo diplocarión y con 10 a 12 enrollamientos en el filamento polar. Se encontró a *Nosema ocularum* en el estroma corneal de un hombre de 39 años (37).

Otro microsporidio se encontró en las células musculares de un paciente con VIH de 31 años. Las esporas de este microsporidio median de 2.5 a 2.9 μm por 1.9 a 2.0 μm , con 7 a 10 enrollamientos en el filamento polar. Estas características están estrechamente relacionadas con el género *Nosema* (48).

Otro de los miembros de este género fue identificado en materia fecal de un paciente con SIDA (29,31,37).

3.4.4 *Vittaforma* sp.

Las esporas de este microsporidio miden 3.7 μm por 1.0 μm y fueron recuperadas del estroma corneal. Las esporas presentan un filamento polar con 6 enrollamientos y un núcleo en arreglo diplocarión. En cultivo celular, se han identificado todos los estadios en el citoplasma de las células del hospedero. Este organismo fue asignado originalmente al género *Nosema* y fue llamado *N. corneum*. El cual fue transferido a un nuevo género y se denominó *Vittaforma corneae* (64,65). La reclasificación fue comprobada por secuencias del gen SSU rARN, la cual mostró la diferencia entre estos 2 géneros (52). En 1990, Davis et al. (14), reportó un hombre de 49 años con keratitis central unilateral progresiva de 18 meses de evolución (52).

3.4.5 *Pleistophora* spp y *Trachipleistophora* spp.

Pleistophora spp es un parásito común en pescados, y hay pocas infecciones reportadas en humanos. Se reportaron 3 casos de infección por *Pleistophora* en músculo esquelético en pacientes con VIH (17). El parásito se desarrolla dentro de la vesícula y producen una cubierta. Las esporas miden 2.0 a 2.8 μm por 3.0 a 4.0 μm con 10 a 12 enrollamientos del filamento polar (17).

El género *Trachipleistophora* es responsable de miositis, y se reportó una infección en un paciente con SIDA; se han encontrado organismos en córnea, músculo esquelético y en descargas nasales. Estos organismos fueron cultivados *in vitro* en un ratón atímico, y se observó que los merontes tienen de 2 a 4 núcleos y que se dividen por fisión binaria. En la esporogonia, la cubierta formada se separa de la membrana plasmática y forma la vesícula esporofora. Este parásito difiere del género *Pleistophora*, por que no forma un plasmodio esporogonial multinucleado en ningún estadio, por lo que este organismo se colocó en un nuevo género y se denominó *Trachipleistophora hominis* (45,61,62).

Recientemente, se reportaron 2 casos de infección con *Pleistophora*, el cual fue reclasificado como *T. antropophthera* (45,61,62).

3.4.6 Otros géneros.

El grupo de los microsporidios agrupa una gran variedad de especies, pero la posición taxonómica que cada uno ocupa es incierta ya que se desconocen muchos detalles de los mismos (28).

Las esporas de *Microsporidium ceylonensis* miden de 1.5 μm por 3.5 μm , fue aislado de una úlcera de córnea de un niño de 11 años de Sri Lanka. Las esporas de *Microsporidium africanum*, poseen un filamento polar con 15 a 16 enrollamientos, mide 4.5 μm por 1.5 μm y aún no se han identificado sus estadios. Se detectó en el estroma de la córnea de una mujer de 26 años en Botswana (37). Se han descrito otros géneros en invertebrados y en 5 clases de vertebrados. La evaluación de nuevos hospederos continúa incrementado el número de géneros y especies de microsporidios (37).

3.5 EPIDEMIOLOGIA

3.5.1 Prevalencia y distribución geográfica

Las infecciones en humanos con microsporidios se han reportado en todas partes del mundo (1,14,36,37,53,56,64,65). En personas sanas se han documentado sólo 35 casos de microsporidiosis (Anexo 4 y 5, Tabla 2 y 3) (40). Varios reportes de casos sospechosos no pudieron ser confirmados porque el material original se perdió ó porque la evaluación de este material mostró que el organismo responsable no era ningún miembro de los microsporidios (56,57). Algunos pacientes vivían ó viajaron a áreas tropicales o subtropicales (35,37,42,50). La infección intestinal causada por *E. bienewisi*, también fue reportada en 8 de 990 niños africanos que vivían en un área de baja prevalencia de VIH, pero el estatus serológico de estos niños hacia el VIH no se conocía (34). Las esporas de *Encephalitozoon* fueron detectadas en 20 de 225 muestras de heces de personas de las cuales se desconocía el estatus serológico para el VIH, estas vivían en México (33).

En todas partes los microsporidios se han observado como patógenos comunes que infectan pacientes con VIH (24,35), lo incierto es cuáles son las áreas más comunes para los microsporidios (tropicales o subtropicales). Se conoce poco acerca de la epidemiología

de los microsporidios, pero el descubrimiento de las infecciones autolimitantes con *E. bienewisi* y *E. intestinalis* en personas inmunocomprometidas sugiere que los microsporidios son patógenos comunes en los humanos (56). La distribución geográfica y la alta prevalencia en pacientes infectados con VIH sugieren que los microsporidios son parásitos naturales en el ser humano, causando enfermedad sólo en hospederos inmunocomprometidos. Recientemente los microsporidios han emergido como patógenos oportunistas en pacientes con órganos transplantados que son tratados con drogas inmunosupresoras (35).

Más de 1000 casos de microsporidiosis han sido documentados en pacientes con VIH, y en su mayoría fueron producidos por *E. bienewisi*. Entre un 2% a 50% de pacientes infectados con VIH, con inmunodeficiencia severa y recuentos de CD4 menores a 100/ μ l, presentan diarrea (13,40,43,55,65).

En pacientes que no presentan diarrea, se ha reportado ocasionalmente *E. bienewisi*. Rabeneck *et al.* (49), observó una diferencia poco significativa en la presencia de microsporidios en pacientes con (18 de 55 [33%]) y sin (13 de 51 [25%]) diarrea crónica. Sin embargo estos aspectos no fueron comprobados por otros investigadores. Se observó que, como con otros parásitos, la presencia de 2 o más especies de microsporidios incrementa la intensidad de la infección y los síntomas clínicos. La microsporidiosis intestinal puede ser una infección común en humanos y puede existir en forma latente (30,37,48,51,55).

La infección con otras especies de microsporidios se han reportado con poca frecuencia, pero más de 100 casos de infecciones humanas con *Encephalitozoon spp* han sido documentadas (63-65), recientemente *E. cuniculi* fue detectada en pacientes con VIH y en pacientes sanos (63-65).

Infecciones en humanos con otras especies (*N. connori*, *N. ocularum*, *V. corneae*, *Pleistophora spp*, *T. hominis*, *T. antropophthera*, *M. ceylonensis* y *M. africanum*) han ocurrido eventualmente en unos cuantos pacientes y por lo tanto representan eventos oportunistas casuales (63).

3.5.2 Fuente de infección y transmisión

Las rutas de transmisión y las fuentes de infección de la microsporidiosis humana han sido difíciles de dilucidar. Basados en la distribución de las lesiones, son posibles las rutas de infección oral, respiratoria y ocular (59-67).

Los microsporidios son liberados al exterior a través de las heces, orina y secreciones respiratorias. También se ha observado que personas y animales infectados son posibles fuentes de contaminación. La transmisión persona a persona de microsporidiosis puede ser importante, ya que se reportó en el compañero sexual de un hombre con VIH y con microsporidiosis intestinal causada por *E. intestinalis*. En un estudio en un caso control la microsporidiosis fue asociada con homosexualidad, por lo que se consideró que esta puede ser una ruta de infección.

No se considera que la microsporidiosis sea una zoonosis, aunque se han identificado cepas de *E. cuniculi* y *E. bienewisi* de diferentes hospederos y muestras ambientales, no existen pruebas documentadas de la transmisión de animales a humanos, con la excepción del caso de una niña de 10 años con seroconversión luego de un estrecho contacto con un perro infectado con *E. cuniculi* (61). Los reservorios animales de los microsporidios y que infectan a humanos se presentan en el Anexo 6, Tabla 4. *E. cuniculi* se encuentra comúnmente en varios mamíferos, y *Encephalitozoon spp* en aves, al igual que *E. hellem*. *E. intestinalis* fue encontrado en diferentes mamíferos (perro, cerdo, vaca y cabra) y *E. bienewisi* fue encontrado en muestras de cerdo y perros. Análisis moleculares en humanos, conejos, perros, ratones y zorros mostraron aislamientos de *E. cuniculi* del mismo subtipo en humanos y el mismo para perros y conejos (53).

Se ha encontrado microsporidios en muestras tomadas de la superficie del agua. Los resultados de estudios recientes con técnicas moleculares indican la presencia de *E. intestinalis*, *E. bienewisi* y *V. corneae* en agua de desecho, agua superficial y agua usada en granjas en Francia y Estados Unidos. Los factores de riesgo para una microsporidiosis intestinal sugieren que el agua es una fuente de infección (24). En un estudio de casos y

controles, los 2 factores asociados con microsporidiosis intestinal fueron la homosexualidad y nadar en piscina, ambos sugieren que el modo de transmisión es la vía feco-oral (24).

3.5.3 Manifestaciones Clínicas

La microsporidiosis es una infección emergente con variedad de manifestaciones clínicas. El espectro de enfermedades incluyen: infecciones gastrointestinales, pulmonares, nasales, musculares, cerebrales y sistémicas (Anexo 7, tabla 5). La microsporidiosis podría ser considerada en el diagnóstico diferencial de pacientes VIH sintomáticos (37-41).

3.5.3.1 Infección gastrointestinal y del tracto biliar

La mayoría de infecciones intestinales reportadas en pacientes con VIH, fueron producidas por *Enterocytozoon bienewisi*. Este organismo es común en pacientes con severa inmunodeficiencia, con recuento de CD4 menor a 100/ μ l (16). Este parásito causa diarrea severa, no sanguinolenta, sin moco, con más de 10 deposiciones diarias, pérdida de peso lenta y progresiva, malabsorción de D-xilosa y vitamina B12 (54-61). La infección intestinal se asocia con deficiencia de lactasa y reducción de la actividad de la fosfatasa alcalina y la α -glucosidasa en la parte basal de las vellosidades, además también se observa reducción de las vellosidades superficiales. La diarrea aparece gradualmente y continua durante meses. Los pacientes a menudo se niegan a comer y presentan náusea. Varios pacientes presentan diarrea intermitente, otros no presentan diarrea y la excreción de esporas es baja. En grupos de pacientes con diarrea crónica, negativos para otros patógenos entéricos, la prevalencia de *E. bienewisi* fue entre 7% y 50% (23,24). Varios pacientes presentan coinfección con otros patógenos, siendo en su mayoría *Cryptosporidium* (23).

La infección del tracto biliar producida por *E. bienewisi*, con o sin celulitis, se ha observado en pacientes con VIH y con colangiopatías (38).

La diseminación de *E. bienewisi* es poco común, pero se ha detectado en las células de la lámina propia del duodeno, en lavado broncoalveolar, en biopsias bronquiales y en los senos nasales de pacientes con VIH (37-41).

Infecciones intestinales con *E. bienewisi*, en pacientes sin SIDA se han reportado en varios países: un paciente con enfermedad crónica, una mujer africana con enfermedad cardíaca, un paciente con enfermedad congénita del sistema linfático, otro con recuento bajo de CD4 y 2 pacientes inmunosuprimidos, el resto de los pacientes estaban sanos (Anexo 4 y 5, Tabla 2 y 3).

Igual que *E. bienewisi*, *E. intestinalis* causa enteritis con diarrea, pérdida de peso y malabsorción. Además de las infecciones intestinales este parásito puede afectar el tracto y la vesícula biliar produciendo colangitis y colecistitis. Regularmente produce infecciones diseminadas, que involucran el tracto urinario y los riñones. Franzen *et al.* (23), describió un paciente con SIDA y con infección diseminada producida por *E. cuniculi*, esta infección no presentaba síntomas gastrointestinales. En personas sin VIH, se han reportado 3 casos de infección intestinal por microsporidios, producidas en su mayoría por *Encephalitozoon spp.* También es importante mencionar que el tratamiento de estos pacientes con albendazol elimina las esporas en las heces, pero los síntomas clínicos persisten (37-41).

3.5.3.2 Hepatitis, Pancreatitis y Peritonitis

Un paciente de 35 años con VIH del sur de Florida presentó Hepatitis causada por *E. cuniculi*, este paciente presentaba un recuento de linfocitos CD4 de 48/ μ l, también presentaba fatiga, diarrea y pérdida de peso, posteriormente desarrolló fiebre y murió por necrosis hepatocelular. La autopsia confirmó el diagnóstico de hepatitis por microsporidios.

Un caso de peritonitis producido por *E. cuniculi* fue descrito en un hombre de 45 años, VIH positivo, con un recuento de linfocitos CD4 de 57/ μ l. El paciente había perdido 13 Kg durante el último año y fue tratado con trimetoprim-sulfametoxazol, ya que presentó neumonía por *Pneumocystis carinii*. Al finalizar la terapia, desarrolló fallo renal. El paciente murió y la autopsia reveló la presencia de *E. cuniculi*. Los reportes de estos casos fueron publicados antes de descubrir a *E. hellem* como nueva especie. En ambos casos, el diagnóstico fue hecho en base, a la ultraestructura del organismo, por lo que la identificación de la especie es incierta (35,40).

3.5.3.3 Infecciones Oculares

Además de las infecciones gastrointestinales, la microsporidiosis ocular es la manifestación más común de los microsporidios en humanos (37).

En pacientes VIH positivo, la keratoconjuntivitis es causada por 3 especies de *Encephalitozoon spp* (*E. hellem*, *E. cuniculi* y *E. intestinalis*) (44-60). La mayoría de pacientes presentan inflamación bilateral de la conjuntiva y además exhiben keratopatía epitelial bilateral, con disminución de la agudeza visual. La keratoconjuntivitis es a menudo asintomática o moderada, en algunas ocasiones puede ser severa, y raramente forma úlceras en la córnea (37).

Otras especies, que pueden producir infecciones oculares son: *Nosema corneum*, que en base, a datos ultraestructurales se colocó en un nuevo género y se llamó *Vittaforma corneae* (24), *Nosema ocularum* (44), *Microsporidium ceylonensis* y *Microsporidium africanum* (50).

3.5.3.4 Sinusitis

La sinusitis es una manifestación común de la microsporidiosis humana. Las 3 especies de *Encephalitozoon spp* causan rinosinusitis en pacientes con VIH. *E. bienensii* y *T. hominis* también se han detectado en biopsias de estos pacientes (23).

3.5.3.5 Infecciones pulmonares

Las infecciones pulmonares con microsporidios se han reportado con menor frecuencia que otras manifestaciones. La infección en el tracto respiratorio bajo puede ser asintomática o asociada con bronquiolitis, raramente se asocia con neumonía o fallo respiratorio en pacientes con VIH (33,45,46,51,62,63).

3.5.3.6 Infecciones del tracto urinario

Las infecciones diseminadas del tracto urinario son comunes en pacientes con VIH y en la mayoría de pacientes son producidas por *Encephalitozoon*. La presentación clínica y las consecuencias de la presencia de microsporidios en el sistema urinario pueden variar; los pacientes pueden ser asintomáticos con o sin microhematuria, pueden presentar cistitis

y nefritis intestinal con disuria y hematuria, o pueden experimentar fallo renal progresivo (21,44,50).

3.5.3.7 Miositis

Se han reportado 4 casos de miositis por *Pleistophora* en pacientes inmunocomprometidos (16,66,38).

3.5.3.8 Infecciones cerebrales

Se han reportado 2 casos de infección diseminada por *Encephalitozoon* spp, el primero en un niño japonés de 9 años y el otro en un niño colombiano de 2 años. Ambos pacientes presentaban síntomas cerebrales con dolor de cabeza, vómitos y convulsiones.

Se encontró *Encephalitozoon* en la orina de ambos pacientes y en el fluido cerebroespinal de uno de ellos. La diferenciación exacta de las especies de los 2 parásitos es incierta (38).

La microsporidiosis cerebral debido a *E. cuniculi* fue recientemente descrita por Weber *et al.* (39), en un hombre de 29 años con SIDA y un recuento de CD4 de 0/ μ l (38).

3.5.3.9 Manifestaciones poco frecuentes

Dos casos de uretritis asociados a microsporidios fueron reportados en pacientes con SIDA (27). Se detectaron las esporas de *Encephalitozoon* en secreción uretral, pus y heces, descarga nasal, esputo y orina en uno de los pacientes. Ambos fueron tratados con albendazol y los síntomas desaparecieron (27).

Un absceso prostático debido a *E. hellem* fue encontrado en un paciente con SIDA y con infección diseminada. La próstata de 1.5 por 1.8 cm, contenía un absceso periuretral central con tejido prostático necrótico. La coloración de Gram del tejido reveló esporas de microsporidios Gram positivo, las cuales correlacionaron con *E. hellem* por fluorescencia indirecta (38).

Una ulceración poco profunda de 1 cm en el dorso de la lengua, fue observada en un paciente con VIH y severa inmunodeficiencia (CD4 15/ μ l), e infección diseminada debido a *E. cuniculi*. Las esporas fueron identificadas en varias muestras de tejido de la úlcera, y fueron confirmadas por inmunofluorescencia, cultivos *in vitro* y análisis moleculares del gen

Ssu rARN. El paciente fue tratado con albendazol y los síntomas resolvieron en 2 meses (38).

Se reportó un caso de microsporidiosis cutánea nodular en un paciente, la cual resolvió con clindamicina oral (38).

3.5.4 Infecciones sistémicas.

El primer caso de infección humana por microsporidios fue un caso de infección diseminada, en un niño japonés de 9 años, quien sufría de fiebre recurrente, dolor de cabeza, vómitos y convulsiones. Este caso fue reportado en 1959. Se encontró a *Encephalitozoon* en el fluido cerebroespinal y en la orina. El paciente fue tratado con sulfisoxazol y penicilina (44).

Las infecciones diseminadas con todas las especies de *Encephalitozoon spp*, son ahora reconocidas en varios pacientes con VIH severamente inmunosuprimidos, usualmente con recuentos de CD4 menores a 100/ μ l. El espectro de enfermedades es amplio e incluye: keratoconjuntivitis, bronquiolitis, neumonía, sinusitis, nefritis, uretritis, cistitis, prostatitis, hepatitis, peritonitis, gastroenteritis y colangitis, pero hay claras diferencias en la distribución típica de cada especie de microsporidios. *E. hellem* parasita mayormente la keratoconjuntiva, el tracto urinario, los senos nasales y el sistema bronquial, y *E. intestinalis* se encuentra en el tracto gastrointestinal y biliar con diseminación a los riñones, ojos, senos nasales y tracto respiratorio; finalmente *E. cuniculi* causa infecciones diseminadas envolviendo todos los sistemas, pero las manifestaciones clínicas son variadas (Anexo 7, Tabla 5) (44,50,52,62,47).

3.6 Terapia

El tratamiento de microsporidiosis para los pacientes inmunodeficientes es limitado. Varios cultivos *in vitro* y modelos animales han sido utilizados para identificar el potencial antimicrobiano para el tratamiento de la microsporidiosis. Algunas drogas controlan los niveles de infección de microsporidios en hospederos invertebrados; estos incluyen la fumagilina, que es producida por *Aspergillus fumigatus*, y el itraconazol para el control de

Nosema apis en abejas (43). Sin embargo las investigaciones *in vitro* con *Nosema bombycis* no muestran ningún efecto del itraconazol y del metronidazol en células infectadas o en esporas maduras. Por otro lado el albendazol produce cambios en la ultraestructura de los microsporidios (54,63).

Otros modelos *in vitro* usados para evaluar la efectividad de la droga incluyen las 3 clases de *Encephalitozoon*. Estos estudios mostraron que el albendazol, la fumagilina, el 5-fluorouracil, la esparfloxacina, el oxibendazol y el isotionato de propamidina, inhiben el crecimiento de *E. cuniculi* en cultivos celulares. La cloroquina, la pefloxacina, la azitromicina, la rifabutina y el tiabendazol, son particularmente efectivos en altas concentraciones. Arprinocid, metronidazol, minociclina, doxiciclina, itraconazol y difluorometilornitina no se evaluaron, ya que las concentraciones que inhiben a los microsporidios son tóxicas para las células en el cultivo celular. La pirimetamina, piritrexim, sulfonamidas, paranomicina, roxitromicina, atovaquone, flucitosina, toltrazuril, ronidazol y ganciclovir son inefectivas (43). La germinación de esporas de *E. hellem* y *E. intestinalis* fue inhibida por nifedipina, metronidazol y óxido nítrico, además la germinación de las esporas de *E. hellem* también fue inhibida por citochalasin D, demecolcina e itraconazol (43). Un análogo semi-sintético de la fumagilina, TNP-470, fue efectivo contra *Encephalitozoon spp* y *V. corneae* en cultivo celular. *In vivo* la eficacia del albendazol, fumagilina y el TNP-240 contra *E. cuniculi* fue demostrada experimentalmente en un ratón atímico y en conejos (43,44).

Basados en los estudios *in vitro*, varias drogas se han utilizado para el tratamiento de infecciones en microsporidios. Varios estudios han demostrado que el albendazol es efectivo para tratar la infección por *Encephalitozoon* en pacientes con VIH, y que erradica al parásito por completo. Sin embargo, varios pacientes recaen después de la terapia, por lo que se requiere de una terapia prolongada. En algunos pacientes con VIH, se reportó la resolución de los síntomas con el uso de fumagilina. Se observó que el itraconazol es inefectivo para prevenir la infección por *E. bienewisi* en pacientes con SIDA. La

keratoconjuntivitis por *Encephalitozoon spp* en pacientes con SIDA responde a la aplicación tópica de isotionato de dibromopropamidina (43).

La desaparición de la diarrea causada por *E. bienewisi* se ha logrado con metronidazol, pero las biopsias muestran que los microsporidios persisten, y otros investigadores no observaron ninguna respuesta después del tratamiento. A pesar de una respuesta clínica notable con atovaquone (45) en pacientes con SIDA e infección intestinal por *E. bienewisi*, no se observó una disminución considerable de los parásitos en heces ni en biopsias. La fumagilina también fue usada para eliminar a *E. bienewisi* de las heces de 3 pacientes, pero se observó que la droga es tóxica y causa trombocitopenia. Como se mencionó anteriormente, el TNP-470, es un análogo semi-sintético de la fumagilina y es menos tóxico, y es igual de efectivo que la fumagilina contra varias especies de microsporidios *in vitro*, por lo que promete ser un nuevo antimicrosporidio (43,44).

Se ha utilizado la talidomida para tratar la diarrea producida por *E. bienewisi*. Varios pacientes responden a esta terapia. La terapia antirretroviral combinada incluye un inhibidor de proteasa el cual restaura la inmunidad hacia los microsporidios (46,47). Sin embargo, en pacientes con valores decrecientes de linfocitos CD4 la infección por microsporidios no se erradica. Por último es importante mencionar que *E. bienewisi* no responde al tratamiento con albendazol, mientras que *Encephalitozoon spp* si lo hace.

3.7 Métodos de diagnóstico

El diagnóstico de las microsporidiosis humanas depende de la identificación de las esporas en las muestras clínicas (heces, líquido biliar o duodenal, orina, fluido broncoalveolar, esputo, descarga nasal o biopsias de tejido). La detección de las esporas en las muestras clínicas es laborioso y consume tiempo ya que los pequeños organismos pueden perderse fácilmente. El diagnóstico definitivo de los microsporidios requiere de microscopía electrónica, pero durante los últimos años se han descubierto métodos de tinción, que pueden usarse para el diagnóstico (48,49).

Dentro de los métodos de tinción utilizados con mayor frecuencia en la actualidad se encuentra el cromotropo desarrollado por Weber *et al.* (32), el cual mejora la detección de esporas en muestras de heces y fluidos del cuerpo, esta técnica implica una modificación de la tinción tricrómica con una concentración de cromotropo 2R, 10 veces más alta que la tinción tricrómica original (54), en ésta las esporas de los microsporidios se observan rojoroso. Usualmente las esporas presentan características propias cuando se observan bajo un aumento de 1000x. La pared de la espora se tiñe intensamente de rojo, y muchas esporas muestran un cinturón diagonal o ecuatorial (54). Esta tinción es larga, y es difícil detectar las esporas cuando hay unas cuantas en la muestra. Varias modificaciones (cambios en la temperatura y en el tiempo de tinción, disminución en el nivel de ácido fosfotungstico, etc.), se han realizado para disminuir el tiempo del proceso y mejorar el contraste entre las esporas y el fondo. La técnica improvisada del Gram-cromotropo caliente presenta varias ventajas para la tinción de los microsporidios. En este procedimiento, las muestras se tiñen en solución de cristal violeta y tintura de yodo usada en la tinción de Gram y luego se calienta la solución de cromotropo modificado a 50-55°C. Con esta tinción, las esporas de los microsporidios se tiñen de violeta contra un fondo verde, y el tiempo total de tinción es de 5 minutos, en conclusión esta tinción es rápida y simple, además se puede adaptar fácilmente a laboratorios clínicos (53,54).

El calcofluor blanco produce mejor contraste y es la tinción de primer elección. El procedimiento de tinción es fácil y rápido, pero el examen requiere de un microscopio de fluorescencia con un filtro de 350-380 nm y un objetivo de 1000x. En esta tinción el fluorocromo se enlaza a la quitina de la endospora, y cuando se excita bajo la luz UV, el enlace fluoresce en el espectro visible. Las esporas se identifican por sus medidas, formas y las propiedades de tinción (55).

Otras tinciones utilizadas: existen varias modificaciones de la tinción fluorescente con Uvitex 2B, originalmente descritas por van Gool *et al.* (56), las cuales fueron introducidas para usarse en preparaciones de especímenes citológicos, fluidos y material

embebido en parafina. El Uvitex 2B fue usado muchos años atrás para detectar los microsporidios en tejidos (55).

Aunque la tinción fluorescente parecía más sensible que la tricrómica modificada, esta mostró varios resultados falsos positivos, debido a la similitud de pequeñas levaduras en la tinción (47,49,57). En adición, otros estudios no demostraron sensibilidad superior de la tinción fluorescente sobre la tricrómica modificada. Varios autores concluyen que las 2 tinciones podrían usarse simultáneamente para obtener mayor exactitud, especialmente en pacientes con infecciones ligeras, ya que el número de microsporidios en muestras clínicas puede ser muy pequeño (47,49,57). Las técnicas fluorescentes penetran rápido y fácilmente en los tejidos y la sensibilidad es alta. Una gran ventaja de esta tinción es que se puede combinar con otras técnicas.

El pequeño tamaño de las esporas se puede visualizar por microscopía de luz, lo cual depende del contraste entre las esporas y el contenido celular de la muestra, se recomienda el uso de la tinción hematoxilina-eosina para visualizar los parásitos en tejidos.

La tinción de tejidos con Gram, café-Brenn o café-Hopps, se usan para identificar a los microsporidios en secciones de tejido embebidas en parafina. Las esporas de microsporidios se tiñen en forma variable con el Gram, pero en la mayoría de casos se tiñen azul o rojo contra un fondo café-amarillo. Se puede utilizar Giemsa, cromotropo 2R o fluorocromo para el diagnóstico de microsporidiosis intestinal, pero estas técnicas requieren de material fresco (54).

Otros métodos utilizados para el diagnóstico de la microsporidiosis humana incluyen la microscopía electrónica, microscopía de luz, cultivos celulares, pruebas serológicas, modelos animales, métodos moleculares etc.

Debido al pequeño tamaño de los organismos y por las pobres técnicas de tinción, inicialmente el diagnóstico definitivo de la microsporidiosis requería el examen ultraestructural de biopsias de tejido, fluidos del cuerpo, o muestras de heces por microscopía electrónica. La visualización de la ultraestructura de las esporas con su característico filamento polar es diagnóstico. Los microsporidios pueden identificarse por

género y especie basándose en la estructura de las esporas, las formas proliferativas y los métodos de división. En tejidos, todos los estadios del ciclo de vida se pueden observar, pero en fluidos o en heces sólo se observan las esporas (28).

El examen histológico de biopsias o el examen citológico de fluidos del cuerpo por microscopía de luz permite el diagnóstico de la infección por microsporidios, pero la identificación de género y especie por este método no es posible.

La detección de los microsporidios por microscopía electrónica es bastante específica, pero la técnica es poco sensible, especialmente en fluidos corporales y muestras de heces (28).

3.7.1 Cultivo celular

El cultivo celular *in vitro* de varias especies de microsporidios que infectan a los humanos ha proporcionado mucha información, para entender aspectos biológicos de la relación entre la célula del hospedero y el parásito. Los cultivos *in vitro* se han usado para probar el efecto de agentes antimicrobianos en varias especies de microsporidios incluyendo *E. cuniculi*, *E. hellem* y *E. intestinalis* (50,51,55). Los cultivos *in vitro* combinados con análisis ultraestructurales, bioquímicos y moleculares, se han utilizado para confirmar las infecciones existentes por microsporidios, como también para definir nuevas especies (50,51,55).

Los microsporidios se han cultivado en un gran número de líneas celulares de mamíferos, incluyendo células del riñón de monos y conejos (Vero y RK13), fibroblastos pulmonares fetales de humano (MRC-5), células MDCK, y otras líneas celulares. Se han cultivado *in vitro* una gran variedad de especímenes humanos, incluyendo a *E. hellem*, *E. cuniculi*, *E. intestinalis*, *V. cornea* y *T. hominis*. En sistemas de cultivos (fibroblastos pulmonares humanos y células Vero), se observó a *E. bienewisi* ejerciendo un efecto citotóxico, el cual también se observó en cultivo celular con *Encephalitozoon spp.* La incapacidad de crecer en cultivo continuo de *E. bienewisi*, refleja la necesidad del

organismo de requerimientos nutricionales específicos que no proveen los cultivos celulares usados (50).

3.7.2 Modelos animales

Los modelos animales han proporcionado las bases para el estudio de la respuesta inmune y para evaluar métodos de diagnóstico, vacunas, terapéutica y rutas de transmisión y son esenciales para producir anticuerpos poli y monoclonales (7,9,59,60). Varios modelos animales se han establecido para estudiar la infección por microsporidios en humanos. La mayoría de los modelos usan a *E. cuniculi* como patógeno, ya que este organismo se ha reconocido como causa importante de infección latente en roedores (50,51).

El ratón SCID se infectó por inoculación oral con esporas de *E. cuniculi*. Este modelo animal fue usado para estudiar la eficacia *in vivo* del albendazol contra este organismo. Los modelos animales para la infección con *E. bienewi* son difíciles de establecer, y por lo tanto no se han logrado resultados confiables (43).

3.7.3 Métodos inmunológicos

Los anticuerpos poli y monoclonales son herramientas útiles para la diferenciación de especies de microsporidios en muestras clínicas, también se han utilizado técnicas de tinción para los anticuerpos, pero estas son menos sensibles.

Se han usado anticuerpos específicos en la prueba de inmunofluorescencia para el diagnóstico y diferenciación de las especies de microsporidios, con anticuerpos poli y monoclonales para identificar las especies de microsporidios por Western blot (55).

Por inmunofluorescencia los anticuerpos policlonales usados contra *E. hellem*, *E. cuniculi* y *E. intestinalis* producidos en ratones o conejos mostraron que varias especies de microsporidios presentan reactividad cruzada (59,60). La reactividad cruzada del antisuero policlonal contra *Encephalitozoon spp* fue usada para la detección de varias especies de microsporidios incluyendo a *E. bienewi* en muestras clínicas. Sin embargo, la reactividad

cruzada del antisuero limita su uso diagnóstico, ya que la diferenciación de especies no es posible con este método (59).

Se han desarrollado anticuerpos monoclonales para *E. hellem*, *E. cuniculi* y *E. intestinalis*, algunos de estos anticuerpos monoclonales son específicos para los antígenos de las esporas, en otras investigaciones se usan anticuerpos monoclonales de la proteína reactiva del filamento polar en combinación con los anticuerpos monoclonales para reconocer la superficie de la espora (60).

Algo importante de mencionar es que no se han desarrollado anticuerpos específicos contra *E. bienewisi* (59,60).

Una gran variedad de pruebas serológicas (inmunofluorescencia indirecta, ELISA, contrainmunolectroforesis y Western blot), se han desarrollado para detectar anticuerpos IgG e IgM, especialmente para *E. cuniculi*. De estos ensayos, la inmunofluorescencia indirecta y ELISA son probablemente los más usados (49,55).

Exámenes serológicos para anticuerpos de *E. cuniculi*, sugieren un posible vínculo entre la exposición a un medio tropical e infección con microsporidios. Un estudio en hombres homosexuales en Suiza reporta que 33% son seropositivos para anticuerpos contra *E. cuniculi*; todos estos pacientes seropositivos en alguna ocasión visitaron un área tropical. Un alta seroprevalencia de anticuerpos contra *E. intestinalis* se observó en donadores sanguíneos en un 8% en mujeres embarazadas 5% y otros con enfermedades infecciosas en un 4%. Se ha observado reactividad cruzada entre los anticuerpos de *Encephalitozoon spp* y los de *E. bienewisi*, aunque no se sabe la causa (59).

Sin embargo, los métodos serológicos no se utilizan como herramienta para el diagnóstico, porque los sueros de los pacientes sin un historial clínico de infección por microsporidios, presentan títulos positivos (59).

3.7.4 Métodos moleculares

Los estudios moleculares sobre los microsporidios son precarios, comparados con otros eucariotes. Los microsporidios tienen genomas extremadamente pequeños, a menudo

en el rango de los genomas bacterianos. Estudios con electroforesis en gel del cariotipo de diferentes especies de microsporidios muestran que el genoma haploide usualmente es de 5.3 a 19.5 pb, este dato se obtuvo al medir el genoma de *Glugea atherinae*. Sin embargo, el genoma haploide de *E. cuniculi* fue estimado en 2.9 pb, el cual es considerado el más pequeño de los microsporidios (56-58).

3.7.4.1 Genes de microsporidios, subunidad rARN larga y corta.

Aunque los microsporidios son verdaderos eucariotes con un núcleo, sistema de membranas intracitoplásmicas y separación de cromosomas por el huso mitótico, sus genes rARN muestran características relacionadas con secuencias procarióticas. Estos están compuestos de 16S SSU rARN y 23S LSU rARN. Como en los procariotes, los microsporidios tienen el gen LSU rARN cuya región 5' corresponde a 5.8S rARN de los eucariotes. Los genes SSU y LSU rARN son más pequeños que los genes de los eucariotes y carecen de varias secuencias universales (56-58).

3.7.4.2 Los genes α y β -tubulina de los microsporidios

Los genes de la familia tubulina son 3: α , β y γ -tubulina. La α y β -tubulina son las más abundantes en las células de los eucariotes y se han estudiado extensivamente.

Los microtúbulos son característicos de los organismos eucarióticos, y forman la mayoría de los componentes del citoesqueleto y del huso mitótico. Los microtúbulos se forman por la polimerización de la tubulina, es cual es un dímero de las subunidades α y β -tubulina que presentan aproximadamente 400 aminoácidos de largo (58).

El Southern blot indica que *E. cuniculi*, *E. hellem* y *E. intestinalis* poseen una copia simple del gen β -tubulina (58,60).

3.7.5 Técnicas de aislamiento de ADN

El ADN de los microsporidios se extrae fácilmente de las muestras de tejido o de cultivos *in vivo* por procedimientos de rutina como la digestión de proteinasa K, seguido por

una extracción de fenol-cloroformo y precipitación con etanol o por métodos de purificación de ADN con kits comerciales como el de Minipreps magic o OIAmp para tejidos (60).

El aislamiento de ADN de las esporas de microsporidios es más difícil ya que se requieren de condiciones drásticas para romper la pared de las esporas. La disrupción mecánica de las esporas se puede realizar con cuentas de vidrio en combinación con la digestión con proteinasa K. Varios autores recomiendan una incubación adicional con enzimas que disuelvan la quitina (quitinasa o líticas), ó también se puede calentar la muestra para desnaturalizar el ADN de las esporas (60,62).

3.7.6 Técnicas moleculares para el diagnóstico y diferenciación de especies

Actualmente se ha utilizado el PCR para amplificar diferentes regiones del gen SSU rARN, así como la región del espacio intergénico, para facilitar el diagnóstico y diferenciación de especies de microsporidios que infectan a humanos y animales.

A la fecha, la hibridación *in situ* se ha utilizado ocasionalmente para el diagnóstico de microsporidios (63).

Los primers V1 y SI 500 se usaron para clonar secuencias del gen SSU rARN de *E. intestinalis*, de muestras de fluidos corporales, tejidos, muestras de heces y cultivos celulares. Para confirmar la identidad de los productos obtenidos en el PCR, se usó un oligonucleótido llamado 18-mer (SI 60), el cual fue usado por Weiss *et al.* (57), en combinación con el primer SI 500, además estos fueron utilizados por otros investigadores (63).

Se estudiaron 46 pacientes con VIH y con diarrea, de los cuales el PCR dió resultados positivos para *E. intestinalis* en 10 pacientes, en 5 casos se observó infección con *E. bienersi*. El examen histológico por microscopía de luz mostró esporas de microsporidios en todos los casos, pero fue incapaz de distinguir las especies causantes de estas infecciones (49).

El primer PMP1 (la secuencia de nucleótidos de este primer es idéntica a la del primer V1) y el PMP2 se usaron para la detección de cuatro microsporidios patógenos que

infectan humanos (*E. bienersi*, *E. hellem*, *E. cuniculi* y *E. intestinalis*). Estos primers se utilizaron para determinar ADN de cultivos celulares y de muestras de heces, así como de otras muestras clínicas incluyendo biopsias gastrointestinales (63). La aplicación de métodos como el PCR se puede utilizar para procesar gran número de muestras y para definir aspectos epidemiológicos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente la identificación de los microsporidios por microscopía de luz, debe confirmarse por técnicas moleculares para la diferenciación de especies (64-67).

4. JUSTIFICACION

Es importante mencionar que actualmente no existen reportes del hallazgo de microsporidios en Guatemala, el cual constituye un grupo de parásitos emergentes que se encuentran cada vez con más frecuencia como causantes de infecciones oportunistas en personas inmunosuprimidas, tal es el caso de aquellas personas que tienen VIH y/o SIDA, así como en personas sin VIH e inmunosupresión.

El número oficial de casos de SIDA en Guatemala, representa sólo una estimación debido a la falta de vigilancia y a la falta de educación de la población en general.

Otro aspecto importante de mencionar es que en Guatemala la transmisión del SIDA está diseminándose a la comunidad heterosexual, lo cual constituye un hecho de gran impacto socioeconómico para la población guatemalteca.

Según estudios realizados, la prevalencia de VIH para el año 2000 en Guatemala será de 1.09%, lo cual representa 25,560 nuevos casos en la población. Además se estima que habrá un aumento en la prevalencia de SIDA en la población comprendida entre los 20 a 24 años y que el número anual de casos de SIDA para este estimado, será de 10,800 personas. El dramático aumento de los casos de VIH y/o SIDA reportados en Guatemala en los últimos años, ha promovido la necesidad de realizar estudios que ayuden a mejorar el entendimiento de la naturaleza de la enfermedad. Es por esto que es necesario estandarizar métodos que contribuyan a identificar con facilidad parásitos como los microsporidios, para el diagnóstico de las infecciones causadas y de esta forma mejorar la calidad de vida de las personas con VIH y/o SIDA.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Determinar la prevalencia de microsporidios en muestras de heces diarreicas y no diarreicas de pacientes con VIH y/o SIDA, que asisten a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt.

5.2 ESPECIFICOS

Demostrar la presencia de las infecciones intestinales causadas por microsporidios, en los pacientes con VIH y/o SIDA que asisten a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt.

Identificar factores de riesgo relacionados con infecciones por microsporidios, en los pacientes con VIH y/o SIDA que asisten a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Universo:

Personas con VIH y/o SIDA que asistieron a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt.

6.1.1 Muestra:

108 pacientes con VIH y/o SIDA que asistieron a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt

6.2 Recursos

6.2.1 Recursos Humanos:

- a. Investigador: María de los Angeles Medina Monzón
- b. Asesor: María Beatriz López

6.2.2 Recursos Institucionales:

Hospital Roosevelt

Laboratorio de parasitología, Universidad del Valle de Guatemala.

6.2.3 Recursos Físicos:

6.2.3.1 Equipo

Microscopio de fluorescencia

Microscopio de luz

Balanza

Hielera pequeña

Jarras Koplik

Mechero

Centrifuga

Refrigeradora

Ocular con escala de medición en micras

6.2.3.2 Materiales

100 tubos plásticos de 2 ½ onzas
10 cajas de portaobjetos
1 caja de palillos de madera
100 bulbos descartables
Beaker de 100mL.
Pipeta semiautomática de 10 a 100µm
20 Puntas descartables
Probeta de 10mL
Marcador indeleble

6.2.3.3 Reactivos

2 litros de formalina bufferada al 10%
500mL de metanol absoluto
5mL de NaOH 0.1N
100mL de solución de calcofluor
100mL de Azul de Evans
100mL de cromotrope 2R
100mL de alcohol ácido
100mL de alcohol etílico al 95%
100mL de alcohol etílico al 100%
50mL de xileno
50mL de cristal violeta
50mL de lugol
50mL de alcohol acetona
250mL de aceite de inmersión
500mL de agua destilada

6.3 Procedimiento de análisis:

Se tomaron muestras de heces diarreicas y no diarreicas de pacientes con VIH y/o SIDA que asisten a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt y que deseaban participar en el estudio, para lo cual firmaron un consentimiento y llenaron el cuestionario epidemiológico (Anexo 9).

Las muestras se colectaron en frascos de plástico de 2 ½ onzas, y se transportaron al laboratorio en una hielera. En el laboratorio se dividió la muestra en 2 porciones, una porción se colocó en formalina y la otra en dicromato de potasio para una eventual confirmación en PCR.

Con la porción de la muestra que se encuentra en formalina se realizaron 4 frotos delgados, para hacerle las siguientes tinciones: Calcofluor, Gram cromotropo y Tricrómica modificada. El otro frote se usó como reserva, o para confirmación posterior.

6.3.1 Calcofluor

Se preparó una solución de calcofluor al 0.5% y se ajustó el pH con NaOH 0.1% hasta que la solución se aclaró, se fijaron los frotos con metanol y se secaron al aire y se agregó 1 a 2 gotas de la solución de calcofluor, después de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente, se lavaron los frotos suavemente con agua. Se agregó Azul de Evans al 0.1% como colorante de contraste y se dejó 1 minuto a temperatura ambiente. Se lavó con agua y se dejó secar al aire. Se observaron bajo microscopio de luz UV.

NOTA: se utilizaron controles positivos en los cuales los microsporidios se observaron como halos ovalados turquesa o blanco azulado.

6.3.2 Tricrómica Modificada

Se fijaron los frotos con metanol y se agregó la solución de cromotropo 2R por 30 minutos a 37°C, se lavó con alcohol ácido por 10 segundos, luego con alcohol etílico al 95% por 10 segundos, se colocó en alcohol etílico al 95% por 5 minutos, se colocó en

alcohol etílico al 100% por 10 minutos, se colocó en xileno por 5 minutos y se examinó al microscopio (100x).

NOTA: se usaron controles positivos en los cuales los microsporidios se observaron rosado brillante.

6.3.3 Gram-cromotropo

Se fijaron los frotos con calor (3 veces por 1 segundo cada flameada), se realizó la tinción de Gram (cristal violeta 30 segundos, lugol por 30 segundos, se removió el lugol con alcohol acetona hasta que quedó incoloro, no se realizó el paso de safranina), luego se lavó con agua para remover el exceso, se colocó el frote a 50-55°C y se le agregó la solución de cromotropo por 1 minuto, se lavó con alcohol ácido al 90% por 1-3 segundos, luego con alcohol etílico al 95% por 30 segundos y por último se lavó 2 veces con alcohol etílico al 100% por 30 segundos y se dejó secar.

NOTA: se usaron controles positivos en los cuales las esporas de los microsporidios se observaron como estructuras ovals violeta en un fondo verde claro. Las levaduras se observaron de color rojo-rosado.

6.3.4 Observación Microscópica

Los frotos teñidos se observaron en el microscopio, y las esporas encontradas se midieron con un lente graduado en micras. Las muestras positivas fueron confirmadas en el Centro para el Control de Enfermedades. CDC, Atlanta, Georgia, E.E.U.U.

6.4 Diseño de investigación:

6.4.1 Tipo de estudio:

Estudio descriptivo de corte transversal para determinar la prevalencia de microsporidios en muestras de heces diarreicas y no diarreicas de todos los pacientes con VIH y/o SIDA que asisten a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt, durante los meses de Julio a Diciembre de 1,999.

6.4.2 Tipo de muestreo:

Se realizó un muestreo no aleatorio, en el cual se incluyeron todas las muestras de heces diarreicas y no diarreicas de pacientes con VIH y/o SIDA, que asistieron a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt, hasta llegar a completar el número total de muestras n (100), el cual se calculó en base a, la cantidad de pacientes registrados en dicha clínica. El cuestionario y las hojas de registro del laboratorio se ingresaron en base de datos en el programa Epi Info 6. Para los factores de riesgo se realizó un análisis multivariado por regresión logística de la presencia de microsporidios.

6.4.3 Determinación del número de muestras:

Para determinar el número de muestras, se tomó en cuenta el total de pacientes a riesgo que asisten a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt, ya que en Guatemala no existen reportes previos de la prevalencia de microsporidios en la población a estudiar. En este caso se determinó la prevalencia, con la siguiente fórmula:

$$P = \frac{\text{No. de casos positivos}}{\text{No. personas a riesgo}}$$

Donde P = prevalencia

No. de casos positivos = No de casos de infección por microsporidios

No. de personas a riesgo = No. de personas con VIH y/o SIDA que asisten a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt, en base a lo anterior $n = 100$

6.4.4 Selección de muestra:

Se analizaron muestras de heces diarreicas y no diarreicas de pacientes con VIH y/o SIDA que asisten a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt. Se incluyeron aquellos pacientes que aceptaron participar en el estudio, para lo cual firmaron un consentimiento.

6.5 Análisis de los resultados:

Con los resultados obtenidos, se estimó la prevalencia de casos positivos para microsporidios utilizando un intervalo de confianza del 95% ($Z = 1.96$), mediante la siguiente fórmula:

$$P = \frac{\text{No. de casos positivos} \times 100}{\text{No. personas a riesgo}}$$

$$\text{Intervalo de confianza (IC)} = P \pm (Z_{1 - \alpha/2})(\sqrt{pq/n})$$

7. RESULTADOS

La investigación fue llevada a cabo en el transcurso de 6 meses (julio a diciembre de 1,999), durante los cuales se analizaron 108 muestras de heces de pacientes VIH y/o SIDA positivos, de estas muestras 27 eran diarreicas (22.9%) y el resto no eran diarreicas (77.12%), los pacientes cuyas muestras fueron analizadas estaban comprendidos entre las edades de 22 a 67 años (edad promedio 30 años). El grupo estaba formado por 38 mujeres y 70 hombres, dichos pacientes asistieron durante este período a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt y presentaban como único criterio diagnóstico de VIH y/o SIDA.

A todas las muestras de heces se les realizó una observación en fresco para determinar la presencia de protozoos y de helmintos intestinales, además de tres coloraciones (Calcofluor, Gram-cromotrofo y Tricrómica modificada), para la identificación de microsporidios intestinales. Para cada coloración se utilizó controles positivos de *Encephalitozoon intestinalis* y *Enterocytozoon bieneusi* para facilitar la interpretación de los resultados de las muestras analizadas (Anexo 11).

Comparando los resultados de las diferentes coloraciones utilizadas se pudo observar que en el Gram cromótrofo las esporas de los microsporidios aparecen como estructuras ovales violeta oscuro y retienen los gránulos de los Gram positivo, sobre fondo verde claro, algunas esporas presentan en su parte media una estructura en forma de cinturón en posición ecuatorial. En la tinción tricrómica modificada las esporas se observan de color rosado brillante contra un fondo verde o azul, las estructuras se observan refringentes y algunas aparecen estriadas o presentan una vacuola con tinción interna. La coloración de Calcofluor permite visualizar con facilidad las esporas de los microsporidios ya que las esporas se observan fluorescentes de color blanco azulado sobre un fondo oscuro, además se observa diferencia en la intensidad de la fluorescencia lo que ayuda a distinguir los microsporidios de las levaduras. Por el contrario en las otras dos coloraciones muchas estructuras y artefactos se tiñen del mismo color que las esporas de microsporidios.

A las 108 muestras se les realizó una observación en fresco la cual demostró lo siguiente: 65 muestras no presentaron parásitos (60.19%), 11 muestras presentaron *Entamoeba coli* (10.19%), 7 muestras presentaron *Giardia lamblia* (6.48%), 7 muestras presentaron *Endolimax nana* (6.48%), 3 muestras presentaron *Blastocystis hominis* (2.78%), 3 muestras presentaron *Strongyloides stercoralis* (2.78%), 1 muestra presentó *Trichuris trichiura* (0.93%), 1 muestra presentó *Entamoeba histolytica* (0.93%) y 10 muestras presentaron infección mixta con más de 2 parásitos (9.53%), (Anexo 10, tabla 7).

En el estudio se observó que en 40 de las muestras habían estructuras similares a microsporidios, en al menos una de las tres coloraciones, por lo que se procedió a concentrar las muestras por centrifugación y repetir las coloraciones para dichas muestras, con esto pudo observarse mayor número de estructuras y solamente 10 fueron confirmadas como sospechosas de microsporidios. Dichas muestras se enviaron al Centro para el Control y Prevención de enfermedades, CDC de Atlanta, USA, donde solamente una de las muestras fue confirmada como *Microsporidium sp.* por medio de la coloración de Gram cromotrofo y Tricrómica modificada, dicha muestra a su vez se confirmó por PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

En base a, este resultado se puede inferir que la prevalencia de infecciones intestinales producidas por microsporidios para pacientes con VIH y/o SIDA que participaron en el estudio, en la ciudad de Guatemala es del 1%, con un intervalo de confianza que corresponde a un máximo de 2.9% y un mínimo de -0.88%.

Es importante mencionar que la muestra positiva para microsporidios corresponde a una paciente de sexo femenino que presentó diarrea con duración de 3 días. En cuanto a las características de las heces, estas mostraron lo siguiente: heces de consistencia líquida, con un máximo de 4 deposiciones por día, no había sangre en las heces, pero si había moco y no se observaron otros parásitos (helmintos, protozoos, etc.). Además la paciente refirió haber padecido de: fiebre, náusea, dolor de estómago, aumento de ruidos intestinales y fatiga.

Los factores que reporta la literatura y que se han encontrado relacionados con la presencia de microsporidios en pacientes con VIH y/o SIDA son: presencia de diarrea crónica, condición inmune del paciente, contacto con animales y el consumo de agua y alimentos contaminados(8). Pero debido a que se encontró un sólo caso no pudo realizarse el análisis multivariado por regresión logística, de los factores de riesgo involucrados en la producción de la microsporidiosis en pacientes con VIH y/o SIDA, ver resultados del cuestionario epidemiológico en el anexo 12, tabla 8.

8. DISCUSION DE RESULTADOS

Como ya se mencionó en el estudio se utilizaron 3 coloraciones (Calcofluor, Gram cromotropo y Tricrómica modificada) para evaluar la presencia de microsporidios en las muestras de heces, pero debido a las características tintoriales de las esporas de los microsporidios, se pudo observar que la coloración de Calcofluor facilita el diagnóstico de los microsporidios, ya que es la coloración que consume menos tiempo y reactivos para lograr su objetivo, además de que simplifica la observación e interpretación, ya que el fluorocromo se enlaza a la quitina de la endospora y este enlace fluoresce en el espectro visible. Esta coloración tiene la desventaja de requerir de un microscopio de fluorescencia con un filtro de 350-380 nm y un objetivo de 1000x. La diferencia de intensidades entre organismos es una ayuda para distinguir los microsporidios de las levaduras, las levaduras en gemación son más pequeñas, se tiñen con un patrón de quitina más brillante y homogéneo, mientras los microsporidios son definitivamente fluorescentes con alguna diferencia en el tinte dependiendo de la madurez. En cuanto a las otras 2 coloraciones se puede mencionar que aunque constituyen las coloraciones de elección para la identificación de los microsporidios, consumen tiempo, más de 60 minutos en ambos casos y en algunos muestras algunas bacterias y levaduras se tiñen en forma semejante que las esporas de los microsporidios, lo que puede dar lugar a confusiones. Por ejemplo si el tiempo de decoloración no es suficiente las esporas de las bacterias permanecen rojas y pueden confundirse con microsporidios. Es muy importante medir el tamaño de las esporas, ya que debe haber consistencia en el tamaño de las estructuras y se debe usar controles positivos en las coloraciones para comparar la morfología y características tintoriales y así establecer un correcto diagnóstico.

La aproximación más recomendable para el diagnóstico de los microsporidios es hacer un tamizaje de las muestras con la coloración de Calcofluor y luego confirmar la morfología y características tintoriales descritas, con las otros dos coloraciones.

Al final de este proceso se determinó que habían 40 muestras con estructuras similares a las esporas de microsporidios y al repetir los frotos con muestras concentradas, con las mismas coloraciones y observar un mayor número de estructuras (3-4/20 μ l) se llegó a la conclusión de que 10 muestras eran sospechosas. Posteriormente estas muestras se enviaron al CDC de Atlanta en donde se confirmó que 1 muestra era positiva para microsporidios, dicha muestra fue además confirmada por PCR.

De todo esto puede concluirse que el diagnóstico de la microsporidiosis humana se basa en la identificación de las características de las esporas en muestras clínicas como las heces fecales; este es un proceso laborioso, que consume mucho tiempo y necesita de mucha experiencia para diferenciar entre una espora de microsporidios y otras estructuras como las levaduras, ya que estas presentan la misma morfología, tamaño y características de tinción en las 3 coloraciones utilizadas.

De los resultados obtenidos en el estudio puede inferirse que la microsporidiosis no es común en pacientes con HIV y/o SIDA en la ciudad de Guatemala. Como puede observarse la prevalencia de los microsporidios en esta investigación es menor comparada con la reportada en la literatura para pacientes VIH y/o SIDA, la cual varía de un 4 a un 50 por ciento (5,7,69), además debe tomarse en cuenta que el número de pacientes que se incluyeron en el estudio es bajo (108) a pesar de que el tamaño de la muestra fue determinado basándose en la cantidad de pacientes registrados en la clínica No 8 del Hospital Roosevelt (en dicha clínica se atiende a un promedio de 25 pacientes por mes), por lo tanto se recomienda llevar a cabo estudios con un mayor número de muestras en la misma población, ya que es de vital importancia lograr una buena identificación de los microsporidios en pacientes con VIH y/o SIDA.

Es importante mencionar que la muestra positiva para microsporidios no presentó parásitos entéricos (helminths, protozoos, etc.), lo anterior concuerda con la literatura, en la cual se indica que en la mayoría de muestras positivas para microsporidios no se observan otros parásitos (7), además la muestra era diarreica, sin sangre y con moco.

A pesar de la baja prevalencia encontrada es importante considerar a los microsporidios cuando la etiología de la diarrea se desconoce y el paciente tiene su inmunidad comprometida como en este caso.

Según la literatura consultada los principales factores de riesgo asociados a los pacientes con microsporidiosis son: diarrea crónica, condición inmune del paciente, contacto con animales, consumo de agua y alimentos contaminados. Aunque muchos de estos factores fueron citados por la paciente no se estableció cual fue la fuente de contaminación por lo que se requieren de futuros estudios para indicar con exactitud el grado de significación de cada uno.

9. CONCLUSIONES

- 9.1 La prevalencia de infecciones intestinales debidas a microsporidios en pacientes con VIH y/o SIDA que asisten a la clínica No. 8 del Hospital Roosevelt fue del 1% con un nivel de confianza del 95%.
- 9.2 El Calcofluor es la coloración que ofrece mayores ventajas para el diagnóstico de las infecciones producidas por microsporidios en pacientes con VIH y/o SIDA.
- 9.3 El diagnóstico de la microsporidiosis requiere de experiencia y el uso de técnicas como PCR para confirmar su presencia.
- 9.4 Se debe diferenciar entre las esporas de los microsporidios y otras estructuras como las levaduras, ya que estas presentan la misma morfología, tamaño y características de tinción y por lo tanto se pueden obtener resultados falso positivo.

10. RECOMENDACIONES

- 10.1 Debido a la baja prevalencia de infecciones intestinales producidas por microsporidios en pacientes con VIH y/o SIDA se recomienda llevar a cabo estudios con un mayor número de muestras, para observar el grado de significancia de los factores de riesgo relacionados.
- 10.2 Utilizar la coloración de Calcofluor como tamizaje y luego Gram cromotrope y la coloración Tricrómica modificada para confirmar la presencia de microsporidios, en aquellas muestras positivas.
- 10.3 Es de vital importancia el uso de técnicas como el PCR para confirmar e identificar las especies de microsporidios, ya que facilita el diagnóstico de las infecciones producidas por estos parásitos.
- 10.4 Realizar investigaciones sobre este tipo de infecciones en el mismo y en otros grupos de población a riesgo y que no presenten otra causa aparente de infección.

11. Referencias

- 11.1 Stites D.P., Inmunología Básica y Clínica. 7 ed. México: El Manual Moderno, 1993. 1055p.
- 11.2 Bryan R. T., Microsporidia. Clin. Infect. 1995;101:2513-2524.
- 11.3 Canning E. U., Lom J., The microsporidia of vertebrates. Academic Press. 1986;40:191-193.
- 11.4 Canning E. U., Hollister W. S., Microsporidia of mammals widespread pathogens or opportunistic curiosities?. Parasitol. Today 1987;3:267-273.
- 11.5 Canning E. U., Hollister W. S., The importance of Microsporidia as opportunistic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 1992;4:422-427.
- 11.6 Desportes I. Y., et al. Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* in the enterocytes of a human patient with AIDS. J. Protozool 1985;32:250-254.
- 11.7 Modigliani R. C., et al. Diarrhoea and malabsorption in acquired immune deficiency syndrome: a study of four cases with special emphasis on opportunistic protozoan infestations. Gut. 1985;26:179-187.
- 11.8 Asmuth D. M., et al. Clinical features of microsporidiosis in patients with AIDS. Clin. Infect. Dis. 1994;18:819-825.
- 11.9 Bryan R. T., et al. Microsporidia: opportunistic pathogens in patients with AIDS. Clin. Parasitol. 1991;2:1-26.
- 11.10 Bryan R. T., Weber R., Microsporidia. Emerging pathogens in immunodeficient persons. Arch. Pathol. Lab. Med. 1993;117:1243-1245.
- 11.11 Bryan R. T., et al. Microsporidiosis as an AIDS-related opportunistic infection. Infect. Dis. 1995;21:62-65.
- 11.12 Cali A., General microsporidian features and recent findings on AIDS isolates. J. Protozool 1991;38:625-630.
- 11.13 Canning E. U. Microsporidia: Parasitic protozoa. Academic Press. 1993;6:299-385.

- 11.14 Dore G. J., *et al.* Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in nine patients infected with the human immunodeficiency virus: response to therapy with albendazole. *Clin. Infect.* 1995;21:70-76.
- 11.15 Canning E. U., Curry A., Lacey C. J., Ultrastructure of *Encephalitozoon* sp infecting the conjunctival, corneal and nasal epithelia of a patient with AIDS. *Eur. J. Protistol.* 1992;28:226-237.
- 11.16 Chris N., *et al.* Examination of the prevalence and seasonal variation of intestinal microsporidiosis in the stool of persons with diarrhea and human immunodeficiency virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998;58:559-561.
- 11.17 Shadduck J. A., Orenstein M., Comparative Pathology of Microsporidiosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1993;117:1215-1219.
- 11.18 Aarons E. J., *et al.* Reversible renal failure caused by a microsporidian infection. *AIDS.* 1994;8:1119-1121.
- 11.19 Beaugerie L., *et al.* Cholangiopathy associated with microsporidia infection of the common bile duct mucosa in a patient with HIV infection. *Ann. Inter. Med.* 1992;177:401-402.
- 11.20 Belcher J. W., Guttenberg S. A., Schmokler B. M., Microsporidiosis of the mandible in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 1997;55:424-426.
- 11.21 Croft S. L., Williams J. McGowan I, Intestinal Microsporidiosis. *Semin. Gastroenterol.* 1997;8:45-55.
- 11.22 De Aguila C., *et al.* Identification of *E. bienewisi* spores in respiratory samples from an AIDS patient with 2-year history of intestinal microsporidiosis. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35:1862-1866.
- 11.23 Franzen C., *et al.* Chronic rhinosinusitis in patients with AIDS: potencial role of microsporidia. 1996;10:687-688.
- 11.24 Hutin Y. J. F., *et al.* Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. *J. Infect. Dis.* 1998;178:904-907.

- 11.25 Scaglia M., et al. Asymptomatic respiratory tract microsporidiosis due to *E. hellem* in three patients with AIDS. Clin. Infect. Dis. 1998;26:174-176.
- 11.26 Sprague V., Bencnel J., Hazard E. L. Taxonomy of phylum microspora. Crit. Rev. Microbiol. 1992;18:285-395.
- 11.27 Larson R., Ultrastructure, function, and classification of microsporidia. Prog. Parasitol. 1986;1:325-390.
- 11.28 Sprague V., Bencnel J., Hazard E. L., Taxonomy of Phylum Microsporidia. Crit. Rev. Microbiol. 1992;18:285-295.
- 11.29 Brown J. R., Doolittle W. F., Root of the universal tree of life based on ancient aminoacyl-tRNA synthetase gene duplications. Proc. Natl. Acad. Sci. 1995;92:2441-2445.
- 11.30 Vossbrinck C. R., Woese C. R., Eukariotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. Nature. 1986;320:287-288.
- 11.31 Zhu X., et al. Ribosomal RNA sequences of *E. bienersi*, *S. intestinalis* y *A. Michaelis*: phylogenetic construction and structural correspondence. J. Eukariot. Microbiol. 1994;41:204-209.
- 11.32 Weiser J., DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. Clin. Microbiol. Rev. 1995;8:113-130.
- 11.33 Cali A., Owen R. L., Microsporidiosis, the laboratory diagnosis of infectious diseases: principles and practice. 1998; 40:928-949.
- 11.34 Orenstein J. M., et al. Disseminated microsporidiosis in AIDS: are any organs spared. AIDS. 1997;11:385-386.
- 11.35 Orenstein J. M., Tenner M., Cali A., A microsporidian previously undescribed in humans, infecting enterocytes and macrophages, and associated with diarrhea in an acquired immunodeficiency syndrome patient. Hum. Pathol. 1992;23:722-728.
- 11.36 Lacey C. J., et al. Chronic microsporidian infection of the nasal mucosae, sinusses and conjunctivae in HIV disease. Genitourin Med. 1992;68:179-181.

- 11.37 Didier E.S., *et al.* Isolation and characterization of a new human microsporidian, *E. hellem*, from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *J. Infect. Dis.* 1991;163:617-621.
- 11.38 Mertens R. B., *et al.* *E. cuniculi* microsporidiosis: infection of the brain, heart, kidneys, trache, adrenal glands and urinary bladder in a patient with AIDS. *Mod. Pathol.* 1997;10:68-77.
- 11.39 Weber R. P., *et al.* Cerebral microsporidiosis due to *E. cuniculi* in patient with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. Med.* 1997;336:474-478.
- 11.40 Cali A., *et al.* A comparison of two microsporidian parasites in enterocytes of AIDS patients with chronic diarrhea. *J. Protozool.* 1991;38:965-985.
- 11.41 Caramello P., *et al.* Clinical and microscopical features of small-intestinal microsporidiosis in patients with AIDS. *Infection.* 1995;23:362-368.
- 11.42 Hollister W. S., *et al.* Characterization of *E. hellem* (Microspora) isolated from the nasal mucosa of a patient with AIDS. *Parasitology.* 1993;107:351-358.
- 11.43 Hollister W. S., *et al.* A species of *Encephalitozoon* isolated from AIDS patient: criteria for species differentiation. *Folia. Parasitol.* 1993;40:293-295.
- 11.44 Coyle C., *et al.* TNP-470 is an effective antimicrosporidial agent. *J. Infect. Dis.* 1998;177:515-518.
- 11.45 Anwar- Bruni D. M., *et al.* Atovaquone is effective treatment for symptoms of gastrointestinal microsporidiosis in HIV-1-infected patients. *AIDS* 1996;10:619-623.
- 11.46 Carr A. D., *et al.* Treatment of HIV-1-associated microsporidiosis and cryptosporidiosis with combination antiretroviral therapy. *Lancet.* 1998;351:256-261.
- 11.47 Dionisio D., *et al.* Use of furazolidine for the treatment of microsporidiosis due to *E. bienersi* in patients with AIDS. *Recenti. Prog. Med.* 1995;86:394-397.
- 11.48 He Q., *et al.* Effects of nifedipine, metronidazole, and nitric oxide donors on spore germination and cell culture infection of the microsporidia *E. hellem* and *E. cuniculi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996;40:179-185.

- 11.49 Rinder H., *et al.* Blinded, Externally Controlled Multicenter Evaluation of Light Microscopy and PCR for detection of Microsporidia in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36:1814-1818.
- 11.50 Croppo G. P., *et al.* Identification of the Microsporidian *E. hellem* using Immunoglobulin G Monoclonal Antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1998;122:182-186.
- 11.51 Vivesvara G. S., *et al.* Short-term *in vitro* culture and Molecular Analysis of the Microsporidian, *E. bieneusi*. *J. Euk. Microbiol.* 1995;506-510.
- 11.52 Vivesvara G. S., *et al.* *In vitro* culture and Serologic and Molecular Identification of *Septata intestinalis* Isolated from urine of patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* 1995;930-936.
- 11.53 Didier D. J., *et al.* Fine structure of a new human microsporidian, *E. hellem*, in culture. *J. Protozool.* 1991;38:502-507.
- 11.54 Moura H., *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.
- 11.55 Ignatius R., *et al.* A New acid-fast trichrome stain for simultaneous detection of *C. parvum* and Microsporidial species in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35:446-449.
- 11.56 Croppo G. P., *et al.* Western Blot and immunofluorescence analysis of a Human isolate of *E. cuniculi* established in culture from the urine of a patient with AIDS. *J. Parasitol.* 1997;66-69.
- 11.57 Weiss L. M., Vossbrinck C. R., Microsporidiosis: molecular and diagnostic aspects. *Adv. Parasitol.* 1998;40:351-395.
- 11.58 Baker M. D., *et al.* Small subunit ribosomal DNA phylogeny of various microsporidia with emphasis on AIDS related forms. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1995;42:564-570.
- 11.59 Keeling P. J., Doolittle W. F., Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Mol. Biol. Evol.* 1996;13:1297-1305.

- 11.60Conteas C. N. *et al.* Modification of the clinical course of intestinal microsporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome patients by immune status and anti-human immunodeficiency virus therapy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998;58:555-558.
- 11.61Duffieux F., *et al.* First report on the systematic sequencing of the small genome of *E. cuniculi* (Microspora, protozoa): gene organization of a 4.3 Kbp region on chromosome I. *Microb. Comp. Genomics.* 1998;3:1-11.
- 11.62Biderre, C., *et al.* Evidence for the smallest nuclear genome (2.9 Mb) in the microsporidium *E. cuniculi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1995;74:229-231.
- 11.63Biderre, C., *et al.* A small spliceosomal type intron occurs in a ribosomal protein gene of the microsporidian *E. cuniculi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1998;94:283-286.
- 11.64Curgy J. J. *et al.* Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in microsporidia, eukaryotic organisms. *Biol. Cell.* 1992;38:49-51.
- 11.65Schottelius J., Y Lo., Schometz C., *S. intestinalis* and *E. cuniculi*: cross-reactivity between two microsporidian species. *Folia Parasitol.* 1995;42:169-172.
- 11.66Cotte L., *et al.* Outbreak of intestinal microsporidiosis in HIV-infected patients in relation with town water distribution system. *American Society for Microbiology.* 1997.
- 11.67Dowd S. E., *et al.* Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *E. bienersi*, *E. intestinalis*, and *V. corneae* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998;64:3332-3335.
- 11.68Franzen C., Muller A., *Molecular Techniques for Detection, Species Differentiation, and Phylogenetic Analysis of Microsporidia.* *Clin. Microbiol.* 1999;12:243-285.
- 11.69Wittner M., *The Microsporidia and Microsporidiosis.* Washigton: ASM PRESS, 1999. 553p.

12. Anexos

Anexo 1

TABLA 1. NOTIFICACION DE CASOS DE SIDA POR AÑO DE 1984 AL 28 DE FEBRERO DE 1999 EN GUATEMALA

AÑO	MASCULINO	FEMENINO	SUB TOTAL
1984	2	0	2
1985	5	0	5
1986	13	2	15
1987	14	2	16
1988	16	2	18
1989	26	7	33
1990	77	15	92
1991	79	17	96
1992	82	12	94
1993	146	32	178
1994	75	35	110
1995	106	35	141
1996	673	162	835
1997	490	159	649
1998	280	117	397
2/28/99	148	64	212
TOTAL	2,232	661	2,893

Información Epidemiológica. Prog. Nac. ETS/VIH/SIDA
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social

ANEXO 2

Espora de microsporidio

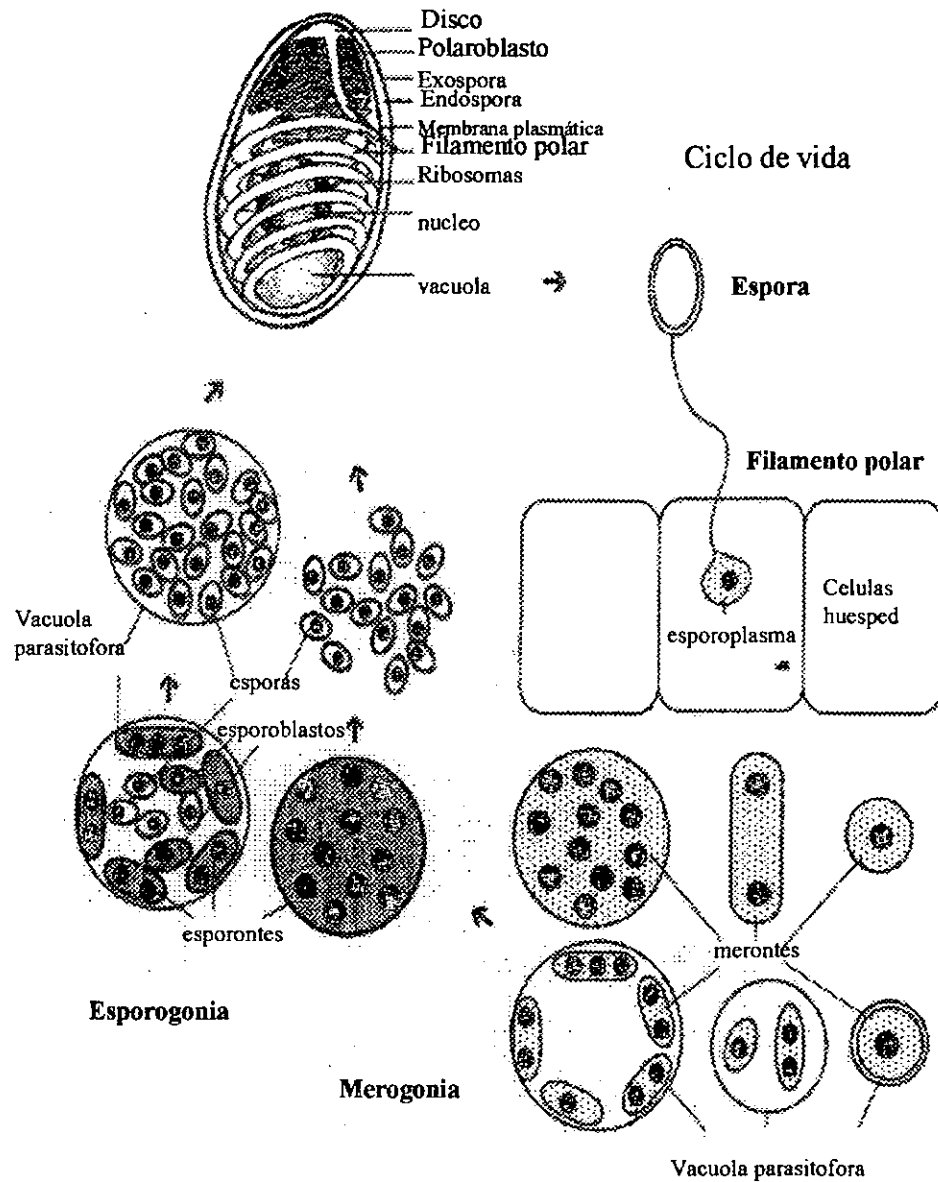


Diagrama de la espora de los microsporidios y ciclo de vida
Fuente: Referencia 68

Anexo 4

TABLA 2. CASOS DE MICROSPORIDIOSIS REPORTADOS EN PACIENTES SIN VIH

Microsporidio	Historia Clínica	Mét. de Dx.	Localización	Año /Estudio
<i>E.intestinalis</i>	Diarrea autolimitante	Examen de heces (33)	Suiza	1995
<i>E.intestinalis</i>	Diarrea	Examen de heces (33)	Francia	1998
<i>E.intestinalis</i>	Diarrea	Examen de heces (33)	Francia	1998
<i>E. bienewisi</i>	Diarrea autolimitante	Examen de heces (33,42)	Alemania	1994
<i>E. bienewisi</i>	Diarrea	Examen de heces (33)	Francia	1994
<i>E. bienewisi</i>	Diarrea	Examen de heces (33)	Francia	1994
<i>E. bienewisi</i>	Diarrea	Examen de heces (33)	Francia	1994
<i>E. bienewisi</i>	Diarrea	Examen de heces (32,37)	Francia	1994
<i>E. bienewisi</i>	Diarrea	Examen de heces (55)	Francia	1994
<i>E. bienewisi</i>	Diarrea	Examen de heces (34)	Francia	1994
<i>E. bienewisi</i>	Diarrea	Examen de heces (55)	Alemania	1995
<i>E. bienewisi</i>	Diarrea autolimitante	Examen de heces (33,42)	Suiza	1995
<i>E. bienewisi</i>	Diarrea autolimitante	Examen de heces (33,42)	Zambia	1997

Fuente: Referencia 68

Anexo 5

TABLA 3. CASOS DE MICROSPORIDIOSIS EN PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA, PERO SIN VIH

MICROSPORIDI	HISTORIA CLÍNICA	STATUS INMUNE	MET. DE DX.
<i>E.bienewisi</i>	Diarrea autolimitante	Inmunosupresión por droga	Examen de heces
<i>E. bienewisi</i>	Diarrea crónica	Disminución de CD4	Examen de heces
<i>E. bienewisi</i>	Diarrea	Inmunosupresión por trans	Examen de heces
<i>E. bienewisi</i>	Diarrea crónica	Linfocitopenia e Hipogammaglobulinemia	Examen de heces y biopsia duodenal

Fuente: referencia 68

Anexo 6

TABLA 4. HOSPEDEROS ANIMALES DE MICROSPORIDIOS QUE CAUSAN INFECCIONES EN HUMANOS

MICROSPORIDIO	HOSPEDERO
<i>E. bieneusi</i>	cerdos, perros, monos macacos (19-25)
<i>E. intestinalis</i>	perros, cerdos, vacas, burros (19-25)
<i>E. hellem</i>	aves (pericos) (19-25)
<i>E. cuniculi</i>	varios mamiferos (19-25)

Fuente: Referencia 68

Anexo 7

TABLA 5. MANIFESTACIONES CLINICAS DE INFECCIONES POR MICROSPORIDIOS EN HUMANOS

MICROSPORIDIO	MANIFESTACIONES CLINICAS
<i>E. bieneusi</i>	Enteritis, colangitis, colecistitis, neumonía bronquitis, sinusitis y rinitis (40,45,65,67)
<i>E. intestinalis</i>	Enteritis, colangitis, colecistitis, nefritis infección del tracto urinario, sinusitis bronquitis, rinitis, keratoconjuntivitis, infección diseminada (47,50)
<i>E. hellem</i>	Keratoconjuntivitis, sinusitis, rinitis, neumonía bronquiolitis, nefritis, infección del tracto urinario, absceso prostático e infección diseminada (4,6,8,11)
<i>E. cuniculi</i>	Hepatitis, encefalitis, infección intestinal, keratoconjuntivitis, sinusitis, rinitis e infección diseminada (37,40,44)

Fuente: Referencia 68

Anexo 8

TABLA 6. CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS DE MICROSPORIDIOS QUE CAUSAN INFECCION EN HUMANOS

CARACTERÍSTICAS	<i>E.bieneusi</i>	<i>Encephalitozoon spp.</i>
Tamaño de espora (μm)	1.1-1.6 por 0.7-1.0	2.0-5.0 por 1.0-1.5
Número de enrollamiento del filamento polar	5 a 7	5 a 7
Arreglo del filamento polar	dos filas	una fila
Núcleo	Unicariótico	Unicariótico
Vacuola	No presenta vacuola, en contacto directo con el citoplasma de las células del hospedero	Vacuola parasitófora septada en <i>E.intestinalis</i>

Fuente: Referencia 68.

Anexo 9

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES

Estimado paciente:

El Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala, en colaboración con los Centros de Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta Georgia, Estados Unidos y el Hospital Roosevelt de Guatemala, están llevando a cabo un estudio con el fin de conocer más sobre los microsporidios intestinales (*E. bienewisi* y *E. intestinalis*) que son parásitos que causan frecuentemente diarrea en pacientes que tienen sus defensas bajas y en pacientes que tienen el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Para participar solicitaremos un poco de su tiempo para ayudarnos a llenar una encuesta de datos relacionados con algunos malestares producidos por estos parásitos y algunas formas posibles por medio de las cuales se pudo haber enfermado; además solicitaremos una muestra de heces, la cual será examinada en la Unidad de Entrenamiento e Investigación de Entomología Médica (MERTU) de la Universidad del Valle de Guatemala.

Su participación es completamente voluntaria y anónima. Los datos obtenidos de la encuesta sólo podrán ser vistos por el encuestador y los médicos investigadores. Usted puede terminar la encuesta o su participación en el estudio en cualquier momento.

Si está de acuerdo en participar, le pedimos que coloque su nombre en la línea o bien su huella digital.

(F) _____

Yo he leído o me ha sido leído y explicado el consentimiento y estoy de acuerdo en participar por lo que coloco mi nombre y/o huella digital.

Fecha: Guatemala _____

Testigo (F): _____

PREVALENCIA DE MICROSPORIDIOS EN PACIENTES CON VIH Y/O SIDA QUE ACUDEN A LA CLINICA No. 8 DEL HOSPITAL ROOSEVELT

DATOS GENERALES:

1. ID _____
2. Fecha de Entrevista: Día ___ Mes ___ 1999
3. Edad _____ (años)
4. Sexo: 1. Masculino _____ 2. Femenino _____
5. Preferencia sexual: 1. Hombres 2. Mujeres 3. Ambos
6. Nivel de Escolaridad:
 1. Analfabeta
 2. Alfabeta
 3. Primaria
 4. Secundaria
 5. Diversificado
 6. Superior
 99. No sabe/No respondió
7. Ocupación: _____
8. Fecha de diagnóstico VIH Día ___ mes ___ año ___
9. Fecha de diagnóstico SIDA Día ___ mes ___ año ___

Ultimo Recuento de:

10. Linfocitos _____ 10.1 Fecha _____
11. Leucocitos _____ 11.1 Fecha _____
12. CD4 _____ 12.1 Fecha _____

13. Recibe actualmente tratamiento retroviral: 1. SI 2.NO 99. No Sabe
- Qué tratamiento Retroviral Recibe:

Nucleósidos inhibidores de transcriptasa inversa

14. Zidovudine (ZDV o AZT)-Retrovir 1. SI 2.NO 99. No Sabe
15. Stavudine (d4t)- Zerit 1. SI 2.NO 99. No Sabe
16. Didanosine (ddI) -Videx 1. SI 2.NO 99. No Sabe
17. Zalcitabine (ddC) - HIViD 1. SI 2.NO 99. No Sabe
18. Lamivudine (3TC)-EpiVir 1. SI 2.NO 99. No Sabe

No Nucleósidos Inhibidores de Transcriptasa Inversa

19. Nevirapine - Viramune 1. SI 2.NO 99. No Sabe
20. Delavirdine - Rescriptor 1. SI 2.NO 99. No Sabe

Inhibidores de Proteasa

21. Saquinavir - Invirase 1. SI 2.NO 99. No Sabe
22. Indinavir - Crixivan 1. SI 2.NO 99. No Sabe
23. Ritonavir - Norvir 1. SI 2.NO 99. No Sabe
24. Nelfinavir - Viracept 1. SI 2.NO 99. No Sabe

25. Recibe actualmente tratamiento profilactico 1. SI 2.NO 99. No Sabe

Para qué enfermedades recibe tratamiento profiláctico

26. Pneumocistis carinni 1. SI 2.NO 99. No Sabe
27. Candida albicans 1. SI 2.NO 99. No Sabe
28. Otra 1. SI 2.NO 99. No Sabe
29. Padece actualmente de alguna infección oportunistas 1. SI 2.NO 99. No Sabe
30. Infección 1 _____ (aquí vamos a colocar una lista)
31. Infección 2 _____
32. Infección 3 _____

32. Infección 3 _____

FUENTES DE AGUA

33. En su casa cuál es la principal fuente de agua que se utiliza para beber?

- | | |
|-----------------------------|----------------------------------|
| 1. Chorro intradomiciliario | 6. Pozo con bomba mecánica |
| 2. Chorro o pila pública | 7. Agua de lluvia |
| 3. Nacimiento (ojo de agua) | 8. Agua de garrafón (salvavidas) |
| 4. Río | 9. Otro _____ |
| 5. Pozo sin bomba mecánica | 10. No sabe/No respondió |

34. Si la fuente de agua no es continua ¿Como almacena o guarda agua para beber en la vivienda?

1. Recipientes con boca ancha
2. Recipientes con boca estrecha
3. Depósito elevado
4. Barriles, toneles, pilas
5. Otro _____
99. No sabe/ No respondió

35. Le da algún tratamiento al agua que utiliza para beber 1. SI 2. NO 99. No sabe

36. Hierve 1. SI 2. NO 99. No sabe

37. Clora 1. SI 2. NO 99. No sabe

38. Filtra 1. SI 2. NO 99. No sabe

SANEAMIENTO

39. Qué tipo de servicio sanitario utiliza en su vivienda?

1. En el campo
2. Letrina sin hoyo
3. Letrina con hoyo
4. Letrina abonera seca
5. Inodoro lavable
6. Otro _____
99. No sabe/ No respondió

40. Este servicio es utilizado por:

1. Solo las personas que viven en la casa
2. Compartida con otros vecinos
3. Utilizada por toda la comunidad
4. Otro _____
99. No sabe/no respondió

CARACTERISTICAS DE LA VIVIENDA

41. Tipo de vivienda

1. Casa Informal/improvisada
2. Rancho techo de paja
3. Rancho con techo de lámina
4. Casa de block/ladrillo/techo de lámina
5. Casa de block/ ladrillo/ techo fundido
6. Otro _____
99. No sabe/ no respondió

42. Tenencia de la vivienda
 1. Propia
 2. Alquilada
 3. Prestada
 4. Otro _____
 99. No sabe/No respondió

Posee en la Vivienda

43. Radio 1. SI 2. NO 99. No sabe
 44. Televisión 1. SI 2. NO 99. No sabe
 45. Bicicleta transporte 1. SI 2. NO 99. No sabe
 46. Moto 1. SI 2. NO 99. No sabe
 47. Automóvil o camión 1. SI 2. NO 99. No sabe

Posee animales en la viviendas

48. Perros 1. SI 2. NO 99. No sabe
 49. Gatos 1. SI 2. NO 99. No sabe
 50. Gallinas 1. SI 2. NO 99. No sabe 50.1 1. Corral 2. Suetos
 51. Patos 1. SI 2. NO 99. No sabe 51.1 1. Corral 2. Suetos
 52. Chompipes 1. SI 2. NO 99. No sabe 52.1 1. Corral 2. Suetos
 53. Paloma 1. SI 2. NO 99. No sabe 53.1 1. Corral 2. Suetos
 54. Pericos 1. SI 2. NO 99. No sabe 54.1 1. Corral 2. Suetos
 55. Otras Aves 1. SI 2. NO 99. No sabe 55.1 1. Corral 2. Suetos
 56. Caballos 1. SI 2. NO 99. No sabe 56.1 1. Corral 2. Suetos
 57. Vacas 1. SI 2. NO 99. No sabe 57.1 1. Corral 2. Suetos
 58. Terneros 1. SI 2. NO 99. No sabe 58.1 1. Corral 2. Suetos
 59. Cerdos 1. SI 2. NO 99. No sabe 59.1 1. Corral 2. Suetos
 60. Otros 1. SI 2. NO 99. No sabe
 61. Especifique otros _____

HABITOS Y CONSUMO DE ALIMENTOS

62. Consume o toma refrescos (no procesados) en la calle? 1. SI 2. NO 99. No sabe
 63. Con que frecuencia consume refrescos no procesados:
 1. Una vez a la semana o más
 2. Una vez cada dos semanas
 3. Una vez por mes o menos
 4. Nunca
 5. Otro _____
 99. No sabe/No respondió
 64. Consume frutas en bolsa, de ventas callejeras? 1. SI 2. NO 99. No sabe
 65. Con que frecuencia consume frutas de ventas callejeras?
 1. Una vez a la semana o más
 2. Una vez cada dos semanas
 3. Una vez por mes o menos
 4. Nunca
 5. Otro _____
 99. No sabe/No respondió
 66. Consume verduras crudas? 1. SI 2. NO 99. No sabe
 67. Qué tipos de verduras? _____
 68. Con que frecuencia consume verduras crudas? _____

70. Ha nadado en un río o lago? 1. SI 2. NO 99. No sabe
 71. Ha tenido contacto con tierra? 1. SI 2. NO 99. No sabe

SINTOMAS GASTROINTESTINALES

Tiene usted diarrea? 1. SI 2. NO 99. No sabe

72. Cuanto tiempo tiene de tener diarrea? _____(días)

73. Cuál es la consistencia de las heces?

1. Líquida
2. Pastosa
3. Dura
4. Otra
99. No sabe/No respondió

74. Cuántas veces es lo máxima de deposiciones que ha tenido en un día? _____
 Durante la enfermedad ha observado alguna de las siguientes características:

75. Sangre en las heces 1. SI 2. NO 99. No sabe
 76. Moco en las heces 1. SI 2. NO 99. No sabe
 77. Fiebre 1. SI 2. NO 99. No sabe
 78. Vómitos 1. SI 2. NO 99. No sabe
 79. Dolor de Estómago 1. SI 2. NO 99. No sabe
 80. Aumento de ruidos intestinales 1. SI 2. NO 99. No sabe
 81. Debilidad o fatiga 1. SI 2. NO 99. No sabe
 82. Otros 1. SI 2. NO 99. No sabe
 83. Cuáles otros síntomas _____

84. Ha recibido algún tratamiento para la diarrea u otros síntomas? :
 1. SI 2. NO 99. No sabe

Qué tipo de tratamiento ha recibido?

85. Antibióticos 1. SI 2. NO 99. No sabe
 86. Antidiarréicos 1. SI 2. NO 99. No sabe
 87. Antiespasmódicos 1. SI 2. NO 99. No sabe

88. Si recibió tratamiento antibiótico, Cuál fue el tratamiento?

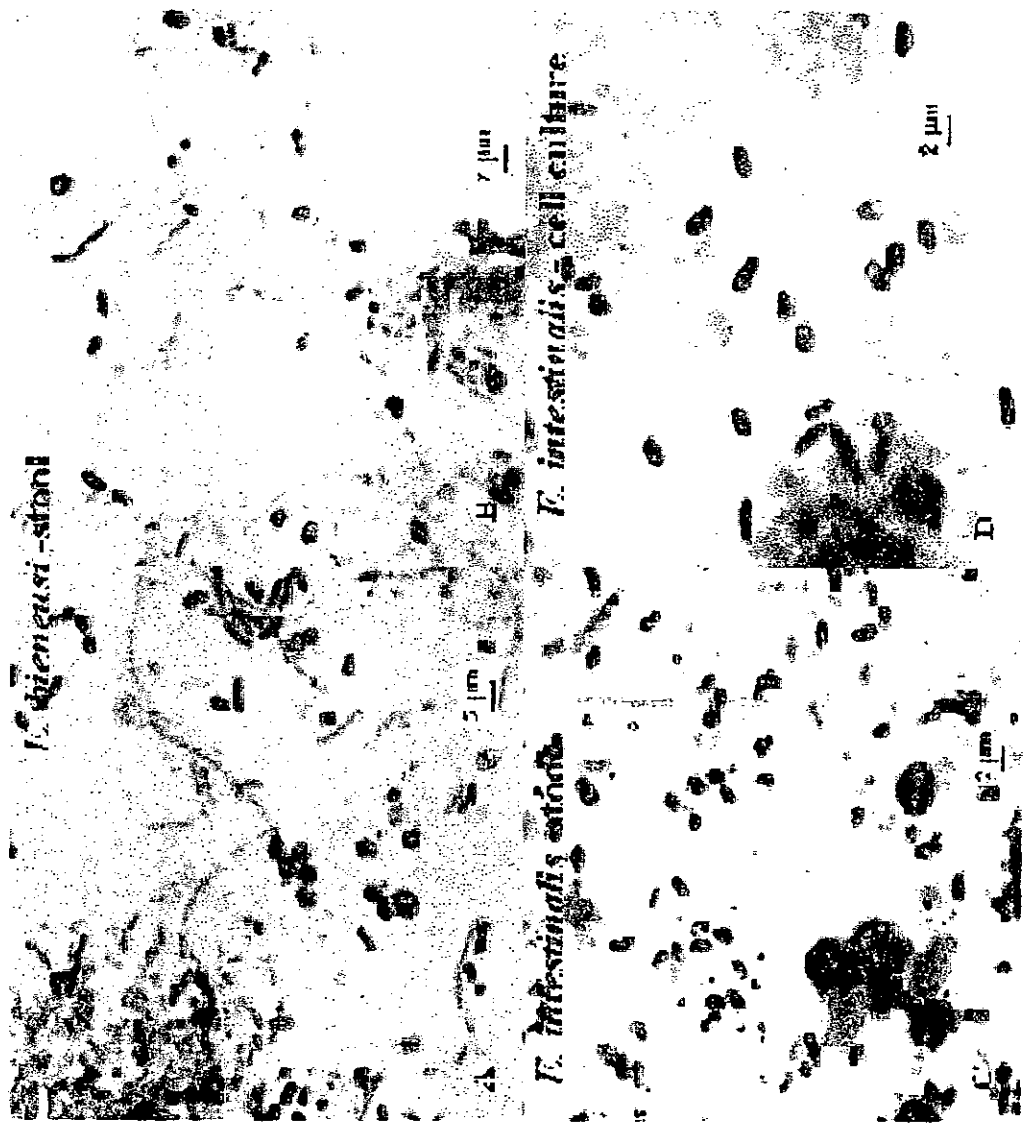
Anexo 10

TABLA 7. FRECUENCIA DE PARASITOS ENTERICOS Y TIPO DE MUESTRA

NOMBRE	FRECUENCIA	PORCENTAJE
<i>E.coli</i>	11	10.2
<i>E.nana</i>	7	6.5
<i>G.lambliia</i>	7	6.5
<i>B. hominis</i>	3	2.8
<i>S.stercoralis</i>	3	2.8
<i>E.histolytica</i>	1	0.93
<i>T. trichiura</i>	1	0.93
2 o más parásitos	10	9.5
NSOP	65	60.2

TIPO DE MUESTRA	NUMERO	PORCENTAJE
Diarreicas	62	57.41
No diarreicas	46	42.59

Anexo 11

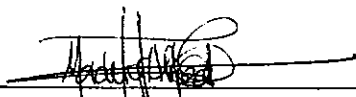


ANEXO No. 12

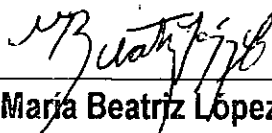
Tabla 8. RESPUESTAS DEL CUESTIONARIO EPIDEMIOLOGICO

ITEM	No. de pacientes con respuesta afirmativa	Porcentaje
DATOS GENERALES		
Edad promedio	30	27.8
Sexo masculino	70	64.8
Sexo femenino	38	35.2
PREFERENCIA SEXUAL		
Hombres	49	45.4
Mujeres	57	52.8
Ambos	2	1.8
NIVEL DE ESCOLARIDAD		
Analfabeta	12	11.1
Alfabeta	12	11.1
Primaria	41	37.9
Secundaria	19	17.6
Diversificado	14	12.9
Superior	10	9.2
RECUENTOS		
Leucocitos promedio	6141/mm3	
Linfocitos promedio	21/mm3	
CD4 promedio	202/ul	
INFECCIONES OPORTUNISTAS		
Tuberculosis	43	39.8
Citomegalovirus	0	0
Candidosis	12	11.1
Toxoplasmosis	52	48.1
FUENTE DE AGUA		
Principal fuente (chorro intradomiciliario)	52	48.1
Tratamiento del agua para beber	49	45.4
Principal tratamiento (hierve)	24	22.2
SANEAMIENTO		
Tipo de servicio sanitario (inodoro lavable)	75	69.4
CARACTERÍSTICAS DE LA VIVIENDA		
Tipo de vivienda (casa de block)	49	45.4
ANIMALES		
Posee animales en la vivienda	51	47.2
HABITOS Y CONSUMO DE ALIMENTOS		
Consumo de refrescos no procesados	45	41.7
Consumo de frutas crudas	45	41.7
Consumo de verduras crudas	65	60.2
ULTIMAS DOS SEMANAS		
Ha bebido agua no tratada	44	40.7
Ha nadado en río o lago	3	2.8
Ha tenido contacto con tierra	26	24.1
SINTOMAS GASTROINTESTINALES		
Diarrea	59	54.6
Duración de la diarrea/días (promedio)	8	7.4
Consistencia de las heces		
Líquida	32	29.6
Pastosa	28	25.9
Dura	0	0
OTROS HALLAZGOS		
Sangre en heces	8	7.4
Moco en heces	21	19.4
Fiebre	30	27.8
Vómitos	31	28.7
Dolor de estómago	50	46.3
Aumento de ruidos intestinales	54	50
Fatiga	45	41.7
Náusea	40	37
TRATAMIENTO RETROVIRAL	36	33.3

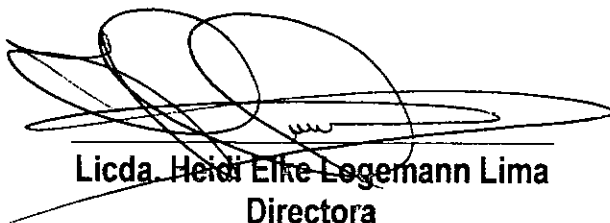
Estas Respuestas corresponden al cuestionario epidemiológico que se encuentra en el anexo No. 9



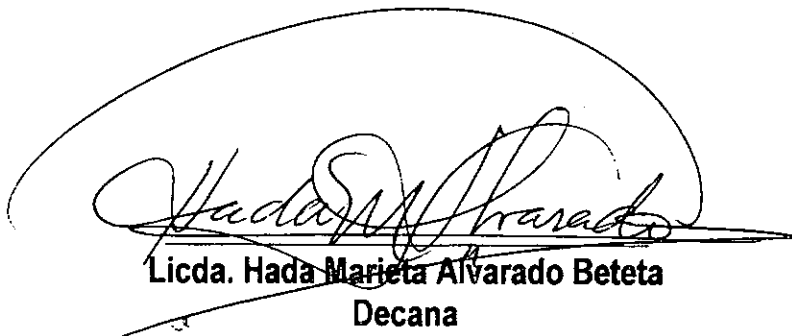
María de los Angeles Medina Monzón
Estudiante



Licda. María Beatriz López Castellanos
Asesora



Licda. Heidi Elke Logemann Lima
Directora



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta
Decana