

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**MICROSPORIDIOS: NUEVOS METODOS DE  
DETECCION E IDENTIFICACION. APLICACIONES  
EN EL DIAGNOSTICO PARASITOLOGICO Y EN EL  
ESTUDIO DE LA EPIDEMIOLOGIA DE LA  
INFECCION HUMANA.**

**MEMORIA DE TESIS DOCTORAL**  
**FERNANDO JORGE BORNAY LLINARES**

**1998**

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRIA**

**DIVISION DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA DEL**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS EXPERIMENTALES Y TECNOLOGIA**



MICROSPORIDIOS: NUEVOS METODOS DE DETECCION E IDENTIFICACION. APLICACIONES EN EL DIAGNOSTICO PARASITOLOGICO Y EN EL ESTUDIO DE LA EPIDEMIOLOGIA DE LA INFECCION HUMANA.

Memoria presentada por Fernando Jorge Bornay Llinares para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad Miguel Hernández.

Alicante, Febrero de 1998

D<sup>a</sup>. INMACULADA MESEGUER SORIA, Profesora Titular de Microbiología del Departamento de Ciencias Experimentales y Tecnología. Directora de la División de Microbiología y Parasitología de la Universidad Miguel Hernández. Alicante. España

D. HÉRCULES MOURA, Professor Adjunto do Departamento de Parasitologia e Laboratórios, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Chefe do Serviço de Parasitologia, Hospital Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

D. NORMAN J. PIENIAZEK, Head of the Molecular Diagnosis Development Laboratory. Biology and Diagnostic Branch. Division of Parasitic Diseases. National Center for Infectious Diseases. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA. USA.

CERTIFICAN: que el trabajo experimental correspondiente a la Memoria titulada "Microsporidios: nuevos métodos de detección e identificación. Aplicaciones en el diagnóstico parasitológico y en el estudio de la epidemiología de la infección humana" ha sido realizado por D. Fernando Jorge Bornay Llinares bajo nuestra dirección y que a nuestro juicio reúne las condiciones adecuadas para ser presentada y juzgada por el Tribunal correspondiente para aspirar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Alicante a 15 de Febrero de 1998.



Fdo.: Inmaculada Meseguer Soria



Fdo.: Hercules Moura



Fdo.: Norman J. Pieniazek



*Tres pares de padres,  
dos pares de hijos,  
un puñado de buenos amigos,  
y una mujer que vale por dos.  
¡ Va por ustedes !*

## **Agradecimientos.**

El trabajo que aquí se presenta, no hubiera sido posible sin la activa participación de los Profesionales e Instituciones citados seguidamente. Los resultados obtenidos son consecuencia de un excelente trabajo en equipo y por ello patrimonio común. Muchas gracias a todos.

**División de Microbiología y Parasitología, Universidad Miguel Hernández. Campus de San Juan. España.**

I. Meseguer, I. Alba.

**Division of Parasitic Diseases. National Center for Infectious Diseases. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta GA. USA.**

N.J. Pieniazek, G.S. Visvesvara, A.J. da Silva, I. Moura, S.B. Slemenda, S. Wallace, S. Wahlquist, M. L. Eberhard, V. Tsang.

**Faculdade de Ciências Médicas, UERJ y Hospital Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. Brasil.**

H. Moura, F. Sodré.

**Departments of Pathology and Medicine (Infectious Diseases), Emory University School of Medicine y Grady Memorial Hospital. Atlanta, GA. USA.**

D.A. Schwartz, B. Furlong, P.B. Stevens.

**Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona. Tucson, AZ. USA.**

F.J. Enriquez, J.D. Palting.

**Departamento de Agentes Biológicos, Escuela de Medicina, Universidad Autónoma de Puebla; Instituto de Investigación Biomedica de Oriente e Instituto Mexicano del Seguro Social. Puebla, Puebla. México.**

A. Cruz-López, P. Hernández-Jauregui, J. Guerrero.

**Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe. Valencia. España.**

J. Pemán, M. Gobernado, B. Acosta.

**Servicios de Anatomía Patológica y Medicina Interna, Hospital Universitario de San Juan de Alicante. España.**

M.J. Mayol Belda, P. Roig Rico, J. Merino Sánchez.

**Unitat de Microbiología, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España.**

M.J. Figueres.

**Apoyo Financiero: Beca Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)-Bayer 1996 y AKRALAB S.L. (Alicante).**

## INDICE

### INTRODUCCION

<b>1. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
<b>2. MICROSPORIDIOS</b>	
1.1. Características generales	5
1.2. Ciclo biológico y ultraestructura	6
Espora	7
Merogonia	8
Esporogonia	9
1.3. Taxonomía	12
<b>3. MICROSPORIDIOSIS HUMANA</b>	
2.1. Etiología	19
2.1.1. Posición taxonómica	19
2.1.2. Características ultraestructurales	21
2.2. Epidemiología	25
2.3. Manifestaciones clínico-patológicas	30
2.3.1. Individuos inmunocompetentes	31
2.3.2. Individuos inmunosuprimidos (VIH-)	32
2.3.3. Individuos infectados por el VIH	33
2.4. Métodos de detección e identificación	38
2.4.1. Microscopía electrónica	38
2.4.2. Microscopía óptica	39
2.4.3. Cultivo celular	42
2.4.4. Métodos inmunológicos	44
2.4.5. Métodos moleculares	46
2.5. Tratamiento	48

## ESTUDIOS EXPERIMENTALES

**ESTUDIO 1. Quick-hot Gram-chromothrope. Un nuevo método de tinción para la detección de microsporidios en muestras clínicas.**

Objetivos	52
Material y métodos	52
Resultados	53
Discusión	55
Figuras	58

**ESTUDIO 2. Identificación de *Enterocytozoon bienewisi* y *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* en muestras fecales mediante reacción en cadena por la polimerasa, usando iniciadores diseñados a partir de la secuencia que codifica el RNA de la subunidad menor ribosomal.**

Objetivos	65
Material y métodos	65
Resultados	67
Discusión	69
Figuras	73

**ESTUDIO 3. Identificación específica de *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* en muestras fecales conservadas en formalina al 10% mediante método de inmunofluorescencia indirecta.**

Objetivos	75
Material y métodos	75
Resultados	76
Discusión	78
Figuras	81

**ESTUDIO 4. Aislamiento en cultivo e identificación de *Encephalitozoon hellem* procedente de un paciente con sida en España. ¿Co-infección con *Enterocytozoon bieneusi*?**

<b>Objetivos</b>	<b>84</b>
<b>Material y métodos</b>	<b>84</b>
<b>Resultados</b>	<b>86</b>
<b>Discusión</b>	<b>88</b>
<b>Figuras</b>	<b>92</b>

**ESTUDIO 5. Caracterización microscópica, inmunológica y molecular de microsporidios en heces humanas y de animales procedentes del estado de Puebla (Méjico).**

<b>Objetivos</b>	<b>99</b>
<b>Material y métodos</b>	<b>99</b>
<b>Resultados</b>	<b>100</b>
<b>Discusión</b>	<b>102</b>
<b>Figuras</b>	<b>106</b>

<b>CONCLUSIONES</b>	<b>112</b>
---------------------	------------

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>114</b>
---------------------	------------

**APENDICE**

<b>Microscopía óptica</b>	<b>I</b>
<b>Microscopía electrónica</b>	<b>IV</b>
<b>Inmunofluorescencia indirecta</b>	<b>VII</b>
<b>Ensayo inmunoenzimático sobre membrana de nitrocelulosa</b>	<b>IX</b>
<b>Reacción en cadena por la polimerasa</b>	<b>XIII</b>

DR. GUS LORENZ finished his morning staff meeting early. Spring was coming early to Atlanta. The trees and bushes were budding, and soon the air would be filled with the fragrances of all flowering plants for which the southern city was so famous – and a lot of pollen, Gus thought, which would get his sinuses all stuffed, but it was a fair trade for living in a vibrant and yet gracious southern city. With the meeting done, he donned his white lab coat and headed off to his own special fiefdom in the Centers for Disease Control and Prevention. CDC (“and P” had never been added to the acronym) was the one of the world’s important centers of medical research – may would say the most important. For that reason the center in Atlanta attracted the best of the profession. Some stayed. Some left to teach the nation’s medical schools, but all were forever marked as CDC people, as other might boast of having served their time in the Marine Corps, and for much the same reason. They were the first people their country sent to trouble spots. They were the first people to fight diseases, instead of armed enemies, and that cachet engendered an *esprit de corps* which more often than not retained the best of them despite the capped government salaries.

Tom Clancy  
Executive orders. Berkley books, New York.

# ***INTRODUCCION***





***PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y  
OBJETIVOS***

---

## PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS.

Los microorganismos pertenecientes al filum Microsporidia, Balbiani 1882, son conocidos colectivamente como microsporidios y las infecciones por ellos producidas como microsporidiosis. A pesar de ser eucariotas, su carencia de mitocondrias y otros orgánulos, los condiciona a vivir a expensas de otras células, como parásitos intracelulares obligados. Son microorganismos ubícuos que parasitan una amplia variedad de animales, incluyendo al hombre (Canning y Lom.1986; Canning y Hollister 1987; Weber y col. , 1994a). Hasta el momento han sido descritas casi 1000 especies pertenecientes a más de 100 géneros (Sprague y col. 1992).

A mediados del siglo XIX, Pasteur y Garnez relacionaron por primera vez la presencia de un agente microscópico con la producción de enfermedad, la pebrina o calcina de los gusanos de seda (*Bombix mori*) y Nageli en 1857 denomina al agente microscópico causante del proceso como *Nosema bombycis*, literalmente enfermedad del gusano de seda, siendo éste el primer microsporidio descrito. Pasteur estudia durante 6 años la pebrina y descubre un método para evitarla mediante la detección y eliminación de los gusanos infectados junto con las hojas de morera que comían; de este modo, se inician las primeras medidas de control y profilaxis de una enfermedad infecciosa y se demuestra experimentalmente por primera vez la conexión entre microbios (como él los denominaba) y enfermedad, o teoría de los gérmenes patógenos (Pasteur,1860; Pasteur, 1865: en Martínez Fernández, 1995). La descripción inicial de Pasteur alertó a la agricultura y a la industria sobre los importantes perjuicios económicos causados por éste, hasta entonces, desconocido grupo de microorganismos.

El reconocimiento de los microsporidios como entidad de seres diferenciados del resto de los Protozoos se debe a Balbiani en 1882, al proponer la creación de un nuevo Orden entre los Esporozoos: protozoos que al final de su ciclo forman esporas de resistencia; en aquel momento, *Nosema bombycis* era la única especie de microsporidio conocida (Canning, 1993). A lo largo de este siglo, se habían propuesto varias clasificaciones para este grupo de protozoos (Martínez Fernández, 1995), hasta que Sprague (1977) crea el filum Microspora dentro del subreino Protozoa para agrupar a todos los microsporidios. La confusión creada por esta denominación, ha sido finalmente resuelta

por Becnel y Sprague (1998) al concluir que ésta debe ser: Microsporidia, Balbiani, 1882. Algunos autores, proponen incluir a estos organismos en un nuevo taxón que reúne a los eucariotas sin mitocondrias (Sogin y col. 1991; Cavalier-Smith, 1993)

Mucho antes de ser reconocidos como patógenos humanos, los microsporidios, fueron ampliamente identificados como agentes infecciosos en patología animal (Shaddock y Pakes, 1971; Canning y Lom 1986). De hecho, están ampliamente distribuidos en el reino animal, parasitando todas las clases de vertebrados e invertebrados (Shaddock y col., 1978; Canning y Hollister 1987)

Entre las especies de microsporidios que infectan invertebrados, están aquellas que pueden generar perjuicios económicos. *Nosema bombicys* se consideró una de las causas de la devastación de la industria europea de la seda en el siglo XIX; *Nosema apis* (Tierische, 1909), infecta a *Apis mellifera*, la abeja productora de miel. Adicionalmente, las características biológicas de estos microorganismos, especialmente, la alta tasa de reproducción que presentan en el huésped, la eficiencia del modo de transmisión por medio de esporas resistentes y la capacidad de determinadas especies de transmitirse verticalmente por vía transovárica (Canning, 1993), han permitido emplearlos como medida de control biológico de plagas en la agricultura, como en el caso de *Nosema locustae*, parásito de varios géneros y especies de saltamontes y langostas (Henry y Ouma, 1984).

También causan infecciones en invertebrados marinos. *Ameson michaelis*, tiene como hospedador al crustáceo decápodo *Callinectes sapidus*, muy común en la costa norte americana y conocido vulgarmente como "blue crab" (cangrejo azul). Los crustáceos infectados tienden a morir rápidamente bajo una situación de estrés, como es la captura de los mismos (Canning, 1993).

Los microsporidios parasitan especies diversas de las cinco clases de vertebrados. Son reconocidos como parásitos importantes en piscifactorías. Numerosas especies parasitan peces y algunas son responsables de mortalidad o de alteraciones patológicas que los hacen comercializables; la mayor parte de las especies que infectan peces pertenecen a los géneros *Glugea* y *Pleistophora*.

La mayoría de microsporidios parásitos de anfibios y reptiles, pertenecen al género *Pleistophora*. Un hecho interesante fue la observación de una alta mortalidad en sapos

(*Bufo bufo*) naturalmente infectados por *Pleistophora myotrophica*, al ser confinados en cautividad para el diagnóstico de embarazo (Canning y Lom, 1986)

Aunque se han descrito pocas especies que parasitan vertebrados homeotérmicos, una de ellas, *Encephalitozoon cuniculi*, es común en roedores y lagomorfos y presenta una amplia distribución geográfica (Levaditi y col., 1923). En roedores, las infecciones son observadas con más frecuencia en conejos, aunque otros animales utilizados frecuentemente en ensayos experimentales (ratas, ratones, hámsters y cobayas) son susceptibles a la infección. Por ello, experimentos que utilizan animales, pueden ser seriamente interferidos por estos microorganismos, que pueden provocar la muerte de los mismos, cuando estos son sometidos a las condiciones de laboratorio. Otras veces las infecciones pueden ser latentes induciendo resultados anómalos o interpretaciones erróneas. Un ejemplo histórico, fue la pretendida relación causal de *E. cuniculi* con enfermedades víricas como la poliomielitis o la rabia (Canning y Lom, 1986; Martínez Fernández, 1995).

El primer caso de microsporidiosis humana fue diagnosticado en Brasil por Torres (1927a y b) en una niña que falleció con un cuadro de convulsiones y contracción muscular generalizada dos días después del nacimiento. Este autor denominó al microsporidio *Encephalitozoon chagasi*, pero la confirmación posterior del agente no pudo ser realizada (Weisser, 1964). El primer caso, internacionalmente reconocido, fue descrito por Matsubayashi y col. (1959), que detectaron esporas en orina y líquido cefalorraquídeo de una paciente que presentó un grave cuadro convulsivo. Hasta la década de los ochenta, únicamente se habían descrito 3 casos más de infección humana (Weber y col., 1994a).

Desde la aparición de la creciente pandemia de infección por el VIH, el estudio de los microsporidios como patógenos oportunistas humanos, se ha incrementado notablemente. Debido a ello, el número de casos, la descripción de las especies implicadas y la variedad de manifestaciones clínicas producidas por la infección, continúa siendo revisada.

Hasta el momento, seis géneros de microsporidios: *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon (Septata)*, *Nosema*, *Vittaforma*, *Pleistophora* y *Trachipleistophora*, han sido asociados con enfermedad en el hombre y cinco nuevas especies *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon (Septata) intestinalis*, *Vittaforma corneae* y *Trachipleistophora hominis*, han sido encontradas por primera vez en pacientes

con sida. Adicionalmente otros microsporidios no identificados, han sido clasificados colectivamente bajo el término *Microsporidium* spp.

Las infecciones por microsporidios son una causa importante de morbilidad y ocasionalmente de mortalidad en pacientes con sida (Weber y col., 1994a), siendo también descritas en pacientes con otras inmunodeficiencias y en pacientes transplantados (Schwartz y Bryan, 1997). En individuos inmunocompetentes pueden producir episodios de diarrea autolimitada de curso benigno (Weber y col., 1994a; Bryan y col., 1997).

Las infecciones humanas por microsporidios son a menudo ignoradas o mal diagnosticadas. El diagnóstico de las microsporidiosis puede resultar difícil por varias razones: los organismos son diminutos (las especies más pequeñas que infectan al hombre miden de 1 a 2,5  $\mu\text{m}$ ) y difícilmente observables en biopsias, preparaciones citológicas o muestras fecales utilizando los métodos de tinción habituales; el examen ultraestructural mediante microscopía electrónica no es práctico y frecuentemente no está disponible; los métodos serológicos descritos no son útiles como indicadores de infección activa y los métodos de diagnóstico especiales como cultivo celular, detección mediante anticuerpos específicos o técnicas moleculares, están únicamente disponibles en laboratorios especializados.

Lo anteriormente expuesto junto al incremento de las infecciones de este grupo de microorganismos, poco conocido como agente patológico en humanos, nos motivó a realizar el trabajo que aquí presentamos. En una primera parte, intentamos resumir el conocimiento básico de las características biológicas, morfológicas y epidemiológicas de las especies causantes de patología humana; describimos las manifestaciones clínicas consecuentes a la infección y los métodos diagnósticos disponibles para finalmente indicar las pautas de tratamiento actualmente recomendadas. A continuación exponemos una serie de estudios experimentales realizados con el propósito de desarrollar nuevos métodos, sencillos y rápidos de detección e identificación de microsporidios en muestras clínicas y la consecuente aplicación de los mismos en el diagnóstico parasitológico y en el estudio de la epidemiología de las microsporidiosis humanas.

Confiamos que todo ello contribuya a que la investigación de estos patógenos emergentes, deje de ser excepcional en el diagnóstico de rutina.



---

***MICROSPORIDIOS***

## 1. MICROSPORIDIOS

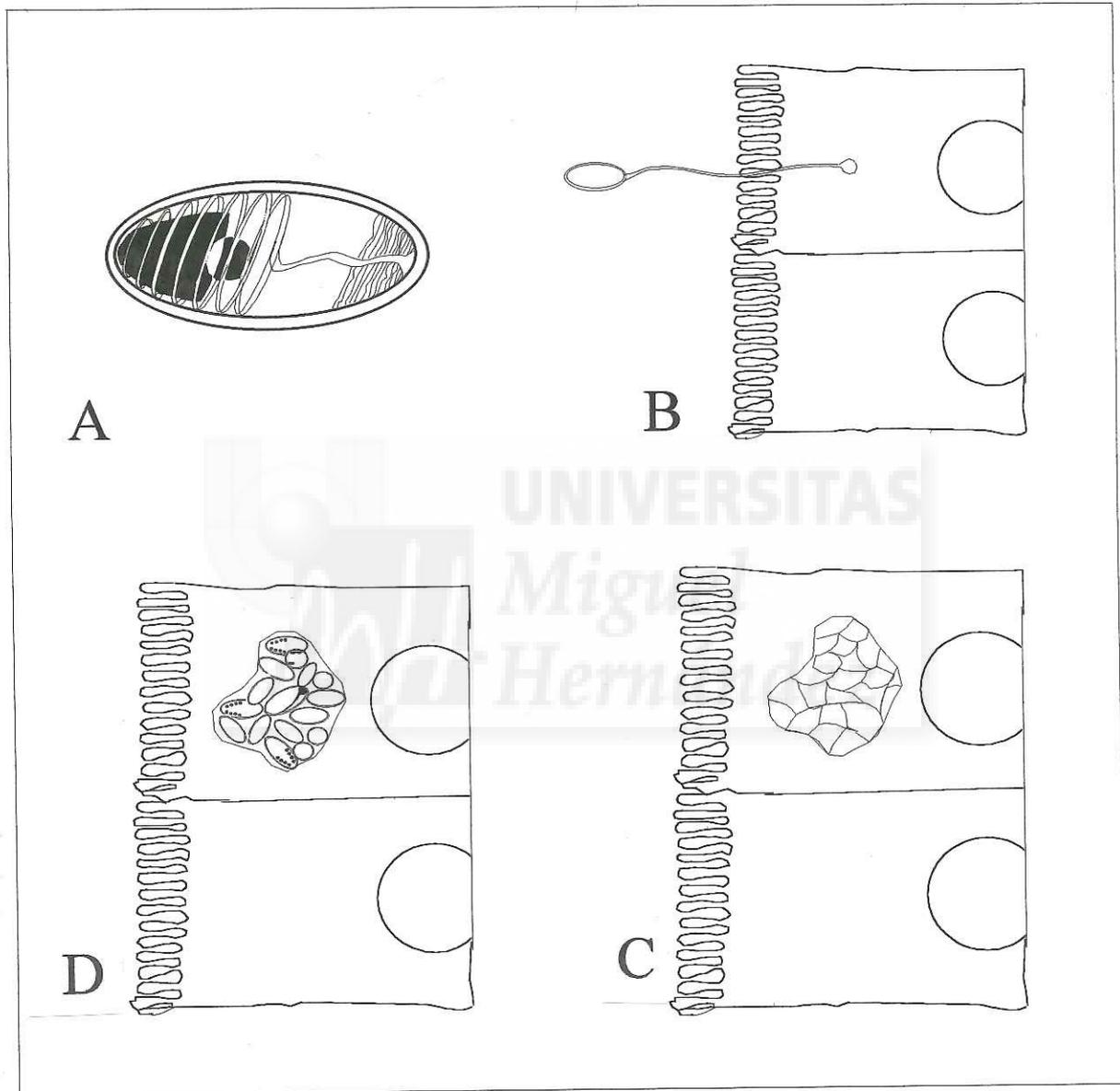
### 1.1. CARACTERISTICAS GENERALES

Los microsporidios son parásitos unicelulares que presentan un mecanismo peculiar y único de infectar las células que los albergan. Se desarrollan exclusivamente en el medio intracelular y carecen de estadios metabólicamente activos fuera de la célula huésped (Canning, 1993). Se transmiten mediante resistentes esporas que presentan enrollada en su interior una estructura especializada denominada tubo o filamento polar. En condiciones favorables, el filamento polar es lanzado a través del polo anterior de la espora y penetra en la célula hospedadora, sin romper la membrana celular. El esporoplasma (conjunto de estructuras infectantes) migra a través del tubo polar, entrando directamente en el citoplasma. A diferencia de otros parásitos que penetran en la célula hospedadora mediante fagosomas, los microsporidios se multiplican en contacto directo con el citoplasma de la célula huésped y protegidos, por tanto, de la acción de los lisosomas (Canning y Lom, 1986).

Estos organismos presentan determinadas características propias de células procariotas, indicando que filogenéticamente son protozoos muy antiguos. Así, en la subunidad mayor ribosomal de los microsporidios, la fracción 5,8S del RNA se encuentra fusionada a la fracción 21S-like del RNA (Vossbrinck y Woose, 1986; Katiyar y col., 1995) y el RNA de la subunidad menor ribosomal es de menor tamaño (1.100 a 1.400 bases) al encontrado en células procariotas (Vossbrink y col., 1987). Además carecen de mitocondrias, peroxisomas y aparato de Golgi desarrollado (Vavra, 1977; Cury y col., 1980). En otros aspectos, son típicamente eucariotas, presentan un núcleo bien definido delimitado por una membrana nuclear y poseen un sistema intracitoplasmático de membranas bien desarrollado, incluyendo un agregado de vesículas que se piensa sea un primitivo aparato de Golgi. Aunque carecen de centriolos, la separación de cromosomas en el proceso de división celular se realiza mediante husos de microtúbulos que irradian desde los polos internos de la membrana nuclear. En algunos géneros el núcleo es único durante todas las fases del desarrollo, mientras que en otras es pareado (diplocario). Poco se conoce de los procesos sexuales en estos microorganismos (Canning y Lom, 1986).

## 1.2.CICLO BIOLÓGICO Y ULTRAESTRUCTURA

El ciclo biológico de los microsporidios se desarrolla en tres fases: la fase infectiva, que comprende desde la liberación de la espora al medio extracelular hasta el momento en que ésta infecta una célula susceptible; la fase de merogonia o fase proliferativa, y la fase de esporogonia o fase de maduración, que culmina con la producción de las esporas.

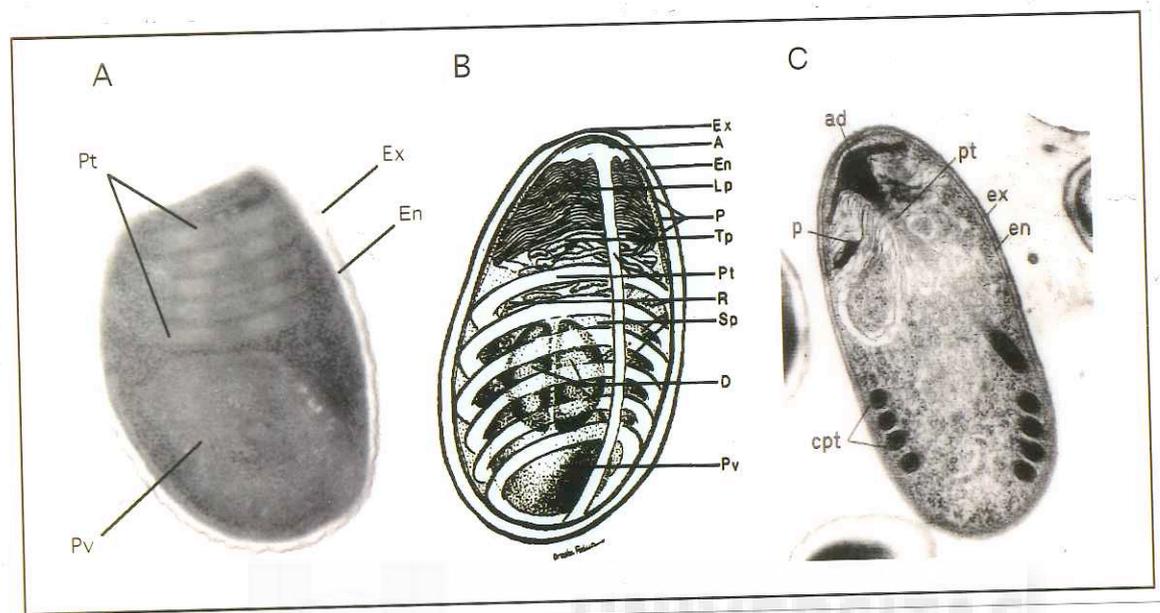


**Figura 1. Diseño esquemático del ciclo biológico de los microsporidios.**

A y B: fase infectiva; espora libre en el medio ambiente (A); extrusión del tubo polar e introducción del contenido de la espora en una célula hospedadora susceptible (B). C: fase proliferativa (merogonia). D: fase de maduración (esporogonia).

## Espora

Las esporas de los microsporidios son de variados tamaños según la especie, desde las pequeñas esporas de *Enterocytozoon bieneusi* ( $1.2 \times 0.8 \mu\text{m}$ ) a las de *Mrazekia piscicola* que miden  $20 \times 6 \mu\text{m}$ .



**Figura 2.** Ultraestructura de las esporas de microsporidios. A y C: Microscopía electrónica de transmisión: esporas de *E. hellen* procedentes de cultivo. Bornay-Llinares y Pemán, 1997 (A); Scaglia y col., 1994 (C). B: Diseño esquemático de una espora de microsporidio (Cali y Owen, 1988). Ex: exospora; En: endospora; Pv: vacuola posterior; A (ad): disco de anclaje; Pt (pt): tubo polar; p: polaroplasto; Lp: membranas del polaroplasto; R: ribosomas; D: núcleos; Sp: esporoplasma.

La pared de la espora está formada por dos capas bien diferenciadas. La capa externa o exospora es una capa proteica (lisa o festoneada) que varía en espesor según la especie (15-200 nm). La capa interna o endospora está compuesta por quitina y mide 150-200 nm de espesor, excepto en la parte central del polo anterior de la espora donde mide 30 nm o menos.

El interior de la espora contiene el agente infeccioso o esporoplasma y el aparato de extrusión formado por el filamento polar, el disco de anclaje (saco polar) y un complejo sistema de membranas (polaroplasto). El disco de anclaje es una estructura localizada en el

contorno de la parte anterior de la espora. La base del tubo polar, parte del centro de esta estructura y se dirige hacia la periferia donde se enrolla rodeando en espiral al citoplasma. El diámetro del tubo en esta región es de 100-150 nm. La parte anterior del tubo polar esta rodeada por un sistema de membranas dispuestas a modo de sacos o láminas denominada polaroplasto.

El espacio sobrante de la espora lo ocupan, la vacuola posterior y un citoplasma relativamente indiferenciado que contiene algo de retículo endoplasmático rugoso y ribosomas libres. Este conjunto rodea uno o dos núcleos que se disponen centralmente en la espiral del tubo polar. El contenido de la espora a excepción del aparato de extrusión se denomina esporoplasma.

Cuando el tubo polar es evertido el esporoplasma viaja a través del tubo polar, penetrando en la célula hospedadora donde inicia un nuevo ciclo biológico (Canning y Lom, 1986; Canning, 1993; Martínez Fernández, 1995).

### **Merogonia.**

También denominada esquizogonia, por algunos autores, es la fase proliferativa. Comienza cuando, en el interior de una célula apropiada para su desarrollo, el esporoplasma evoluciona formando merontes.

Los merontes son células redondas, irregulares o elongadas que en estadios tardíos presentan un rudimentario sistema de retículo endoplasmático liso y rugoso. La membrana plasmática es simple, aunque algunos géneros presentan estructuras especializadas en la interfase con la célula hospedadora. Los merontes pueden tener un núcleo aislado o doble y pueden dividirse por fisión binaria, múltiple o por plasmotomía. La cariocinesis ocurre de forma repetida antes que la división celular tenga lugar, resultando formas redondeadas de plamodio multinucleado, como en la especie *E. bieneusi* (Cali y Owen, 1990) o células multinucleadas semejantes a cintas, descritas en *S. intestinalis* (Cali y col., 1993). En humanos, tras producirse la merogonia en algunas células susceptibles localizadas en la puerta de entrada del parásito (epitelios digestivo y respiratorio), se puede producir, vía sanguínea o linfática, la diseminación de los parásitos (Cali, 1991; Cali y col., 1993).

## **Esporogonia**

Los esporontes son estadios previos a los esporoblastos. Presentan en su superficie una cubierta electrodensa que al final de la esporulación formará la capa externa de la pared de la espora (exospora). Pueden presentar un núcleo aislado o doble. A veces los esporontes se dividen directamente en esporoblastos por fisión binaria. Otras, forman estadios multinucleados (esporogonia plasmodial) y pasan por procesos de división en dos fases o secuenciales. Las secuencias de división son muy variadas y características de cada género.

Taxonómicamente, los microsporidios se dividen en dos subórdenes basados en la secuencia de la esporogonia. Uno en que las esporas están empaquetadas en vesículas esporóforas, también conocidas como membranas panesporoblásticas (Suborden Pansporoblastina), el otro en que las esporas aparecen dispersas en el citoplasma de la célula hospedadora (Suborden Apansporoblastina). En los géneros que presentan vesículas esporóforas, la cubierta característica es secretada en la superficie del esporonte antes de la división en esporoblastos. El número resultante de esporoblastos y posteriormente de esporas se utiliza como diagnóstico de género. En el Suborden Apansporoblastina, la cubierta del esporonte es secretada en la superficie del esporonte libre (Sprague, 1977; Levine y col., 1980).

Algunos géneros de microsporidios presentan en su desarrollo, más de una secuencia esporogónica y a veces también más de una secuencia merogónica. El curso de estas secuencias es tan diferente que caracteriza a nivel de género.

Los esporoblastos son generalmente cuerpos ovoides. Su desarrollo es un proceso de maduración hasta convertirse en esporas. Presentan un incremento en la cantidad de retículo endoplasmático liso y rugoso. Las vesículas de Golgi están presentes y son responsables en parte de la formación del tubo y saco polar. La membrana electrotransparente, denominada endospora, se adhiere gradualmente a la pared de la espora por debajo de la densa cubierta (exospora). Las vesículas del rudimentario aparato de Golgi, obsoletas al finalizar el proceso de maduración, coalescen para formar la vacuola posterior. (Canning y Lom, 1986; Canning, 1993; Martínez Fernández, 1995).

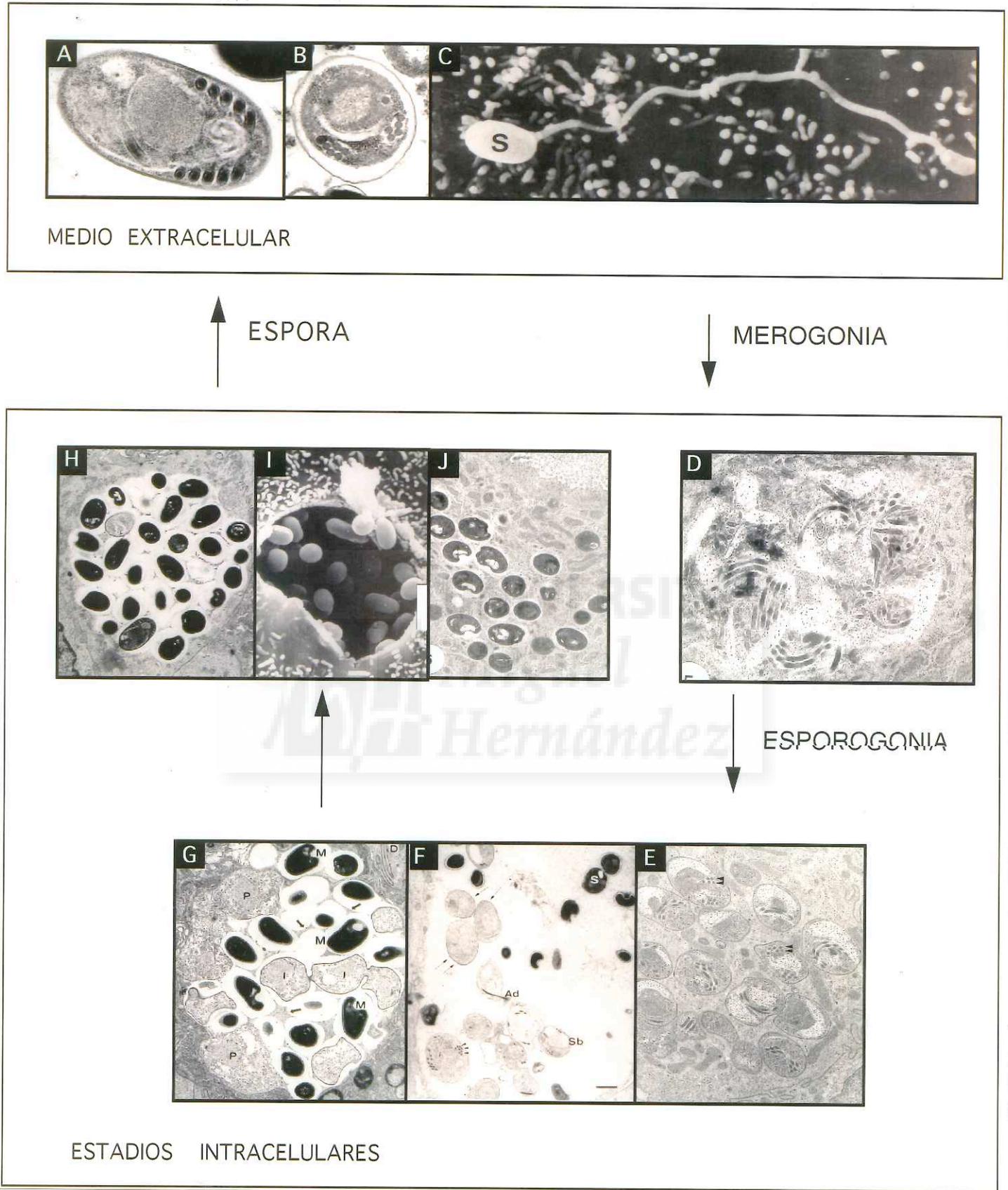


Figura 3. Ciclo biológico de los microsporidios.

**Figura 3 (continuación). Estadíos del ciclo biológico de los microsporidios.**

**A, B y C:** esporas libres; **D:** merogonia; **E, F y G:** diversos estadíos de desarrollo y maduración de las esporas; **H, I y J:** esporas maduras.

**A:** espora de *Encephalitozoon* spp. (Soule y col., 1997)

**B:** espora de *Enterocytozoon bieneusi* (Bornay-Llinares y Pemán, 1997)

**C:** espora de *Encephalitozoon hellem*, mostrando la extrusión del tubo polar (Visvesvara y col., 1991)

**D:** fase de merogonia de *Enterocytozoon bieneusi*, se observan las inclusiones electrotransparentes y los discos electrodensos (precursores del aparato de extrusión) (Schwartz y col., 1994a)

**E:** fase de esporogonia de *Enterocytozoon bieneusi*, esporoblastos en contacto directo con el citoplasma de la célula hospedadora, conteniendo un tubo polar con 5-7 vueltas dispuestas en doble hilera, característica de especie (Schwartz y col., 1996).

**F:** fase de esporogonia de *Encephalitozoon hellem*, con diferentes formas evolutivas en el interior de una vacuola parasitófora (Visvesvara y col., 1994).

**G:** esporogonia de *Encephalitozoon (Septata) intestinalis*, vacuola parasitófora con diferentes estadíos evolutivos separados por una matriz fibrilar, caracterizando la especie (Schwartz y col., 1996).

**H:** vacuola parasitófora con esporas maduras de microsporidios separadas por una matriz fibrilar propia de *Encephalitozoon (Septata) intestinalis*. (Soule y col., 1997)

**I:** Microscopía electrónica de barrido, mostrando una vacuola parasitófora repleta de esporas maduras de *Encephalitozoon hellem* (Visvesvara y col., 1994)

**J:** esporas maduras de *Enterocytozoon bieneusi*, libres en el citoplasma de la célula hospedadora (Schwartz y col., 1994a)

### 1.3. TAXONOMIA

La sistemática, en sus comienzos, se basaba en las características estructurales observadas por microscopía para separar a los protozoos taxonómicamente. Las enormes variaciones que presentan con relación al ciclo vital y aspectos fisiológicos, citológicos y bioquímicos dificultan el consenso que defina cuál de ellas debe ser considerada para inferir relaciones filogenéticas. Se han utilizado características ultraestructurales y de desarrollo para establecer relaciones en la evolución de diferentes géneros. Sin embargo, las comparaciones de caracteres fenotípicos son cualitativas y poco objetivas para establecer relaciones genéticas mensurables. El secuenciamiento de proteínas o genes que comparten una historia evolutiva común puede ser usada para inferir cuantitativamente relaciones filogenéticas (Gadjhagar y col., 1991). Se procede a la comparación de secuencias macromoleculares comunes a todos los seres vivos, y por ello, comunes también a los antecesores comunes. La idea partió del trabajo de Zuckerkandl y Pauling (1965) y consiste en hacer una filogenia molecular. Los RNA ribosomales (rRNA) o sus DNA nucleares parecen ser las moléculas ideales para el análisis filogenético molecular (Woese, 1987). Los ribosomas están distribuidos universalmente en los organismos individuales o sus componentes (cloroplastos, mitocondrias y orgánulos funcionalmente equivalentes); además, las variaciones que se observan en los rRNA son comparativamente más conservadas que las de otros constituyentes universales, tales como la ubiquitina, actina y tubulina. Las secuencias del RNA de la subunidad menor ribosomal (SSU-rRNA) presentan regiones altamente conservadas, junto a otras distintas incluso entre especies de un mismo género, por lo que son una de las principales herramientas empleadas para el estudio de las interrelaciones filogenéticas de los seres vivos (Martínez Fernández, 1995). El SSU-rRNA (16S-like) y las regiones que lo codifican son especialmente útiles para estimar la distancia de relación filogenética entre amplios rangos evolutivos (Gajadhar y col., 1991; Sogin y col., 1993). Este hecho no es diferente para los microsporidios como exponemos a continuación.

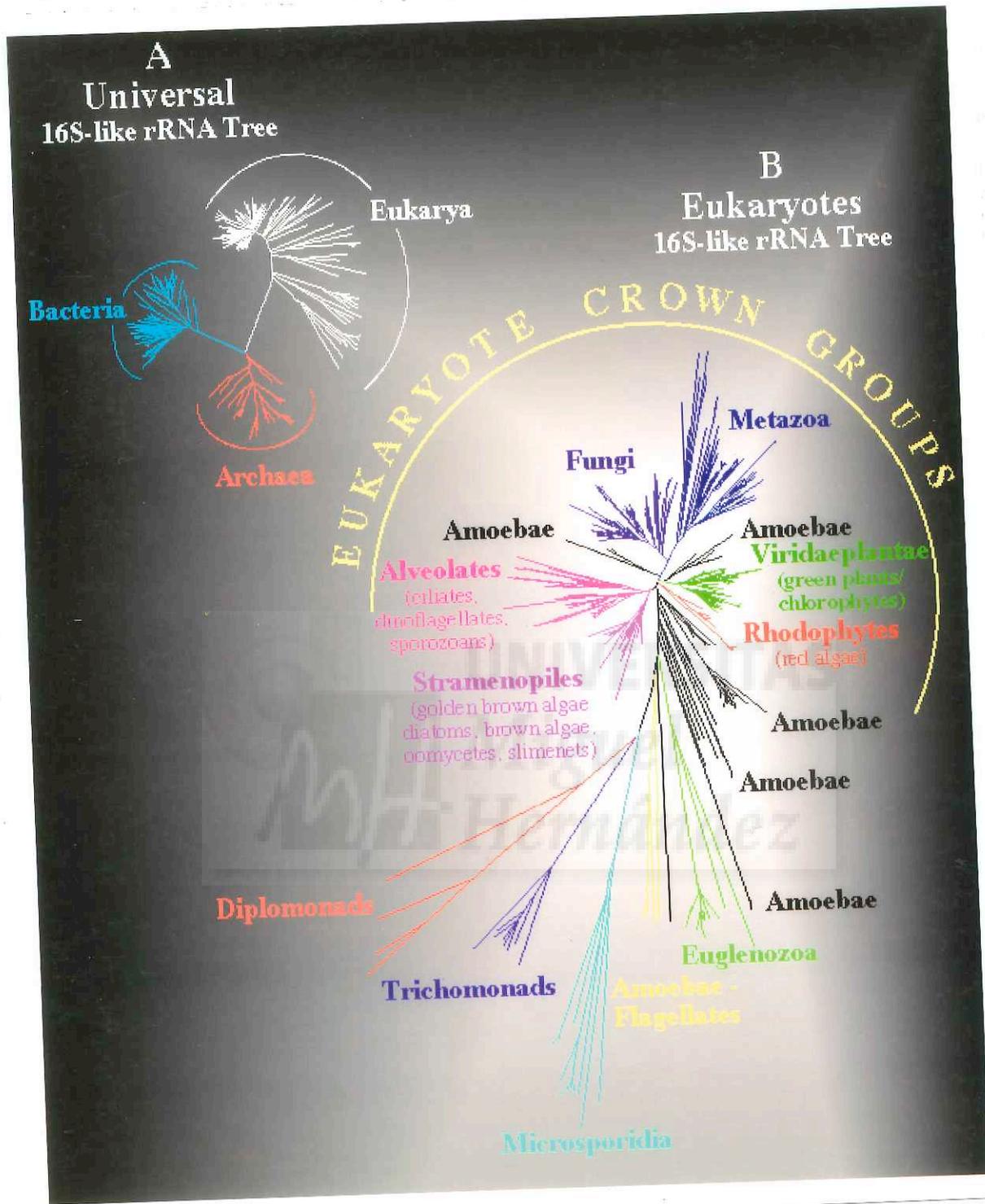


Figura 4. "El árbol de la vida". Posición de los microsporidios en el árbol filogenético universal mediante análisis de la secuencia del gen que codifica el RNA de la subunidad menor ribosomal (Sogin y col., 1993).

Desde que Balbiani en 1882 creó el orden Microsporidia para reunir a estos organismos, se han sucedido distintas clasificaciones. Sprague (1977) los elevó a la categoría de phylum, que denominó Microspora, dentro del reino Protozoa. Desde la clasificación general de los protozoos adoptada por la Sociedad de Protozoólogos (Levine y col., 1980), que divide los microsporidios en dos grupos basándose en la presencia o ausencia de vesícula esporófora (Sprague, 1977; Sprague, 1982), se han propuesto cinco sistemas diferentes de clasificación. Weisser (1985) basa la clasificación en la condición nuclear de las esporas, situando las especies que presentan núcleo diplocario en el orden Nosematidida y a las uninucleadas en el orden Pleistophoridida. Sprague y col. (1992), crean las clases Dihaplophasea y Haplophasea según las características del ciclo celular. Issi (1986), propone una clasificación, conscientemente artificial, basada en la morfología de la spora y de los estadios de desarrollo que tiene por objeto facilitar la inclusión de nuevas especies en un contexto taxonómico. Larson (1986), considera que esos caracteres (diplocario, vesícula esporófora y meiosis) han evolucionado independientemente en varios linajes y propone un agrupamiento de los géneros según características ultraestructurales y de desarrollo a nivel inferior a familia. Actualmente, los microsporidios no son considerados por algunos autores como miembros de los Protozoa, siendo agrupados junto los Diplomonadida (ej. *Giardia lamblia*) en un nuevo taxón: los eucariotas amitocnoriales (Sogin y col., 1991). Cavalier-Smith (1993), al proponer una nueva clasificación del Reino Protozoa, sitúa taxonómicamente el phylum, que denomina Microsporidia, en un reino aparte, el Reino Archezoa, caracterizado por contener microorganismos que carecen de mitocondrias, peroxisomas, hidrogenosomas y dictiosomas.

Todas las clasificaciones anteriores están basadas fundamentalmente en criterios morfológicos que han generado descripciones inadecuadas de géneros y especies, aunque finalmente se ha llegado a un consenso respecto a la correcta denominación del nombre del phylum, el autor y la fecha: Microsporidia, Balbiani, 1882 (Becnel y Sprague, 1998).

La secuencia de nucleótidos del gen que codifica el RNA de la subunidad menor ribosomal (SSU-rRNA) de un microsporidio aislado de insectos, *Vairimorpha necatrix*, sugiere que los microsporidios son organismos ancestrales, que aparecen mucho antes que los eucariotas en el desarrollo evolutivo (Vossbrink y col., 1987). Los métodos de análisis molecular y filogenético, aportan evidencias suficientes para que la posición de

determinadas especies en los actuales sistemas de clasificación sea constantemente revisada.

Así, Fries y col., (1996) describieron una nueva especie *Nosema ceranae*, parásito de la abeja *Apis cerana*. Trabajos anteriores habían atribuido estas infecciones en las abejas a *Nosema apis* (Lian, 1980; Yakobson y col., 1992), pero estudios detallados de ultraestructura demostraron diferencias morfológicas y mediante métodos de análisis molecular se confirmó que dichos aislados eran especies completamente distintas. También se ha constatado la situación contraria y *Vairimorpha necatrix* es sinónimo de otra especie *Nosema necatrix*, pues ambas presentan un 100% de homología en el gen que codifica la SSU-rRNA (Pieniazek N.J., observaciones no publicadas). Otro ejemplo de clasificación redundante se dió entre *Nosema tricoplusiae* y *Nosema bombycis*, ambas especies mostraron un 100% de homología en la secuencia del SSU-rRNA, además de idéntica morfología (Pieniazek y col., 1996).

El análisis filogenético usando las secuencias de los genes que codifican la SSU-rRNA, la subunidad mayor del RNA ribosomal (LSU- rRNA) y el espaciador intergénico (IGS), puede utilizarse como referencia para crear un modelo taxonómico que ayude a corregir las paradojas creadas por la sistemática tradicional (Olsen, 1987; Ward y col., 1992; Olsen y Woese, 1993; Sogin y col., 1993; De Rijk y col., 1995). Los tres grupos principales de métodos usados en análisis filogenético son: el método de parsimonia o método de compatibilidad, el método de matriz de distancia (ej. "neighbor joining") y el método de semejanza máxima (Felsenstein, 1988).

El método de análisis de parsimonia realiza la reconstrucción filogenética, basándose en el mínimo de veces que un determinado evento debe haber ocurrido, o mediante el sumatorio del número que diferentes eventos ocurrieron, asumiendo con ello, que el cambio evolutivo es improbable a priori (Camin y Sokal 1965; Felsenstein 1981; Felsenstein, 1988). El método de matriz de distancia (distancia génica) genera árboles acomodándolos en una matriz de distancia de apareamiento entre las especies. En el caso de secuencias de nucleótidos, la distancia puede ser calculada, por ejemplo, a partir de la fracción de lugares diferentes entre dos secuencias distintas (Felsenstein, 1988). El método de semejanza (similaridad-disimilaridad), introducido por Felsenstein (1981), es el más general para derivar estimaciones estadísticas a partir de los datos inferidos. En este método

se entiende que la semejanza de las especies en el árbol es la probabilidad del dato (secuencia) o del modelo (grupo de organismos en investigación) y el árbol en sí, considerado como función de ese árbol. Este método simplemente asume, que el árbol que maximiza la semejanza es el que maximiza la probabilidad de que el dato en cuestión haya ocurrido (Felsenstein, 1988). Los métodos de semejanza y de matriz de distancia se muestran superiores al método de parsimonia para inferir análisis filogenético de secuencias complejas desde el punto de vista evolutivo (Felsenstein 1978; Felstein, 1988; Pieniazeck N.J., comunicación personal). Aunque el análisis filogenético sea un método de gran utilidad en el estudio taxómico de los microsporidios, no debe ser utilizado como único instrumento para la alteración de taxa previamente establecidas (Vossbrink y col., 1987; Vossbrinck y col., 1993; Baker y col., 1994; Weiss y col., 1994; Zhu y col., 1994; Baker y col., 1995).

En la figura 5 se presenta un ejemplo de análisis filogenético realizado a partir de las secuencias que codifican la SSU- rRNA de 27 especies de microsporidios (Pieniazek, Kurtti y Fries, datos no publicados). En el mismo, podemos observar que especies filogenéticamente relacionadas entre sí y previamente clasificadas en el género *Nosema* (*N. acridophagus* y *N. algerae*), se encuentran situadas a una gran distancia evolutiva con las otras especies del dicho género. Este hecho derivará en la propuesta de creación de un nuevo género de microsporidios, denominado *Visvesvaria*, para incluir estas especies. (Pieniazek N.J., comunicación personal).

La taxonomía de los microsporidios ha sido y continúa siendo revisada. Este hecho no es diferente para las especies de microsporidios que infectan al hombre como describiremos mas adelante.

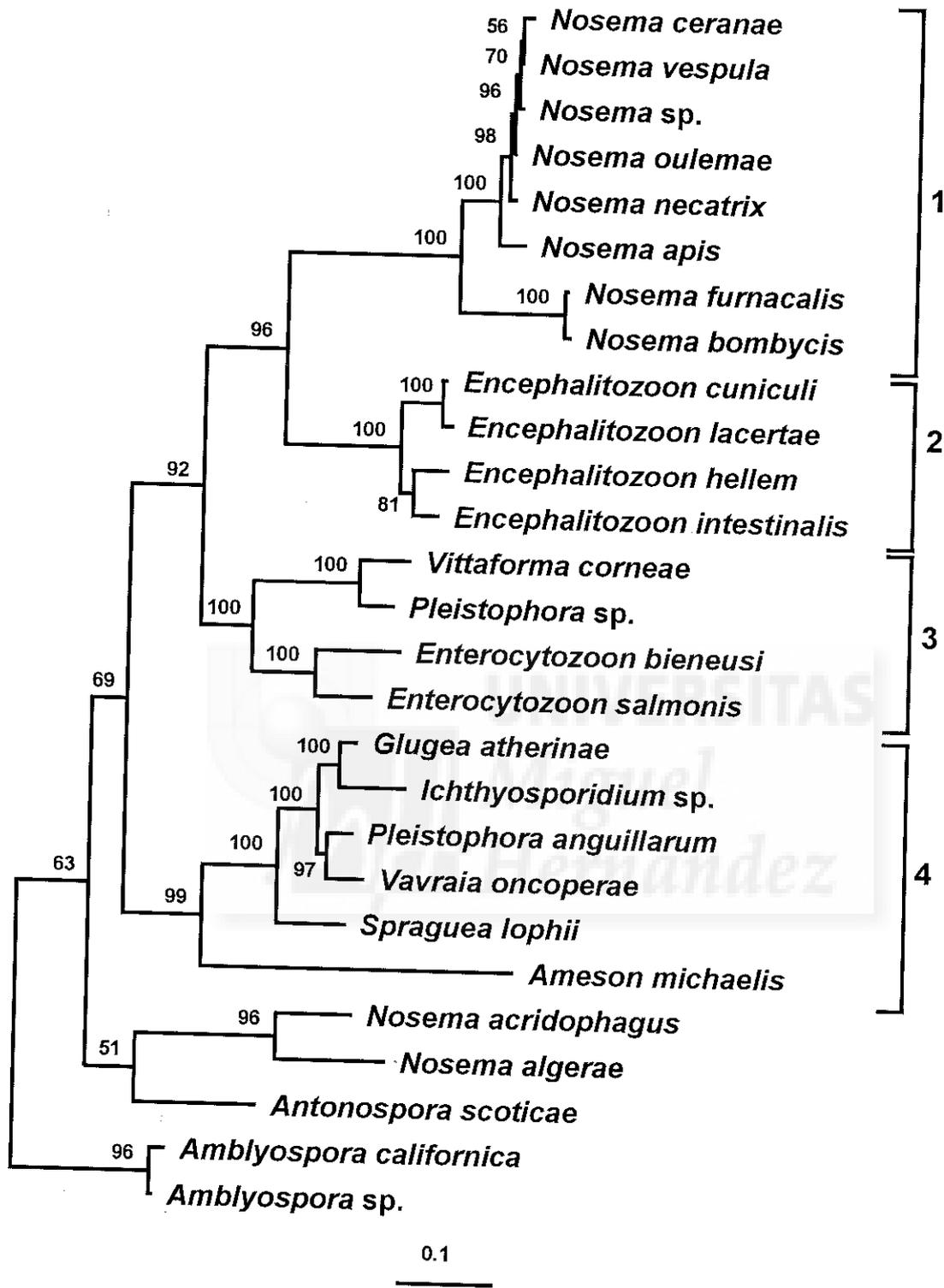


Figura 5. Arbol filogenético obtenido a partir del análisis de las secuencias de los genes que codifican la SSU-rRNA de 27 especies de microsporidios (Pieniazek, Kurtti y Fries, datos no publicados).

**Figura 5 (continuación).** Fenograma generado por el programa PUZZLE (Strimmer y von Haeseler, 1996) mediante el método de semejanza máxima de 27 taxa de microsporidios. Los números a derecha e izquierda de los nodos indican el "quartet puzzling" que apoya cada rama interna. Como grupo externo se empleó *Halobacterium halobium* (número de acceso al GenBank M11583). La barra indica una distancia evolutiva de 0.1 nucleótidos por posición en la secuencia. Los paréntesis indican los cuatros grupos filogenéticos propuestos por Baker y col. (1995). **1.** Grupo *Vairimorpha/Nosema*, **2.** Grupo *Encephalitozoon*, **3.** Grupo *Endoreticulatus* [*Pleistophora* sp. es idéntica a *Endoreticulatus schubergi*], **4.** Grupo *Ichthyosporidium*.

A continuación se enumera la lista completa de las especies (excepto las especies no publicadas: *N. algerae*, *N. acridophagus* y *E. lacertae*), con los números de acceso de la secuencias del SSU-rRNA en el Gen Bank.

*Amblyospora californica*, U68473, Baker y col.; *Amblyospora* sp., U68474, Baker y col.; *Ameson michaelis*, L15741, Zhu y col.; *Antonospora scoticae*, AF024655, Pieniazek y col.; *Encephalitozoon cuniculi*, L17072, Pieniazek y col.; *Encephalitozoon hellem*, L19070, Pieniazek y col.; *Encephalitozoon (Septata)intestinalis*, U09929, Pieniazek y col.; *Enterocytozoon bieneusi*, AF024657, Pieniazek y col.; *Enterocytozoon salmonis*, U10883, Pieniazek y col.; *Glugea atherinae*, U15987, Pieniazek y col.; *Ichthyosporidium* sp., L39110, Baker y col.; *Nosema apis*, U26534, Pieniazek y col.; *Nosema bombycis*, U09282, Pieniazek y col.; *Nosema furnacalis*, U26532, Pieniazek y col.; *Nosema (Vairimorpha) necatrix*, U11051, Pieniazek y col.; *Nosema ceranae*, U26533, Pieniazek y col.; *Nosema oulemae*, U27359, Pieniazek y col.; *Nosema* sp., D85501, Hatakeyama y col.; *Nosema vespula (Vairimorpha lymanrriae)*, U11047, Pieniazek y col.; *Pleistophora anguillarum*, U47052, Hsu y col.; *Pleistophora* sp., U10342, Pieniazek y col.; *Spraguea lophii*, Pieniazek y Hinkle, AF033197; *Vittaforma corneae (Nosema corneum)*, U11046, Pieniazek y col.; *Vavraia oncooperae*, X74112, Malone y col..

**Nota:** para *N. algerae* y *N. acridophagus* se propone el nombre de género *Visvesvaria*.



**MICROSPORIDIOSIS HUMANAS**

## 2. MICROSPORIDIOSIS HUMANAS

### 2.1. ETIOLOGIA

#### 2.1.1. Posición taxonómica

Hasta el momento se han descrito pocas especies de microsporidios como agentes patógenos en humanos. Clásicamente la identificación y clasificación de especie se realizaba mediante el estudio morfológico con microscopía electrónica de transmisión. En las tablas 1 y 2 se refleja la posición taxonómica de las especies descritas en patología humana según Levine y col. (1980) y Sprague y col. (1992), con la adición de las especies descritas posteriormente a la publicación de ambas clasificaciones. En ambas se describen erróneamente a los microsporidios formando el Phylum Microspora dentro del Reino Protozoa (Becnel y Sprague, 1998).

**Tabla 1.** Microsporidios patógenos para el hombre según Levine y col. (1980).

Clase	Orden	Suborden	Familia	Género	Especie
Rudímicrosporea					
Microsporea	Minisporida				
	Microsporida	Pansporoblastina	Pleistophoridae	<i>Pleistophora</i>	<i>Pleistophora</i> sp.
				<i>Trachipleistophora</i>	<i>T. hominis</i>
		Apansporoblastina	Nosematidae	<i>Nosema</i>	<i>N. connori</i> <i>N. oculorum</i>
				<i>Vittaforma</i>	<i>V. corneae</i>
		Encephalitozoonidae	<i>Encephalitozoon</i>	<i>E. cuniculi</i> <i>E. hellem</i> <i>E. (S.) intestinalis</i>	
		Enterocytozoonidae	<i>Enterocytozoon</i>	<i>E. bienersi</i>	

**Tabla 2.** Microsporidios patógenos para el hombre según Sprague y col. (1992).

Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Dihaplophasea	Meiodihaplophasida			
	Dissociohaplophasida	Nosematidae	<i>Nosema</i>  <i>Vittaforma</i>	<i>N. connori</i> <i>N. ocularum</i>  <i>V. corneae</i>
Haplophasea	Glugeida	Pleistophoridae	<i>Pleistophora</i> <i>Trachipleistophora</i>	<i>Pleistophora</i> sp. <i>T. hominis</i>
		Encephalitozoonidae	<i>Encephalitozoon</i>  "Septata"	<i>Encephalitozoon</i> sp <i>E. cuniculi</i> <i>E. hellem</i> <i>E. (S.) intestinalis</i>
		Enterocytozoonidae	<i>Enterocytozoon</i>	<i>E. bienersi</i>
No clasificados	No clasificados	No clasificados	<i>Microsporidium</i>	<i>M. ceylonensis</i> <i>M. africanum</i>

Sin embargo la clasificación de Sprague y col. (1992), basada en características ultraestructurales que no son fáciles de observar, comete errores como situar a *Vairimorpha necatrix* en una clase diferente de *Nosema necatrix*, siendo "ambas" una única especie.

Entre los microsporidios patógenos para el hombre y al igual que vimos en otras especies parásitas de animales, aparecen continuos cambios taxonómicos. Uno de los ejemplos más recientes es la reclasificación de *N. corneum* (Shaddock y col., 1990) como *Vittaforma corneae* después de un detallado estudio ultraestructural de los estadios evolutivos de esta especie de microsporidio (Silveira y Canning, 1995). Este hecho concuerda con análisis filogenéticos que demuestran que las especies de *Nosema* oriundas de artrópodos forman un grupo separado de las aisladas en vertebrados y sitúan a *N. corneum* relacionada con los microsporidios que infectan vertebrados, incluidas las especies patógenas para el hombre (Baker y col., 1995; Pieniazek, Kurrti y Fries, observaciones no publicadas [Figura 5, página 17]).

Debemos citar aquí la polémica existente sobre la posición taxonómica de *Septata intestinalis* (Cali y col., 1993). Aunque nadie discute la clasificación de este microsporidio como nueva especie, se ha propuesto reclasificarla dentro del género *Encephalitozoon* (Baker y col., 1995; Hartskeerl y col., 1995; Didier y col., 1996a), motivando argumentaciones en sentido contrario por otros autores (Cali y col., 1996). Con relación a ello, debemos puntualizar que a pesar de las semejanzas morfológicas y antigénicas que la especie presenta con las del género *Encephalitozoon* (Hartskeerl y col., 1995; Didier y col., 1996a), el argumento esgrimido por Hartskeerl y col., (1995) basándose en la homología encontrada a nivel del gen que codifica la SSU-rRNA entre *S. intestinalis* y *E. hellem* (90% de homología), no ofrece base científica suficiente para determinar la posición de una especie de microsporidio en un género existente (Pienazek N.J., comunicación personal) ya que las diferencias en las secuencias del SSU-rRNA entre especies del mismo género, son mucho mayores que las encontradas entre organismos más recientes desde el punto de vista evolutivo (Vossbrinck y col., 1987; Olsen y Woese, 1993; Sogin y col., 1993). El análisis filogenético sitúa a *S. intestinalis* en un grupo evolutivamente relacionado con *E. cuniculi* y *E. hellem* (Baker y col., 1995; Pienazek, Kurti y Fries, resultados no publicados [figura 5, página 17]).

Estos resultados demuestran que las secuencias de la SSU-rRNA pueden ser de gran utilidad para confirmar posiciones filogenéticas de microsporidios cuya clasificación no está claramente definida. Sin embargo, debido a que las diferencias entre secuencias de especies de microsporidios son mayores que las observadas entre otros microorganismos y a la morfología semejante de determinadas especies, sería deseable que la nomenclatura de las especies no fuese alterada inmediatamente sino en el seno de comités multidisciplinares constituidos para este fin.

### 2.1.2. Características ultraestructurales

Las principales características ultraestructurales de las principales especies patógenas para el hombre se exponen en la tabla 3 (página 24).

*E. bienewisi* fue inicialmente detectado por Modigliani y col. (1985) y descrito con detalle por Desportes y col. (1985) como una nueva especie de microsporidio presente en las heces y en tejido intestinal de un paciente con sida y diarrea crónica (Desportes y col.,

1985). Es el patógeno intestinal más prevalente en pacientes con sida y puede afectar al árbol hepatobiliar y a las células epiteliales del ducto pancreático (Weber y col., 1994; Schwartz y Bryan, 1997).

*S. intestinalis* se describió en 1992 (Orenstein y col., 1992a; Orenstein y col., 1992b) como un microsporidio semejante ultraestructuralmente a los pertenecientes al género *Encephalitozoon*. Las diferencias morfológicas observadas determinaron la creación de un nuevo género y especie (Cali y col., 1993). La mayoría de los autores ha aceptado la reclasificación como *E. intestinalis* (Hartskeerl y col., 1995), y por ello así lo denominaremos en adelante. Es la segunda especie en prevalencia entre las que infectan humanos (Conteas y col., 1996; Coyle y col., 1996; Sodr e y col., 1997). La infección por *E. intestinalis* presenta un cuadro clínico superponible al causado por *E. bienewisi*, afectando en ocasiones a colon y árbol hepatobiliar. Pero a diferencia del anterior, es causa frecuente de infección diseminada, parasitando diversos órganos y tejidos (Weber y col., 1994; Schwartz y Bryan, 1997).

*E. cuniculi*, fue el primer microsporidio reconocido como parásito de mamíferos. Wright y Craighead en 1922, describieron la infección en conejos domésticos y un año después, Levaditi y col. (1923), denominaron al agente etiológico como lo conocemos actualmente. La infección por *Encephalitozoon* spp. fue diagnosticada en pocas ocasiones antes de la pandemia del sida; surgiendo seguidamente los primeros casos de queratoconjuntivitis. También fueron descritas, infecciones extraoculares (hepatitis y peritonitis) (Weber y col., 1994). Recientemente han sido identificados nuevos casos de infección diseminada comprometiendo diversos órganos y tejidos (Schwartz y Bryan, 1997).

*E. hellem* fue identificado como nueva especie por Didier y col. en 1991. Este microsporidio es morfológicamente indistinguible de *E. cuniculi* y únicamente la utilización de métodos bioquímicos, inmunológicos o moleculares, permiten distinguir ambas especies (Didier y col., 1991; Visvesvara y col., 1991). Desde su descripción la mayor parte de los casos de infección sistémica descritos en humanos son debidos a esta especie y las manifestaciones clínicas de las infecciones son igualmente similares (Schwartz y Bryan., 1997). Si a este hecho añadimos la imposibilidad de distinguir morfológicamente las esporas de *E. intestinalis* con las de microsporidios pertenecientes al

género *Encephalitozoon*, es lógico suponer que muchos de los casos previamente descritos como causados por *E. cuniculi* o *Encephalitozoon* spp., fuesen debidos a infecciones por las otras especies más prevalentes.

*Pleistophora* spp. son microsporidios que parasitan insectos y peces. Han sido identificados como agentes de infecciones en músculo esquelético en tres pacientes, dos de los cuales estaban infectados por el VIH (Chupp y col., 1993; Grau y col., 1996). El tercer paciente presentaba una severa inmunodeficiencia celular pero después de cuatro años de seguimiento tras el diagnóstico de la infección continuaba con serología negativa para el VIH (Ledford y col., 1985; Macher y col., 1988).

*Trachipleistophora hominis*, una nueva especie descrita en 1996 por Hollister y col., como agente causal de miositis en un paciente con sida (Field y col., 1996), viene a incrementar el creciente número de microsporidios patógenos para el hombre. Desde entonces, dos casos de infección por microsporidios que parecen ser especies de *Trachipleistophora* han sido descritos en sendos pacientes con síntomas neurológicos, cuya autopsia demostró el carácter diseminado de la infección (Yachnis y col., 1996).

*Nosema* spp. son conocidos parásitos de invertebrados. El primer caso de infección humana por *N. conori* fue descrita en 1973, asociada con un cuadro de infección diseminada en un niño atímico que presentó el parásito en la mayor parte de los tejidos examinados en la autopsia (Margileth y col., 1973). Otra especie, *N. ocularium* fue identificada en muestras de tejido de un paciente con úlcera corneal (Cali y col., 1991).

*Vittaforma corneae*, es la única especie de este nuevo género creado por Silveira y Canning (1995) tras detallado análisis ultraestructural de un microsporidio aislado de tejido ocular, previamente denominado *N. corneum* (Shadduck y col., 1990).

Los microsporidios descritos en humanos que no han sido suficientemente caracterizados para ser asignados a un determinado género, se denominan colectivamente bajo el término de *Microsporidium* spp. Aquí se incluyen, *M. cyelonensis* descrito en una úlcera corneal de un joven en Ceilán (Ashton y Wirasinha, 1973), *M. africanum*, localizado en el estroma de una úlcera corneal perforada de una mujer en Botswana (Pinnolis y col., 1981), *Microsporidium* spp. observado en mucosa gástrica de un paciente con sida en Valencia (España) (Flores y col., 1993) y el hallado en India por Kelkar y col. (1997) en una paciente sometida a transplante de médula ósea.

**Tabla 3. Características ultraestructurales de microsporidios patógenos para el hombre.**

	VP	NUCLEO	MEROGONIA	ESPOROGONIA	VE	ESPORA
<i>Nosema spp.</i>	No	Doble	Fisión binaria o múltiple	Disporoblástica	No	Binucleadas 2-2,5 x 5 µm Tp: 11-12 vueltas en única hilera
<i>V. corneae</i>	No (1)	Doble	Fisión binaria	Poliesporoblástica (2)	No	Binucleadas 1,2 x 3.8 µm Tp: 5-7 vueltas en única hilera.
<i>Pleistophora spp.</i>	No (3)	Unico	Plasmodios multinucleados	Poliesporoblástica	Si (4)	Uninucleadas 2.8 x 3.2-3.4 µm. Tp: 9-12 vueltas en única hilera.
<i>T. hominis</i>	No	(5)	Fisión binaria o plasmotomía	Fisión binaria	Si (6)	Uninucleadas 2.4 x 4.0 µm Tp: REV Vacuola posterior prominente.
<i>E. ncephalitozoon spp.</i>	Si (7)	Unico	Fisión binaria	Fisión binaria	No	Uninucleadas 1.15 x 2-2.5 µm. Tp: 4-7 vueltas en unica hilera.
<i>E. bienersi</i>	No	Unico (8)	Plasmodios multinucleados(9)	Poliesporoblástica (10)	No	Uninucleadas 0.7-1 x 1-1.6 µm. Tp: 4-7 vueltas en doble hilera.

VP: vacuola parasitófora; VE: vesícula esporófora; Tp: tubo polar

1. Cada parásito rodeado por una cisterna de retículo endoplasmático de la célula hospedadora.
2. Esporontes acintados dando lugar a una disposición lineal de esporoblastos.
3. El parásito segrega una gruesa y amorfa pared a su alrededor aislándose de la célula hospedadora.
4. Pared multicapa. Gran y variable número de esporas en vesícula esporófora.
5. Merontes: estadios con 2 a varios núcleos. Esporontes y esporoblastos: uninucleados.
6. Pared simple. Vesícula esporófora conteniendo de 2 a >32 esporas.
7. Delimitada por una membrana plasmática simple, originada por la célula hospedadora. *E. (Septata) intestinalis* presenta una matriz fibrilar rodeando los organismos en desarrollo, característica de especie.
8. Elongado en los estadios iniciales. Característico de género.
9. Redondeados y > 6 µm de diámetro. Presencia de discos electrodensos e inclusiones electrotransparentes únicas en este género.
10. Desarrollo de organelas de la espora, precoz a la fisión múltiple del plasmodio esporogónico en esporoblastos.

## **3.2 EPIDEMIOLOGIA**

A partir de la descripción de estos parásitos como agentes de infección humana, el número de casos relatados se ha incrementado notablemente y determinados aspectos epidemiológicos relacionados con los agentes implicados y con la enfermedad van siendo paulatinamente definidos.

En 1987, Canning y Hollister, plantearon dos preguntas fundamentales: ¿ es *E. bienewsi* un parásito natural del hombre o su hábitat es zoonótico?, y consecuentemente, ¿ las infecciones humanas son adquiridas, o simplemente exacerbaciones de parasitación a niveles subpatentes que se manifiestan clínicamente en individuos inmunosuprimidos?. Hoy, diez años después, las respuestas a estas preguntas solo se conocen parcialmente.

### **3.2.1. Prevalencia y distribución geográfica**

Las microsporidiosis humanas, presentan una distribución cosmopolita. Han sido documentados casos en individuos de los cinco continentes y la inmensa mayoría de éstos afectando enfermos con sida (Weber y col., 1994; Schwartz y Bryan, 1997). Este hecho llevo a sugerir que los microsporidios podían ser parásitos naturales del hombre, causando enfermedad sólo en situaciones de inmunosupresión (Canning y Hollister, 1992)

Desde la descripción de *E. bienewsi* (Desportes y col., 1985) hasta 1989 se habían descrito 42 casos de microsporidiosis humana (Canning y Hollister, 1990). Este número se incrementó a mas de 400 en 1993 (Bryan y Weber, 1993) y 4 años después mas de 600 casos habían sido diagnosticados únicamente en Estados Unidos (Bryan, 1995). La mayoría de ellos son debidos a *E. bienewsi*. La prevalencia de microsporidios en pacientes con sida y diarrea crónica oscila entre el 7 y el 50% según las series (Orenstein y col., 1990; Field y col., 1993; Molina y col., 1993; Cominos y col., 1994; Kotler y Orenstein, 1994; Weber y col., 1994; Franzen y col., 1996a; Lambl y col., 1996; Contreas y col., 1996; Coyle y col., 1996; Sodré y col., 1997). Estas variaciones pueden deberse tanto a diferencias reales, segun la localización geográfica, como a diferencias en la sensibilidad de los métodos diagnósticos empleados en los diferentes estudios. En España se han realizado tres estudios en enfermos con sida y diarrea crónica. Los resultados muestran una prevalencia del 20%,

15,4% y 12 % respectivamente y en todos los casos la especie identificada fue *E. bienewisi* (Moreno-Camacho y col., 1995; Bornay-Llinares y col., 1996; del Aguila y col., 1997a). *E. intestinalis* ocupa el segundo lugar en frecuencia entre los agentes de microsporidiosis humana (Field y col., 1996; Coyle y col., 1996; Ommbruck y col., 1996; Sodré y col., 1997; Franzen y col., 1995a), mientras que las infecciones documentadas por el resto de las especies no alcanzan los 50 casos.

Dejando a un lado el hecho probado de que estas infecciones ocurren más frecuentemente en pacientes severamente inmunocomprometidos infectados por el VIH, parece que pueden emerger como importantes agentes de infección en pacientes con otro tipo de inmunosupresión (ej., receptores de transplantes de  rganos) (Schwartz y Bryan, 1997). La presencia de microsporidios ha sido también documentada, en pacientes con sida asintomáticos (Eeftink Schattenkerk y col., 1991; Rabeneck y col., 1993; Svenson y col., 1993) y en individuos inmunocompetentes (Deloul y col., 1994; Sandfort y col., 1994; Sobottka y col., 1995b; Flepp y col., 1996; Monneret y col., 1995; Enriquez y col., 1997a). Estos datos indican la posibilidad de que las infecciones por microsporidios sean más frecuentes que lo estimado y sostienen el escaso poder patógeno de este grupo de organismos en individuos inmunocompetentes.

### 3.2.2. Fuentes de infección y mecanismos de transmisión

Evidencias relacionadas con el hábitat natural de los microsporidios, los posibles mecanismos de transmisión y las vías de adquisición de varias de las especies que infectan al hombre están siendo desveladas. Esta información permite argumentar razonadamente la probable historia natural de estos parásitos y de las infecciones por ellos causadas.

*E. cuniculi* causa enfermedad en numerosas especies de mamíferos, como conejos, ratas, ratones, caballos, perros, zorros, gatos, leopardos y primates, incluyendo el hombre y es la única entre las especies que infectan al hombre que ha sido aislada en cultivo a partir de hospedadores no humanos (Canning y Lom, 1986; de Groote y col., 1995; Didier y col., 1995a; Hollister y col., 1995; Desplazes y col., 1996; Weber y col., 1997). La homología encontrada entre aislados humanos y de animales (perros y conejos) mediante análisis molecular de los mismos, apoyan el origen zoonótico de la infección por esta especie

(Didier y col., 1996b; Desplazes y col., 1996; Mertens y col., 1997; Weber y col., 1997). *E. bienewisi* ha sido recientemente identificado en muestras fecales de cerdos (Desplazes y col., 1996) y en monos infectados experimentalmente con SIV (simian immunodeficiency virus) con patología hepatobiliar (Mansfield y col., 1997). Finalmente *E. hellem* ha sido identificado en *Melosittacus undulatus* (Black y col., 1997). En el estudio 5 (página 98) presentamos evidencias que muestran por primera vez la presencia de *E. intestinalis* en diferentes animales y la parasitación de individuos inmunocompetentes por este microsporidio. Nuestros hallazgos demuestran la infección en diferentes mamíferos y apoyan el origen zoonótico de las infecciones por esta especie.

La liberación de esporas al medio ambiente por animales infectados tras su muerte y putrefacción resulta evidente y la excreción de las mismas por la orina y heces de animales está perfectamente demostrada (Googman y Gardner, 1972; Cox y col., 1979; Jafri y col., 1993; Desplazes y col., 1996). En individuos infectados se han detectado esporas en heces, orina y secreciones respiratorias (Weber y col., 1994; Schwartz y Bryan, 1997). Estas esporas son altamente resistentes y pueden constituir una fuente ambiental de propagación. Su presencia en agua estancada ha sido documentada, aunque ninguna de las especies que infectan al hombre pudo ser identificada. (Avery y Undeen, 1987).

Los datos obtenidos junto a observaciones realizadas en infecciones experimentales y estudios clínico-patológicos, nos permiten apuntar como fuentes posibles de infección humana: el medio ambiente, animales e individuos infectados; y como vías probables de transmisión horizontal: la respiratoria, la digestiva (incluyendo agua y alimentos contaminados) y la sexual.

La alta prevalencia de infecciones gastrointestinales debidas a *E. bienewisi* y *E. intestinalis*, junto a la escasa capacidad de diseminación de *E. bienewisi* en el hospedador, hace suponer que la adquisición de la infección por ambas especies ocurre por vía digestiva. La presencia de *E. bienewisi* en el aparato respiratorio solo se ha comprobado en dos pacientes y ambos presentaban simultáneamente sendos cuadros de diarrea crónica (Weber y col., 1992b; del Aguila y col., 1997b). Además, esta especie sólo ha sido identificada una vez en la lámina propia de la mucosa intestinal (Schwartz y col., 1995) apuntando, al contrario que *E. intestinalis*, una diseminación por contigüidad más que una diseminación hematogena o linfática. Así pues, la contaminación feco-oral puede jugar un

papel importante en el modo de transmisión de la microsporidiosis intestinal. Esta suposición se refuerza con el hallazgo de portadores asintomáticos de *E. bieneusi* (Rabeneck y col., 1993) y de *E. intestinalis* (Enriquez FJ, comunicación personal) y la transmisión experimental de la infección con esta especie en monos, utilizando la vía oral (Tzipori y col., 1997). Por otro lado la presencia de *E. hellem* y *E. cuniculi* en heces solo ha sido descrita esporádicamente (Franzen y col., 1995c; Katzwinkel-Wladarsch y col., 1996; Weber y col., 1997), confirmando la observación clínica relativa al tropismo tisular de ambas especies, que no es, evidentemente, el tracto gastrointestinal, sino fundamentalmente los tractos respiratorio y genitourinario. De todas formas, este hecho no permite descartar la posibilidad de adquisición de las mismas por la vía digestiva y su posterior e inmediata diseminación hacia los órganos diana. En animales, la inoculación vía oral es capaz de producir infección experimental por *E. cuniculi* (Cox y col., 1979; Koudela y col., 1993) y *E. hellem* (Didier y col., 1994). Es más, en un paciente con infección diseminada por *E. cuniculi*, fueron detectadas esporas de esta especie en sus heces seis meses antes de que los síntomas de diseminación se manifestasen, sugiriendo la adquisición del parásito por vía oral (Weber y col., 1997).

Inicialmente, la presencia de esporas de *E. hellem* en orina y secreciones respiratorias de pacientes con afectación ocular llevaron a sugerir que estas infecciones se adquirirían por autoinoculación externa (Rosberger y col., 1993; Schwartz y col., 1993a). También han sido observadas infecciones debidas a *E. hellem* y *E. bieneusi* en personas que conviven con pacientes con sida (Schwartz y Bryan, 1997) y la transmisión vía sexual ha sido sospechada en parejas homosexuales de pacientes infectados por microsporidios (Flepp y col., 1996; Birthistle y col., 1996). La inoculación vía rectal de esporas de *E. cuniculi* en animales de experimentación produce una infección diseminada apoyando la posibilidad de transmisión sexual (Wicher y col., 1991; Fuentealba y col., 1992).

Por otro lado la posibilidad de transmisión mediante aerosoles fue sugerida tras la primera autopsia realizada en un paciente con infección diseminada por *E. hellem* (Schwartz y col., 1992). Un exhaustivo estudio necrópsico, reveló la presencia de numerosos microsporidios en las células epiteliales de la mucosa tráqueo-bronquial, asociado en algunas áreas a traqueitis erosiva, bronquitis y bronquiolitis. Los parásitos se localizaron, en número decreciente desde la tráquea proximal a los bronquiolos terminales.

El patrón de colonización observado, es coherente con la adquisición de la infección vía respiratoria. Otra necropsia, describe intensa parasitación por *E. cuniculi* del epitelio bronquial, lámina propia y la luz y células endoteliales de los vasos sanguíneos (Mertens y col., 1997). Estos hallazgos han sido confirmados tras la demostración de ambas especies por biopsia transbronquial y pulmonar en pacientes con sintomatología respiratoria (Schwartz y col., 1993b; De Grootte y col., 1995). Otras observaciones que apoyan esta hipótesis son la frecuente presencia de microsporidios del género *Encephalitozoon* en el tracto respiratorio, incluso en ausencia de sintomatología, (Orenstein y col., 1992b; Schwartz y col., 1993a; Weber y col., 1993a; Molina y col., 1995; Pemán y col., en prensa), la reciente descripción de un cuadro de neumonía en un paciente, en el que un exhaustivo estudio, sólo pudo demostrar la presencia del parásito en esta localización (Scaglia y col., 1997) y la infección experimental vía intratraqueal (Cox y col., 1979).

Ha sido demostrada la transmisión transplacentaria en varios mamíferos (conejos, zorros, perros y monos) (Hunt y col., 1972; Mohn y col., 1982; Zeman y Baskin, 1985). Sin embargo, no se conoce hasta el momento ningún caso de microsporidiosis congénita en humanos.

En resumen, tanto el medio ambiente como diferentes animales o humanos infectados, representan una posible fuente de infección. Esta podría ser adquirida por vía digestiva, respiratoria y sexual en función de las características biológicas de la especie implicada, que precisa de células apropiadas que permitan su desarrollo inicial estableciendo la infección de forma local o diseminada. La demostración futura de estos hechos, permitirá la implantación de medidas profilácticas adecuadas en poblaciones de riesgo.

### 3.3. MANIFESTACIONES CLINICO-PATOLOGICAS

Las infecciones por microsporidios, provocan variadas manifestaciones clínicas. Su forma de presentación está relacionada especialmente, con la especie infectante y con el estado inmune del individuo infectado. Ya que no existe una clasificación establecida de las formas clínicas de las microsporidiosis humanas, y en base a los conocimientos que disponemos, podríamos describirlas con fines didácticos como:

#### A. Formas localizadas

##### A.1. Ocular

Severa (inmunocompetentes)

Leve (inmunodeprimidos)

##### A.2. Rino-sinusal (inmunodeprimidos)

##### A.3. Pulmonar (inmunodeprimidos)

##### A.4. Muscular (inmunodeprimidos)

##### A.5. Gastrointestinal

Diarrea autolimitada (inmunocompetentes)

Diarrea crónica persistente o intermitente (inmunodeprimidos)

#### B. Formas diseminadas

Afectando diversos órganos y tejidos, especialmente aparatos respiratorio y genitourinario (inmunodeprimidos)

En este punto, no obstante, debemos señalar que hay suficientes evidencias indicando que la mayoría de las infecciones en individuos inmunodeprimidos con afectación ocular, rinosinusal o pulmonar, cursan con afectación multiorgánica (Orenstein y col. 1997; Schwartz y Bryan, 1997).

### 3.3.1. Individuos inmunocompetentes

Los casos conocidos de microsporidiosis en individuos inmunocompetentes, son pocos y aislados. En todos ellos la infección se ha presentado de forma localizada y con afectación ocular o gastrointestinal.

Las formas oculares cursan con queratitis severa y han sido descritas en cuatro pacientes, dos de los cuales presentaron durante el curso de la infección úlceras corneales severas. Un niño de 11 años con afectación corneal derecha, fue sometido a queratoplastia que opacificó posteriormente, el estudio histopatológico evidenció un microsporidio *Nosema*-like que se denominó *Microsporidium ceylonensis* (Ashton y Wirasinha, 1973); una mujer de 26 años presentó úlcera corneal perforada más queratouveitis e hipema que requirió enucleación; el estroma corneal mostró un microsporidio *Nosema*-like que se denominó *Microsporidium africanum* (Pinnolis y col., 1981); un hombre de 45 años con queratitis discoide central progresiva, infiltración recurrente del estroma corneal, queratoconjuntivitis punctata e iritis anterior de dos años de evolución, presentó en biopsia corneal microsporidios denominados *N. corneum*, la resolución de la infección requirió queratoplastia (Shaddock y col., 1990; Davis y col., 1990); el último de ellos un hombre de 39 años con úlcera corneal persistente que resolvió con trasplante de cornea, la biopsia corneal permitió la identificación de *N. ocularum* (Cali y col., 1991).

Han sido documentados, cuatro casos de microsporidiosis intestinal en individuos inmunocompetentes (Sandfort y col., 1994; Flepp y col., 1996; Sobottka y col., 1995b; Wanke y col., 1996). Tres de los pacientes presentaron cuadros de diarrea que resolvieron espontáneamente entre dos y seis semanas sin tratamiento. En dos de los casos hubo antecedentes de viajes; uno de ellos a Egipto y Turquía (Sandfort y col., 1994) y el otro a Turquía (Sobottka y col., 1995b); ambos fueron diagnosticados a su regreso al país de origen. El cuarto paciente presentaba náuseas, dolor abdominal y diarrea de más de tres meses de evolución, el estudio del estado inmunológico mostró un recuento de linfocitos CD4 en el límite de la normalidad (500/mm<sup>3</sup>), con un cociente CD4/CD8 de 1,69. El estudio serológico para el VIH fue negativo. Se le administró albendazol (400 mg/día) durante 30 días. Los síntomas decrecieron a partir del 5 día de tratamiento y el estudio

parasitológico fue negativo durante los 8 meses de seguimiento (Wanke y col., 1996). El estudio exhaustivo de los pacientes demostró la presencia de *E. bienersi* en muestras fecales y ausencia de otros microorganismos enteropatógenos (bacterias, virus o parásitos), excepto en uno de los casos que presentó co-infección con *Cryptosporidium parvum* (Sobottka y col., 1995b).

Estos datos sugieren que los microsporidios puedan ser agentes de "diarrea del viajero" que cursan de forma autolimitada y en los que por las técnicas microbiológicas habituales no se detecta el agente etiológico. Y se fundamenta en el hallazgo de estos agentes en individuos inmunocompetentes con diarrea e incluso en individuos asintomáticos (Enriquez y col., 1997a; Hautvast y col., 1997; Raynaud y col., 1998).

### **3.3.2. Individuos inmunosuprimidos (VIH-)**

Pocos son los casos documentados de pacientes con microsporidiosis sistémica cuya inmunodeficiencia no fuera causada por el VIH, dentro de ellos podemos distinguir aquellos pacientes con inmunodeficiencia celular congénita o de etiología desconocida y aquellos con inmunodeficiencia secundaria a tratamiento inmunosupresor.

Entre los primeros, están descritos: un niño de 9 años con fiebre recurrente, dolor de cabeza, pérdida de conciencia y convulsiones en el que se detectaron esporas de *Encephalitozoon* spp. en orina y líquido cefalorraquídeo (Matsubayashi y col., 1959); un niño de cuatro meses con aplasia tímica e infección diseminada por *Nosema* spp. (Margileth y col., 1973); un niño de tres años con inmunodeficiencia celular de etiología desconocida e infección diseminada por *Encephalitozoon* spp. (Bergquist y col., 1984); y un hombre de 20 años con infección muscular causada por *Pleistophora* spp. (Ledfordt y col., 1985; Macher y col., 1988).

Recientemente, se han descrito infecciones por microsporidios en pacientes transplantados y sometidos a tratamiento inmunosupresor. El primero de los casos cursó con diarrea en un paciente con trasplante hepático (Sax y col., 1995); el segundo, un paciente sometido a trasplante de pulmón y corazón, experimentó además de la diarrea una masiva pérdida de peso (Rabodonirina y col., 1996). En ambos pacientes el agente

etiológico identificado fue *E. bienensi*. Un tercer paciente con leucemia mieloide crónica, sometido a un trasplante alogénico de médula ósea fue diagnosticado postmortem mediante microscopía electrónica de microsporidiosis e infección fúngica (Kelkar y col., 1997), la especie de microsporidio implicada no pudo ser identificada al presentar una ultraestructura diferente a la de los microsporidios hasta ahora descritos en humanos. Por último, en una paciente receptora de un doble trasplante de riñón y páncreas, se diagnosticó una infección en el riñón transplantado debida a *E. cuniculi*. La identificación se realizó mediante microscopía óptica, electrónica y reacción en cadena por la polimerasa. La paciente presentó simultáneamente, encefalitis y cardiomiopatía de etiología incierta (Schwartz DA, comunicación personal).

### **3.3.3. Individuos infectados por el VIH**

#### ***E. bienensi***

*E. bienensi* ha sido frecuentemente asociado con diarrea crónica y patología biliar en pacientes infectados por el VIH y severamente inmunosuprimidos. La mayoría de los pacientes infectados, presentan recuentos de linfocitos CD4 por debajo de 50-100/mm<sup>3</sup> (Orenstein y col., 1990; Eeftink Schattenkerk y col., 1991; Asmuth y col., 1994; Molina y col., 1993; Rabenek y col., 1993; Goodgame, 1996). No obstante puede presentarse también en pacientes con recuentos de linfocitos CD4 relativamente conservados (Rabeneck y col., 1995; Sowerby y col., 1995).

Las manifestaciones más frecuentes son diarrea, anorexia y pérdida de peso. La intensidad de la diarrea varía de 1 a más de 20 deposiciones día (generalmente de 3 a 10). Las heces son de consistencia blanda a líquida y en ausencia de coinfección con otros parásitos intestinales, sin moco, leucocitos o sangre. Es habitual la ausencia de fiebre. (Orenstein y col., 1990; Field y col., 1993; Molina y col., 1993; Asmuth y col., 1994; Weber y col., 1994; Bryan, 1995; Goodgame, 1996). La diarrea suele empeorar tras la comida y suele ser mas frecuente por la mañana (Asmuth y col., 1994). El curso suele ser crónico, muchas veces con periodos asintomáticos. La severidad de la diarrea, incremento de la frecuencia (con incontinencia, en casos severos), la malbsorción de grasas, D-xilosa y

vitamina B12 junto a la pérdida de peso asociada lleva a un síndrome constitucional (Asmuth y col., 1994; Weber y col., 1994a).

Otros signos y síntomas asociados a la infección intestinal por *E. bienersi*, incluyen: dolor abdominal, náuseas, vómitos y ocasionalmente fiebre. Estos hallazgos se observan a menudo en pacientes con infección biliar concomitante y manifestaciones clínicas compatibles con colangitis o colecistitis. La patología biliar asociada a *E. bienersi* en pacientes con SIDA puede ocasionar cuadros de estenosis papilar, dilatación de vías biliares, colangitis esclerosante y colecistitis alitiásica (McWhinney y col., 1991; Beaugerie y col., 1992; Pol y col., 1992; Bouche y col., 1993; Pol y col., 1993; Knapp y col., 1996). Muchos de los pacientes con afectación biliar, refieren dolor en hipocondrio derecho y no suelen presentar ictericia. Las exploraciones complementarias (ultrasonografía abdominal y endoscópica, tomografía axial computarizada y ERCP) revelan a menudo dilatación de los conductos biliar común y hepático, irregularidades en la pared de la vesícula biliar como engrosamiento, distensión o la presencia de barro biliar. También se puede encontrar estenosis de papila. Las concentraciones séricas de fosfatasa alcalina, gamma glutamil transferasa y transaminasas suelen elevarse de 2 a 3 veces, pero los niveles de bilirubina permanecen, generalmente, normales. (Bouche y col., 1993; Pol y col., 1993).

La mayoría de infecciones intestinales por microsporidios son causadas por *E. bienersi*. El parásito se localiza a lo largo del intestino delgado, generalmente en la región supranuclear de los enterocitos. La infección es usualmente focal y el número de esporas puede ser pequeño. Por ello varias muestras deben ser examinadas antes de emitir un resultado negativo (Schwartz y col., 1996). En raras ocasiones, se han observado esporas de esta especie en la lámina propia, pero ese hecho no parece presentar un factor de riesgo para la diseminación del parásito (Schwartz y col., 1995). En el tracto biliar, el parásito se ha localizado en células hepáticas no parenquimatosas, en el epitelio de las vías biliares y ocasionalmente en vesícula biliar (Weber y col., 1994a).

La coinfección con otros patógenos intestinales está presente hasta en un tercio de los casos (Weber y col., 1994a), siendo la asociación mas frecuente con *Cryptosporidium* spp. (Garcia y col., 1994; Wuhib y col., 1994). También se ha descrito co-infección con *Giardia intestinalis* (Hewan-Lowe y col., 1997), *Isospora belli* (Rabeneck y vol., 1993) y *Leishmania* sp. (Miró y col., 1994).

El hallazgo de *E. bienewsi* en localizaciones extraintestinales, ha sido descrito en dos ocasiones. Ambos pacientes presentaban cuadro de diarrea crónica y desarrollaron cuadros de afectación pulmonar (Weber y col., 1992b; Hartskeerl y col., 1993; del Aguila y col., 1997b). En uno de ellos, con disnea y tos productiva persistente, el parásito fue identificado en lavado broncoalveolar y en biopsia bronquial en ausencia de otros patógenos pulmonares; se observaron esporas en el interior de macrófagos alveolares y en la región supranuclear del epitelio bronquial. El estudio radiológico mostró infiltrado postero basal y efusión pleural leve en el pulmón izquierdo (Weber y col., 1992b). Posteriormente, el agente fue también identificado en la mucosa del seno maxilar (Hartskeerl y col., 1993). El segundo caso ha sido descrito en España por del Aguila y col. (1997b) en un paciente que presentó fiebre, tos productiva y un patrón radiológico consistente en infiltrados intersticiales difusos bilaterales y en el que se identificó el parásito en esputo y lavado broncoalveolar, junto a *Mycobacterium avium* complex. El tratamiento combinado de ambas infecciones resultó en una rápida mejoría de la sintomatología pulmonar y digestiva.

### *E. intestinalis*

La infección por *E. intestinalis*, provoca principalmente un cuadro intestinal similar al descrito por *E. bienewsi*. En ocasiones afecta colon (Orenstein y col., 1992a; Dore y col., 1995; Gunnarson y col., 1995) y vías biliares (Gunnarson y col., 1995; Franzen y col., 1996c). El parásito, a diferencia de *E. bienewsi*, se localiza además de en los enterocitos, en las células endoteliales, fibroblastos y macrófagos de la lámina propia; favoreciendo la diseminación hacia otros órganos vía linfática y hematogena (Orenstein y col., 1992b; Cali y col., 1993; Dore y col., 1995; Doultree y col., 1995; Field y col., 1993; Sobotka y col., 1995a; Chu y West, 1996) y ha sido recientemente implicado como causante de un cuadro de perforación intestinal (Soule y col., 1997). Han sido descritas infecciones mixtas junto a *E. bienewsi* (Blansard y col., 1992; Van Gool y col., 1994; Field y col., 1995; Sodré y col., 1997).

*E. intestinalis*, además de producir diarrea, es causa frecuente de infección diseminada, afectando particularmente el ri n y las vías urinarias. La leucocituria es un hallazgo común y frecuentemente asociado a polaquiuria y disuria ( Orenstein y col.,

1992b; Cali y col., 1993; Gunnarson y col., 1995; Molina y col., 1995, Visvesvara y col., 1995a; Soule y col., 1997). Sin embargo, comunicaciones recientes sugieren que el completo espectro clínico de las infecciones por *E. intestinalis* aún está siendo descrito y probablemente sea similar al de las otras especies de su género que infectan al hombre.

Se han descrito casos de queratoconjuntivitis, rinitis, sinusitis y bronquitis (Doultree y col., 1995; Gunnarson y col., 1995; Molina y col., 1995; Sobotka y col., 1995a; Didier y col., 1996a; Franzen y col., 1996c; Lowder y col., 1996), prostatitis, cistitis y uretritis purulenta (Molina y col., 1995; Birthishtle y col., 1996; Corcoran y col., 1996; Soule y col., 1997).

### *E. hellem* y *E. cuniculi*

Hasta la década de los noventa, habían sido atribuidas a *E. cuniculi* un caso de hepatitis (Terada y col., 1987) y un caso peritonitis (Zender y col., 1989), aunque la identificación de especie fue confirmada posteriormente. En 1990 y 1991, fueron comunicados seis casos de queratoconjuntivitis por *Encephalitozoon* spp (Friedberg y col., 1990; Lowder y col., 1990; Cali y col., 1991; Yee y col., 1991); y en años sucesivos el agente etiológico identificado en la mayoría de los casos fue *E. hellem* (Didier y col., 1991; Schwartz y col., 1993a), asumiéndose que probablemente, las infecciones descritas con anterioridad eran debidas a las especies más prevalentes: *E. hellem* y *E. intestinalis* (Weber y col., 1994). Esta afirmación contrastaba con la amplia distribución de *E. cuniculi* en varias especies de animales (Canning y Lom, 1986) y con la reciente identificación de *E. cuniculi* en varios casos de microsporidiosis (De Groot y col., 1994; Desplazes y col., 1995; Franzen y col., 1995c; Didier y col., 1996b; Weber y col., 1997). Así pues, podemos estimar que la prevalencia de infección humana por ambas especies debe ser similar.

Ultimamente, continúan siendo descritas infecciones por ambas especies. Las manifestaciones clínicas consecuentes a estas infecciones son muy similares, sugiriendo que a su semejanza morfológica se añade un comportamiento biológico similar, al menos en el hombre. La manifestación clínica inicial y más frecuentemente observada es la queratoconjuntivitis. Los síntomas, incluyen sequedad de ojos, sensación de cuerpo extraño, dolor, lagrimeo, visión borrosa y fotofobia en grado leve a severo (Cali y col., 1991; Metcalfe y col., 1992; Schwartz y col., 1993a; Franzen y col., 1995c; Didier y col., 1996c). No presentan exudado purulento excepto si se acompañan de sobreinfección

bacteriana. La exploración oftalmológica con lámpara de hendidura revela a menudo una característica queratopatía punctata difusa, frecuentemente bilateral, el parásito se localiza en el epitelio corneal y conjuntival (Schwartz y col., 1996). Sin embargo, se han descrito casos de conjuntivitis leve y de colonización asintomática (Schwartz y col., 1993a; Weber y col., 1993a). La ulceración corneal, al contrario de lo observado en las infecciones descritas en pacientes inmunocompetentes es inusual.

La experiencia acumulada en los últimos años, hace pensar que la patología ocular esta asociada a infección diseminada (Terada y col., 1987; Zender y col., 1989; Lacey y col., 1992; Schwartz y col., 1992; Schwartz y col., 1993a; Weber y col., 1993a; De Groote y col., 1995) y la mayoría de los pacientes presentan afectación multiorgánica. Los pacientes, en general, presentan recuentos de linfocitos CD4 bajos y la gravedad del cuadro puede variar desde infección asintomática hasta fracaso renal o respiratorio. Actualmente el espectro clínico de las infecciones por ambas especies incluye: colonización del tracto respiratorio superior causando rinitis (Franzen y col., 1995c), sinusitis (Lacey y col., 1992; De Groote y col., 1995; Franzen y col., 1995c) y poliposis nasal (Lacey y col., 1992); afectación del tracto respiratorio inferior produciendo, bronquiolitis (Schwartz y col., 1993b) neumonía (De Groote y col., 1995; Desplaces y col., 1996) y afectación del tracto genitourinario que se manifiesta como nefritis (De Groote y col., 1995; Orenstein y col., 1992b; Schwartz y col., 1992), cistitis/ureteritis (Schwartz y col., 1992); uretritis y prostatitis (Schwartz y col., 1994b).

Recientemente se han comunicado dos casos de microsporidiosis diseminada con afectación del sistema central debidos a *Encephalitozoon cuniculi* (Mertens y col., 1997; Weber y col., 1997). En uno de ellos se ha descrito por primera vez la afectación del corazón, glándulas adrenales, bazo y ganglios linfáticos por microsporidios (Mertens y col., 1997). También se han comunicado, dos casos de infección gastrointestinal por *E. cuniculi* (Franzen y col., 1995c; Weber y col., 1997) y un caso de hepatitis fulminante por *Encephalitozoon* sp. (Sheth y col., 1997). Es habitual la presencia simultánea de infecciones víricas, bacterianas y/o fúngicas en pacientes con microsporidiosis diseminada.

### **Otras especies**

Infecciones debidas a *Pleistophora* spp. han sido descritas en dos pacientes con sida, asociadas a cuadros de miositis progresiva (Chupp y col., 1993; Grau y col., 1996)

Los casos de infección por *Trachipleistophora hominis* y especies afines, han cursado con mialgia difusa y debilidad muscular o con sintomatología neurológica (convulsiones, alteración del estado mental) (Field y col., 1996; Yachnis y col., 1996).

## **2.4 METODOS DE DETECCION E IDENTIFICACION**

Clásicamente, el diagnóstico de las microsporidiosis humanas se realizaba mediante la observación del parásito en biopsias o muestras biológicas estériles por técnicas de microscopía. Sin embargo, la identificación de la especie implicada requería técnicas de microscopía electrónica de transmisión a fin de observar las características ultraestructurales de los microorganismos (Weber y col., 1994a; Schwartz y Bryan, 1997).

Los métodos serológicos hasta hoy utilizados en el estudio de las microsporidiosis humanas han revelado considerables variaciones en los títulos de anticuerpos detectados, así como, reacciones cruzadas entre antígenos obtenidos de diferentes especies de microsporidios (Bergquist y col., 1984; Hollister y Canning, 1987; Weiss y col., 1992; Van Gool y col., 1996)). Estos resultados no permiten concluir si la presencia de anticuerpos representa una infección actual o pasada o si se debe a reacciones inespecíficas y por ello carecen de utilidad para el diagnóstico.

El diagnóstico de las microsporidiosis humanas se basa en métodos directos de detección del parásito o sus componentes en heces, secreciones, fluidos orgánicos o biopsias. El importante incremento de casos diagnosticados, ha motivado a varios grupos de investigación al desarrollo de métodos alternativos que faciliten por un lado el diagnóstico de la infección, y por otro permitan la identificación de especie. Se expone a continuación un resumen actualizado de todos ellos.

### **2.4.1 Microscopía electrónica de transmisión**

El examen mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), fue durante mucho tiempo, el único método disponible para la identificación de estos microorganismos. La observación de las características ultraestructurales de los microsporidios, permite salvo

contadas excepciones, la identificación definitiva a nivel de especie, La identificación se basa en: morfología de las esporas, formas proliferativas, tipo de división celular y naturaleza de la interfase parásito-célula hospedadora. La MET sigue siendo esencial en estudios taxonómicos, especialmente en la descripción de nuevas especies (Desportes y col., 1985; Cali y col., 1993; Silveira y Canning, 1995; Hollister y col., 1996).

La descripción de los agentes de infección humana, se realizaba clásicamente mediante MET a partir de la observación de los mismos en biopsias de distintos tejidos (Desportes y col., 1985, Cali y col., 1991; Shaddock y col., 1992). Fué realizada con éxito por primera vez en fluidos biológicos por Van Gool y col. (1990), identificando *E. bienewisi* en heces de pacientes con diarrea y por Visvesvara y col. (1991) que diagnosticaron un caso de microsporidiosis diseminada por *Encephalitozoon* spp. mediante el estudio del sedimento urinario. Desde entonces, la detección e identificación de microsporidios en biopsias, heces, orina, aspirado duodenal y biliar, esputo, exudado nasofaríngeo y lavado broncoalveolar ha sido ampliamente relatada (Weber y col., 1993a; Schwartz y col., 1993b; Franzen et al, 1995b; Didier y col., 1996a; Field y col., 1996; Bornay-Llinares y col., 1996; Weber y col., 1997). En general, estas muestras contienen únicamente esporas y la observación de los estadios evolutivos del parásito y de la interfase parásito-huésped, usualmente necesarios para la identificación de especie, sólo se observan en muestras tisulares.

Excepcionalmente, la descripción de nuevas especies morfológicamente idénticas, como *E. hellen* y *E. cuniculi*, hace insuficiente el análisis ultraestructural y requiere el empleo de métodos bioquímicos, inmunológicos y/o moleculares para su identificación a nivel de especie (Didier y col., 1991; De Groote y col., 1995)

#### **2.4.2 Microscopía óptica**

Inicialmente, el diagnóstico de microsporidiosis mediante microscopía óptica se realizaba a partir de biopsias de tejidos (muscular, hepático, conjuntival, corneal, intestinal, etc.) o de líquidos biológicos estériles o poco contaminados (orina, líquido cefalorraquídeo, aspirado duodenal, bilis, etc.) (Weber y col., 1994a). No obstante, el pequeño tamaño de los microorganismos, su localización intracelular, la escasa reacción inflamatoria observada y la afinidad variable de los mismos por los colorantes habitualmente empleados

(especialmente hematoxilina-eosina), dificultaban el diagnóstico de la infección. Por ello se recomienda el uso de las tinciones de Giemsa, Gram (Brown-Breen, Brown-Hopps) o Wartin-Starry, para facilitar la visualización del parásito en tejidos (Field y col., 1993; Schwartz y col., 1996)

Con la descripción de nuevos métodos de tinción, la detección de microsporidios en muestras clínicas mediante microscopía óptica, es suficiente para el diagnóstico de la infección en la mayoría de los casos (Kotler y col., 1994), sin embargo los organismos no pueden ser identificados a nivel de género y especie. El examen de muestras biológicas contaminadas (heces, esputo), junto al examen citopatológico, puede evitar en la mayoría de las ocasiones el empleo de técnicas agresivas para lograr el diagnóstico. (Schwartz y col., 1994a)

En el inicio de la década de los 90, fue descrito el primer método de tinción realmente eficaz para la detección de microsporidios en heces mediante microscopía óptica (Weber y col., 1992a). Los autores lo denominaron tinción tricrómica modificada. Este método fue adaptado a partir de la tinción tricrómica, descrita en 1951 por Wheatley y que se utiliza rutinariamente en el examen parasitológico de heces. La adaptación introducida consistió en aumentar 10 veces la concentración del colorante (chromotrope 2R) en la fórmula original descrita por Wheatley. De ese modo, las esporas exhiben una mayor afinidad por el mismo y aparecen como estructuras ovaladas de color rosa o rojo pálido. Algunas presentan una banda característica que los rodea transversal o longitudinalmente. Esta técnica ha sido desde entonces utilizada como referencia en el diagnóstico de microsporidiosis localizadas y sistémicas (Weber y col., 1994a; Schwart y Ryan 1997).

Posteriormente surgieron varios estudios proponiendo modificaciones en la tinción de Weber. Ryan y col. (1993), disminuyeron la concentración de ácido fosfotúngstico y sustituyeron el fast green por azul de anilina como contracolorante, denominando la tinción Trichrome-Blue. Otros, introdujeron modificaciones en el sentido de acortar el tiempo de tinción que tanto en el método de Weber como en el de Ryan es de 120 minutos. Así, Koskoskin y col. (1994), comprobaron que usando el colorante de chromotrope a 50°C, se podía disminuir el tiempo total del método a 40 minutos sin detrimento de las características tintoriales de las esporas. Otros autores disminuyendo 10 veces la

concentración de chromotrope 2R y sustituyendo el *fast green* por *light green*, redujeron el tiempo de tinción a 30 minutos (Punpoowong y col., 1995).

Un abordaje alternativo para detección de esporas de microsporidios, es el uso de marcadores quimiofluorescentes que se unen inespecíficamente a la quitina de la endospora (Calcofluor White, Fungifluor, Fungiquial, Uvitex 2B y Rylux BA) Uno de estos fluorocromos, Uvitex 2B, fue usado durante años para detectar microsporidios en muestras de tejido en animales (Weir y Sullivan 1989). A partir de 1993, fue descrita su utilidad en el diagnóstico de la microsporidiosis intestinal (Van Gool y col., 1993; Vávra y col., 1993a; Luna y col., 1995), siendo también ampliamente utilizada en muestras de tejido (Van Gool y col., 1993; Vávra y col., 1993b; Franzen y col., 1995b). Este método tiene la ventaja de la rapidez de ejecución (15 minutos); como desventajas podemos citar: la necesidad de un microscopio de fluorescencia, la posibilidad de confusión de las esporas con pequeñas levaduras y la imposibilidad de visualizar la característica banda ecuatorial observada en la tinción de Weber.

Actualmente, la preferencia en la elección del método de detección de microsporidios mediante microscopía óptica es una opción estrictamente personal. Los estudios comparativos realizados demuestran, con mínimas diferencias, un grado de sensibilidad y especificidad muy semejante entre los métodos disponibles (Beauvais y col., 1993; Houze-Savage y col., 1992; DeGirolami y col., 1995; Didier y col., 1995b; Conteas y col., 1996; Ignatius y col., 1997), y concluyen que lo realmente importante es el entrenamiento, en la identificación de estos microorganismos, del personal responsable de la observación microscópica.

Recientemente ha sido descrita una nueva técnica para el diagnóstico de la microsporidiosis (Moura y col., 1996). Estos autores combinaron la distinta afinidad que presentan las esporas de microsporidios a la tinción de Gram con la tinción de chromotrope anteriormente descrita. La técnica ha sido denominada tinción de Gram-chromotrope y se caracteriza por teñir las esporas de una tonalidad violeta que las diferencia de bacterias gram positivas y levaduras. El tiempo de ejecución es corto (11 minutos) y permite la observación del característico cinturón ecuatorial. En el estudio 1 del presente trabajo (página 52), describimos una modificación de esta técnica que reduce el tiempo de

realización a 5 minutos y la aplicación de la misma en diferentes muestras clínicas, especialmente biopsias.

En relación al procesamiento previo de las heces, determinados autores sugirieron que los métodos de concentración no mejoraban la sensibilidad en la detección de microsporidios en heces (Orenstein, 1990; Weber y col., 1992a), sin embargo se han descrito diferentes métodos de concentración que evidencian lo contrario (Van Gool y col., 1990; Van Gool y col., 1993, Van Gool y col., 1994b; Sodré y col., 1995; Carter y col., 1996).

### 2.4.3. Cultivo celular

El cultivo in vitro de microsporidios patógenos para el hombre, ha reportado enormes beneficios, tanto en la comprensión de la relación parásito-huésped, como en el desarrollo de anticuerpos para el diagnóstico clínico. El primer microsporidio aislado de un paciente fue *V. corneae*, denominado en la descripción original como *N. corneum* (Shadduck y col., 1990). El año siguiente se publicaron los primeros aislamientos de *E. hellem* (Didier y col., 1991; Visvesvara y col., 1991). Desde entonces el aislamiento en cultivo de las diferentes especies patógenas para el hombre, a partir de muestras clínicas, es cada vez más frecuente. Van Gool y col (1994a), cultivaron por primera vez, *E. intestinalis* y *E. cuniculi* fue aislado el año siguiente (De Groote y col., 1995). *E. bienewisi* es la única especie que ha sido aislada una sola vez, aunque no pudo mantenerse indefinidamente en cultivo (Visvesvara y col., 1995b). El aislamiento en cultivo de un microsporidio semejante a *Pleistophora* spp. ha permitido identificarlo como una nueva especie patógena para el hombre denominada *Trachipleistophora hominis* (Hollister y col., 1996). En España, hasta el momento sólo se han aislado en cultivo, *E. cuniculi* (Del Aguila y col., comunicación personal). y *Encephalitozoon* spp (Pemán y col., en prensa). El estudio 4 (página 83) relata la caracterización de este aislado y su identificación como *E. hellem*.

Varias líneas celulares para el cultivo de microsporidios a partir de diferentes muestras clínicas han sido empleadas con éxito. Las más utilizadas se presentan en la siguiente tabla.

**Tabla 4. Principales líneas celulares empleadas en el aislamiento de microsporidios a partir de muestras clínicas.**

Línea celular	Especie	Muestra	Referencia
MDKC	<i>V. corneae</i>	Biopsia corneal	Shaddock y col., 1990
	<i>E. hellem</i>	Biopsia corneal y raspado conjuntival	Didier y col. 1991
		Biopsia nasal	Hollister y col., 1993
	<i>E. cuniculi</i>	Orina	Hollister y col., 1995
	<i>E. intestinalis</i>	Aspirado nasal y lav. broncoalveolar	Didier y col., 1996a
	<i>E. bienersi</i>	Aspirado duodenal y biopsia yeyuno	Visvesvara y col., 1995b
	<i>T. hominis</i>	Biopsia muscular	Hollister y col., 1996
E6	<i>E. hellem</i>	Orina	Visvesvara y col. 1991
	<i>E. cuniculi</i>	Orina y esputo	De Groote y col., 1995
	<i>E. intestinalis</i>	Orina	Visvesvara y col., 1995a
HLF	<i>E. hellem</i>	Orina y lavado faríngeo	Scaglia y col., 1994
		Lavado broncoalveolar	Scaglia y col., 1997
	<i>E. cuniculi</i>	Orina y esputo	De Groote y col., 1995
	<i>E. intestinalis</i>	Aspirado nasofaríngeo	Doultree y col., 1995
	<i>E. bienersi</i>	Aspirado duodenal y biopsia yeyuno	Visvesvara y col., 1995b
RK-13	<i>E. hellem</i>	Biopsia nasal	Didier y col., 1991
		Orina y raspado conjuntival	Didier y col., 1996c
	<i>E. intestinalis</i>	Aspirado nasal y lav. broncoalveolar	Didier y col., 1996a
		Heces	Van Gool y col., 1994a
	<i>T. hominis</i>	Biopsia muscular	Hollister y col., 1996

MDCK: derivada de riñón de perro; E6: derivada de riñón de mono; HLF: derivada de fibroblastos fetales humanos; RK-13: derivada de riñón de conejo

Además de las anteriores también han sido usadas con éxito, entre otras: SIRC (ATCTC 60) para *V. corneae*; FBF (fibroblastos fetales bovinos) para *E. hellem* (Scaglia y col., 1997); COS-1 (derivadas de riñón de mono), L6-C10 (mioblastos de músculo esquelético de rata), G-7 (mioblastos de ratón) para *T. hominis* (Hollister y col., 1996); Vero (ATCC CCL 81), I 047 (ATCC CCL 5), Caco-2 (ATCC HTB- 37) y HT-29 (ATCC HTB 38), para *E. intestinalis* (Didier y col., 1996a).

La experiencia indica que el cultivo de microsporidios a partir de muestras clínicas es técnicamente posible. Con la comercialización de líneas celulares, especialmente empleadas para el aislamiento de virus (ej. MRC-5, derivada de fibroblastos fetales

humanos), el aislamiento de microsporidios deberá ser más frecuente, una vez que se reconozca el efecto citopático característico y se mantengan los cultivos el tiempo necesario para permitir el desarrollo de los mismos.

Aunque no es el método de elección para el diagnóstico clínico, el cultivo de microsporidios de pacientes ha facilitado: el estudio de sus características ultraestructurales, la producción de anticuerpos específicos y la obtención de abundante material genómico para análisis molecular de los diferentes aislados. El conocimiento adquirido, ha permitido desarrollar técnicas inmunológicas y moleculares útiles para el diagnóstico que pueden ser empleadas en estudios epidemiológicos y taxonómicos.

#### **2.4.4 Métodos inmunológicos**

La identificación a nivel de especie en patología humana, permite instaurar un tratamiento adecuado y emitir un juicio pronóstico.

El alto grado de reacción cruzada entre distintas especies de microsporidios usando suero policlonal de conejo inmunizado con una de ellas, es un hecho documentado (Niederhorn y col., 1980), indicando la presencia de antígenos comunes entre especies.

En los últimos años, distintos grupos de investigación han producido y caracterizado anticuerpos poli y monoclonales que reconocen antígenos propios de género o especie. Este hecho representa un gran avance en el desarrollo de métodos de diagnósticos y una excelente herramienta para estudios epidemiológicos. Es más, algunos de ellos, permiten identificar especies morfológicamente idénticas (Didier y col., 1991)

Varios de los anticuerpos policlonales descritos, presentan alto grado de reacción cruzada entre distintos microsporidios y otros microorganismos (bacterias y hongos) (Didier y col., 1991; Weis y col., 1992; Aldras y col., 1994; Zierdt y col., 1993). Otros, sin embargo, han mostrado su utilidad en la detección e identificación específica de *E. hellem* (Schwartz y col., 1992, Weber y col., 1993a), *E. cuniculi* (De Grotte y col., 1995) y *E. intestinalis* (Visvesvara y col., 1995; Sodré y col., 1997) en muestras clínicas mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y en organismos aislados en cultivo celular mediante IFI y western blot (WB) (Didier y col., 1991, Visvesvara y col., 1991). Está claramente demostrado que determinadas especies comparten antígenos comunes (van Gool y col., 1997), no obstante el estudio de diferentes aislados mediante WB, puede permitir en el

futuro, la identificación y purificación de antígenos característicos de las diferentes especies (Croppo y col., 1993; Croppo y col., 1997; del Aguila y col., en prensa).

El uso de anticuerpos monoclonales (AcMc) debería permitir una mayor discriminación entre géneros y especies de microsporidios; no obstante, algunos de ellos también presentan reacciones inespecíficas. Así, tres de ellos denominados C12, E9 y E11, obtenidos tras inoculación con *E. hellem*, mostraron un alto grado de reactividad cruzada con *E. bienewisi*, *E. cuniculi* y *S. intestinalis* (Aldras y col., 1994). En 1997, Enriquez y col. describieron un AcMc denominado 3B6 que reconoce epitopos presentes en la exoespora del género *Encephalitozoon*, estos AcMc no son de utilidad para el diagnóstico de especie aunque pueden ser utilizados como técnica de selección en estudios epidemiológicos (Enriquez et al, 1997, en prensa). El primero de ellos utilizado para la identificación de *E. hellem* denominado ED4H10B11/B12, no mostró reacción cruzada con *E. bienewisi* ni con *V. cornea*; sin embargo se observó un cierto grado de reacción con *E. cuniculi* si se utilizaba a una dilución menor de 1:128 (Visvesvara y col., 1994). Finalmente, se han descrito dos AcMc específicos para *E. intestinalis* (Beckers y col., 1996), Mab Si91 que reacciona exclusivamente con el tubo polar extruido de esporas maduras y Mab Si13 que reconoce esporas maduras y esporontes en formación. Estos anticuerpos no presentan reacción cruzada con *E. hellem*. Mediante la técnica de IFI combinando ambos anticuerpos, se identificaron esporas en orina, lavado broncoalveolar, biopsias y exudado nasal de un paciente, sin embargo la utilización de estos AcMc en heces precisa un pretratamiento de las mismas (Beckers y col., 1996).

Ombrouck y col. (1996) describieron un método de doble marcaje fluorescente usando primero un marcador quimioluminiscente y seguidamente un anticuerpo especie-específico con el objetivo de detectar infecciones mixtas por microsporidios.

En el estudio 3 (página 74) demostramos la utilidad del método de IFI utilizando un suero policlonal anti-*E.intestinalis* (Visvesvara y col., 1995a) en la detección e identificación de esta especie en muestras fecales conservadas en formalina al 10% y ensayamos el método descrito por Ombrouck y col. (1996).

No obstante, ninguno de los antisueros descritos está disponible comercialmente, ni ha sido empleado en el desarrollo de métodos para la detección de antígenos.

#### 2.4.5 Métodos moleculares

Estudios sobre taxonomía molecular de microsporidios (Vossbrink y col., 1987) mostraron que la secuencia del gen que codifica el SSU-rRNA de los mismos, presenta una homología limitada con otros organismos eucariotas. Este dato sugiere que los microsporidios son organismos muy antiguos en el desarrollo evolutivo. Zhu y col. (1993a, b y c) utilizando las secuencias conservadas del SSU-rRNA y la secuencia de RNA ribosomal de *Vairimorpha necatrix* (Vossbrink y col., 1987), fueron capaces de amplificar mediante reacción en cadena por la polimerasa (PCR) y seguidamente clonar y secuenciar el SSU-rRNA de *E. bienewisi* (Zhu y col., 1993a) y *E. intestinalis* (Zhu y col., 1993b). La secuencia de estos genes, permitió desarrollar métodos de detección específica en muestras de tejidos procedentes de individuos infectados (Zhu y col., 1993c)

En los últimos años, han sido descritos una amplia variedad de iniciadores para el diagnóstico específico de microsporidios en muestras clínicas (tabla 5).

Las diferencias entre técnicas, además de los iniciadores, se observan en los diferentes métodos de extracción y en los métodos de análisis utilizados para caracterizar los productos amplificados tras PCR y nested-PCR. La mayoría de ellos, utilizan la electroforesis en gel de agarosa y visualización mediante bromuro de etidio directamente de los productos amplificados, han sido usadas también: la digestión previa con enzimas de restricción, y southern blot (Fedorko y col., 1995).

La aplicación de las técnicas de PCR en muestras clínicas está condicionada en gran medida a la naturaleza de la muestra empleada. Su eficacia en la detección e identificación de especie ha quedado demostrada en microsporidios procedentes de cultivo (Visvesvara y col., 1994; De Groote y col., 1995; Fedorko y col., 1995; da Silva y col., 1996; da Silva y col., 1997a) y de diferentes muestras clínicas incluyendo: biopsias (Zhu y col., 1993c; Franzen y col., 1995a; Coyle y col., 1996; da Silva et al; 1996; Velasquez y col., 1996; da Silva y col., 1997a; Kock y col., 1997), orina (Franzen y col., 1996c), lavado broncolalveolar (Visvesvara y col., 1994), esputo (Franzen y col., 1996b; del Aguila y col., 1997b), aspirado duodenal y biliar (Franzen y col., 1996a; da Silva y col., 1996; Velasquez y col., 1996) y heces (Fedorko y col., 1995; Velasquez y col., 1996; da Silva y col., 1997b; Liguory y col., 1997; Kock y col., 1997; Ombrouck y col., 1997). La detección de *E.*

*intestinalis* en sangre, mediante PCR, solo se ha comunicado en una ocasión (Franzen y col., 1996d).

**Tabla 5.** Iniciadores más empleados en el diagnóstico de las microsporidiosis humana mediante reacción en cadena por la polimerasa (PCR).

Iniciadores	Designación	Especificidad	Am (pb)	Referencias
5'-GAAACTTGTCCTCTTACG-3' 5'-CCATGCACCACTCCTGCCATT-3'	EBIEF1 EBIER1	<i>E. bienewisi</i>	607	Da Silva y col., 1996
5'-TGAGAAAGTAAGATGTTTAGCA-3' 5'-GTAAAAACACTCTCACACTCA-3'	EHEF EHER	<i>E. hellem</i>	547	Visvesvara y col., 1994
5'-ATGAGAAGTGATGTGTGTGCG-3' 5'-TGCCATGCACACAGGCATC-3'	ECUF ECUR	<i>E. cuniculi</i>	549	Visvesvara y col., 1994
5'-CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC-3' 5'-CTCGCTCCTTACACTCGAA-3'	V1 SI500	<i>S. intestinalis</i>	375	Zhu y col., 1993b
5'-TCAGTTTGGGTGTGGTATCGG-3' 5'-GCTACCCATACACATCATT-3'	Eb. Gc Eb. Gt	<i>E. bienewisi</i>	210	Velasquez y col., 1996
5'-TTTCGAGTGTAAGGAGTCGA-3' 5'-CCGTCCTGCTTCTCCTGCCCG-3'	SINTF1 SINTR	<i>E. intestinalis</i>	520	Da Silva y col., 1997a
5'-GGGGGCTAGGAGTGTTTTG-3' 5'-CAGCAGGCTCCCTCGCCATC-3'	Set 3	<i>E. intestinalis</i>	930	Liguory y col., 1997
5'-GCCTGACGTAGATGCTAGTC-3' 5'-ATGGTTCTCCAACCTGAAACC-3'	Set 2	<i>E. bienewisi</i>	1265	Liguory y col., 1997
5'-CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC-3' 5'-ACTCAGGTGTTATACTCAGCTC-3'	V1 EB450	<i>E. bienewisi</i> <i>E. hellem</i>	353	Zhu y col., 1993a
5'-CCAGGUTGATUCTGCCUGACG-3' 5'-TUACCGCGGCUGCUGGCAc-3'	Mic3U Mic421U	<i>E. bienewisi</i> <i>E. hellem</i> <i>E. cuniculi</i> <i>E. intestinalis</i>	410 433 419 421	Kock y col., 1997
5'-AAGGAGCCTGAGAGATGGCT-3'	Mic266			
5'-CAATTGCTTCACCCTAAGGTC-3' 5'-GACCCCTTTGCACTCGCACAC-3' 5'-TGCCCTCCAGTAAATCACAAC-3' 5'-CCTCCAATCAATCTCGACTC-3'	Eb379 Ec378 Eh410 Ei395	<i>E. bienewisi</i> <i>E. cuniculi</i> <i>E. hellem</i> <i>E. intestinalis</i>	132 113 134 128	
5'-CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC-3' 5'-CCTCTCCGGAACCAAACCTG-3'	PMP1* PMP2	<i>E. bienewisi</i> <i>E. hellem</i> <i>E. cuniculi</i> <i>E. intestinalis</i>	250 268 270 279	Fedorko y col., 1995

\* La secuencia de nucleótidos del primer PMP1 es idéntica a la del primer V1

El mayor grado de dificultad se ha encontrado en muestras de heces. Varios autores han publicado diferentes métodos de extracción de DNA de microsporidios en heces (Fedorko y col., 1995; Velazquez y col., 1996; da Silva y col., 1997b; Kock y col., 1997; Ombrouck y col., 1997). Las estrategias usadas incluyen: la simple ebullición de la muestra

(Ombrouck y col., 1997), la digestión de la muestra seguida de extracción mediante fenol-cloroformo y precipitación con etanol (Fedorko y col., 1995; Velasquez y col., 1996), el uso durante el procedimiento de perlas de vidrio para provocar la rotura de las esporas (Fedorko y col., 1995; da Silva y col., 1997b; Coyle y col., 1996) y el uso de sales caotrópicas (Liguory y col., 1997; Kock y col., 1997).

La aplicación de PCR en estas muestras, debe realizarse con precaución para evitar los resultados falsos negativos. Dos variables deben tomarse en cuenta: 1) la concentración de esporas viables en la muestra y 2) la presencia de inhibidores de la PCR. Cuando la concentración de DNA extraído es baja, la amplificación se producirá, únicamente cuando se emplee una cantidad suficiente en la reacción. Por otro lado, en muestras que presenten inhibidores, la amplificación sólo se produciría tras la dilución de los mismos. En el estudio 2 (página 65), describimos un nuevo método de extracción de DNA en heces aplicable en el diagnóstico específico de la microsporidiosis intestinal.

### **3.5 TRATAMIENTO**

La experiencia que disponemos en el tratamiento de las microsporidiosis humanas es limitada. Prácticamente todos los casos y series publicados presentan pacientes VIH severamente inmunosuprimidos y no se tienen resultados de estudios doble ciego de tratamiento comparado con placebo.

La evaluación de drogas *in vitro* y los ensayos terapéuticos en animales de experimentación son limitados. (Canning y Lom, 1986; Canning 1993).

#### **Infecciones gastrointestinales**

Los intentos iniciales de tratamiento en cuadros producidos por *E. bienersi*, tuvieron un éxito limitado. Resultados preliminares indicando mejoría clínica en pacientes tratados con metronidazol (Eeftink Schattenkerk y col., 1991), no pudieron ser posteriormente confirmados (Weber y col., 1994a). Azitromicina (Dore y col., 1995), atovaquona (Dieterich y col., 1994) y otros antibióticos y antiprotozoarios han sido utilizados sin éxito (Dieterich y col., 1994). Observaciones recientes han mostrado que el

tratamiento con albendazol, disminuye la intensidad de la diarrea a la vez que se observa un aumento de peso en algunos pacientes, a pesar de que los parásitos siguen presentes en biopsias de intestino delgado y se siguen detectando esporas en las muestras de heces obtenidas tras tratamiento (Blanshard y col., 1992; Asmuth y col., 1994; Wanke y Mathia, 1993; Dieterich y col., 1994). No obstante, la excreción esporádica de esporas de *E. bienewisi*, con mejoría intermitente de la diarrea ha sido observada sin ninguna intervención terapéutica y nunca se ha demostrado la cura espontánea o la completa erradicación del parásito tras el tratamiento (Weber y col., 1994c).

Más recientemente, se sugiere que la furazolidona puede ser útil en el tratamiento de diarrea por *E. bienewisi*. Tres pacientes fueron tratados (100 mg, cuatro veces por día durante 20 días), la diarrea cesó tras 12 días de tratamiento, y no se detectaron esporas en las muestras de heces; sin embargo un paciente recayó (Dionisio y col., 1995). Basándose en que la talidomida reduce el factor de necrosis tumoral, investigadores británicos trataron 12 pacientes con talidomida (100 mg por la noche durante 3 semanas). En ellos se evidenció un descenso en el número de deposiciones, transición de las heces de líquidas a semisólidas y detención en la pérdida de peso; un paciente recayó (Sharpstone y col., 1995).

Otro estudio reciente sugiere el uso de atovaquona. Investigadores en Atlanta GA (USA), monitorizaron una serie de 8 pacientes (750 mg 3 veces al día, un mínimo de 4 semanas). La diarrea cesó en todos ellos y además experimentaron un aumento de peso, sin embargo el control parasitológico tras el tratamiento, demostró esporas en las heces de los pacientes y en algunos casos en biopsia intestinal. Parece pues que el control de la diarrea y otros síntomas gastrointestinales depende del mantenimiento de la droga (Anwar-Bruni y col., 1996).

El tratamiento de las infecciones gastrointestinales causadas por *E. intestinalis*, es idéntico al recomendado en las infecciones diseminadas y se expone a continuación.

### **Infecciones diseminadas**

Observaciones preliminares del posible tratamiento curativo de las infecciones causadas por *E. intestinalis* y *Encephalitozoon* spp. con albendazol han permitido acumular un buen número de comunicaciones confirmando la eficacia de esa droga (Lecuit y col.,

1994; Dore y col., 1995; Sobottka y col., 1995a; Corcoran y col., 1996; Wanke y col., 1996). Varias comunicaciones de casos aislados de infección por *E. intestinalis* han descrito la cura clínica y parasitológica con una dosis de 400 mg por vía oral 2-3 veces al día, durante 2 semanas a 3 meses en casos de sinusitis, keratoconjuntivitis, enteritis y uretritis (Wanke y col., 1996; Sobottka y col., 1995a; Corcoran y col., 1996; Joste y col., 1996). Igualmente series entre 2 y 7 casos con infección diseminada por *E. intestinales* han usado 400 mg de albendazol dos veces al día durante un periodo de 2 a 3 semanas con éxito. En la mayoría de los casos una mejoría clínica se acompañó de una reducción en la carga parasitaria o de cura parasitológica. En otras la interrupción del tratamiento y la recidiva de la infección, requirió la institución del tratamiento. Fallos en el tratamiento son raros (Dore y col., 1995; Gunnarsson y col., 1995; Molina y col., 1995)

Los resultados observados en las infecciones por *E. hellem* y *E. cuniculi* son esencialmente las mismos y la respuesta al tratamiento con albendazol es generalmente buena (Visvesvara y col., 1994; de Groote y col., 1995; Deplazes y col., 1996; Didier y col., 1996c), habiéndose relatado un único fracaso terapéutico en un paciente con microsporidiosis pulmonar causada por *E. hellem* (Scaglia y col., 1997).

### **Infecciones oculares**

El primer tratamiento con éxito de un caso de infección corneal por *E. hellem* se relató en un paciente tratado con itraconazol (Yee y col., 1991), pero este resultado no pudo ser comprobado posteriormente (Diesenhouse y col., 1993). Esta droga no ha sido capaz de prevenir la infección por *E. bienewisi* en pacientes VIH (+) (Albrecht y col., 1995a).

McCluskey y col. (1995) han descrito un caso de queratoconjuntivitis con respuesta al tratamiento con isotionato de dibromopropimidina.

El tratamiento tópico con fumagilina consiguió una mejoría de la sintomatología y una reducción de los signos clínicos de infección en pacientes con queratoconjuntivitis debidas a *Encephalitozoon* spp. (Diesenhouse y col., 1993; Rosberger y col., 1993; Garvey y col., 1995; Didier y col., 1996a). A pesar de no erradicar el parásito, esta droga reduce la infección por microsporidios en abejas infectadas (Ketznelson y Jamieson, 1952) e inhibe la replicación de *Encephalitozoon* spp. en cultivo celular (Canning y Hollister, 1992) y en infección experimental en conejos (Shaddock, 1980). Una situación similar se observa

durante el curso del tratamiento en humanos, donde la constante es la persistencia del parásito y la recidiva de la sintomatología clínica tras la suspensión del mismo (Diesenhouse y col., 1993; Rosberger y col., 1993). Se han relatado casos de cura espontánea (Weber y col., 1993a) y tras tratamiento combinado con albendazol por vía sistémica (Didier y col., 1996c).

Así pues podemos concluir que actualmente el tratamiento de elección en infecciones debidas a *Encephalitozoon* spp. y *E intestinalis* es la administración de albendazol. La indicación del tratamiento no dependerá de la presencia o no de sintomatología ocular, ya que las infecciones producidas por ellos, se presentan casi siempre de forma sistémica y raramente, si es que alguna, limitada a esta localización. El tratamiento deberá mantenerse hasta confirmar la cura parasitológica.



***ESTUDIOS EXPERIMENTALES***





---

***ESTUDIO 1***

## **“QUICK-HOT” GRAM-CHROMOTROPE. UN NUEVO METODO DE TINCIÓN PARA LA DETECCIÓN DE MICROSPORIDIOS EN MUESTRAS CLÍNICAS.**

### **Objetivos**

El presente estudio tuvo como objetivos: 1) optimizar el método de tinción de Gram-chromotrope (Moura et al., 1996) y 2) evaluar las características morfotintoriales de microsporidios y otros microorganismos en muestras clínicas, especialmente muestras de tejido embebidas en parafina.

### **Material y métodos.**

#### **Muestras.**

Se emplearon las siguientes muestras conteniendo microsporidios:

1) Sobrenadantes de cultivos celulares de *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* y *V. corneae*. 2) Muestras clínicas incluyendo: heces, aspirado duodenal, bilis, orina, exudado conjuntival, lavado broncoalveolar, esputo y exudado nasofaríngeo. 3) Secciones de tejido formolizadas e incluidas en parafina conteniendo esporas de *E. bieneusi*, *E. cuniculi*, *E. hellem* y *E. intestinalis*.

También fueron procesadas una amplia variedad de muestras clínicas: heces, preparaciones citológicas y muestras histológicas, conteniendo: bacterias gram positivas y gram negativas, *Histoplasma capsulatum*, *Mycobacterium avium-intracelulare* y *Cryptosporidium parvum* para determinar sus características tintoriales. En todos los casos fueron realizadas tinciones control mediante las técnicas de Gram, chromotrope (Weber y col., 1992), y/o Steiner, para garantizar la presencia de microsporidios en las muestras.

#### **Optimización del método.**

Para escoger la concentración óptima de colorante, el tiempo de tinción y la temperatura apropiada, se utilizaron 8 muestras positivas conteniendo microsporidios. Las concentraciones de chromotrope 2R empleadas, fueron 0.3, 0.6, 1, 3, 4.5 y 6 g %. Los tiempos de tinción para las soluciones de cristal violeta y lugol, fueron de 5, 15, 30 y 60 segundos y para la soluciones de chromotrope de 30 segundos, 1, 2, 5, 30, 60 y 90 minutos.

## Evaluación del método.

Se escogió la combinación óptima entre las diferentes concentraciones y tiempos de coloración (apéndice, pág. II), que fue utilizada en el presente estudio. Las coloraciones se realizaron utilizando un aparato denominado Slide Stainer (Boeckel Scientific Inc, Feasterville, Pa, USA) diseñado para realizar tinciones de Gram y Giemsa. Las preparaciones histológicas, fueron desparafinizadas y rehidratadas mediante el método habitual (apéndice, pág. I).

Todas las preparaciones fueron teñidas con la tinción quick-hot Gram-chromotrope, montadas y codificadas. El exámen de las muestras se realizó por tres observadores que informaron la presencia o ausencia de esporas de microsporidios en las muestras estudiadas. En las muestras con microsporidios, los resultados se compararon con las preparaciones control procesadas mediante las tinciones de Gram (muestras de biopsia y necropsia y preparaciones citológicas), Steiner (muestras de biopsia y autopsia) y chromotrope (Weber y col., 1992) (muestras de cultivo celular y heces)

## Resultados.

Entre todas las combinaciones resultantes de variar las concentraciones de los distintos colorantes y tiempos de incubación, se escogió: cristal violeta 1% durante 30 segundos; lugol durante 30 segundos y chromotrope 1% durante 1 minuto. Siendo estas las condiciones necesarias para reducir el tiempo total de tinción, sin detrimento de las características tintoriales de los microsporidios. Para las preparaciones histológicas los tiempos se incrementaron en 30 segundos en todos los pasos.

En todas las preparaciones examinadas, hubo absoluto consenso entre los tres examinadores, coincidiendo al informar ausencia o presencia de microsporidios.

En las muestras procedentes de cultivo, las esporas se tiñen en una gama que va del rosa-violeta al violeta intenso, con un fondo claro (Figura E1.1). Algunas esporas presentan gránulos gram positivos en su interior que pueden ser considerados como diagnósticos junto a la característica banda ecuatorial que caracteriza la apariencia microscópica de algunas esporas. Se observaron algunas diferencias relacionadas con la calidad de la coloración entre los diferentes géneros y especies de microsporidios estudiados. Las esporas de *E. cuniculi*, *E. hellem* y *E. intestinalis* aparecen de color violeta y

uniformemente teñidas (figura E1.1: A,B y C). Las esporas de *Vittaforma corneae*, muestran prominentes gránulos gram positivos, se tiñen con menor intensidad con el cristal violeta y son ligeramente menores y más estrechas (figura E1.1: D).

En las extensiones citológicas, las esporas se tiñen de rosa-violeta a violeta intenso, aparecen también gránulos positivos y algunas esporas presentan la típica banda ecuatorial. Los detalles citológicos de las células pueden apreciarse mediante esta tinción (Figura E1.1 E y H).

En muestras de heces, las esporas de microsporidios se tiñen de color violeta intenso sobre un fondo relativamente claro (Figura E1.1 K y L), en contraste con la tinción de chromotrope (Figura E1.1 J) en la que la coloración es más tenue. Por ello, las esporas de *E. bienersi* y *E. intestinalis* pueden incluso ser tentativamente distinguidas de acuerdo a su tamaño. Las levaduras presentes habitualmente en estas muestras se tiñen de color rosa a rojo y son fácilmente diferenciadas de las esporas de microsporidios. Las bacterias gram negativas no se tiñen y las gram positivas, toman la coloración habitual, haciendo difícil su confusión con microsporidios.

En todas las preparaciones histológicas, los organismos fueron fácilmente visualizados a bajo aumento (200 x), incluso en biopsias de mucosa intestinal en las que el número de esporas era pequeño. El patrón de coloración observado fue de rojo-violeta a violeta oscuro, y en muchas de las esporas el característico cinturón ecuatorial fue claramente visualizado. La coloración de fondo de esta tinción en muestras de tejido, permitió la localización anatómica de los parásitos y la identificación de las células parasitadas (Figuras E1.2, E1.3 y E1.4). Los núcleos de las células se tiñen variablemente gris-violeta, azul a rojo; el tejido intersticial azul claro y los eritrocitos rojos. Las esporas de *E. bienersi* y *E. intestinalis* en biopsias de intestino delgado, se observaron como estructuras ovoides y mostraron una gama de coloración de rosa al violeta intenso. (Figura E1. 2: A, C, D y F).

Las muestras de tejido conteniendo otros microorganismos, mostraron patrones tintoriales diferentes a los descritos para los microsporidios. Las levaduras se observaron con una pared celular azul y núcleo rosa, las bacterias de rosa a violeta y criptosporidium de azul claro a rosa (Figura E1.3 A y B).

## Discusión.

El diagnóstico de las microsporidiosis humanas se basa en la identificación de las características esporas en muestras clínicas. No obstante, la detección de las mismas, requiere el uso de métodos de tinción apropiados y un adecuado tiempo de observación. No es de extrañar por ello que esporas que miden de 1 a 3  $\mu\text{m}$  puedan pasar desapercibidas incluso a microscopistas bien entrenados.

Durante los últimos años han sido descritas numerosas técnicas de identificación de esporas en muestras clínicas (Weber y col., 1992a; Beauvais y col., 1993; Ryan y col., 1993; García y col., 1994; van Gool y col., 1994b; Koskokin y col., 1994; Luna y col., 1995; Moura y col., 1996).

El avance sin duda más importante fue el desarrollo de la tinción chromotrope 2R-modificada (Weber y col., 1992), que permite la tinción diferencial de las esporas de microsporidios con otras estructuras similares. Este método fue rápidamente adoptado como tinción de referencia para estos parásitos. Mediante esta técnica, las esporas aparecen como pequeñas estructuras ovoides de color rosa tenue, con una banda característica atravesando ecuatorialmente a la espora. Las bacterias y otros elementos presentes en heces se tiñen de verde claro, facilitando así la visualización de las esporas. Sin embargo, el tiempo de tinción es largo (120 minutos), y el color de las esporas es, a veces, sutil. Entre las modificaciones aparecidas a partir de la técnica habitual, destacan la de Ryan y col. (1993), que disminuyó la concentración de ácido fosfotúngstico de 0.7 a 0.25 g y sustituyó el fast green por azul de anilina, consiguiendo un fondo más claro y mejorando la luminosidad de las esporas. Otra modificación de la técnica de Weber consistente en usar la solución de chromotrope 2R caliente (50°C), consiguió reducir el tiempo de tinción de 120 a 40 minutos (Koskokin y col., 1994).

La tinción chromotrope de Weber ha sido empleada también para identificar esporas en cortes de tejidos (Giang y col., 1993), aunque los anatomopatólogos usan generalmente variaciones de la tinción de Gram para tejido (Brown & Brenn o Brown & Hopps) debido a la mayor intensidad y contraste de esta tinción en tejido. Así pues la tinción de Gram puede ser usada para detección de esporas de microsporidios en tejido o en muestras clínicas estériles o que presenten una baja contaminación bacteriana. Sin embargo, es totalmente

ineficaz para detectar esporas de microsporidios en muestras de heces donde no se podrían diferenciar de bacterias gram positivas.

Las esporas de microsporidios, incluyendo las de las especies que infectan al hombre, poseen afinidad por la tinción de Gram. Partiendo de esta premisa, Moura y col. (1996) desarrollaron esta nueva técnica que combina las tinciones de Gram y chromotrope, consiguiendo resaltar las características diferenciales propias de estas esporas. Las esporas maduras de *E. hellem* y *E. cuniculi* de cultivo celular o de muestras clínicas, son gram positivas o poseen gránulos gram positivos (Schwartz y col., 1996; Moura y col., 1996) y aunque similar comportamiento presentan las esporas de *E. bienersi*, esta especie muestra generalmente una gran variabilidad en relación a la tinción de Gram (Weber y col., 1994a; Schwartz y col., 1996), pudiendo aparecer como gram positivas, gram negativas o gram intermedias (Schwartz y col., 1993a). Esta observación puede deberse a un exceso en la etapa de decoloración y/o al estado de madurez biológica de la espora. Las esporas maduras tienden a ser claramente gram positivas, mientras que las esporas inmaduras y los esporoblastos, son gram intermedios o negativos.

En el desarrollo del presente método, que combina las tinciones de Gram y chromotrope 2R, se eliminó la contracoloración con safranina en la primera tinción. Esto evita que el fondo se tiña de rojo, manteniendo la característica coloración violeta de las esporas. Las esporas se tiñen de color violeta intenso y mantienen los característicos gránulos gram positivos, sobre un fondo relativamente limpio, en función del origen de la muestra. Las particulares características morfo-tintoriales de las esporas (Weber y col., 1992), incluyendo la típica banda ecuatorial, aparecen realzadas. Es más, las esporas pueden ser fácilmente visualizadas incluso cuando se presentan en bajo número. El tiempo de tinción se disminuyó drásticamente de 120 a 11 minutos (Moura y col., 1996)

Para facilitar aún más la implantación de la técnica en la rutina de laboratorios clínicos, el procedimiento fue modificado calentando varios de sus componentes entre 50 y 55°C. Los resultados demostraron una perfecta coloración de las esporas en todas las muestras clínicas estudiadas y una reducción del tiempo de tinción a solo 5 minutos. Para ello se recomienda usar aparatos de tinción termoregulables o simplemente introducir los colorantes en jarras de Couplin al baño maría a la temperatura descrita..

Una importante ventaja de la tinción es que la variabilidad inherente que algunas esporas de microsporidios presentan en la tinción de Gram, se minimiza al contracolorear con la solución de chromotrope y aunque algunas esporas pueden aparecer de color rosa-rojo, pueden ser fácilmente detectadas.

Otra aportación del método, es su aplicación en el estudio histopatológico, donde empleando las tinciones de Gram y especialmente la de chromotrope, los tejidos aparecen pálidos y usualmente mal definidos. El método aquí descrito tiñe claramente los tejidos. Esta característica facilita la identificación de células específicamente susceptibles a la infección por estos parásitos (ej. enterocitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliales y endoteliales), permitiendo definir infecciones de carácter invasivo.

Por todo ello, podemos afirmar que el método de quick-hot Gram-chromotrope, es un método rápido, sencillo y eficaz para el diagnóstico de las microsporidiosis humanas.



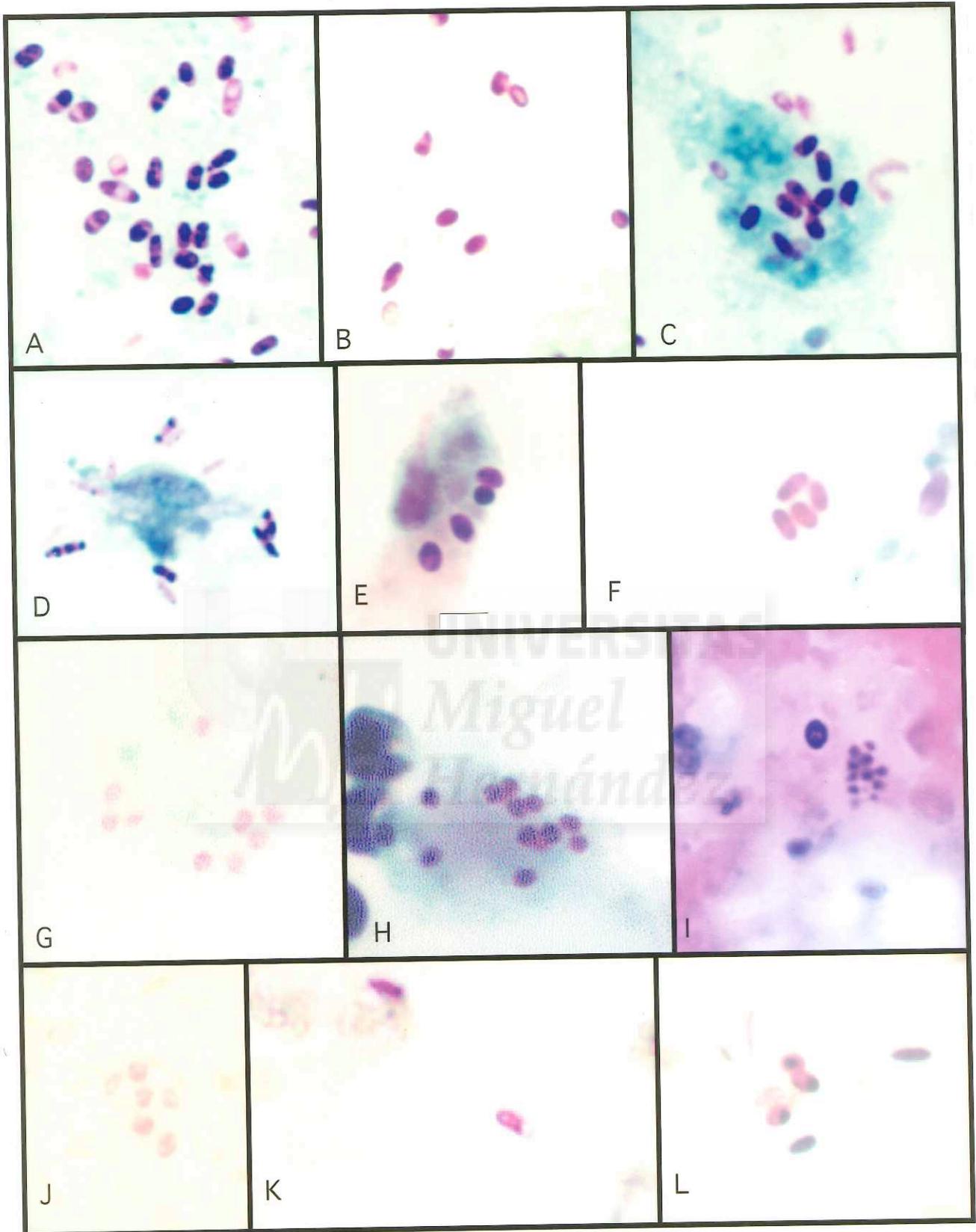


Figura E1.1. Tinción de "quick-hot" Gram-chromotrope.

**Figura E1.1 (continuación). Características morfológicas y tintoriales de diferentes especies de microsporidios en cultivo celular y en muestras clínicas (observación original 1000x).**

**A – D:** esporas de microsporidios en cultivo celular; *E. cuniculi* (A); *E. hellem* (B); *E. intestinalis* (C); *V. corneae* (D).

**E:** esporas de *E. hellem* en exudado conjuntival.

**F:** esporas de *E. cuniculi* en orina.

**G:** esporas de *E. bieneusi* en esputo (Tinción de chromotrope).

**H:** esporas de *E. bieneusi* en esputo.

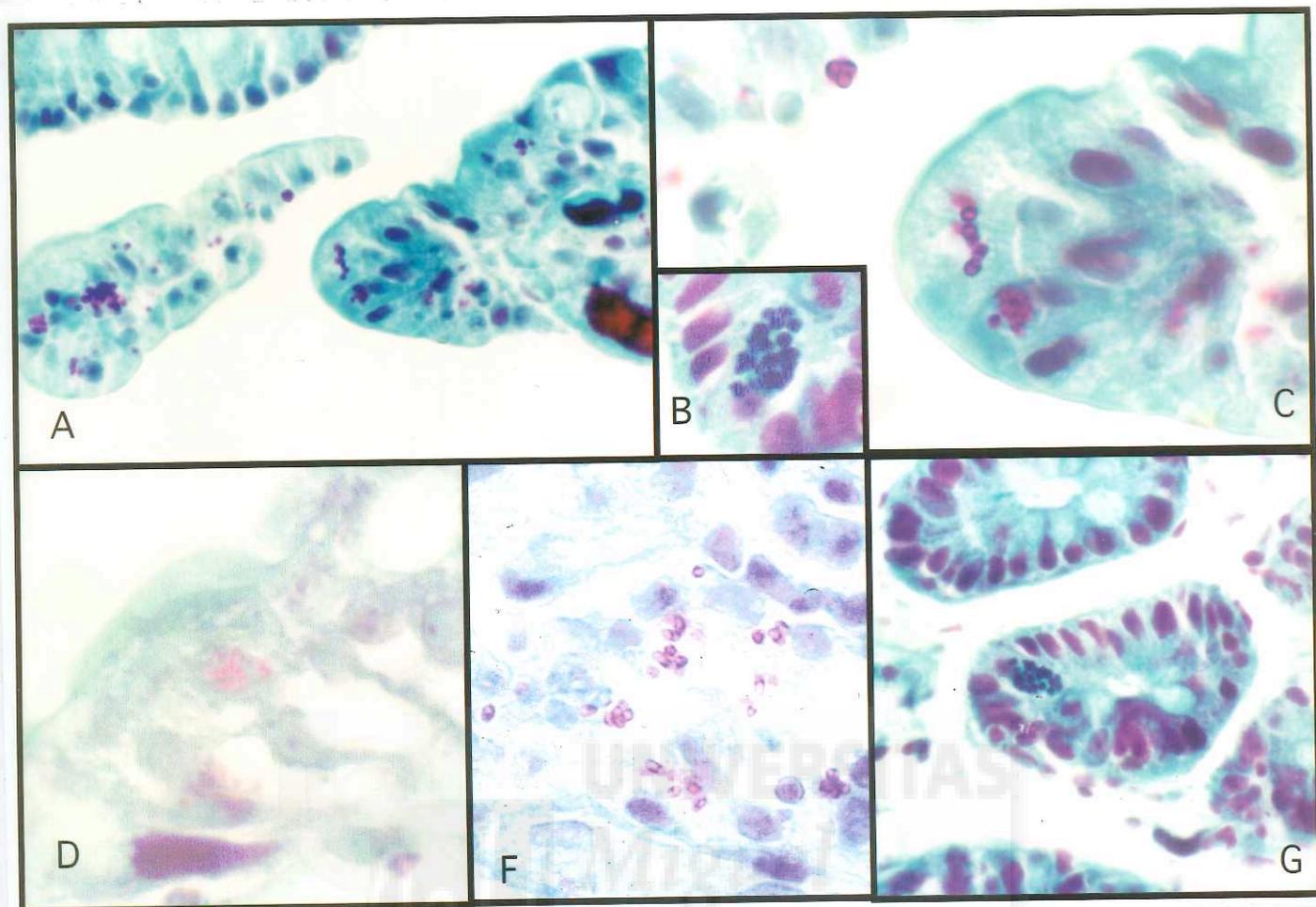
**I:** esporas de *E. hellem* en lavado broncoalveolar. Se observan las diferencias morfológicas y tintoriales con cocos gram positivos.

**J:** esporas de *E. bieneusi* en heces (Tinción de chromotrope).

**K:** esporas de *E. intestinalis* en heces.

**L:** esporas de *E. bieneusi* en heces.





**Figura E1.2. Tinción de “quick-hot” Gram-chromotrope. Afectación intestinal por microsporidios.**

A, C y F: características morfotintoriales de *E. intestinalis* en biopsia duodenal. A: presencia de esporas en el epitelio intestinal y en la lámina propia (400x). C: detalle de A observado a 1000 aumentos. F: esporas en la lámina propia (1000x). D: características morfotintoriales de *E. bienewisi* en biopsia duodenal. Esta especie se localiza exclusivamente en el polo apical de los enterocitos. En esta preparación, las esporas son fácilmente detectables a pesar de presentar una baja intensidad de coloración (1000x). G: biopsia duodenal donde se observa una célula de Paneth (400x). Los gránulos presentes en las mismas son, a veces, confundidos con esporas de microsporidios. B: detalle de G a 1000 aumentos, mostrando la morfología, localización y coloración de los gránulos, fácilmente distinguibles de las esporas de microsporidios.

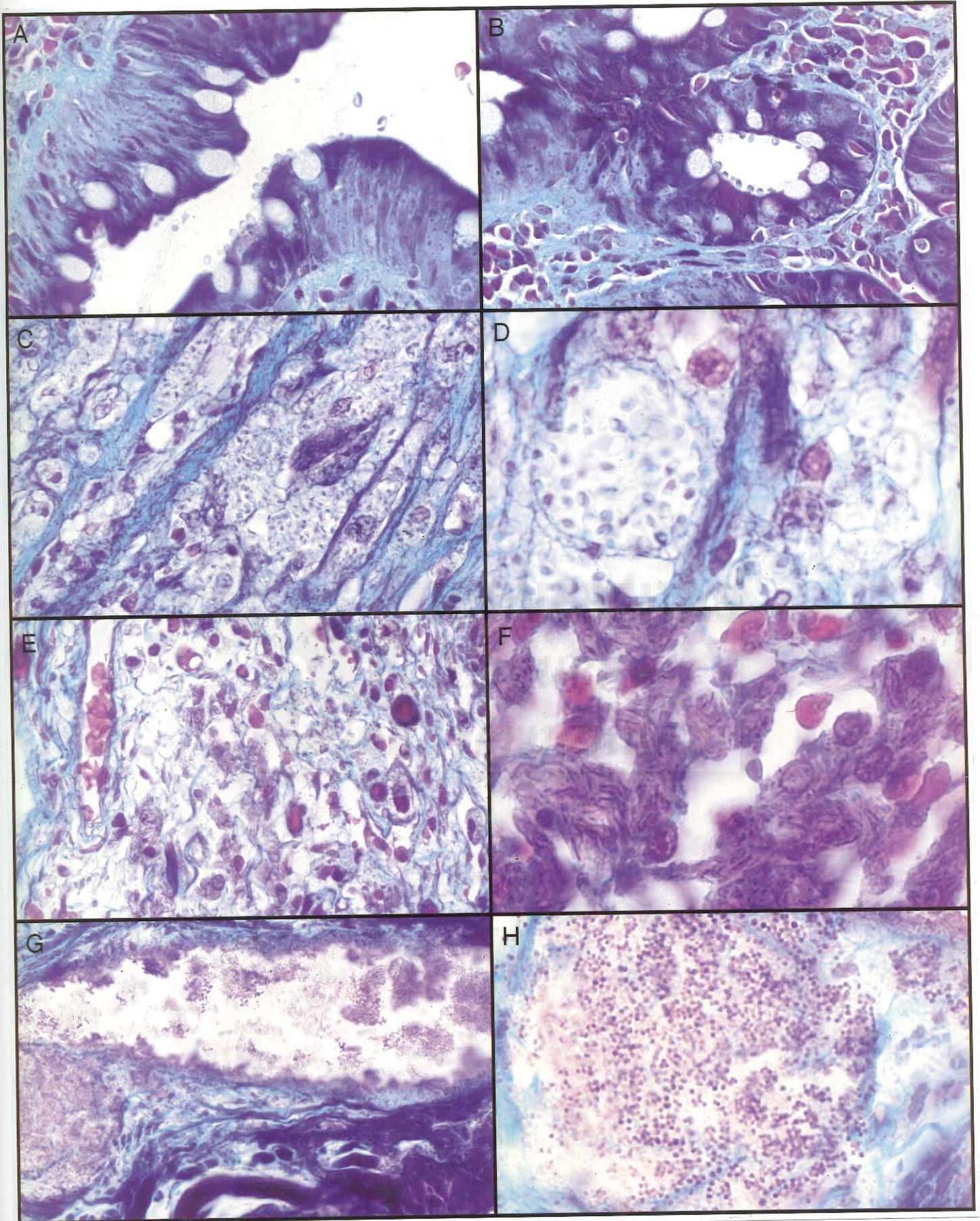


Figura E1.3. Tinción de "quick-hot" Gram-chromotrope.

**Figura E1.3. (continuación).****Características morfotintoriales de diferentes patógenos tisulares.**

**A:** biopsia intestinal donde se observan ooquistes de *Cryptosporidium parvum* localizados sobre las células del epitelio intestinal. Sección longitudinal; observación original, 400 aumentos.

**B:** biopsia duodenal del paciente descrito en A. Sección transversal; observación original, 400 aumentos.

**C:** biopsia pulmonar presentando numerosas levaduras de *Histoplasma capsulatum*; observación original, 400 aumentos.

**D:** detalle de C observado a 1000 aumentos.

**E:** infección por *Mycobacterium* sp.; observación original, 400 aumentos.

**F:** detalle de E observado a 1000 aumentos.

**G:** absceso por cocos gram positivos; observación original, 400 aumentos.

**H:** detalle de G observado a 1000 aumentos.



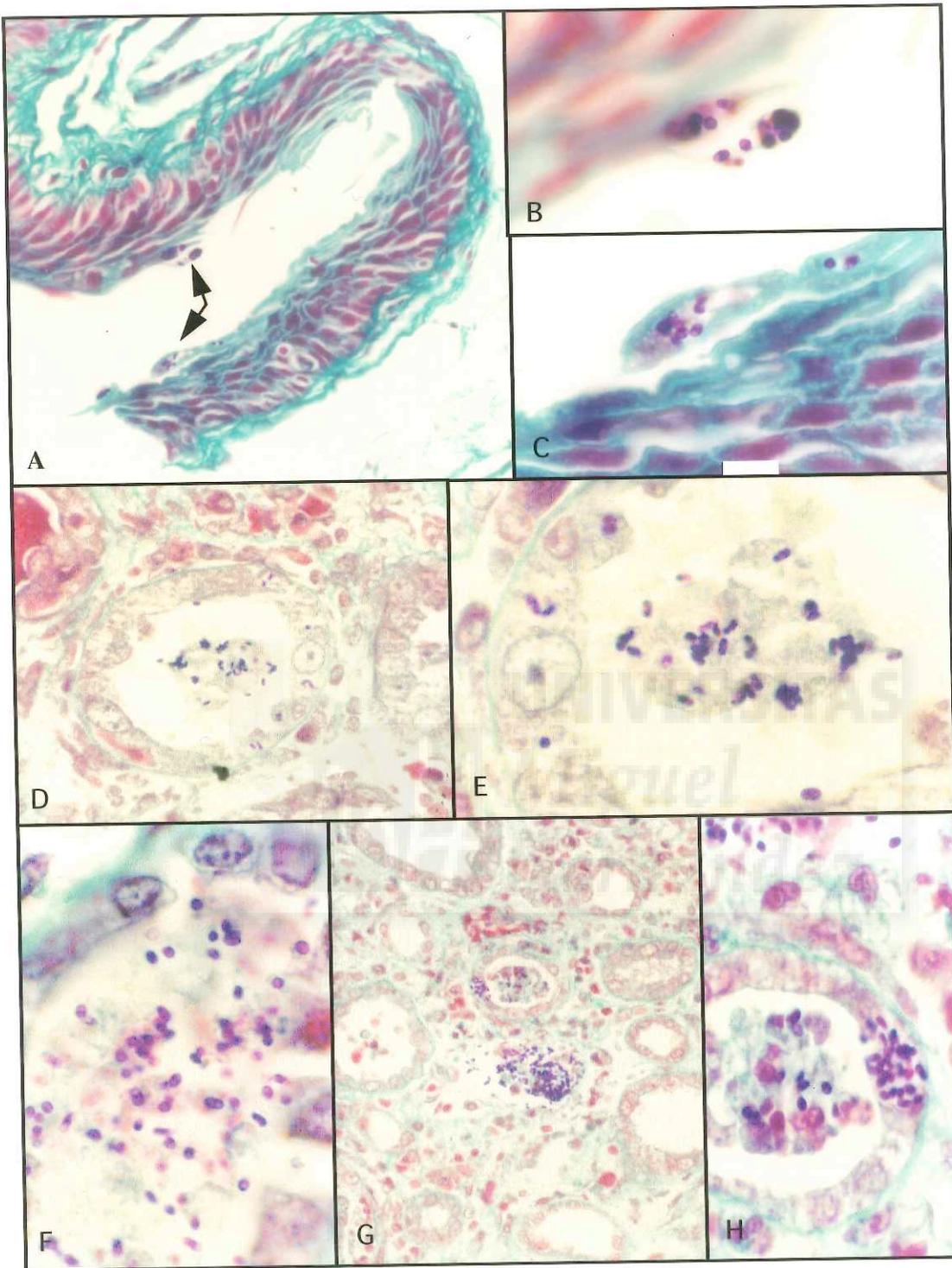


Figura E1.4. Tinción de “quick-hot” Gram chromotrope. Afectación ocular y renal por microsporidios.

**Figura E1.4 (continuación).**

**A:** globo ocular (muestra necrótica) donde se observan esporas de *E. hellem* en el epitelio corneal; observación original, 200 aumentos.

**B y C:** detalle de A observado a 1000 aumentos.

**D:** biopsia renal donde se observan esporas de *E. intestinalis* en la luz de un túbulo renal; observación original, 400 aumentos.

**E:** detalle de D observado a 1000 aumentos.

**F, G y H:** afectación renal por *E. hellem*; observación original 200 aumentos (G) y 1000 aumentos (F y H). Se observan esporas en el parénquima renal (G) y en el interior de los túbulos renales (F, G y H). También se observa una célula del epitelio tubular intensamente parasitada (H).





***ESTUDIO 2***

---

**IDENTIFICACION DE *Enterocytozoon bieneusi* Y *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* EN MUESTRAS FECALES MEDIANTE REACCION EN CADENA POR LA POLIMERASA, USANDO INICIADORES DISEÑADOS A PARTIR DE LA SECUENCIA QUE CODIFICA EL RNA DE LA SUBUNIDAD MENOR RIBOSOMAL.**

**Objetivos**

El presente estudio tuvo como objetivos: a) evaluar un método de extracción de DNA en muestras fecales desarrollado para identificar *E. bieneusi* y *E. intestinalis* mediante PCR usando iniciadores especie-específicos, b) comparar la eficacia en la retirada de inhibidores de la PCR en muestras de heces, del método desarrollado con respecto a otros métodos de extracción de DNA y c) evaluar el efecto de la conservación de las muestras fecales en formalina al 10%.

**Material y métodos**

**Muestras.**

En la evaluación inicial del método, se utilizaron 64 muestras de heces frescas procedentes de pacientes con sida y diarrea crónica que fueron conservadas a 4°C hasta su procesamiento. En los meses siguientes, se analizaron otras 75 muestras de heces frescas (30 humanas y 45 animales) y 96 muestras de heces conservadas en formol al 10% (35 humanas y 61 animales) procedentes de diferentes localizaciones.

**Tabla E1.1.** Descripción de las muestras según su procedencia y estado de conservación.

Procedencia	HUMANAS		ANIMALES		TOTAL
	Frescas	Formalina 10%	Frescas	Formalina 10%	
ESPAÑA	77	2	-	-	79
MEJICO	-	23	-	51	74
USA	1	10	45	-	56
BRASIL	12	-	-	-	12
HAITI	-	-	-	10	10
ALEMANIA	4	-	-	-	4
<b>TOTAL</b>	<b>94</b>	<b>35</b>	<b>45</b>	<b>61</b>	<b>235</b>

### **Microscopía óptica (MO).**

Para examinar la presencia de esporas de microsporidios en las heces, todas las muestras fueron teñidas mediante la tinción de chromotrope (apéndice, pág. I) y/o "quick-hot" Gram-chromotrope (apéndice, pág. II). La presencia de otros parásitos intestinales fue investigada en las 79 muestras de España mediante exámen en fresco tras concentración por el método de etil-acetato y mediante tinción ácido-alcohol (Ash y Orihel, 1997).

### **Reacción en cadena por la polimerasa (PCR):**

Las 64 muestras iniciales, fueron procesadas mediante el método de extracción y purificación de DNA desarrollado (apéndice, pág. XV). Las 171 muestras restantes, fueron procesadas mediante el método citado anteriormente, con una única variación en la etapa de purificación, donde se utilizó una columna distinta (QuiaQuick) que ofrece las mismas prestaciones que la empleada inicialmente pero es de manejo más sencillo y rápido. Diferentes volúmenes (10, 1 y 0,1 µl) de los extractos fecales obtenidos de cada una de las muestras, fueron amplificados mediante PCR. Se emplearon iniciadores diseñados a partir de la región que codifica la subunidad menor del RNA ribosomal (SSU-rRNA) (apéndice, pág. XVII). Todas las muestras fueron analizadas mediante el par denominado EBIEF1/EBIER1, específico para *E. bienersi*, que origina un fragmento diagnóstico de 607 pares de bases (da Silva y col., 1996). El par denominado SINTF1/SINTR (da Silva y col., 1997a), origina un amplicón de 520 pares de bases, diagnóstico de *E. intestinalis* y fue ensayado en 133 muestras. Los productos resultantes se visualizaron mediante coloración con bromuro de etidio tras electroforesis en gel de agarosa. (apéndice, pág. XVIII).

### **Inhibidores de la PCR.**

A fin de evaluar el la eficacia de distintos métodos de extracción de DNA en la eliminación de inhibidores de la PCR, se escogió una muestra de heces con una alta concentración de los mismos que no contenía esporas de microsporidios mediante microscopía óptica. Esta muestra fue procesada mediante el método descrito (apéndice, pág. XV), un método de ebullición (Ombruck y col., 1997), dos métodos de extracción mediante fenol-cloroformo (Velazques y col., 1996, Collins y col., 1995 ) y un método basado en el uso de sales caotrópicas (Chomczynski y col., 1997). La presencia de inhibidores de la PCR en los distintos extractos fecales obtenidos, fue evaluada usando volúmenes de 10, 1 y 0,1 µl de los mismos, a los que se adicionó 0.03 ng de DNA clonado correspondiente a la

región que codifica el SSU- rRNA de *E. intestinalis*. Las muestras preparadas se sometieron a PCR usando el par de iniciadores SINTF1/SINTR (da Silva y col., 1997a). La amplificación de una banda de la misma intensidad que el control positivo indicaba la retirada de los inhibidores. La reproducibilidad de los resultados obtenidos se comprobó, realizando el experimento descrito en tres ocasiones.

Para verificar la presencia o ausencia de inhibidores de la PCR en las 235 muestras procesadas en el presente estudio, se incluyó en cada una de ellas, un control interno consistente en la adición de 0,03 ng de DNA clonado de la especie de microsporidio ensayada en el mayor volumen de extracto fecal empleado

#### **Fijación en formalina al 10%.**

Con el propósito de definir hasta que grado la fijación de las heces con formalina al 10% afecta la amplificación mediante PCR, se seleccionó por microscopía óptica, una muestra de heces frescas humanas conteniendo numerosas esporas de microsporidios. Las esporas observadas fueron identificadas como pertenecientes a *E. bieneusi*, al mostrar mediante PCR usando el par de iniciadores EBIEF1/EBIER1 un producto de amplificación de 607 pares de bases característico de esta especie, (da Silva y col., 1996). La muestra fue dividida en 10 alícuotas de 500 µl y fijadas añadiendo un volumen equivalente de formalina al 10%. Las 10 muestras resultantes fueron conservadas a 4°C y sometidas, en intervalos de un día, a los procedimientos de extracción y purificación de DNA descritos (apéndice, pág. XV). Los extractos fecales fueron conservados a 4°C y al cabo de los 10 días se procedió a la detección de DNA *E. bieneusi* mediante PCR (apéndice, pág. XVI).

Posteriormente fueron procesadas 96 muestras fecales que habían estado conservadas en formalina al 10 %. Ochenta y cuatro de ellas durante un periodo comprendido entre 6 a 12 meses y las 12 restantes durante más de dos años.

## **Resultados**

### **Microscopía óptica.**

De las 235 muestras evaluadas, 101 fueron positivas para microsporidios en estudio microscópico. Las esporas observadas eran redondas u ovals con un tamaño de 1 a 1.5 µm en unos casos y de aproximadamente 2 µm en otros y presentaban las características morfológicas de las esporas de microsporidios.

### Reacción en cadena por la polimerasa.

Los resultados obtenidos se presentan en las tablas E.1.2 y E.1.3.

**Tabla E1.2.** Evaluación de la PCR en 235 muestras de heces.

MUESTRAS	PCR (+) / MO (+)	PCR (-) / MO (-)
Heces frescas (139)*	28 / 25	111 / 114
Heces formolizadas (96)*	36 / 86	60 / 10

\* Número de muestras ensayadas.

**Tabla E1.3.** Resultados de las muestras según la especie analizada

ESPECIE	PCR (+) / MO (+)	PCR (-) / MO (-)
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>		
Heces frescas (139)*	28 / 25	111 / 114
Heces formolizadas (96)*	8 / 86	88 / 10
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>		
Heces frescas (37)*	0 / 12	37 / 25
Heces formolizadas (96)*	32 / 86	64 / 10

\*Número de muestras ensayadas.

En muestras frescas (139) se detectaron 28 muestras positivas mediante PCR. En todas ellas se identificó *E. bieneusi*. Tres de ellas (10,7 %) habían sido previamente consideradas negativas por métodos de microscopía óptica. Estas muestra fueron nuevamente teñidas y reevaluadas detenidamente, no consiguiendo visualizar esporas de microsporidios en las mismas. En la figura E2.1.A y B se presentan, como ejemplo, los resultados obtenidos en alguna de las muestras analizadas mediante iniciadores específicos de *E. bieneusi*, tras purificación del DNA utilizando diferentes columnas: Microspin (A) y QuiaQuick (B). Fue posible amplificar DNA de microsporidios en 36 de las muestras conservadas en formalina al 10%. Treinta y dos de ellas fueron positivas para *E. intestinalis* y 8 para *E. bieneusi*. En cuatro de las muestras se detectó infección mixta por ambas especies.

### **Inhibidores de la PCR.**

El ensayo de distintos métodos de extracción de DNA en la muestra de heces seleccionada, mostró diferencias en relación a la retirada de inhibidores de la PCR. Los métodos más eficaces fueron el descrito en este trabajo y el basado en el uso de sales caotrópicas (Chomczynski y col., 1997) (Figura E2.1.C). Ambos métodos consiguieron obtener extractos fecales libres de inhibidores, a partir de los que fue posible amplificar el DNA adicionado en la reacción conteniendo el mayor volumen (10µl) de extracto fecal. Quedó igualmente demostrada, la presencia de inhibidores en los extractos obtenidos mediante los restantes métodos empleados, ya que sólo se obtuvo la amplificación deseada en las muestras mas diluidas, indicando la dilución de los inhibidores de la reacción.

Diferentes grados de inhibición fueron observados en 67 (28,5%) de las 235 muestras analizadas; siendo que en 30 de ellas (12,8%), la inhibición observada fue parcial y se consiguió amplificación en diluciones menores de la muestra. Treinta y siete muestras (15,7%) necesitaron una etapa de purificación adicional para retirar los inhibidores de la PCR.

### **Fijación en formalina al 10%.**

La figura E1.D, muestra los resultados obtenidos en las alícuotas fijadas durante 1 día (calle 1 a 3) y 10 días (calles 4 a 6). Los extractos obtenidos de las distintas alícuotas se mostraron libres de inhibidores, como demuestra la amplificación del fragmento diagnóstico en los controles internos de las muestras (calles 3 y 6). La eficiencia en la detección de DNA de *E. bienersi*, no se vio influenciada por la conservación de la muestra en formalina al 10% durante los 10 días estudiados, es más, la amplificación observada en el 10º día fue más intensa que la conseguida en la muestra fijada durante 24 horas.

Ochenta y seis de las 96 muestras conservadas en formalina al 10%, contenían esporas de microsporidios. Sólo se consiguió amplificación en 36 de ellas (41,9%). Las muestras habían sido conservadas durante periodos de tiempo que oscilaban entre 6 meses y cinco años. En las muestras fijadas durante menos de 1 año (74 muestras) se consiguió amplificación en el 48,9% (36 muestras). Sin embargo esto no fue posible en ninguna de las 12 muestras conservadas durante más de dos años.

## Discusión.

La mayoría de las infecciones causadas por microsporidios en pacientes con sida, tienen como agente etiológico a *Enterocytozoon bieneusi*, mientras que *Encephalitozoon intestinalis* es la segunda especie más prevalente (Weber y col., 1994a; Schwartz y Bryan, 1997). Las técnicas de microscopía óptica usadas actualmente para la detección de microsporidios en heces, son efectivas para el diagnóstico de la infección, pero la identificación a nivel de especie, importante para tratamiento y pronóstico de la infección, sólo era posible mediante microscopía electrónica (Weber y col., 1992a; Weber y col., 1994a; Schwartz y col., 1994a; Visvesvara y col., 1991; de Girolami y col., 1995). Sin embargo, éste método no es práctico ni suficientemente sensible para el diagnóstico coprológico de las microsporidiosis.

En este estudio mostramos la utilidad de dos pares de iniciadores denominados EBIEF1/EBIER1 (da Silva y col., 1996) y SINTF1/SINTR (da Silva y col., 1997a), diseñados para la detección específica de *E. bieneusi* y *E. intestinalis* mediante PCR. En 1996, da Silva y col. demostraron que la amplificación obtenida por el par EBIEF1/EBIER era más eficiente que la lograda usando iniciadores genéricos de microsporidios (Zhu y col., 1993a, b y c). Además el método diagnóstico propuesto no requiere la digestión con enzimas de restricción del producto amplificado, como en el método diseñado por Fedorko y col. (1995). Una ventaja adicional de estos iniciadores es que no presentan amplificación cruzada con varias especies de microsporidios entre las que se incluyen aquellas patógenas para el hombre (da Silva y col., 1996; da Silva y col., 1997a).

La presencia de inhibidores de la PCR en el DNA extraído de muestras fecales ha limitado la realización de estudios comparando el diagnóstico microscópico y molecular de microsporidios entéricos. Se ha descrito la retirada de inhibidores de la PCR mediante tratamiento de las muestras fecales con hipoclorito sódico (Fedorko y col., 1995), pero el procedimiento es laborioso, requiere 5 días para obtener DNA fecal purificado y es menos eficaz que el método utilizado (da Silva y col., 1997b). Otros métodos de extracción de DNA en heces (Velazques y col., 1996; Ombrouck y col., 1997) han sido ensayados en el presente trabajo y comparados con el método propuesto. En ambos, la eficiencia en la retirada de inhibidores de la PCR se ha mostrado inferior y sólo se consiguió diluyendo el extracto fecal obtenido. La necesidad de diluir los extractos fecales tras purificación de

DNA ha sido también comentada por varios autores (Katzwinkel-Wladarsch y col., 1996; Koch y col., 1997; Ombrouck y col., 1997) e implica una disminución en la sensibilidad de los métodos.

Por otra parte, hemos podido comprobar que la presencia y concentración de inhibidores de la PCR en muestras de heces, es un factor impredecible y que varía sustancialmente de una muestra a otra. Para evitar estos problemas, es evidente la necesidad de disponer de un método que elimine eficazmente los inhibidores de la reacción sin que las muestras resulten dañadas ni se disminuya la sensibilidad del ensayo.

El método desarrollado en este trabajo ha mostrado ser de gran utilidad por su sencillez y eficacia en la eliminación de los inhibidores, con un rendimiento del 84,3% en las muestras estudiadas; permitiendo así la utilización de volúmenes de 10  $\mu$ l de extracto fecal en la reacción y emitir resultados en 24 horas. También ha sido aplicado con éxito en el diagnóstico de infecciones por *Cyclospora cayetanensis* y *Criptosporidium parvum* (Pieniaseck y col., 1997).

En 3 de las 28 las muestras frescas en las que se amplificó DNA de *E. bienensi*, no fue posible observar esporas de microsporidios mediante microscopía óptica. Este resultado no sorprende ya que la sensibilidad teórica del método de PCR desarrollado, es de 4 esporas utilizando 10  $\mu$ l de extracto de heces en la reacción. Lo que corresponde a una concentración de  $10^2$  esporas/ml de heces, mientras que el límite de detección teórica en los métodos microscópicos observando 10  $\mu$ l de muestra requiere una concentración de  $10^4$  esporas/ml de heces (aunque en la práctica es difícil la observación de esporas cuando las heces contienen una concentración inferior a  $10^5$  esporas/ml). Estudios comparando la sensibilidad de los métodos de diagnóstico microscópico y molecular realizados a partir de esporas procedentes de cultivo, de heces de pacientes naturalmente infectados y de heces contaminadas con esporas de cultivo, han demostrado que la sensibilidad real de la PCR es mayor que la de los métodos microscópicos (datos no presentados). No obstante debemos señalar en este punto dos importantes consideraciones: 1) los resultados obtenidos a partir de heces contaminadas con esporas procedentes de cultivo deben ser analizados con prudencia, ya que, la presencia de DNA soluble en los sobrenadantes de cultivo (incluso después de lavar las esporas varias veces) puede falsear los resultados (Pieniaseck NJ, comunicación personal). Este hecho no es comentado en algunos trabajos que evalúan la

sensibilidad de los métodos moleculares mediante este abordaje experimental (Katzwinkel-Wladarsch y col., 1996; Koch y col., 1997; Ombrouck y col., 1997); 2) También hemos podido comprobar que la concentración de DNA de microsporidios en heces no guarda relación directa con el número de esporas observadas mediante métodos microscópicos. No es posible determinar la proporción de esporas que contienen DNA en el momento del diagnóstico. Además hemos podido comprobar una disminución de la concentración de DNA tanto en suspensiones de esporas procedentes de cultivo como en heces de pacientes con microsporidiosis mantenidas a 4°C durante un periodo de 12 meses (datos no presentados).

Por último, evaluamos el efecto que produce la fijación de las heces en formalina al 10% sobre la eficacia del método, ya que este es el procedimiento más utilizado para la conservación y transporte de muestras fecales y es compatible con otros protocolos coproparasitológicos. Los resultados demuestran que la fijación durante un periodo de 10 días no afecta los resultados obtenidos mediante el método descrito. Sin embargo, la conservación durante periodos más prolongados parece producir la degradación del DNA presente en la muestra. En la serie estudiada fue posible amplificar DNA de microsporidios en aproximadamente la mitad de las muestras que habían estado conservadas durante un periodo entre 6 y 12 meses, pero en ninguna de las muestras conservadas durante más de 2 años.

Por todo ello, concluimos que la evaluación del método descrito permite afirmar su utilidad en el diagnóstico específico de microsporidios en muestras fecales, e incita a proseguir en la investigación de métodos de extracción más sencillos y rápidos encaminados a emitir resultados en el menor tiempo posible.

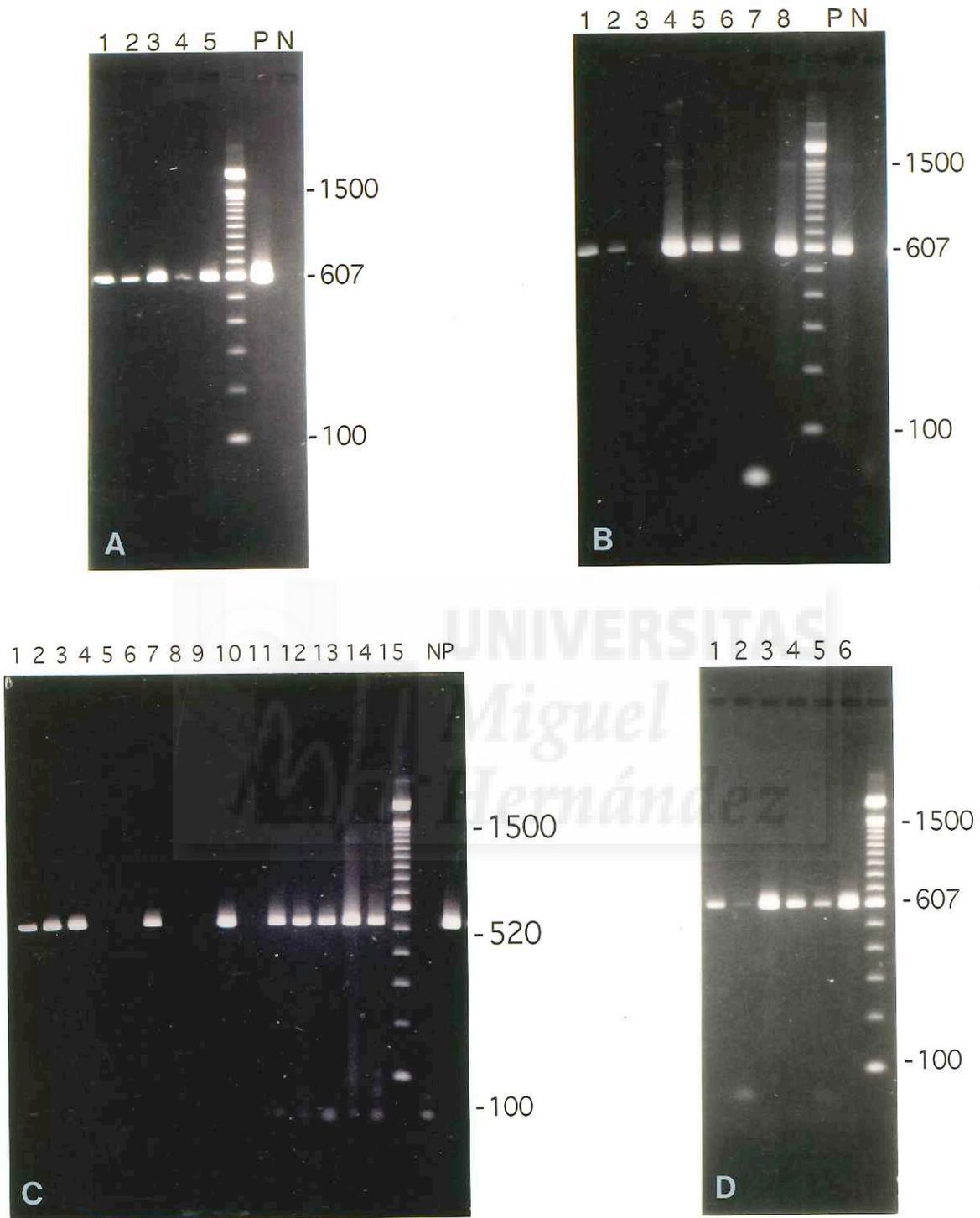


Figura E2.1. Electroforesis en gel de agarosa mostrando los resultados obtenidos tras PCR usando iniciadores especie-específicos para *E. bienersi* y *E. intestinalis*.

**Figura E2.1 (continuación).**

**A:** Gel de agarosa que muestra los productos amplificados por PCR usando iniciadores específicos de *E. bieneusi*, a partir de extractos de heces purificados con la columna Microspin. Calles 1 a 5: amplificación en cinco muestras fecales humanas purificadas, mediante el par de iniciadores EBIEF1/EBIER1. N: control negativo (DNA extraído de células E6). P: control positivo (DNA clonado correspondiente a la región que codifica el SSU-rRNA de *E. bieneusi*). Los números a la derecha de los geles indican el tamaño de los fragmentos de DNA en pares de bases. El tamaño esperado del amplicón usando el par de iniciadores EBIEF1/EBIER1 es 607 pares de bases (calles 1 a 6).

**B:** Gel de agarosa que muestra los productos de amplificación tras PCR usando el par de iniciadores EBIEF1/EBIER, específicos de *E. bieneusi* en extractos de muestras fecales purificadas mediante la columna QuiaQuick. Calles 1 a 4: muestras fecales conservadas en formalina al 10%, humana (calles 1 y 3), cerdo (calle 2), vaca (calle 4), calles 5 a 8: muestras fecales frescas, cabra (calle 5): humanas (calle 6, 7 y 8). Mediante microscopía óptica se observaron esporas de microsporidios en todas las muestras excepto en dos (calles 6 y 7). N: control negativo (DNA procedente de células E6 de mono). P: control positivo (DNA clonado correspondiente a la región que codifica el SSU-rRNA de *E. bieneusi*). Los números a la derecha de los geles indican el tamaño de los fragmentos de DNA en pares de bases.

**C:** Eficacia de distintos métodos de extracción de DNA en heces en la retirada de inhibidores de la PCR. Calles 1,2 y 3: método desarrollado en el presente estudio; calles 4, 5 y 6: método de Ombrouck (1997); calles 7, 8 y 9: método de Velasquez (1996); calles 10, 11 y 12: método de Collins (1995) y calles 13, 14 y 15: método de Chomczynski (1997). Se utilizaron en todos ellos, volúmenes de reacción de 10, 1 y 0,1  $\mu$ l, consecutivamente.

**D:** Efecto de la fijación en formalina al 10% en una muestra de heces. Calle 1 : amplificación de la muestra fijada durante 1 día (dilución 1:10); calle 2: amplificación de la muestra fijada durante 1 día (dilución 1:100); calle 3: control de inhibidores de la PCR en la muestra fijada durante 1 día (dilución 1:10); calle 4: amplificación de la muestra fijada durante 10 días (dilución 1:10); calle 5: amplificación de la muestra fijada durante 10 días (dilución 1:10); calle 6: control de inhibidores de la PCR en la muestra fijada durante 10 días (dilución 1:10).



---

***ESTUDIO 3***

## IDENTIFICACION ESPECIFICA DE *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* EN MUESTRAS FECALES CONSERVADAS EN FORMALINA AL 10% MEDIANTE METODO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

### Objetivos

El presente estudio tuvo como objetivos: a) evaluar la sensibilidad y especificidad de un suero policlonal de conejo anti-*E. intestinalis* en muestras fecales conservadas en formalina al 10%, procedentes de pacientes VIH (+) con diarrea crónica; b) determinar la prevalencia de infección por esta especie en la serie estudiada y c) investigar la presencia de co-infecciones con *E. bienersi*.

### Materiales y métodos

#### Muestras fecales.

Fueron analizadas 210 muestras fecales. Las muestras estuvieron conservadas en formalina al 10%, a temperatura ambiente durante un periodo de 3 a 5 años. En 120 de ellas había sido detectada previamente la presencia de microsporidios mediante la tinción de chromotrope. Las 90 muestras restantes fueron negativas para microsporidios por microscopía óptica y algunas presentaban otros microorganismos entéricos: *Cryptosporidium parvum* (20); *Giardia intestinalis* (8); *Isospora belli* (5); *Entamoeba coli* (7); *Endolimax nana* (3); *Salmonella* spp (8); *Campylobacter* spp. (6) y *Mycobacterium* spp. (4).

Con el objetivo de confirmar o descartar la presencia de esporas de microsporidios, todas las muestras fueron nuevamente teñidas mediante la técnica de quick-hot Gram chromotrope (según descrito en el estudio 1).

#### Microscopía electrónica de transmisión (MET).

Debido a la observación de esporas de dos diferentes tamaños en algunas de las muestras, se seleccionaron 10 de ellas y se realizó medición de las mismas mediante micrómetro. Un mínimo de 20 a 30 esporas por muestra fueron medidas por tres microscopistas. Estas 10 muestras fueron procesadas para MET (apéndice, pág.IV).

### Aislados de referencia.

Microsporidios aislados de muestras clínicas: *E. cuniculi* (CDC: V282) (De Grootte y col., 1995), *E. hellem* (CDC: 0291: V213) (Visvesvara y col., 1994), *E. intestinalis* (CDC: V297) (Visvesvara y col., 1995a) y *V. corneae* (Siveira & Canning, 1995), fueron cultivadas en células de riñón de mono (ED6) según el método descrito por Visvesvara y cols. (1991).

### Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Diez  $\mu\text{l}$  de suspensión de esporas ( $5 \times 10^6$  esporas/ml) procedentes de los distintos cultivos, fueron dispensados en portas con 12 pocillos individuales, fijados y conservados a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso. Adicionalmente de 5 a 10  $\mu\text{l}$  de cada una de las 210 muestras fecales, fueron procesadas del mismo modo. El método de IFI se realizó con el suero anti-*E. intestinalis* (CDC:V297) a una dilución 1:400 y con suero anti-IgG de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína como se describe en la página VII del apéndice (Visvesvara y col., 1995a). Antes de realizar el ensayo en las muestras de heces, el suero anti-*E. intestinalis* (CDC:V297) fue titulado usando diluciones seriadas desde 1:100 a 1:3.200, frente a esporas de *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* y *V. corneae* obtenidas de cultivo y frente a dos muestras de heces, una conteniendo *E. intestinalis* por MET (Visvesvara y col., 1995a) y otra en la que se identificó *E. bienewisi* mediante PCR (da Silva y col., 1997b).

Doble marcaje fluorescente. Las muestras sospechosas de infección mixta por *E. bienewisi* y *E. intestinalis* se procesaron mediante el método de doble marcaje fluorescente descrito por Ombrouck y col. (1996) (apéndice, pág. II).

## Resultados

### “Quick-hot” Gram-chromotrope.

Las 120 muestras previamente informadas como positivas, revelaron la presencia de esporas de microsporidios mediante la tinción de “quick-hot” Gram-chromotrope. Las esporas se tiñeron de color violeta oscuro y exhibieron al menos una de las siguientes características: presencia de banda ecuatorial, vacuola y/o presencia de gránulos gram positivos (figura E3.1 A, C y D). En las 90 muestras utilizadas como control negativo, se confirmó la ausencia de esporas.

El tamaño de las esporas en 8 de las 10 muestras seleccionadas fue de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de media (rango de 0,8 a 1,4  $\mu\text{m}$ ). Sin embargo en 2 de ellas en que la mayoría de las esporas median de media 2  $\mu\text{m}$  (rango de 1,5 a 3  $\mu\text{m}$ ) se observaron también esporas de un tamaño aproximado a 1  $\mu\text{m}$ . Dos de las muestras, contenían exclusivamente las esporas de mayor tamaño.

#### IFI.

Para evaluar la posibilidad de reacciones cruzadas del suero anti- *E. intestinalis* con esporas de *E. bienewsi* y *E. intestinalis* en muestras de heces y con esporas obtenidas de cultivo (*E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* y *V. corneae*), se ensayaron diferentes diluciones del anti-suero a partir de 1:100. A las diluciones 1:100 y 1:200, las esporas de las especies heterólogas reaccionaron produciendo una fluorescencia moderada y débil, respectivamente. Sin embargo a una dilución 1:400 o mayor no se observó fluorescencia con las especies heterólogas, mientras las esporas de *E. intestinalis* mostraron una brillante fluorescencia verde manzana. Esta dilución (1:400) del suero fue seleccionada para evaluar las muestras fecales.

De las 120 muestras conteniendo microsporidios y ensayadas por IFI, las esporas presentes en 22 (18.3%) de las muestras reaccionaron con el suero anti-*E. intestinalis*, indicando que las esporas presentes en ellas pertenecían a esta especie (Figura E3.1 B, E y F). En alguna de las muestras, bacterias con morfología de diplococos y estructuras fúngicas mostraron una ligera fluorescencia amarilla, pero pudieron ser distinguidas con facilidad de las esporas de microsporidios. En 7 de las 22 muestras se observó un número de esporas fluorescentes, inferior a las observadas en las mismas muestras teñidas mediante la tinción de Gram-chromotrope, sugiriendo que contenían también esporas de otra especie, probablemente *E. bienewsi*. Ninguna de las muestras negativas o conteniendo otros microorganismos mostró reactividad con este anti-suero.

Doble marcaje fluorescente. Los resultados obtenidos con este método confirmaron en las 7 muestras con sospecha de infección mixta, la presencia de esporas de microsporidios no reconocidas por el suero anti- *E. intestinales*. Sin embargo, también se observó la situación contraria, esto es, la ausencia de fluorescencia en determinadas esporas mediante Calcofluor white junto a reactividad positiva de las mismas frente al suero anti-*E. intestinalis* (Figura E3.2).

**MET.**

De las 10 muestras examinadas, 5 presentaban esporas y estados esporogónicos de *E. bienewsi* y fueron negativas por IFI. Entre las cinco restantes, todas positivas por IFI, tres contenían esporas de *E. intestinalis* y en dos muestras se observaron ambos tipos de esporas confirmando la infección por las dos especies (Figura E3.3 A y B).

**Discusión**

El diagnóstico de la microsporidiosis humana a nivel de especie es importante ya que las infecciones debidas a *E. intestinalis* pueden ser tratadas con éxito con albendazol, mientras que *E. bienewsi* puede ser refractario a esta droga (Weber y col., 1994a; Shwartz & Bryan, 1997). La identificación a nivel de especie es difícil y requiere tiempo además de técnicas especializadas como MET o PCR, disponibles en pocos laboratorios. Es por ello importante el desarrollo de anticuerpos especie-específicos capaces de identificar el agente mediante sencillas técnicas serológicas permitiendo instaurar el tratamiento adecuado.

Varios grupos de investigación han desarrollado anticuerpos poli y monoclonales (AcMc) con el objetivo de identificar microsporidios en muestras fecales. Ninguno de ellos permite identificar inequívocamente la especie de microsporidio implicada debido a reacciones cruzadas con otras especies de importancia clínica. (Weiss y col., 1992, Zeirdt y col., 1993; Aldras y col., 1994; Enriquez y col., 1997b). Otro trabajo describe la producción de dos AcMc que identifican esporas de *E. intestinalis* en muestras fecales frescas o refrigeradas pero no en muestras fijadas en formalina (Beckers y col., 1996). Otro presenta la producción de Ac policlonales que reconocen *E. intestinalis* en muestras fecales fijadas con acetona, pero no con formalina (Ombrouck y col., 1996)

Visvesvara y col. (1995a), utilizaron un suero policlonal anti-*E. intestinalis* (CDC: V297), que permitió identificar esporas de esta especie en distintas muestras clínicas incluidas heces. La sensibilidad y especificidad de este antisuero han sido determinadas en el presente estudio, analizando su reactividad frente a esporas procedentes de cultivo de *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* y *V. corneae* y dos muestras fecales conteniendo esporas de *E. intestinalis* y *E. bienewsi* y posteriormente frente a 210 muestras fecales que habían sido conservadas en formalina y mantenidas a temperatura ambiente durante 3 a 5 años.

Los resultados obtenidos indican que el suero anti-*E. intestinalis* utilizado a la dilución 1:400, reconoce específicamente *E. intestinalis* en cultivo y en muestras fecales fijadas con formalina al 10%, sin reaccionar con esporas de cultivo de *E. hellem*, *E. cuniculi* y *Vittaforma corneae* o con heces conteniendo esporas de *E. bienewisi*. Sin embargo, en alguna de las muestras se observó reacción cruzada con diplococos y hongos. La fluorescencia amarilla y de baja intensidad junto con la morfología de estas estructuras permitió distinguir las fácilmente de la fluorescencia verde brillante de las esporas de *E. intestinalis* (Sodré y col., 1997).

Estudios previos han identificado los agentes de microsporidiosis intestinal, mediante PCR y ME (Field y col., 1993; Kotler y Orenstein, 1994; Coyle y col., 1996; Franzen y col., 1996a y c; Liquory y col., 1997). La incidencia de infección por *E. intestinalis* oscila entre el 7.3% (Liquory y col., 1997) y el 10% (Coyle y col., 1996). Sin embargo, Franzen y col. (1996a), estudiando biopsias de pacientes con microsporidiosis intestinal mediante PCR, indicaron que la prevalencia de infección por *E. intestinalis* en las muestras analizadas es probablemente mayor a la descrita previamente debido a la ocurrencia de infecciones latentes.

En el presente estudio, las esporas presentes en 22 de las 120 (18.3%) muestras con microsporidios, reaccionaron intensamente con el suero anti-*E. intestinalis* mostrando una intensa fluorescencia verde manzana. Debido a la dificultad de realizar MET en las 120 muestras positivas, se seleccionaron 10 muestras. Los resultados de la MET confirmaron que 5 de ellas (negativas en el método de IFI) presentaban únicamente esporas características de *E. bienewisi*. De las otras 5 muestras (positivas en el método de IFI), 3 solo contenían esporas del género *Encephalitozoon*, mientras que en las 2 restantes se observaron ambos tipos de esporas. En estas 2 muestras, el número de esporas fluorescentes con el suero anti-*E. intestinalis* fue pequeño comparado con el número de esporas observado mediante los métodos de tinción.

El examen microscópico tras tinción de las 22 muestras fecales positivas mediante el método de IFI, reveló que en la mayoría de ellas, las esporas median 2  $\mu\text{m}$  o más, tamaño compatible con *E. intestinalis* (Canning y Lom, 1986; Cali y col., 1993; Van Gool y col., 1994a; Doultree y col., 1995; Viscesvara y col., 1995a; Didier y col., 1996a; Ombrouck y col., 1996). Sin embargo, la reevaluación microscópica mostró que 7 de las 22 muestras

contenían esporas de dos tamaños diferentes, unas de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y otras de unos 2  $\mu\text{m}$  o más. Las esporas de *E. bienewisi*, miden aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , mientras que las de *E. intestinalis* tienen, en general, una longitud igual o mayor que 2  $\mu\text{m}$ . Además, el número de esporas fluorescentes en estas muestras fue considerablemente menor que las observadas en los métodos de tinción.

Por último, empleamos el método de doble marcaje fluorescente propuesto por Ombrouck y col. (1996), para la detección de infecciones mixtas, con el que obtuvimos unos resultados comparables a los referidos por los autores. Este método combina la exposición inicial de la muestra a un marcador quimioluminiscente que se une inespecíficamente a la quitina presente en la exospora, seguido del método de IFI. La observación de las muestras dio lugar a: 1) la identificación de esporas fluorescentes con el suero anti-*E. intestinalis* y negativas con el marcador quimioluminiscente, probablemente debido a la presencia en las muestras de esporas inmaduras o estadios precursores con escasa o nula presencia de quitina en su estructura; 2) la presencia de esporas (marcador quimioluminiscente positivas) de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , compatibles con *E. bienewisi*, que no eran reconocidas por el suero anti-*E. intestinalis*, junto a esporas de unos 2  $\mu\text{m}$  de longitud que reaccionaron intensamente con el antisuero.

Basados en las observaciones anteriores, concluimos que esas muestras contenían esporas de *E. intestinalis* y *E. bienewisi*, indicando que los pacientes de los que se obtuvieron las muestras padecían infecciones mixtas. Basados en estos datos podemos estimar que un total del 5.8% (7 de 120) de los pacientes presentaban microsporidiosis intestinal debida a la infección simultánea de ambas especies.

El hallazgo de infecciones intestinales mixtas había sido descrita anteriormente (Blanssard y col., 1992, Field y col., 1993; Van Gool y col., 1994a, Franzen y col., 1996c; Ombrouck y col., 1996) mediante IFI, MET, PCR y cultivo.

En este estudio ha sido demostrada la utilidad de este anticuerpo en el diagnóstico específico en muestras clínicas, siendo el primer antisuero producido que puede ser utilizado para identificación de *E. intestinalis* en muestras fecales conservadas en formalina al 10%. Este anticuerpo, podrá ser utilizado en estudios epidemiológicos para identificar esta especie en animales y muestras ambientales. La primera aplicación práctica de este uso se expone en el Estudio 5 (página 98).

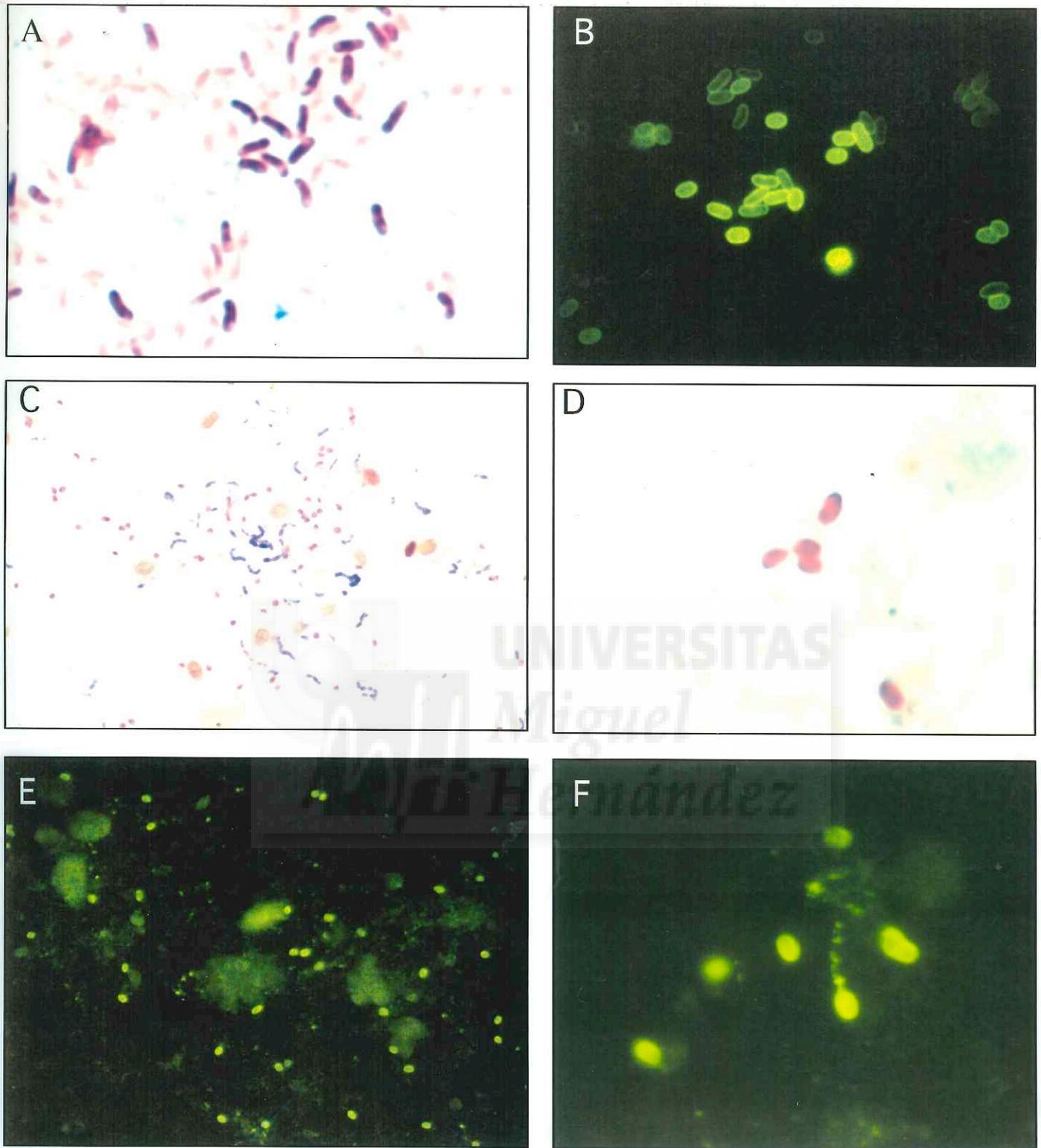
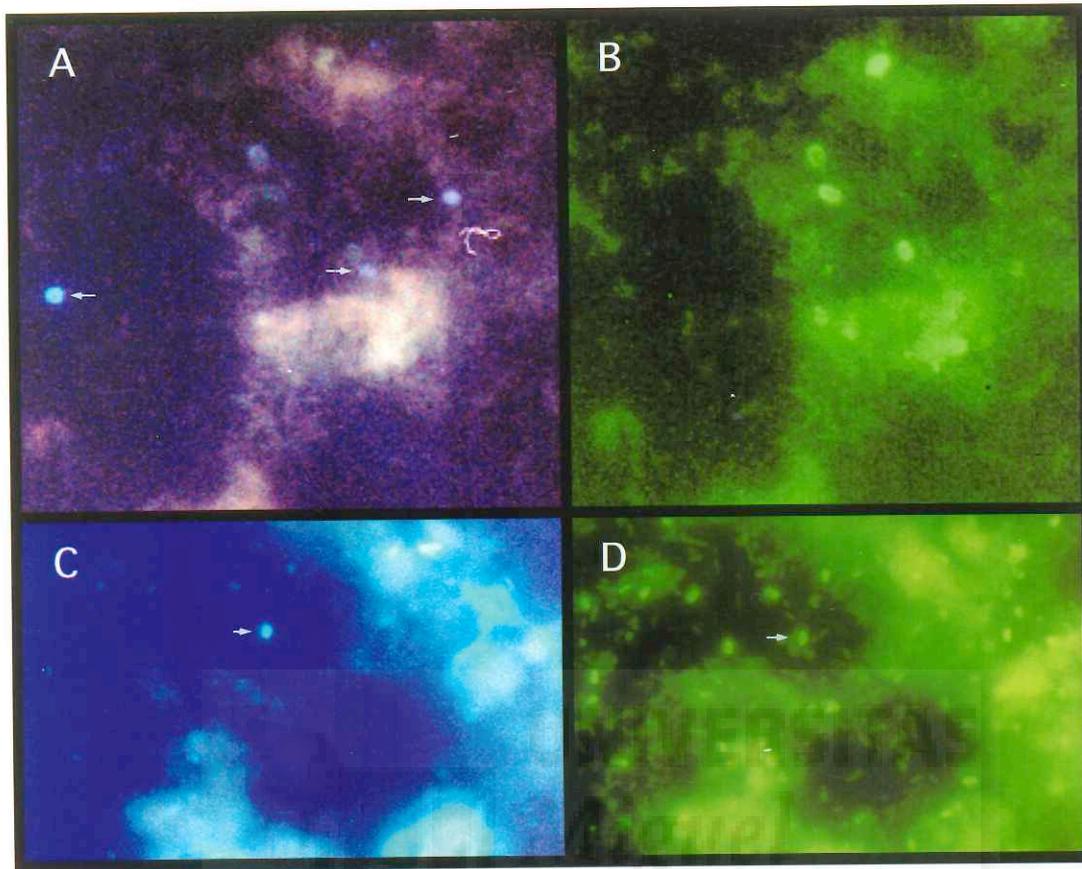


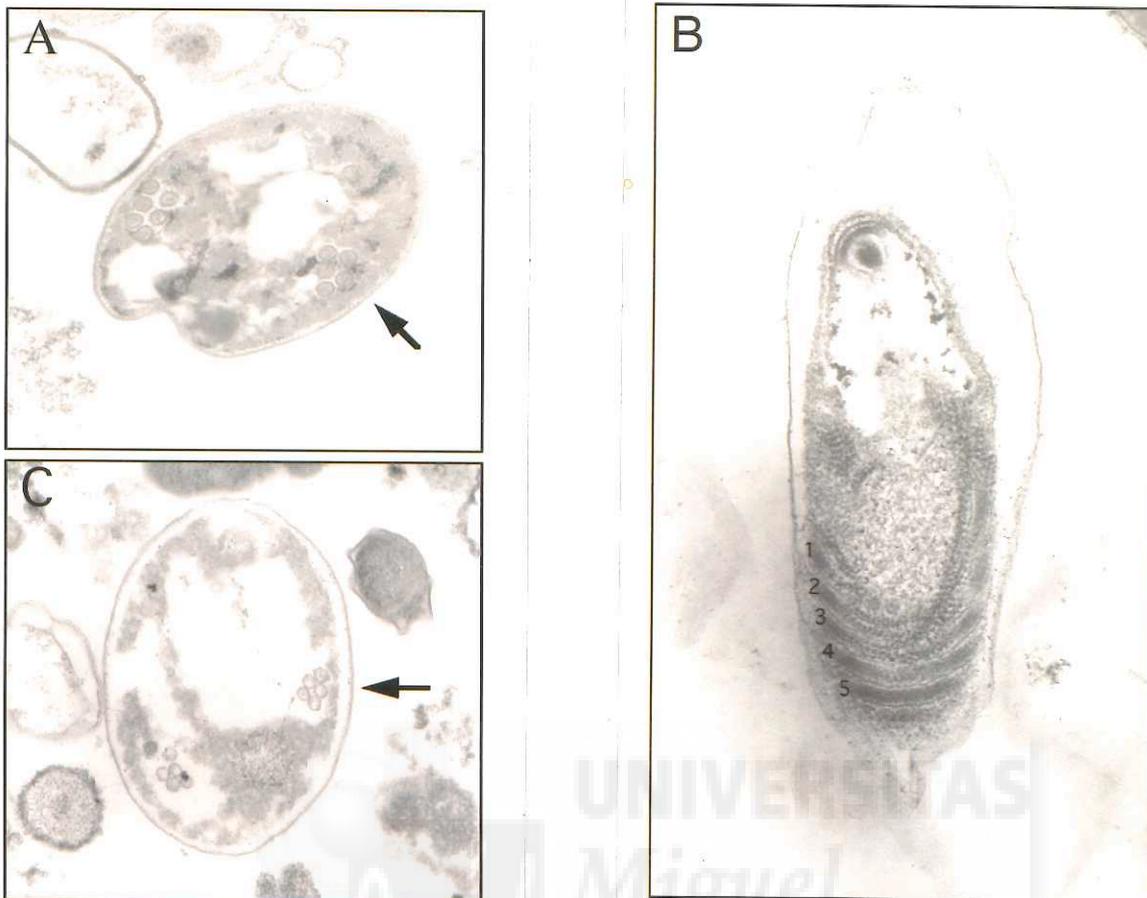
Figura E3.1. Esporas de *E. intestinalis*. A, C y D: tinción de quick-hot Gram-chromotrope. B, E y F: IFI empleando suero anti-*E. intestinalis*. A y B: esporas procedentes de cultivo celular (1000x). C a F: esporas presentes en muestras fecales observadas a 400x (C y E) y a 1000x (D y F).



**Figura E3.2. Método de doble marcaje fluorescente en muestras fecales.**

**A y B:** observación de un campo microscópico a 1000 aumentos. Tres esporas fluorescentes con el marcador quimioluminiscente (**A**, flechas), probablemente *E. bieneusi*, no son reconocidas por el suero anti-*E. intestinalis* (**B**).

**C y D:** observación de un campo microscópico a 400 aumentos. Se aprecia una espora madura claramente fluorescente con el marcados quimioluminiscente (**C**, flecha) que es también reconocida por el suero anti-*E. intestinalis* (**D**, flecha). En esta muestra el método de IFI pone en evidencia la existencia de numerosas esporas inmaduras, que presentan escasa o nula fluorescencia con el marcador quimioluminiscente.



**Figura E3.3. Microscopía electrónica de transmisión en muestras fecales humanas.**

**A y C:** Características ultraestructurales de las esporas de *E. bienersi*. Se observa un tubo polar con 5 a 7 vueltas dispuestas en doble fila (flechas).

**B:** Características ultraestructurales de una espora de microsporidio conteniendo un filamento polar con cinco vueltas (1 a 5) dispuestas en una única hilera, sugestivo de género *Encephalitozoon*.



---

***ESTUDIO 4***

## **AISLAMIENTO EN CULTIVO E IDENTIFICACION DE *Encephalitozoon hellem* PROCEDENTE DE UN PACIENTE CON SIDA EN ESPAÑA. ¿ CO-INFECCION CON *Enterocytozoon bienersi* ?.**

### **Objetivos**

El presente estudio tuvo como objetivo identificar a nivel de especie un microsporidio aislado casualmente en cultivo celular a partir del lavado broncoalveolar (LBA) de un paciente con sida, ingresado en el hospital "La Fe" de Valencia (España).

### **Material y métodos**

#### **Caso clínico**

Un paciente con sida (CDC estadio, C3), homosexual, de 41 años, presentando severa desnutrición y lesiones cutáneas de sarcoma Kaposi, fue admitido al hospital por diarrea, astenia y disnea. El paciente tenía una historia de sífilis latente. A los 33 años de edad presentó una trombocitopenia y se le diagnosticó como portador de anticuerpos contra el virus de inmunodeficiencia humano. Tres años más tarde presentó episodios de diarrea acuosa. A los 39 años de edad desarrolló sarcoma de Kaposi cutáneo. Un año más tarde fue diagnosticado de toxoplasmosis cerebral y desarrolló un síndrome constitucional. El estudio radiológico en el momento de la admisión, reveló nódulos pulmonares compatibles con sarcoma de Kaposi, pero la broncoscopia evidenció un árbol bronquial mínimamente inflamatorio y no fueron identificadas alteraciones histológicas compatibles con sarcoma de Kaposi. Los exámenes de laboratorio presentaron: recuento de linfocitos CD4  $<50/\text{mm}^3$ ; plaquetas, 41000; potasio 1.5 meq/L; LDH, 1639 U/L y ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en muestras fecales. No se investigó la presencia de microsporidios en heces. En el cultivo del lavado broncoalveolar, fue aislado Cytomegalovirus. Siete días después de la admisión la disnea empeoró y el paciente falleció. No fue permitido el estudio necrópsico. El microsporidio aislado, se identificó como perteneciente al género *Encephalitozoon* mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión e inmunofluorescencia indirecta (Pemán y col., en prensa)

## Cultivo

En el momento de la hospitalización, fue recogida una muestra de LBA. La muestra fue homogeneizada con medio de transporte para virus conteniendo vancomicina, amikacina y anfotericina B, en la proporción 1:1. La mezcla se mantuvo 4-8°C durante 30 minutos, y posteriormente centrifugada a 500g durante 15 minutos. El sedimento resultante, se dispuso en dos tubos de cultivo celular de fibroblastos humanos fetales (línea celular, MRC-5), mantenidos con medio de Eagle suplementado con suero fetal bovino al 2%, penicilina y estreptomina al 1% y glutamina al 1%. El cultivo fue incubado a 37°C. La cepa se mantiene actualmente en cultivo (líneas celulares: HLF y E6).

## Caracterización morfológica.

Microscopía óptica: las esporas procedentes del cultivo, fueron teñidas mediante las tinciones de chromotrope (apéndice, pág. III) y "quick-hot Gram-chromotrope" (apéndice, pág. IV).

Microscopía electrónica de transmisión: Un frasco de cultivo fue tripsinizado y procesado para estudio ultraestructural (apéndice, pág. IV).

## Caracterización inmunológica

Inmunofluorescencia indirecta (IFI): esporas procedentes del cultivo fueron fijadas sobre portas de inmunofluorescencia y analizadas usando sueros inmunes anti-*E. hellem*, anti-*E. cuniculi* y anti-*E. intestinalis* (apéndice, pág. VII).

Western blot (WB): esporas procedentes del aislado en estudio y de aislados de referencia: : *E. cuniculi* (CDC: V282) (De Groot y col., 1995), *E. hellem* (CDC: 0291: V213) (Visvesvara y col., 1994) y *E. intestinalis* (CDC: V297) (Visvesvara y col., 1995a) fueron colectadas, purificadas y sometidas a procedimientos de extracción. Las proteínas extraídas fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y posteriormente transferidas a membrana de nitrocelulosa y sometidas a ensayo inmunoenzimático usando suero policlonal de conejo anti-*E. hellem* (apéndice, pág. IX).

## Caracterización molecular

Esporas de diferentes subcultivos del aislado en estudio fueron sometidas a procedimientos de extracción y purificación de DNA y seguidamente analizadas mediante PCR usando iniciadores específicos para *E. bienersi*, *E. hellem*, *E. cuniculi* y *E. intestinalis* (apéndice, pág. XV).

## Resultados

### Cultivo.

A los 18 días de cultivo se detectó un efecto citopático (CPE) consistente en un alargamiento y distensión de los fibroblastos, que presentaban en su interior una colección de esporas, dando la característica apariencia denominada "mazorca de maíz" (Visvesvara y col., 1991) (Figura E4.1 A). En ese momento la monocapa de células fue tripsinizada y subcultivada. El subcultivo fue observado diariamente y el característico efecto citopático detectado de nuevo a los 5 días de la inoculación. La monocapa fue nuevamente tripsinizada y centrifugada y el sedimento teñido mediante las tinciones de chromotrope y "quick-hot" Gram-chromotrope.

### Microscopía óptica.

La tinción de chromotrope mostró estructuras ovoides de color rosa a rojo ( $2.0-2.5 \times 1.0-1.2 \mu\text{m}$ ), algunas de las cuales presentaban la característica banda ecuatorial (Figura E4.1 B). La tinción de "quick-hot" Gram-chromotrope tiñó estas estructuras de color violeta (Figura E4.1. C), algunas de ellas presentaban en su interior, además de la banda ecuatorial, gránulos gram positivos. Las características morfotintoriales descritas son propias de esporas de microsporidios.

### Microscopía electrónica de transmisión.

La microscopía electrónica de transmisión reveló células infectadas, conteniendo esporas maduras y diferentes estadios evolutivos del parásito en el interior de vacuolas parasitóforas (Figuras E4.2 y E4.3 A y B). También se observaron esporoblastos, esporas maduras y esporas vacías en el medio extracelular (figura E4.3 C, D y E). Las esporas maduras de forma ovalada y con un tamaño medio de  $1.3 \times 2.5 \mu\text{m}$  (rango  $1.0-1.6 \times 2.3-2.7 \mu\text{m}$ ), presentaban una gruesa pared formada por una capa electrodensa (exospora), una gruesa capa electrotransparente (endospora) y una fina membrana plasmática rodeando el contenido de la espora. Las esporas contenían un único núcleo (Figura E4.3 D) y un filamento polar que presentaba entre 4 y 6 vueltas, dispuestas generalmente en una única hilera (Figura E4.3 E). Las características ultraestructurales descritas permiten identificar el aislado como perteneciente al género *Encephalitozoon*. También se observaron esporas teratoides (Figuras E4.6 C y D).

Por otra parte, determinadas células, contenían esporas libres en su citoplasma junto a estadios proliferativos en proceso de degeneración (Figura E4.5) y estructuras compatibles con tubos polares (Figura E4.6 A). Determinados esporoblastos (figura E4.6 B), esporas teratoides (Figura E4.6 D) y esporas maduras (Figura E4.6 E, F y G) presentaban tubos polares con 5 a 7 vueltas dispuestas en doble hilera sugestivos de *E. bieneusi*. No obstante, no se encontraron los estadios merogónicos exclusivos de esta especie que permitiesen confirmar el cultivo mixto.

#### **Inmunofluorescencia indirecta.**

Las esporas reaccionaron, únicamente con en suero anti-*E. hellem*, mostrando una fluorescencia intensa al ser examinadas con un microscopio de epifluorescencia (Figura E4.1 D).

#### **Western blot.**

El análisis del aislado mediante WB, mostró un patrón de reactividad semejante al mostrado por el aislado de referencia *E. hellem* (CDC: 0291: V213). No obstante el antisuero empleado, reconoció con intensidad una banda de aproximadamente 25 KDa en la muestra procedente del aislado en estudio y no en el aislado de la especie homóloga utilizado como comparación. (Figura E4.4 B).

#### **PCR.**

Mediante PCR se observó la amplificación de una banda diagnóstica de 547 pares de bases al emplear iniciadores específicos para *E. hellem*. El DNA extraído del cultivo celular fue también amplificado mediante los iniciadores específicos para *E. bieneusi*. No se observó amplificación usando los iniciadores específicos para *E. cuniculi* y *E. intestinalis*. (Figura E4.4 A).

Debido a la observación previa mediante MET de estructuras sugestivas de *E. bieneusi* en el cultivo celular, se evaluó, la muestra original y distintos subcultivos realizados a los 1, 4, 6, 8 y 12 meses. Una banda de 607 pares de bases, fue amplificada mediante iniciadores especie-específicos de *E. bieneusi* en la muestra original y en las correspondientes a los subcultivos realizados a los 4, 6, 8 y 12 meses de la recepción de la muestra. La presencia de DNA de *E. hellem* fue detectada en todas las muestras analizadas. (Figura E4.4 A).

## Discusión.

Desde la descripción de *E. hellem* (Didier y col., 1991), únicamente se han comunicado 16 casos de infecciones causadas por esta especie: 10 en USA, 3 en Suiza, 2 en Italia, y 1 en Gran Bretaña (Didier y col 1991; Hollister y col., 1993; Schwartz y col., 1993a; Weber y col., 1993a; Visvesvara y col., 1994; Weber y col., 1994a; Scaglia y col., 1994; Didier y col., 1996; Scaglia y col., 1997). En este estudio presentamos el primer caso de aislamiento e identificación de *E. hellem* en España.

La primeras y más frecuentes manifestaciones clínicas observadas en los pacientes infectados por esta especie fueron cuadros de patología ocular, 13 de los casos presentaron queratoconjuntivitis epitelial punctata, otros 3 comunican cuadros ligeros de conjuntivitis y en los 4 restantes no se confirma ni descarta una posible colonización ocular.

La primera autopsia completa realizada en un paciente infectado por *E. hellem* (Schwartz y col., 1992), mostró por un lado el carácter diseminado de la infección al localizar el parásito además de en los ojos, en riñón, uréter, vejiga urinaria, traquea y bronquios. No se observa parasitación de bazo, ganglios linfáticos, hígado, cerebro, corazón, vasos sanguíneos y tracto gastrointestinal. A pesar de no demostrarse el parásito en bronquiolos, neumocitos alveolares o intersticio, el patrón de colonización del árbol traqueobronquial y la presencia de parásitos en los espacios alveolares, sugiere la adquisición de la infección por vía respiratoria. Posteriormente el estudio histopatológico en otro paciente, evidenció la presencia de microsporidios en las células epiteliales de los bronquiolos terminales, permitiendo suponer la adquisición del parásito por vía aérea y su posterior diseminación hematogena hacia otros órganos (Schwartz y col., 1993b). Esta sugerencia se afirma al comprobar la presencia de microsporidios en la orina de 11 de los pacientes, en 5 de ellos no se informa y sólo en uno de ellos la infección se presenta con afectación exclusivamente pulmonar en ausencia del parásito en otras localizaciones (Scaglia y col., 1997). En la mayoría de los casos se identifican otras infecciones oportunistas concomitantes, por lo que el diagnóstico de una o varias de ellas por sí, no permite descartar la infección simultánea por *E. hellem*.

En todos los casos descritos, el diagnóstico inicial de microsporidiosis se realizó mediante microscopía óptica por las tinciones de Giemsa, Gram, calcoflúor y/o chromotrope. En 13 de las ocasiones se identificó el agente a nivel de género mediante

MET. Se realizó el aislamiento del parásito en cultivo celular en 12 de los casos y diferentes líneas celulares se mostraron útiles para este propósito: E6 (Scaglia y col., 1994; Visvesvara y col., 1994), MDCK (Didier y col., 1991; Scaglia y col., 1994; Visvesvara y col., 1994), HLF (Visvesvara y col., 1991; Scaglia y col., 1994; Scaglia y col., 1997), CDC-HME (Visvesvara y col., 1994) y RK13 (Didier et al 1996c).

La definitiva identificación de especie fue realizada por IFI (11 pacientes), SDS-PAGE (8 pacientes), western blot (8 pacientes) y PCR (5 pacientes). En 9 pacientes se utilizaron dos o más de los métodos anteriores.

En relación al tratamiento, no se relata en 5 ocasiones. El tratamiento tópico con itraconazol (1 paciente) y fumagilina (3 pacientes) reporta una mejoría en 3 de los pacientes y cura clínica y parasitológica en uno de ellos. Cuatro de los pacientes recibieron tratamiento sistémico con albendazol con mejoría clínica en uno de ellos, cura en dos de los casos y fracaso terapéutico en el último (Scaglia y col., 1997). Un paciente recibió tratamiento tópico y sistémico (fumagilina mas albendazol) con resolución de la sintomatología y erradicación del parásito (Didier y col., 1996c). Un paciente no tratado presentó cura espontánea (Weber y col., 1993a) y el caso que aquí relatamos murió a los siete días de su ingreso, antes de realizar el diagnóstico

Las manifestaciones clínicas descritas comprueban el carácter diseminado de la infección por *E. hellem*, este comportamiento es compartido por las especies morfológicamente relacionadas: *E. cuniculi* y *E. intestinalis*, habiéndose relatado casos de queratoconjuntivitis, sinusitis y afectación de los sistemas respiratorio y genitourinario (Weber y col., 1994a; Schwartz y Bryan, 1997).

Puesto que el tratamiento de las infecciones causadas por las tres especies con albendazol resulta efectivo en la mayoría de los casos (Weber y col., 1994a; Schwartz y Bryan, 1997), la identificación a nivel de género parece suficiente a tales efectos. Sin embargo, el aislamiento en cultivo e identificación a nivel de especie de diferentes aislados de microsporidios morfológicamente compatibles con los del género *Encephalitozoon*, resulta conveniente por varias razones, permitiendo: el estudio e identificación de especies semejantes; la realización de estudios in vivo e in vitro de nuevas drogas; la obtención de herramientas y materiales para estudios inmunológicos y moleculares, todos ellos de aplicación en el estudio de los microsporidios y de las microsporidiosis.

La identificación de *E. hellem* y *E. cuniculi* no es posible en base a criterios morfológicos (Didier y col., 1991) y *E. intestinales* sólo puede diferenciarse de las anteriores especies en los estadios intracelulares, al presentar en la vacuola parasitófora un material amorfo entre las esporas, no obstante, las esporas de las tres especies son morfológicamente idénticas (Cali y col., 1993). En contraste, cualquiera de los métodos bioquímicos, inmunológicos y moleculares desarrollados permite la identificación de especie. En el caso presentado, los tres métodos de identificación empleados (IFI, WB y PCR), mostraron inequívocamente la presencia de *E. hellem* en el cultivo.

La escasez de datos epidemiológicos acerca de las infecciones por microsporidios en España, es comprensible, pues son escasos los hospitales que realizan el diagnóstico de microsporidiosis. En contraste, en muchos de ellos se utiliza rutinariamente el cultivo celular para el aislamiento de virus a partir de muestras clínicas. Entre las líneas celulares más empleadas, se encuentra la MRC-5, que permite el desarrollo de microsporidios. Consideramos por ello recomendable, mantener y observar periódicamente estos cultivos durante un periodo de 30 días y, en caso de observarse efectos citopáticos inusuales, proceder a investigar la posible presencia de microsporidios. Así precisamente, es como se aisló la cepa de *E. hellem* estudiada, procedente de un lavado broncoalveolar procesado inicialmente para cultivo de Cytomegalovirus.

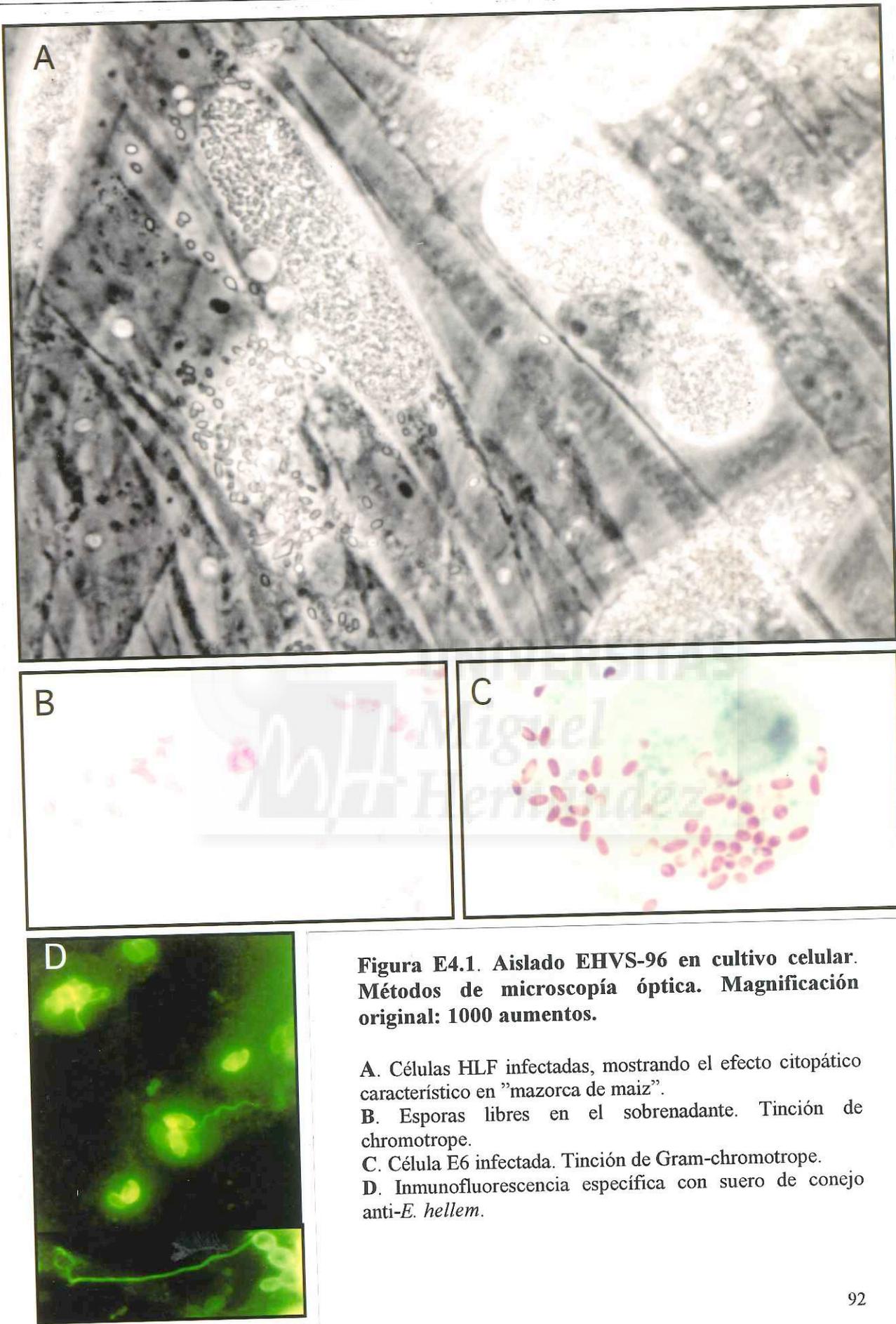
Durante el estudio por microscopía electrónica del cultivo del aislado EHVS-96, observamos estructuras sugestivas de la presencia de otro microsporidio, compatibles con *E. bieneusi*. Otro hecho que apoya esta observación, fue la amplificación obtenida a partir del DNA extraído del cultivo, mediante PCR usando iniciadores específicos para *E. bieneusi*, aunque sólo se obtuvo amplificación en el cultivo original (que había sido congelado) y en los subcultivos mantenidos durante 1, 4, 6 y 8 meses.

Hasta el momento, *E. bieneusi* ha sido aislado y mantenido durante un máximo de 6 meses en cultivo, en una única ocasión (Visvesvara y col., 1995b). Ello indica que existe una gran dificultad para mantener permanentemente en cultivo esta especie. Este hecho, fue también observado por van Gool y col. (1994a) al realizar el aislamiento en cultivo de microsporidios a partir de muestras fecales. Por todo ello no resulta sorprendente el resultado negativo de la PCR en el cultivo mantenido durante 12 meses.

Por otra parte, aunque la presencia de *E. bienewisi* en muestras respiratorias es inusual, ha sido relatada en dos ocasiones (Weber y col., 1992b; del Aguila y col., 1997b). Ambos pacientes presentaban simultáneamente cuadros de diarrea crónica siendo identificado *E. bienewisi* en el exámen coproparasitológico. El paciente objeto de nuestro estudio, también presentaba diarrea crónica atribuida a *Cryptosporidium parvum*, pero debido a que la investigación de microsporidios no se realizó en el hospital de origen, no se pudo disponer en este estudio de otras muestras clínicas (incluidas heces).

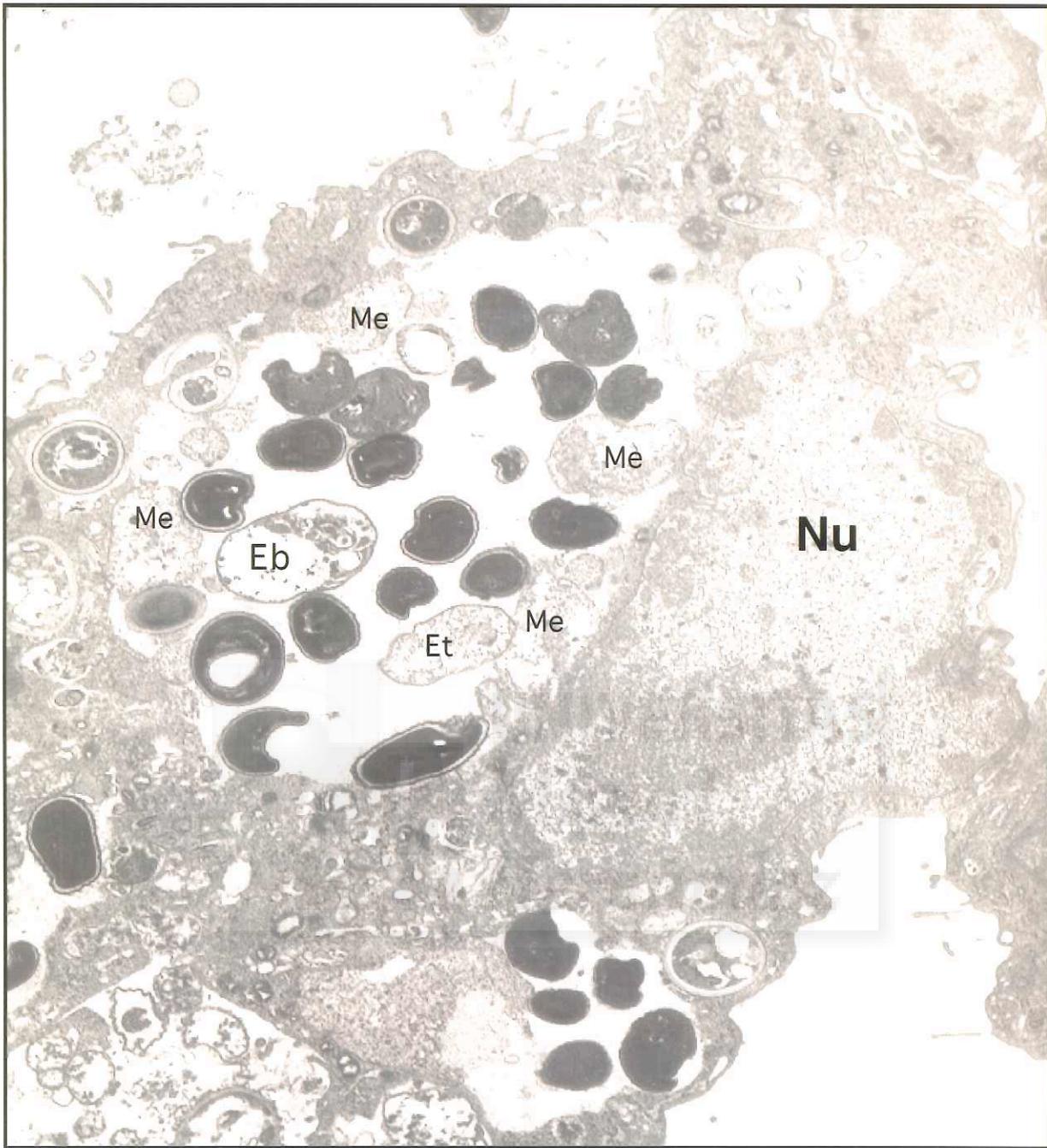
Por todo ello, y a pesar de las evidencias observadas, no podemos emitir conclusiones definitivas ya que no conseguimos observar los estadios merogónicos característicos y exclusivos de esta especie. Además la presencia de esporas libres en el citoplasma de las células en cultivos de *E. hellem*, es un hecho relativamente frecuente (Visvesvara, comunicación personal), al igual que la existencia de formas de desarrollo aberrantes, denominadas esporas teratoides, observadas también en biopsia de un paciente infectado por *E. bienewisi* (Ditrich y col., 1994b).

Concluyendo, mediante microscopía electrónica se observó el crecimiento en cultivo de un microsporidio perteneciente al género *Encephalitozoon*. Los métodos inmunológicos y moleculares realizados en el estudio del cultivo del aislado, permitieron claramente confirmar la presencia de la especie *E. hellem* (denominado EHVS-96), siendo éste, el primer caso descrito de infección por esta especie en España. Adicionalmente, algunos de los datos obtenidos, sugieren la presencia concomitante en cultivo de *E. bienewisi*. Comprobar esta suposición, pondría de manifiesto la posibilidad, nunca relatada, de infecciones mixtas por ambas especies en el hombre.



**Figura E4.1. Aislado EHVS-96 en cultivo celular. Métodos de microscopía óptica. Magnificación original: 1000 aumentos.**

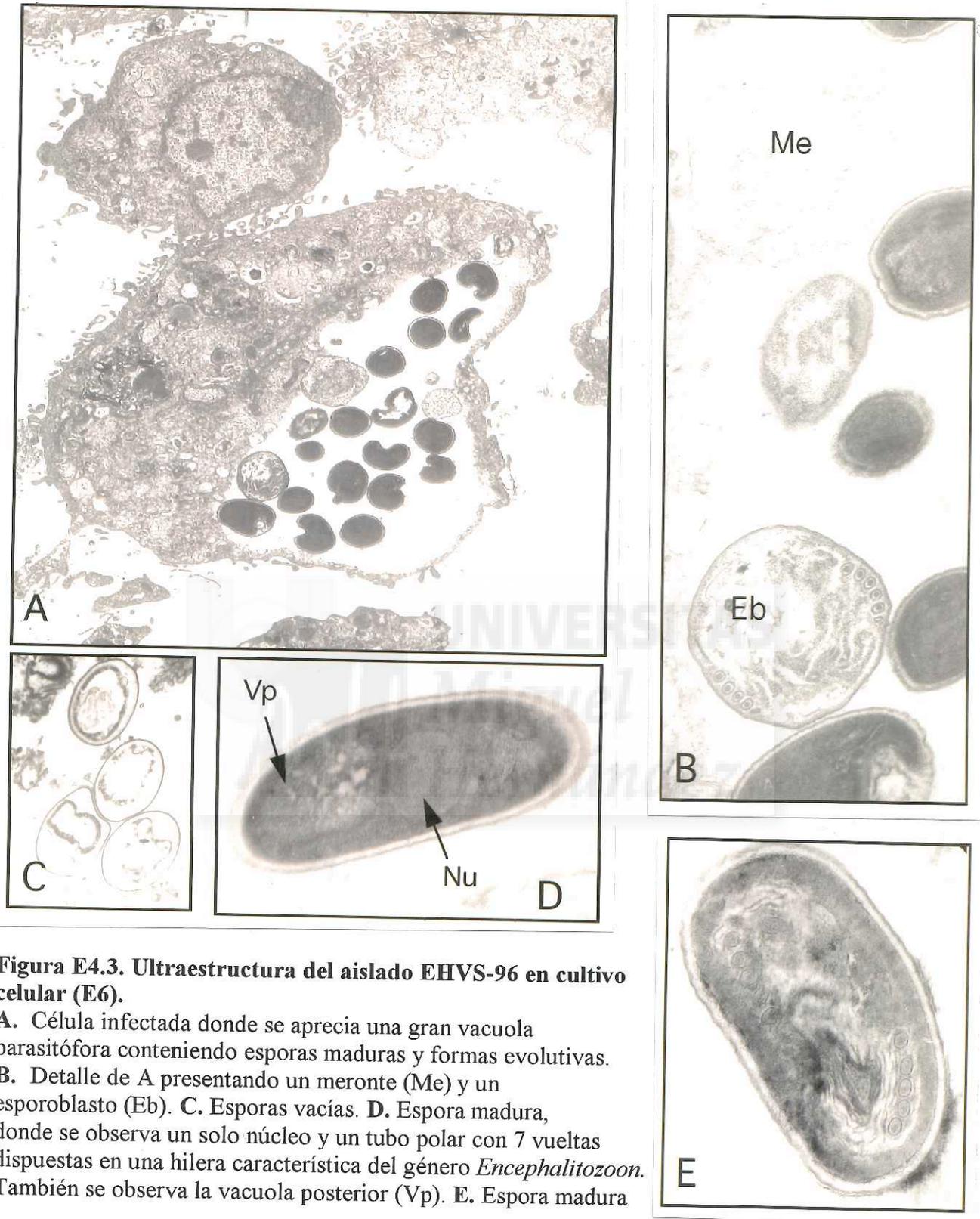
- A. Células HLF infectadas, mostrando el efecto citopático característico en "mazorca de maíz".  
 B. Esporas libres en el sobrenadante. Tinción de chromotrope.  
 C. Célula E6 infectada. Tinción de Gram-chromotrope.  
 D. Inmunofluorescencia específica con suero de conejo anti-*E. hellem*.



**Figura E4.2. Características ultraestructurales del desarrollo del aislado EHVS-96 en cultivo celular.**

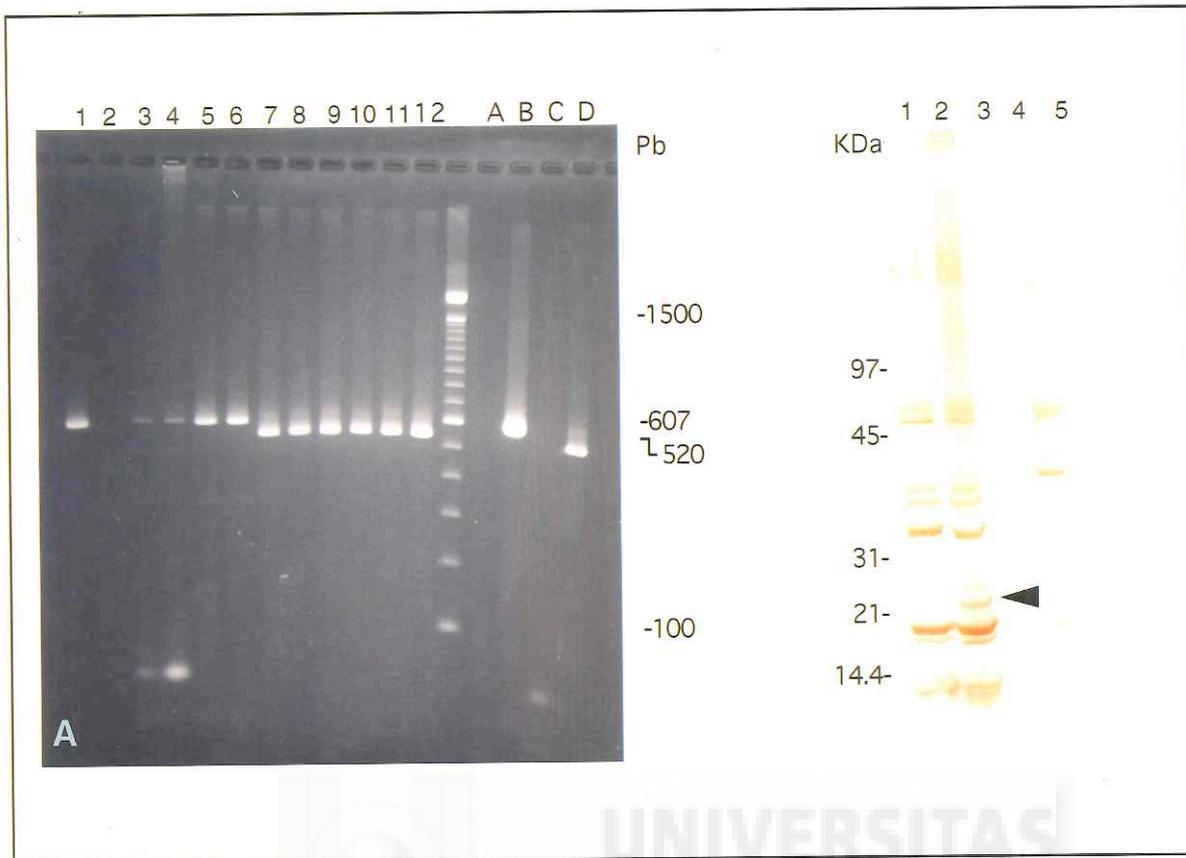
Vacuola parasitófora con los estadios iniciales de desarrollo localizados en la perifería de la vacuola y las esporas maduras libres en el interior de la misma.

Nu: núcleo celular en el que se distingue el nucleolo; Me: merontes; Et: esporonte; Eb: esporoblasto. (Línea celular: E6).



**Figura E4.3. Ultraestructura del aislado EHVS-96 en cultivo celular (E6).**

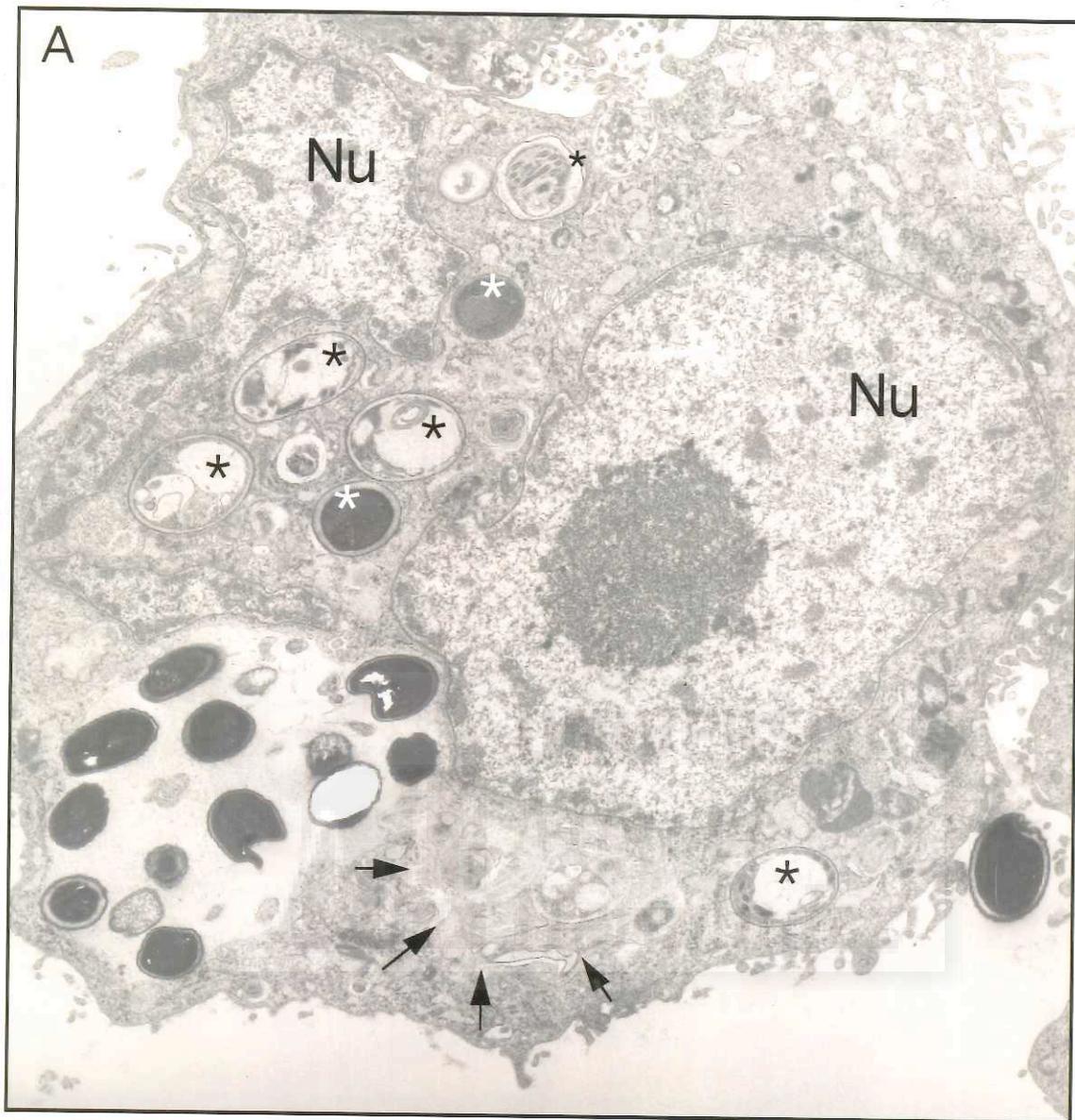
**A.** Célula infectada donde se aprecia una gran vacuola parasitófora conteniendo esporas maduras y formas evolutivas. **B.** Detalle de A presentando un meronte (Me) y un esporoblasto (Eb). **C.** Esporas vacías. **D.** Espora madura, donde se observa un solo núcleo y un tubo polar con 7 vueltas dispuestas en una hilera característica del género *Encephalitozoon*. También se observa la vacuola posterior (Vp). **E.** Espora madura



**Figura E.4.4 Caracterización inmunológica y molecular del aislado EHVS-96.**

**A:** gel de agarosa mostrando los productos amplificados a partir del DNA extraído de los diferentes cultivos del aislado, usando iniciadores específicos para *E. bieneusi* (calles 1 a 6) y *E. hellem* (calles 7 a 12). Cultivo inicial (calles 1 y 7), cultivo 12 meses (calles 2 y 8); cultivo 8 meses (calles 3 y 9); cultivo 6 meses (calles 4 y 10); cultivo 4 meses (calles 5 y 11) y cultivo 1 mes (calles 6 y 12). A y C: control negativo (Dna extraído de células E6); B y D: control positivo ( DNA clonado de la región que codifica el RNA de la subunidad menor ribosomal de *E. bieneusi* (B) y *E. hellem* (D)).

**B:** Patrón de reconocimiento antigénico mediante western blot usando suero policlonal de conejo anti-*E. hellem* frente a extractos proteicos de esporas procedentes de cultivo el células E6 del aislado EHVS-96 (calle 2) y de aislados de referencia: *E. hellem* (calle 1), *E. cuniculi* (calle 3) y *E. intestinalis* (calle 4). La calle 5 corresponde a un extracto de células E6. El aislado EHVS-96 presenta una banda de aproximadamente 25 Kda ausente en el aislado homólogo de referencia (flecha).



**Figura E4.5. Célula E6 parasitada por microsporidios.**

Se observa una vacuola parasitófora típica con esporas maduras en su interior. Esporas maduras y esporoblastos en contacto directo con el citoplasma aparecen señalados con un asterisco. Las flechas indican la presencia de formas proliferativas en proceso de degeneración.

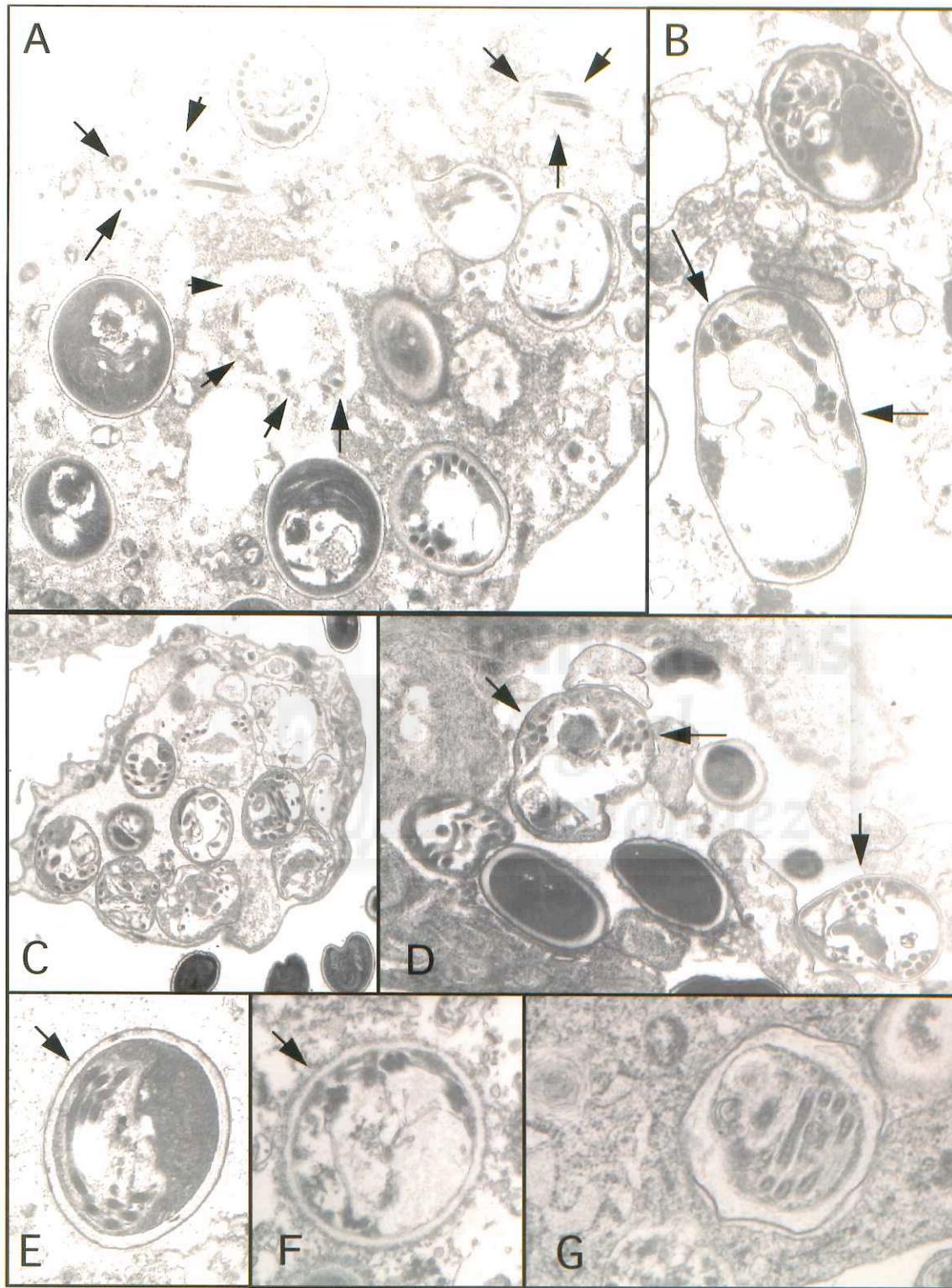


Figura E4.6. Microscopía electrónica de transmisión del aislado EHVS-96 en cultivo de células E6.

**Figura E6.6. (continuación).**

**A:** Célula presentando esporoblastos y esporas compatibles morfológicamente con *Encephalitozoon* spp. libres en su citoplasma. Junto a ellas se observan secciones longitudinales y transversales de tubos polares (flechas) también libres en el citoplasma .

**B:** Esporoblasto mostrando en sección transversal un tubo polar con 6 vueltas dispuesto en doble hilera (flechas).

**C:** esporas teratoides.

**D:** estadios esporogónicos anormales o en proceso de degeneración en los que se aprecian tubos polares con las características descritas en B (flechas).

**E, F y G:** esporas maduras conteniendo tubos polares con la disposición descrita en B. En el interior de una de las esporas (F) se observa un aparato de extrusión doble.





---

***ESTUDIO 5***

## **CARACTERIZACION MICROSCOPICA, INMUNOLOGICA Y MOLECULAR DE MICROSPORIDIOS EN HECES HUMANAS Y DE ANIMALES PROCEDENTES DEL ESTADO DE PUEBLA (MEJICO).**

### **Objetivo**

Identificar a nivel de especie, los microsporidios detectados en muestras fecales procedentes de humanos y diferentes animales.

### **Materiales y Métodos**

#### **Muestras fecales.**

Sesenta y cuatro muestras de heces fueron seleccionadas a partir de un estudio epidemiológico realizado en dos localidades rurales del estado de Puebla (Méjico) (Enriquez y col., en prensa). Las muestras habían sido conservadas en formalina al 10% durante un periodo entre 6 y 9 meses y en el momento de iniciar el estudio, fueron concentradas con etil-acetato, resuspendidas con dicromato potásico al 2.5% y almacenadas a 4°C hasta su análisis. Todas ellas contenían esporas de microsporidios que habían reaccionado positivamente al ser analizadas mediante inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo monoclonal (AcMc) denominado 3B6. Este AcMc reconoce epitopos presentes en la exospora de microsporidios pertenecientes al género *Encephalitozoon* (Enriquez y col., 1997b).

#### **Microscopía óptica (MO).**

En primer lugar las muestras fueron teñidas mediante el método de quick-hot Gram-chromotrope, descrito en el estudio experimental 1. para estudio microscópico (apéndice, pág. IV).

#### **Inmunofluorescencia indirecta (IFI).**

Seguidamente las muestras se procesaron mediante IFI (apéndice, pág. VII), usando sueros policlonales anti-*E. cuniculi* (CDC:V282), anti-*E. hellem* (CDC:0291:V213) y anti-*E. intestinalis* (CDC: V297) obtenidos de conejos inmunizados con esporas de microsporidios aislados de pacientes VIH + (Apéndice, pág. VIII). Las esporas se visualizaron mediante un microscopio de epifluorescencia a 400 aumentos.

### Reacción en cadena por la polimerasa (PCR).

Por último, las muestras fueron sometidas a procedimientos de extracción y purificación de DNA y analizadas mediante PCR usando iniciadores específicos para *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* y *E. bieneusi* (apéndice, pág. XV). Se analizaron diferentes volúmenes (10, 1 y 0,1  $\mu$ l) de cada muestra con el propósito de detectar muestras con baja concentración de DNA de microsporidios. La presencia de inhibidores de la PCR fue monitorizada adicionando 0,1 ng de DNA clonado correspondiente a la región que codifica el SSU-rRNA de cada especie de microsporidio ensayada. Los productos de amplificación, fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio (apéndice, pág. XVII).

### Microscopía electrónica de transmisión (MET).

Tres muestras con carga parasitaria alta, procedentes de una vaca, un cerdo y una cabra fueron seleccionadas para MET y procesadas con los métodos habituales (apéndice, pág. IV).

## Resultados

### MO.

El examen microscópico tras tinción, demostró en todas las muestras, la presencia de esporas de microsporidios con una longitud aproximada de 1.5 a 2.0  $\mu$ m (Figura E5.1 A, B, C, D y E). Adicionalmente, un segundo tipo de esporas, morfológicamente distintas y de mayores dimensiones fueron observadas en las muestras de aves. Este hecho había sido previamente constatado mediante el método de IFI usando el AcMc 3B6. Es importante resaltar la presencia de grupos de esporas en el interior de células epiteliales en las heces de varias especies de mamíferos (hombre, cerdo, vaca, cabra, perro y burro) (Figura E5.1 A, B, E y F).

### MET.

La microscopía electrónica de transmisión mostró en las heces de los tres animales estudiados, esporas sugestivas de género *Encephalitozoon*. El examen de la muestra procedente de la cabra, reveló la presencia de células epiteliales degeneradas, conteniendo en su interior diferentes estadios evolutivos del parásito. En una de esas células (probablemente un enterocito), se pudo reconocer claramente una vacuola parasitófora

conteniendo esporas maduras e inmaduras (Figura E5.2A). Las esporas contenían un tubo polar con 5 a 7 vueltas dispuestas en una sola hilera. El tamaño y los hallazgos ultraestructurales son consistentes con los descritos para los miembros de género *Encephalitozoon* (Figura E5.2E). En las heces del cerdo, solo se observaron esporas vacías (Figura E5.2B). En las heces de la vaca, se observaron numerosas esporas maduras con idénticas características morfológicas a las esporas presentes en las heces de la cabra (Figura E5.2D), junto a esporas vacías y tubos polares extruidos (Figura E5.2C), indicando que las esporas habían descargado su contenido en las heces. En esta muestra se identificaron también, células epiteliales conteniendo vacuolas parasitóforas intactas con estadios evolutivos en su interior (Figura E5.3A). Alguna de estas células parecía presentar, además, esporas libres en su citoplasma con características ultraestructurales sugestivas de *E. bieneusi* (Figura E5.3B).

#### IFI.

Ninguna de las muestras reaccionó con el suero anti-*E. hellem*. Tres de ellas presentaron esporas reconocidas por el suero anti-*E. cuniculi*. Sin embargo, 32 de las muestras contenían esporas fluorescentes (Figura E5.1 F, G, H e I), cuando fueron ensayadas con el suero anti-*E. intestinalis*. (Tabla E5).

#### PCR.

Ninguna de las muestras mostró amplificación mediante los iniciadores específicos para *E. cuniculi* o *E. hellem*. Un fragmento de DNA de 520 pares de bases, diagnóstico de *E. intestinalis* fue amplificado en 18 de las 32 muestras positivas en el método de IFI usando el suero anti-*E. intestinalis* (Tabla E5, Figura E5.4 A). En 8 de las muestras procedentes de animales (2 cerdos, 2 vacas, 1 cabra, 1 gato, 1 pavo y 1 pollo) se observó amplificación de un fragmento de DNA de 607 pares de bases empleando los iniciadores para *E. bieneusi* (Figura E5.4 B). La muestra procedente de una vaca que había sido seleccionada para MET (Figuras E5.2 y E5.3), mostró tras PCR, productos de amplificación específicos usando iniciadores tanto de *E. intestinalis* como de *E. bieneusi* (Figura E5.4 A y B). Este resultado fue observado en otros 3 animales (2 cerdos, 1 cabra), indicando la ocurrencia en los mismos de infección concomitante por ambas especies.

La presencia de inhibidores de la PCR fue observada en 10 muestras que necesitaron de una etapa de purificación adicional. Un ejemplo de ello se muestra en la

figura E5.4.C. En la muestra procedente de una cabra (calles 1 a 4), se observan productos de amplificación específicos de *E. intestinalis* usando 10 y 1  $\mu$ l de extracto fecal (calles 1 y 2, respectivamente) pero no se observa amplificación al usar un volumen de 0,1  $\mu$ l (calle 3). La reacción es más eficiente, usando un volumen de 1  $\mu$ l que un volumen de 10  $\mu$ l, probablemente debido a la presencia de inhibidores de la PCR. La calle 4, corresponde a esta muestra adicionada de DNA clonado. La presencia de inhibidores de la PCR, es más evidente en una muestra procedente de un burro (calles 5 a 8). No se aprecia amplificación al emplear 10  $\mu$ l del extracto de DNA fecal (calle 5), ni en la muestra adicionada de DNA clonado (calle 8). Sin embargo, se obtuvo amplificación con 1  $\mu$ l (calle 6) y la señal fue más intensa con 0,1  $\mu$ l (calle 7), indicando dilución de los inhibidores. En esta figura también se presenta, una muestra negativa, sin inhibidores (calles 9 a 12).

**Tabla E5. Identificación de *E. intestinalis***

Muestras	Número (positivas)	IFI positivas	PCR positivas
<b>Cabra</b>	2 (2)	2	2
<b>Gato</b>	6 (0)	-	-
<b>Pavo</b>	10 (0)	-	-
<b>Cerdo</b>	8 (7)	7	5
<b>Vaca</b>	6 (5)	5	4
<b>Pollo</b>	11 (0)	-	-
<b>Perro</b>	5 (4)	4	1
<b>Burro</b>	3 (2)	2	1
<b>Hombre</b>	13 (12)	12	5
<b>TOTAL</b>	64 (32)	32	18

### Discusión.

Las fuentes de infección de los microsporidios patógenos para el hombre, particularmente *E. intestinalis*, y los modos de transmisión permanecen inciertos. Personas o animales infectados con microsporidios, eliminan esporas al ambiente por las heces, orina, y secreciones respiratorias, siendo, posiblemente una fuente de infección. Los datos epidemiológicos que disponemos son limitados y hay escasos estudios que indiquen el

potencial reservorio animal de las especies de microsporidios que infectan al hombre (*E. bienewisi*, *E. hellem* y *E. cuniculi*) (Desplazes y col., 1996; Didier y col., 1995a; Black y col., 1997; Mansfield y col., 1997).

La infección debida a *E. cuniculi* es actualmente considerada una zoonosis (Desplazes y col., 1996; Didier y col., 1996b). Hay descritas tres diferentes cepas de *E. cuniculi* (denominadas canina, ratón y conejo) identificadas mediante análisis de los antígenos de la espora por western blot, mediante amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos de DNA y detección de diferencias en la región intergénica del DNA ribosomal. Las cepas canina y de conejo han sido identificadas en tres y seis pacientes infectados, respectivamente (Desplazes y col., 1996; Didier y col., 1996b; Weber y col., 1997). Sin embargo, sólo existe una comunicación demostrando la infección por *E. hellem* en pájaros. (Black y col., 1997) En este estudio, la identificación de especie se realizó mediante southern blot utilizando una secuencia de oligonucleótidos específica de este microsporidio. La presencia de *E. bienewisi* ha sido descrita, por primera vez, en las heces de cerdos mediante PCR (Desplazes y col., 1996).

En el presente estudio demostramos, mediante la tinción de "quick-hot Gram chromotrope" la presencia de esporas de microsporidios en 51 muestras de animales y en 13 de humanos inmunocompetentes originarias de dos poblaciones rurales de Méjico Central. Sin embargo, aunque el AcMc 3B6 reconoció las esporas observadas en las muestras procedentes de aves, éstas eran de mayores dimensiones que las observadas en las muestras de mamíferos. Este hallazgo no sorprende, ya que, el AcMc 3B6 también reconoce microsporidios parásitos de insectos (Enriquez y col., 1997b). Esporas de *Encephalitozoon* spp. fueron identificadas en las heces del 7,8% de individuos que viven en las dos comunidades estudiadas (Enriquez y col., en prensa).

La observación mediante microscopía electrónica de esporas típicas de *Encephalitozoon* spp., junto a otras sugestivas de *E. bienewisi*, nos motivó a identificar mediante técnicas especie-específicas (IFI y PCR), las especies observadas.

Se identificaron esporas de *E. intestinalis* usando suero policlonal de conejo anti-*E. intestinalis* en 32 hospedadores humanos y animales. Es más, en las muestras procedentes de 18 de ellos, se consiguió confirmar la presencia de esta especie mediante amplificación de DNA usando iniciadores especie-específicos (Da Silva 1997a). También mediante PCR

se detectó la presencia de DNA de *E. bieneusi* (Da Silva et al., 1997b) en las muestras fecales de 8 animales, siendo que 4 de ellos presentaban infección mixta por ambas especies. Los resultados obtenidos mediante el suero anti-*E. cuniculi* (3 muestras positivas), no pudieron ser confirmados mediante métodos moleculares, por lo que no podemos emitir conclusiones al respecto. Dos razones pueden explicar este resultado: a) Baja concentración de DNA en la muestra por degradación espontánea del mismo y/o debido a la conservación de las muestras en formol y b), reactividad cruzada del suero anti-*E. cuniculi* empleado con las esporas pertenecientes a otra especie de microsporidio.

No sabemos si la presencia de esporas de *E. intestinalis* y *E. bieneusi* libres en las heces de estos animales puede significar colonización/infección por el parásito o simplemente tránsito de las mismas por su aparato digestivo. Sin embargo, la presencia de esporas y estadios evolutivos de microsporidios en el interior de células epiteliales encontradas en heces de estos animales sugiere que estos sirven como hospedadores de estas especies de microsporidios. Esta es la primera vez que se identifica *E. intestinalis* en hospedadores no humanos y la segunda que detecta *E. bieneusi* en animales. Nuestros resultados muestran que los animales portadores *E. intestinalis* y *E. bieneusi*, eliminan esporas al ambiente. Ahora bien, estos hallazgos, no demuestran si los animales representan una fuente de infección para el hombre, ya sea por vía oral en forma de comida o agua contaminada o por vía aérea. La transmisión oral de microsporidios ha sido documentada en experimentación animal (Canning y Lom 1986, Tzipori y col., 1997) y además, dos comunicaciones previas en pacientes con sida, sugieren que *E. cuniculi* fue adquirido por esta vía (Franzen y col. 1995c, Weber y col., 1997). La posibilidad de transmisión mediante aerosoles, ha sido también sospechada mediante hallazgos histopatológicos en pacientes con sida e infección diseminada por *E. hellem* (Schwartz y col., 1992; Schwartz y col., 1993b) y *Encephalitozoon* sp. (Mertens y col., 1997). Posteriores estudios serán necesarios para demostrar si *E. intestinalis* presenta el mismo comportamiento

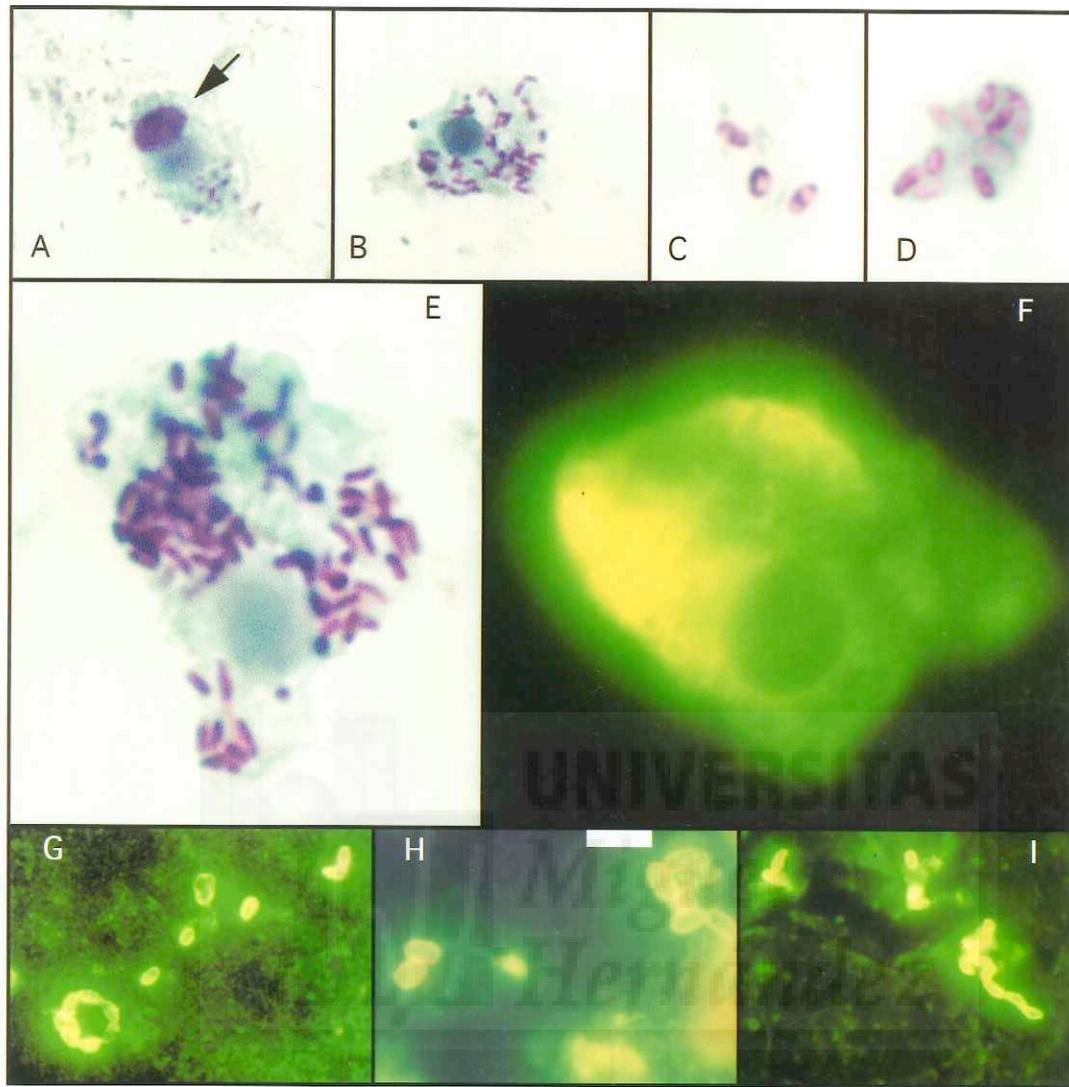
Es importante, en este punto enfatizar que la aplicación de la técnica de PCR en el análisis de muestras fecales debe realizarse con precaución para evitar la interpretación de resultados falsos negativos. La concentración de DNA parasitario puede ser baja, y en esos casos, la amplificación se observará cuando se utilicen para la reacción grandes volúmenes de muestra. Por otro lado, la presencia en determinadas muestras de inhibidores de la PCR,

sólo permite una adecuada amplificación cuando éstas están más diluidas. (Da Silva y col. 1997b; Ommbruck y col., 1997). En este estudio, ensayamos todas las muestras usando tres diluciones y control interno de la misma, a fin de garantizar la interpretación de los resultados. El criterio utilizado para considerar una muestra negativa, implicó la ausencia de amplificación en todas las diluciones junto con una amplificación de intensidad igual al control positivo en la muestra adicionada de DNA clonado.

Entre las especies de microsporidios que infectan al hombre, *E. intestinalis* es sin duda la segunda en importancia tras *E. bienewsi* (Weber y col., 1994a; Schwartz y Bryan, 1997). Esta especie posee la capacidad de diseminar causando infección en diferentes órganos y tejidos. La evidencia de la presencia de estas especies en otros animales, puede servir de soporte para futuras investigaciones con el objetivo de conocer: la distribución de la especie en otros animales y la localización del parásito en sus órganos y tejidos, el potencial papel patógeno en determinados casos y las diferentes vías de excreción del parásito al medio ambiente.

Entre los animales estudiados, únicamente los mamíferos excretan esporas de *E. intestinalis* por las heces. Una vez demostrada la presencia de *E. intestinalis* en animales domésticos (perro y burro) y de *E. intestinalis* y/o *E. bienewsi* en animales utilizados para el consumo humano (cerdo, vaca, cabra, pollo y pavo), es importante definir si las infecciones por *E. intestinalis* en ellos se presentan de forma diseminada y si es así, cuáles son los órganos diana de la infección.

El mantenimiento en cultivo de *E. bienewsi* no ha sido aún logrado (Visvesvara y col., 1995b). Sin embargo, el cultivo in vitro de cepas de *E. intestinalis* aisladas de animales, sería de gran importancia para definir nuevos marcadores moleculares que permitan realizar estudios epidemiológicos más detallados. Todo ello contribuirá en beneficio de la población de riesgo y permitirá implantar medidas profilácticas adecuadas en el caso de que sea probado que la infección por *E. intestinalis* es una zoonosis.



**Figura E5.1. Métodos de microscopía óptica empleados en la detección de esporas de microsporidios en heces procedentes de humanos y animales.**

**A-E:** tinción de Gram-chromotrope. **F-I:** inmunofluorescencia indirecta con suero anti-*E. intestinalis*. **A:** cabra (400x); **B:** perro (1000x); **C:** cerdo; **D:** vaca (1000x); **E:** burro (400x); **F:** humano (1000x); **G:** vaca (400x); **H:** humano (1000x); **I:** cerdo (400x). Se observan cadenas de esporoblastos (**G** e **I**) y esporas en el interior de células epiteliales (**A**, **B**, **E** y **F**). En una de las células epiteliales (**A**) se aprecia nítidamente una vacuola parasitófora (flecha).

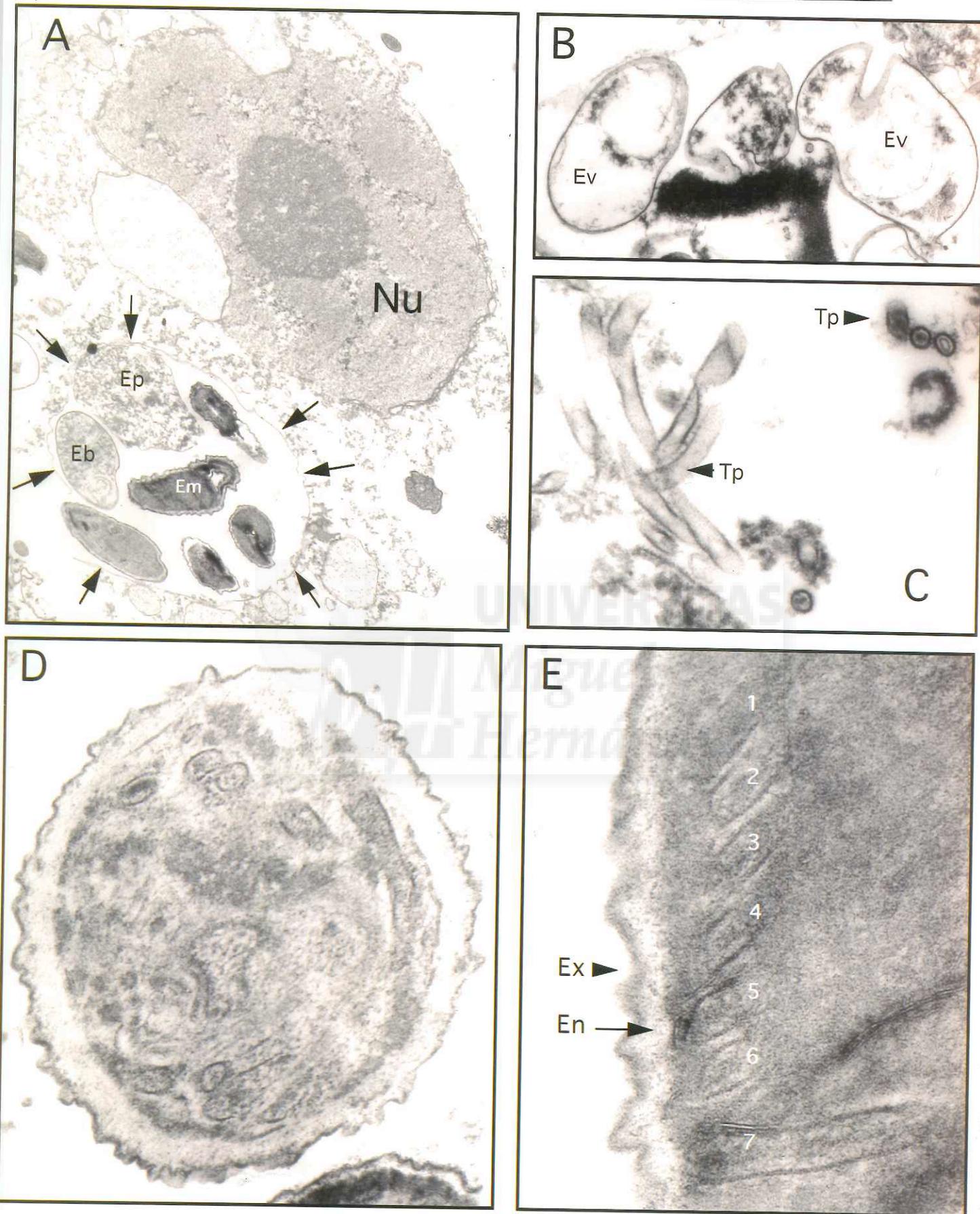


Figura E5.2. Ultraestructura de microsporidios en muestras fecales de animales. 107

**Figura E5.2. Microscopía electrónica de transmisión mostrando la ultraestructura de microsporidios presentes en heces de una cabra, un cerdo y una vaca.**

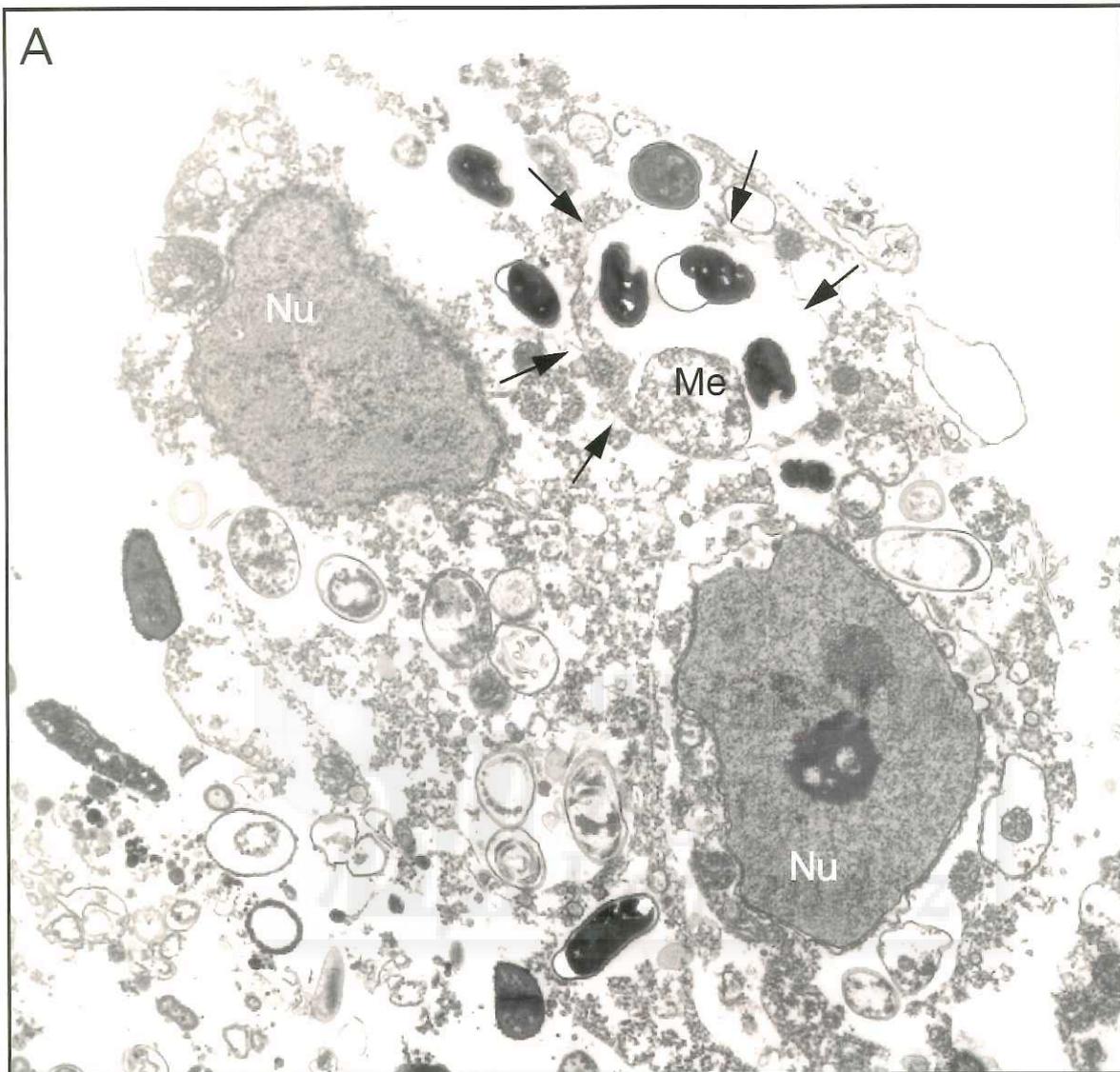
**A:** célula epitelial degenerada presente en las heces de una cabra. Se observa el núcleo (Nu) preservado, incluyendo el nucleolo y la membrana nuclear. En el citoplasma degenerado se distingue una vacuola parasitófora (flechas), conteniendo distintas formas evolutivas: esporonte (Ep), esporoblasto (Eb) y esporas maduras (Em) compatibles con las del género *Encephalitozoon*. No se aprecian septos entre las esporas, pero es posible que esas estructuras hayan degenerado en la célula necrótica al su paso por las heces.

**B:** esporas vacías (Ev) de microsporidios observadas en las heces de un cerdo.

**C:** tubos polares de microsporidios extruídos en las heces de una vaca. Las características ultraestructurales se visualizan nítidamente en las secciones transversales de los mismos.

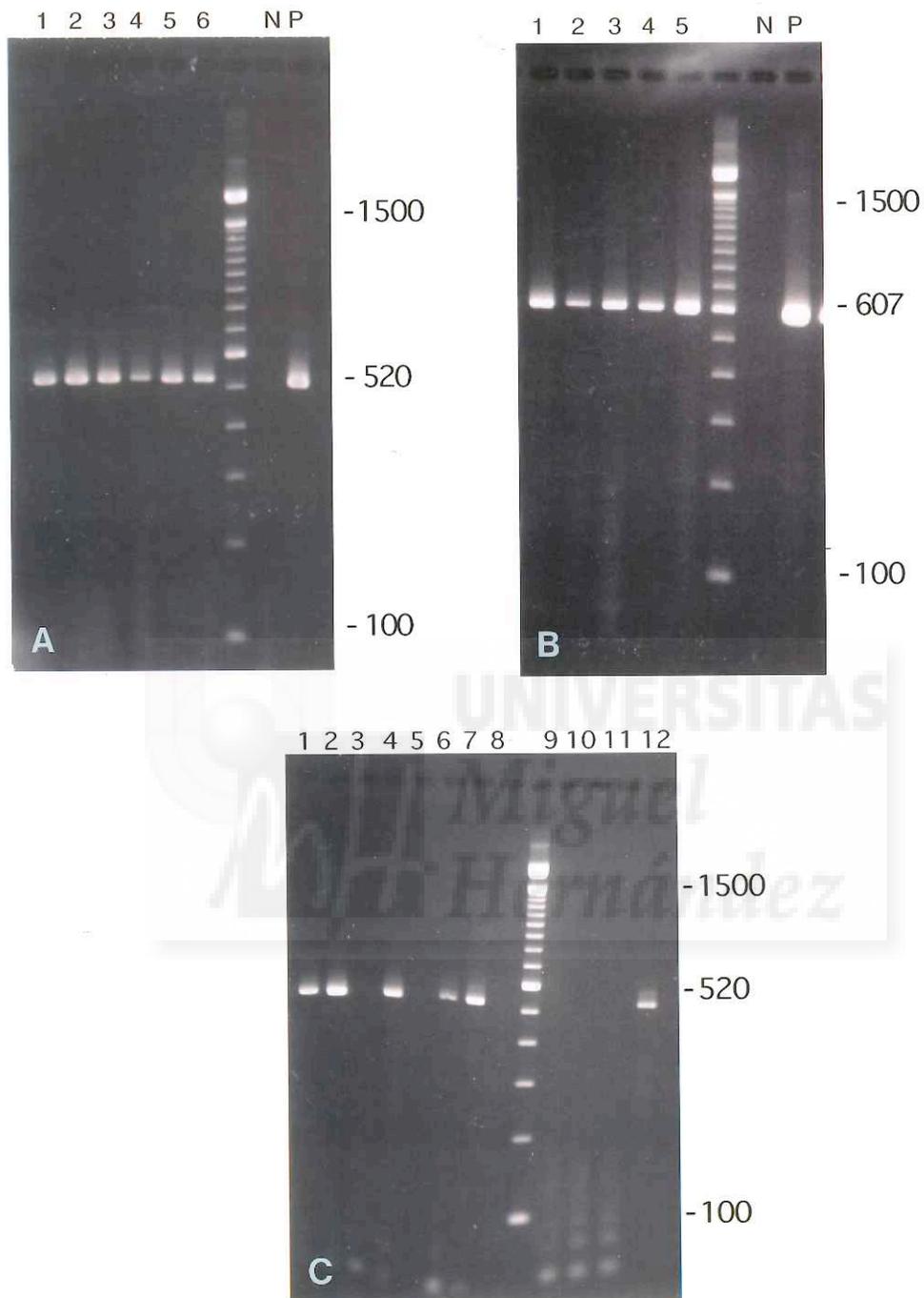
**D:** espora madura de microsporidio observada en las heces de una vaca.

**E:** sección transversal de una espora madura de microsporidio presente en heces de cabra, ilustrando la exospora (Ex), la endospora (En) y un tubo polar con siete vueltas (1 a 7).



**Figura E5.3. Ultraestructura de células epiteliales parasitadas por microsporidios presentes en las heces de una vaca.**

**A:** se observa una vacuola parasitófora intacta (flechas) con un meronte (Me) y esporas maduras en su interior, junto a microsporidios libres en el citoplasma. **B:** tubo polar con 6-7 vueltas dispuestas en doble hilera (flecha) en un esporoblasto



**Figura E5.4.** Análisis en gel de agarosa de los productos de amplificación tras PCR de extractos fecales usando iniciadores especie-específicos de microsporidios.

**Figura E5.4. Análisis en gel de agarosa de los productos de amplificación tras PCR de extractos fecales usando iniciadores especie-específicos de microsporidios.**

**Figura E5.4 (continuación).**

**A:** Gel de agarosa que muestra los productos de la PCR usando iniciadores específicos de *E. intestinalis*. Calles 1 a 6: muestras fecales de mamíferos. Vaca (calle 1), cerdo (calle 2), cabra (calle 3), hombre (calle 4), perro (calle 5) y burro (calle 6). N: control negativo. P: control positivo. Los números a la derecha de los geles indican el tamaño de los fragmentos de DNA en pares de bases.

**B:** Gel de agarosa que muestra los productos de la PCR usando iniciadores específicos de *E. bieneusi*. Calles 1 a 5: muestras fecales de mamíferos y aves. Vaca (calle 1), cerdo (calle 2), gato (calle 3), pavo (calle 4) y pollo (calle 5). N: control negativo. P: control positivo. Los números a la derecha de los geles indican el tamaño de los fragmentos de DNA en pares de bases.

**C:** Gel de agarosa que muestra los productos de la PCR usando diferentes concentraciones de DNA purificado de heces. Calle 1 a 4: heces de burro. Calles 5 a 8: heces de cerdo. Calles 9 a 12: heces de pollo. Calles 1,5 y 9 (10  $\mu$ l); calles 2,6 y 10 (1  $\mu$ l); calles 3,7 y 11 (0,1  $\mu$ l); calles 4, 8 y 12, controles de las muestras (10  $\mu$ l de las respectivas muestras más 10  $\mu$ l de DNA purificado conteniendo 0,1 ng de DNA clonado correspondiente a la región que codifica el SSU-rRNA de *E. intestinalis*. Los números a la derecha de los geles indican el tamaño de los fragmentos de DNA en pares de bases.



---

***CONCLUSIONES***

## CONCLUSIONES.

1. Modificamos el método de tinción de Gram-chromotrope, permitiendo reducir el tiempo de coloración a tan sólo 5 minutos y lo denominamos "quick-hot" Gram-chromotrope. Este método permite realizar la detección de microsporidios en tan sólo 5 minutos, siendo de gran utilidad en el diagnóstico parasitológico. Hemos evaluado su eficacia en muestras clínicas de diversas procedencias, y demostrado su utilidad en cortes de tejidos incluidos en parafina al permitir la observación de las características morfológicas de los mismos.
2. Desarrollamos y evaluamos un método de extracción de DNA en muestras fecales, seguido de reacción en cadena por la polimerasa, usando iniciadores especie-específicos de *E. bienewsi* y *E. intestinalis*.

Los resultados obtenidos permitieron:

- a) Determinar el efecto que causa la fijación con formalina al 10% de las muestras fecales en el diagnóstico molecular de las microsporidiosis intestinales. Nuestros datos revelan que los efectos nocivos de la fijación, son progresivos en función del tiempo. El rendimiento del método descrito, no se vió afectado durante los primeros 10 días, descendió a aproximadamente el 50% en las muestras fijadas por un periodo entre 6 y 12 meses y fue nulo en muestras conservadas durante más de dos años.
- b) Controlar la presencia de inhibidores de la PCR en cada una de las muestras ensayadas, mediante el uso de controles internos. Este procedimiento elimina la emisión de resultados falsos negativos y permite cuantificar la eficacia del método de extracción en la reducción de los inhibidores, obteniéndose un rendimiento del 84,3 % sin necesidad de purificación adicional..
- c) Identificar las especies de microsporidios presentes en las muestras fecales humanas y de animales analizadas, comprobando la utilidad del método tanto con fines diagnósticos en patología humana, como en el estudio epidemiológico conducido para detectar animales portadores, reservorios potenciales, de las especies que infectan al hombre.

3. Determinamos mediante inmunofluorescencia indirecta, la sensibilidad y especificidad de un suero policlonal de conejo anti-*E. intestinalis* y la aplicación del mismo en la detección de esta especie en muestras fecales procedentes de pacientes con diarrea crónica. Los resultados obtenidos mostraron, en la serie estudiada una prevalencia de infección por esta especie del 18,3 % y permitió la detección de infecciones mixtas (*E. bienewisi* y *E. intestinalis*) en el 5,7 % de los pacientes que presentaban microsporidiosis en las heces.
4. Aislamos en cultivo e identificamos un microsporidio procedente de un paciente con sida y neumonía, que falleció antes de llegar al diagnóstico de la infección. Demostramos mediante métodos microscópicos, inmunológicos y moleculares la presencia en cultivo de *E. hellem*, siendo éste el primer caso descrito en nuestro país. Mantenemos la sospecha del aislamiento y desarrollo simultáneo en el cultivo de *E. bienewisi* y continuamos intentando confirmar esta suposición.
5. Demostramos la presencia de microsporidios en individuos inmunocompetentes y en algunos de sus animales domésticos, tras estudiar sus muestras fecales mediante microscopía electrónica, inmunofluorescencia indirecta y reacción en cadena por la polimerasa. Los resultados obtenidos confirman la presencia de *E. bienewisi* en cerdos y, por primera vez, en otros animales (vaca, cabra, gato, pavo y pollo). Finalmente, es ésta la primera ocasión en que la especie *E. intestinalis* es caracterizada en hospedadores no humanos (cerdo, vaca, cabra, perro y burro). El hallazgo de estadios de desarrollo del parásito en el interior de células epiteliales presentes en las heces, fundamenta la convicción de que las infecciones por microsporidios sean, realmente, una zoonosis.



---

***BIBLIOGRAFIA***

- ALBRECHT, H., STELLBRINK, H.J., SOBOTTKA, I. 1995a. Failure of itraconazole to prevent *Enterocytozoon bieneusi* infection [letter]. *Genitourin. Med.* **71**: 325-6.
- ALBRECHT, H., SOBOTTKA, I., STELLBRINK, H.J., GRETEN, H. 1995b. Does the choice of *Pneumocystis carinii* prophylaxis influence the prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in AIDS patients? [letter]. *AIDS* **9**: 302-3.
- ALDRAS, A.M., ORENSTEIN, J.O., COTLER, D.P., SHADDUCK, J.A., DIDIER, E.S. 1994. Detection of microsporidia by indirect immunofluorescence antibody test using polyclonal and monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 608-612.
- ANWAR-BRUNI, D.M., HOGAN, S.E., SCHWARTZ, D.A., WILCOX, C.M., BRYAN, R.T., LENNOX, J.L. 1996. Atovaquone is effective treatment for the symptoms of gastrointestinal microsporidiosis in HIV-1-infected patients. *AIDS* **10**: 619-23.
- ASH, L., ORIEL, T.C. 1987. Collection and preservation of feces. En: *Parasites: A Guide to Laboratory Procedures And Identification*. 1<sup>st</sup> de. Chicago, American Society of Clinical Psychologist p. 5-53
- ASMUTH, D.M., DEGIROLAMI, P.C., FEDERMAN, M., EZRATTY, C.R., PLESKOW, D., KDESAL, G., WANKE, C.A. 1994. Clinical features of microsporidiosis in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **18**: 819-25.
- ASHTON, N., WIRASINHA P.A. 1973. Encephalitozoonosis (Nosematosis) of the cornea. *Brit. J. Ophthalmol.* **57**: 669-674.
- AVERY, S.W., UNDEEN A.H. 1987. The isolation of microsporidia and other pathogens from concentrated ditch water. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **3**: 54-58.
- BAKER, M. D., VOSSBRINCK, C. R., MADDOX, J. V. & UNDEEN, A. H. 1994. Phylogenetic relationship among *Vairimorpha* and *Nosema* species (Microspora) based on ribosomal RNA sequence data. *J. Invert. Patol.* **64**:100-106.
- BAKER, M.D., VOSSBRINCK, C.R., DIDIER, E.S., MADDOX, J.V., SHADDUCK, J.A. 1995. Small subunit ribosomal DNA phylogeny of various microsporidia with emphasis on AIDS related forms. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**: 564-570.
- BALBIANI, G. 1882. Sur les microsporidies ou sporospermies des articules. *C. R. Acad. Sci. Paris* **95**: 1168-1171.
- BEAUGERIE, L., TEIHAE, M.F., DELOUL, A.M., FRITSCH, J., GIRARD, P.M., ROZENBAUM, W., LE QUINTREC, Y., CHATELET, F.P. 1992. Cholangiopathy associated with Microsporidia infection of the common bile duct mucosa in a patient with HIV infection. *Ann. Intern. Med.* **117**: 401-402.
- BEAUVAIS, B., SARFATI, C., MOLINA, J.M., LESOURD, A., LARIVIERE, M., DEROUIN, F. 1993. Comparative evaluation of five diagnostic methods for demonstrating microsporidia in stool and intestinal biopsy specimens. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **87**: 99-102.
- BECKERS, P.J.A., DERKS, G.J.M.M., VAN GOOL, T., RIETVELD, F.J.R., SAUER, W., EIN, R.W. 1996. *Encephalitozoon intestinalis* - specific monoclonal antibodies for laboratory diagnosis of microsporidiosis. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 282-285.
- BECNEL, J.J., SPRAGUE, V. 1998. Note on the name-author-date combination for the taxon Microsporidies Balbiani, 1992, when ranked as a Phylum. *J. Inver. Pathol.* **71**: 91-94.
- BERGQUIST, N.R., STINTZING, G., SMEDMAN, L., WALLER, T., ANDERSSON, T. 1984. Diagnosis of encephalitozoonosis in man by serological test. *Br. Med. J.* **288**: 902.

- BIRTHISTLE, K., MOORE, P., HAY, P. 1996. Microsporidia: a new sexually transmissible cause of urethritis. *Genitourinar. Med.* **72**: 445.
- BLACK, S.S., STEINOHRT, L.A., BERTUCCI, D.C., ROGERS, L.B., DIDIER, E.S. 1997. *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet. Pathol.* **34**: 189-198.
- BLANSHARD, B., HOLLISTER, W.S., PEACOCK, D.G., TOVEY, D.G., ELLIS, D.S., CANNING, E.U., GAZZARD, B.G. 1992. Simultaneous infection with two types of intestinal microsporidia in a patient with AIDS. *Gut* **33**: 418-420.
- BLANSHARD, C., ELLIS, D.S., DOWELL, S.P., TOVEY, G., GAZZARD, B.G. 1993. Electron microscopic changes in *Enterocytozoon bieneusi* following treatment with albendazole. *J. Clin. Pathol.* **46**: 898-902.
- BORNAY-LLINARES, F.J., ROIG-RICO, P., DA SILVA, A.J., FIGUERAS, M.J., MOURA, H., MAYOL, M.J., MESEGUER, I., PIENIAZECK, N.J. 1996. Microsporidiosis intestinal: Diagnóstico retrospectivo mediante métodos de microscopía y PCR usando primers diseñados a partir de la secuencia que codifica el rRNA de *Enterocytozoon bieneusi*. VII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Torremolinos. P. 110, abstract 14/14.
- BORNAY-LLINARES F.J., PEMÁN J. 1997. Microsporidiosis en pacientes con sida: manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento. *Infectio* **5**: 4-10.
- BOUCHE, H., HOUSSET, C., DUMONT, J.L., CARNOT, F., MENU, Y., AVELINE, B., BELGHITI, J., BOBO, C., BERLINGER, S., BERTHELOT, P., PLO, S. 1993. AIDS-related cholangitis: diagnostic features and course in 15 patients. *J. Hepatol.* **17**: 34-39.
- BRETAGNE, S., FOULET, F., ALKASSOUM, W., FLEURY-FEITH, J., DEVELOUX, M. 1993. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* spores in the stool of AIDS patients and African children not infected by HIV. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **86**: 351-7.
- BRYAN, R.T. 1995. Microsporidiosis as an AIDS-related opportunistic infection. *Clin. Infect. Dis.* **21**: S62-S65.
- BRYAN, R.T., WEBER, R. 1993. Microsporidia: emerging pathogens in immunodeficient persons. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **117**: 1243-1245.
- BRYAN, R.T., CALI, A., OWEN, R.L., SPENCER, H.C. 1991. Microsporidia: opportunistic pathogens in patients with AIDS. p. 1-26. En: *Progress in clinical parasitology*. Sun T. ed. Fields and Wood, Philadelphia.
- BRYAN, R.T., WEBER, R., SCHWARTZ, D.A. 1997. Microsporidiosis in patients who are not infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* **24**: 534-535.
- CALI, A. 1991. General microsporidian features and recent findings on AIDS isolates. *J. Protozool.* **38**: 625-630.
- CALI, A., OWEN, R.L. 1988. Microsporidiosis. pp. 928-949. En: *The Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Principles and Practice*. Balows, A., Hausler, Jr., W. y Lennette, E.H. eds. Springer-Verlag, New York.
- CALI, A., OWEN, R.L. 1990. Intracellular development of *Enterocytozoon*, a unique microsporidian found in the intestine of AIDS patients. *J. Protozool.* **37**: 145-155.
- CALI, A., MEISLER, D., LOWDER, C.Y., LEMBACH, R., AYERS, L., TAKVORIAN, P.M., RUTHERFORD, I., LONGWORTH, D.L., MCMAHON, J.T., BRYAN, R.T. 1991. Corneal microsporidiosis: characterization and identification. *J. Protozool.* **38**: S215-S217.

- CALI, A., KOTLER, D.P., ORENSTEIN, J.M. 1993. *Septata intestinalis* n. g., n. sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**: 101-12.
- CALI, A., WEISS, L., TAKVORIAN, P., TANOWITZ, H., WITTNER, M. 1994. Ultrastructural identification of AIDS associated microsporidiosis. *J. Eukaryot. Microbiol.* **41**: 24S.
- CALI, A., WEISS, L.M., TAKVORIAN, P.M. 1996. Microsporidian taxonomy and the status of *Septata intestinalis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **43**: 106S-107S.
- CANNING, E.U. 1993. Microsporidia. pp. 299-385. En: *Parasitic Protozoa*, 2<sup>nd</sup> ed., vol. 6. Kreier, J-P- and Baker, Jr. ed., Academic Press, Inc., New York.
- CANNING, E.U., LOM, J. 1986. The microsporidia of vertebrates. pp.289. Academic Press, Inc.; New York.
- CANNING, E.U., HOLLISTER, W.S. 1987. Microsporidia of mammals - widespread pathogens or opportunistic curiosities?. *Parasitol. Today* **3**: 267-273.
- CANNING, E.U., HOLLISTER, W.S. 1990. *Enterocytozoon bienewisi* (Microspora): prevalence and pathogenicity in AIDS patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**: 181-186.
- CANNING, E.U., HOLLISTER W.S. 1992. Human infections with microsporidia. *Rev. Med. Microbiol.* **3**: 35-42.
- CAMIN, J. H., SOKAL, R.R. 1965. A method for deducing branching sequences in phylogeny. *Evol.* **19**: 311-326.
- CARTER, P.L., MACPHERSON, D.W., MCKENZIE, R.A. 1996. Modified technique to recover microsporidian spores in sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed fecal samples by light microscopy and correlation with transmission electron microscopy. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2670-2673.
- CAVALIER-SMITH, T. 1993. Kingdom Protozoa and its 18 Phyla. *Microbiol. Rev.* **54** (4): 953-994.
- CHOMCZYNSKI, P., MACKAY, K., DREWS, R., WILFINGER, W.W. 1997. DNazol. A reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *BioTechniques* **22**: 550-553.
- CHU, P., WEST, A.B. 1996. *Encephalitozoon (Septata) intestinalis*. Cytologic, histologic, and electron microscopic features of a systemic intestinal pathogen. *Am. J. Clin. Pathol.* **106**: 606-614.
- CHUPP, G.L., ALROY, J., ADELMAN, L.S., BREEN, J.C., SKOLNIK, P.R. 1993. Myositis due to *Pleistophora* (Microsporidia) in a patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **16**: 15-21.
- CLARRIDGE, J.E. 3<sup>RD</sup>, KARKHANIS, S., RABENECK, L., MARINO, B., FOOTE, L.W. 1996. Quantitative light microscopic detection of *Enterocytozoon bienewisi* in stool specimens: a longitudinal study of human immunodeficiency virus-infected microsporidiosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 520-523.
- CLEVELAND, K.O., GELFAND, M.S. 1996. Microsporidia and AIDS-associated diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* **22**: 603-604, reply 604-5.
- COLLINS, F.H., MENDEZ, M.A., RASMUSSEN, M.O., MEHAFFEY, P.C., BESANSKY, N.J., FINNERTY, V. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **37**: 37-41.
- COMINOS, D., PATERSON, D.L., WALKER, N.I., ALLWORTH, A.M., KEMP, R.J. 1994. Relative infrequency of microsporidial infection in HIV infected patients in Queensland [letter]. *Med. J. Australia* **160**: 452-453.

- CONTEAS, C.N., SOWERBY, T., BERLIN, G.W., DAHLAN, F., NGUYEN, A., PORSCHEN, R., DONOVAN, J., LARIVIERE, M., ORENSTEIN, J.M. 1996. Fluorescence techniques for diagnosing intestinal microsporidiosis in stool, enteric fluid, and biopsy specimens from acquired immunodeficiency syndrome patients with chronic diarrhea. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **120**: 847-853.
- CONTEAS, C., DONOVAN, J., BERLIN, O.G., SOWERBY, T.M., LA RIVIERE, M. 1997. Comparison of fluorescence and standard light microscopy for diagnosis of microsporidia in stools of patients with AIDS and chronic diarrhoea [letter]. *AIDS* **11**: 386-387.
- CORCORAN, G.D., TOVEY, D.G., MOODY, A.H., CHIODINI, P.L. 1995. Detection and identification of gastrointestinal microsporidia using non-invasive techniques. *J. Clin. Pathol.* **48**: 725-727.
- CORCORAN, G.D., ISAACSON, J.R., DANIELS, C., CHIODINI, P.L. 1996. Urethritis associated with disseminated microsporidiosis: clinical response to albendazole. *Clin. Infect. Dis.* **22**: 592-593.
- COYLE, C.M., WITTNER, M., KOTLER, D.P., NOYER, C., ORENSTEIN, J.M., TANOWITZ, H. B., WEISS, L.M. 1996. Prevalence of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* among patients with AIDS-related diarrhea: determination by polymerase chain reaction to the microsporidian small-subunit rRNA gene. *Clin. Infect. Dis.* **23**: 1002-1006.
- COX, J.C., HAMILTON, R.C., ATTWOOD, H.D. 1979. An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. *J. Protozool.* **26**: 260-265.
- CROPPO, G.P., LEITCH, G.J., WALLACE, S., VISVESVARA, G.S. 1994. Immunofluorescence and western blot analysis of microsporidia using anti-*Encephalitozoon hellem* immunoglobulin G monoclonal antibodies. *J. Eukaryot. Microbiol.* **41**: 31S.
- CROPPO, G.P., VISVESVARA, G.S., LEITCH, G.J., WALLACE, S., DE GROOTE, M.A. 1997. Western blot and immunofluorescence analysis of a human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* established in culture from the urine of a patient with AIDS. *J. Parasitol.* **83**: 66-69.
- CURGY, J.J., VAVRA, J., VIVARES, C. 1980. Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organisms. *Biol. Cell.* **38**: 49-51.
- DA SILVA, A.J., SCHWARTZ, D.A., VISVESVARA, G.S., DE MOURA, H., SLEMENDA, S.B., PIENIAZEK, N.J. 1996. Sensitive PCR diagnosis of infections by *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) using primers based on the region coding for small-subunit rRNA. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 986-987.
- DA SILVA, A.J., SLEMENDA, S.B., VISVESVARA, G.S., SCHWARTZ, D.A., WILCOX, C.M., WALLACE, S., PIENIAZEK, N.J. 1997a. Detection of *Septata intestinalis* (Microsporidia) Cali et al. 1993 using polymerase chain reaction primers targeting the small subunit ribosomal RNA coding region. *Mol. Diagnosis* **2**: 47-52.
- DA SILVA, A.J., BORNAY-LLINARES, F.J., DEL AGUILA DE LA PUENTE, C., MOURA, H., PERALTA, J.M., SOBOTTKA, I., SCHWARTZ, D.A., VISVESVARA, G.S., SLEMENDA, S., PIENIAZEK, N.J. 1997b. Diagnosis of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) infections by polymerase chain reaction in stool samples using primers based on the region coding for small-subunit ribosomal RNA. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **121**: 874-879.
- DAVID, F., SCHUITEMA, A.R., SARFATI, C., LIGUORY, O., HARTSKEERL, R.A., DEROUIN, F., MOLINA, J.M. 1996. Detection and species identification of intestinal microsporidia by polymerase chain reaction in duodenal biopsies from human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Infect. Dis.* **174**: 874-877.
- DAVIS, R.M., FONT, R.L., KEISLER, M.S., SHADDUCK, J.A. 1990. Corneal microsporidiosis. A case report including ultrastructural observation. *Ophthalmology* **97**: 953-957.

- DE GIROLAMI, P.C., EZRATTY, C.R., DESAI, G., McCULLOUGH, A., ASMUTH, D., WANKE, C., FEDERMAN, M. 1995. Diagnosis of intestinal microsporidiosis by examination of stool and duodenal aspirate with Weber's modified trichrome and Uvitex 2B strains. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 805-810.
- DE GROOTE, M.A., VISVESVARA, G.S., WILSON, M.L., PIENIAZEK, N. J., SLEMENDA, S.B., DA SILVA, A.J., LEITCH, G.J., BRYAN, R.T., REVES, R. 1995. Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. *J. Infect. Dis.* **171**: 1375-1378.
- DE RIJK, P., VAN DE PEER, Y., VAN DEN BROECK, I., DE WACHTER, R. 1995. Evolution according to large ribosomal subunit RNA. *J. Mol. Evol.* **41**: 366-375.
- DEL AGUILA, C., SORIANO, V., NAVAJAS, R., SUBIRATS, M., FENOY, S., VALENCIA, E., BAQUERO, M., PIENIAZECK, N.J. 1997a. Identificación específica de microsporidios intestinales en pacientes HIV-positivos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Enf. Inf. Microbiol. Clin.* **15**: 456-461.
- DEL AGUILA, C., LOPEZ-VELEZ, R., FENOY, S., TURRIENTES, C., COBO, J., VISVESVARA, G.S., CROPPA, G.P., DA SILVA A.J., PIENIAZECK, N.J. 1997b. Identification of *Enterocytozoon bieneusi* in respiratory samples from an AIDS patient with a 2-year history of intestinal microsporidiosis. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1862-1866.
- DEL AGUILA, C., CROPPA, G.P., MOURA, H., DA SILVA, A.J., LEITCH, G., MOSS, D., WALLACE, S., SLEMENDA, S.B., PIENIAZECK, N.J., VISVESVARA, G.S. Ultrastructure, immunofluorescence, western blot, and polymerase chain reaction analysis of eight isolates of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* established in culture from sputum, urine, and duodenal aspirate of five patients with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* (en prensa).
- DELOUL, A.M., POIROT, J.L., HEYER, F., ROUX, P., LEVY, D., ROZENBAUM, W. 1994. Intestinal microsporidiosis: about clinical characteristics and laboratory diagnosis. *J. Eukaryot. Microbiol.* **41**: 33S.
- DEPLAZES, P., MATHIS, A., MULLER, C., WEBER, R. 1996. Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples of pigs. *J. Eukaryot. Microbiol.* **43**: S 93.
- DESORTES, I., LE CHARPENTIER, Y., GALIAN, A., BERNARD, F., COCHAND-PRIOLET, B., LAVERGNE, A., RAVISSE, P., MODIGLIANI, R. 1985. Occurrence of a new Microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n.sp., in the enterocytes of human patient with AIDS. *J. Protozool.* **32**: 250-254.
- DESORTES-LIVAGE, I., HILMARSDOTTIR, I., ROMANA, C., TANGUY, S., DATRY, A., GENTILINI, M. 1991. Characteristics of the microsporidian *Enterocytozoon bieneusi*: a consequence of its development within sort-living enterocytes. *J. Protozool.* **38**: 11S-113S.
- DIDIER, E.S., DIDIER, P.J., FRIEDBERG, D.N., STENSON, S.M., ORENSTEIN, J.M., YEE, R.W., TIO, F.O., DAVIS, R.M., VOSSBRINCK, C., MILLICHAMP, N. 1991. Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *J. Infect. Dis.* **163**: 617-621.
- DIDIER, E.S., VARNER, P.W., DIDIER, P.J., ALDRAS, A.M., MILLICHAMP, N.J., MURPHY-CORB, M., BHOM, M., SHADDUCK, J.A. 1994. Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitol.* **41**: 1-11.

- DIDIER, E.S., VOSSBRINCK, C.R., BAKER, M.D., ROGERS, L.B., BERTUCCI, D.C., SHADDUCK, J.A. 1995a. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* **111**: 411-22.
- DIDIER, E.S., ORENSTEIN, J.M., ALDRAS, A., BERTUCCI, D., ROGERS, L.B., JANNEY, F.A. 1995b. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 3138-45.
- DIDIER, E.S., ROGERS, L.B., ORENSTEIN, J.M., BAKER, M.D., VOSSBRINCK, C.R., VAN GOOL, T., HARTSKEERL, R., SOAVE, R., BEAUDET, L.M. 1996a. Characterization of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* isolates cultured from nasal mucosa and bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients. *J. Eukaryot. Microbiol.* **43**: 34-43.
- DIDIER, E.S., VISVESVARA, G.S., BAKER, M.D., ROGERS, L.B., BERTUCCI, D.C., DE GROOTE, M.A., VOSSBRINCK, C.R. 1996b. A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2835-2837.
- DIDIER, E. S., ROGERS, L. B., BRUSH, A. D., WONG, S., TRAINA-DORGE, V. & BERTUCCI, D. 1996c. Diagnosis of disseminated microsporidian *Encephalitozoon hellem* infection by PCR-southern analysis and successful treatment with albendazole and fumagilin. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 947-952.
- DIESENHOUSE, M.C., WILSON, L.A., CORRENT, G.F., VISVESVARA, G.S., GROSSNIKLAUS, H.E., BRYAN, R.T. 1993. Treatment of microsporidial keratoconjunctivitis with topical fumagillin [see comments]. *Am. J. Ophthalmol.* **115**: 293-298.
- DIETERICH, D.T., LEW, E.A., KOTLER, D.P., POLES, M.A., ORENSTEIN, J.M. 1994. Treatment with albendazole for intestinal disease due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* **169**: 178-183.
- DIONISIO, D., STARRANTINO, G., MELI, M., TROTTA, M., MILO, D., LEONCINI, F. 1995. Use of furazolidone for the treatment of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with AIDS. *Recenti Prog. Med.* **86**: 394-397.
- DITRICH, O., Z. KUCEROVÁ Y B. KOUDELA. 1994a. *In vitro* sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem* to albendazole. *J. Eukaryot. Microbiol.* **41**: 37S.
- DITRICH, O., LOM, J., DYKOVA, I., VAVRA, J. 1994b. First case of *Enterocytozoon bieneusi* infection in the Czech Republic: comments on the ultrastructure and teratoid sporogenesis of the parasite. *J. Eukaryot. Microbiol.* **41**: 35S-36S.
- DORE, G.J., MARRIOTT, D.J., HING, M.C., HARKNESS, J.L., FIELD, A.S. 1995. Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in nine patients infected with the human immunodeficiency virus: response to therapy with albendazole. *Clin. Infect. Dis.* **21**: 70-76.
- DOULTREE, J.C., MAERZ, A.L., RYAN, N.J., BAIRD, R.W., WRIGHT, E., CROWE, S.M., MARSHALL, J. A. 1995. *In vitro* growth of the microsporidian *Septata intestinalis* from an AIDS patient with disseminated illness. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 463-470.
- EEFTINCK SCHATTENKERK, J.K.M., VAN GOOL, T., VAN KETEL, R.J., BARTELSMAN, J.F.W., KUIKEN, C.L., TERPSTRA, W.J., REISS, P. 1991. Clinical significance of small-intestinal microsporidiosis in HIV-1-infected individuals. *Lancet* **337**: 895-898.
- ENRIQUEZ, F.J., CRUZ-LOPEZ, A.P., PALTING, J.D., CRUZ-LOPEZ, P., HERNANDEZ-JAUREGUI P., TELLEZ, C., GUERRERO, J., CURRAN, B. 1997a. Prevalence of microsporidial infections in children and adults with diarrhea.

- ENRIQUEZ, F.J., DITRICH, O., PALTING, J.D., SMITH, K. 1997b. Simple diagnosis of *Encephalitozoon* sp microsporidial infections by using a panspecific antiexospore monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 724-729. Abstract book 97<sup>th</sup> Gen. Meet. ASM. p. 158. abstract C-216.
- ENRIQUEZ, F.J., TAREN, D., CRUZ-LOPEZ, A.P., MURAMOTO, M., PALTING, J.D. Prevalence of fecal microsporidial *Encephalitozoon* spp. Spores in of children and adults and potential risk factors involved. *Clin. Infect. Dis.* (en prensa).
- FEDORKO, D.P., NELSON, N.A., CARTWRIGHT, C.P. 1995. Identification of microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1739-1741.
- FEDORKO, D.P., HIJAZI, Y.M. 1996. Application of molecular techniques to the diagnosis of microsporidial infection. *Emerg. Infect. Dis.* **2**: 183-191.
- FELSENSTEIN, J. 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.* **27**: 401-410.
- FELSENSTEIN, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**: 368-376.
- FELSENSTEIN, J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 521-65
- FIELD, A.S., HING, M.C., MILLIKEN, S.T., MARRIOTT, D.J. 1993. Microsporidia in the small intestine of HIV-infected patients. A new diagnostic technique and a new species. *Med. J. Australia* **158**: 390-394.
- FIELD, A.S., MARRIOTT, D.J., MILLIKEN, S.T., BREW, B.J., CANNING, E.U., KENCH, J.G., DARVENIZA, P., HARKNESS, J.L. 1996. Myositis associated with a newly described microsporidian, *Trachipleistophora hominis*, in a patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2803-2811.
- FLEPP, A.S., SAUER, B., LÜTHY, R., WEBER, R. 1996. Human microsporidiosis in HIV-seronegative, immunocompetent patients. Abstracts of the 35<sup>th</sup> ICAAC, p. 331, abstr. LM25. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
- C FRIES, I., FENG, F., da SILVA, A. J., SLEMENDA, S. B., PIENIAZEK, N. J. 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Europ. J. Protistol.* **32**:1-11.
- FLORES, J., BELLVER, J.F., TERRADEZ, J., MONZO, E. 1993 Acute lesions of gastric mucosa as presentation form of intestinal infection caused by Microsporida in a patient with human immunodeficiency virus infection (letter). *Med. Clin.* **101**: 719.
- FRANSSSEN, F.F., LUMEIJ, J.T., VAN KNAPEN, F. 1995. Susceptibility of *Encephalitozoon cuniculi* to several drugs in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 1265-1268.
- FRANZEN, C., FATKENHEUER, G., SALZBERGER, B., MULLER, A., MAHRLE, G., DIEHL, V., SCHRAPPE, M. 1994. Intestinal microsporidiosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome--report of three more German cases. *Infection* **22**: 417-419.
- FRANZEN, C., MULLER, A., HEGENER, P., SALZBERGER, B., HARTMANN, P., FATKENHEUER, G., DIEHL, V., SCHRAPPE, M. 1995a. Detection of microsporidia (*Enterocytozoon bieneusi*) in intestinal biopsy specimens from human immunodeficiency virus-infected patients by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2294-2296.

- FRANZEN, C., MULLER, A., SALZBERGER, B., FATKENHEUER, G., EIDT, S., MAHRLE, G., DIEHL, V., SCHRAPPE, M. 1995b. Tissue diagnosis of intestinal microsporidiosis using a fluorescent stain with Uvitex 2B. *J. Clin. Pathol.* **48**: 1009-1010.
- FRANZEN, C., SCHWARTZ, D.A., VISVESVARA, G.S., MULLER, A., SCHWENK, A., SALZBERGER, B., FATKENHEUER, G., HARTMANN, P., MAHRLE, G., DIEHL, V. 1995c. Immunologically confirmed disseminated, asymptomatic *Encephalitozoon cuniculi* infection of the gastrointestinal tract in a patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **21**: 1480-1484.
- FRANZEN, C., MULLER, A., HEGENER, P., HARTMANN, P., SALZBERGER, B., FRANZEN, B., DIEHL, V., FATKENHEUER, G. 1996a. Polymerase chain reaction for microsporidian DNA in gastrointestinal biopsy specimens of HIV-infected patients. *AIDS* **10**: F23-27.
- FRANZEN, C., MULLER, A., SALZBERGER, B., FATKENHEUER, G., DIEHL, V., SCHRAPPE, M. 1996b. Chronic rhinosinusitis in patients with AIDS: potential role of microsporidia [letter]. *AIDS* **10**: 687-688.
- FRANZEN, C., KUPPERS, R., MULLER, A., SALZBERGER, B., FATKENHEUER, G., VETTEN, B., DIEHL, V., SCHRAPPE, M. 1996c. Genetic evidence for latent *Septata intestinalis* infection in human immunodeficiency virus-infected patients with intestinal microsporidiosis. *J. Infect. Dis.* **173**: 1038-1040.
- FRANZEN, C., MULLER, A., HARTMANN, P., DIEHL, V., FATKENHEUER, G. 1996d. Disseminated *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infection in a patient with AIDS. *N. Engl. J. Med.* **335**: 1610-1611.
- FRIEDBERG, D.N., STENSON, S.M., ORENSTEIN, J.M., TIerno, P.M., CHARLES, N.C. 1990. Microsporidial keratoconjunctivitis in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Ophthalmol.* **108**: 504-508.
- FRIES, I., FENG, F., da SILVA, A. J., SLEMENDA, S. B., PIENIAZEK, N. J. 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Europ. J. Protistol.* **32**: 1-11.
- FUENTEALBA, I.C., MAHONEY, N.T., SHADDUCK, J.A., HARVILLM, J., WICHER, V., WICHER, K. 1992. Hepatic lesions in rabbits infected with of *Encephalitozoon cuniculi* administered per rectum. *Vet. Pathol.* **29**: 536-540.
- GAJADHAR, A.A., MARQUARDT, W.C., HALL, R., GUNDERSON, J., ARITZTIA-CARMONA, E.V., SOGIN, M.L. 1991. Ribosomal sequences of *Sarcocystis muris*, *Theileria annulata* and *Crythecodium cohnii* reveal evolutionary relationships among apicomplexan, dinoflagellates, and ciliates. *Mol. Biochem. Parasitol.* **45**: 147-154.
- GARCIA, L.S., SHIMIZU, R.Y., BRUCKNER, D.A. 1994. Detection of microsporidial spores in fecal specimens from patients diagnosed with cryptosporidiosis. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1739-1741.
- GARVEY, M.J., AMBROSE, P.G., ULMER, J.L. 1995. Topical fumagillin in the treatment of microsporidial keratoconjunctivitis in AIDS. *Ann. Pharmacother.* **29**: 872-874.
- GIANG, T.T., KOTLER, D.P., GARRO, M.L. 1993. Tissue diagnosis of intestinal microsporidiosis using the chromotrope-2R modified stain. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **117**: 1249-1251.
- GOODGAME, R.W. 1996. Understanding intestinal spore-forming protozoa: cryptosporidia, microsporidia, isospora, and cyclospora. *Ann. Inter. Med.* **124**: 429-441.
- GOODMAN, D.G., Gardner, F.M. 1972. A comparison of methods to detect *Nosema cuniculi* in rabbit urine. *Lab. Anim. Sci.* **22**: 568-572.

- GRAU, A., VALLS, M.E., WILLIAMS, J.E., ELLIS, D.S., MUNTANE, M.J., NADAL, C. 1996. Myositis caused by *Pleistophora* in a patient with AIDS. *Med. Clin.* **107**: 779-781.
- GUNNARSSON, G., HURLBUT, D., DEGIROLAMI, P.C., FEDERMAN, M., WANKE, C. 1995. Multiorgan microsporidiosis: report of five cases and review. *Clin. Infect. Dis.* **21**: 37-44.
- HARTSKEERL, R.A., SCHUITEMA, A.R., VAN GOOL, T., TERPSTRA, W.J. 1993. Genetic evidence for the occurrence of extra-intestinal *Enterocytozoon bieneusi* infections. *Nuc. Acids Res.* **21**: 4150.
- HARTSKEERL, R.A., VAN GOOL, T., SCHUITEMA, A.R., DIDIER, E.S., TERPSTRA, W.J. 1995. Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis*, Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology* **110**: 277-285.
- HAUTVAST, J.L., TOLBOOM, J.J., DERKS, T.J., BECKERS, P., SAUERWEIN, R.W. 1997. Asymptomatic intestinal microsporidiosis in a human immunodeficiency virus-seronegative, immunocompetent Zambian child. *Pediat. Infect. Dis. J.* **16**: 415-416.
- HE, Q., LEITCH, G.J., VISVESVARA, G.S., WALLACE, S. 1996. Effects of nifedipine, metronidazole, and nitric oxide donors on spore germination and cell culture infection of the microsporidia *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon intestinalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 179-185.
- HENRY, J. E. & OUMA, E. A. 1981. Pest control by *Nosema locustae*, a pathogen of grasshoppers and crickets. pp. 572-586. En: *Micorbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Burgues, H. D. ed.. Academic Press. New York.
- HEWAN-LOWE, K., FURLONG, B., SIMS, M., SCHWARTZ, D.A. 1997. Coinfection with *Giardia lamblia* and *Enterocytozoon bieneusi* in a patient with acquired immunodeficiency syndrome and chronic diarrhea. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **121**: 417-422.
- HOLLISTER, W.S. AND E.U. CANNING. 1987. An enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to of *Encephalitozoon cuciculi* and its use in determination of infections in man. *Parasitology* **94**: 209-219.
- HOLLISTER, W.S., CANNING, E.U., COLBOURN, N.I., CURRY, A., LACEY, C.J.N. 1993. Characterization of *Encephalitozoon hellem* (Microspora) isolated from the nasal mucosa of a patient with AIDS. *Parasitology* **107**: 351-358.
- HOLLISTER, W.S., CANNING, E.U., COLBOURN, N.I., AARONS, E.J. 1995. *Encephalitozoon cuciculi* isolated from the urine of an AIDS patient, which differs from canine and murine isolates. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**: 367-372.
- HOLLISTER, W.S., CANNING, E.U., WEIDNER, E., FIELD, A.S., KENCH, J., MARRIOTT, D.J. 1996. Development and ultrastructure of *Trachipleistophora hominis* n.g., n.sp. after in vitro isolation from an AIDS patient and inoculation into athymic mice. *Parasitology* **112**: 143-154.
- HOUZE-SAVAGE, S., VAN GOOL, T., AUMAITRE, H., LE BRAS. 1992. Intérêt de Úvitex 2B et du chromotrope 2R dans le diagnostic de la microsporidiose intestinale. Abstract Workshop on Intestinal Microsporidia in HIV Infection, Paris.
- HUNT, R., KING, N.W., FOSTER, H.L. 1972. Encephalitozoonosis: evidence for vertical transmission. *J. Infect. Dis.* **126**: 221-224.
- IGNATIUS, R., HENSCHEL, S., LIESENFELD, O., MANSMANN, U., SCHMIDT, W., KOPPE, S., SCNEIDER, T., HEISE, W., FUTH U., RIECKEN, E.O., HAHN, H., ULLRICH, R. 1997. Comparative evaluation of modified trichrome and Uvitex 2B stains for detection of low numbers of microsporidial spores in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2266-2269.

- ISSI, I.V. 1986. Microsporidia as a phylum of parasitic protozoa. Acad. Sci. U.S.S.R. (Leningrad) **10**: 6-136.
- JAFRI, H.S., REEDY, T., MOORHEAD, R., DICKERSON, J.W., SCHANT, P.M., BRYAN, R.T. 1993. Detection of pathogenic protozoa in fecal specimens from urban dwelling dogs. Abstr. 361. 42<sup>nd</sup> Annu Meet Am. Soc. Trop. Med. Hyg.
- JUSTE, E.N., RICH, J.D., BUSAM, K.J., SCHWARTZ, D.A. 1996. Autopsy verification of *Encephalitozoon intestinalis* (microsporidiosis) eradication following albendazole therapy. Arch. Pathol. Lab. Med. **120**: 199-203.
- KATIIYAR, S.K., VISVESVARA, G.S., EDLIND, T.D. 1995. Comparisons of ribosomal RNA sequences from amitochondrial protozoa: implications for processing mRNA binding and paromomycin resistance. Gene **152**: 27-33.
- KATZWINKEL-WLADARSCH, S., LIEB, M., HELSE, W., LOSCHER, T., RINDER, H. 1996. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. Trop. Med. Internat. Health. **1**: 373-378.
- KELKAR, R., SASTRY, P.S., KULKARNI, S.S., SAIKIA, T.K., PARIKH, P.M., ADVANI, S.H. 1997. Pulmonary microsporidial infection in a patient with CML undergoing allogeneic marrow transplant. Bone Marrow Transplant. **19**: 179-182.
- KETZNELSON, H., JAMIESON, C.A. 1952. Control of Nosema disease of honey bees with fumagilline. Science **115**: 70.
- KNAPP, P.E., SALTZMAN, J.R., FAIRCHILD, P. 1996. Acalculous cholecystitis associated with microsporidial infection in a patient with AIDS [see comments]. Clin. Infect. Dis. **22**: 195-196.
- KOCK, N.P., PETERSEN, H., FENNER, T., SOBOTTKA, I., SCHMETZ, C., DEPLAZES, P., PIENIAZEK, N.J., ALBRECHT H., SCHOTTELIUS, J. 1997. Species-specific identification of microsporidia in stool and intestinal biopsy specimens by the polymerase chain reaction. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **16**: 369-379.
- KOKOSKIN, E., GYORKOS, T.W., CAMUS, A., CEDILLOTTE, L., PURTILL, T., WARD, B. 1994. Modified technique for efficient detection of microsporidia. J. Clin. Microbiol. **32**: 1074-1075
- KOTLER, D.P., GIANG, T.T., GARRO, M.L., ORENSTEIN, J.M. 1994a. Light microscopic diagnosis of microsporidiosis in patients with AIDS. Am. J. Gastroenterol. **89**: 540-544.
- KOTLER, D.P., ORENSTEIN, J.M. 1994b. Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals referred for gastroenterological evaluation [see comments]. Am. J. Gastroenterol. **89**: 1998-2002.
- KOUDELA, B., VITOVEC, J., KUCEROVA, Z., DITRICH, O., TRAVNIZEK, J. 1993. The severe combined immunodeficient mouse as a model of *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. Folia Parasitol. **40**: 279-286.
- LACEY, C.J.N., CLARKE, A.M.T., FRASER, P., METCALFE, T., BONSOR, G., CURRY, A. 1992. Chronic microsporidian infection of the nasal mucosae, sinuses and conjunctivae in HIV disease. Genitourinary Med. **68**: 179-181.
- LAMBL, B.B., FEDERMAN, M., PLESKOW, D., WANKE, C.A. 1996. Malabsorption and wasting in AIDS patients with microsporidia and pathogen-negative diarrhea. AIDS **10**: 739-744.
- LARSON, J.I.R. 1986. Ultrastructure, function and classification of Microsporidia. Progr. Protistol. **1**: 325-390.

- LECUIT, M., OKSENHENDLER, E., SAFARTI, C. 1994. Use of albendazole for disseminated microsporidiosis infection in patient with AIDS. 1994. Clin. Infect. Dis. **19**: 332-333.
- LEDFORD, D.K., OVERMAN, M.D., GONZALO, A., CALI, A., MESTER, W., LOCKEY, R.F. 1985. Microsporidiosis myositis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Ann. Intern. Med. **102**: 628-630.
- LEVADITI, C., NICOLAU, S., SCHOEN, R. 1923. L'agent étiologique de l'encephalite épizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). C. R. Soc. Biol. Paris **89**: 984-986.
- LEVINE, N.D. ET AL. 1980. A newly revised classification of the Phylum Protozoa. J. Protozool. **27**: 37-58.
- LIAN, C. Z. 1980. Nosema disease I honeybee (*Apis ceranae*) in chinese. Apiculture in China **4**:15-16.
- LIGUORY, O., DAVID, F., SARFATI, C., SCHUITEMA, A.R., HARTSKEERL, R.A., DEROUIN, F., MODAI, J., MOLINA, J.M. 1997. Diagnosis of infections caused by *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* using polymerase chain reaction in stool specimens. AIDS **11**: 723-726.
- LOWDER, C.Y., MEISLER, D.M., McMAHON, J.T., LONGWORTH, D.L., RUTHERFORD, I. 1990. Microsporidia infection of the cornea in a man seropositive for human immunodeficiency virus. Am. J. Ophthalmol. **109**: 242-244.
- LOWDER, C.Y., MCMAHON, J.T., MEISLER, D.M., DODDS, E.M., CALABRESE, L.H., DIDIER, E.S., CALI, A. 1996. Microsporidial keratoconjunctivitis caused by *Septata intestinalis* in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Am. J. Ophthalmol. **121**: 715-717.
- LUNA, V.A., STEWART, B.K., BERGERON, D.L., CLAUSEN, C.R., PLORDE, J.J., FRITSCH, T.R. 1995. Use of the fluorochrome calcofluor white in the screening of stool specimens for spores of microsporidia. Am. J. Clin. Pathol. **103**: 656-659.
- MACHER, A.M., NEAFIE, R., ANGRITT, P., TUUR, S.M. 1988. Microsporidial myositis and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): a four-year follow-up. Ann. Intern. Med. **109**: 343 (letter).
- MANSFIELD, K.G., CARVILLE, A., SHVETZ, D., MACKAY, J., TZIPORI, S., LACKNER, A.A. 1997. Identification of an *Enterocytozoon bieneusi*-like microsporidian parasite in simian-immunodeficiency-virus-inoculated macaques with hepatobiliary disease. Am. J. Pathol. **150**: 1395-1405.
- MARGILETH, A.M., STRANO, A.J., CHANDRA, R., NEATIE, R., BLUM, M., MACULLY, R.M. 1973. Disseminated nosematosis in a immunologically compromised infant. Arch. Pathol. **95**: 145-150.
- MARTINEZ FERNANDEZ, A.R. 1995. Microsporidiosis: protistas parásitos, nuevos patógenos humanos. Real Academia de Farmacia. Instituto de España. Madrid.
- MCCLUSKEY, P.J., GOONAN, P.V., MARRIOT, D.J., FIEL. 1993. Microsporidial conjunctivitis in AIDS. Eye **7**: 80-83.
- MCWHINNEY, P.H., NATHWANI, M.D., GREEN, S.T., BOYD, J.F., FORREST, J.A.H. 1991. Microsporidiosis detected in association with AIDS-related sclerosing cholangitis. AIDS **5**: 1394-1395.
- MERTENS, R.B., DIDIER, E.S., FISHBEIN, M.C., BERTUCCI, D.C., ROGERS, L.B., ORENSTEIN, J.M. 1997. *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis - infection of the brain, heart, kidneys, trachea, adrenal glands, and urinary bladder in a patient with Aids. Mod. Pathol. **10**: 68-77.
- METCALFE, T., DORAN, R., ROWLAND, P., CURRY, A., LACEY, C.J.N. 1992. Microsporidial keratoconjunctivitis in a British patient with AIDS. British J. Ophthalmol. **76**: 177-78.

- MARGILETH, A.M., STRANO, A.J., CHANDRA, R., NEAFIE, R., BLUM, M., McCULLY, R.M. 1985. Disseminate nosematosis in an immunologically compromised infant. *Arch. Pathol.* **95**: 145-150.
- MATSUBAYASHI, H., KOIKE, T., MIKATA, I., TAKEI, H., HAGIWARA, S. 1959. A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *Arch. Pathol.* **67**: 181-187.
- MIRO, O., MORENO, O., VALLS, M.E., MIRO, J.M. PIQUE, J.M., BORDAS., GATELL. Microsporidiosis intestinal en enfermos con sida: estudio de tres casos. *Med. Clin. (Bar)* **104**: 96-99.
- MODIGLIANI, R., BORIES, C., LE CHARPENTIER, Y., SALMERON, M., MESSING, B., GALIAN, A., RAMBAUD, J.C, LAVERGNE, A., COCHAND PRIOLLET, B., DESPORTES I. 1985 Diarrhoea and malabsorption in acquired immune deficiency syndrome: a study of four cases with special emphasis on opportunistic protozoan infestations. *Gut* **26**: 179-187.
- MOHN, S.F., NORDSTOGA, K., DISHINGTON, I.W. 1982. Experimental encephalitozoonosis in the blue fox. Clinical, serological and pathological examination of vixens after oral and intrauterine inoculation. *Acta Vet. Scan.* **23**: 490-502.
- MOLINA, J.M., SARFATI, C., BEAUVAIS, B., LEMANN, M., LESOURD, A., FERCHAL, F., CASIN, I., LAGRANGE, P., MODIGLIANI, R., DEROUIN, F., MODAI, J. 1993. Intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic unexplained diarrhea: prevalence and clinical and biologic features. *J. Infect. Dis.* **167**: 217-221.
- MOLINA, J.M., OKSENHENDLER, E., BEAUVAIS, B., SARFATI, C., JACCARD, A., DEROUIN, F., MODAI, J. 1995. Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in patients with AIDS: clinical features and response to albendazole therapy. *J. Infect. Dis.* **171**: 245-249.
- MONNERET, G., RABDONIRINA, M., COTTE, L., DESPORTES-LIVAGE, I., PAULUA, S., BASTIEN, O., TRONCY, J., LACHAUX, A., BOIBIEUX, A., ROUMANET-DUBOIS, F. 1995 Detection of intestinal microsporidian spores in non human immunodeficiency population. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **53**: 563-564.
- MORENO-CAMACHO, A., MIRO, J.M., MORENO-MARTINEZ, A. 1995. Chronic enteropathy in AIDS patients: Analysis of 40 cases. p. 214, abstr. I60. 35<sup>th</sup> Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco.
- MOURA, H., DA SILVA, J.L., SODRE, F.C., BRASIL, P., WALLMO, K., WAHLQUIST, S., WALLACE, S., CROPPO, G.P., VISVESVARA, G.S. 1996. Gram-chromotrope: a new technique that enhances detection of microsporidial spores in clinical samples. *J. Eukaryot. Microbiol.* **43**: 94S-95S.
- MOURA, H., SCHWARTZ, D.A., BORNAY-LLINARES, F.J., SODRE, F. WALLACE, S., VISVESVARA, G.S. 1997. 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.* **121**: 888-893.
- NAEGELI, K.W. 1857. Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Bot. Z.* **15**: 760-761.
- NIEDEKORN, J.Y. SHADDUCK, J.A., WEIDNER, E. 1980. Antigen cross-reactivity among different microsporidian spores as determined by immunofluorescence. *J. Parasitol.* **66**: 675-677.
- OLDFIELD, E.C. 3<sup>rd</sup>. 1995. Albendazole: new hope for treatment of microsporidiosis in AIDS. *Am. J. Gastroenterol.* **90**: 159-160.
- OLSEN, G. J. 1987. Earliest phylogenetic branchings: comparing rRNA-based evolutionary trees inferred with various techniques. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitate Biology*, Vol LII.

- OLSEN, G.J., WOESE, C.R. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.* 7: 113-123.
- OMBROUCK, C., ROMESTAND, B., DA COSTA, J.M. 1995. Use of cross-reactive antigens of the microsporidian *Glugea atherinae* for the possible detection of *Enterocytozoon bieneusi* by western blot. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52: 89-93.
- OMBROUCK, C., DESPORTES-LIVAGE, I., ACHBAROU, A., GENTILINI, M. 1996. Specific detection of the microsporidia *Encephalitozoon intestinalis* in AIDS patients. *C.R. Acad. Sci. Paris* 319: 39-43.
- OMBROUCK, C., CICERON, L., BILIGUI, S., BROWN, S., MARECHAL, P., VAN GOOL, T., DATRY, A., DANIS, M., DESPORTES-LIVAGE, I. 1997. 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.* 35: 652-655.
- ORENSTEIN, J.M., CHIANG, J., STEINBERG, W., SMITH, P.D., ROTTERDAM, H., KOTLER, D.P. 1990. Intestinal microsporidiosis as a cause of diarrhea in human immunodeficiency virus-infected patients: a report of 20 cases. *Hum. Pathol.* 21: 475-481.
- ORENSTEIN, J.M., TENNER, M., CALI, A., KOTLER, D.P.A. 1992a. A microsporidian previously undescribed in humans, infecting enterocytes and macrophages, and associated with diarrhea in an acquired immunodeficiency syndrome patient. *Hum. Pathol.* 23: 722-728.
- ORENSTEIN, J.M., DIETERICH, D.T., KOTLER, D.P.A. 1992b. Systemic dissemination by a newly recognized intestinal microsporidia species in AIDS. *AIDS* 6: 1143-1150
- ORENSTEIN, J.M., LEW, E., POLES, M.A., DIETERICH, D. 1995. The endoscopic brush cytology specimen in the diagnosis of intestinal microsporidiosis [letter]. *AIDS* 9: 1199-1201
- ORENSTEIN, J.M., GAETZ, H.P., YACHNIS, A.T., FRANKEL, S.S., MERTENS, R.B., DIDIER, E.S. 1997. Disseminated microsporidiosis in AIDS: are any organs spared? [letter]. *AIDS* 11: 385-386.
- PEMAN, J., BORNAY-LLINARES, F.J., ACOSTA, B., LÓPEZ-ALDEGUER, J., MESEGUER, I., FIGUERAS, M.J., PESET, V., GOBERNADO, M., VISVESVARA, G.S. First report of a case of *Encephalitozoon* sp. microsporidiosis in a Spanish AIDS patient. *Res. Rev. Parasitol.* (en prensa).
- PIENIAZEK, N.J., DA SILVA, A.J., SLEMENDA, S.B., VISVESVARA, G.S., KURTTI, T.J., YASUNAGA, C. 1996. *Nosema trichoplusiae* is a synonym of *Nosema bombycis* based on the sequence of the small subunit ribosomal RNA coding region. *J. Inv. Pathol.* 67: 316-7.
- PIENIAZEK, N.J., SLEMENDA, S.B., DA SILVA, A.J., ALFANO, E.M., ARROWOOD M.J. 1997. PCR confirmation of infection with *Cyclospora cayetanensis*. *Emerging Infect. Dis.* 2: 357-358
- PINNOLIS, M., EGBERT, P.R., FONT, R.L., WINTER, F.C. 1981. Nosematosis of the cornea. *Arch. Ophthalmol.* 99: 1044-1047.
- POL, S., ROMANA, C.A., RICHARD, S., CARNOT, F., DUMONT, J.L., BOUCHE, H., PIALOUX, G., STERN, M., PAYS, J.F., BERTHELOT, P., CARNOT, F., PAYS, J.F., BERTHELOT, P. 1992. *Enterocytozoon bieneusi* infection in acquired immunodeficiency syndrome-related sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 102: 1778-1781.
- POL, S., ROMANA, C.A., RICHARD, S., AMOUYAL, P., DESPORTES-LIVAGE, I., CARNOT, F., PAYS, J.F., BERTHELOT, P. 1993. Microsporidia infection in patients with the human immunodeficiency virus and unexplained cholangitis. *New Engl. J. Med.* 328: 95-99.

- PUNPOOWONG, B., PITISUTTITHUM, P., CHINDANOND, D., PHIBOONNAKIT, D., LEELASUPHASRI, S. 1995. Microsporidium: modified technique for light microscopic diagnosis. *J. Med. Assoc. Thailand* **78**: 251-254.
- RABENECK, L., GYORKEY, F., GENTA, R.M., GYORKEY, P., FOOTE, L.W., RISSER, J.M. 1993. The role of Microsporidia in the pathogenesis of HIV-related chronic diarrhea [see comments]. *Ann. Int. Med.* **119**: 895-899.
- RABENECK, L., GENTA, R.M., GYORKEY, F., CLARRIDGE, J.E., GYORKEY, P., FOOTE, L.W. 1995. Observations on the pathological spectrum and clinical course of microsporidiosis in men infected with the human immunodeficiency virus: follow-up study. *Clin. Infect. Dis.* **20**: 1229-1235.
- RABODONIRINA, M., BERTOCCHI, M., DESPORTES-LIVAGE, I., COTTE, L., LEVREY, H., PIENS, M.A., MONNERET, G., CELARD, M., MORNEIX, J.F., MOJON, M. 1996. *Enterocytozoon bienewsi* as a cause of chronic diarrhea in a heart-lung transplant recipient who was seronegative for human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* **23**: 114-117.
- RAMON-GARCIA, G., SADOWINSKI-PINE, S. 1996. Acalculous cholecystitis and microsporidiosis in a patient with AIDS [letter; comment]. *Clin. Infect. Dis.* **23**: 664.
- RAYNAUD, L., DELBAC, F., BROUSSOLLE, V., RABODONIRINA, M., GIRAULT, V., WALLON, M., COZON, G., VIVARES, C.P., PEYRON, F. 1998. Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travelers with chronic diarrhea by specific PCR amplification. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 37-40.
- ROSBERGER, D.F., SERDARIVIC, O.N., ERLANDSON, R.A., BRYAN, R.T., SCHWARTZ, D.A., VISVESVARA, G.S., KEENAN, P.C. 1993. Successful treatment of microsporidial keratoconjunctivitis with topical fumagillin in a patient with AIDS. *Cornea* **123**: 261-265.
- RYAN, N.J., SUTHERLAND, G., COUGHLAN, K. 1993. A new trichrome-blue stain for detection of microsporidial species in urine, stool, and nasopharyngeal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 3264-3269.
- SANDFORT, J., HANNEMANN, A., GELDERBLOM, H., STARK, K., OWEN, R.L., RUF, B. 1994. *Enterocytozoon bienewsi* infection in an immunocompetent patient who had acute diarrhea and who was not infected with the human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* **19**: 514-516.
- SAX, P.E., RICH, J.D., PIECIAK, W.S., TRNKA, Y.M. 1995. Intestinal microsporidiosis occurring in a liver transplant recipient. *Transplantation* **60**: 617-618.
- SCAGLIA, M., SACCHI, L., GATTI, S., BERNUZZI, A.M., POLVER, P., PIACENTINI, I., CONCIA, E., CROPPA, G.P., DA SILVA, A.J., PIENIAZEK, N.J., SLEMENDA, S.B., WALLACE, S., LEITCH, G.J., VISVEVARA, G.S. 1994. Isolation and identification of *Encephalitozoon hellem* from an Italian AIDS patient with disseminated microsporidiosis. *APMIS* **102**: 817-827.
- SCAGLIA, M., SACCHI, L., CROPPA, G.P., DA SILVA, A., GATTI, S., CORONA, S., BERNUZZI, A.M., PIENIAZEK, N.J., SLEMENDA, S.B., WALLACE, S., VISVEVARA, G.S. 1997. Pulmonary microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem* in a patient with AIDS. *J. Infect.* **34**: 119-126.
- SCHOTTELIUS, J., LO, Y., SCHMETZ, C. 1995. *Septata intestinalis* and *Encephalitozoon cuniculi*: cross-reactivity between two microsporidian species. *Folia Parasitol.* **42**: 169-172.
- SCHWARTZ, D.A., BRYAN, R.T. 1997. Microsporidia. pp. 61-94. En.: Pathology of emerging infections. Horsburg CR, Jr., Nelson AM, eds., ASM Press. Washington.

- SCHWARTZ, D.A., BRYAN, R.T., HEWAN-LOWE, K.O., VISVESVARA, G.S., WEBER, R., CALI, A., ANGRITT, P. 1992. Disseminated microsporidiosis (*Encephalitozoon hellem*) and acquired immunodeficiency syndrome. Autopsy evidence for respiratory acquisition. Arch. Pathol. Lab. Med. **116**: 660-668.
- SCHWARTZ, D.A., VISVESVARA, G.S., DIESENHOUSE, M.C., WEBER, R., FONT, R.L., WILSON, L.A., CORRENT, G., SERDAREVIC, O.N., ROSBERGER, D.F., KEENEN, P.C. 1993a. Pathologic features and immunofluorescent antibody demonstration of ocular microsporidiosis (*Encephalitozoon hellem*) in seven patients with acquired immunodeficiency syndrome [see comments]. Am. J. Ophthalmol. **115**: 285-292.
- SCHWARTZ, D.A., VISVESVARA, G.S., LEITCH, G.J., TASHJIAN, L., POLLACK, M., HOLDEN, J., BRYAN, R.T. 1993b. Pathology of symptomatic microsporidial (*Encephalitozoon hellem*) bronchiolitis in the acquired immunodeficiency syndrome: a new respiratory pathogen diagnosed from lung biopsy, bronchoalveolar lavage, sputum, and tissue culture [see comments]. Human Pathol. **24**: 937-943.
- SCHWARTZ, D.A., BRYAN, R.T., WEBER, R., VISVESVARA, G.S. 1994a. Microsporidiosis in HIV positive patients: current methods for diagnosis using biopsy, cytologic, ultrastructural, immunological, and tissue culture techniques. Folia Parasitol. **41**: 101-9.
- SCHWARTZ, D.A., VISVESVARA, G.S., WEBER, R., BRYAN, R.T. 1994b. Male genital tract microsporidiosis and AIDS: prostatic abscess due to *Encephalitozoon hellem*. J. Eukaryot. Microbiol. **41**: 61S.
- SCHWARTZ, D.A., BRYAN, R.T., VISVESVARA, G.S. 1994c. Diagnostic approaches for *Encephalitozoon* infections in patients with AIDS. J. Eukaryot. Microbiol. **41**: 59S-60S.
- SCHWARTZ, D.A., ABOU-ELELLA, A., WILCOX, C.M., GORELKIN, L., VISVESVARA, G.S., THOMPSON, S.E. 3<sup>RD</sup>, WEBER, R., BRYAN, R.T. 1995. The presence of *Enterocytozoon bieneusi* spores in the lamina propria of small bowel biopsies with no evidence of disseminated microsporidiosis. Enteric Opportunistic Infections Working Group. Arch. Pathol. Lab. Med. **119**: 424-428.
- SCHWARTZ, D.A., SOBOTTKA, I., LEITCH, G.J., CALI, A., VISVESVARA, G.S. 1996. Pathology of microsporidiosis: emerging parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Arch. Pathol. Lab. Med. **120**: 173-88.
- SHADDUCK, J.A., PAKES, S.P. 1971. Spontaneous diseases of laboratory animals which interfere with biomedical research: encephalitozoonosis and toxoplasmosis. Am. J. Pathol. **64**: 657-674.
- SHADDUCK, J.A., BENDELE, A.R., ROBINSON, G.T. 1978. Isolation of the causative organism of canine encephalitozoonosis. Vet. Pathol. **15**: 449-460.
- SHADDUCK, J.A., WATSON, W.T., PAKES, S.P., CALI, A. 1979. Animal infectivity of *Encephalitozoon cuniculi*. J. Parasitol. **65**: 123-129.
- SHADDUCK, J.A. 1980. Effect of fumagillin on *in vitro* multiplication of *Encephalitozoon cuniculi*. J. Protozool. **27**: 202-208.
- SHADDUCK, J.A., MECCOLI, R.A., DAVIS, R., FONT, R.L. 1990. First isolation of a microsporidian from a human patient. J. Infect. Dis. **162**: 773-776.
- SHETH, S.G., BATES, M., FEDERMAN, S., CHOPRA, S. 1997. Fulminant hepatic failure caused by microsporidial infection in a patient with aids. AIDS **11**: 553-554.
- SHARPSTONE, D., ROWBOTTOM, A., NELSON, M., GAZZARD, B. 1995. The treatment of microsporidial diarrhoea with thalidomide [letter]. AIDS **9**: 658-659.

- SILVEIRA, H., CANNING, E.U. 1995. In vitro cultivation of the human microsporidium *Vittaforma corneae*: development and effect of albendazole. *Folia Parasitol.* **42**: 241-250.
- SOBOTTKA, I., ALBRECHT, H., SCHAFFER, H., SCHOTTELIUS, J., VISVESVARA, G.S., LAUFS, R., SCHWARTZ, D.A. 1995a. Disseminated *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infection in a patient with AIDS: novel diagnostic approaches and autopsy-confirmed parasitological cure following treatment with albendazole. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2948-2952.
- SOBOTTKA, I., ALBRECHT, H., SCHOTTELIUS, J., SCHMETZ, C., BENTFELD, M., LAUFF, R. & SCHWARTZ, D. A. 1995b. Self limited travelers diarrhea due to a dual infection with *Enterocytozoon bieneusi* and *Cryptosporidium parvum* in a immunocompetent HIV-negative child. *Europ. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**: 919-920.
- SODRE, F.C., BORGES, A.L.V., BRASIL, P., CUNHA, C.C., MOURA, H. Descrição de um método modificado para a concentração de esporos nas fezes para o diagnóstico das microsporidioses intestinais. 1995. *J. Bras. Patol.* **31**: 126-133.
- SODRE, F.C., MOURA, H., WAHLQUIST, S., BORNAY-LINARES, F.J., VISVESVARA, G.S. 1997. An immunofluorescent (IF) test detects *Encephalitozoon intestinalis* spores in stool samples. p. 159. Abstr. C-225. 97<sup>th</sup> Gen. Meet. ASM. Miami.
- SOGIN, M.L. 1991. Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1**: 457-463.
- SOGIN, M. L., HINKLE, G., LEIPE, D. D. 1993. Universal tree of life. *Nature.* **362**: 795.
- SORVILLO, F., KERNDT, P. 1995. Pathogenicity of the microsporidia [letter; comment]. *AIDS* **9**: 215.
- SOULE, J.B., HALVERSON, A.L., BECKER, R.B., PISTOLE, M.C., ORENSTEIN, J.M. 1997. A patient with acquired immunodeficiency virus and untreated *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* microsporidiosis leading to small bowel perforation. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **121**: 880-887.
- SOWERBY, T.M., CONTEAS, C.N., BERLIN, O.G., DONOVAN, J. 1995. Microsporidiosis in patients with relatively preserved CD4 counts [letter]. *AIDS* **9**: 975.
- SPRAGUE V. 1977. Classification and phylogeny of Microsporidia. En: *Comparative Pathobiology*. Vol 2, p. 1-510. Bulla, L.A. and Cheng, T.C. eds., Plenum Press, New York.
- SPRAGUE V. 1982. Microspora. En: *Synopsis and classification of living organism*, vol. 1, pp 589-594. Parker, S.P. ed., McGraw Hill, New York.
- SPRAGUE, V., BECNEL, J.J., HAZARD, E.I. 1992. Taxonomy of phylum Microspora. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**: 285-395.
- STRIMMER, K., VON HAESLER, A. 1996. Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 964-969.
- SVENSON, J., MACLEAN, J.D., KOKOSKIN-NELSON, E., SZABO, J., LOUGH, J., GILL, M.J. 1993. Microsporidiosis in AIDS patients. *Can. Commun. Dis. Rep.* **19**: 13-15.
- TERADA, S., REDDY, K.R., JEFFERS, L.J., CALI, A., SCHIFF, E.R. 1987. Microsporidian hepatitis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.* **107**: 61-62.
- TIERISCHE, Z.E. 1909. Parasiten als krankenerreger bei der Biene. *Leipziger Bienenztg.* **24**: 147-50, 64-66.

- TORRES, C.M. 1927a. Sur une nouvelle maladie de l'homme, caracterisee par la presence d'un parasite intracellulaire, tre proche de *Toxoplasma* et de l'*Encephalitozoon* dans la tissu musculaire cardiaque, les muscles de squelette, le tissu cellulaire sous-cutane et le tissu nerveux. C. R. S. Soc Biol. Paris **97**: 1778-1781.
- TORRES C.M. 1927b. Morphologie d'un nouveau parasite de l'homme, *Encephalitozoon chagasi* n. sp. observé dans un cas de méningoencéphalomyélite congenitale avec myosite et myocardite. C.R.Soc. Biol., Paris, **97**: 1787-1790.
- TSANG, V.C.W., BOYER, A.E. PAU CH. 1991. Enzyme-linked Immunoelctrotansfer Blot Technique for Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Antibodies. Immunology Series No. 15. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta.
- TZIPORI, S., CARVILLE, A., WIDMER, G., KOTLER, D., MANSFIELD, K., LACKNER, A. 1997. Transmission and establishment of a persistent infection of *Enterocytozoon bieneusi*, derived from a human with AIDS, in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. J. Infect. Dis. **175**: 1016-1020.
- VAN GOOL, T., HOLLISTER, W.S., , SCHATTENKERK, W.E., VAN DEN BERGH WEERMAN, M.A., TERPSTRA, W.J. VAN KETEL, R.J., REISS, P., CANNING, E.U. 1990. Diagnosis of *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in AIDS patients by recovery of spores from faeces. Lancet **336**: 697-698.
- VAN GOOL, T., SNIJDERS, F., REISS, P., EEFTINCK SCHATTENKERK, J.K., VAN DEN BERGH, WEERMAN, M.A., BARTELSMAN, J.F., BRUINS, J.J., CANNING, E.U., DANKERT, J. 1993. Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique. J. Clin. Pathol. **46**: 694-699.
- VAN GOOL, T., CANNING, E.U., GILIS, H., VAN DEN BERGH WEERMAN, M.A., EEFTINCK SCHATTENKERK, J.K., DANKERT, J. 1994a. *Septata intestinalis* frequently isolated from stool of AIDS patients with a new cultivation method. Parasitology **109**: 281-289.
- VAN GOOL, T., CANNING, E.U., DANKERT, J. 1994b. An improved practical and sensitive technique for the detection of microsporidian spores in stool samples. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. **88**: 189-190.
- VAN GOOL, T., VETTER, J.C.M., WEINMAYR, B., VAN DAM, A., DEROUIN, F., DANKERT, J. 1997. High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. J. Infect. Dis. **175**: 1020-1024.
- VAVRA, J. 1977. Development of the Microsporidia. , p. 87-109. En: Comparative Pathobiology. Vol 1. Biology of the Microsporidia. Bulla, L.A. and Chang, T.C. eds., Plenum Press. New York.
- VAVRA, J., DAHBIOVA, R., HOLLISTER, W.S., CANNING, E.U. 1993a. Staining of microsporidian spores by optical brighteners with remarks on the use of brighteners for the diagnosis of AIDS associated human microsporidiosis. Folia Parasitol. **40**: 267-272.
- VAVRA, J., NOHYNKOVA, E., MACHALA, L., SPALA, J. 1993b. An extremely rapid method for detection of microsporidia in biopsy materials from AIDS patients. Folia Parasitol. **40**: 273-274.
- VELASQUEZ, J.N., CARNEVALE, S., GUARNERA, E.A. 1996. Detection of the microsporidian parasite *Enterocytozoon bieneusi* in specimens from patients with AIDS by PCR. J. Clin. Microbiol. **34**: 3230-3232.
- VISVESVARA, G.S., LEITCH, G.J., MOURA, H., WALLACE, S., WEBER, R., BRYAN, R.T. 1991. Culture, electron microscopy, and immunoblot studies on a microsporidian parasite isolated from the urine of a patient with AIDS. J. Protozool. **38**: 105S-111S.

- VISVESVARA, G.S., LEITCH, G.J., DA SILVA, A.J., CROPPO, G.P., MOURA, H., WALLACE, S., SLEMENDA, S.B., SCHWARTZ, D.A., MOSS, D., BRYAN, R.T., PIENIAZECK, N.J. 1994. 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.* **32**: 2760-2768.
- VISVESVARA, G.S., DA SILVA, A.J., CROPPO, G.P., PIENIAZEK, N.J., LEITCH, G.J., FERGUSON, D., DE MOURA, H., WALLACE, S., SLEMENDA, S.B., TYRRELL, I. 1995a. In vitro culture and serologic and molecular identification of *Septata intestinalis* isolated from urine of a patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 930-936.
- VISVESVARA, G.S., LEITCH, G.J., PIENIAZEK, N.J., DA SILVA, A.J., WALLACE, S., SLEMENDA, S.B., WEBER, R., SCHWARTZ, D.A., GORELKIN, L., WILCOX, C.M. 1995b. Short-term in vitro culture and molecular analysis of the microsporidian, *Enterocytozoon bieneusi*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**: 506-510.
- VOSSBRINK, C.R., WOESE, C.R. 1986. Eucaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature* **320**: 287-288.
- VOSSBRINK, C.R., MADDOX, J.V., FRIEDMAN, S., DEBRUNNER-VOSSBRINK, B.A., WOESE, C.R. 1987. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* **326**: 411-414.
- VOSSBRINCK, C.R., BAKER, M.D., DIDIER, E.S., DEBRUNNER-VOSSBRINK, B.A., SHADDUCK, J.A. 1993. Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon cuniculi*. Species identification and phylogenetic construction. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**: 354-362.
- VOSSBRINCK CR, BAKER MD, DIDIER ES. 1996. Comparative rDNA analysis of Microsporidia including AIDS related species. *J. Eukaryot. Microbiol.* **43**: 110S.
- WANKE, C.A., MATTIA, A.R. 1993. A 36-year-old woman with AIDs, increase in chronic diarrhea, and intermittent fever and chills. Case records of the Massachusetts General Hospital (Case 51-1993). *N. Engl. J. Med.* **329**: 1946-1954.
- WANKE, C.A., DE GIROLAMI, P., FEDERMAN, M. 1996. *Enterocytozoon bieneusi* infection and diarrheal disease in patients who were not infected with human immunodeficiency virus-case report and review. *Clin. Infect. Dis.* **23**: 816-818.
- WARD, D. M. , BATESON, M. M., WELLER, R. & RUFF-ROBERTS, A. L. 1992. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *Adv. Microbiol. Ecol.* **12**:219-286.
- WEBER, R, BRYAN, R.T. 1994. Microsporidial infections in immunodeficient and immunocompetent patients. *Clin. Infect. Dis.* **19**: 517-521.
- WEBER, R., BRYAN, R. T., OWEN, R. L., WILCOX, C. M., GORELKIN, L. & VISVESVARA, G. S. 1992a. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N. Engl. J. Med.* **326**:161-166.
- WEBER, R., KUSTER, H., KELLER R., BACHI, T., SPYCHER, M.A. BRINER, J., RUSSI, E., LUTHY, R. 1992b. Pulmonary and intestinal microsporidiosis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am. Rev. Resp. Dis.* **146**: 1603-1605.
- WEBER, R., KUSTER, H., VISVESVARA, G.S., BRYAN, R.T., SCHWARTZ, D.A.,LUTHY, R. 1993a. Disseminated microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem*: Pulmonary colonization, microhematuria and mild conjunctivitis in a patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **17**:415 419.

- WEBER, R., SAUER, B., LUTHY, R., NADAL, D. 1993b. Intestinal coinfection with *Enterocytozoon bieneusi* and *Cryptosporidium* in a human immunodeficiency virus-infected child with chronic diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* **17**: 480-483.
- WEBER, R., BRYAN, R.T., SCHWARTZ, D.A., OWEN, R.L. 1994a. Human microsporidial infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 426-61.
- WEBER, R., SAUER, B., SPYCHER, M.A., DEPLAZES, P., KELLER, R., AMMANN, R., BRINER, J., LUTHY, R. 1994b. Detection of *Septata intestinalis* in stool specimens and coprodiagnostic monitoring of successful treatment with albendazole. *Clin. Infect. Dis.* **19**: 342-345.
- WEBER, R., DEPLAZES, P., FLEPP, M., MATHIS, A., BAUMANN, R., SAUER, B., KUSTER, H., LUTHY, R. 1997. Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with human immunodeficiency virus infection. *New Engl. J. Med.* **336**:474-478.
- WEISS, L.M., CALI, A., LEVEE, E., LAPLACE, D., TANOWITZ, H., SIMON, D., WITTNER, M. 1992. Diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection by Western blot and the use of cross-reactive antigens for the possible detection of microsporidiosis in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **47**: 456-462.
- WEISS, L. M., ZHU, X., CALI, A., TANOWITZ, H. B., WITTNER, M. 1994 Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny: a review. *Folia Parasitol.* **41**:81-90.
- WEISSER, J. 1964. On the taxonomic position of the genus *Encephalitozoon* Levaditi, Nicolau & Shoen, 1923 (Protozoa, Microsporidia). *Parasitology.* **54**: 749-751.
- WEISSER J. 1977. Contribution to the classification of the Microsporidia. *Věstn. Cs. Spol. Zool.* **41**: 308-321.
- WEISSER, J. 1985. Phylum Microspora Sprague, 1969. En Lee, J.J. y col. eds.. *An Illustrated Guide to the Protozoa* pp. 375-383. Lawrence.
- WEISER J. 1993. Early experiences with microsporidia of man and mammals. *Folia Parasitol.* **40**: 257-260.
- WHEATLEY, W.B. 1951. A rapid staining procedure for intestinal amoebae and flagellates. *Am. J. Clin. Pathol.* **21**: 990-991.
- WICHER, V., BAUGHN, R.E., FUENTEALBA, C., SHADDUCK, J.A., ABBRUSCATO, F., WICHER, K. 1991. Enteric infection with an obligate intracellular parasite, *Encephalitozoon cuniculi*, in an experimental model. *Infect. Immun.* **59**: 2225-2231.
- WILKINS, J.H., JOSHI, N., MARGOLIS, T.P., CEVALLOS, V., DAWSON, C.R. 1994. Microsporidial keratoconjunctivitis treated successfully with a short course of fumagillin [letter]. *Eye* **8**: 703-704.
- WILLSON, R., HARRINGTON, R., STEWART, B., FRITSCH, T. 1995. Human immunodeficiency virus 1-associated necrotizing cholangitis caused by infection with *Septata intestinalis*. *Gastroenterology* **108**: 247-251.
- WOESE, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271-
- WRIGHT, J.H., CRAIGHEAD, E.M. 1922. Infectious motor paralysis in young rabbits. *Journal of Experimental Med.* **36**: 135-140.
- WUHIB, T., SILVA, T.M.J., NEWMAN, R.D., GARCIA, L.S., PEREIRA, M.L.D., CHAVES, C.S., WAHLQUIST, S.P., BRYAN, R.T., GUERRANT, R.L., SOUSA, A. DE Q., DE QUEIROZ, T.R.B.S., SEARS, C.L. 1994. Cryptosporidial and microsporidial infections in human immunodeficiency virus-infected patients in northeastern Brazil. *J. Infect. Dis.* **170**: 494-497.

- YACHNIS, A.T., BERG, J., MARTINEZ-SALAZAR, A., BENDER, B.S., DIAZ, L., ROJANI, A.M., ESKIN, T.A., ORENSTEIN, J.M. 1996. Disseminated microsporidiosis especially infecting the brain, heart, and kidneys. Report of a newly recognized pansporoblastic species in two symptomatic AIDS patients. *Am. J. Clin. Pathol.* **106**: 535-543.
- YAKOBSON, B., POTHICHOT, S., WONGSIRI, S. 1992. Possible transfer of *Nosema apis* from *Apis mellifera* to *Apis cerana*. Abstract Int. Conf. Asian honey bees and bee mites. Bangkok.
- YEE, R.W., FERMIN, O.T., ALBERTO MARTINEZ, J., HELD, K.S., SHADDUCK, J.A., DIDIER, E.S. 1991. Resolution of microsporidial epithelia kerathopathy in a patient with AIDS. *Ophthalmol.* **98**: 196-201.
- ZENDER, H., ARRIGONI, O.E., ECKERT, J., KAPANCI, Y. 1989. A case of *Encephalitozoon cuniculi* peritonitis in a patient with AIDS. *Am. J. Clin. Pathol.* **92**: 352-356.
- ZEMAN, C.H., BASKIN, G.B. 1985. Encephalitozoonosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Vet Pathol* **22**: 24-31.
- ZHU, X., WITTNER, M., TANOWITZ, H.B., KOTLER, D., CALI, A., WEISS, L.M. 1993a. Small subunit rRNA sequence of *Enterocytozoon bieneusi* and its potential diagnostic role with use of the polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* **168**: 1570-1575.
- ZHU, X., WITTNER, M., TANOWITZ, H.B., CALI, A., WEISS, L.M. 1993b. Nucleotide sequence of the small subunit rRNA of *Septata intestinalis*. *Nucleic Acids Res.* **21**:4846.
- ZHU, X., WITTNER, M., TANOWITZ, H.B., KOTLER, D., CALI, A., WEISS, L.M. 1993c. Small subunit rRNA sequence of *Enterocytozoon bieneusi* and its potential diagnostic role with use of the polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* **168**: 1570-1575.
- ZHU, X., WITTNER, M., TANOWITZ, H.B., CALI, A., WEISS, L.M. 1994. Ribosomal RNA sequences of *Enterocytozoon bieneusi*, *Septata intestinalis* and *Ameson michaelis*: phylogenetic construction and structural correspondence. *J. Eukaryot. Microbiol.* **41**: 204-209.
- ZIERDT, C.H., GILL, V.J., ZIERDT, W.S. 1993. Detection of microsporidian spores in clinical samples by indirect fluorescent-antibody assay using whole-cell antisera to *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 3071-3074.
- ZUCKERLAND, E., PAULING, L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* **8**: 357-366.



---

***APENDICE***

## **A. MICROSCOPIA OPTICA**

### **A.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

A.1.1. Preparar una extensión fina de la muestra (heces, saliva, orina, esputo, sobrenadantes de cultivo celular etc.) y dejar secar al aire.

A.1.2. Fijar la extensión por calor (3x 1 segundo sobre la llama de un mechero Bunsen o 5 minutos sobre una placa de calor a 60°C). Dejar enfriar a temperatura ambiente antes de proceder a teñir. Alternativamente se puede fijar también cubriendo la extensión con alcohol metílico durante 5 minutos.

A.1.3. Para procesar cortes de tejido fijados con formalina e incluidos en parafina, desparafinizar antes de proceder a teñir, según el siguiente protocolo:

Xilol	30 minutos
Xilol-Etanol 100% (v/v)	10 minutos
Etanol 100%	10 minutos
Etanol 90%	10 minutos
Etanol 70%	10 minutos
Agua destilada	10 minutos

### **A.2. SOLUCIONES UTILIZADAS EN LOS METODOS DE TINCION**

**Solución de chromotrope** (Modificado por Weber y col., 1992a).

Chromotrope 2R®*	6.0 g
Fast Green	0.15 g
Acido fosfotúngstico	0.70 g
Acido acético glacial	3.0 ml
Agua destilada q.s.p.	100ml

\* Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA

Preparación: mezclar los reactivos (excepto el agua destilada), durante 30 minutos. Tras obtener una buena homogeneización de los colorantes, añadir el agua destilada poco a poco hasta conseguir una solubilización completa. No es necesario filtrar.

**Solución de chromotrope** (Modificado por Moura y col., 1996).

Chromotrope 2R®	1.0 g
Fast Green	0.15 g
Acido fosfotúngstico	0.25 g
Acido acético glacial	3 ml
Agua destilada q.s.p.	100 ml

**Solución alcohol-ácido**

Alcohol etílico 90%	995.5 ml
Acido acético glacial	4.5 ml

**Solución de cristal violeta**

Cristal violeta	0.5 g
Oxalato amónico	0.8 g
Metanol	20 ml
Agua destilada q.s.p.	100 ml

**Solución de lugol**

Cristales de iodo	0.33 g
Ioduro potásico	0.66 g
Agua destilada q.s.p.	100 ml

**Solución decolorante**

Acetona	50 ml
Alcohol etílico 95%	50 ml

**A.3. METODOS DE TINCION****A.3.1. Tinción con marcadores fluorescentes (Didier y col, 1995b)**

- 1.- Dispensar sobre la muestra una solución de Calcofluor-White® (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) al 1% en PBS 0.001 M, pH 7.6.
- 2.- Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente en lugar oscuro.
- 3.- Lavar con PBS 0.001 M, pH 7.6 durante 5 minutos (3 veces).
- 4.- Dispensar una solución de azul de Evans al 0.2% (p/v).
- 5.- Lavar con PBS 0.001 M, pH 7.6 durante 5 minutos (3 veces).
- 6.- Dejar secar y montar.
- 7.- Examinar en un microscopio de fluorescencia (longitud de onda de 320-380 nm).

**A.3.1. Tinción de chromothrope (Weber y col., 1992a)**

1. Teñir con la solución de chromotrope durante 90 minutos.
2. Decolorar con alcohol-ácido durante 1 a 3 segundos.
3. Deshidratar con alcohol etílico 95% durante 5 minutos.
4. Deshidratar con alcohol etílico absoluto durante 10 minutos.
5. Clarificar dos veces con xilol durante 10 minutos.
6. Dejar secar y montar con Cytosel 60® (Stephens Scientific) o similar.

### **A.3.3. Tinción de gram-chromothrope (Moura y col., 1996)**

A. Realizar una tinción de Gram (excepto la contracoloración con safranina).

1. Teñir las extensiones en violeta de genciana durante 30 segundos.
2. Lavar el exceso de colorante con agua.
3. Introducir las extensiones en una solución de Lugol durante 30 segundos.
4. Retirar el exceso de lugol por arrastre con una solución decolorante .
5. Lavar con agua para retirar el exceso de la solución decolorante.

B. Realizar una tinción de chromotrope.

1. Sumergir la extensión en chromotrope caliente (50°-55° C), al menos 1 minuto.
2. Decolorar con alcohol ácido durante 1 a 3 segundos.
3. Deshidratar con alcohol etílico 95% durante 30 segundos.
4. Deshidratar dos veces (30 segundos cada vez) con alcohol etílico 100%.
5. Dejar secar y montar con Cytosel 60 ® (Stephens Scientific) o similar.

NOTA: En cortes histológicos, incrementar el tiempo de tinción en los tres colorantes, en 30 segundos.

## **B. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION**

### **B.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS**

Los medio de cultivo procedente de los frascos con células HLF o E6, fueron decantados, y centrifugados. El sedimento fue resuspendido con PBS y nuevamente centrifugado en las condiciones descritas anteriormente. Despues de tres lavados el sedimento fue resuspendido con fijador para MET (ver más adelante).

### **B.2. PREPARACION DE REACTIVOS**

Trabajar siempre en campana de gases (reactivos tóxicos).

**B.2.1. Fijador para MET (Formaldehído 4%-Glutaraldehído 1%)**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5.8 g
NaOH	1.35 g
40% Formaldehído	50 ml
50% Glutaraldehído	10 ml
Agua desionizada q.s.p.	500 ml

La osmolaridad final debe ser de 176 mosmol y el pH 7.2.

Conservar a 4°C, 3-6 meses.

**B.2.2. Tampón fosfato**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	5.8 g
NaOH	1.35 g
Agua desionizada q.s.p.	500 ml

La osmolaridad debe ser 176 mosmol y el pH 7.2 Conservar a 4C (3 meses).

**B.2.3. Tetraóxido de osmio 1% en tampón collidina-HCl 0.1 M**

Preparar las soluciones:

**A. Solución de OsO<sub>4</sub> al 2%**

Dispensar 2 g de OsO<sub>4</sub> en 100 ml de agua desionizada en una botella de cristal ámbar. Colocar en la botella un agitador magnético y agitar en campana durante varias horas hasta la disolución del OsO<sub>4</sub>. Guardar la solución en una segunda botella de vidrio y conservar a 4°C.

**B. Tampón Collidina-HCl 0.2 M**

Usar reactivos del kit Polysciences. Añadir el contenido (5.34 ml) del vial de s-collidina a 100 ml de agua desionizada. Colocar un agitador magnético y agitar unos minutos. Añadir el contenido del vial de HCl 1 N y agitar durante unos minutos. Añadir agua desionizada hasta un volumen de 200 ml. La osmolaridad debe ser 220 mosmol y el pH 7.3.

**B. Solución de trabajo**

Mezclar las soluciones A y B (v/v) en botella de vidrio ámbar. Colocar la botella en el interior de otra y conservar a 4°C.

**B.2.4. Medio Maraglas-Epoxy 732**

Maraglas Epoxy Resin	72 ml
----------------------	-------

**B.3. PREPARACION DE LOS BLOQUES**

1. Lavar las muestras durante 15 minutos con tampón fosfato (dos veces).
2. Fijar con OsO<sub>4</sub> al 1% en tampon collidina-HCl durante 1 hora (a 4°C o a temperatura ambiente).
3. Lavar con etanol al 70% durante 15 minutos.
4. Lavar con etanol al 95% durante 15 minutos.
5. Lavar con etanol absoluto durante 15 minutos (dos veces).
6. Lavar con óxido de propileno durante 15 minutos (dos veces).
7. Introducir la muestra en una solución 1:1 de óxido de propileno y Maraglas durante 30 minutos.
8. Introducir la muestra en Maraglas durante 5-6 horas a temperatura ambiente.
9. Colocar la muestra en cápsulas para ME.
10. Incubar las cápsulas a 60°C durante 18-24 horas.

**B.3. TINCION DE CONTRASTE****B.3.1. Preparación de las soluciones.**

## a) Acetato de uranilo:

Acetato de uranilo	5 g
Etanol al 70%	50 ml

Se puede conservar después de filtrado hasta un mes a 4°C en frasco limpio y tapado.

## b) Citrato de plomo:

Citrato de plomo	0,16 g
Agua	50 ml
NaOH 10N	unas gotas hasta aclarar la solución.

Se puede conservar hasta un mes a 4°C en matraz aforado muy limpio y tapado.

## B.3.2. Método de tinción.

1. Dispensar sobre la rejilla la solución de acetato de uranilo. Dejar teñir entre 3 y 5 minutos (en la oscuridad).
2. Lavar con agua. Dar unos 10 pases a cada rejilla. Repetir la operación.
3. Retirar el exceso de agua secando cada rejilla con papel de filtro.
4. Dispensar sobre la rejilla la solución de citrato de plomo. Dejar teñir durante 3 minutos.
5. Repetir el punto 2.
6. Secar las rejillas sobre papel de filtro durante un mínimo de 10 minutos antes de proceder a su observación.

**C. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.****C.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS**

Se utilizaron portas para inmunofluorescencia con 12 pocillos cada uno. En cada pocillo se aplicaron 5 µl de cada muestra, se fijaron a 37°C durante 2 horas. Los portas se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su uso.

**C.2. REACTIVOS****C.2.1. Solución salina tamponada (PBS)**

Fosfato sódico dibásico 0.01 M/ Fosfato sódico monobásico 0.01 M, ClNa 0.15 M. pH 7.2

Preparar las soluciones:

A.	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1.3799 g
	NaCl	8.766 g
	Agua desionizada q.s.p.	1000 ml

B.	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.6807 g
	NaCl	8.766 g
	Agua destilada q.s.p.	1000 ml.

Mezclar las soluciones A y B ( aproximadamente 5 partes de la solución A y 6 partes de la solución B) hasta que el pH sea 7.2.

### C.2.2. Antisueros utilizados

Suero policlonal de conejo anti-*E. hellem* (CDC: 0291: V213).

Suero policlonal de conejo anti-*E. cuniculi* (CDC: V282).

Suero policlonal de conejo anti-*E. intestinalis* (CDC: V297).

### C.2.3. Conjugado

Suero policlonal de cabra anti-conejo (Ig G, M) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Cappel, Westchester, PA, US), diluido (1:800) en PBS con azul de Evans al 0,2 % (p/v).

### C.2.4. Solución de montaje con alcohol polivinílico (PVA II)

1. Mezclar gradualmente 2.4 g de Alcohol polivinílico (PVA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) en 6 ml de glicerol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), evitando la formación de burbujas.
2. Añadir 6 ml de agua destilada y dejar reposar a temperatura ambiente varias horas.
3. Añadir 12 ml de tampón Tris 0.2 M, pH 8.5, mezclar y calentar a 50°C durante 10 minutos agitando ocasionalmente.
4. Cuando el PVA este disuelto, clarificar mediante centrifugación a 5.000 g (15 minutos).
5. Añadir 1,4-diazabicyclo-[2.2.2.] octano (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a una concentración final del 2.5%. Alicuotar en tubos de polipropileno y guardar a -20°C.

### C.3. METODO

1. Dispensar 5  $\mu$ l de anticuerpo específico (dilución 1:400) en cada pocillo.
2. Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos.
3. Lavar con PBS 0.001M, pH 7,6 durante 10 minutos (3 veces).
4. Dejar secar.
5. Dispensar 5  $\mu$ l de conjugado (dilución 1:800) en cada pocillo.
6. Incubar en cámara húmeda a 37C durante 30 minutos.
7. Lavar con PBS 0.001M, pH 7,6 durante 10 minutos (3 veces).
8. Dejar secar y montar con alcohol polivinílico (PVA II)

### D. ENSAYO INMUNOENZIMATICO SOBRE MEMBRANA DE NITROCELULOSA (WESTERN BLOT) (Tsang y col., 1991 ).

#### D.1. PREPARACION DE LA MUESTRA

Esporas de los aislados: *E. hellem* (CDC: 0291: V213); *E. cuniculi* (CDC: V282) y *E. intestinalis* (CDC: V297), fueron periódicamente colectadas de los respectivos cultivos celulares. Para ello los sobrenadantes del cultivo fueron centrifugados a 2000 g durante 20 minutos a 4°C. El sedimento fue dispersado en 10 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.25% e incubado a 37°C durante 20 minutos. Tras otra centrifugación como la descrita anteriormente el sedimento fue lavado tres veces en solución salina balanceada de Hank (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Las esporas se contaron en hemocitómetro.

#### D.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA 5-22.5% (SDS-PAGE)

##### D.2.1. Preparación del antígeno

En primer lugar se realizó una extracción de las proteínas de las esporas. Para ello,  $10^8$  esporas suspendidas en tampón de extracción conteniendo SDS al 2% y  $\beta$ -mercaptoetanol al 5% y expuestas a 100°C durante 5 minutos.

Entre 1 y 10 mg de proteínas fueron aplicados por calle y separados mediante electroforesis en gradiente de acrilamida del 5 al 22,5%.

**D.2.2: Preparación de reactivos**Tampón del gel inferior

Disolver 205.6 g de Tris (Schwarz-Mann, Inc., Spring Valley, NY, USA) en 950 ml de agua desionizada y ajustar el pH a 9.18 con HCl concentrado. Añadir agua hasta un volumen final de 1000 ml, filtrar con un filtro de 0.2 mm y conservar a 4°C.

Tampón de la cámara inferior

Diluir el tampón del gel inferior 1:4 con agua desionizada. Guardar a 4°C.

Tampón del gel superior

Disolver 2.62 g de Tris en 90 ml de agua desionizada y ajustar el pH a 6.14 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. Añadir agua hasta alcanzar un volumen final de 100 ml. Guardar a 4°C.

Tampón de la cámara superior

Disolver 2.47 g de ácido bórico y 4.92 g de Tris en agua desionizada. Añadir 10 ml de SDS al 10% y completar con agua hasta un volumen de 1000 ml. El pH de esta solución suele ser 8.64. Guardar a 4°C.

Solución de acrilamida para el gel de resolución (40%T:1%C [ratio de acrilamida y bis]).

Disolver 40 g de monómeros de acrilamida y 1 g de N,N'-metileno-bisacrilamida, en 65 ml de agua desionizada hirviendo. Dejar enfriar la solución a temperatura ambiente y añadir agua hasta completar un volumen de 100 ml. Filtrar (tamaño de poro: 0.2 µm). Esta solución puede usarse durante un mes pero nunca el día que fue preparada. Guardar en un recipiente de cristal y mantener a 4°C.

Solución de acrilamida para el gel de empujamiento (12%T:1.2%C)

Disolver 3.0 g de acrilamida y 0.3 g de N,N'-metileno-bisacrilamida en 15 ml de agua desionizada hirviendo. Dejar enfriar la solución a temperatura ambiente y añadir agua hasta completar un volumen de 25 ml. Filtrar (tamaño de poro: 0.2 µm). Esta solución puede usarse durante un mes pero nunca el día que fue preparada. Guardar en un recipiente de cristal y mantener a 4°C.

Solución de persulfato de amonio (PSA)

Pesar 33 mg de persulfato de amonio en un tubo de plástico. Añadir 6.0 ml de agua desionizada desgasificada para obtener una concentración final de 5.5 mg/ml. Mezclar bien. Preparar esta solución en el momento de preparar el gel de resolución. Esta solución diluida 1:5 en agua puede utilizarse para el gel de apilamiento.

Solución de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina).

Pipetear 5.55 ml de agua desionizada desgasificada en un tubo de vidrio. Añadir 450 ml de TEMED y mezclar con la pipeta. Preparar en el día de uso. Para el gel espaciador, diluir la solución anterior con agua (1:4).

Solución de isobutanol

Mezclar 700 ml de isobutanol y 300 ml de agua desionizada. Agitar durante 5 a 6 horas. Dejar en reposo hasta que el agua y el isobutanol se separen en dos fases. Usar la fase de isobutanol.

**D.2.3. Preparación del gel**

Preparar separadamente las siguientes soluciones:

	Gel 5%	Gel 22.5%
Agua desionizada	46.6 ml	12.6 ml
Tampón cámara inferior	20.0 ml	20.0 ml
Acrilamida sol resolución	10.0 ml	45.0 ml

Preparar soluciones de TEMED y de persulfato de amonio

Mezclar bien las cuatro soluciones y dejar en cámara degasificante durante 15 minutos.

Preparación de gel de resolución:

Retirar las soluciones de la cámara degasificadora. Colocar las soluciones de acrilamida en placas agitadoras y agitar lentamente evitando la aireación de las mismas.

Añadir primero el TEMED y seguidamente el PSA a cada solución:

	5%	22.5%
TEMED	1.2 ml	1.2 ml
PSA	2.0 ml	0.8 ml

Dispensar cuidadosamente las soluciones en un mezclador de gradiente (Pharmacia GM1) y preparar el gel. Cuando aproximadamente la tercera parte de gel esté formada, dispensar 1 ml de isobutanol y continuar dispensando la acrilamida hasta que la capa de isobutanol se encuentre a 1 cm del tope. Dejar el gel polimerizando durante 2 horas y retirar el isobutanol.

Preparar el gel espaciador:

Primero secar el área con un papel de filtro. Limpiar el peine de Teflon con etanol al 95%.

Insertarlo hasta 5 mm antes del gel de resolución y asegurarse que permanece centrado.

Mezclar las siguientes soluciones en el orden citado:

Tampón gel superior	2 ml
Acrilamida gel espaciador	2 ml
TEMED (150 ml/7.85 ml)	2 ml
PSA (1mg/ml)	2 ml

Mezclar bien con una pipeta y cargar en una jeringa de 10 ml.

Dispensar la solución hasta llenar el área de apilamiento. Dejar polimerizar durante 15 minutos. Retirar el peine y lavar la parte superior del gel con agua desionizada.

Electroforésis

Colocar el gel en la cuba de electroforésis y dispensar los respectivos tampones en sus cámaras.

Aplicar 1ml/mm de antígeno en el gel de apilamiento y el patrón de peso molecular.

Conectar la cámara de electroforesis a la fuente de alimentación y someter el gel a electroforesis, el gel de apilamiento a 10 mA, fijando un máximo de 25 watos por gel.

Una vez las proteínas hayan entrado en el gel, aumentar la potencia a 25 mA.

Mantener un circuito refrigerado para mantener la temperatura próxima a 4°C durante la electroforesis. Cuando el frente alcance el final del gel desconectar la fuente.

### **D.3. ELECTROTRANSFERENCIA A MEMBRANA DE NITROCELULOSA**

#### **D.3.1. Reactivos:**

##### Tampón de transferencia

Añadir a 2 litros de tampón de la cámara inferior, 800 ml de metanol absoluto y 1200 ml de agua desionizada. Mezclar y mantener a 4°C

##### Solución salina tamponada (PBS)

Ver pagina VII

##### Solución de PBS-Tween (0.3% Tween)

Dispensar 3 ml de Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 1 litro de PBS. Añadir el Tween lentamente, usando una jeringa con aguja de 14 g. Mantener el PBS en agitación mientras se adiciona el Tween. Preparar diariamente.

#### **D.3.2. Método**

Tras la electroforesis las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.20 mm (Schleicher and Schuell, Inc., Keene, NH, USA) sumergidas durante 5 minutos en tampón de transferencia

## D.4. Ensayo inmunoenzimático sobre membrana de nitrocelulosa

### D.4.1. Reactivos

#### Tampón de PBS-Tween-Leche desnatada (PBS-Tween-LD)

Añadir 5 g de leche desnatada en polvo a 100 ml de PBS-Tween y mezclar agitando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Preparar diariamente.

#### Antisuero

Antisuero policlonal de conejo anti-*E. hellem* (CDC: 0291: V213)

#### Conjugado

Antisuero de cabra marcada anti IgG de conejo marcado con peroxidasa (Cappel, Westchester, PA, USA) diluido 1:1000 en una solución de PBS con leche desnatada al 5%.

#### Solución de sustrato (DAB)

Añadir 50 mg de 3,3'-diaminobencidina (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate [DAB]) (Aldrich Chemical Co.) y 10 ml de agua oxigenada al 30% en 100 ml de PBS, pH 7.2. Preparar la solución diariamente. Es importante usar el agua oxigenada de la mayor pureza (con concentración de plomo de 0.01 ppm o menor), conservarla a 4°C y reemplazarla cada 6 meses.

### D.4.2. Método

1. Diluir el suero anti-*E. hellem* en tampón PBS-Tween-LD a la dilución 1:500.
2. Colocar las tiras de nitrocelulosa en la cámara de incubación.
3. Dispensar el suero anti-*E. hellem* diluido e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación .
4. Lavar las tiras una vez con PBS-Tween calentado a 50°C, seguidamente realizar 3 lavados más con PBS-Tween a temperatura ambiente. El tiempo de cada lavado es de 5 minutos.
5. Dispensar el anticuerpo marcado con peroxidasa previamente diluido en tampón PBS-Tween-LD e incubar 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante.

6. Lavar las tiras durante 5 minutos con PBS-Tween. Repetir la operación 4 veces. Realizar dos lavados adicionales usando únicamente PBS.

7. Retirar el PBS y dispensar la solución de sustrato (DAB). Las bandas reactivas aparecerán a los 10 minutos.

8. Parar la reacción enzimática lavando las tiras 10 veces con agua desionizada. Colocar las tiras boca arriba en un papel de filtro y protegidas de la luz directa y dejar secar.

## **E. REACCION EN CADENA POR LA POLIMERASA (PCR)**

### **E.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS**

Las muestras deben ser procesadas inmediatamente a su obtención o conservadas el menor tiempo posible a 4°C o congeladas a -80°C. En caso de necesidad se pueden conservar el etanol absoluto (v/v) o en dicromato potásico al 5% (v/v) a 4°C. Las heces conservadas en formalina al 10%, deben conservarse a 4°C y ser procesadas lo más rápidamente posible.

### **E.2. EXTRACCION DE DNA DE MUESTRAS FECALES.**

Las muestras con consistencia blanda a sólida, fueron suspendidas en 3 volúmenes de tampón fostato-salina (0.01 mol/L; pH 7.2) conteniendo una concentración 1 mmol/l de ácido etilendiaminatetraacético (PBS-EDTA) y una alícuota de 500 µl fue separada para extracción de DNA. El mismo volumen fue tomado directamente en las muestras con consistencia acuosa.

Las muestras fueron centrifugadas a 14000 g y resuspendidas en 1 ml de PBS-EDTA, este procedimiento se repitió 3 veces a 4°C (en las muestras mantenidas en formalina se realizaron previamente, dos lavados con etanol absoluto en las condiciones descritas).

El sedimento del último lavado fue resuspendido en 300 µl de tampón de digestión conteniendo 50 mmol/l de Tris-HCl, Ph 8.5, 1 mmol/l EDTA y 1% de lauryl alcohol polieter (Laureth 12®, PPG Industries Inc, Gurnee, Ill, USA). Cuando el sedimento fue demasiado denso y difícil de suspender se añadieron 200 µl adicionales de tampón de

digestión. Seguidamente se añadió Proteinasa K (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA) a la concentración final de 1 mg/ml y finalmente se adicionaron 0.1 g de perlas de vidrio (Sigma G-9139, Glass beads, Trimethylsilyl-silanized, 140-270 mesh, Sigma Chemical Co) por cada 0.1 ml de muestra.

La suspensión se agitó 4 veces durante 2.5 min cada vez, en un agitador (Biospec Products, Bartlesville, Okla, USA) a máxima velocidad. Las muestras se enfriaron entre las agitaciones, manteniéndolas en un baño de hielo durante 5 min.

Finalmente las muestras fueron centrifugadas para sedimentar las perlas de vidrio, y el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio. Se añadió de nuevo proteinasa K a la concentración final de 1 mg/ml, y el material fue incubado a 55°C hasta el día siguiente. Las muestras se incubaron a 95°C durante 10 minutos para inactivar la proteinasa K y posteriormente fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

### E.3. PURIFICACION DE DNA PARA PCR

El DNA fue purificado de los extractos de heces usando el RapidPrep Micro Genomic Isolation Kit for Cells and Tissue (Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA). El extracto de heces fue centrifugado a 14000 g durante 1 minuto y 100 ml del sobrenadante fue procesado siguiendo las instrucciones del fabricante, comenzando por el procedimiento B de dicho manual. Tras eluir el DNA fue precipitado con isopropanol y resuspendido en 50 ml de tampón tris-EDTA y conservado a 4°C hasta su uso.

### E.4. REACCION EN CADENA POR LA POLIMERASA

#### E.4.1. Reactivos

##### Master mix

Se emplearon los reactivos de Perkin Elmer GeneAmp PCR Reagent Kit ( Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con la siguiente variacion:

La master mix para 1 reacción fue:

Primer F <sup>1</sup>	1.0 µl
Primer R <sup>1</sup>	1.0 µl
Tampón 10x <sup>2</sup>	5.0 µl

DT <sup>3</sup>	1.0 µl
DG <sup>3</sup>	1.0 µl
DC <sup>3</sup>	1.0 µl
DA <sup>3</sup>	1.0 µl
Agua desionizada	28.75 µl
TAQ polimerasa <sup>4</sup>	0.25 µl
Volumen final	40 µl

1. Los iniciadores se prepararon a una concentración aproximada de 0.1 mg/ml; resultando una concentración final de 2 ng/ml, entre 0,2 y 0,5 mM en 50 ml de reacción.
2. Tampón Perkin Elmer 10x: Tris-HCl 100mM, KCl 15 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 nM, 0.01% de gelatina.
3. Deoxinucleótidos trifostados Perkin Elmer: 10 mM.
4. AmpliTaq polimerasa Perkin Elmer: 5U/µl

#### Iniciadores

Se utilizaron iniciadores específicos de *E. bieneusi* (EBIEF/EBIER) (Da Silva y col., 1996), *E. intestinalis* (SINTR/SINTF) (Da Silva y col., 1997a), *E. cuniculi* (ECUNF/ECUNR) (Visvesvara y col., 1994) y *E. hellem* (EHELf/EHELr) (Visvesvara y col., 1994). Todos ellos a una concentración de 1 µg/ml.

A continuación 10 µl de cada muestra y respectivos controles se añadía a la mezcla de reacción obteniendo un volumen final de 50 µl.

#### **E.4.2. Condiciones de reacción**

Las reacciones se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), en sistema de microplaca sin necesidad de usar aceite mineral.

Las condiciones de reacción establecidas fueron de 35 ciclos y las temperaturas empleadas para las etapas de desnaturalización, anillamiento y elongamiento fueron de 94, 55 y 72°C respectivamente.

#### **E.4.3. Electroforesis en gel de agarosa**

A diez  $\mu$ l de cada producto de amplificación se añadieron de 2  $\mu$ l de colorante trazador: Orange G al 1% (Mallinckrodt, Paris, Francia) en FicoIl 400 al 25% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). El volumen resultante se aplicó a un gel de agarosa al 2% (SeaKem GTG, FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA), en tampón Tris 0.1M, ácido bórico 0.09M, EDTA 0.001M, pH 8.4 (GibcoBRL, Gathersburg, MD, USA). La electroforesis se realizó a 10-11 volts/cm, hasta que el colorante alcanzase el final del gel. Un patrón de 100 pares de bases (GibcoBRL, Gathersburg, MD, USA) se incluyó en cada electroforesis.

#### **E.4.4. Visualización del producto amplificado**

Tras la electroforesis, el gel se incubó en una solución conteniendo 1 mg/ml de bromuro de etidio (GibcoBRL, Gathersburg, MD, USA) en tampón Tris 0.1M, ácido bórico 0.09M, EDTA 0.001M, pH 8.4 (GibcoBRL, Gathersburg, MD, USA) durante 15 minutos. Tras dos lavados de 10 minutos cada uno en el tampón referido, se visualizó bajo luz ultravioleta.

En altibajas elucubraciones nosológicas, el doctor Friladio exquimió con certeza factores genético-culsurales, y acorraló al evolvente masqueno, transmellando al eluyente masgro etiogénico.

-¡*Transcumises miodermalis cambrinensis*, ¡claro está!- Exclamó en silencio.- Roca volcánica, desnutrición, ambiente húmedo...

Escondió su excitante deliberación en las compuertas de sus neuronas, después de la larga disernancia, y justificó la imperceptible remiración, a los ojos de su paciente, con una explicación que rebasaba la comprensión de Elómina.

-Helmintos meniscópicos, ectoparásitos de mohó tropical, que en condiciones favorables procuran en humanos una localizada infección semioportunista y cronicante en, paradójicamente, zonas hipotérmicas superficiales,-explicó a Elómina.

Ella asentó positivamente, expresando en su tez una obvia duda al no haber entendido ninguna palabra con excepción de "infección". El doctor Frilardo le imprecó que no se preocupara, ya que la cura era sencilla y casi inmediata. Elómina se tranquilizó, mientras que el anderete continuaba balanceando sus piernas colgantes e inspeccionaba el consultorio con la lejanía de sus ojos. El médico preparó los asquendices quirúrgicos, y en pocos minutos procedió a la exsarción entre los gritos del niño en pávuco entremar. La carquinde apustulosa que drenaba de la incisión no era un problema de colinante diseminación, ya que era un tumor quístico sin infección y el doctor ya había tomado la precaución de preinyectarlo con un preparado de microcílico de vernel rojo con distemio sulfático. Con dos asguejes cerró la herida y la última de sus consultas.

Javier Enriquez Serralde  
Las primas segundas. Plaza y Valdés. México.