

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

INVESTIGACIÓN DE LA PRESENCIA DE MICROSPORIDIOS EN
HECES DE NIÑOS DESNUTRIDOS EN GUATEMALA
UTILIZANDO TRES MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE TINCIÓN

KAREN ELIZABETH CONTRERAS ALONZO

QUÍMICA BIÓLOGA

GUATEMALA, AGOSTO DE 2006

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

INVESTIGACIÓN DE LA PRESENCIA DE MICROSPORIDIOS EN
HECES DE NIÑOS DESNUTRIDOS EN GUATEMALA
UTILIZANDO TRES MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE TINCIÓN

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR

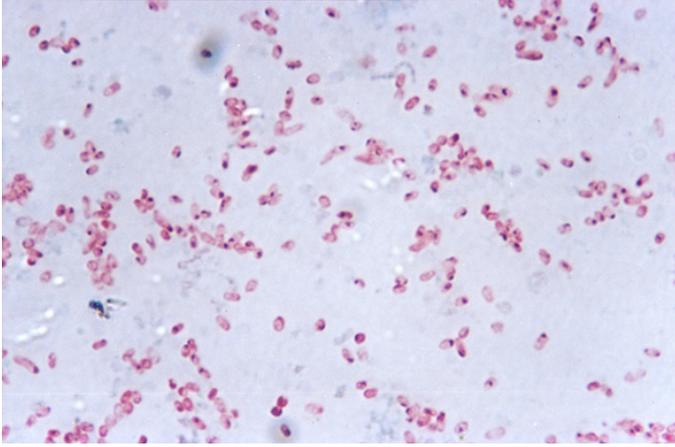
KAREN ELIZABETH CONTRERAS ALONZO

PARA OPTAR AL TÍTULO DE

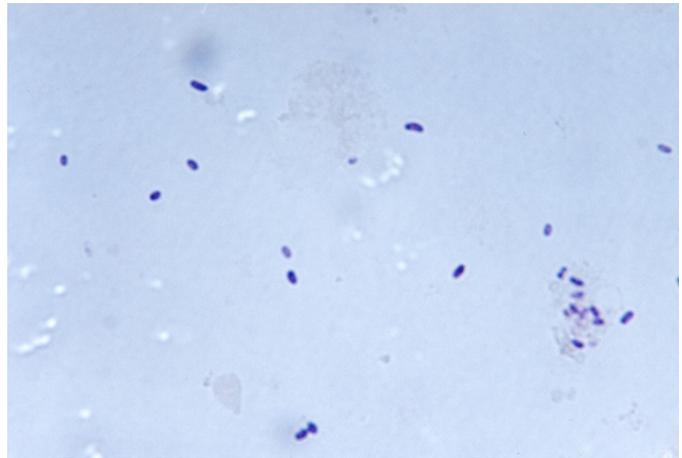
QUÍMICA BIÓLOGA

GUATEMALA, AGOSTO DE 2,006

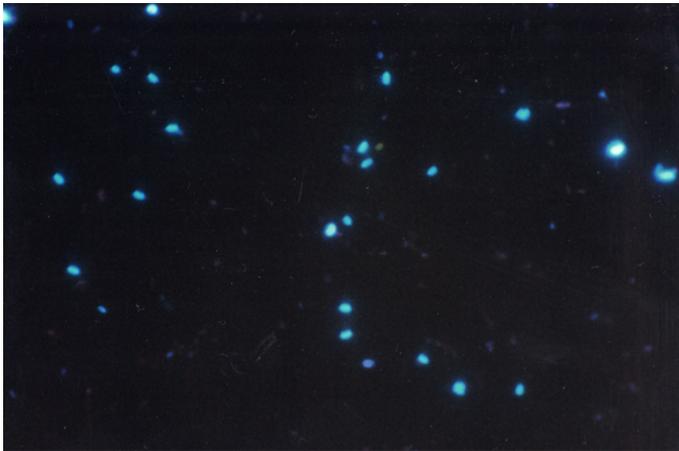
Anexo No. 4
Tinciones de esporas de microsporidios



Esporas de *Encephalitozoon cuniculi*
Tinción tricrómica modificada.



Esporas de *Encephalitozoon intestinalis*
Tinción Gram-cromótopo 2R.



Esporas de *Enterocytozoon bieneusi*
Tinción Calcofluor.

INDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCIÓN	3
3.	ANTECEDENTES	5
	3.1 DESNUTRICIÓN PROTEICO-ENERGÉTICA	5
	3.2 NUTRICIÓN, INMUNIDAD E INFECCIÓN.....	5
	3.3 MICROSPORIDIOS	7
	A. Características generales	7
	B. Ciclo de vida	8
	C. Clasificación	9
	D. Características de cada género.....	9
	E. Cuadro clínico	11
	F. Diagnóstico	12
	G. Tratamiento	13
4.	JUSTIFICACIONES.....	14
5.	OBJETIVOS.....	15
6.	MATERIAL Y METODOS.....	16
	6.1 Universo.....	16
	6.2 Recursos.....	16
	6.3 Procedimiento.....	18
	6.4 Diseño de Investigación.....	21
	6.5 Análisis de los datos.....	21
7.	RESULTADOS.....	22
8.	DISCUSION DE RESULTADOS.....	27
9.	CONCLUSIONES.....	30
10.	RECOMENDACIONES.....	31
11.	REFERENCIAS.....	32
12.	ANEXOS.....	38

1. RESUMEN

La desnutrición infantil sigue siendo uno de los principales problemas de Guatemala. La mayoría de los niños con desnutrición moderada y severa padecen de muchas complicaciones entre las que se encuentran diarrea y malabsorción que pueden ser causadas por diversos microorganismos como bacterias, parásitos y virus. Sin embargo, a pesar de diagnósticos por métodos estándar, hay ocasiones en las que no se encuentra ninguno de los microorganismos o bien el paciente está bajo tratamiento antimicrobiano y la diarrea y malabsorción persisten.

En esta investigación se consideró importante la búsqueda de microsporidios, parásitos relativamente nuevos para el humano que podrían estar involucrados en la infección intestinal de los niños desnutridos, causándoles episodios de diarrea. Como estos parásitos no son ampliamente conocidos, se evaluaron las tinciones disponibles para escoger la mejor e implementarla en el diagnóstico rutinario de laboratorio en nuestro medio. Para realizar lo anterior se escogieron cuatro tinciones: tinción tricrómica modificada, Gram-cromotropo 2R, calcoflúor y Kinyoun modificado. Las tres primeras tinciones ya se han utilizado para el diagnóstico de microsporidios, y la última, se deseaba probar con el objeto de obtener dos resultados en una sola tinción: coccidios y microsporidios.

El muestreo se realizó en la pediatría del Hospital General San Juan de Dios y en la Colonia Infantil del Club de Leones de San Juan Sacatepéquez. Se recolectaron un total de 107 muestras de niños que se encontraban entre las edades de 11 a 48 meses. A todas las muestras recolectadas se les hizo un análisis de parásitos, coccidios y microsporidios. Los resultados mostraron que el parásito encontrado con mayor frecuencia fue *Cryptosporidium parvum*, seguido por *Blastocystis hominis*. Además es importante mencionar que muchos de los niños tenían abundantes levaduras, lo cual indicaba un posible problema inmunológico a nivel del sistema gastrointestinal (27). No se encontró microsporidios en las muestras recolectadas, a pesar de eso se realizó la comparación de las tinciones propuestas en la investigación. Para ello se realizó la contaminación de muestras de heces con cinco diferentes concentraciones de esporas de microsporidios, éstas fueron teñidas y observadas por las cuatro tinciones a comparar, con el objetivo de determinar la cantidad mínima de esporas que es detectada por cada tinción utilizada en este estudio. En esta parte fue eliminada la tinción de Kinyoun modificado para el diagnóstico de microsporidios, pues no se observaron las esporas de estos parásitos en ninguna de las concentraciones realizadas. A partir de esto se escogieron

dos concentraciones de esporas para contaminar las muestras de heces y con ellas se realizó la comparación entre las tinciones de Gram-cromotropo 2R, tricrómica modificada y calcoflúor.

Las tinciones de Gram-cromotropo y tricrómica modificada dieron resultados muy parecidos, sin embargo, la tinción tricrómica tiene algunas ventajas en cuanto a la coloración de las esporas de microsporidios, pero la tinción de Gram-cromotropo consume mucho menos tiempo que la tricrómica modificada. La tinción de calcoflúor es rápida y sencilla y demuestra mejores resultados que las otras dos, por lo cual sí puede ser usada como un método confirmatorio, pero sus desventajas son que los reactivos son relativamente costosos, no se encuentran a la venta localmente y se requiere de un microscopio de fluorescencia.

2. INTRODUCCION

La diarrea es una de las causas principales de mortalidad infantil en Guatemala. En la edición de 1998 de Salud en las Américas las diarreas en niños menores de cinco años ocuparon el segundo lugar como causa de mortalidad con un 24.3 por ciento(1-3).

Guatemala es un país en donde hay escasas medidas higiénicas debidas en gran parte a la baja cobertura de abastecimiento de agua, que es de 57 por ciento en total (87 por ciento en población urbana y 40 por ciento en el sector marginal urbano, del cual solamente el 4.5 por ciento tiene conexiones domiciliarias). La cobertura de saneamiento es el 75 por ciento, pero en el área urbana las aguas negras sólo se evacuan mediante alcantarillado en el 82 por ciento de la población, en el área rural solamente el 51.6 por ciento tienen letrinas. Además, solamente el 20 por ciento de las plantas de tratamiento de agua son funcionales. Es necesario agregar también que en la población urbana sólo el 45 por ciento del agua es clorada (4).

Sumado a todo lo anterior, aproximadamente el 41.2 por ciento de los niños padecen desnutrición aguda moderada o grave y se encuentran predispuestos a adquirir infecciones de cualquier tipo de microorganismos patógenos incluyendo parásitos oportunistas los microsporidios (5-10).

Los microsporidios son parásitos protozoos intracelulares obligados capaces de infectar a muchos invertebrados y a las cinco clases de vertebrados. Se encuentran clasificados en el subreino protozoa dentro del phylum *Microspora* (11).

A partir de 1985 se descubrió que estos parásitos causan enfermedades en pacientes con SIDA y desde entonces a las especies *Enterocytozoon bieneusi* y *Encephalitozoon intestinalis* se les atribuye la diarrea crónica, malabsorción y severa pérdida de peso que sufre un elevado porcentaje de los pacientes con SIDA. Estos parásitos son asociados también con la desnutrición. Entre los microsporidios se encuentran también otras especies *E. hellem*, *E. cuniculi* que causan infección diseminada (incluyendo a *E. intestinalis*), *Vittaforma corneae* y *Nosema ocularum* se han encontrado causando problemas en el estroma de la córnea (5-9).

Para realizar el diagnóstico de estos parásitos se utilizan diversas técnicas que incluyen: tinciones para tejidos y fluidos corporales que pueden observarse en un microscopio de luz con objetivo de inmersión, pruebas serológicas, PCR para fluidos y biopsias; y para confirmar se

utiliza la microscopía electrónica (6,12-18). Con respecto al tratamiento, se utiliza albendazol para las especies que producen infección intestinal pero sólo actúa eficientemente contra *E. intestinalis* (8,19-21).

En esta investigación se determinó la presencia de microsporidios en niños de Guatemala que tienen desnutrición moderada o severa que son evaluados en la pediatría del Hospital General San Juan de Dios y en la Ciudad Infantil del Club de Leones de San Juan Sacatepéquez.

Se utilizaron tres técnicas de tinción de esporas entre las que se encuentran: Tricrómica modificada, Kinyoun modificado y Gram-cromotropo, las cuales se compararán contra la tinción de calcofluor que es el método que se usa como referencia. El propósito de la comparación fue evaluar las características y ventajas de cada coloración.

3. ANTECEDENTES

3.1 DESNUTRICION PROTEICO-ENERGETICA

Los estudios nacionales sobre el consumo de alimentos son muy escasos, en particular para los niños menores de seis años de edad, lo que restringe el análisis causal sobre disponibilidad y consumo real de alimentos en este grupo de edad, más aún si se tienen en cuenta las restricciones impuestas por las políticas de ajuste que afectan primordialmente a los grupos de bajos ingresos. Al realizar la evaluación nutricional del niño menor de cinco años se observa la tendencia ascendente de la desnutrición aguda (peso para talla) la cual casi se ha triplicado en los últimos años (4,10,22).

Los datos básicos para hacer la evaluación del estado nutricional de un niño son: la edad, el peso, la talla o longitud y el sexo. Para obtener información confiable y válida es indispensable: obtener la edad exacta del niño, dominar la técnica de toma de peso, talla y longitud, contar con personal capacitado y estandarizado, y contar con el equipo necesario en buen estado (23).

El diagnóstico antropométrico nutricional se basa en valores de referencia, indicadores y puntos de corte diversos a nivel clínico y poblacional. Los indicadores de salud y nutrición son mediciones u observaciones, que en forma indirecta reflejan el grado de la malnutrición. El diagnóstico antropométrico del estado nutricional comprende el análisis de dimensiones corporales diversas, y cada una de ellas suministra una parte de la información necesaria (10,24).

3.2 NUTRICION, INMUNIDAD E INFECCION

La infección y la mala alimentación son problemas que con frecuencia coexisten. Para poder explorar esta interacción entre la infección y la nutrición, resulta útil tomar el modelo epidemiológico (agente, hospedero y ambiente) donde la actividad del agente patógeno sólo es uno de los tres elementos que constituyen el complejo etiológico en el que, además, intervienen las características del hospedero y los factores ambientales, por lo que ni la presencia de un agente infeccioso ni la carencia de un nutrimento bastan por sí solos, para determinar la aparición de una enfermedad infecciosa (27).

Cada día se está en contacto con un enorme número de diversos microorganismos. Sin embargo, la mayor parte de veces no se desarrolla la enfermedad infecciosa. Esta protección relativa a los agentes patógenos está dada tanto por mecanismos no específicos como por defensas específicas. Cuando una o más de estas defensas del hospedero se alteran, a menudo se produce un aumento en la frecuencia y gravedad de los procesos infecciosos en el individuo afectado (27).

Las defensas inespecíficas del organismo son piel, mucosas y fagocitos, mientras que las defensas específicas son la inmunidad humoral representada por los anticuerpos (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD) y la inmunidad mediada por células representada por los linfocitos T (27).

Para producir las células y las sustancias que son responsables de defender al organismo éste requiere (al igual que para cualquier otra síntesis) de materias primas que están constituidas por nutrimentos, los cuales cumplen tanto funciones plásticas como energéticas o catalíticas, dependiendo del nutrimento y de la circunstancia de que se trate. Así, es de esperar que una reducción en la ingestión de nutrimentos se acompañe de alteraciones en la respuesta inmune. La magnitud de la incapacidad inmunológica dependerá del tipo de carencia de nutrimentos involucrados, de las interacciones con otros nutrimentos, de la severidad de la deficiencia, la presencia de infecciones agregadas y de la inmunidad propia del sujeto (27).

Todo lo anterior es importante porque habitualmente se ilustra la interacción entre inmunidad y nutrición con estudios hechos en sujetos severamente desnutridos, lo que tiende a favorecer la creencia de que sólo en estas condiciones se da la interacción antes mencionada. Pero es factible encontrar alteraciones de la respuesta inmune mucho antes aún de que se muestren evidencias clínicas de desnutrición (27).

La desnutrición generalmente es una enfermedad resultante de múltiples carencias nutricionales por lo que es frecuente encontrar diversas alteraciones en la respuesta inmune, que incluyen tanto los mecanismos específicos como los inespecíficos (27).

En la desnutrición proteico-energética (DPE) se dan desórdenes en el sistema inmunitario (sobre todo en la DPE moderada y severa), que hacen que el paciente desnutrido esté susceptible a las infecciones (respiratorias, gastrointestinales, etc.) tanto de patógenos como de microorganismos oportunistas. Hay diversos cambios en la estructura de las células

absortivas del intestino y en la mayor parte de pacientes se presenta diarrea, que puede estar relacionada con los siguientes microorganismos: *Shigella* sp, *Salmonella* sp, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enteropatógena, enterotoxigénica, enteroinvasiva y enterohemorrágica, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas* sp y *Plesiomonas* sp, rotavirus, astrovirus, adenovirus, helmintos, coccidios y otros protozoos. Además, entre éstos hay que mencionar a algunos parásitos que son oportunistas o producen diarrea autolimitante en algunos pacientes como: coccidios (*Isospora belli*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*) y microsporidios (*Enterocytozoon bieneusi* y *Encephalitozoon intestinalis*) (1,2,27-31).

3.3 MICROSPORIDIOS

A. CARACTERISTICAS GENERALES

Los microsporidios son parásitos protozoos intracelulares obligados, formadores de esporas. Son capaces de infectar a muchos invertebrados y a las cinco clases de vertebrados (32). Fueron identificados en 1857 (33), y reconocidos como causa de enfermedades en muchos hospederos no humanos, especialmente en insectos de importancia comercial, pescado, roedores de laboratorio, conejos, primates y otros (34). Hay más de mil especies clasificadas dentro de aproximadamente cien géneros, pero de éstas solamente trece especies han sido reportadas como causa de infección en los mamíferos (35).

El primer caso de microsporidiosis humana fue reportado en 1959 (36), pero fue a partir de 1985 cuando se comenzaron a reportar más casos de microsporidios en personas con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. Debido a esto, el interés en los microsporidios incrementó por considerarse patógenos oportunistas y ser los causantes de la diarrea en muchos pacientes con SIDA (7).

Los microsporidios están clasificados en el subreino Protozoa dentro del Phylum *Microspora*. Tienen características de procariotas (como el ARN ribosomal, la ausencia de mitocondria, peroxisomas y aparatos de Golgi), pero son considerados verdaderos eucariotas porque tienen núcleo con envoltura nuclear, tienen un sistema de membrana intracitoplásmica y porque sus cromosomas se dividen por episodios mitóticos. Por todo esto, se les considera filogenéticamente eucariotas tempranos (35,37). Las esporas que se encuentran en los mamíferos son de forma ovoide o piriforme y miden 1.5 a 5µm de ancho por 2 a 7µm de largo.

Se caracterizan porque poseen un túbulo polar que utilizan para inyectar el material infeccioso dentro de la célula hospedera. Este túbulo polar distingue a todos los microsporidios de los demás protozoos y, además, es utilizado para diferenciar los géneros y especies de microsporidios por el número de vueltas que presenta en el interior de la espora (34,37).

B. CICLO DE VIDA (Anexo 1)

1. GERMINACION: Una vez ingerida, la espora es estimulada por el ambiente gastrointestinal y bajo condiciones apropiadas de pH, concentración de iones calcio y presión pueden germinar e infectar a la célula hospedera. Particularmente, el género *Encephalitozoon* puede replicarse dentro de los macrófagos y es posible que estos organismos puedan ser fagocitados después de la germinación. Los iones calcio interactúan con los componentes del citoesqueleto de la membrana celular y de esa forma contribuyen para que la espora inyecte por medio del filamento polar el material infeccioso (esporoplasma) dentro del citoplasma de la célula hospedera (35,38).

2. MEROGONIA: Es la fase proliferativa del desarrollo, que inicia en cuanto el esporoplasma entra en el citoplasma de la célula hospedera. Se producen una serie de cambios en la superficie de la membrana celular que pueden ser agrandamiento o elongación. La división ocurre por fisión binaria (*Encephalitozoon*, *Nosema*, *Vittaforma*) o cariocinesis en donde resultan formas multinucleadas (*Enterocytozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*) (34,35,37).

3. ESPOROGONIA: Es el desarrollo de organismos más electrodensos, son llamados esporontes y pueden dividirse un número limitado de veces por fisión binaria, algunos se dividen rápidamente resultando cuatro a ocho organismos conectados. Pueden haber esporontes multinucleados (*Enterocytozoon*, *Pleistophora*) (39).

Después de la replicación de los microsporidios la célula hospedera se rompe y libera las esporas y algunos organismos inmaduros. La espora madura es considerada el estadio infeccioso, pero algunas formas menos maduras podrían también desarrollar infección (38,39).

Las esporas son eliminadas con las heces, orina o secreciones respiratorias, o pueden producir autoinfección en los hospederos (diseminación o infección local). Las esporas entran a nuevas células hospederas inyectando el esporoplasma en el proceso de germinación o pueden ser fagocitadas. Los géneros *Enterocytozoon*, *Pleistophora* y *Nosema* se encuentran

relativamente localizados en el intestino delgado, músculo esquelético y estroma de córnea, respectivamente, con algunas excepciones. Las especies del género *Encephalitozoon* generalmente producen infección diseminada probablemente por macrófagos. Las esporas en el ambiente pueden permanecer viables hasta 4 meses, siendo las principales vías de transmisión la ruta feco-oral, urinaria-oral, transplacentaria y transovárica. En carnívoros es muy común la transmisión vertical (34,35,37).

C. CLASIFICACIÓN (Anexo 2)

En la clasificación taxonómica anterior, los microsporidios fueron divididos dentro de dos órdenes, *Pansporoblastina* y *Apansporoblastina*, basándose en la presencia o ausencia, respectivamente, de la vesícula esporofora. Estas categorías se usaban comúnmente para describir nuevas especies de microsporidios que infectan a mamíferos (34,40). En la más reciente clasificación taxonómica se estableció nuevos órdenes, y las familias fueron definidas basándose en la relación parásito-hospedero, características de la esporogonia y la morfología de la espora (38).

Las características que se usaron para clasificar a los microsporidios dentro de cada género, incluyeron, tipo de hospedero, modo de transmisión, relación parásito-hospedero, desarrollo del microsporidio (merogonia y esquizogonia), y morfología de la espora (tamaño, desarrollo nuclear, número de vueltas del filamento polar) (35).

D. CARACTERÍSTICAS DE CADA GENERO

Género *Enterocytozoon*:

Enterocytozoon bieneusi es la única especie de este género. Su hospedero son mamíferos, principalmente humanos. Recientemente se encontró en macacos y cerdos (41,42).

E. bieneusi es el microsporidio que más se encuentra en personas con SIDA su transmisión ocurre generalmente por vía feco-oral siendo el sitio primario de infección los enterocitos del intestino delgado (yeyuno y duodeno) (6,43,44).

En algunas ocasiones *E. bieneusi* infecta páncreas, hígado, así como también el tracto respiratorio, pero por lo general la infección se limita al intestino delgado, en el que causa cambios citopáticos en las células del intestino, incluyendo pleomorfismo, núcleo hipercromático

y pérdida de la orientación del núcleo (6,45,46).

Género *Encephalitozoon*:

En éste se incluyen tres especies, *E. cuniculi*, *E. hellem* y *E. intestinalis*. La especie *E. cuniculi* infecta a muchos mamíferos como roedores, conejos, perros, lobos y primates (no humanos y humanos). *E. hellem* se ha encontrado en humanos (no se ha reportado en ningún otro mamífero) y también en aves, mientras que *E. intestinalis* solamente se ha reportado en humanos (7,8,40,47,48). Anteriormente *E. intestinalis* era llamado *Septata intestinalis*, pero luego de analizar las características moleculares del parásito se dieron cuenta que debía clasificarse dentro del género *Encephalitozoon* (49,50).

Se han identificado tres cepas de *E. cuniculi*. La cepa I se aisló y cultivó en conejos; la cepa II se encontró en ratón, pero poco tiempo después fue aislada de lobos; y la cepa III se aisló de perros domésticos. Cualquiera de las tres cepas de *E. cuniculi* es capaz de causar infección a los humanos (41,51).

Las esporas de estas tres especies no se distinguen morfológicamente, pero sí por características inmunológicas, moleculares y bioquímicas (52). La transmisión puede ser por inhalación e ingestión; aunque en *E. cuniculi* se ha observado también la transmisión transplacentaria (40,53). Además, se cree que la infección ocular por *E. hellem* o *E. intestinalis* podría transmitirse por contacto con aerosoles o por manos contaminadas con orina, debido a que la infección en los ojos es comúnmente asociada con la presencia de esporas en la orina (54).

La infección de las especies de éste género se puede diseminar a hígado, riñones, bazo y cerebro (6,45,55).

Género *Pleistophora*:

Las especies de este género infectan comúnmente el músculo esquelético de peces, pero también se han reportado algunos casos de la infección en humanos. El modo de transmisión no está bien establecido, sin embargo, se ha observado que el sitio primario de infección en mamíferos es el músculo esquelético (38,39,56).

Género *Trachipleistophora*:

Aquí se incluyen dos especies *Trachipleistophora hominis* y *Trachipleistophora anthropophthera*. La especie *T. hominis* se aisló de un paciente con SIDA y no ha sido identificada en ningún otro hospedero. Los sitios de infección incluyen músculo esquelético, epitelio de la córnea y tejido nasofaríngeo (39,57,58). Por otra parte, la especie *T. anthropophthera* se encontró en la autopsia de dos pacientes con SIDA, en el primero solamente en el cerebro, mientras que en el segundo se encontró en cerebro, riñones, páncreas, tiroides, paratiroides, corazón, hígado, pulmones, bazo y nódulos linfáticos (58).

Género *Nosema*:

En este género se encuentran especies que infectan principalmente insectos, pero dos de ellas *N. conori* y *N. ocularum* se han identificado en humanos. *N. ocularum* se encontró en el estroma corneal de un paciente negativo para Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y *N. conori* se identificó causando infección diseminada en un niño atímico. Se desconoce el modo de transmisión en mamíferos (34,59).

Género *Vittiforma*:

Solamente hay una especie, *Vittamorfa corneae*, pero se desconoce el modo de transmisión. Esta especie se encontró en el estroma de córnea de un paciente VIH negativo (60). Anteriormente se llamaba *Nosema corneum* (61).

E. CUADRO CLINICO

En humanos la infección por microsporidios tomó mucha importancia a partir de las infecciones causadas por el VIH, pues en 1994, en Estados Unidos, el 39 por ciento de los pacientes infectados con este virus, tenían infección intestinal por estos parásitos (62). Sin embargo, también se han reportado ya varios casos en los que las personas tienen infección por microsporidios, pero serológicamente son VIH negativas, aunque en la mayoría de los casos tienen algún tipo de inmunodeficiencia incluyendo desnutrición. Se considera que en las personas inmunocompetentes la diarrea es autolimitante y subclínica (5,37,63,64).

En los individuos que tienen infección por microsporidios, se pueden presentar distintos desórdenes clínicos como la enteropatía, infecciones diseminadas en la piel, queratoconjuntivitis, sinusitis, traqueobronquitis, encefalitis, nefritis intersticial, hepatitis,

colecistitis, osteomielitis y miositis (35). Sin embargo, los síntomas más comunes son la diarrea y malabsorción, y casi todos los pacientes con microsporidiosis sufren de pérdida de peso como consecuencia de la diarrea crónica (63-65).

Los agentes causales de la infección gastrointestinal son *E. bienewisi* y *E. intestinalis* (66,67). Algunos autores consideran que la infección por *E. bienewisi* no se asocia con enfermedad clínica en todos los casos, y sugieren que los microsporidios podrían no ser verdaderos patógenos entéricos (37). Sin embargo, no se puede distinguir entre la presencia de *E. bienewisi* como organismo comensal o bien la posibilidad de que los microsporidios puedan existir en un estado latente y siendo capaces de producir daño al tejido. Además, hay que tomar en cuenta que existen otros factores que influyen en el desarrollo de una microsporidiosis intestinal, como sería una severa depleción de linfocitos CD4+ (35).

Cuando la diarrea es severa hay una marcada deshidratación y anomalías electrolíticas (hipokalemia, hipomagnesemia y disminución en la concentración de bicarbonato). Algunos pacientes que no tienen diarrea presentan evidencia de enteropatía y malabsorción, así como intolerancia a la lactosa y grasas (68).

F. DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la microsporidiosis inicialmente fue basado en microscopía electrónica, pero esto lo hacía muy limitado, debido al poco acceso que se tiene a este equipo. Para solucionar este problema se buscaron otras alternativas menos complicadas. Se comenzó a utilizar entonces el microscopio de luz teniendo siempre como referencia el microscopio electrónico. Esto y el desarrollo de varias tinciones diagnósticas hizo posible detectar más casos de microsporidiosis, pues cualquier laboratorio está en la capacidad de realizar alguna de las tinciones que se utilizan (69).

Las tinciones diagnósticas que se usan son tricrómica, Gram (con modificaciones), Ziehl-Neelsen, Giemsa, hematoxilina eosina y otras. También hay técnicas de tinción utilizando fluorocromos, pero se usan con menor frecuencia debido a las limitaciones de equipo y experiencia en su manejo (12-17). Otras técnicas disponibles son las de inmunofluorescencia así como también están las técnicas moleculares como el PCR, que se han trabajado en especímenes clínicos (heces, orina, biopsias, fluido broncoalveolar) dando muy buenos

resultados. Sin embargo, no todos los laboratorios tienen acceso a estos procedimientos, pero es importante porque se logra determinar la especie causante de la infección sin tener que recurrir a la microscopía electrónica (8,18,70-77).

G. TRATAMIENTO

Los estudios sobre tratamiento para *E. bienewisi* son escasos. Algunos refieren que hay respuesta al albendazol, metronidazol y otros, pero al realizar un examen histológico, éste revela que la infección persiste (19,65). Sin embargo, las esperanzas de encontrar tratamiento no se pierden, pues ya se encontró otro tipo de hospederos distintos al humano (macacos y cerdos) que podrían utilizarse como modelos para realizar estos estudios (42). Además, puede usarse también como alternativa terapias antiretrovirales que podrían influir en la supresión del virus de inmunodeficiencia humana y disminuir la eliminación de esporas de *E. bienewisi* (78).

Por el contrario, para *E. intestinalis* existe una excelente respuesta al tratamiento con albendazol y clínicamente en la mayoría de los pacientes tiende a desaparecer la diarrea y la eliminación de esporas por heces y orina, incluso para confirmar si la infección persiste, se ha tomado biopsias del intestino delgado, observando que hay una evidente desaparición de las esporas en el tejido (8,20,21). Hay otros tratamientos que aún están en pruebas, como la fumagalina, derivados de imidazoles, etc. (79).

4. JUSTIFICACIONES

Guatemala es un país con escasez de medidas higiénicas y de salud. Los salarios mínimos no alcanzan para comprar los alimentos de la canasta básica por lo que las demandas nutricionales mínimas no se satisfacen. Además, la carencia y consumo adecuado de los alimentos se ven afectados por varios factores, por ejemplo el nivel de instrucción que la madre posee, así como los hábitos y prácticas alimentarias, la calidad y periodicidad del suministro de alimentos, y la existencia de "tabúes alimentarios". Como consecuencia de todo lo anterior el 41.2 por ciento de niños guatemaltecos menores de cinco años se encuentran con desnutrición moderada y severa (3,10).

Los niños desnutridos, especialmente los que se encuentran en las categorías de desnutrición moderada y severa padecen de muchas complicaciones. Las complicaciones más comunes son infecciones respiratorias, sistémicas (que pueden ser sin reacción febril), lesiones oculares, gastroenteritis, diarrea y malabsorción (21,24).

La diarrea puede ser causada por muchos microorganismos como bacterias, virus y parásitos, pero existen situaciones en las que a pesar de no tener ninguno de los agentes buscados o estar bajo tratamiento antimicrobiano, la diarrea y malabsorción persisten. Por esta razón, se considera necesaria la búsqueda de nuevos parásitos que podrían estar involucrados en la diarrea y malabsorción de los niños que se encuentran con alguna deficiencia en el sistema inmunitario (debido a la desnutrición). Este es el caso de los microsporidios que, aunque no son considerados verdaderos patógenos, son parásitos que causan diarrea crónica, malabsorción y severa pérdida de peso en personas que tienen alguna inmunodeficiencia, pero también producen diarrea en personas inmunocompetentes la cual es considerada autolimitante (5,35,37,59).

Es importante determinar si estos parásitos son capaces o no de causar los problemas de diarrea, malabsorción y pérdida de peso en niños desnutridos, pues de esa manera podrían tratarse, mejorar la evolución de los niños, así como también disminuir la mortalidad infantil debida a infecciones intestinales la cual ocupa el primer lugar de causas de muerte en este país.

5. OBJETIVOS

Objetivo General:

1. Determinar la presencia de esporas de microsporidios en heces de niños desnutridos.

Objetivos Específicos:

1. Determinar qué porcentaje de niños desnutridos presentan esporas de microsporidios, analizando las muestras que se toman en la pediatría del Hospital General San Juan de Dios y en la ciudad Infantil del Club de Leones, ubicada en San Juan Sacatepéquez.
2. Estandarizar la técnica de cada método de tinción.
3. Determinar que método de tinción de esporas de microsporidios tiene mayor sensibilidad y especificidad para el uso en la rutina del laboratorio.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Universo: Niños desnutridos comprendidos en las edades de cero a cinco años.

Muestra: Niños desnutridos de cero a cinco años con desnutrición moderada y severa de la pediatría del Hospital General San Juan de Dios y de la Ciudad Infantil del Club de Leones de San Juan Sacatepéquez.

Para determinar el grado de desnutrición de los niños se utilizará los indicadores antropométricos, peso para talla y talla para edad.

6.2 Recursos:

6.2.1 Humanos:

- Lic. Rafael Pratdesaba
- Licda. Olga Torres de Matute
- Lic. Víctor Alfonso Mayén
- Dra. Elizabeth Didier
- Dra. Susana de Molina
- Licda. Rosa Carolina Joo León
- Licda. Blanca Samayoa
- Br. Karen Elizabeth Contreras (Tesisista)
- Br. Mayra Sucely Ixcot

6.2.2 Institucionales:

- Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá.
- Pediatría del Hospital General San Juan de Dios.
- Ciudad Infantil del Club de Leones de San Juan Sacatepéquez.
- Centro de investigación en primates de la universidad de Tulane, New Orleans, Estados Unidos.

6.2.3 Físicos:

Material de laboratorio:

- Láminas portaobjetos
- Palillos de madera
- Tubos plásticos con tapadera de rosca con capacidad de 8 ml
- Frascos de vidrio

- Pipetas pasteur
- Aceite de inmersión
- Bulbos
- Guantes descartables
- Esporas de *E. cuniculi* II de ratón preservadas en formalina
- Frotos con esporas de microsporidios de especies ya identificadas, teñidos con Gram, Calcoflúor y Tricrómica donados por el Centro de investigaciones en primates de la Universidad de Tulane, New Orleans
- Cajas de coplic.

Reactivos:

- Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al 5 por ciento (Com. pers. Didier ES).
- Formalina al 10 por ciento
- Cromotrope 2R
- Anilina azul
- Acido fosfotúngstico
- Acido acético concentrado
- Alcohol etílico al 90 por ciento
- Alcohol etílico al 95 por ciento
- Alcohol etílico al 100 por ciento
- Xileno
- Verde intenso
- Cristal violeta al 1 por ciento
- Solución de yodo
- Alcohol acetona
- Carbol fucsina
- Azul de metileno
- Alcohol ácido
- Agua destilada
- Cloruro de sodio
- Azul de Evans
- Calcofluor blanco

Equipo:

- Microscopio de luz

- Incubadora
- Pipetas graduada de 10 μ l
- Microscopio de fluorescencia
- Baño maría

6.3 Procedimiento:

1. Se recolectaron muestras de heces, que se preservaron en formalina al 10 por ciento y dicromato de potasio al 2.5 por ciento.
2. De la porción preservada en formalina se hizo examen parasitológico de rutina y se realizaron cuatro frotos de cada muestra utilizando 10 μ l de muestra para hacer los frotos.
3. Los frotos de las muestras se tiñeron de la siguiente manera:
 - El primero con coloración de Kinyoun modificado (80).
 - El segundo frote con coloración de Gram-cromotrope-2R (12).
 - El tercero con coloración tricrómica modificada(13).
 - El cuarto frote fue teñido con el método calcoflúor de fluorescencia (15).
4. Los frotos ya teñidos se observaron al microscopio en objetivo de 100X para buscar las esporas de microsporidios y hacer las comparaciones entre las tinciones.
5. La porción de heces preservada en dicromato de potasio se utilizó posteriormente para estudios de PCR, como parte de otra investigación.

6.3.1 Técnica de tinción de Kinyoun modificado (80):

- Colocar los portaobjetos para tinción en una bandeja, agregar suficiente carbolfushina y calentar suavemente hasta vaporización. Dejar que se vaporice durante cinco minutos.
- Lavar suavemente con agua de chorro.
- Decolorar con alcohol ácido hasta que ya no aparezca un color rojo al lavarlo. Lavar suavemente con agua del chorro.
- Realizar contratinción con azul de metileno por treinta segundos. Lavar suavemente con agua del chorro y dejar secar. Las esporas se observan de color rojo sobre un fondo

azul (para preparación de colorantes ver anexo 3).

6.3.2 Técnica de tinción con Gram-cromotropo 2R (12):

- Teñir el frote con cristal violeta al uno por ciento por treinta segundos.
- Lavar y cubrir con solución de yodo por treinta segundos.
- Decolorar con alcohol acetona y lavar.
- Agregar cromotropo al uno por ciento y calentar a 50 o 55 °C por un minuto en baño maría.
- Lavar en alcohol-ácido al noventa por ciento por uno a tres segundos.
- Lavar en alcohol etílico al noventa y cinco por ciento por treinta segundos.
- Lavar varias veces en etanol al cien por ciento, en tiempos de treinta segundos.
- Para cortes de tejido agregar treinta segundos en cada paso. Las esporas de microsporidios aparecerán teñidas de color morado o violeta, porque son Gram positivo (ver anexo 3 para preparación de colorantes).

6.3.3 Técnica de tinción tricrómica modificada(13):

- Fijar el frote en metanol por cinco minutos.
- Teñir con colorante cromotropo 2R por treinta minutos a 37°C y lavar por diez segundos con alcohol ácido.
- Deshidratar los frotos lavando cinco minutos en alcohol al noventa y cinco por ciento.
- Lavar 10 minutos en alcohol etílico al cien por ciento.
- Dejar cinco minutos en xileno. Dejar secar al aire y observar las esporas de color rojo sobre un fondo verde azulado (ver anexo 3 para preparación de colorantes).

6.3.4 Técnica de tinción con Calcofluor (15):

- Fijar los frotos con metanol por cinco minutos y dejar secar al aire.
- Agregar la solución de calcofluor y dejar por cinco minutos a temperatura ambiente.
- Lavar con agua de chorro y agregar luego el colorante de contraste azul de Evans por un minuto a temperatura ambiente.
- Lavar los portaobjetos con agua y dejar secar al aire.
- Observar al microscopio UV a 395 o 415 nm de longitud de onda. Los organismos aparecen celestes o con halos ovals turquesas (ver anexo 3 para preparación de colorantes).

6.3.5 Comparación de Tinciones:

1. Se contaminaron heces (sin presencia de parásitos) con esporas de *Encephalitozoon cuniculi* II (cultivadas en células de ratón), agregando a un gramo de heces 10 ul de una suspensión de esporas a una concentración de 1.5×10^3 .
2. A partir de la suspensión se hizo cuatro diluciones a concentraciones de: 150, 15, 3 y 1 esporas/gramo de heces.
3. Se hizo cuatro frotos de cada dilución (utilizando 10 ul de muestra de heces para hacer los frotos) y se tiñeron por las coloraciones: Kinyoun modificado, Gram-cromotropo 2R, tricrómica modificada y calcoflúor según los procedimientos estandarizados de cada.
4. Se observó los frotos (mínimo 200 campos/ frote) y se seleccionó dos de las cinco diluciones de esporas, para así continuar con esas diluciones la comparación de tinciones.
5. Se hizo 30 frotos por tinción, de los cuales 25 frotos fueron positivos y 5 frotos fueron negativos (para esporas de microsporidios y otros parásitos).
6. Los frotos fueron numerados y ordenados por una persona ajena al proyecto, intercalando los negativos entre los positivos, de manera aleatoria.
7. Se tiñeron los frotos por las coloraciones a comparar según los requerimientos de cada una.
8. Se observaron al microscopio un mínimo 200 campos/frote.
9. Los resultados obtenidos se utilizaran para establecer comparaciones entre las tinciones utilizadas en este estudio.

6.4 Diseño de Investigación:

1. Muestreo:

Los criterios de inclusión que se utilizaron son:

a) Niños de cero a cinco años de edad que están internados en la pediatría del Hospital General San Juan de Dios y en la Ciudad infantil del Club de Leones de San Juan Sacatepéquez durante los meses de marzo 1999 a enero de 2000.

b) Tener desnutrición moderada o severa. Para determinar el grado de desnutrición de los niños se utilizará los indicadores antropométricos, peso para talla y talla para edad.

Los criterios de exclusión son:

a) Niños con otro tipo de enfermedades como por ejemplo SIDA, cáncer, etc.

Tamaño de muestra: Se definió mediante la fórmula:

$$N = \frac{NC^2 \sigma^2}{\Delta^2}$$

A todos los pacientes se les llenará una ficha con todos los datos, en la cual se colocará también los resultados que se vayan obteniendo en la búsqueda de esporas, con cada tinción (81).

2. Estándar de oro:

Para determinar la presencia de esporas de microsporidios en heces se utilizó las tinciones de Kinyoun modificado, Gram-cromótopo y Tricrómica modificada, para confirmar el diagnóstico se utilizó como "estándar de oro" la tinción de calcofluor.

6.5 Análisis de Datos:

Los resultados obtenidos por medio de las tres tinciones y el estándar de oro utilizado se analizaron por medio de una tabla de contingencia para determinar la especificidad, sensibilidad y valores predictivos de las tinciones empleadas.

El diagnóstico positivo por medio de la tinción de calcofluor se utilizó para establecer el porcentaje de infección por microsporidios.

7. RESULTADOS

MUESTREO

En este estudio se pretendía evaluar la cantidad de niños desnutridos que presentaban infección por microsporidios. Para llevar a cabo esto se recolectaron muestras de un total de 107 niños cuyas características se describen en la tabla No. 1. El mayor porcentaje de las muestras obtenidas pertenecía al Hospital General San Juan de Dios, y el resto a la Colonia Infantil del Club de Leones de San Juan Sacatepéquez.

Tabla No. 1

Descripción de la población incluida en el estudio (n = 107)

Características Evaluadas	Descripción	
	HGSJD ¹	SJS ²
TOTAL	76 (71%)	31 (29%)
EDAD	Media = 9 meses Rango:1 - 44 meses	Media = 17 meses Rango:6 - 38 meses
GENERO	Niños 39 (52%) Niñas 37 (48%)	Niños 16 (52%) Niñas 15(48%)
Presencia de parásitos	10 (14%)	3 (10%)
1 parásito	8 (10%)	3 (10%)
mas de un parásito	3 (4%)	0 (0%)
DIARREA³		
Presente	21 %	26 %
Ausente	79 %	74 %
DESNUTRICIÓN		
Moderada	17 %	26 %
Severa	71 %	52 %
Sin clasificar	12 %	22 %

1: Pediatría del Hospital General San Juan de Dios.

2: Colonia Infantil del Club de Leones de San Juan Sacatepéquez

3: Niños que tenían diarrea al momento del estudio.

Para la clasificación nutricional de los niños es necesario aclarar que existían ciertas diferencias entre los sitios de muestreo, en la pediatría del Hospital General San Juan de Dios se contaba con la evaluación de un nutricionista, mientras que en el otro sitio de muestreo solamente eran evaluados por un médico y las enfermeras. Los datos antropométricos se describen a continuación.

Tabla No. 2**Relación de los índices antropométricos de los niños en los sitios de muestreo**

Índice	Rango	Porcentaje de niños en ese rango	
		HGSJD ¹	SJS ²
Talla/Edad	Hasta 80%	9 %	23 %
	80 - 90%	61 %	52 %
	Mayor 90%	29 %	25 %
Peso/Edad	Hasta 50%	38 %	19 %
	50 - 65%	42 %	48 %
	66 - 77%	16 %	29 %
	Mayor 90%	4 %	4 %

1: Pediatría del Hospital General San Juan de Dios.

2: Colonia Infantil del Club de Leones de San Juan Sacatepéquez

A todas las muestras recolectadas se les realizó un examen parasitológico de rutina, que incluía la búsqueda de coccidios y microsporidios, es importante mencionar que las muestras fueron preservadas en formalina salina al 10 % (tabla No.3).

Tabla No. 3**Resultados obtenidos del análisis parasitológico (N = 107)**

Parásitos	No. de casos encontrados	Porcentaje
<i>Ascaris lumbricoides</i>	3	2.7 %
<i>Trichuris trichiura</i>	2	1.8 %
Uncinarias	2	1.8 %
<i>Blastocystis hominis</i>	5	4.5 %
<i>Cryptosporidium parvum</i>	7	6.3 %
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	1	0.9 %
Microsporidios	0	0 %

Tabla No.4**Cantidad de parásitos observados por paciente (N = 14)**

Parásitos	No. de Casos	Porcentaje
<i>Trichuris trichiura</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i> y Uncinarias	1	7 %
<i>Trichuris trichiura</i> y <i>Blastocystis hominis</i>	1	7 %
<i>Trichuris trichiura</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i> y <i>Cryptosporidium parvum</i>	1	7 %
<i>Blastocystis hominis</i>	4	29 %
<i>Cryptosporidium parvum</i>	6	43 %
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	1	7 %

Comparación de tinciones de microsporidios

Debido a que no se encontró ninguna muestra positiva para microsporidios (tabla No. 3) no se pudo establecer ninguna comparación entre las tinciones seleccionadas en esta investigación. Sin embargo, para establecer algún tipo de comparación se contaminaron muestras de heces sin presencia de parásitos con esporas de *E. cuniculi* II (cultivadas en células de ratón) de la siguiente forma: a un gramo de heces se le agregó 10 ul de una solución de esporas de concentración conocida (1.5×10^3) y a partir de esta se hicieron varias diluciones de esporas para obtener cinco diferentes concentraciones de las esporas.

A partir de las muestras de heces contaminadas se hicieron cinco frotos de cada una utilizando las suspensiones de esporas; estos tiñeron por las distintas coloraciones que incluían: tricrómica modificada, Kinyoun modificado, Gram-cromotropo 2R y Calcofluor. Posteriormente se observaron al microscopio un mínimo de 200 campos en cada frote evaluado (Com. pers. Didier ES). Con estas concentraciones se determinó hasta que cantidad aún era posible identificar (en un frote) las esporas de microsporidios.

Tabla No. 5

Detección de esporas de microsporidios por cuatro diferentes tinciones.

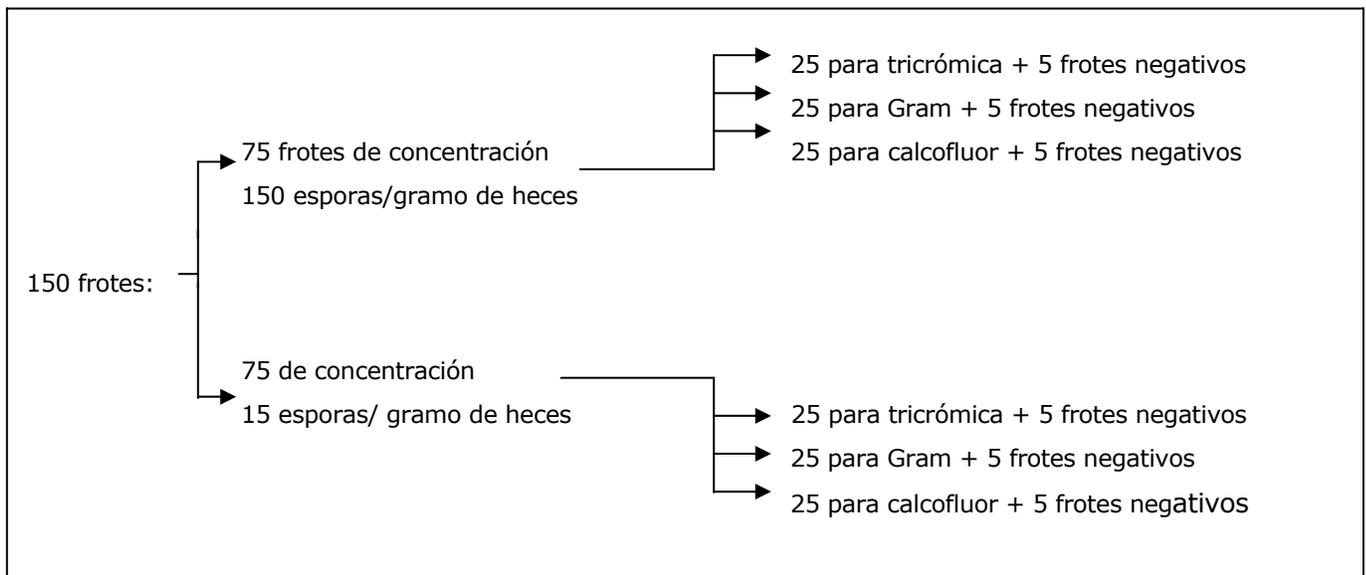
CONCENTRACIONES		TINCIÓN TRICRÓMICA MODIFICADA*	TINCIÓN KINYOUN MODIFICADO*	TINCIÓN GRAM-CROMOTROPO 2R*	TINCIÓN CALCOFLUOR*
1.	1.5×10^3	500 esporas/frote	No se observó	450 esporas/frote	650 esporas/frote
2.	150	18 esporas/frote	No se observó	30 esporas / frote	18 esporas/frote
3.	15	11 esporas/frote	No se observó	13 esporas/frote	3 esporas/frote
4.	3	3 esporas/frote	No se observó	2 esporas/frote	1 espóra/frote
5.	1	1 esporas/frote	No se observó	1 espóra/frote	No se observó

*Los frotos se realizaron con 10 ul de la suspensión de heces observando como mínimo 200 campos / frote.

Luego de observar los resultados obtenidos en el experimento anterior se decidió eliminar la tinción de Kinyoun modificado pues las esporas no se observaron en ninguna de las concentraciones realizadas (tabla No. 5). Además, se eligieron dos concentraciones para llevar a cabo la comparación entre las tinciones, la de 150 y la de 15 esporas de microsporidios/gramo de heces, pues se consideró que esas concentraciones son el promedio en el cual se puede evaluar la efectividad de cada una de las tinciones. Las muestras de heces negativas para la presencia de parásitos se contaminaron con las esporas de microsporidios de igual forma que para el experimento anterior y se realizaron los frotos según la tabla No.6:

Tabla No. 6

Esquema de la distribución de frotos para cada tinción



Posteriormente los frotos fueron numerados por una persona totalmente ajena al proyecto y se tiñeron por las tres tinciones (tricrómica modificada, Gram-cromotropeo 2R y Calcofluor) para así observarlos (con un mínimo de 200 campos por frote) e identificar las esporas (tabla No.7).

Tabla No. 7

Comparación de tinciones de esporas de microsporidios

CONCENTRACION DE ESPORAS/GRAMO DE HECES	TINCIÓN TRICRÓMICA MODIFICADA	TINCIÓN GRAM-CROMOTROPO 2R	TINCIÓN CALCOFLUOR
150	73% positivos reales 7% negativos reales 10% negativos falsos 10% positivos falsos	70% positivos reales 7% negativos reales 13% negativos falsos 10% positivos falsos	80% positivos reales 13% negativos reales 3% negativo falso 4% positivo falso
15	37% positivos reales 7% negativos reales 46% negativos falsos 10% positivos falsos	40% positivos reales 17% negativos reales 43% negativos falsos 0% positivos falsos	30% positivos reales 13% negativos reales 53% negativos falsos 4% positivo falso

8. DISCUSION DE RESULTADOS

En Guatemala aun existe un alto grado de desnutrición infantil y, por lo general, la diarrea y malabsorción son algunas de las complicaciones que afectan a la mayoría de los niños con los tipos de desnutrición moderada o severa (1,2,27). El llevar a cabo estudios nuevos de parásitos que podrían estar provocando estas complicaciones en los niños es muy beneficioso, pues de alguna manera podría aclarar la procedencia de los síntomas de los niños. En este trabajo de investigación se realizó la búsqueda de microsporidios, parásitos y coccidios en niños con los tipos de desnutrición ya mencionados.

Las muestras evaluadas pertenecían a los niños que asistían a dos lugares, la mayor parte (71 por ciento) al Hospital General San Juan de Dios y el resto (29 por ciento) a la Colonia Infantil del Club de Leones de San Juan Sacatepéquez. Los lugares de muestreo variaban un poco en cuanto a sus características, por lo que los niños de ambos lugares no se encontraban bajo las mismas condiciones, por ejemplo, en el Hospital mencionado casi todos los niños tenían a uno de sus padres encargados quien permanecía con ellos el tiempo que estuvieran en recuperación nutricional, lo cual duraba alrededor de uno a dos meses y mientras tanto el estado nutricional de los niños era evaluado por varios médicos y nutricionistas. En la Colonia Infantil del Club de Leones de San Juan Sacatepéquez debido a todos los gastos que se tienen los niños ingresan y se quedan al cuidado de las niñeras por el tiempo que se considere necesario para restablecer su estado nutricional, son visitados y evaluados por un médico pero no cuentan con el apoyo de un nutricionista. Los niños en algunas ocasiones son abandonados.

Se obtuvieron muestras de un total de 107 niños con edades que oscilaban entre 1 a 48 meses, la media estuvo en 11 meses y el 50 por ciento de los niños estaban por debajo de los 9 meses. Otros datos importantes de la población fueron que el 52 por ciento era de género masculino y el 48% de género femenino, lo cual demuestra una población bastante homogénea. En el momento de la toma de muestra en los dos sitios de muestreo se encontró 21 y 26 por ciento de los niños con diarrea respectivamente (tabla No.1), datos que no reflejan mayores diferencias entre los lugares.

El 14 por ciento de los niños del hospital tenían parásitos mientras que en la colonia infantil fue solo el 10 por ciento (tabla No.1), posiblemente la diferencia se deba a que en la colonia infantil las enfermeras son mas cuidadosas con la higiene de los niños que en el hospital General San Juan de Dios. El parásito encontrado en mayor cantidad fue *Cryptosporidium*

parvum seguido por *Blastocystis hominis* (tabla No. 3). Se observó que muchos de los niños tenían abundantes levaduras, lo cual podría indicar alguna deficiencia inmunológica a nivel del sistema gastrointestinal (27).

Se observó todas las muestras recolectadas (107) por las tinciones que se querían comparar para la búsqueda de microsporidios: tricrómica modificada, Gram-cromotropo 2R, Kinyoun modificado y calcofluor, pero en ninguna de las muestras se encontró microsporidios. Esto pudo deberse a que las esporas de microsporidios se excretan de manera irregular en las heces al igual que otros parásitos y sería necesario tomar muestras seriadas en el paciente. Por otra parte también se puede decir que según lo indica la literatura los niños que padecen de desnutrición moderada o severa tienen afectado su sistema inmune (1,2,27), pero se desconoce si solamente eso es necesario para que los microsporidios puedan provocar una infección intestinal, podría ser que otros factores más específicos de la inmunidad sean necesarios para producir este tipo de infección.

Para poder realizar la comparación de las técnicas de tinción se decidió realizar la contaminación de muestras de heces negativas para la observación de parásitos a cinco concentraciones diferentes de esporas de microsporidios. Con estas concentraciones, realizadas a partir de esporas de microsporidios formalinizadas (que se cultivaron en células de ratón) se determinó la cantidad mínima de esporas de microsporidios que es detectada por cada una de las tinciones que se estaban comparando en el estudio (tabla No. 5).

A partir del experimento anterior se decidió que la tinción de Kinyoun modificado no es adecuada para la búsqueda de esporas de microsporidios pues las esporas no se tiñen, notándose que aún en la más alta concentración realizada no fue posible identificarlas (tabla No. 5). A pesar de esto la tinción se realizó pues era necesario buscar la presencia de coccidios en todos los pacientes. El objetivo de incluir esta técnica de tinción era evaluar la posibilidad de realizar el diagnóstico de coccidios y microsporidios conjuntamente sin tener que recurrir a realizar una segunda tinción.

Los resultados de la comparación de las tinciones bajo las condiciones de laboratorio empleadas demuestran que las tinciones tricrómica modificada y Gram-cromotropo 2R son muy similares y que en ambas tinciones fue más fácil reconocer las esporas de microsporidios en la mayor concentración (tabla No. 7). El porcentaje de positivos y negativos reales es parecido en las dos, sin embargo, se observó que el porcentaje de falsos negativos es mayor en la tinción

de Gram-cromotrofo 2R, lo cual era de esperarse pues es más fácil distinguir las esporas de microsporidios de algún material contaminante en la tinción tricrómica, principalmente por la estructura interior que se tiñe más intensamente que el resto de la espora. Las otras tinciones no tienen esta ventaja pues la espora se tiñe de un color homogéneo (Anexo No.4). Sin embargo, la tinción tricrómica consume más tiempo que las otras.

Con respecto a la tinción de calcofluor se observó también que en la mayor concentración de esporas se pudo diferenciar con más facilidad los positivos reales y negativos reales que las otras tinciones (tabla No. 7). Es importante mencionar que cuando existen frotos con escasa cantidad de esporas de microsporidios es muy difícil distinguir si es una espora o algún otro material contaminante, lo cual se logra eliminar solamente con el uso de controles positivos y negativos en cada tinción y con la experiencia del observador.

Se pudo demostrar que el calcofluor es una tinción muy efectiva, rápida por lo cual si podría usarse como un método de confirmación, no obstante vale la pena aclarar que los reactivos son un poco caros y se necesita de un microscopio de fluorescencia. Lo aconsejable sería tener dos métodos para el diagnóstico de microsporidios, ya sea elegir entre tricrómica modificada o Gram-cromotrofo y la tinción calcofluor utilizarla como un segundo método para tener mayor seguridad del diagnóstico. Es importante mencionar que las tinciones utilizadas en esta investigación necesitan de una persona capacitada para la observación de las esporas de microsporidios pues éstas son pequeñas y por lo general son confundidas fácilmente con otras estructuras por ejemplo, algunas levaduras.

9. CONCLUSIONES

- 1 *Cryptosporidium parvum* es el parásito que se encuentra en mayor porcentaje en los niños desnutridos del Hospital General San Juan de Dios y en la Colonia Infantil del Club de Leones de San Juan Sacatepéquez.
- 2 En los niños desnutridos del Hospital General San Juan de Dios y en la Colonia Infantil del Club de Leones de San Juan Sacatepéquez no se encontraron esporas de microsporidios.
- 3 La tinción de Kinyoun modificado no es aconsejable para el diagnóstico de microsporidios, no tiñe las esporas y por lo tanto no es posible identificarlas.
- 4 La tinción tricrómica modificada y Gram-cromotropo no reflejan mayores diferencias, por lo cual ambas pueden ser utilizadas para el diagnóstico de microsporidios.
- 5 La tinción de calcofluor es muy sencilla, rápida y se recomienda para confirmar un resultado.

10. RECOMENDACIONES

1. Diseñar un tipo de muestreo en el cual se tomen varias muestras al mismo paciente durante varios días, para tener mas posibilidades de encontrar el parásito.
2. Realizar el muestreo en una población mayor, determinando por medio de análisis de laboratorio si los niños tienen deficiencias a nivel del sistema inmunitario.
3. Mantener los colorantes en frascos color ámbar y no utilizarlos si tienen más de un año pues su capacidad de tinción va disminuyendo.
4. Los frotos de heces que se deseen teñir no deben ser demasiado gruesos pues eso hará muy difícil la búsqueda de esporas de microsporidios y posiblemente provocará un resultado falso negativo. Una cantidad de 10 ul de heces por frote es aconsejable.
5. La tinción tricrómica modificada tiene una ventaja muy importante que ayuda eficientemente en el diagnóstico de microsporidios, lo cual sería importante tomar en cuenta a la hora de seleccionar la tinción que se va utilizar para identificar los microsporidios.
6. Tomar en cuenta que la tinción de calcofluor es muy rápida pero se necesita experiencia para utilizarla y los reactivos y materiales que se requieren tienen costos elevados y se necesita microscopio de fluorescencia.

11. REFERENCIAS

1. Hurtarte SB. Cólera y diarreas en Guatemala. Recopilación de estudios de investigación de Agosto 1991 a 1993. Guatemala: OPS/OMS,1994. 103p.
2. Indicadores de salud. Algunos indicadores de salud seleccionados por departamentos. Guatemala: OPS-OMS,1993. 32p.
3. Las Condiciones de Salud en las Américas. Vol. II. USA: OPS/OMS ,1994. (p.223-232).
4. La Salud en las Américas. Vol. II. USA: OPS/OMS, 1998.
5. Cegielski JP, *et al.* Cryptosporidium, Enterocytozoon, and Cyclospora un pediatric and adult patient with diarrhea in Tanzania. CID. 1999;28:314-321.
6. Dobbins W, Weinstein W. Electron microscopy of the intestine and rectum in acquired immunodeficiency syndrome. Gastroenterology. 1985;88:738-749.
7. Weber R, *et al.* Human microsporidial infections. Clin Microbiol Rev. 1994;7:426-461.
8. Didier ES, *et al.* Diagnosis of disseminated microsporidian *Encephalitozoon hellem* infection by PCR southern analysis and successful treatment with albendazole and fumagillin. J Clin Microbiol. 1996;34:947-952.
9. Didier ES, *et al.* Characterisation of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* isolates cultured from nasal mucosa an bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients. J Euk Microbiol. 1996;43:34-43.
10. O'Donnell A, *et al.* Nutrición y alimentación del niño en los primeros años de vida. USA: Fundación Cavendes,Cesni OPS/OMS, 1997. 549p.
11. Weiss L, Vossbrinck C. Advances in Parasitology. Microsporidiosis: molecular and diagnostic aspects. New York: Academic Press, 1998. 540p. (p.351-395).
12. 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.
13. Kokoskin E, *et al.* Modified technique for efficient detection on microsporidia. J Clin Microbiol. 1994;32:1074-1075.
14. Vavra J, Chalupsky J. Fluorescence staining of microsporidian spores with the brightener calcofluor white M2R. J Protozool. 1982;29:503.
15. Didier ES, *et al.* Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. J Clin Microbiol. 1995;33:3138-3145.
16. Van Gool T. *et al.* *Septata intestinalis* frequently isolated from stool of AIDS patients with a new cultivation method. Parasitology. 1994;109:281-289.

17. Van Gool T, *et al.* Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique. *J Clin Pathol.* 1993;46:694-699.
18. Aldras M, *et al.* Detection of microsporidia by indirect immunofluorescence antibody test using policlonal and monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 1994;32:608-612.
19. Blanshard C, *et al.* Treatment of intestinal microsporidiosis with albendazole in patients with AIDS. *AIDS.* 1992;6:311-313.
20. Weber R, *et al.* Detection of *Septata intestinalis* in stool specimens and coprodiagnostic monitoring of successful treatment with albendazole. *CID.* 1994;19:342-345.
21. Molina JM, *et al.* Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in patients with AIDS: clinical features and response to albendazole therapy. *J Infect Dis.* 1995;171:245-249.
22. Del Busto ME, *et al.* Predicción del riesgo de retardo en el crecimiento en niños de seis a veinticuatro meses. Guatemala: OPS/INCAP, 1996. 25p. (p. 15-19)
23. Galindo M, *et al.* Cursillo sobre tratamiento del niño desnutrido. Guatemala: INCAP, 1991. 60p. (p. 6-20)
24. Conocimientos actuales sobre nutrición. 7 ed. OPS/OMS, Washigton: ILSI, 1997. 600p.
25. Delgado H, Valverde V. II cursillo de educación a distancia. "Monitoreo del crecimiento físico del niño". Guatemala: INCAP/OMS, 1986. 32p. (p. 9-12)
26. Waterlow JC. Malnutrición proteico-energética. Washigton: OPS/OMS, 1996. 342p.
27. Casanueva E. Nutrición, inmunidad e infección. Cuadernos de nutrición. 1991;14:19-30.
28. Cruz JR, *et al.* Acute and persistent diarrheal disease and its nutritional consequences in Guatemalan infants. *Arch Latinoam Nutr.* 1989;39:263-277.
29. Cruz JR, *et al.* Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. *J Clin Microbiol.* 1992;30:1-5.
30. Cruz JR, *et al.* Adenovirus types 40 and 41 and rotaviruses associated with diarrhea in children from Guatemala. *J Clin Microbiol.* 1990;28:1780-1784.
31. John N. Diarrea secretora en niños: toxinas y secretagogos tumorales. *Clin Ped Nort.* 1996;2:313-329.
32. Shadduck J, Greeley E. Microsporidia and human infections. *Clin Microbiol Rev.* 1989;2:158-165.
33. Nägeli K. Über di neue krankheit der seidenraupe und verwandte organismen. *Botanische Zeitung.* 1857;15:760-761.
34. Bryan RT, Cali A, Owen RL, Spencer HC. Microsporidia: Opportunistic pathogens in patients with AIDS. New York: Progress in Clinical Parasitology, Vol. 2, 1990. (p. 1-26)

35. Baker JR, *et al.* Advances in parasitology. "Opportunistic protozoa in humans. New York: Academic Press, Vol. 40, 1998. 395p.
36. Matsubayashi H, *et al.* A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. Arch Pathol. 1959;67:181-187.
37. Weber R, Bryan R. Microsporidial infection in immunodeficient and immunocompetent patients. CID. 1994;19:517-521.
38. Sprague V, *et al.* Taxonomy of phylum Microspora. Crit Rev Microbiol. 1992;18:285-395.
39. Hollister WS, *et al.* Development and ultrastructure of *Trachipleistophora hominis* n.g., n.sp. after *in vitro* isolation from an AIDS patient and inoculation into athymic mice. Parasitol. 1996;112:143-154.
40. Canning EU, Lom J. The microsporidia of vertebrates. Orlando FL: Academic Press, 1986.
41. Desplazes P, Mathis A, Mueller C, Weber R. Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples in pigs. J Euk Microbiol. 1996;43:93.
42. Mansfield KG, *et al.* Identification of an *Enterocytozoon bieneusi*-like microsporidian parasite in simian-immunodeficiency-virus-inoculated macaques with hepatobiliary diseases. Am J Pathol. 1997;150:1395-1405.
43. Kent ML, *et al.* Taxonomy studies and diagnostic tests for myxosporean and microsporidian pathology of salmonid fishes utilising ribosomal DNA sequence. J Euk Microbiol. 1996;43:98-99.
44. Weber R, *et al.* Pulmonary and intestinal microsporidiosis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. Am Rev Res Dis. 1992;146:1603-1605.
45. Orestein JM, *et al.* Microsporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome. J Parasitol. 1991;77:843-864.
46. Del Aguila C, *et al.* Identification of *Enterocytozoon bieneusi* spores in respiratory samples from an AIDS patient with a 2-year history of intestinal microsporidiosis. J Clin Microbiol. 1997;35:1862-1866.
47. Black SS, *et al.* *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). Vet. Pathol. 1997;34:189-198.
48. Pulparampil N, Graham D, Phalen D, Snowden K. *Encephalitozoon hellen* in two eclectus parrots (*Eclectus roratus*): identification from archival tissues. J. Eukaryot. Microbiol. 1998;45:651-655.
49. Cali A, Kotler DP, Orenstein JM. *Septata intestinalis* n. g., n.sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. J Protozool. 1993;40:101-112.

50. Hartskeerl RA, *et al.* Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology*. 1995;110:277-285.
51. Didier ES, *et al.* A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to the *Encephalitozoon cuniculi* strain III originally isolated from domestic dogs. *J Clin Microbiol*. 1996;34:2835-2837.
52. Vossbrinck CR, *et al.* Ribosomal RNA sequence of *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon cuniculi*. Species identification and phylogenetic construction. *J Euk Microbiol*. 1993;40:354-362.
53. Canning EU, Hollister WS. Microsporidia of mammals - widespread pathogens or opportunistic curiosities? *Parasitol Today*. 1987;3:267-273.
54. Schwartz DA, *et al.* Pathology of symptomatic microsporidial (*Encephalitozoon hellem*) bronchiolitis in AIDS: a new respiratory pathogen diagnosed from lung biopsy, bronchoalveolar lavage, sputum, and tissue culture. *Hum Pathol*. 1993;24:937-943.
55. Kotler DP, Orenstein JM. Microsporidia. In: *Infections of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press, 1995. 1245p. (p. 1129-1140)
56. Chupp GL, *et al.* Myositis due to *Pleistophora* (microsporidia) in a patient with AIDS. *CID*. 1993;16:15-21.
57. Fiel AS, *et al.* Myositis associated with a new described microsporidian, *Trachipleistophora hominis*, in a patient with AIDS. *J Clin Microbiol*. 1996;34:248-251.
58. Vavra J, *et al.* Microsporidia of the genus *Trachipleistophora* – causative agents of human microsporidiosis: description of *Trachipleistophora anthropophthera* n. sp. (Protozoa: microsporidia). *J Eukaryot Microbiol*. 1998;45:273-283.
59. Cali A, *et al.* Corneal microsporidiosis in a patient with AIDS. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;44:463-468.
60. Davis RM, Font RL, Keisler MS, Shadduck JA. Corneal microsporidiosis. A case report including ultrastructural observations. *Ophthalmol*. 1990;97:953-957.
61. Silveiro H, Canning EU. *Vittaforma corneae* n. comb. For the human microsporidium *Nosema corneum* Shadduck, Meccoli, Davis & Font, 1990, based on its ultrastructure in the liver of experimentally infected athymic mice. *J Eukaryot Microbiol*. 1995;42:158-165.
62. Kotler D, Orenstein JM. Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals. *Am J Gastroenterol*. 1994;89:1998-2002.
63. Sandfort J, *et al.* *Enterocytozoon bieneusi* infection in an immunocompetent patient who had acute diarrhea and who was not infected with the human immunodeficiency virus. *CID*. 1994;19:514-516.

64. Bretagne S, *et al.* Prevalence of microsporidial spores in stools from children in Niamey, Niger. *AIDS*. 1993;3:34-35.
65. Kester KE, Turiansky GW, McEvoy PL. Nodular cutaneous microsporidiosis in patient with AIDS and successful treatment with long term oral clindamycin therapy. *Ann Intern Med*. 1998;128:911-914.
66. Rabeneck L, *et al.* The role of microsporidia in the pathogenesis of HIV-related chronic diarrhea. *An Intern Med*. 1993;119:895-899.
67. Rabeneck L, *et al.* Observations on the pathological spectrum and clinical course of microsporidiosis in men infected with the human immunodeficiency syndrome. A case report. *CID*. 1995;20:1229-1235.
68. Kotler DP. Textbook of gastroenterology. Gastrointestinal complications of the acquired immunodeficiency syndrome. Philadelphia: T. Yamada, 1991. pp. 86-103.
69. Peacock CS, *et al.* Histological diagnosis of intestinal microsporidiosis in patient with AIDS. *J Clin Pathol*. 1991;44:558-563.
70. Fedorko DP, Nelson NA, Cartwright CP. Identification of microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1739-1741.
71. Ombrouck C, *et al.* Specific PCR Assay for direct detection of intestinal microsporidia *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* in fecal specimens from human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol*. 1997;35:652-655.
72. Fedorko DP, Hijazi YM. Application of molecular techniques to the diagnosis of microsporidial infection. *Emer Infec Dis*. 1996;2:1-15.
73. Visvesvara GS, *et al.* Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small subunit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. *J Clin Microbiol*. 1994;32:2760-2768.
74. da Silva AJ, *et al.* Sensitive PCR diagnosis of infections by *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) using primers based on the region coding for small-subunit rRNA. *J Clin Microbiol*. 1996;34:986-987.
75. Franzen C, *et al.* Detection of microsporidia (*Enterocytozoon bieneusi*) in intestinal biopsy specimens from human immunodeficiency virus-infected patients by PCR. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2294-2296.
76. Del Aguila C, *et al.* Ultrastructure, immunofluorescence, western blot, and PCR analysis of eight isolates of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* established in culture from sputum and urine samples and duodenal aspirates of five patient with AIDS. *J Clin Microbiol*. 1998;36(5):1201-1208.

77. 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(6):1814-1818.
78. Contreas CN, *et al.* Modification of the clinical course of intestinal microsporidiosis in acquired immunodeficiency syndrome patients by immune status and anti-human immunodeficiency virus therapy. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58:555-558.
79. Molina JM, *et al.* Albendazole for treatment and prophylaxis of microsporidiosis due to *Encephalitozoon intestinalis* in patients with AIDS: a randomized double-blind controlled trial. *J Infect Dis.* 1998;177:1373-1377.
80. Manual DIFCO. Medios de cultivo deshidratados y reactivos para microbiología. 10 ed. Detroit Michigan: Difco Laboratories, 1984. 1166p. (p.925-930)
81. Joo RC. Análisis estadístico a seguir en la comparación de métodos diagnósticos cualitativos en la Escuela de Química Biológica: Evaluación de las tesis de Químicos Biólogos elaboradas de 1988 a 1997 y elaboración de un instructivo general para la comparación de métodos. Guatemala: USAC (Tesis de graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1998. 60p.