

# Diagnóstico de Microsporidiosis Intestinales

---



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Ekroth Martín

Fernández María Inés

Segredo Marcela

Tito Natalia

Ventura María Lucía

Acuña AM, Lena A, Tort C.

Universidad de la República, Facultad de Medicina

Instituto de Higiene

Departamento de Parasitología y Micología

Montevideo, Uruguay

## Índice de contenidos

Resumen.....	3
Introducción.....	3
Objetivos.....	7
Resultados.....	8
Conclusiones y perspectivas.....	12
Bibliografía.....	14
Agradecimientos.....	17

## Resumen

Las microsporidiosis intestinales son infecciones emergentes oportunistas causante de diarrea en inmunocompetentes e inmunodeprimidos, atribuibles principalmente a *Enterocytozoon bienewisi* y *Encephalitozoon intestinalis*. En general el diagnóstico de los mismos es complejo debido a su pequeño tamaño, existiendo múltiples técnicas específicas para la detección de este microorganismo. Teniendo como objetivo revisar y reseñar las diferentes técnicas utilizadas a nivel mundial, analizando su rendimiento y aplicabilidad en nuestro medio, se realizó una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos online. Se seleccionaron 17 artículos que cumplieran con los criterios de búsqueda definidos y a partir de los mismos se realizó una tabla analizando sus principales características. El rendimiento de las técnicas fue comparado en una segunda tabla con los datos de los artículos aportaban este tipo de información, principalmente contrastando valores de sensibilidad y especificidad. La mayoría de los artículos coincidía en que las técnicas de tinción como Tricrómica modificada de Weber son suficientes para el diagnóstico de microsporidiosis. También coinciden en la importancia de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como método de identificación de especie, resaltando su utilidad en epidemiología y fundamentalmente en el tratamiento. Concluimos que el tener técnicos y profesionales capacitados en la utilización de métodos de tinción es suficiente para el diagnóstico. Mayor investigación respecto a aplicabilidad y costo beneficio del PCR podrían ser útiles a futuro en vistas a la importancia de la determinación de especie.

Palabras Clave: microsporidiosis, intestinal, humanos, técnicas diagnósticas.

## Introducción (Marco Teórico)

Los Microsporidios son parásitos oportunistas intracelulares obligados eucariotas, carentes de mitocondrias, con ciclos complejos, formadores de pequeñas esporas unicelulares resistentes (1). Fueron recientemente incluidos en el reino *Fungi*. Ocho géneros y catorce especies están asociados con infecciones humanas, de los cuales *Enterocytozoon bienewisi* (*E. bienewisi*) y *Encephalitozoon intestinalis* (*E. intestinalis*) son los más comúnmente reportados en enfermedades gastrointestinales (2). *Encephalitozoon cuniculi* y *Encephalitozoon hellem* son menos frecuentes.

Afectan a diferentes hospederos incluidos vertebrados e invertebrados. Surgieron como patógenos oportunistas en humanos durante la pandemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y también en pacientes trasplantados. *E. bienewisi* fue descrito por primera vez en asociación con malabsorción y diarrea en pacientes con SIDA en 1985(2). La detección

de *E. bieneusi* en pacientes inmunocompetentes fue recientemente descrita. Fueron encontradas en enterocitos y en células de la lámina propia como así también en células epiteliales del árbol biliar, en los túbulos renales, epitelio bronquial y epitelio nasal(2).

Las infecciones causadas por *E. intestinalis* son tratadas con Albendazol, mientras que Fumagilina mostró ser efectivo para la erradicación de *E. bieneusi*. Por lo tanto la identificación de especies constituye un pilar fundamental para lograr un tratamiento adecuado (3).

### Manifestaciones clínicas

En inmunocompetentes causan generalmente diarrea acuosa autolimitada, mientras que en inmunocomprometidos fueron reconocidos como patógenos oportunistas causantes de diarrea crónica.

*E. bieneusi* suele producir diarreas acuosas sin sangre, anorexia, pérdida de peso y edema intestinal mientras *E. intestinalis* puede diseminarse sistémicamente a través de macrófagos migrantes.

Algunos pacientes experimentan diarreas intermitentes. Las heces son líquidas o pastosas, la diarrea empeora con la ingesta de la mayoría de los alimentos, con frecuencia los pacientes reportan dolor abdominal o náuseas y vómitos. La diarrea es debilitante y la pérdida de peso conduce a caquexia, la cual es una causa importante o co-factor para la muerte (4).

En cuanto a la patogenicidad, característicamente producen alteraciones en las vellosidades del intestino delgado y activación de la respuesta inflamatoria. Pueden afectar al sistema nervioso central y otros órganos como hígado, páncreas, ojos, músculos, tractos respiratorio y urinario (5).

### Epidemiología en Uruguay

En abril de 1998 se comenzaron a implementar técnicas de coloración para esporas de microsporidios, como Gram-cromotrope y tricrómica modificada en el Departamento de Parasitología y Micología de la Facultad de Medicina (6).

El primer caso de microsporidiosis intestinal del Uruguay fue diagnosticado en el 1999 en un paciente portador de diarrea crónica y con diagnóstico de virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en etapa SIDA. El método utilizado fue frotis de heces coloreado con Gram-cromotrope y tricrómica modificada. El diagnóstico fue confirmado en el Center for Disease Control (CDC) de Estados Unidos (6).

En 2002 el Hospital Pereira Rossell realizó diagnóstico de microsporidiosis en niños VIH positivos y niños inmunocompetentes con diarrea mediante métodos de tinción. De 304 muestras 15 resultaron positivas (7).

En ese mismo año se propone un algoritmo para diagnóstico de enteroparasitosis en niños el cual incluye la técnica tricrómica para microsporidios (8).

En el 2006 el Departamento de Parasitología y Micología del Instituto de Higiene comienza a implementar una técnica de coloración para el diagnóstico simultáneo de coccidios y

microsporidios por medio de la técnica combinada de fucsina y Tricrómica modificada de Didier.

Según el estudio esta coloración se puede realizar en 45 minutos, siendo de bajo costo y fácil reproducibilidad, obteniendo buenos resultados(9).

En el año 2008 un estudio retrospectivo de la Sección Parasitología y Micología del CHPR sobre el diagnóstico de enteroparásitos en niños relata el hallazgo de esporas de microsporidios en coproparasitarios recolectados entre los años 2006 y 2007. El mismo concluye que los parásitos oportunistas más frecuentes fueron *Cryptosporidium spp.* y microsporidios (10).

Un estudio realizado en pacientes VIH/SIDA asistidos en el Servicio de Enfermedades Infecciosas Contagiosas (SEIC) de ASSE entre marzo de 2009 y agosto de 2010 concluyó también que los Microsporidios y *Cryptosporidium spp.* fueron los agentes oportunistas más diagnosticados, se hallaron con mayor frecuencia en individuos con diarrea y con menos de 200 CD4+ y que el uso de terapia antiretroviral (TARV) disminuye su frecuencia (11).

Entre 2010 y 2014 se realizó un estudio buscando enteropatógenos en los pacientes VIH/SIDA que fueron atendidos en el SEIC. Se estudiaron 142 pacientes de los cuales un 5.6% presentaban infección por microsporidios detectada por técnica tricrómica de Weber. El estudio concluye que la diarrea sigue siendo un problema frecuente en este tipo de pacientes y recomienda la utilización del examen coproparasitario con coloraciones específicas para coccidios y microsporidios que fueron los más prevalentes (12).

Actualmente en nuestro país se realiza diagnóstico de microsporidiosis a partir de técnicas de microscopía óptica. Estas técnicas no permiten definir género ni especie. Se realizan únicamente en el Departamento de Parasitología y Micología del Instituto de Higiene y en el Centro Hospitalario Pereira Rossell.

### **Diagnóstico**

El diagnóstico de la microsporidiosis ha sido difícil de realizar por diversas razones, entre las más importantes están su tamaño muy pequeño (1-2 micras de longitud) y su forma de espora que las hace confundible con otros patógenos bacterianos. Se pueden utilizar diferentes tipos de muestras para diagnóstico de microsporidiosis, tales como: materia fecal, orina, biopsia, esputo o lavado broncoalveolar, lavado bronquial, conjuntival, nasal, líquido cefalorraquídeo, etc. (2,13).

Los estudios coprológicos convencionales, es decir sin realizar las técnicas de tinción específicas, son leídos como negativos y no aportan ninguna información que sirva para sospechar la presencia de esta clase de parásito intestinal (4,14,15).

Se han propuesto diferentes coloraciones para la identificación de los esporos de microsporidios en materia fecal, entre las que se destacan: Tricrómica modificada de Weber o de Ryan, Gram-cromotrofo rápida caliente, tinciones con fluorocromos Calcofluor blanco y Uvitex 2B (14,15). La diferencia entre el tamaño de las esporas de *Enterocytozoon* y *Encephalitozoon spp.*, permite

establecer un diagnóstico diferencial tentativo entre los géneros, pero éste debe confirmarse mediante microscopía electrónica o mediante técnicas de biología molecular: PCR (reacción en cadena de la polimerasa) , FISH (hibridación fluorescente in situ), métodos basados en la identificación de antígeno como IFAT (prueba de anticuerpos por inmunofluorescencia), ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) e Inmunoblot, estos utilizan anticuerpos de animales experimentalmente inmunizados para reconocer antígenos específicos(1,4,14,16,17). La diferenciación de especie constituye un hecho deseable para un mejor abordaje terapéutico de los pacientes, al igual que permite un manejo más racional (5).

### **Técnicas de Microscopía Óptica:**

La demostración a través del microscopio de luz se logra con métodos de tinción que generan contraste diferencial entre las esporas del microorganismo y las células presentes en las muestras clínicas (16).

Tricrómica: emplea Cromotropo 2R, las esporas se colorean rosado claro con un fondo verde azul, algunas aparecen transparentes, pero la mayoría muestran una pequeña línea central que corresponde al túbulo polar lo que confirma el diagnóstico de microsporidiosis intestinal. Existen varias modificaciones de la Tricrómica incluyendo cambios en la temperatura de la solución de tinción y tiempo de tinción: modificación de Weber (1992)(18), Ryan (1993)(19), Kokoskin (1994)(20) y Didier (1995)(21) (2,13,15).

Gram-cromotrope rápida caliente: las esporas se tiñen de violeta oscuro, muestran como mínimo uno de los rasgos estructurales de los microsporidios y además se observan las esporas como gránulos Gram positivos (15).

Giemsa: A pesar de que las esporas de los microsporidios pueden resultar celestes, resulta difícil diferenciarlas del resto de los elementos presentes en los frotis (13).

Plata metamina de Grocott: Los componentes de mucopolisacáridos de la pared celular se oxidan para liberar los grupos aldehído. Los grupos aldehído reaccionan entonces con el nitrato de plata, reduciéndolo a una plata metálica, lo que los hace visibles de color oscuro, pero de esta manera se tiñen también elementos fúngicos lo que puede llevar a confusión en el diagnóstico (22).

Hematoxilina Eosina: A pesar de que los organismos se han identificado en preparaciones de tejidos histológicos de rutina, no tienden a manchar con resultados predecibles. Solamente patólogos experimentados han sido capaces de identificar microsporidios utilizando esta técnica (13).

Tinciones Fluorescentes (Calcofluor blanco y Uvitex 2B): son tinciones que requieren para su lectura el uso de un microscopio de fluorescencia, dependiendo del agente usado y la longitud de onda será la fluorescencia de la pared de la espora del microsporidio. Estos colorantes se unen a la pared quitinosa de la espora (13,15,16,23,24).

**Técnicas de Microscopía Electrónica:** es considerado el estándar de oro (Gold standard) para la confirmación del diagnóstico y la identificación de la especie de microsporidio, permitiendo

observar la ultraestructura del microorganismo incluyendo los tubos polares enrollados y otros caracteres estructurales específicos de cada especie. Esta opción no está disponible en la gran mayoría de los laboratorios por su infraestructura y costo elevado (2,13,17,24).

### **Técnicas moleculares:**

PCR: amplifica segmentos de ácidos nucleicos al utilizar oligonucleótidos, con secuencias específicas que reconocen de manera exclusiva cada una de las especies de microsporidios intestinales implicadas, sin presentar reacciones cruzadas entre los microsporidios intestinales. Es una técnica rápida, sensible y específica, pero de alto costo (15,17).

FISH: utiliza una sonda marcada con fluorescencia que se une al ácido nucleico complementario (ADN o ARN) en el espécimen.

A pesar de ser un procedimiento atractivo y que brinda información específica, resulta laborioso y desafiante, requiriendo múltiples pasos previos a la visualización en el microscopio de fluorescencia y es menos sensible que el PCR (17).

Método de Rinder y Liguori: Está basado en la secuenciación de la región ITS interna 243 pb. Ha puesto de manifiesto una considerable diversidad genética dentro de *E. bienersi* que aislaron más de 50 genotipos distintos reportados hasta la fecha en seres humanos y animales (5).

### **Métodos basados en identificación de antígenos:**

IFAT/ELISA: utilizan anticuerpos de animales experimentalmente inmunizados para reconocer antígenos específicos característicos de patógenos. Los anticuerpos pueden ser policlonales (por ejemplo, purificados a partir de suero animal y dirigidos contra de varios epítomos de la proteína) o monoclonales (purificados a partir de sobrenadantes de cultivo celular).

Se han desarrollado una serie de estos contra microsporidios que infectan humanos. Más a menudo estos anticuerpos se han dirigido contra la pared de esporas o el tubo polar de los microsporidios (17).

## **Objetivos**

### Objetivo general

Revisar y reseñar las diferentes técnicas utilizadas a nivel mundial hasta el momento para el diagnóstico de microsporidiosis intestinal.

### Objetivos específicos

- 1.- Describir y comparar las diferentes técnicas diagnósticas encontradas y analizar su rendimiento y aplicabilidad en el medio.
- 2.- Analizar cuál de las técnicas obtiene mejor rendimiento.
- 3.- Recomendar posibles técnicas a incorporar en nuestro medio.

## Resultados

Se realizó una búsqueda bibliográfica en cuatro etapas, en la primera empleamos diferentes bases de datos online como Timbó, Medline, Pubmed, Scielo, Embase, Cochrane, Lilacs, Popline y Latindex, utilizando como palabras claves **microsporidiosis, intestinal, human y diagnosis** e incluyendo los artículos publicados a partir del año 2010. A partir de esta obtuvimos solo nueve artículos que lidiaban con el diagnóstico de este microorganismo.

Por esto decidimos ampliar la fecha de publicación al año 2000, obteniendo así treinta artículos. Tras realizar una primera lectura de los mismos detectamos que muchos de ellos hacían referencia al diagnóstico de microsporidiosis solamente mencionando que es laboratorial, sin profundizar en las técnicas disponibles. Por lo cual no nos aportaban información útil para nuestra revisión.

Luego de esta selección utilizamos las referencias de los artículos seleccionados que tenían fecha de publicación más actual para obtener nuevos artículos.

Finalmente realizamos una búsqueda en base a los nombres de las especies y por último una búsqueda en la base de datos de Mendeley con las mismas palabras claves.

Obtuvimos un total de diecisiete artículos que contribuían con información útil sobre el diagnóstico de microsporidiosis, a partir de los cuales se trabajó en la revisión. Los artículos que aportaban información epidemiológica, histórica, de situación regional y descripción de técnicas diagnósticas fueron utilizados para la realización del marco teórico.

Se realizó una lectura meticulosa de todos los artículos a utilizar, y a partir de los mismos confeccionamos una tabla (Tabla1) en la cual se especificó: país de procedencia, fecha de publicación, técnicas a comparar, tipo de población, tipo de muestra y especies encontradas.

De los diecisiete artículos obtenidos catorce utilizaron PCR, la mayoría asociado a otras técnicas(4,5,14,23,25,34). Solo dos artículos utilizaron esta técnica de forma exclusiva. Estos fueron realizados en Corea (33) y Venezuela (14) en 2015 y 2013 respectivamente. Ambos utilizan el PCR para diagnosticar microsporidios en pacientes VIH positivos, en el caso del estudio coreano eran pacientes portadores de diarrea crónica. Lo interesante de este segundo artículo fue su investigación respecto al suelo, en un país donde no hay reportes previos de infección por microsporidios en humanos (sí en animales y fuentes de agua). De todos modos este artículo se basa primordialmente en la epidemiología de la Microsporidiosis Intestinal y sus fuentes de infección más que en el análisis de la técnica utilizada. Del total de artículos, quince emplearon distintos tipos de tinciones como Tricrómica modificada de Weber y sus modificaciones, Hot cromotrope Kokoskin, Gram-cromotrope, Hematoxilina y eosina, Gram-cromotrope rápida caliente, plata metamina de Grocott, Giemsa, tinción de fluorescencia con Uvitex 2B, tinción de fluorescencia con Calcofluor blanco (1,3,4,23,25–28,35).

Artículo	Autor(es)	País	Fecha	Técnica(s) utilizada(s)	Población	Tipo(s) de muestra(s)	Cantidad de muestras	Especie(s) de
Clinical and diagnostic aspects of intestinal microsporidiosis in HIV-1 infected patients with chronic diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil (23)	Brasil P, de Lima DB, de Paiva DD, Lobo MS, Soares FO, Silva SP	Brasil	2000	Tricrómica modificada de Weber, Gram-cromotrope, Hematoxilina-eosina, plata metálica de Girocot, Giemsa, PCR	Pacientes VIH positivos con diarrea	Materia fecal, biopsia intestinal	40 de materia fecal y 39 biopsias	<i>E. bienewsi</i>
Evaluation of an Immunofluorescent Antibody test using monoclonal antibodies directed against <i>E. bienewsi</i> and <i>E. intestinalis</i> for diagnosis of intestinal Microsporidiosis in Bamako (Mali) (25)	Alfa Cisse O, Outtara A, Thellier M, Accoosberry I, Biligui S, Minta D	Mali	2002	Tinción con Uvitex 2B, IFAT, PCR	Pacientes VIH positivos y niños de 1 a 60 meses	Materia fecal	132	<i>E. bienewsi</i>
Intestinal Microsporidiosis Due to Enterocytozoon bienewsi in Elderly Human Immunodeficiency Virus-Negative Patients from Vigo, Spain (27)	Lores B, López-Mingoy A, Arias C, Fenoy S, Torres J, del Aguila C	España	2002	Tricrómica modificada de Weber, PCR	Pacientes VIH negativos	Materia fecal, biopsia intestinal	193	<i>E. bienewsi</i>
Evaluation Of DNA Extraction and PCR Methods For Detection Of Enterocytozoon bienewsi In Stool Specimens (28)	Subrungruang J, Mungthin M, Chavattishewinokorn Patmitri P, Rangasin R, Naaglor T, Leelayoova S	Tailandia	2004	Gram-cromotrope, PCR	Niños	Materia fecal	290	<i>E. bienewsi</i>
Frecuencia de microsporidiosis intestinal en pacientes positivos para VIH mediante las técnicas de Gram cromotrope rápido y PCR (4)	Botero J, Montoya M, Venegas A, Díaz A, Navarro Martínez L, Bormay F	Colombia	2004	Gram-cromotrope rápida caliente y PCR	Pacientes VIH positivos	Materia fecal	309	<i>E. bienewsi</i> y <i>E. intestinalis</i>
Laboratory diagnosis of opportunistic intestinal parasites with emphasis on human microsporidiosis, in Golanía-Go (1)	García-Zapata MT, Manzi RS, Souza Júnior ES de, Fagundes GM, Macedo DF, Barros DAC	Brasil	2006	Tricrómica modificada de Weber, hot cromotrope Kokoskin, técnicas de HPL, Rugai y Faust	Inmunodeprimidos e Inmunocompetentes	Materia fecal	723	No identifica
Retrospective Species Identification of Microsporidian Spores in Diarrheal Fecal Samples from Human Immunodeficiency Virus/AIDS Patients by Multiplexed Fluorescence In Situ Hybridization (29)	Graczyk TK, Johanson MA, Tamang L, Veesavara GS, Moura LS, DaSilva AJ	Estados Unidos	2007	Tricrómica modificada de Weber, Calcofluor blanco, PCR, FISH	Pacientes VIH positivos con diarrea y microsporidiosis intestinal	Materia fecal	110	<i>E. bienewsi</i> y <i>E. intestinalis</i> y <i>E. hellem</i>
Prevalence of intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus infected patients with diarrhea in major United States cities (35)	Dworkin MS, Buskin SE, Davidson AJ, Cohn DL, Morse A, Inungu J	Estados Unidos	2007	Tricrómica modificada de Weber, Quick-hot Gram	Pacientes VIH positivos con diarrea	Materia fecal	737	No identifica
Performance of microscopy for detection of microsporidian spores from stool samples of HIV infected individuals with diarrhea (2)	Kulkarni S, Patsute S, Chandane M, Risbud A	India	2011	Tricrómica modificada de Weber, tinción de fluorescencia con Uvitex 2B, PCR	Pacientes VIH positivos con diarrea	Materia fecal	65	<i>E. bienewsi</i> y <i>E. intestinalis</i>
Species identification of intestinal microsporidia using immunofluorescence antibody assays (3)	Al-Mekhlafi MA, Fatmah MS, Anisah N, Azlin M, Al-Mekhlafi HM, Norhayati M	Malasia	2011	Tricrómica modificada de Weber, IFAT	Pacientes hospitalizados y de policlínicas	Materia fecal	100	<i>E. bienewsi</i> , <i>E. intestinalis</i>
Latent microsporidian infection in immunocompetent individuals - A longitudinal study (30)	Sak B, Kváč M, Kučerová Z, Květoňová D, Saková K	República Checa	2011	IFAT, Calcofluor blanco, PCR	Personas VIH negativos	Materia fecal, muestras de orina	15	<i>E. bienewsi</i> , <i>E. hellem</i> , <i>E. cucullii</i>
Genotype of Enterocytozoon isolates from stool samples of HIV infected Tunisian patients (5)	Chabchoub N, Abdelmalek R, Bregon J, Kanoun F, Thellier M, Bourattine A	Túnez	2012	Estudios moleculares basados en el análisis del gen del ARN-r, con métodos de Rinder y Liguori, Tricrómica modificada de Weber, PCR	Pacientes VIH positivos	Materia fecal	9	<i>E. bienewsi</i>
Identification and Characterization of Microsporidia from Fecal Samples of HIV-Positive Patients from Lagos, Nigeria (31)	Ojuroti OT, Izquierdo F, Fenoy S, Fagbenro-Beyoku A, Oyibo W, Akanmu A	Nigeria	2012	Tricrómica modificada de Weber, IFAT, PCR	Pacientes VIH positivos	Materia fecal	193	<i>E. bienewsi</i> , <i>E. intestinalis</i> , <i>E. cucullii</i>
Prevalencia de <i>E. intestinalis</i> y <i>E. bienewsi</i> en pacientes VIH positivos de Maracaibo, Venezuela (14)	Rivero-Rodríguez Z, Hernández Sierra A, Arráz N, Bracho Mora A, Villalobos Percozo R	Venezuela	2013	PCR	Pacientes VIH positivos	Materia fecal	50	<i>E. bienewsi</i> y <i>E. intestinalis</i>
Comparison of staining techniques and multiplex nested PCR for diagnosis of intestinal microsporidiosis (32)	Saigal K, Khurana S, Sharma A, Sehgal R, Mallia N	India	2015	Tricrómica modificada de Weber, Calcofluor blanco, PCR	Pacientes VIH negativos con diarrea, pacientes VIH positivos con diarrea, pacientes VIH positivos sin diarrea y pacientes sanos.	Materia fecal	395	<i>E. bienewsi</i> y <i>E. intestinalis</i>
Detection of <i>Encephalitozoon</i> spp. from Human Diarrheal Stool and Farm Soil Samples in Korea (33)	Kim K, Yoon S, Cheun H-H, Kim J-H, Sim S, Yucor J-R	Corea	2015	PCR	Pacientes VIH positivos con diarrea	Materia fecal, muestras de suelo agrícola	139 muestras de materia fecal y 34 muestras de suelo	<i>E. intestinalis</i> y <i>E. hellem</i>
Comparative Evaluation Of Staining Techniques And Polymerase Chain Reaction For Diagnosis Of Intestinal Microsporidiosis In Immunocompromised Patients (34)	Ghoshal U, Khandula S, Agarwal V, Dholé T	India	2015	Tricrómica modificada de Weber, Calcofluor blanco, PCR	Pacientes inmunocomprometidos con o sin diarrea	Materia fecal	730	<i>E. bienewsi</i>

Tabla 1. Resultado de la búsqueda bibliográfica sobre diagnóstico de microsporidiosis intestinales. Montevideo, 2016.

Otros cuatro aplicaron la IFAT. Uno de ellos realizado en Malasia en 2011 en pacientes inmunocompetentes compara la validez de la determinación de microsporidiosis intestinal entre IFAT y la Tricrómica modificada de Weber, tomando esta última como referencia.

Un estudio realizado en Mali en 2002 en pacientes VIH y niños utiliza IFAT, Uvitex 2B y PCR. Tomando PCR como referencia compara las distintas técnicas en especificidad, sensibilidad y realiza comentarios sobre los costos y el tiempo que requiere cada una de ellas. Por otro lado el autor brinda su opinión sobre los distintos aspectos que pueden influir a la hora de detectar estos microorganismos, como pasa en casos que se utilizan tinciones que pueden teñir también levaduras y disminuir la especificidad del estudio (26). Por otro lado, el realizado en Nigeria, un país en vías de desarrollo, compara Tricrómica modificada de Weber, IFAT y PCR, centrando su análisis en la epidemiología y enfatizando en que son enfermedades infecciosas que van aumentando su prevalencia en este tipo de regiones (31). El cuarto artículo que utiliza IFAT fue

realizado en República Checa en 2011 en población inmunocompetente y utiliza también PCR y calcofluor blanco (30).

El estudio realizado en Brasil en pacientes VIH positivos con diarrea analizó muestras fecales y biopsias intestinales para el diagnóstico de patógenos entre ellos de microsporidios. Utilizaron diversas técnicas como: Tricrómica modificada de Weber, Gram-cromotrope, Hematoxilina-eosina, Plata Metamina de Grocott, Giemsa y PCR(30).

Uno de los artículos fue realizado en Estados Unidos en el 2007 en pacientes VIH con diarrea y compara las técnicas de PCR, Tricrómica de Weber, Calcofluor blanco y FISH (29), siendo el único que utiliza esta última técnica. La identificación de las esporas de microsporidios por el ensayo FISH fue más sensible que ambas tinciones: cromotropo 2R y Calcofluor Blanco; 85.5% contra 72.7 y 70.9% respectivamente. Los autores afirman que el ensayo FISH es un método fiable, cuantitativo por microscopía de fluorescencia para la identificación simultánea de *E.bieneusi*, *E. intestinalis*, y *E.hellem*, así como *Encephalitozoon cuniculi*. El método se puede utilizar para las investigaciones epidemiológicas y se aplica en la práctica clínica.

Por otro lado el estudio realizado en Túnez en 2012 diagnóstica microsporidiosis en pacientes VIH por medio de una técnica molecular como son los métodos de Rinder y Liguori, así como también utilizando Tricrómica de Weber y PCR (5).

En relación a la procedencia de los artículos, seis fueron realizados en Asia: Malasia (3), India (23,32,34), Tailandia (28), Corea (33); cuatro en Sudamérica: Brasil (1,25), Colombia (4), Venezuela (14), tres en África: Túnez (5), Mali (26) y Nigeria (31); dos en Europa: España (27) República Checa (30) y dos en Norteamérica: Estados Unidos (33,35).

En cuanto a la población estudiada en diez publicaciones se trabajó únicamente con inmunocomprometidos, algunos de ellos específicamente pacientes VIH con diarrea (23,25,29,32–35) y otros sin esta patología (4,5,14,31,32,34). Solo tres estudiaron casos de inmunocompetentes (27,30,32). Un artículo en particular (26) trabaja con pacientes VIH positivos y niños de entre 1 a 60 meses con o sin VIH.

Se obtuvieron cinco artículos que analizan la sensibilidad y especificidad de diferentes técnicas, entre ellas PCR, IFAT, y las tinciones Tricrómica modificada de Weber, Calcofluor blanco y Uvitex 2B. A partir de estos se realizó una tabla (Tabla 2) donde se comparan dichos métodos de análisis, respecto a su rendimiento(3,26,28,32,34). De estos artículos cuatro analizan el PCR, obteniendo una sensibilidad que varía entre 96,8% y 100%, y especificidad entre 97,9% y 100% para la detección de microsporidiosis e identificación de su especie (26,28,32,34).

El estudio realizado en Malasia en pacientes en hospitalizados compara el rendimiento de la IFAT frente a la Tricrómica modificada de Weber modificada, observándose, que IFAT tiene un 98% de sensibilidad y 86% de especificidad (3). Otro estudio en inmunocomprometidos con o sin diarrea realizado en India en el 2015 compara tinción Tricrómica modificada de Weber, Calcofluor blanco y PCR. Dando como resultado una sensibilidad para Calcofluor blanco de

100%, Tricrómica modificada de Weber de 93,8% y PCR 96,8% y una especificidad de 68,5, 100%, 99,8% respectivamente (34). Una comparación entre Gram-cromotrope y PCR en Tailandia en el año 2004, arrojó una sensibilidad de 100% para PCR, 86,7% para Gram-cromotrope y una especificidad 100% para ambas técnicas (26).

Con respecto al estudio realizado en Mali en 2002 que compara Tinción con Uvitex 2B, IFAT y PCR, la sensibilidad para todos fue de 100%. En cuanto a la especificidad fue 98,1% para Uvitex 2B y 100% para los dos restantes.

Por último un artículo que trabajó con población inmunocomprometida e inmunocompetente con o sin diarrea en India en 2013 comparó Tricrómica modificada de Weber con Calcofluor Blanco y PCR presentando una sensibilidad entre 79.9% y 100% para Calcofluor blanco, Uvitex 2B de 100% y Tricrómica modificada de Weber entre 63.9% y 93,8%. En relación a la especificidad se obtuvieron valores de 68,5%-82.2%, 98,1% y 100% respectivamente (23).

Artículo	Procedencia	Poblacion	Método	Sensibilidad	Especificidad
Species identification of intestinal microsporidia using immunofluorescence antibody assays (3)	Malasia	Pacientes hospitalizados y de las clínicas del Hospital Universiti Kebangsaan	Tricrómica modificada de Weber, IFAT	IFA respecto a Weber 98%	IFA respecto a Weber 86%
Comparative Evaluation Of Staining Techniques And Polymerase Chain Reaction For Diagnosis Of Intestinal Microsporidiosis In Immunocompromised Patients (34)	India	Pacientes inmunocomprometidos con o sin diarrea del Departamento de microbiología y Parasitología	Tricrómica modificada de Weber, Calcofluor blanco, PCR	Calcofluor blanco: 100%, Tricrómica modificada de Weber: 93,8%, PCR: 96,8%	Calcofluor blanco 68,5%; Tricrómica modificada de Weber 100% y PCR 99,8%.
Evaluation Of DNA Extraction and PCR Methods For Detection Of Enterocytozoon bienewisi In Stool Specimens (28)	Tailandia	Niños de un orfanato de Bangkok donde se les hizo un examen de rutina.	Gram-cromotrope, PCR	PCR: 100%, Gram-cromotrope 86,7%	PCR, Gram-cromotrope: 100% de especificidad
Evaluation of an Immunofluorescent - Antibody Test Using Monoclonal Antibodies Directed against Enterocytozoon bienewisi and Encephalitozoon intestinalis for Diagnosis of Intestinal Microsporidiosis in Bamako (26)	Mali	Pacientes internados en 3 centros de salud de Bamako	Uvitex2B, IFAT, PCR.	Uvitex 2B, IFAT PCR: 100%.	PCR y IFAT: 100%, Uvitex 2B: 98,1%
Comparison of staining techniques and multiplex nested PCR for diagnosis of intestinal microsporidiosis (32)	India	Pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes con y sin diarrea del Instituto de Postgrado de educación médica e Investigación , Chandigarh	Tricrómica modificada de Weber, Calcofluor blanco, PCR.	PCR: 100%, CB: 79.9%, Tricrómica modificada de Weber 63.9%	Tricrómica modificada de Weber: 100%, PCR 97.9%, CB: 82.2%

Tabla 2. Comparación de sensibilidad y especificidad de técnicas diagnósticas. Montevideo, 2016.

Un total de seis de los diecisiete artículos coincidieron en la importancia del diagnóstico de especie (1,4,25–28). La mayoría de los artículos coinciden y animan a la utilización de tinciones como método de screening y diagnóstico destacando su bajo costo y la escasa complejidad de su reproducibilidad(1,27). No obstante, destacan la importancia del PCR para la identificación de la especie con vistas al tratamiento y a la epidemiología regional a pesar de su elevado costo (1,14,31,32). En cuanto al IFAT, las opiniones son discutidas. El artículo realizado en Mali en pacientes VIH y niños, tras la utilización de tinción con Uvitex 2B, IFAT y PCR alega que IFAT ha demostrado ser más eficaz en tiempo requerido, sumado a su menor costo frente al PCR (26). Por otro lado, otro autor sostiene que PCR es una técnica rápida, sensible y específica, comparada con las técnicas inmunofluorescentes y que además permite hacer diagnóstico y diferenciación de especie (28).

## Conclusiones y perspectivas

Previo a la búsqueda bibliográfica teníamos altas expectativas de hallar gran cantidad de información sobre el rendimiento, utilidad, aplicabilidad y costo de las técnicas diagnósticas para microsporidios. Una vez efectuada la búsqueda resultó que no todos los artículos obtenidos para la revisión nos aportaron datos valiosos al respecto. Una gran diversidad de técnicas fueron encontradas como métodos diagnósticos y se obtuvo mucha información relacionada a la prevalencia de estos microorganismos. Sin embargo, esperábamos obtener estudios que contrastaran el rendimiento de las diferentes técnicas. Sólo cinco artículos ofrecían información numérica de sensibilidad y especificidad por lo cual en algunos casos debimos trabajar con las opiniones que los autores proporcionaban. En cuanto a los costos no obtuvimos datos comparativos, sin embargo algunos autores dieron su opinión mediante un breve comentario (5,26,31,34). Respecto a la reproducibilidad, la mayoría de los artículos resaltan la necesidad de contar con técnicos altamente especializados, entrenados y con experiencia en microscopía (5). La mayoría de los trabajos revisados recomiendan el uso de PCR para el diagnóstico e identificación de la especie (4,23,26,32).

Uno de los puntos de la discusión se centra en si es necesario aplicar técnicas que identifiquen la especie (mayores costos y mayor laboriosidad) o simplemente utilizar las tinciones para el diagnóstico de microsporidios sin la identificación de la misma.

Varios de los artículos justifican que la identificación de la especie del microorganismo tiene especial importancia epidemiológica y fundamentalmente, en el tratamiento que se va a instaurar (1,4,5,14,23,28,29).

Ya que se trata por lo general de pacientes inmunocomprometidos que asocian en general otras comorbilidades, desde nuestro punto de vista y en base a lo que hemos reflexionado luego de la lectura de los artículos, sería importante llegar a un diagnóstico de especie involucrada en esta infección intestinal. En este caso, no quedan dudas que PCR sería el método de elección según especificidad y sensibilidad, pero debemos tener en cuenta otras variables, como son tiempo y costo de la técnica, con vistas a su eventual aplicación en nuestro país.

Sería interesante contar con estudios que aportaran datos de costos económicos y beneficios sanitarios esperables de la aplicación del PCR para la determinación de especie.

Consideramos que se debe ahondar en técnicas como la IFAT, que en los últimos años se ha desarrollado ampliamente y ha obtenido buenos resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad. Por otro lado se destaca su ventaja en relación al poco tiempo que requiere y a lo económica por sobre el PCR (35).

Muchos de los trabajos avalan el diagnóstico por técnicas que utilizan tinciones, en especial la Tricrómica modificada por Weber. Este tipo de métodos tienen la gran ventaja que mediante una simple muestra de materia fecal y con un microscopio óptico, que es de fácil acceso en nuestro

medio, se obtienen resultados que han demostrado tener excelente sensibilidad (17,25,34). En el país contamos con personal técnico capacitado para realizar este tipo de diagnóstico, pero éste se encuentra centralizado en el Laboratorio del Centro Hospitalario Pereira Rossell y en el Departamento de Parasitología y Micología de la Facultad de Medicina.

En relación a lo expuesto en este último apartado concluimos y enfatizamos que el diagnóstico por medio de tinciones es una excelente estrategia de screening, y las técnicas moleculares como PCR son las que sin duda recomendaríamos aplicar a futuro en nuestro país con vistas a realizar investigaciones de epidemiología molecular, así como para mejorar la evolución de los pacientes que podrían recibir el tratamiento adecuado según el agente involucrado.

## Bibliografía

1. Garcia-Zapata MT, Manzi RS, Souza Júnior ES de, Fagundes GM, Macedo DF, Barros DAC. Diagnóstico laboratorial dos enteroparasitos oportunistas em pacientes HIV+ no Hospital de Doenças Tropicais, Goiânia-GO, Brasil: estudo retrospectivo (1996-1999). *Rev patol trop* [Internet]. 2004;33(1):81–90. Available from: <http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/en/lil-412846>
2. Botero D, Restrepo M. Microsporidiosis. In: *Parasitosis Humana 5ta edicion*. 2012. p. 385–92.
3. Al-Mekhlafi MA, Fatmah MS, Anisah N, Azlin M, Al-Mekhlafi HM, Norhayati M. Species identification of intestinal microsporidia using immunofluorescence antibody assays. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2011;42(1):19–24.
4. Botero JH, Montoya Nelly M, Vanegas Lucía A, Díaz A, Aguila LN-MFJBFIC del, Agudelo S del P. Frecuencia de microsporidiosis intestinal en pacientes positivos para VIH mediante técnicas de Gram Cromotropo rápido y PCR. *Biomed Rev del Inst Nac Salud*. 2004;24:375–84.
5. Chabchoub N, Abdelmalek R, Breton J, Kanoun F, Thellier M, Bouratbine A, et al. Genotype identification of *Enterocytozoon bieneusi* isolates from stool samples of HIV-infected Tunisian patients. *Parasite*. 2012;19(2):147–51.
6. Fernández N, Combol A, Elena D, Zanetta E, Acuña AM, Gezuele E. Primer diagnóstico de microsporidiosis humana en Uruguay. *Rev Med Uruguay*. 2002;18:251–5.
7. Fernández N, Núñez C, Zanetta E, Fazzio S. Hallazgo de microsporidios en población infantil de Uruguay. *Rev Med Uruguay*. 2002;35:33.
8. Zanetta E, Fernández N, Núñez C, Bonasse J, Fazzio S. Algoritmo diagnóstico para las enteroparasitosis en centro hospitalario pediátrico. *Rev Uruguay*. 2002;35:34.
9. Cómbol A, Fernández N, Figueredo E, Acuña AM, Zanetta E. Implementación de una técnica de coloración para el diagnóstico simultáneo de coccidios y microsporidios. *Rev Med Uruguay*. 2006;41:48.
10. Fernández N, Zanetta E, Fernández M, Bonasse J. Diagnóstico de enteroparásitos en niños. *Rev Med Uruguay*. 2008;43:20.
11. Cabrera MJ, Pinato D, García J, Arteta Z, Leon D, Combol A, et al. Características de las

- enteroparasitosis en pacientes VIH/SIDA asistidos en el SEIC-ASSE. Rev Med Uruguay. 2010;46:34.
12. González T, Cabrera F, Rodríguez T, Combol A, Acuña AM. Enteroparasitosis en pacientes VIH/SIDA del Servicio de Enfermedades Infecciosas y Contagiosas de Asse. Rev Med Uruguay. 2014;53:76.
  13. Garcia LS. Laboratory identification of the microsporidia. Vol. 40, Journal of Clinical Microbiology. 2002. p. 1892–901.
  14. Rivero-Rodríguez Z, Hernández Sierra A, Arráiz N, Bracho Mora A, Villalobos Perozo R. Prevalencia de *Encephalitozoon intestinalis* y *Enterocytozoon bieneusi* en pacientes VIH positivos de Maracaibo, Venezuela. Invest Clin. 2013;54(1):58–67.
  15. Botero-Garces J, Montoya-Palacio MN. Microsporidiosis: una vision integral. Infectio. 2002;6–4:213–22.
  16. Amauri L, Noda A, Cañete R, Brito Pérez K. Microsporidiosis gastrointestinal: una actualización. Rev Medica Electron. 2013;35(2).
  17. Ghosh K, Weiss LM. Molecular diagnostic tests for microsporidia. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2009;2009:926521.
  18. Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorelkin L, Visvesvara GS. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. The Enteric Opportunistic Infections Working Group. N Engl J Med. 1992;326(3):161–6.
  19. Ryan NJ, Sutherland G, Coughlan K, Globan M, Doultree J, Marshall J, et al. A new trichrome-blue stain for detection of microsporidial species in urine, stool, and nasopharyngeal specimens. J Clin Microbiol. 1993;31(12):3264–9.
  20. Kokoskin E, Gyorkos TW, Camus A, Cedilotte L, Purtill T, Ward B. Modified technique for efficient detection of microsporidia. Vol. 32, Journal of Clinical Microbiology. 1994. p. 1074–5.
  21. Didier ES, Orenstein JM, Aldras A, Bertucci D, Rogers LB, Janney FA. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. J Clin Microbiol. 1995;33(12):3138–45.
  22. GMS - METHENAMINE SILVER - GROCOTT'S, MODIFIED [Internet]. p. 1–3. Available from: <http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/MANUALS/GMS.PDF>

23. Kulkarni S, Patsute S, Chandane M, Risbud A. Performance of microscopy for detection of microsporidial spores from stool samples of HIV infected individuals with diarrhoea. *Indian J Med Res.* 2011;134(6):982–4.
24. Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: current status. *Curr Opin Infect Dis* [Internet]. 2006;19(0951–7375 (Print)):485–92. Available from: C:\Karsten\PDFs\Parasitologie-PDFs\Parasit-2006\Didier - Weiss-Microsporidiosis- current status.pdf
25. Brasil P, de Lima DB, de Paiva DD, Lobo MS, Sodré FC, Silva SP, et al. Clinical and diagnostic aspects of intestinal microsporidiosis in HIV-infected patients with chronic diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000;42(6):299–304.
26. Alfa Cisse O, Ouattara A, Thellier M, Accoceberry I, Biligui S, Minta D, et al. Evaluation of an immunofluorescent-antibody test using monoclonal antibodies directed against *Enterocytozoon bienewisi* and *Encephalitozoon intestinalis* for diagnosis of intestinal microsporidiosis in Bamako (Mali). *J Clin Microbiol.* 2002;40(5):1715–8.
27. Lores B, López-Miragaya I, Arias C, Fenoy S, Torres J, del Aguila C. Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienewisi* in elderly human immunodeficiency virus--negative patients from Vigo, Spain. *Clin Infect Dis.* 2002;34(7):918–21.
28. Subrungruang I, Mungthin M, Chavalitshewinkoon Petmitr P, Rangsin R, Naaglor T, Leelayoova S. Evaluation of DNA extraction and PCR methods for detection of *Enterocytozoon bienewisi* in stool specimens. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2004;42(8):3490–4. Available from: <img src=http://demo.ovid.com/berlin/linksolverlogo.gif border=0 alt="dies fuehrt zu allen weiteren Internetlinks..."> <http://linksolver.ovid.com/OpenUrl/LinkSolver?sid=SP:MEDS&genre=Comparative-Study&aulast=&issn=0095-1137&isbn=&title=Journal-of-clinical>
29. Graczyk TK, Johansson MA, Tamang L, Visvesvara GS, Moura LS, DaSilva AJ, et al. Retrospective species identification of microsporidian spores in diarrheic fecal samples from human immunodeficiency virus/AIDS patients by multiplexed fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol.* 2007;45(4):1255–60.
30. Sak B, Kváč M, Kučerová Z, Květoňová D, Saková K. Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals - a longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(5).
31. Ojuromi OT, Izquierdo F, Fenoy S, Fagbenro-Beyioku A, Oyibo W, Akanmu A, et al. Identification and characterization of microsporidia from fecal samples of hiv-positive patients from lagos, Nigeria. *PLoS One.* 2012;7(4).
32. Saigal K, Khurana S, Sharma A, Sehgal R, Malla N. Comparison of staining techniques

and multiplex nested PCR for diagnosis of intestinal microsporidiosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;77(3):248–9.

33. Kim K, Yoon S, Cheun HI, Kim JH, Sim S, Yucor JR. Detection of *Encephalitozoon spp.* from Human Diarrheal Stool and Farm Soil Samples in Korea. *J Korean Med Sci* [Internet]. 2015;30(3):227–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4330474/>
34. Ghoshal U, Khanduia S, Agarwal V, Dholé T. Comparative evaluation of staining techniques and polymerase chain reaction for diagnosis of intestinal microsporidiosis in immunocompromised patients. *US Natl Libr Med Natl Institutes Heal*. 2015;5(2):101–5.
35. Dworkin MS, Buskin SE, Davidson AJ, Cohn DL, Morse A, Inungu J, et al. Prevalence of intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with diarrhea in major United States cities. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007;49(6):339–42.

## **Agradecimientos**

Agradecemos a nuestras tutoras Ana María Acuña, Anayde Lena, Cecilia Tort, por el compromiso y dedicación que demostraron y también a todo el equipo de la cátedra de Parasitología y Micología del Instituto de Higiene por habernos brindado el apoyo y el lugar para la realización de nuestro trabajo.