



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Cultivo *in vitro* de esporas de microsporidios obtenidas de  
heces de conejo.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A:**

**Christian Alejandro García Ávila**



**DIRECTOR DE TESIS:  
M. en C. Silvia Caballero Salazar  
2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno  
García  
Ávila  
Christian Alejandro  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
305126896
2. Datos del tutor  
M. en C.  
Silvia  
Caballero  
Salazar
3. Datos del sinodal 1  
Dr.  
Rogelio  
Aguilar  
Aguilar
4. Datos del sinodal 2  
Dra.  
Martha  
Ponce  
Macotella
5. Datos del sinodal 3  
Dra.  
María del Carmen  
Guzmán  
Cornejo
6. Datos del sinodal 4  
M. en C.  
Isabel Cristina  
Cañeda  
Guzmán
7. Datos de la tesis  
Cultivo *In vitro* de esporas de microsporidios obtenidas de heces de conejo.  
89 p.  
2015

## Dedicatorias

**A mis papas:** Gracias por todo lo que me han dado (incluso más de lo que merezco), ya que sin ustedes y todo su apoyo esto no habría sido posible, todo lo que soy y llegue a ser es gracias a los dos, son las mejores personas que conozco.

Gracias madre por todo tu cariño, comprensión y ánimos que me das, por preocuparte por mí y por qué este bien. Te quiero mucho.

Gracias padre por ser tan buena onda conmigo en todos los aspectos, por apoyarme en cualquier situación y creer en mí. Te quiero mucho.

**A mis hermanas:** Ana y Alicia, gracias por su apoyo, por ser buenas conmigo y aunque a veces nos enojemos saben que las quiero y me preocupo por ustedes.

**A Fabiola:** Gracias por estar a mi lado en todo momento, por no dejarme caer, por toda tu ayuda, por todos los momentos y aventuras vividas, por apoyarme incluso cuando estoy equivocado jeje, gracias por estar conmigo y dejarme estar contigo. Te quiero mucho, mucho, muchísimo.

*“Nunca te rindas tratando de hacer lo que realmente deseas hacer. Donde hay amor e inspiración, nada te puede salir mal.”*

*Ella Fitzgerald*

## Agradecimientos

Quiero agradecer a la **M. en C. Silvia Caballero Salazar** por todo su apoyo, esfuerzo y tiempo invertido para poder realizar este trabajo, por todos los consejos no solo académicos sino también a nivel personal, por creer en mí para sacar adelante el proyecto, por aguantarme cuando cualquier otro tutor no lo hubiera hecho jeje. Muchísimas gracias por todo.

A la **Dra. Marta Ponce Macotela** por crear el taller de “Estudio biológico y molecular de los parásitos de importancia medica” y aceptarme en el taller, por compartir su conocimiento conmigo.

A los profesores del taller: **M. en C. Yadira Rufino Gonzales** y al **Biol. Mario Noe Martínez Gordillo**, por las buenas clases y conocimientos impartidos.

A mis sinodales: **Dr. Rogelio Aguilar Aguilar**, **Dra. María del Carmen Guzmán Cornejo** y la **M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán** por aceptar formar parte de mi comité y tomarse el tiempo de revisar mi tesis, por hacerme comentarios constructivos que ayudaron a mejor este trabajo y aprender más.

Al **MVZ Esteban Cruz Gómez** por ayudarme con la colecta de las muestras de la FES Cuautitlán, UNAM.

A **Uriel**, por todas las aventuras vividas, clases, fiestas, practicas y demás cosas, por tu amistad, por ser bien chido y estar siempre que necesito ayuda. Gracias hermano.

A **Daniela, Isabel, Berenice, Candy** (mi cuaderno de doble raya) y **Cristian**, por su amistad, compañerismo, clases, fiestas, practicas de campo, consejos, platicas, porque gracias a todos ustedes la carrera fue más amena.

*“La muerte no es más que un viaje, semejante al que realizan dos amigos al separarse para atravesar los mares. Como aún se necesitan, ellos siguen viviendo el uno en el otro y se aman en una realidad omnipresente. En dicho divino espejo se ven cara a cara, y su conversación fluye con pureza y libertad. Tal es el consuelo de los amigos: aunque se diga que han muerto, su amistad y su compañía no desaparecen, porque éstas son inmortales”*  
*William Penn*

# Índice general

<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>3</b>
1.1. Taxonomía.....	3
1.2. Historia .....	7
1.3. Morfología.....	7
1.4. Ciclo de vida.....	10
1.5. Mecanismos de germinación de la espora y descarga del tubo polar. ....	12
1.6. Especies de Microsporidios que infectan al Hombre .....	13
1.7. Carácter zoonótico de <i>E. cuniculi</i> .....	17
1.8. Sintomatología en animales.....	20
1.9. Epidemiología.....	21
1.10. Diagnóstico.....	27
1.11. Tratamiento .....	29
1.12. Cultivo <i>In vitro</i> de microsporidios .....	30
<b>2. Justificación.....</b>	<b>33</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>35</b>
<b>4. Diseño experimental.....</b>	<b>36</b>
<b>5. Material y métodos .....</b>	<b>37</b>
5.1. Población estudiada .....	37
5.2. Colecta de muestras .....	37
5.3. Procesamiento de las muestras de heces.....	37
5.4. Técnicas de Tinción .....	38
5.5. Criterios para la identificación de esporas de microsporidios.....	40
5.6. Concentración de esporas .....	40
5.7. Axenización de esporas.....	41
5.8. Inducción de la germinación de esporas por cambios de pH .....	42
5.9. Inoculación de esporas al cultivo celular Vero. ....	42
5.10. Mantenimiento de la línea celular VERO.....	43
<b>6. Resultados .....</b>	<b>44</b>
<b>7. Discusión .....</b>	<b>64</b>
<b>8. Conclusiones .....</b>	<b>67</b>
<b>9. Perspectivas .....</b>	<b>69</b>
<b>10. Apéndice .....</b>	<b>70</b>
<b>11. Referencias .....</b>	<b>80</b>

## Resumen

El Phylum Microspora comprende hongos atípicos caracterizados por ser parásitos intracelulares obligados y oportunistas. Se han descrito más de 1,200 especies dentro de las cuales se encuentra *Encephalitozoon cuniculi*; que parasita al humano provocando la enfermedad de Encefalitozoonosis, afectándole diferentes sitios como el intestino, tracto respiratorio, tracto urinario, sistema biliar, sistema nervioso central, entre otros, hasta producir infecciones sistémicas causándole la muerte. Su prevalencia a nivel mundial varía del 1% al 87%, siendo las poblaciones más susceptibles individuos inmunodeficientes, principalmente con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y personas con algún tipo de inmunosupresión como pacientes con trasplante de médula ósea y órganos sólidos, con cáncer, desnutridas, ancianos y embarazadas, también personas inmunocompetentes en menor grado (usuarios de lentes de contacto y viajeros). Es una especie zoonótica que infecta principalmente a animales de granja (ovejas, bovinos, conejos, caballos), roedores (rata, ratón, etc.) y animales de compañía (perros, gatos, conejos, pájaros, etc.) entre otros.

El propósito de este trabajo consistió en la obtención de aislados (esporas) de microsporidios obtenidas de heces de conejo para su cultivo *in vitro* en la línea celular VERO.

Se colectaron muestras de heces de conejo del Centro de Enseñanza Agropecuario de la FES Cuautitlán, UNAM., se realizaron frotis de las heces para la identificación de esporas por medio de tinciones: Ziehl-Neelsen, Gram-Cromotropo y Blanco de Calcoflúor; posteriormente se concentraron en Buffer TES (Tris-EDTA/SDS); después de su purificación se axenizaron con una solución de antibióticos; se indujo la germinación con cambios de pH ácido/base y se inocularon a células VERO en cultivo con una confluencia al 100%.

Se estableció la infección de dos aislados en células VERO en cultivo, procedentes de: uno de heces de conejos machos, cosechando las esporas en el sobrenadante de los cultivos celulares infectados a los 26 días posinoculación y el

segundo de heces de conejos hembras a los 45 días posinoculación. Las esporas obtenidas presentaron las características morfológicas y de tinción que corresponden con las reportadas para microsporidios. Presentaron forma oval, tamaño de 1.5 a 2.5  $\mu\text{m}$  de largo X 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho; se pudo observar el filamento polar como un “cinturón” en la parte media, así como dos polos en los extremos de las esporas que corresponden a la vacuola posterior y al disco de anclaje. Es importante destacar que el hospedero principal de *Encephalitozoon cuniculi* es el conejo, el cual elimina las esporas principalmente por la orina y deposiciones, por lo que en el caso de los aislados establecidos en este trabajo, provenientes de heces de conejo se puede inferir que existe una alta probabilidad de que las esporas correspondan a la especie de *E. cuniculi*, pero esto tendrá que ser confirmado con el análisis molecular.



# 1. Introducción.

## 1.1. Taxonomía de Microspora

El phylum Microspora comprende parásitos intracelulares obligados, oportunistas, amitocondriados y eucariotas. Se han descrito más de 1,200 especies pertenecientes a más de 100 géneros (Sprague *et al.*, 1992; Didier *et al.*, 2006). El término microsporidio es una designación común no taxonómica que se utiliza para nombrar a los microorganismos pertenecientes a este phylum (Atias, 1991). Originalmente fueron considerados organismos evolutivamente “primitivos” por la presencia de pocos genes, por ejemplo, las secuencias de genes de la subunidad pequeña de rRNA de *Variamorphia necatrix* son más parecida a las procariotas que a las de eucariotas, además de mostrar características celulares que recuerdan a los procariontes como el proceso de traducción, el tamaño pequeño del genoma en el intervalo de la de las bacterias (Cuadro 1), la ausencia de mitocondrias, peroxisomas y un Aparato de Golgi verdadero (Mathis, 2000). Debido a sus particularidades de procariontes, los microsporidios fueron clasificados inicialmente en el phylum Archezoa, junto con otros organismos amitocondriados (*Giardia*, *Trichomonas* y *Entamoeba*) (Cavalier, 1993). Posteriormente Cavalier-Smith, dentro de su artículo Seis Reinos, los ubico en el reino Fungi, subreino Eomycota (carencia de mitocondrias y peroxisimas), phylum Microsporidia (parásitos intracelulares obligados, presencia de quitina, presencia de tubo o filamento polar), clase Microsporea (polaroplasto presente, esporas usualmente ovals) y subclase Pleistophorea (división por plasmodio) (Cavalier-Smith, 1998); sin embargo, nuevos estudios proponen un origen más reciente, lo que sugiere que estos organismos han perdido varios genes y se han sometido a la compactación de su genoma, probablemente en respuesta a su alta adaptación al parasitismo intracelular (Didier *et al.* 2004; Franzen, 2008). Debido a que son eucariotes verdaderos, es decir, poseen un núcleo eucariótico, sistema de endomembranas y citoesqueleto y la estructura de su espora a el phylum Microsporidia fue separado de los protistas y se propuso como un taxón monofilético (Franzen, 2008).

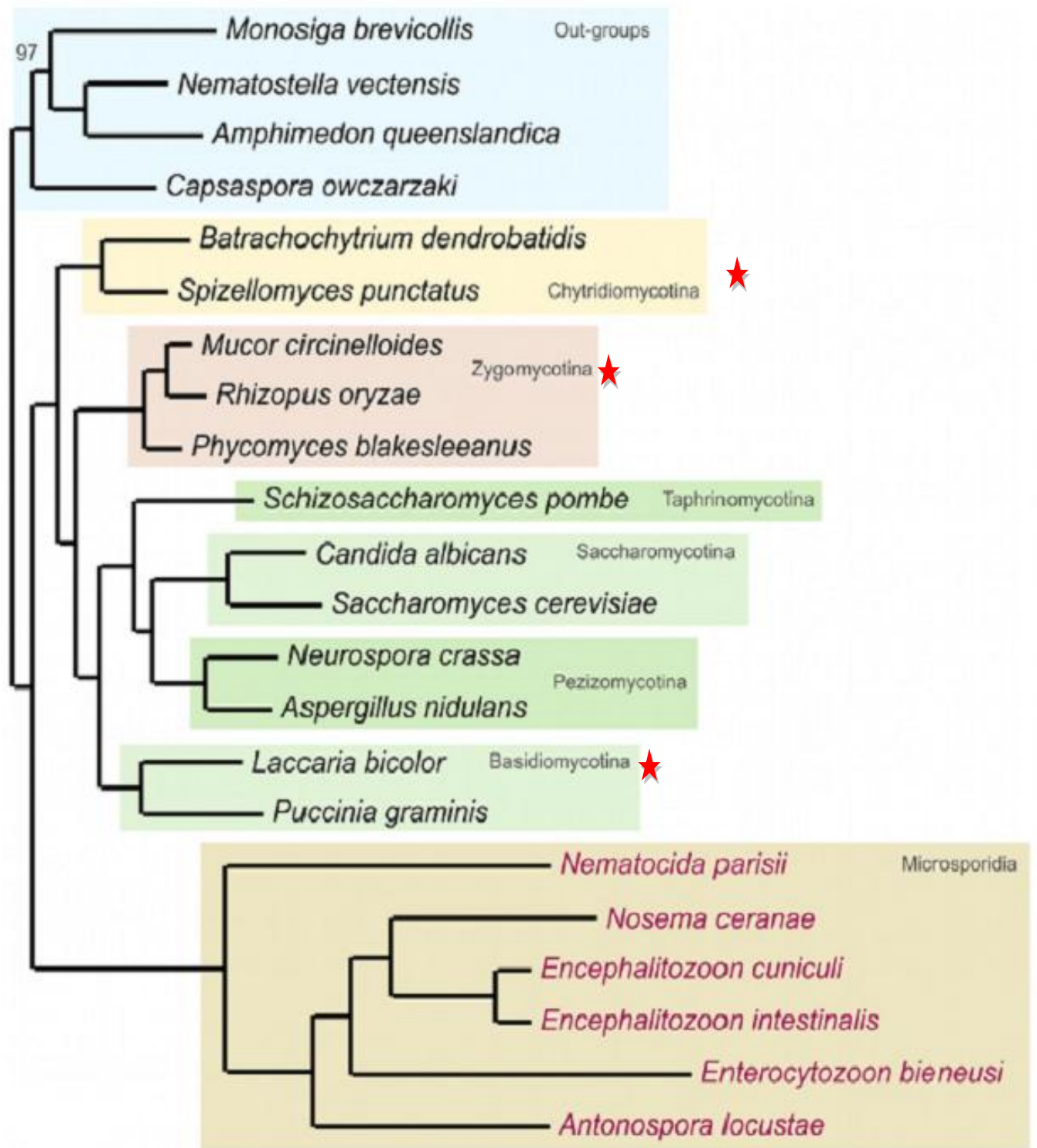
**Cuadro 1. Tamaño del genoma de procariontes y eucariontes.**

	<b>Especie</b>	<b>Tamaño del genoma (Mbp)</b>
Microsporidia	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	2.4
	<i>Encephalitozoon hellem</i>	2.5-2.9
	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	2.9
	<i>Nosema locuste</i>	5.3
	<i>Glugea atherina</i>	19.5
Aplicomplexa	<i>Cryptosporidium parvum</i>	10.4
	<i>Plasmodium falciparum</i>	24.6
	<i>Toxoplasma gondii</i>	80
Kinetoplastida	<i>Leishmania major</i> Friendlin	33.6
Procariontes	<i>Coxiella burnetti</i>	2.1
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	1.111
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	1.04

**Cuadro1.** Los microsporidios a pesar de ser eucariontes presentan un tamaño de genoma muy pequeño de 2.4 a 19.5 mbp. Tamaño en millones de pares de bases.

Buscando una clasificación más natural, Vivarés y colaboradores, proponen que los microsporidios han evolucionado a partir de los hongos después de la divergencia de los Chytridiomycetes. Otros estudios realizados del gen *Hsp70* en *Varimorpha nectrix* y el análisis del gen de la tubulina  $\alpha$  y  $\beta$  (proteínas estructurales del citoesqueleto) con estos resultados el phylum Microsporidia se reclasificó en el reino Fungi (Keeling *et al.*, 2000; Keeling *et al.* 2002; Vivarés *et al.* 2002; Didier *et al.*, 2004; Franzen, 2008). Posteriores análisis filogenéticos de las secuencias de genes múltiples, incluyendo aquellos con una menor tasa de evolución evidenciaron la estrecha relación con los hongos, compartiendo un ancestro común con los Zigomicetes, Ascomicetos y Basidiomicetos muy al inicio de la evolución de estos (Figura1) (Capella *et al.* 2012). Otras características importantes para relacionarlos con los hongos son: la presencia de quitina, trehalosá, similitudes entre los ciclos celulares y la organización de los genes RPL21 (componente de la subunidad grande del ribosoma), RPS9 (implicado en la disociación de los ARNm a

partir del complejo ribosomal como parte de la traducción), los cuales son exclusivos de los hongos. Hoy en día se consideran hongos, aunque su ubicación dentro de este reino todavía no es muy clara (Canning, 1988; Müller, 1997; Thomarat *et al.*, 2004; Gill *et al.*, 2006, Chan et al. 2009; Capella *et al.* 2012; Yazar *et al.*, 2013).



**Figura 1.-** Árbol filogenético muestra la relación filogenética de microsporidios con los grupos de hongos: Chytridiomycotina, Zygomycotina y Basidiomycotina(★) los microsporidios divergieron muy al inicio de la evolución de los hongos (Tomado y modificado de Capella *et al.* 2012).

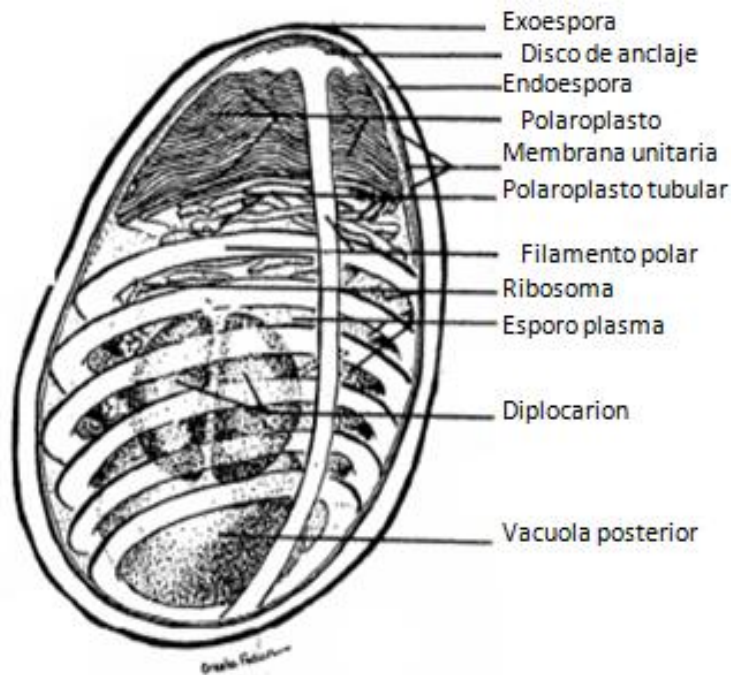
## 1.2. Historia

Los microsporidios fueron descritos por primera vez en 1857 por Nägeli, quien reconociera a *Nosema bombycis* como el agente causal de la enfermedad de la pebrina del gusano de seda (Nägeli, 1857). Posteriormente fueron identificados como agentes causantes de enfermedades en insectos de importancia económica como: abejas productoras de miel (*Nosema apis*) y el gusano de seda, provocando grandes pérdidas económicas en varios países (Becnel *et al.*, 1999); también se ha detectado en mamíferos: conejos, animales de peletería y roedores (Canning *et al.*, 1986; Didier *et al.*, 2000), aves exóticas (Kas̃ic̃kova' *et al.*, 2009) y peces (Call *et al.*, 2012). El primer caso de infección en humanos fue documentado en 1959 por Matsubayashi y colaboradores cuando aislaron a *Nosema cuniculi* (ahora *Encephalitozoon cuniculi*) de sangre, líquido cefalorraquídeo y orina de un niño japonés de 9 años con meningoencefalitis febril (Matsubayashi *et a.*, 1959). Por otro lado, surgieron como importantes patógenos oportunistas para el hombre cuando el SIDA se convirtió en una pandemia (Weber *et al.*, 1994; Didier *et al.*, 1996).

## 1.3. Morfología

Los microsporidios producen esporas las cuales son la fase infectante, su tamaño varía dependiendo de la especie van de 1.0 a 3.0  $\mu\text{m}$  de ancho X 1.5 a 4.0  $\mu\text{m}$  de largo, están cubiertas por tres capas: una capa externa electrodensa compuesta de glicoproteínas llamada **exoespora**, otra interna de quitina denominada **endoespora** y una **membrana citoplasmática** que les proporciona una magnífica protección contra las inclemencias del ambiente (Franzen *et al.*, 1999). Cuentan con un citoplasma en el cual se encuentran los organelos, núcleo en arreglo monocarion o diplocarion (uno o dos núcleos) dependiendo de la especie, disco anterior de anclaje, polaroplasto con membrana laminar que puede incluir un atípico aparato de Golgi, vesículas polares llamadas mitosomas, retículo endoplasmático, ribosomas y una vacuola posterior que puede funcionar como un peroxisoma (Figura 2) (Vavra *et al.*, 1999; Vivares *et al.*, 2002; Vavra, 2005;

Findley *et al.*, 2005). Contienen un aparato de extrusión tubular largo llamado tubo o filamento polar, el cual es un organelo altamente especializado para la invasión, que les distingue de otros organismos, presenta forma de espiral con 5 a 30 vueltas dependiendo el género (Cuadro 2) (Cali *et al.*, 1996; Franzen *et al.*, 1999), este nace en el disco de anclaje, tiene un papel fundamental en la penetración de la célula huésped, permitiéndoles la infección (Xu *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Morfología típica de una espora de microsporidios (Tomado y modificado de Botero *et al.*, 2002)

**Cuadro 2. Características de las principales especies de microsporidios.**

Característica	<i>E. bienewisi</i>	<i>Encephalitozoon</i>		<i>Nosema</i>	<i>V. corneae</i> <i>spp.</i>	<i>Pleistophora</i>
		<i>E. intestinalis</i>	<i>E. cuniculi</i>			
Tamaño de la espora (µm)	1.1-1.6 x 0.7-1.0	2.0-2.5 x 1.0-1.5	2.0-3,2 x 1.0-1.6	2.5-5.0 x 2.0-2.5	3.8-4.5 x 0.7-4.3	3.2-3.4 x 2.8
Nº vueltas túbulo polar	5-7	5-7	4-5	7-12		9-12
Núcleo	Unicariótico	Unicariótico	Unicariótico	Diplocariótico	Diplocariótico	Unicariótico
Vacuola	Sin vacuola en contacto directo con el citoplasma de la célula del hospedero	Vacuola parasitofora, septada	Vacuola parasitofora	Sin vacuola en contacto directo con el citoplasma de la célula del hospedero	Sin vacuola en contacto directo con el citoplasma de la célula del hospedero	Vesícula esporófora
Rasgos especiales	Túbulo polar se inicia desde el esporonte			Esporogonia esporoblástica	Esporogonia tetraesporoblástica	Plasmodio esporulado multinucleado

**Cuadro 2.** Características morfológicas de las esporas de microsporidios que infectan al ser humano (Botero et. al. 2002).

## 1.4. Ciclo de vida

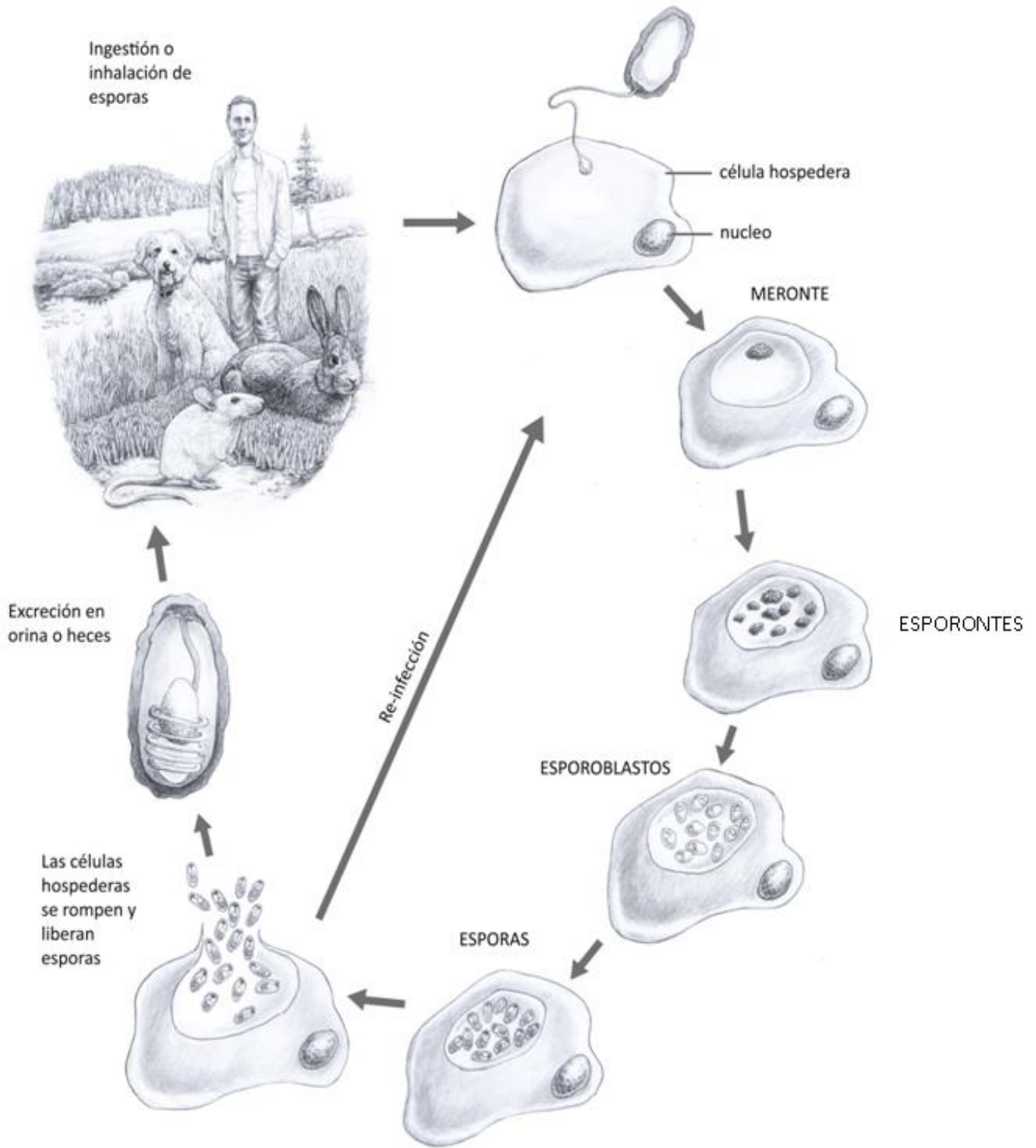
Se desarrolla en tres fases: **1) Fase infectiva**, comprende desde la liberación de las esporas al medio extracelular en el caso de una reinfección (infecta otras células del mismo hospedero) hasta la salida al exterior en heces y orina contaminando el ambiente, esta fase termina en el momento en que infectan otras células hospederas (Figura 3) (Berg *et al.*, 1996; Bornay *et al.*, 1998). La infección se inicia con la ingestión e inhalación de las esporas, posteriormente la germinación y la transferencia o inyección del esporoplasma infeccioso a través del filamento o tubo polar hacia el citoplasma de la célula hospedera.

Los microsporidios no tienen etapas activas fuera de las células hospedadoras, y solo pueden sobrevivir dentro de otras células, por lo que es un organismo intracelular obligado, solamente la fase de espora es extracelular.

**2) Fase proliferativa** o merogónica, inicia cuando en el citoplasma de las células ya infectadas el esporoplasma empieza a formar merontes, ya sea en una vacuola parasitófora o en el citoplasma directamente, dependiendo de la especie. Los merontes pueden presentar fisión binaria o múltiple, son células redondas, irregulares o elongadas en los estadios tardíos, presenta una membrana plasmática simple con núcleo aislado o doble. La cariocinesis ocurre de forma repetida antes de que se presente la división celular. En humanos luego de la merogonia se puede producir diseminación vía sanguínea o linfática (Berg *et al.*, 1996).

**3) Fase de esporogonia.** En esta fase se lleva a cabo la maduración de las esporas pasando por varias etapas. A partir de los merontes, después varias divisiones forman esporontes que son estadios previos a los esporoblastos, presentan en la superficie una cubierta electrodensa la cual forma la capa externa de la espora (exospora). Algunas veces los esporontes se dividen por fisión binaria en esporoblastos y otros forman estadios multinucleados (esporogonia plasmodial). Los esporoblastos generalmente son ovoides y su desarrollo es un proceso de maduración hasta convertirse en esporas maduras, salen cuando la célula hospedera se rompe (Berg *et al.*, 1996; Bornay *et al.*, 1998).





**Figura 3.** Ciclo de vida de *E. cuniculi*. La infección se inicia con la ingestión de esporas, posteriormente la germinación y la transferencia del esporoplasma en el citoplasma de la célula hospedera, el desarrollo de merontes por fisión binaria, maduración de esporontes a esporoblastos para finalmente formar esporas maduras que pueden infectar otras células del mismo hospedero o salir en orina y heces contaminando el ambiente.

## **1.5. Mecanismos de germinación de la espora y descarga del tubo polar.**

La germinación o activación de la espora se inicia cuando las esporas ingeridas son activadas por cambios de pH al entrar en el sistema digestivo del hospedero; se inicia con la hinchazón del polaroplasto y la vacuola posterior, causando un incremento importante de la presión osmótica dentro de las paredes rígidas, esto lleva a que el tubo polar se desenrolle, salga con fuerza, penetre a la célula y descargue el esporoplasma infeccioso a través del tubo polar en el citoplasma de la célula hospedera (Didier *et al.* 2006). El aumento de volumen es mediado por la rápida entrada de agua a través de los canales de acuaporinas en la membrana plasmática causada por la ruptura del disacárido trehalosa en un monosacárido de glucosa (Findley *et al.*, 2005; Ghosh *et al.*, 2006). Asimismo, se ha propuesto un segundo mecanismo de infección en donde las esporas son endocitadas, y transferidas a compartimentos lisosomales en donde se comienza una digestión y el inicio de su germinación, expulsando su filamento polar vertiendo su esporoplasma infeccioso dentro del citoplasma de la célula huésped, estableciendo de esta manera un nuevo ciclo de vida (Franzen, 2004). Se ha descrito un tercer mecanismo de infección que involucra el incremento de la presión dentro de la espora por la producción de agua a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno) en la vacuola posterior, empujando al esporoplasma dentro del tubo polar como si fuera un pistón a presión, la presión se incrementa la porción anterior se rompe y el disco de anclaje se evierte formando un cuello por donde es expelido el tubo polar y a través de este es inyectando el esporoplasma a la célula huésped (Noda *et al.*, 2013).

## 1.6. Especies de Microsporidios que infectan al Hombre

En la actualidad se reconocen ocho géneros con quince especies que causan enfermedades en humanos: *Brachiola*, *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Microsporidium*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora* y *Vittaforma* (Cuadro3), siendo las más frecuentes e importantes: *E. bienewisi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi* y *E. hellem* (Schwartz *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1997; Cali *et al.*, 1998; Mathis *et al.*, 2005; Ditrich *et al.* 2011., Jiménez *et al.*, 2012).

Entre estas especies esta *Encephalitozoon cuniculi* que es de gran relevancia para el humano por su alto potencial zoonótico. Fue identificada por primera vez en 1922 en una colonia de conejos de laboratorio como una de las causas de enfermedad vestibular (Wright *et al.*, 1922). Se ha reportado como parásito importante de otros mamíferos como ratas, ratones, caballos, zorros, gatos, perros, ratones almizcleros, leopardos, babuinos, vacas, ovejas (Didier *et al.*, 2000). El reservorio principal es el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) que elimina al parásito principalmente por la orina y deposiciones, contaminando el ambiente (Wilson, 1979). Se han descrito tres genotipos en base al número de repeticiones de guanina-timina (GTTT) en los espaciadores transcritos internos (ITS) del gen de RNA ribosomal (RNAr): el genotipo I presenta tres repeticiones, se reporta en conejo y humano; el genotipo II con dos repeticiones descrito en ratón y el genotipo III con cuatro repeticiones encontrado en perro y el humano (Didier *et al.*, 1995; Didier *et al.*, 1996; Ditrich *et al.*, 2011).

En humanos *E. cuniculi* infecta a personas inmunocomprometidas, en especial con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) e individuos con alguna inmunosupresión como personas trasplantadas de médula ósea y trasplantadas con órganos sólidos (riñón e hígado) , niños, ancianos y también a individuos inmunocompetentes en muchas ocasiones se mantiene como una infección latente (Lores *et al.*, 2002; Didier *et al.*, 2004; Anane *et al.*, 2010; Galván *et al.*, 2011; Sak *et al.*, 2011; Ditrich *et al.*, 2011; Lobo *et al.*, 2012)

En humanos las vías de infección principalmente son oral-fecal, inhalación, ingestión de comida o agua contaminadas con esporas provenientes de humanos y animales infectados.

Existen estudios de seroprevalencia donde se reporta un 33% de anticuerpos anti *E. cuniculi* en poblaciones homosexuales lo que sugiere que las prácticas de este tipo pueden contribuir a la transmisión de microsporidiosis (Bergquist *et al.* 1984, Ananne *et al.* 2010)

**Cuadro 3. Especies de microsporidios que infectan al hombre.**

Especie	Descubrimiento		No. de pacientes reportados		Sitio(s) de Infección
	Hospedero	Año	Inmuno-Deprimidos	Inmuno-competentes	
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Humano	1985	> 1000	<20	Intestino, tracto biliar, tracto respiratorio
<i>Encephalitozoon hellem</i>	Humano	1991	<50	3	Ojos, tracto respiratorio, tracto urinario, infección sistémica
<i>Encephalitozoon intestinalis</i> (originalmente llamado <i>Septata intestinalis</i> )	Humano	1993	<200	2	Intestino, tracto biliar, tracto respiratorio, hueso, piel, infección sistémica
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	Conejo	1923	<20		Infección sistémica, ojos, tracto respiratorio, tracto urinario, hígado, peritoneo, cerebro
<i>Vittaforma comeae</i> (originalmente llamado <i>Nosema comeum</i> )	Humano	1990	1	3	Ojos, tracto urinario
<i>Pleitophora ronneafiei</i> (originalmente llamado <i>Pleistophora sp.</i> )	Humano	1985	1		Musculo
<i>Trachipleistophora hominis</i>	Humano	1996	1	1	Musculo, ojos
<i>Trachipleistophora anthropophthera</i>	Humano	1998	3		Infección sistémica, ojos
<i>Brachiola algerae</i> (originalmente llamado <i>Nosema algerae</i> )	Mosquito	1970	1	1	Ojos, musculo
<i>Brachiola connori</i> (originalmente llamado <i>Nosema connori</i> )	Humano	1974	1		Infección sistémica
<i>Brachiola vesicularum</i>	Humano	1998	1		Musculo
<i>Nosema ocularum</i>	Humano	1991		1	Ojos
<i>Microsporidium ceylonensis</i>	Humano	1973	1		Ojos
<i>Microsporidium africanum</i>	Humano	1981	1		Ojos

**Cuadro 3.** Especies de microsporidios que infectan al ser humano, se muestra el hospedero y sitios de la infección (Mathis et. al. 2005, con algunas modificaciones).

**Taxonomía actual de *Encephalitozoon cuniculi*** (Yazar *et al.* 2013)

Reino: Fungi

Phylum: Microsporidia

Clase: Haplophasea

Orden: Glugeida

Familia: Encephalitozoonidae

Género: *Encephalitozoon*

Especie: *E. cuniculi*

## 1.7. Carácter zoonótico de *E. cuniculi*

Se han registrado a nivel mundial casos de *E. cuniculi* en diferentes poblaciones humanas con diversos tipos de inmunosupresión como VIH positivos, trasplantados y con cáncer, en donde los genotipos I y III están estrechamente relacionados a una gama de sintomatología como pérdida de peso, diarrea persistente acuosa, abundante, no sanguinolenta, sin moco, sin leucocitos, litérica. Dicho cuadro diarreico ocasiona deshidratación y una gran debilidad. Algunas veces puede presentarse anorexia y dolor abdominal antes de la deposición, mala absorción intestinal debido a los bajos niveles de D-xilosa y vitamina B12, sin embargo, dependiendo del lugar de la infección se pueden presentar otras enfermedades como: insuficiencia renal, encefalitis, hepatitis, colecistitis, enteritis, nefritis, rinitis, sinusitis, queratoconjuntivitis, convulsiones e infección diseminada (Cuadro 4), (Rabeneck, 1993; Kotler y Orenstein, 1998-2002; Brasil *et al.*, 1998; Goodgame, 1999; Didier *et al.*, 2000; Fedorko, 2001; Lores *et al.*, 2002; Didier *et al.*, 2004; Anane *et al.*, 2010; Galvan *et al.*, 2011; Sak *et al.*, 2011; Lobo *et al.*, 2012).

Por otro lado en Suiza también se refirieron pacientes infectados con *E. cuniculi* genotipo I (genotipo de conejo), los cuales trabajaban en una granja y estuvieron en contacto con conejos (Mathis *et al.* 1997; Weber *et al.* 1997). En contraste, en Estados Unidos se informó de dos pacientes infectados con *E. cuniculi* genotipo III (genotipo de perro), los pacientes tenían un perro como mascota (Didier *et al.*, 1996; Teachey *et al.*, 2004). Sólo los genotipos I y III han sido identificados en humanos, lo cual indica que estos genotipos son zoonóticos (Didier *et al.*, 1996; Rossi *et al.*, 1998).

**Cuadro 4. Genotipos de *E. cuniculi* reportados en humanos**

<b>País</b>	<b>Manifestaciones clínicas</b>	<b>Sitio(s) de la infección y/o muestra</b>	<b>Genotipo de <i>E. cuniculi</i></b>	<b>Año</b>
<b>Pacientes infectados con VIH</b>				
Reino Unido	Dolor abdominal, anorexia, náusea, vómito, fiebre, tos, insuficiencia renal	Riñón, orina	III	1994
Estados Unidos	Fiebre, tos, vómito, insomnio, congestión de los senos, ojos severamente secos, visión borrosa	Orina, esputo	III	1995
Alemania	Queratoconjuntivitis, sinusitis, rinitis	Orina, esputo, heces, secreción nasal, biopsia duodenal	No determinado	1995
Suiza	Dolor de cabeza, discapacidad visual, deterioro cognitivo, náusea, vómito	Líquido cefalorraquídeo, heces, orina, esputo	I	1997
México	Neumonía, otitis media	Orina, heces	III	1997
Estados Unidos	Mareo, fiebre, náuseas, dolor abdominal, diarrea	Glándulas suprarrenales, riñón, cerebro, corazón, tráquea, vejiga urinaria, bazo, ganglios linfáticos	III	1997
Suiza	Ninguno	Orina	I	1997
Suiza	Conjuntivitis, sinusitis, convulsiones	Orina	I	1997
Suiza	Insuficiencia renal	Orina	I	1997
Suiza	Ninguno	Orina	I	1997
Italia	Sinusitis crónica, queratoconjuntivitis bilateral	Epitelio nasal	I	1998



Continuación cuadro 4

<b>País</b>	<b>Manifestaciones clínicas</b>	<b>Sitio(s) de la infección y/o muestra</b>	<b>Genotipo de <i>E. cuniculi</i></b>	<b>Año</b>
Francia	Discapacidad visual	Líquido cefalorraquídeo, orina, esputo, biopsia duodenal	No determinado	2000
Chile	Tos, fiebre	Lavado bronquio alveolar, lavado transbronquial	No determinado	2001
España	Fiebre, astenia, dolor abdominal, diarrea	Heces, orina, esputo	III	2001
Italia	Fiebre, mialgia, mal estado general	Riñón, hígado, ganglios linfáticos, bazo, cerebro, ovarios	III	2002
<b>Pacientes sometidos a trasplante de órganos</b>				
Canadá	Fiebre, queratoconjuntivitis	Orina, heces, esputo, rapados conjuntivales	III	2002
México	Tos, fiebre, diarrea, dolor torácico, debilidad extrema	Hígado riñón	III	2003
Estados Unidos	Dificultad respiratoria	Biopsia de pulmón	III	2004
<b>Pacientes negativos a VIH (inmunocomprometidos de otra manera)</b>				
Suiza	Tumor en el iris	Biopsia de tumor	I	2005

**Cuadro 4.** Casos de humanos infectados con *E. cuniculi* confirmados por análisis moleculares (Mathis *et. al.* 2005)

## 1.8. Sintomatología en animales

El principal hospedero de *E. cuniculi* es el conejo, presentan diversos síntomas, neurológicos como convulsiones, temblores, tortícolis, paresia, coma, inclinación de la cabeza, parálisis y muerte (Figura 4) (Kunstyr *et al.*, 1983; Nast *et al.*, 1996). Las lesiones se encuentran más comúnmente en los ojos (cataratas), riñones, pulmones, bazo, glándulas suprarrenales, páncreas y miocardio (Fuentealba *et al.* 1992; Harcourt, 2004).

Los conejos se infectan por ingestión, inhalación de esporas y transmisión transplacentaria (Didier *et al.*, 2000; Baneux *et al.*, 2003; Harcourt, 2004). En la fase aguda de la infección el parásito se multiplica en el pulmón, el hígado, el riñón, en el sistema nervioso central (SNC) y el corazón (Harcourt, 2004) en la fase crónica produce infecciones diseminadas aunque hay reportes en donde mencionan que la infección puede ser asintomática permaneciendo de forma latente (Rodríguez *et al.*, 2001; Harcourt, 2004; Marchant *et al.*, 2007). Es importante resaltar que *E. cuniculi* no tiene predilección por algún tejido en especial, infecta macrófagos, células epiteliales, células endoteliales vasculares, células renales del túbulo y puede infectar la mayoría de los tejidos, el cerebro y riñón (Canning *et al.*, 1986).

En perros recién nacidos (cachorros) la infección se adquiere por transmisión transplacentaria, los perros jóvenes se infectan por ingestión o inhalación de esporas desprendidas de los fluidos corporales, orina y heces de la madre, ocasionando retraso en el crecimiento y falta de desarrollo en general, y los perros adultos la adquieren por inhalación o ingestión de esporas del medio ambiente. Los signos clínicos en los perros principalmente son neurológicos, incluyendo la ceguera, ataxia y convulsiones. En el caso de los gatos los signos clínicos son: espasmos musculares severos, infección de la cornea superficial con blefaroespasma (contracción involuntaria de los párpados), depresión, parálisis y muerte. Los perros y gatos de edad avanzada generalmente muestran pocos o ningún síntoma clínico de la enfermedad, pero esporádicamente arrojan esporas en orina y heces (Greene, 2006).

Además de parasitar a conejos y perros, provoca placentitis y aborto en caballos (Patterson *et al.* 2003).



**Figura 4.** Conejos infectado con *E. cuniculi*. (A) con debilidad, paresia (ausencia parcial de movimiento) y polidipsia (aumento anormal de sed) (B) tortícolis (inclinación de la cabeza) (Tomado de Harcourt. 2004).

## 1.9. Epidemiología

Los microsporidios son conocidos desde 1857 como parásitos de diversos animales. En humanos se detectaron en 1959, pero hasta la década de los 80's con la pandemia del SIDA comenzaron a considerarse patógenos emergentes de gran importancia. La distribución de la microsporidiosis en el hombre es cosmopolita, pero los datos de prevalencia varían ampliamente dependiendo del método utilizado así como la población estudiada, estado inmunológico del hospedero y región geográfica (Figura 5). Se citan prevalencias que pueden ir desde del 1% al 87% (Cuadro 5) (Campos *et al.*, 2002; Didier *et al.*, 2004; Anane *et al.*, 2010; Sak *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2011; Albelo *et al.*, 2013). En un estudio realizado en México en el estado de Puebla se encontró una seroprevalencia del 8%, el agente patógeno identificado fue *Encephalitozoon* sp. (Becerril, 2011).

**Cuadro 5. Prevalencia de microsporidiosis en humanos**

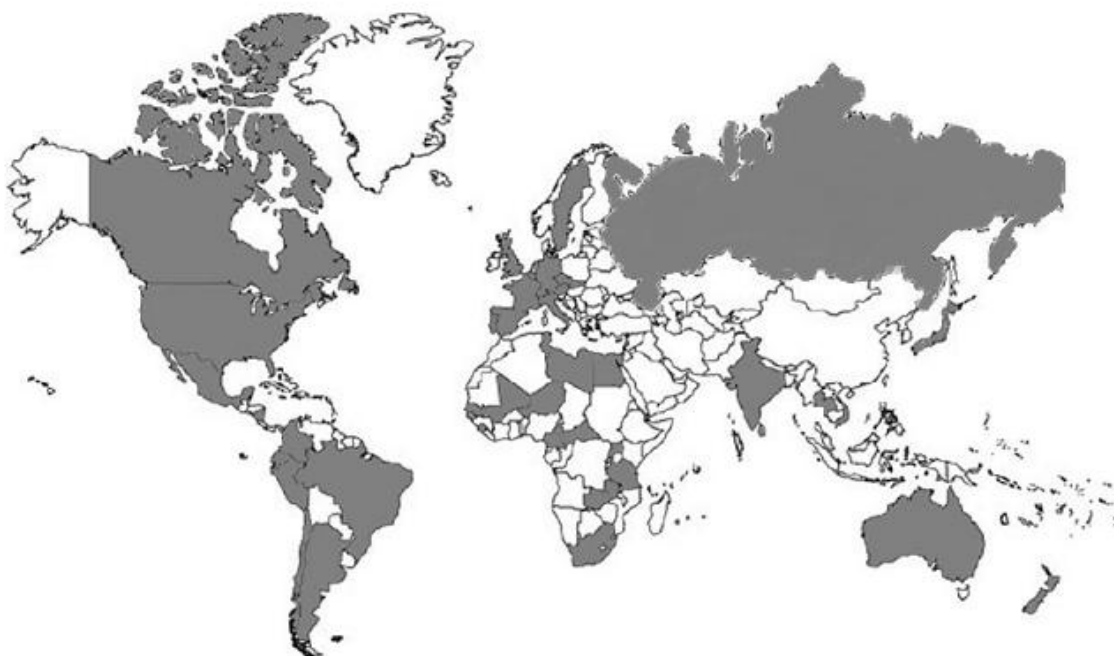
País	Número de casos	Población estudiada	Prevalencia	Método de diagnóstico	Autor
Francia	207	VIH (+)	3.38 %	Microscopia electrónica	Michiels et al. 1992
Túnez	12	VIH (-) <sup>a</sup>	16.7 %	Uvitex 2B y tricromica de Weber	Aoun et al. 1997
Francia	100	VIH (+)	39 %	PCR	Liguory O. et al. 1996
Francia	682	VIH (+)	2.9 %	Uvitex 2B+ tricromica de Weber	Billaund et al. 1997
Guinea	52	VIH (+) y VIH (-) <sup>b</sup>	VIH (+)=11 % VIH (-)=0 %	Tricromica de Weber	Lebbad et al. 2001
Portugal	215	VIH (+)	42.8 %	Tricromica de Weber y blanco de calcofluor	Ferreira et al. 2002
España	60	VIH (-) <sup>c</sup>	17.02 %	Tricromica de Weber	Lores et al. 2002
Perú	2652	VIH (+)	3 %	Tricromica de Weber	Bern et al. 2004
Mali	70	VIH (+)	11.5 %	PCR	Konate et al. 2005
Vietnam	72	VIH (+)	1.38 %	PCR	Lejeune et al. 2005
Etiopia	243	VIH (+) y VIH (-) <sup>b</sup>	VIH (+)=18.2% VIH (-)=0%	PCR	Endeshav et al. 2006
Venezuela	103	VIH (+)	13.6 %	Tricromica de Weber	Chacin-Bonilla et al. 2006
Camerún	154	VIH (+)	5.2 %	PCR	Sarfati et al. 2006
USA	737	VIH (+)	1.5 %	Chromotropo 2R y Quick-hot Gram-Chromotropo	Dworkin et al. 2007
Nigeria	228	VIH (+)	10.5 %	PCR	Esporn et al. 2007
Camerún	191	VIH (+) y VIH (-)	VIH (+)=35.7% VIH (-)=24%	Blanco de Calcofluor	Nikinin et al. 2007

Continuación cuadro 5.

País	Número de casos	Población estudiada	Prevalencia	Método de diagnóstico	Autor
Congo	50	VIH (+)	2 %	Tricromica de Weber y fungifluor	Wumba et al. 2007
Sudáfrica	322	VIH (+) VIH (-) <sup>d</sup>	11.2 %	PCR	Samie et al. 2007
Malasia	893	VIH (+) VIH (-) <sup>e</sup>	13 %	Gran – Chromotropo modificado	Norhayati et al. 2008
Túnez	119	VIH (+) VIH (-) <sup>f</sup>	9.3 %	PCR	Anane et al. 2009

**Cuadro 5.** <sup>a</sup> Niños con inmunodeficiencia primaria. <sup>b</sup> Sujetos inmunocompetentes con diarrea. <sup>c</sup> Personas de edad avanzada. <sup>d</sup> Niños inmunocompetentes y pacientes hospitalizados por diversas condiciones. <sup>e</sup> Individuos con diversas condiciones (diabetes, enfermedades hematológicas malignas) y sujetos inmunocompetentes. <sup>f</sup> Sujetos inmunodeprimidos (Anane *et al.*, 2010).

**Figura 5. Distribución geográfica de microsporidiosis humana**



**Figura 5.** Las regiones oscuras indican las zonas con casos humanos mostrando una distribución cosmopolita (Tomado y modificado de Franzen, 2008).

## **Epidemiología de *E. cuniculi* en animales**

En animales la prevalencia reportada oscila en un rango muy amplio que va del 3.9% hasta un 85% (Cuadro 6) (Merino *et al.*, 1990; Marchant *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2010). Faega, en cortes histológicos de diez conejos con tortícolis, encontró esporas de *E. cuniculi* en nueve de ellos (Faega, 1997). Meyer reportó una seroprevalencia del 42% en 200 conejos enanos mascotas, (Meyer, 1996). De igual manera Ewingmann y colaboradores encontraron que en 227 conejos una seroprevalencia del 45%, de los conejos seropositivos 41% presentaron signos clínicos de encefalitozoonosis; 45% de los conejos en el sistema nervioso central (SNC), 31% insuficiencia renal, 14% uveítis facoclástica y 6% presentaban síntomas en el SNC, trastornos renales y uveítis facoclástica (Ewingmann *et al.*, 1999).

La prevalencia en perros reportada va del 13.3% a 70%, en una perrera de Londres fue del 13.3%, en Sudáfrica un estudio serológico de 220 muestras de suero de perros arrojó una prevalencia de 18%, también en una perrera se registró una prevalencia del 70%, esta alta prevalencia puede haber sido consecuencia de la reclusión y el contacto cercano con la orina o heces contaminadas de los perros (Grane, 2006).

**Cuadro 6. Prevalencia de *Encephalitozoon cuniculi* en animales**

<b>País</b>	<b>Animal</b>	<b>Estado de salud</b>	<b>Población total (N)</b>	<b>Población infectada</b>	<b>Referencia</b>
Suiza	Conejos	Asintomáticos	292	7.5 %	Müller 1998
Suiza	Conejos	Síntomas neurológicos	72	85 %	Müller 1998
Reino Unido	Conejos	Asintomáticos	26	23 %	Harcourt <i>et al.</i> 2003
Reino Unido	Conejos	Síntomas neurológicos	65	71 %	Harcourt <i>et al.</i> 2003
Francia	Conejos salvajes	-	204	3,9 %	Chalupsky <i>et al.</i> 1990
Australia	Conejos salvajes	-	-	25 %	Thomas <i>et al.</i> 1997
Islandia	Ratón de campo	-	-	4%	Hersteinsson <i>et al.</i> 1993
Islandia	Ratón doméstico	-	-	9 %	Hersteinsson <i>et al.</i> 1993
Islandia	Zorros salvajes	-	372	12 %	Hersteinsson <i>et al.</i> 1993
Islandia	Visón salvajes	-	-	8 %	Hersteinsson <i>et al.</i> 1993
Colombia	Conejos	Asintomáticos	300	5 %	Rodríguez <i>et al.</i> 2001
Chile	Conejos	-	100	55 %	Marchant <i>et al.</i> 2007
Cuba	Conejos	-	1517	31.5 %	Merino <i>et al.</i> 1990
México	Cerdos	-	120	80 %	Rodríguez <i>et al.</i> 2010

**Cuadro 6.** Prevalencias reportadas a nivel mundial. Ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*), Ratón doméstico (*Mus musculus*, Zorros (*Alopex lagopus*))



## 1.10. Diagnóstico

El diagnóstico de microsporidios es muy complicado ya que se basa principalmente en la observación de las esporas (extremadamente pequeñas), en fluidos corporales, heces y tejidos (biopsias) de los hospederos infectados. En muchas ocasiones los humanos y animales presentan infecciones subclínicas (infección que no produce síntomas evidentes), por lo que el diagnóstico es más dificultoso, además la excreción de esporas es intermitente y esporádica, por lo que si se analizan muestras en el periodo donde no haya excreción el diagnóstico será negativo a pesar de que el hospedero tenga presente la infección (Csokai *et al.* 2009). Se ha reportado que en conejos infectados experimentalmente por vía oral con esporas de *E. cuniculi*, se encontró que la excreción regular de esporas en la orina y heces, fue observada entre los días 38 y 63 posinfección, y después de forma intermitente a una densidad muy baja (Cox *et al.*, 1979).

La microscopía electrónica de transmisión (ME) se ha considerado el estándar para el diagnóstico específico de microsporidiosis mediante la cual se observan características morfológicas específicas como el filamento polar, el número de vueltas del mismo (específico de cada especie) (Tabla 2). Sin embargo, es una técnica costosa, invasiva, consume mucho tiempo y requiere de técnicos especializados (Accoceberry *et al.* 1999). Debido a la dificultad de la identificación de los microorganismos, se buscaron nuevas alternativas de diagnóstico, como tinciones para microscopía de luz. Las esporas muestran afinidad de tinción a la hematoxilina-eosina, Ziehl-Neelsen (rojo), ácido peryódico de Schiff (positivo), Goodpasture, Giemsa (rojo pálido), metamina argéntica de Gomori y coloraciones fluorocrómicas, como cromotropo 2R (rojo magenta), Quick-hot-Gram Cromotropo (violeta), tricrómica de Weber (rojo), calcofluor (azul fluorescente) y Uvitex 2B (azul-verde) (Becerril, 2011). Las técnicas de tinción más utilizadas por su fácil manejo y bajo costo son: quick-hot gram-cromotropo tiene una gran sensibilidad y especificidad, es una prueba rápida y sencilla, evidenciando con gran claridad al filamento polar, que se observa como un cinturón en la parte media de la espora de

color rosa o rojizo característico de los microsporidios (Ignatius *et al.*, 1997; Botero *et al.* 2004; Rodriguez *et al.* 2010).

La tinción con Blanco de Calcoflúor es un método fluorescente para la detección de hongos. Maeda y colaboradores describieron que podía teñir hongos al exponerlo a la luz UV, lo utilizaron para la tinción de tejidos fijados en parafina, logrando identificar hifas y esporas. La tinción se basa en la capacidad del blanco de calcoflúor para unirse a los polisacáridos  $\beta$  1-3 de la celulosa y  $\beta$  1-4 presente en la quitina de la pared fúngica, en el caso de los microsporidios se une a la exospora (formada de quitina), el compuesto exhibe fluorescencia cuando se expone a luz ultravioleta permitiendo observar claramente la forma oval de la espora en color azul rey intenso en un fondo oscuro. Esta tinción se puede utilizar en tejidos frescos y/o congelados, fijados en parafina, en cultivos puros y en heces (Maeda *et al.*, 1967; Harrington *et al.*, 1991; Moura *et al.*, 1996; Ignatius *et al.*, 1997; Punpoowong *et al.*, 1998).

La tinción de Zhiel-Neelsen modificada se basa en la propiedad de la pared celular de algunos microorganismos alcohol resistentes de resistir a la decoloración con un alcohol y un ácido fuerte cuando han sido previamente teñidas con fucsina, al calentar la muestra la fucsina penetra profundamente al interior de la espora y puede resistir la acción decolorante de una solución de ácido-alcohol quedando teñidas de rosa muy intenso (Monacorda *et al.*, 2007).

Uno de los inconvenientes de las técnicas de tinción, es que no se puede diferenciar entre géneros y especies, esto es posible con las técnicas de inmunofluorescencia directa o indirecta utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para cada una de las especies. También con las técnicas moleculares como PCR utilizando primers específicos para cada una de las especies es posible determinar el género y especie (De Groote *et al.*, 1995; Rossi *et al.*, 1998; Hůrková *et al.*, 2006; Franzen 2008; Csokai *et al.*, 2009).

## 1.11. Tratamiento

Se ha propuesto el uso de diversos fármacos para tratar la microsporidiosis. La eficacia ha sido variable y los criterios de éxito terapéutico son la disminución de las manifestaciones clínicas y muestras negativas (ausencia de esporas). Entre los fármacos más utilizados y de mayor eficacia se encuentran el albendazol, metronidazol, nitazoxanida, talidomina y funmagillin, este último en presentación tópica es utilizado con frecuencia en conjuntivitis, queratoconjuntivitis y lesiones corneales. Otros fármacos como furazolidona, sinefungin, azitromicina, itraconazol, octreótida y sulfas se han empleado con resultados variables. Las personas con SIDA deben de tomar medicamento de por vida ya que al ser una parasitosis oportunista se pueden infectar o activar en cualquier momento (Franssen *et al.* 1995; Becerril, 2008; Anane *et al.* 2010).

## Prevención

Las esporas de los microsporidios son la fase de resistencia e infección, y son altamente resistentes en el ambiente. Se ha documentado que la inhibición de hasta el 99.9% de la infectividad de las esporas de *E. cuniculi* es con 2 mg/L de cloro durante 6 minutos, por lo que es necesario el uso de cloro para desinfectar agua y alimentos. Las esporas de *E. cuniculi* resisten a 56°C durante 60 minutos, pero se inactivan cuando se incuban durante 120 minutos a la misma temperatura, por lo que es necesario hervir el agua. Dentro de otras medidas de sanidad es importante que se les proporcione el servicio de agua potable, drenaje y pavimento a todas las comunidades; si no hay agua potable ésta debe hervirse o filtrarse, y si no hay drenaje será necesario construir letrinas adecuadas para que la materia fecal no esté expuesta al aire libre y pueda diseminarse por medios mecánico (viento, lluvia y fomites). Es indispensable que se fomenten medidas de buena higiene como: el lavado de manos antes de ingerir alimentos y después de defecar. Evitar que los insectos (moscas o cucarachas) se paren en los alimentos, lavar y desinfectar futas y verduras antes de ser ingeridas. Evitar la propagación de las esporas provenientes las heces de mascotas o animales de granja. En pacientes

inmunocomprometidos extremar precauciones para evitar que se infecten con estos parásitos (Didier *et al.* 2004; Didier, 2005, Didier & Weiss, 2011).

## 1.12. Cultivo *In vitro* de microsporidios

Antes de la aparición del SIDA, el interés en el cultivo *in vitro* de microsporidios se limitó a especies de importancia económica, como *Nosema apis* y *Nosema bombycis* que infectan abejas y gusanos de seda, respectivamente; *Brachiola algerae*, que parasita a los mosquitos del género *Anopheles*, son los vectores del paludismo y *Vavraia culiceis*, que parasita a mosquitos del género *Culex*, vectores de la filariasis (Jaronski, 1984). Sin embargo, la necesidad para cultivar microsporidios de origen humano surgió cuando la pandemia del SIDA se hizo presente, debido a que estos pacientes mostraban enfermedades con diagnóstico difícil o indeterminado, por lo que inicialmente se implementó el cultivo de muestras provenientes del líquido cefalorraquídeo, esputo y orina de estos pacientes con SIDA (Cuadro 7) (Visvesvara, 2002).

En 1956, Morris y colaboradores cultivaron *E. cuniculi* genotipo II (ratón) por un corto tiempo en una línea celular de linfosarcoma. Fue hasta que Shaddock tuvo éxito en el cultivo continuo de *E. cuniculi* en células RK (riñón de conejo) (Shaddock, 1969). Pasaron 25 años para que Beauvais y colaboradores establecieran un cultivo de *E. cuniculi* en la línea celular MDCK (células epiteliales de riñón canino), obteniendo esporas después de 6 semanas de la infección (Beauvais *et al.* 1994). Posteriormente, De Groote y colaboradores establecieron cultivos de *E. cuniculi* a partir de muestras de orina y esputo de un paciente con SIDA cultivándolo en la línea celular E6 (células de riñón de mono) después de 4 a 6 semanas se observaron esporas en los sobrenadantes de cultivo (De Groote *et al.*, 1995). En el mismo año, Hollister y colaboradores en el Reino Unido establecieron otro cultivo de *E. cuniculi* mediante la inoculación de esporas aisladas a partir de la orina de un paciente con SIDA a la línea celular MDCK (Hollister *et al.* 1995). Tres años después, Rossi y colaboradores establecieron un

cultivo de *E. cuniculi* en células de riñón de conejo (RK13) a partir de esporas del epitelio nasal de un hombre italiano con VIH (Rossi *et al.*, 1998).

Hasta 1999 a nivel mundial solo 13 aislados de *E. cuniculi* habían sido establecidos procedentes de distintas muestras humanas como orina, lavado broncoalveolar (BAL), esputo y cerebro. Posteriormente, otros aislados de *E. cuniculi* fueron establecidos en Suiza, siete fueron cultivados en la línea celular MRC-5 (fibroblasto de pulmón), provenientes de orina y líquido cefalorraquídeo de pacientes con SIDA (Visvesvara *et al.* 2002). Del Águila *et al.*, establecieron dos aislados, uno de orina y otro de esputo ambos de pacientes con SIDA, en cultivos de células riñón de mono (E6) y fibroblasto de pulmón humano (HLF), respectivamente, reportando la presencia de esporas con un tamaño de 1.8 a 3.0  $\mu\text{m}$  de largo por 1  $\mu\text{m}$  de ancho en el sobrenadante de los cultivos de 2 a 4 semanas posinoculación (Del Aguila *et al.*, 2001). Posteriormente Joseph-Sharma, cultivaron *E. cuniculi* en células HeLa y reportaron la obtención de esporas de 4 a 5 semanas posinoculación (Joseph-Sharma, 2009).

Es importante resaltar que todos los cultivos reportados a nivel mundial se han obtenido únicamente de muestras de fluidos y tejidos de pacientes inmunocomprometidos principalmente con SIDA, hasta el momento no se han obtenido cultivos de esporas de microsporidios aislados de materia fecal de hospederos inmunosuprimidos ni de inmunocompetentes.

## Cuadro 7. Especies de Microsporidios cultivadas

Especie	Línea celular	Medio	Suplementos y condiciones de cultivo
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	E6, HLF, MDCK, MRC-5	EMEM + 2 mM de glutamina	5 o 10% de SFB o FCS y antibióticos (penicilina y estreptomicina o gentamicina y anfotericina B) con 5% de CO <sub>2</sub>
<i>Encephalitozoon hellem</i>	MDCK, E6, HLF, MRC-5, RK-13, FBF	EMEM + 2 mM de glutamina, RPMI	5 o 10% de SFB o FCS y antibióticos (penicilina y estreptomicina o gentamicina y anfotericina B) con 5% de CO <sub>2</sub>
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	E6, HLF, MDCK, HEL, MDM, RK-13, I047, HT-29, Caco-2	EMEM + 2 mM de glutamina, RPMI 1640, DMEM + 2 mM de glutamina	5 o 10% de SFB o FCS y antibióticos (penicilina y estreptomicina o gentamicina o un coctel de amoxicilina, vancomicina, gentamicina y anfotericina B) con 5% de CO <sub>2</sub>
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	E6, HLF, HT-29, Caco-2, MDCK, RK-13	EMEM + 2 mM de glutamina	5 O 10% SFB, EGF, insulina, transferrina, HC, selenio, HEPES
<i>Vitaforma corneae</i>	SIRC, MDCK, E6, HLF, MRC-5	EMEM + 2 mM de glutamina	5 O 10% SFB, gentamicina, con 5 % de CO <sub>2</sub>
<i>Trachipleistophora hominis</i>	MDCK, RK-13, COS-1, L6-C10, MM	DEMEM + 2 mM de glutamina	10 % SFB, 10 % HS, gentamicina, con 5 % de CO <sub>2</sub>
<i>Brachiola algerae</i>	E6, HLF	EMEM	5 O 10% SFB, gentamicina y anfotericina B

**Cuadro 7.** E6: riñón de mono; HLF: fibroblasto de pulmón humano; MDCK: Madin-Darby riñón canino; MRC-5: fibroblasto de pulmón; RK-13: riñón de conejo; FBF: pulmón fetal bovino; HEL: pulmón de embrión humano; MDM: monocitos; I047: intestino; HT-29: adenocarcinoma humano; Caco-2: carcinoma de colon humano; SIRC: epitelio de córnea de conejo; COS-1: riñón de mono verde; L6-C10: línea de células humanas; MM: mioblastos de ratón; SFB: suero fetal bovino; FCS: suero fetal de ternero; EGF: factor de crecimiento epidérmico; HC: hidrocortisona; HS: suero humano (Visvesvara, 2002)

## 2. Justificación.

La microsporidiosis en general es considerada una enfermedad oportunista y emergente, distribuida ampliamente alrededor del mundo, infectan a una gran variedad de animales invertebrados y vertebrados incluyendo al hombre. Causan pérdidas en la sericultura, apícola, pesquera y ganadera. En lo que se refiere al humano las poblaciones más susceptibles son individuos inmunodeficientes o inmunocomprometidos, principalmente con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) provocándoles serias patologías e incluso hasta la muerte, también son afectadas personas con otros tipos de inmunosupresión: pacientes con trasplante de órganos sólidos y de medula ósea, con cáncer, desnutridas, ancianos, embarazadas y con diabetes. Pero en estudios recientes se ha reportado que afecta a personas inmunocompetentes (usuarios de lentes de contacto y viajeros) (Fedorko, 2001; Lores *et al.*, 2002; Anane *et al.*, 2010; Didier *et al.*, 2011; Ditrich *et al.*, 2011; Galvan *et al.*, 2011; Sak *et al.*, 2011; Lobo *et al.*, 2012).

Dentro de las distintas especies que infectan al humano se encuentra *Encephalitozoon cuniculi*, que se a registrado como una especie zoonótica, causa la enfermedad de encefalitozoonosis, infecta animales que juegan un papel importante en la vida de los humanos ya que están estrechamente relacionados en la convivencia diaria, como animales de compañía, mascotas (perro, hámster, rata, ratón y cobayos) siendo un factor de riesgo, también en aquellas personas que se dedican a la cría, producción y manejo de animales (industria cunícula y ganadera principalmente), y orina debido a que están en contacto directo con sus desechos, ya que los animales infectados eliminan las esporas en las heces pudiendo de esta manera infectarse. Es importante destacar que estos patógenos se presentan con mayor frecuencia como infecciones latentes en individuos inmunocompetentes, planteando la posibilidad del riesgo potencial de reactivación tras la inducción de la inmunosupresión causada por ciertas condiciones patológicas y/o terapéutica con fármacos (Kotkova *et al.* 2013).

Por tal motivo es necesario obtener aislados de *Encephalitozoon cuniculi* autóctonos de México para su caracterización, cultivo *in vitro*, que ayudará en el conocimiento de la biología de este parásito: mecanismos de patogenicidad y tiempo de multiplicación, a partir de los cuales se puedan desarrollar herramientas que nos permitan la estandarización de técnicas diagnósticas inmunológicas y moleculares, así como la búsqueda de tratamientos alternativos eficaces ya que actualmente no se cuenta con alguno eficaz contra esta parasitosis. Además de realizar estudios en México de prevalencia y seroprevalencia existente en la población mexicana, así como de animales de granja y de compañía.



### **3. Objetivos**

#### **Objetivo general**

Establecer el cultivo *in vitro* de esporas de microsporidios obtenidas de heces de conejo.

#### **Objetivos específicos:**

- a) Obtención de aislados (esporas) de microsporidios a partir heces de conejo.
- b) Identificación morfológica con tinciones Gram-Cromotropo, Blanco de Calcoflúor y Ziehl-Neelsen.
- c) Purificación de esporas de microsporidios de heces de conejo.
- d) Cultivo *in vitro* de microsporidios en línea celular VERO.

## 4. Diseño experimental

A continuación se muestra el diseño experimental en el cual se observa la metodología que se siguió para la realización de este trabajo.



## **5. Material y métodos**

### **5.1. Población estudiada**

Se trabajó con conejos del Centro de Enseñanza Agropecuario de FES Cuautitlán, UNAM en donde se utilizan para las prácticas de algunas materias de las carreras impartidas en la FES Cuautitlán, además de estar en venta al público para consumo humano y como mascotas. Son mantenidos en jaulas de 70 cm de largo x 60 cm de ancho con un promedio de 6 a 8 animales por jaula, seleccionados por sexo (hembras recién paridas y sementales) y para reproducción (hembras y machos).

### **5.2. Colecta de muestras**

Se realizó una colecta de 70 muestras de heces de conejos aparentemente sanos del Centro de Enseñanza Agropecuario de FES Cuautitlán, UNAM. Las muestras de aproximadamente 70 gramos se colectaron en bolsas de plástico y se colocaron los datos (fecha, origen y sexo) posteriormente se depositaron en una recipiente con hielo para su transporte al laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

En el laboratorio fueron guardadas en refrigeración (4°C) no por más de una semana y se procesaron para la identificación microscópica de las esporas.

### **5.3. Procesamiento de las muestras de heces**

Se tomaron aproximadamente de 10-15 gramos de heces por muestra, se colocaron en tubos de 50 mL, se les agregó 30 mL de agua destilada estéril, con la ayuda de un abatelenguas se mezclaron hasta obtener una solución homogénea, posteriormente se filtraron en un copropacks con la finalidad de eliminar el exceso de residuos de alimento y detritos. El sobrenadante obtenido del filtrado se colocó en un tubo de 50 mL y se realizaron extendidos en portaobjetos, y se secaron en

una estufa (aproximadamente a 40°C/5 minutos), se fijaron con unas gotas de metanol para posteriormente realizar las 3 tinciones (Gram-Cromotrope y Blanco de Calcoflúor y Ziehl-Neelsen) para la identificación de microsporidios por microscopia de luz (campo claro).

## **5.4. Técnicas de Tinción**

### **Tinción de Quick-hot gram-cromotrope**

Esta tinción se realiza en dos etapas.

- Primero se realizó la tinción de Gram de la siguiente manera:

Los portaobjetos con los extendidos de materia fecal se tiñeron con violeta de genciana durante 30 segundos, se lavó el exceso de colorante con agua de llave, después se introdujeron los portaobjetos en solución de lugol durante 30 segundos, posteriormente se retiró el exceso de lugol por arrastre con una solución decolorante, en seguida se lavó con agua de la llave para retirar el exceso de la solución decolorante.

- Segundo se hizo la tinción con cromotrope.

Los portaobjetos se sumergieron en el colorante cromotrope que se encontraba a una temperatura de 50-55°C durante dos minutos e inmediatamente se decoloró con alcohol ácido durante tres segundos. A continuación se deshidrataron con alcohol etílico al 95% durante 30 segundos, dos veces con alcohol etílico puro por 30 segundos (Ignatius *et al.*, 1997). La observación de las laminillas se realizó en un microscopio Olympus BX41.

## **Tinción con Blanco de Calcoflúor**

Se hicieron extendidos de materia fecal sobre portaobjetos y se les agregaron unas gotas de una solución que contenía: 1 ml de fluostain I (0.1% en PBS pH 7.2), 1.0 ml de NaOH al 5% y 8ml de azul de Evans (0.5% en PBS pH 7.2), se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, se lavaron con PBS pH 7.6 hasta eliminar el exceso de colorante, se dejaron secar a temperatura ambiente en la oscuridad, se montaron con resina sintética y se observaron en un microscopio de fluorescencia (OLYMPUS BX50) con un objetivo 100X (Jiménez *et al.* 2012).

## **Tinción Ziehl-Neelsen**

A los portaobjetos con extendidos de materia fecal se les colocó papel filtro, cubriendo en su totalidad la muestra, se agregó sobre el papel filtro el colorante Carbol-Fucsina, evitando la formación de burbujas de aire. Posteriormente las muestras se calentaron con un mechero un par de minutos hasta que emitiera vapores, evitando que la muestra se quemara, después se les agregó nuevamente colorante repitiendo 3 veces el mismo procedimiento, después de calentar las muestras se les retiró el papel filtro, se decoloraron con alcohol-acido al 1% y se enjuagaron con agua de la llave, se les agregó el colorante de contraste verde brillante al 1% y se dejaron por 2 minutos, finalmente se retiró el exceso de colorante con agua corriente de la llave, se dejó secar y se observaron en un microscopio Olympus BX41 (Jiménez *et al.* 2012).

## 5.5. Criterios para la identificación de esporas de microsporidios

- 1) Forma ovalada
- 2) Tamaño: 1.0-3.0  $\mu\text{m}$  ancho  $\times$  1.5-4.0  $\mu\text{m}$  de largo.
- 3) Presencia del filamento polar en la espora como un cinturón en la parte media.
- 4) Presencia de dos polos intensamente teñidos en los extremos correspondientes a la vacuola posterior y el disco de anclaje del filamento polar.
- 5) Presencia de quitina en la pared de la espora teñida con Blanco de Calcoflúor

## 5.6. Concentración de esporas

Una vez filtradas las muestras de heces, se tomó 1 mL de cada una, se colocaron en tubos de 15 mL, se agregaron 5 mL de buffer TES (Tris 300 mM, EDTA 100 mM y SDS al 1%) para disgregar la materia fecal y liberar las esporas, se homogenizaron en un vortex durante 10 minutos y se centrifugaron a 500 rpm/10 minutos para eliminar los detritos más gruesos contenidos en la materia fecal: se tomó el sobrenadante, se colocó en otro tubo de 15 mL y se centrifugó a 4000 rpm/20 minutos, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió con 15 mL de agua destilada (para retirar el exceso de buffer), se homogenizaron nuevamente con un vortex por 10 minutos y se centrifugaron a 4000 rpm/20 minutos. El paso anterior se repitió por tres veces más para eliminar el exceso de buffer.

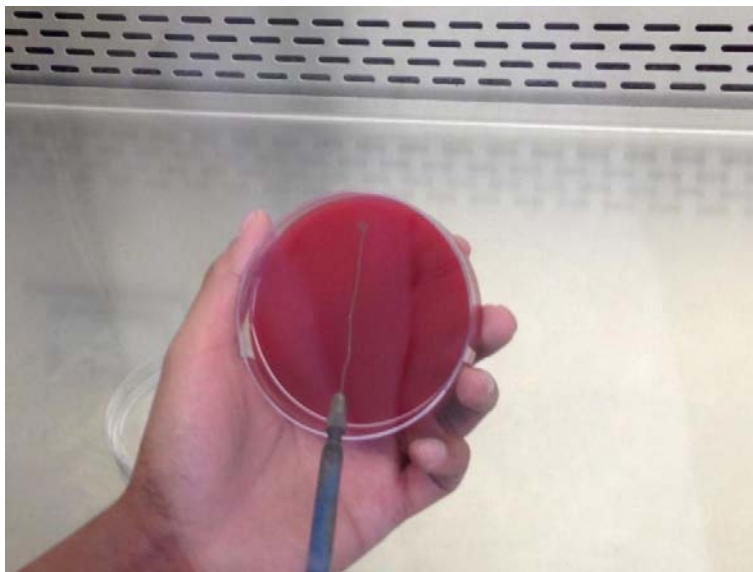
Al finalizar el proceso de lavado, se obtuvieron tres fases que consistieron de: una fase de color café que correspondía al sobrenadante (parte superior) y un botón con dos fases una de color claro (blanco) que correspondió a las esporas y otra (inferior) oscura que correspondió a los detritos, posteriormente las esporas fueron colectadas con mucho cuidado con la ayuda de una pipeta Pasteur, procurando no tomar de la fase oscura y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 1 mL

de agua destilada estéril y se guardaron a 4°C no por más de una semana para su cultivo posterior en la línea celular VERO.

## 5.7. Axenización de esporas

Las esporas ya concentradas y purificadas se sometieron a un tratamiento de axenización que consistió en una mezcla de antibióticos: Eritromicina, Claritromicina y Amoxicilina a una concentración de 10 mg/mL y Anfotericina B a una concentración de 50 µg/mL con la finalidad de eliminar la contaminación por bacterias y hongos en la muestra, se incubaron en baño maría con agitación a 37°C/24 hrs, después, transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron a 8,000 rpm/5 minutos, se desechó el sobrenadante, se agregó 1 mL de agua estéril y se homogenizó en un vortex. Nuevamente se centrifugó a 8,000 rpm/5 minutos, este paso se repitió 3 veces más para eliminar el exceso de antibióticos.

Posteriormente se sembró una alícuota de cada una de las muestras axenizadas en cajas petri con medio Base Gelosa Sangre y se incubaron por 48 horas a 37 °C, con el propósito de confirmar que no hubiera crecimiento bacteriano o por hongos (este medio es ideal para el aislamiento y cultivo de numerosos microorganismos aerobios y anaerobios nutricionalmente exigentes) (Figura 6).



**Figura 6. Siembra de muestras axenizadas en Medio Base Gelosa Sangre.**

## **5.8. Inducción de la germinación de esporas por cambios de pH**

La germinación de las esporas se realizó con cambios de pH ácido/ base; se tomaron 50 mL de solución Salina Balanceada de HANK`S (SSBH), se ajustó el pH a 7.5 (el pH se ajustó con bicarbonato de sodio en polvo), de esta solución se tomaron 25 mL y se les ajustó nuevamente el pH pero a 2.0 con ácido clorhídrico (HCl 1M), ambas soluciones (pH 7.5 y pH 2.0) se esterilizaron por filtración con membrana de poro de 22  $\mu$ m. Posteriormente las soluciones se incubaron a diferentes temperaturas, la solución de pH 2 a 37°C y la solución de pH 7.5 a 42°C por 30 minutos (ambas se prepararon en el momento de su uso). A continuación al botón de esporas axenizadas se les agregó 375  $\mu$ L de SSBH pH 2 y se incubaban a 37°C por 30 minutos, después de este tiempo de incubación se les agregaron 1.125  $\mu$ L de SSBH pH 7.5, se homogenizó perfectamente y se centrifugó a 8000 rpm por 3 minutos, posteriormente se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomocina 100  $\mu$ g/ml) y anfotericina B (5  $\mu$ g/mL) y la suspensión de esporas se inoculó a los cultivos de células Vero en monocapas, como se describe a continuación.

## **5.9. Inoculación de esporas al cultivo celular Vero.**

Los cultivos de la línea celular VERO se realizaron con anterioridad en placas de 24 pozos hasta obtener una confluencia del 100% (en monocapa), se inocularon con 50  $\mu$ L/pozo de la solución de esporas (activadas para la germinación) y se incubaron a 37°C en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 24 h. Pasado este tiempo se retiró el inóculo (esporas) con una pipeta Pasteur, procurando no lesionar la monocapa celular, se lavaron 3 veces con Buffer de fosfatos salino (PBS) pH 7.0 para eliminar las esporas que no se adhirieron a las células y los cultivos inoculados se les agregó medio nuevo y se incubaron en las condiciones antes mencionadas.



Para mantener en buenas condiciones los cultivos infectados con las esporas, se les cambió el medio cada tercer o cuarto día según lo requiriera y el medio recuperado se colocó en tubos de 15 mL, se centrifugaron a 4000 rpm/20 minutos y se obtenía el botón el cual se resuspendió en PBS pH 7.0. Se tomaban alícuotas del botón resuspendido para hacer frotis y realizar las tinciones correspondientes para verificar si en el sobrenadante de los cultivos se observaban esporas y de esta manera se monitoreó el desarrollo de la infección en dichos cultivos.

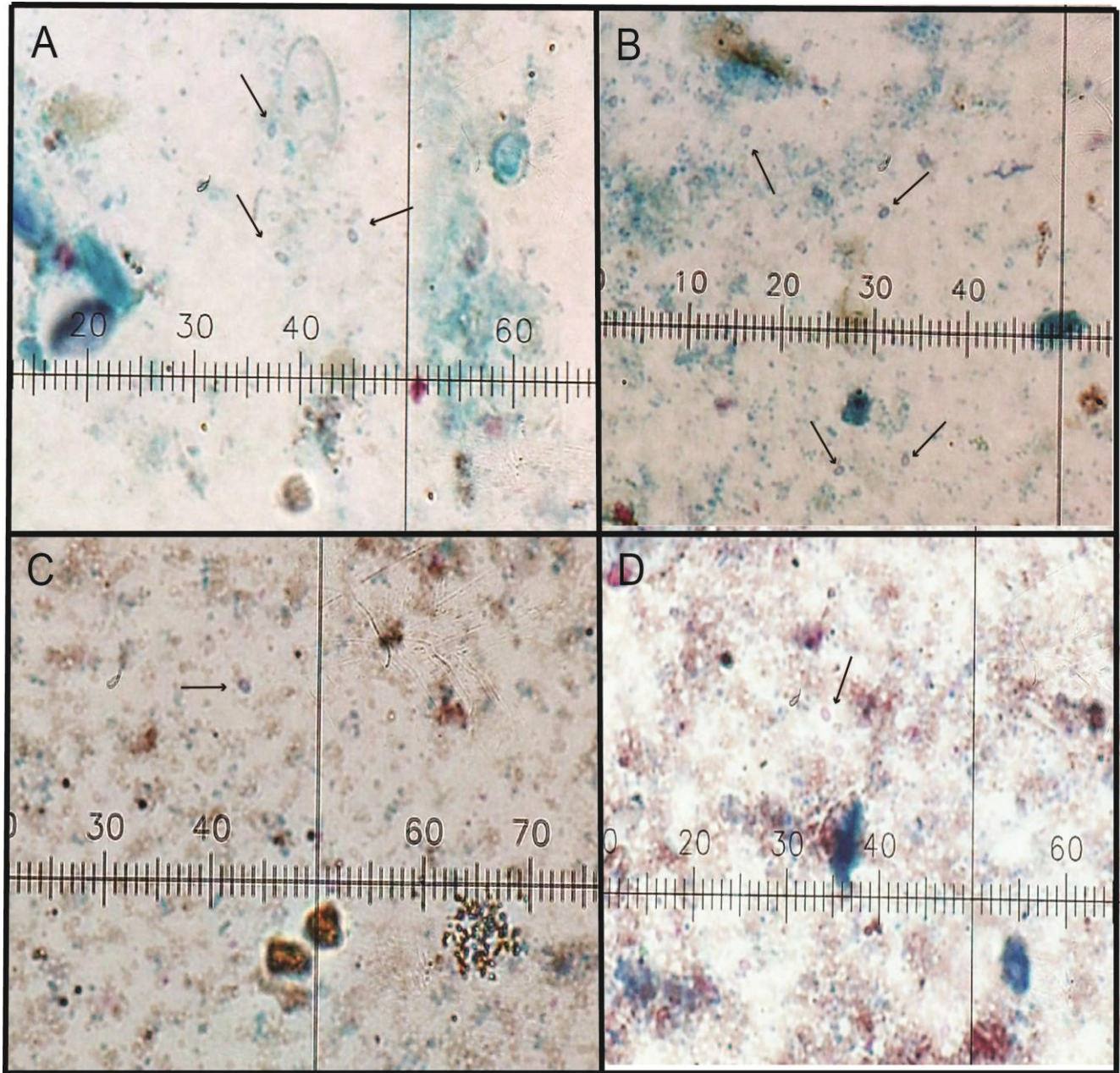
## **5.10. Mantenimiento de la línea celular VERO**

Para el mantenimiento de la línea celular fue necesario realizar subcultivos (pases), a partir de una caja de cultivo con células VERO con una confluencia del 100% (en monocapa), se eliminó el medio de cultivo con una pipeta Pasteur procurando no dañar la monocapa e inmediatamente después se le agregaron 2.0 mL de una solución de Tripsina/EDTA y se incubaron a 37°C por 5 minutos para desprender la monocapa, se observaron al microscopio para verificar que las células ya estuvieran completamente redondeadas y desprendidas de la superficie de la caja, una vez desprendidas las células se le agrego 2 mL de medio DMEM para inhibir el efecto de la Tripsina/EDTA quedando un volumen de 4 mL de suspensión celular, se tomaron 2 mL de esta suspensión y se colocaron en otra caja de cultivo estéril, se le agregó medio de cultivo hasta completar un volumen de 7 mL y a la caja original también se le agregó el mismo volumen de medio y se dejaron incubar a 37°C/5% CO<sub>2</sub> para su crecimiento. El monitoreo de las células se llevó a cabo con el fotomicroscopio invertido Olympus IX70 con cámara Olympus SC35 Type 12.

## 6. Resultados

La identificación de esporas de las muestras de heces de conejo (hembra, machos y en reproducción) teñidas con las diferentes tinciones: 1) con la tinción Ziehl-Neelsen (Figura 7) y Gram-Cromotopo (Figura 8), se encontró una mayor cantidad de esporas en las muestras de machos y hembras en comparación con las de animales en reproducción, con la técnica de Ziehl-Neelsen se observaron las esporas ligeramente teñidas mientras que con la de Gram-Cromotopo las esporas se tiñeron intensamente de color morado/violeta y se observó claramente el filamento polar como una línea transversal en la parte media de la espora (cinturón) característica de microsporidios.

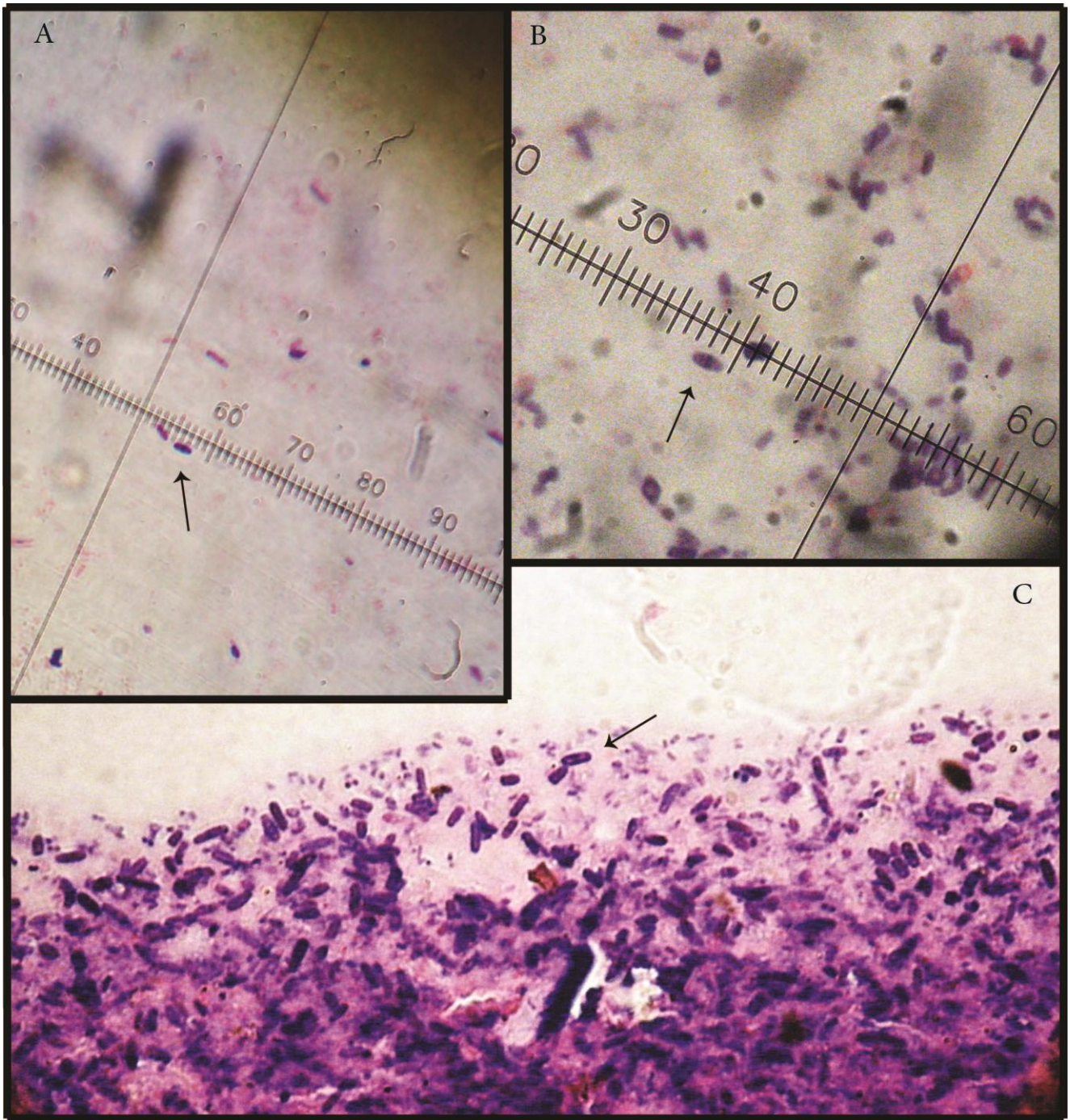
**Figura 7. Identificación de esporas de microsporidios en heces de conejo, tinción Ziehl-Neelsen**



**Figura 7.** Identificación de esporas por Tinción Ziehl-Neelsen. A) muestra de machos, B) muestra de hembras, C y D) muestra de animales en reproducción. En las muestras A y B se observa un número mayor de esporas. (→) esporas ligeramente teñidas. Aumento 100 X.



**Figura 8. Identificación de esporas de microsporidios en heces de conejo, tinción Gram-Cromotropo**



**Figura 8.** Identificación de esporas por Tinción Gram-Cromotropo. (→) esporas. A) muestra de machos, B) muestra de hembras, C) animales en reproducción. Se observa el filamento polar en la parte media (cinturón) característica de Microsporidios. Aumento 100 X

Resultados de la identificación de todas las muestras (70) se muestran en el Cuadro 8.

Las muestras se consideraron positivas cuando se observaron esporas en los frotis, la cuantificación fue de acuerdo a una escala de cruces (+)

+ = 1 espora por campo

++ = 2 a 3 esporas por campo

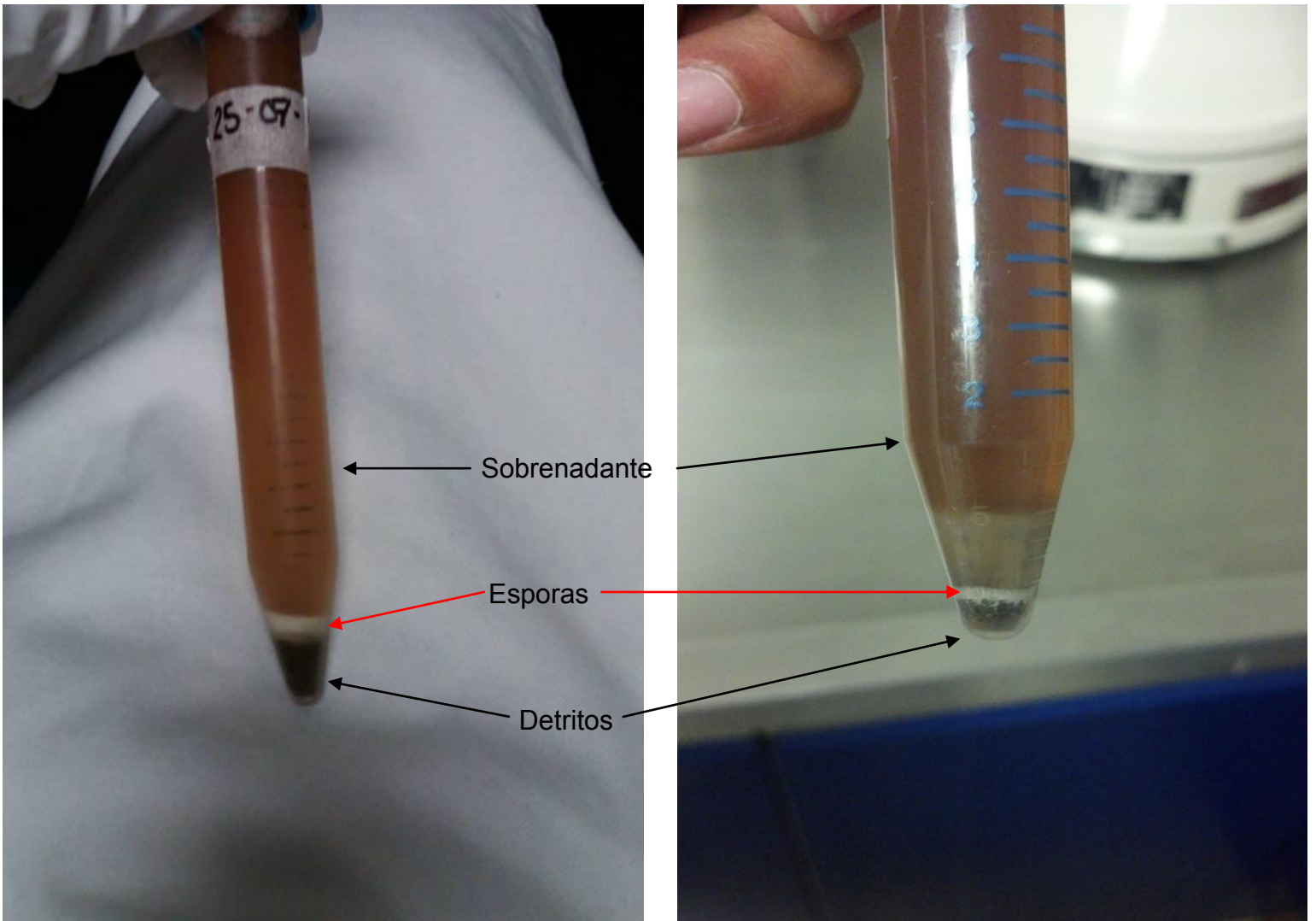
+++ = más de 4 esporas por campo

**Cuadro 8. Muestras positivas con tinciones Ziehl-Neelsen y Gram-Cromotropo**

Muestras de heces	Número muestras	Tinción		
		Ziehl-Neelsen	Gram-Cromotropo	Escala de medición (+)
Machos	10	Positivo	Positivo	+++
Hembras recién paridas	10	Positivo	Positivo	+++
Reproducción (machos y hembras)	50	Positivo	Positivo	++

**Cuadro 8.** Identificación de esporas con tinción de Ziehl-Neelsen y Gram-Cromotropo procedentes de heces de conejos. El 100% de las muestras fueron positivas.

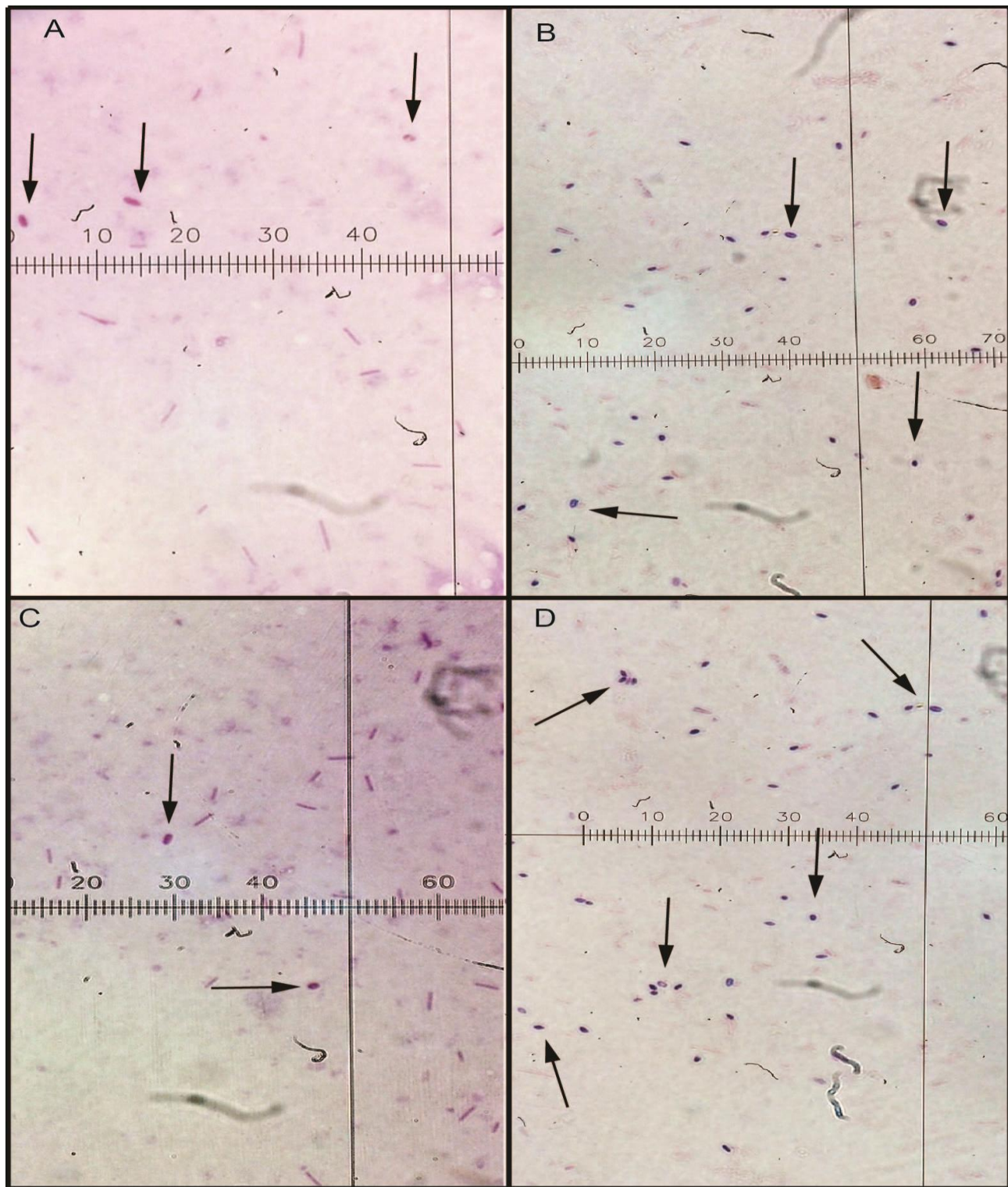
Posteriormente se eligieron las muestras con mayor número de esporas (machos y hembras) para su concentración y purificación (**Figura 9**). En la figura se muestran 3 faces: una de color café que corresponde al sobrenadante; otra intermedia de color claro (blanco) que corresponde a las esporas y una última (inferior) oscura que corresponde a los detritos. En la figura 10 y 11, se muestra una comparativa de las esporas antes y después de concentrar.



**Figura 9.** Concentración y purificación de esporas: esporas concentradas (→).

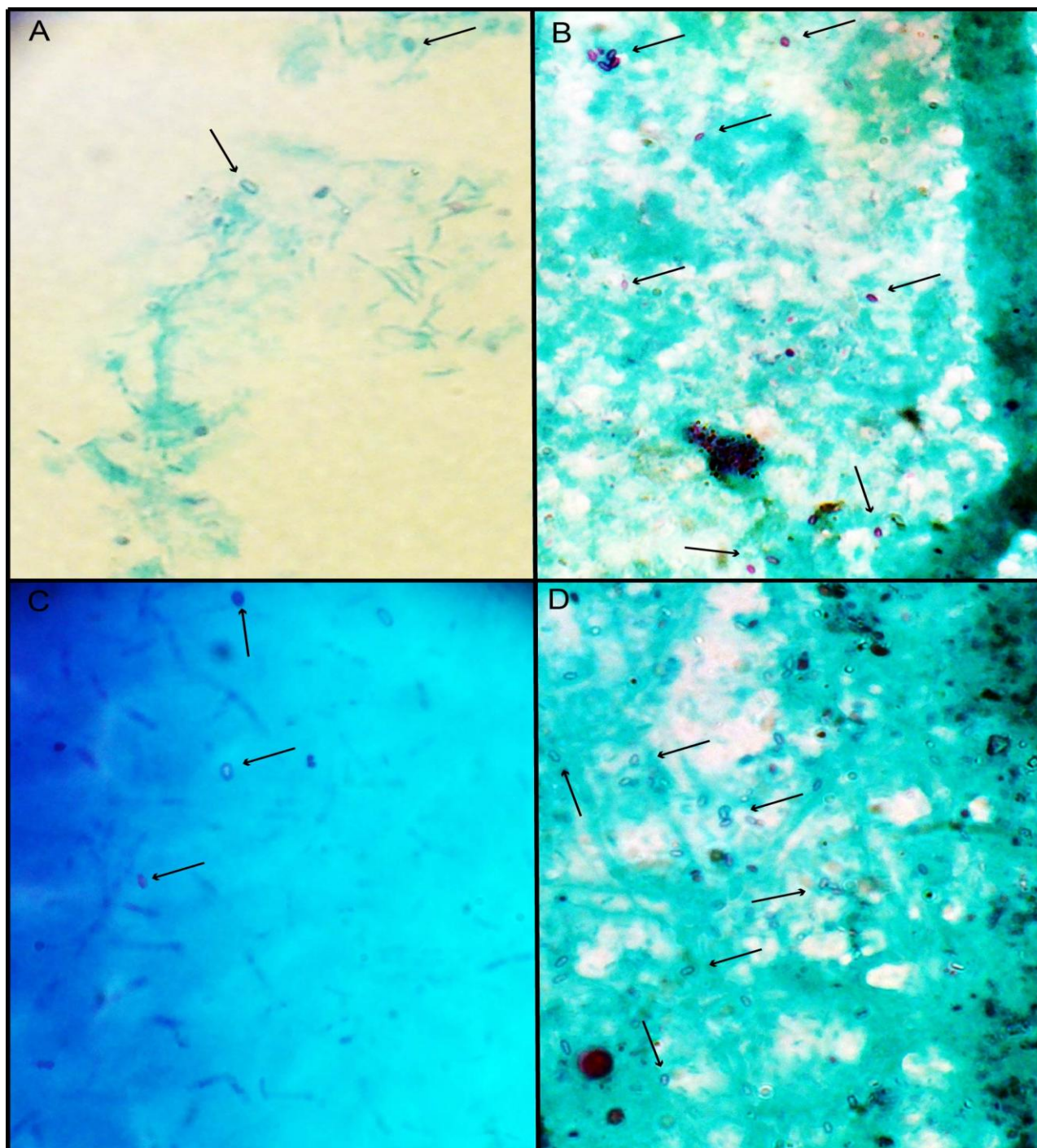


**Figura 10. Muestra de heces de conejo antes y después de la concentración de esporas, tinción Gram-Cromotropo.**



**Figura 10. Muestras de machos A) sin concentrar, B) concentradas. Muestras de hembras C) sin concentrar, D) concentradas. (→) esporas. Tinción Gram-Cromotropo. Aumento 100X.**

**Figura 11. Muestra de heces de conejo antes y después de la concentración de esporas, tinción Ziehl-Neelsen.**

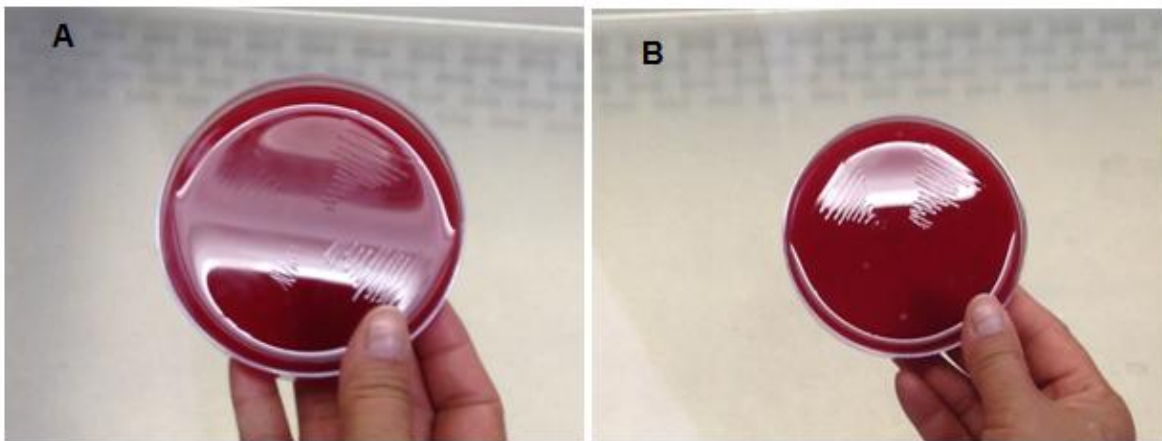


**Figura 11. Muestras de machos A) sin concentrar, B) concentradas. Muestras de hembras C) sin concentrar, D) concentradas. (→) esporas. Tinción Ziehl-Neelsen. Aumento 100x**



La axenización de las muestras de machos y hembras resultó satisfactoria, ya que no hubo crecimiento bacteriano ni por hongos en el medio de Gelosa Sangre (Figura 12). Es importante destacar que este paso fue de suma importancia ya que para la inoculación de las esporas a los cultivos celulares era primordial.

**Figura 12. Cajas con medio Gelosa Sangre sembradas con muestras de esporas axenizadas.**

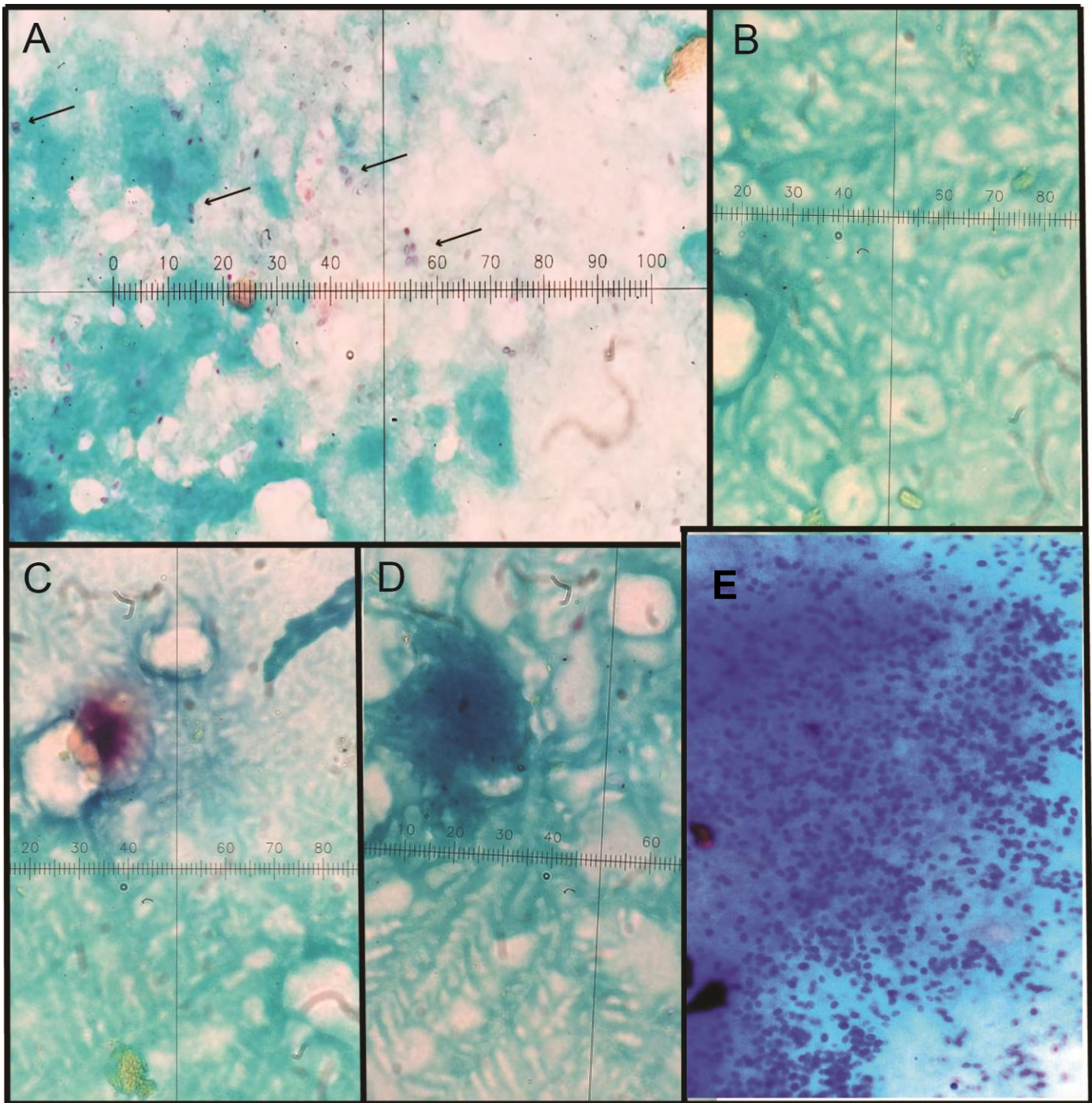


**Figura 12.** Cajas con medio Base Gelosa Sangre sembradas con muestras de esporas axenizadas. A) muestra de esporas de machos, B) muestra de esporas de hembras.

Posterior a la axenización se realizó la inducción de la germinación de las esporas con cambios de pH (ácido pH 2, básico pH 7.5), simulando las condiciones a las cuales son expuestas al ser ingeridas por un hospedero, pasando por el estómago a un pH ácido (pH 2) y al duodeno con un pH básico (pH 7.5). Ambas muestras machos y hembras fueron activadas para su germinación de esta manera, e inmediatamente inoculadas a los cultivos de células Vero logrando completar la germinación e infección.

Se logro establecer el cultivo *in vitro* de dos aislados de microsporidios en células Vero; uno procedente de conejos machos, logrando cosechar las esporas en el sobrenadante de los cultivos celulares a los 27 días posinoculación, esto fue verificado con 3 técnicas diferentes de tinción: Ziehl-Neelsen, Gram-Cromotropo y Blanco de Calcoflúor. Con Ziehl-Neelsen (Figura 13) se observa el inoculo, durante los tiempos 7, 14, y 21 días posinoculación no se observaron estructuras en los sobrenadantes, pero al día 27 posinoculación se observaron grandes cantidades de esporas teñidas intensamente. Con la tinción Gram-Cromotropo (Figura 14) de igual manera se observa el inoculo, durante los tiempos 7, 14, y 21 días posinoculación no se observaron estructuras en los sobrenadantes de los cultivos celulares pero a los 27 días posinoculación se observaron cúmulos de esporas teñidas de color violeta. Con la tinción de Blanco de Calcoflúor (Figura 15) se observó el mismo patrón que con las dos tinciones anteriores, en los tiempos 7, 14 y 21 días posinoculación no se observaron esporas y solo se veían los campos en color negro, pero a los 27 días posinoculación se evidenciaron cúmulos de esporas de color azul turquesa sobre un fondo negro.

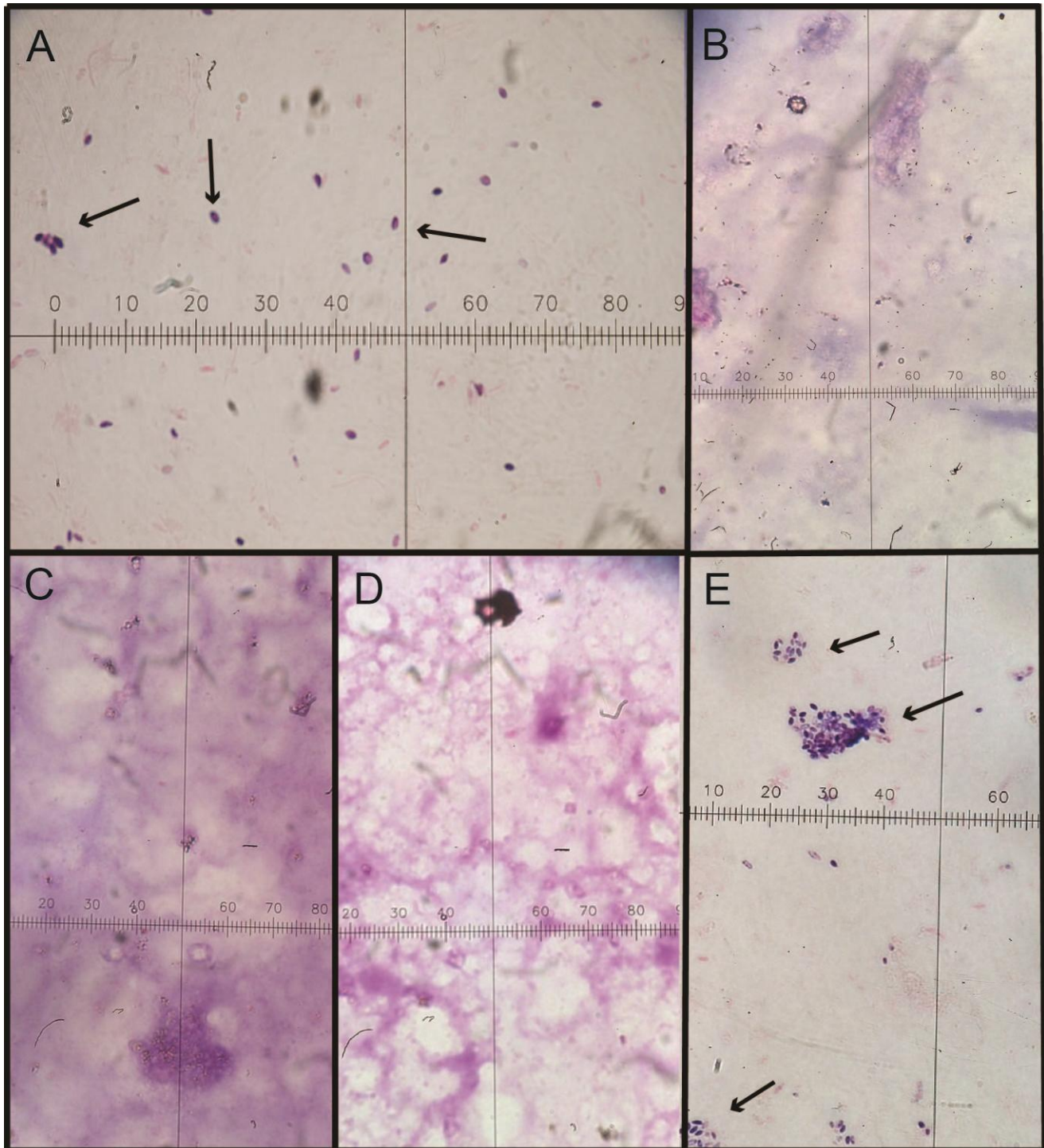
**Figura 13. Tinción Ziehl-Neelsen: esporas de conejos machos obtenidas en los sobrenadantes de los cultivos de células Vero.**



**Figura 13.** Muestra de machos, esporas (→): A) Inoculo, sobrenadantes obtenidos del cultivo celular B) 7, C) 14 y D) 21 días posinoculación no se observaron esporas a estos tiempos. E) 27 días posinoculación se observaron esporas teñidas de color rosa/azul en grandes cantidades. Tinción Ziehl-Neelsen. A-D colorante contraste verde brillante. E) colorante contraste Azul de metileno. Aumento 100X

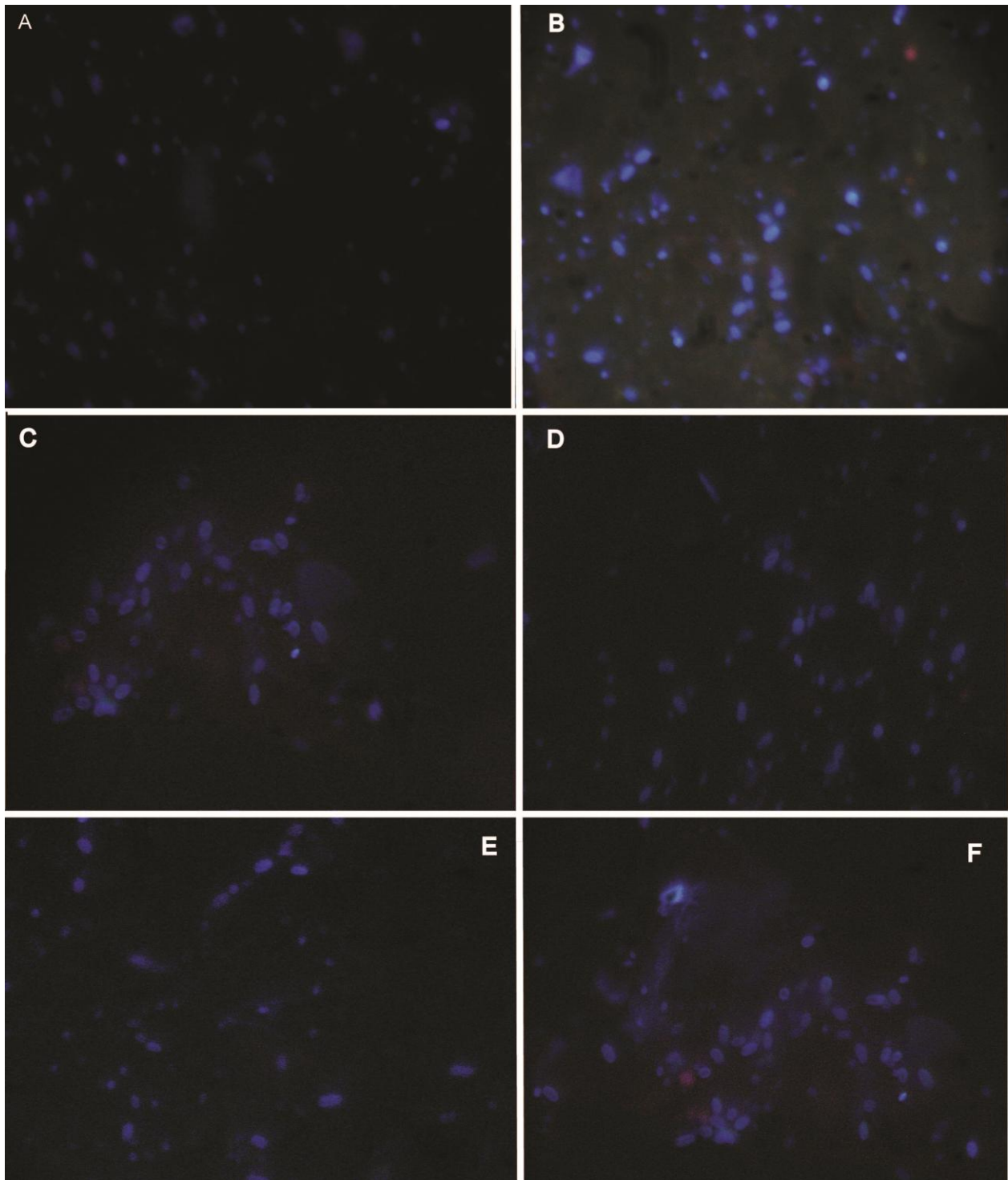


**Figura 14. Tinción Gram-Cromotrope: esporas de conejos machos obtenidas en los sobrenadantes de los cultivos de células Vero**



**Figura 14.** Muestra de machos, esporas (→): A) Inoculo, sobrenadantes obtenidos del cultivo celular B) 7, C) 14 y D) 21 días posinoculación no se observaron esporas a estos tiempos. E) 27 días posinoculación se observaron esporas teñidas de color violeta/morado en mayor número formando cúmulos o conglomerados. Tinción Gram-Cromotrope. Aumento 100X.

**Figura 15. Tinción Blanco de Calcoflúor: esporas de conejos machos obtenidas en los sobrenadantes de los cultivos de células Vero**



**Figura 15.** Muestra de machos. A) Esporas después de retirar el inoculo (esporas teñidas de azul fluorescente). B), C) y D), E) y F) corresponden a los 27 días posinoculación en donde se observan las esporas tenidas de azul rey. No se muestran imágenes de los tiempos 7, 14, 21 días posinoculación ya que no se encontraron estructuras (esporas) y solo se veía el fondo negro. Tinción Blanco de Calcofluor. Microscopio de Fluorescencia (luz UV) OLYMPUS. Aumento 100X.

El segundo cultivo establecido procedente de la muestra de conejos hembras, las esporas se obtuvieron en los sobrenadantes de los cultivos a los 45 días posinoculación.

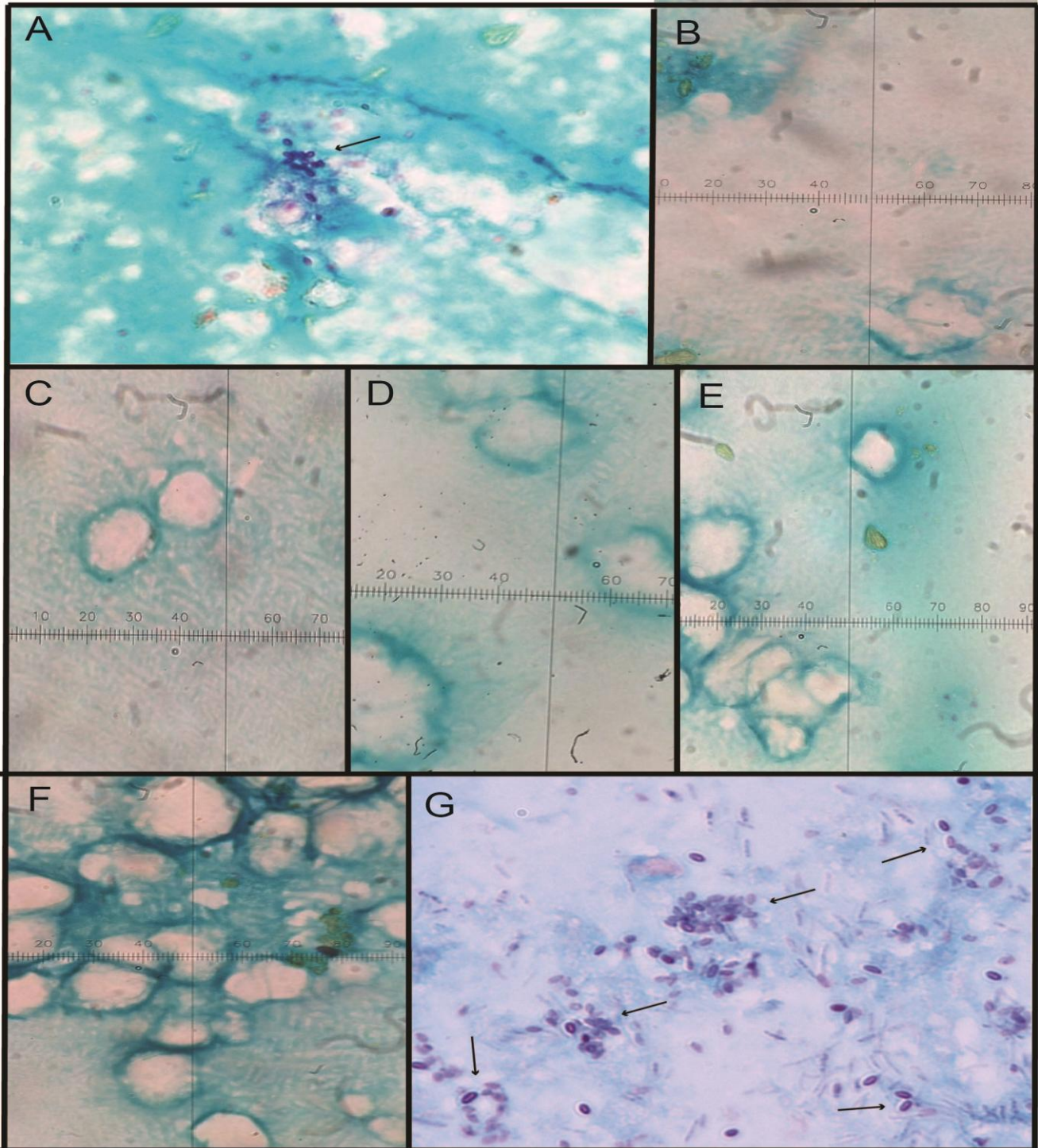
Con la tinción Ziehl-Neelsen (Figura 16) se observan las esporas del inóculo, a los 7, 14, 21, 28 y 35 días posinoculación no se observaron esporas, pero hasta el día 45 posinoculación se observaron grandes cantidades de esporas teñidas intensamente de color rosa. Con la tinción Gram-Cromotopo (Figura 17) se observa que durante los días 7, 14, 21, 28 y 35 posinoculación no se observaron esporas en los sobrenadantes de los cultivos celulares sino hasta el día 45 posinoculación se observaron grupos de esporas teñidas de color violeta. Con la tinción de Blanco de Calcoflúor (Figura 18) se conserva el mismo patrón que con las tinciones anteriores, se observan las esporas del inóculo, durante los 7, 14, 21, 28 y 35 días posinoculación no se observaron esporas, pero a los 45 días posinoculación se evidenciaron conjuntos de esporas de color azul fluorescente sobre un fondo negro.

En la Figura 19 se muestran un comparativo de las tres técnicas de tinción utilizadas para evidenciar las esporas, para la muestra de machos en donde se obtuvieron las esporas en los sobrenadantes del cultivo celular a los 27 días posinoculación, tiempo en el cual se obtuvo la máxima cantidad de esporas, observándose un patrón en forma de agregados. Es importante destacar que con la tinción Gram-Cromotopo fue posible ver el filamento polar en la parte media de la espora intensamente teñido (como un cinturón) como se describe en la literatura (Botero *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2010) observándose un patrón de organización en forma de rosetas.

En la Figura 20 también se muestra un comparativo de las tres tinciones utilizadas para evidenciar las esporas de la muestra de hembras obtenidas de los sobrenadantes del cultivo celular a los 45 días posinoculación, de igual manera mostraron un patrón de organización en forma de rosetas como los encontrados en la muestra de machos (Del Águila *et al.*, 2001).

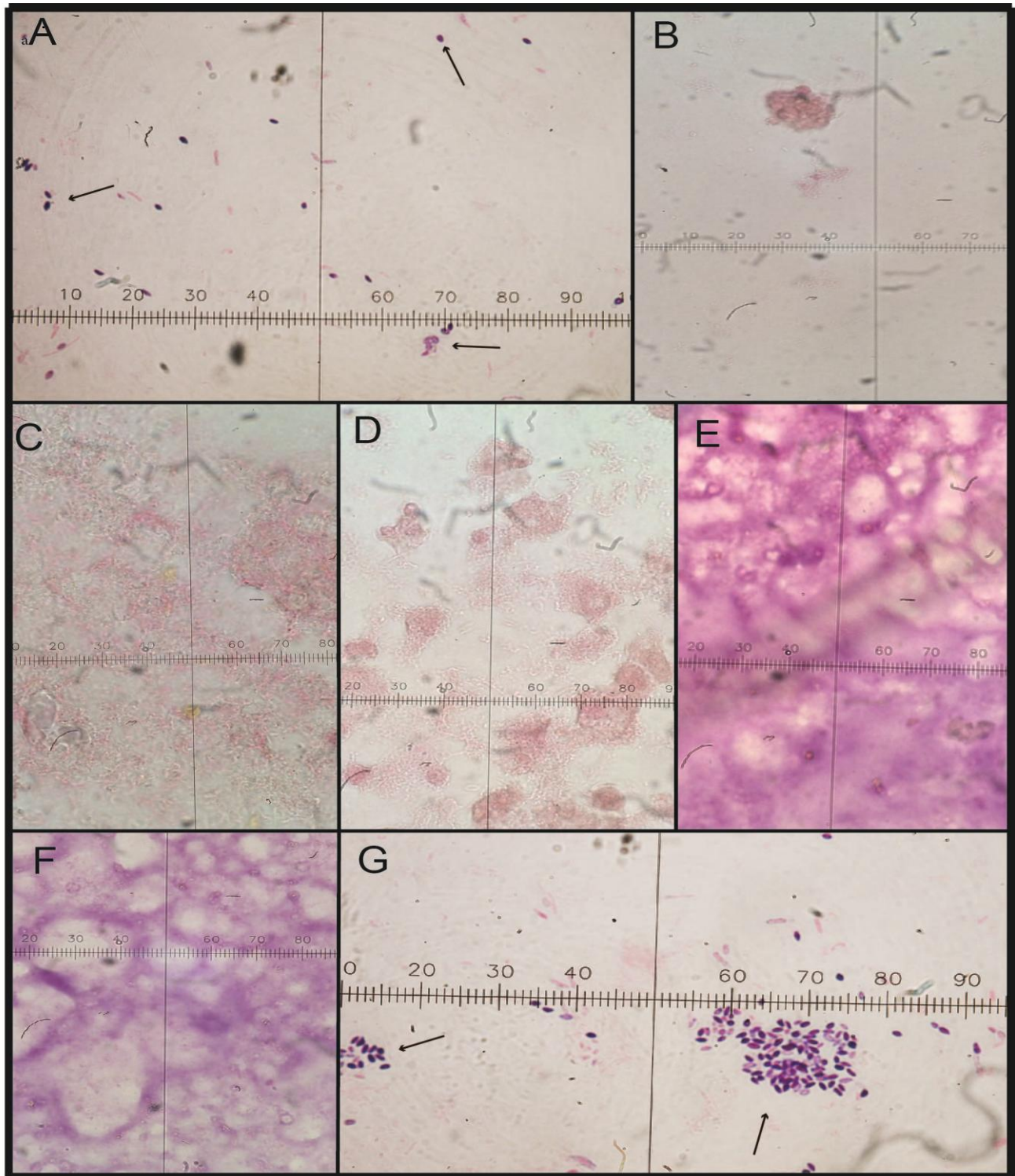


**Figura 16. Tinción Ziehl-Neelsen: esporas de conejos hembras obtenidas en los sobrenadantes de los cultivos de células Vero**



**Figura 16.** Muestra de hembras. A) Inoculo esporas (→), sobrenadantes obtenidos del cultivo celular B) 7, C) 14, D) 21, E) 28 y F) 35 días posinoculación no se observaron esporas a estos tiempos. G) 45 días posinoculación se observaron esporas teñidas de color rosa en grandes cantidades. Tinción Ziehl-Neelsen. A-F colorante contraste verde brillante. G) colorante contraste Azul de metileno. Aumento 100X.

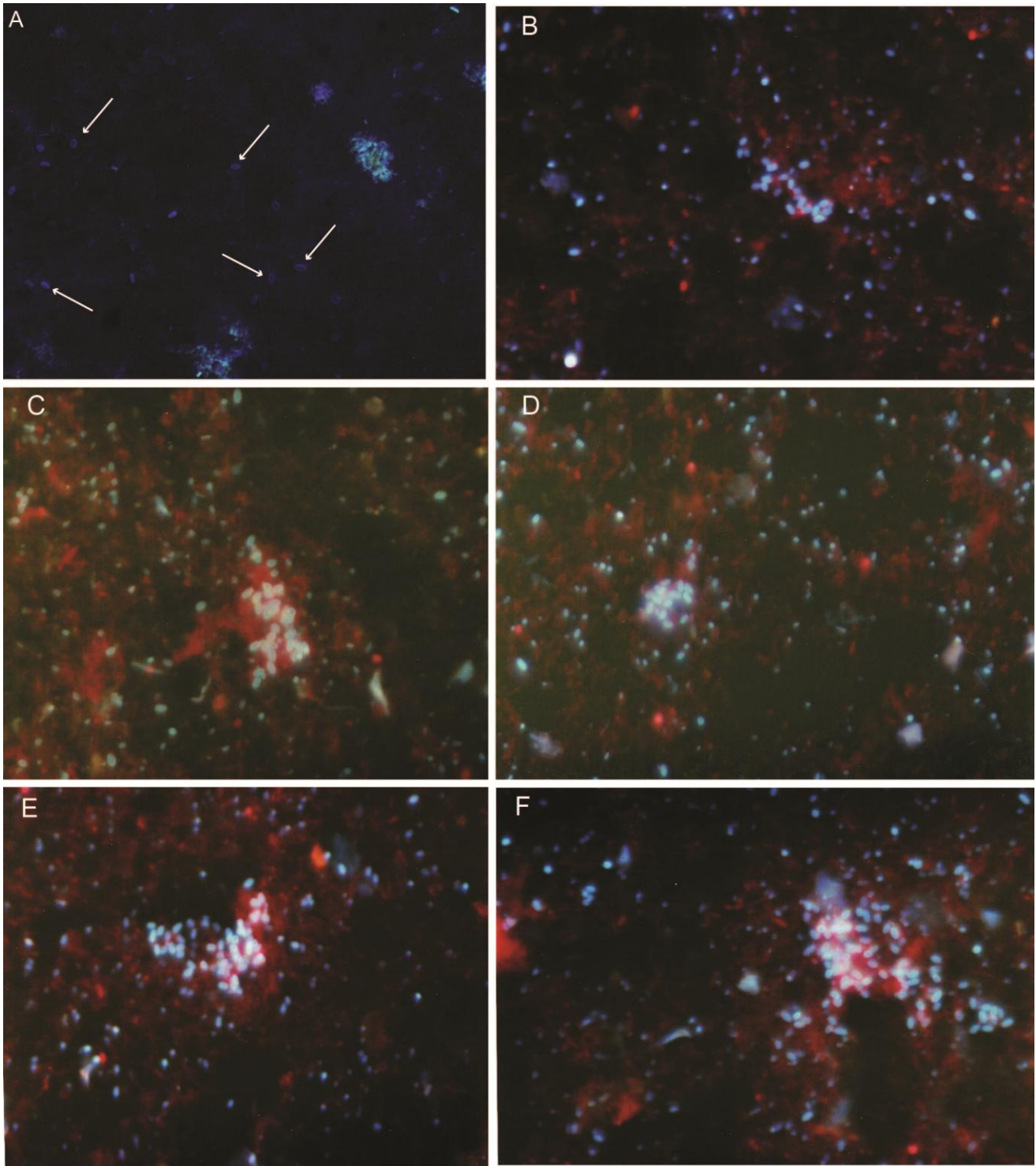
**Figura 17. Tinción Gram-Cromotropo: esporas de conejos hembras obtenidas en los sobrenadantes de los cultivos de células Vero**



**Figura 17.** Muestra de hembras. A) Inoculo esporas (→), sobrenadantes obtenidos del cultivo celular B) 7, C) 14, D) 21, E) 28 y F) 35 días posinoculación no se observaron esporas a estos tiempos. G) 45 días posinoculación, se observaron esporas teñidas de color violeta en mayor cantidad. Tinción Gram-Cromotropo. Aumento 100X.

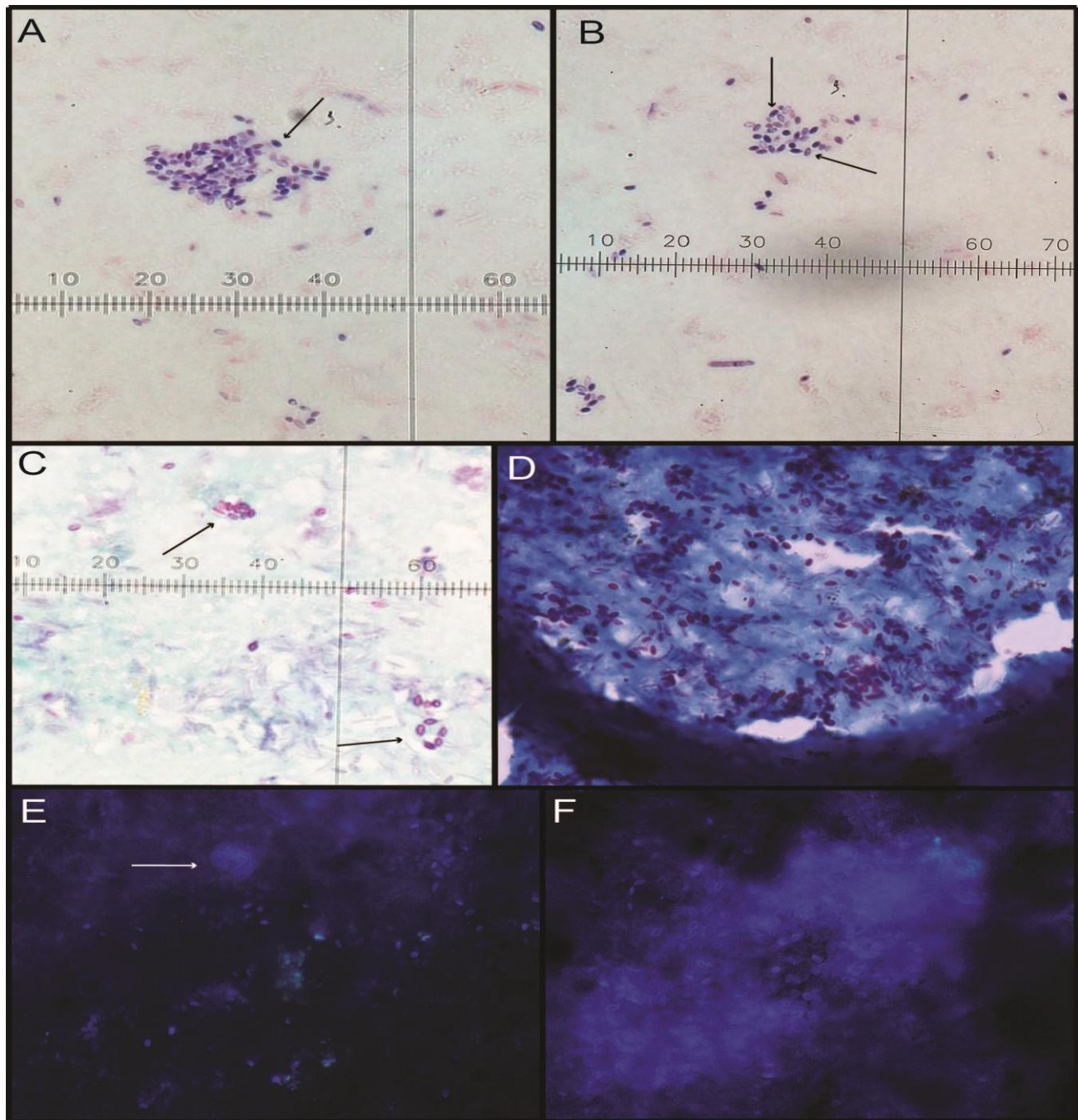


**Figura 18. Tinción Blanco de Calcoflúor: esporas de conejos hembras obtenidas en los sobrenadantes de los cultivos de células Vero**



**Figura 18.** Muestra de hembras. A) Inoculo (las flechas señalan algunas esporas, se observan teñidas de un azul fluorescente). B, C), D), E) y F) Esporas obtenidas 45 días posinoculación (se conservan cúmulos o agregados de esporas). Tinción Blanco de Calcoflúor. Microscopio de Fluorescencia (luz UV) OLYMPUS. Aumento 100X.

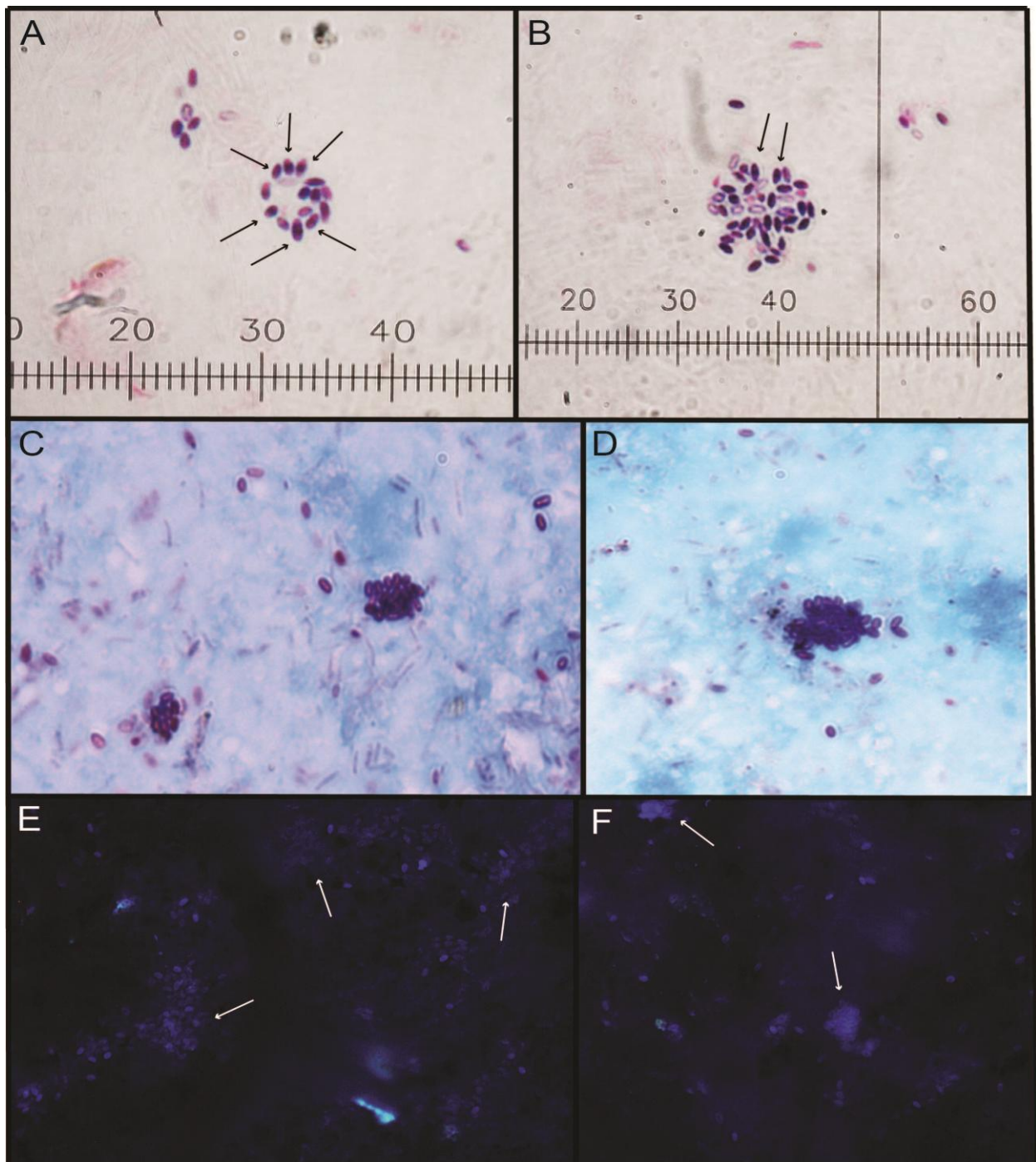
**Figura 19. Comparación de tres tinciones: Ziehl-Neelsen, Gram-Cromotropo y Blanco de Calcoflúor de esporas de conejos machos obtenidas del sobrenadante de los cultivos celulares a los 27 días posinoculación.**



**Figura 19. Muestras de machos. Comparación de las 3 tinciones utilizadas, tiempo de cultivo 27 días posinoculación. A y B) Tinción de Gram-Cromotropo, se conserva el patrón de cúmulos (las flechas señalan esporas donde se ve el filamento polar como una línea transversal en la espora). C y D) Esporas teñidas con la tinción de Ziehl-Neelsen, (las flechas señalan esporas que se observan en cúmulos o agregados). E, F) Se observan esporas teñidas con la técnica de Blanco de Calcoflúor (las flechas señalan cúmulos de esporas). F) Se observa una gran cantidad de esporas en un gran cumulo. Aumento 100X.**



**Figura 20. Comparación de tres tinciones: Ziehl-Neelsen, Gram-Cromotropo y Blanco de Calcoflúor de esporas de conejos hembras obtenidas del sobrenadante de los cultivos celulares a los 45 días posinoculación.**



**Figura 20.** Muestras de hembras. Comparación de las 3 tinciones utilizadas. Esporas obtenidas a los 45 días posinoculación. A y B) Tinción de Gram-Cromotropo (las flechas señalan esporas donde se ve el filamento polar como una línea transversal además de conservar el patrón de agregados o cúmulos). C y D) Esporas teñidas con la técnica de Ziehl-Neelsen (las esporas se observan en cúmulos). E y F) Esporas teñidas con la técnica de Blanco de Calcoflúor (las flechas señalan cúmulos de esporas). Aumento 100X.

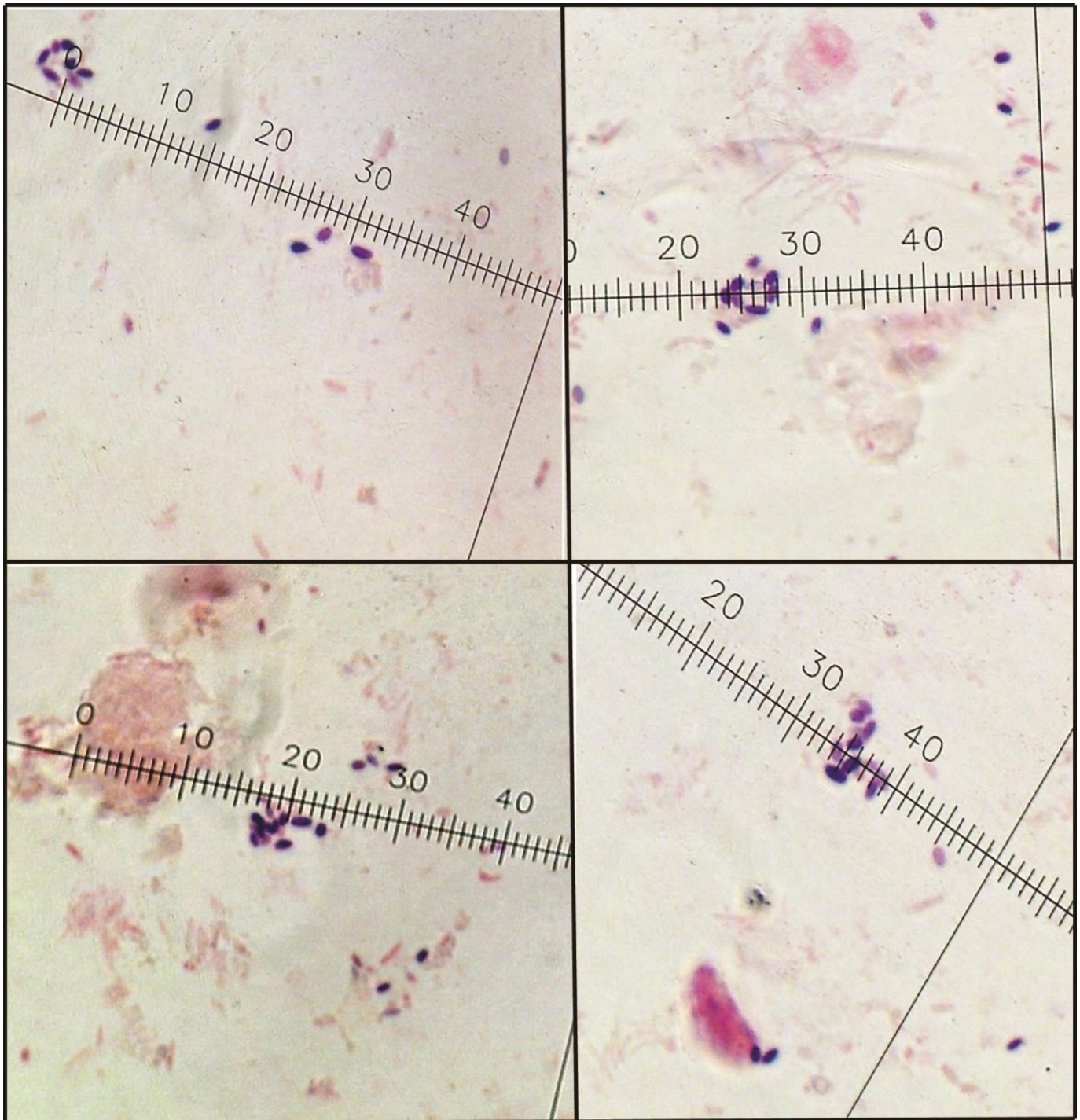
Posteriormente se realizó la medición de 300 esporas (al azar) cosechadas en los tiempos 27 y 45 días posinoculación de las muestras de machos y hembras respectivamente (Cuadro 9) (Figura 21). Las esporas presentaron varios tamaños, el tamaño menos frecuente encontrado fue el de 1.0 a 1.5  $\mu\text{m}$  de largo por 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho, en contraste el más abundante fue el de 2.0 a 2.5  $\mu\text{m}$  de largo por 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho en ambos cultivos, dando un porcentaje del 63 % en machos y 57% en hembras.

**Cuadro 9.** Medidas de esporas cosechadas en sobrenadantes de cultivos de células Vero

Tamaño de espora Largo X Ancho $\mu\text{m}$	Machos		Hembras	
	Número de esporas	Porcentaje (%)	Número de esporas	Porcentaje (%)
1.0 a 1.4 x 1.0	16	5.33	21	7
1.5 a 1.9 x 1.0	22	7.33	57	19
2.0 a 2.5 x 1.0	189	63	171	57
2.6 a 3.0 x 1.0	73	24.33	51	17
Total de esporas	300	100	300	100

Medidas de 300 esporas cosechadas de los sobrenadantes de los cultivos inoculados con esporas de machos y hembras: Las esporas provenientes de machos se cosecharon a los 27 días y de hembras a los 45 días posinfección.

**Figura 21. Tamaño de esporas obtenidas de los sobrenadantes de los cultivo in vitro en células VERO**



**Figura 21.** Esporas obtenidas de los sobrenadantes de los cultivo *in vitro*, se observa que el tamaño que presentaron fue de aproximadamente 2.0  $\mu\text{m}$  de largo por 1  $\mu\text{m}$  de ancho. Tinción Gram-Chromothropo. Aumento 100x



## 7. Discusión

La prevalencia de *E. cuniculi* registrada a nivel mundial en conejos de explotaciones, bioterios y mascotas es del 5 al 70 % (Merino *et al.*, 1990; Marchant *et al.*, 2007), en contraste la prevalencia encontrada en este trabajo fue del 100% en muestras de conejos (heces) asintomáticos, siendo mayor a la reportada, se encontraron esporas en todas las muestras examinadas. La alta prevalencia encontrada puede ser una consecuencia de la reclusión y hacinamiento de los conejos, debido a que están en contacto cercano y expuestos directamente con sus desechos como orina y heces, habiendo una mayor probabilidad de infectarse entre sí (Greene, 2006).

Es importante destacar que los conejos que se encuentran en la FES Cuautitlán se utilizan para las prácticas de algunas materias de las carreras impartidas en ese lugar, asimismo se encuentran a la venta al público para consumo humano y como mascotas, esto representa un importante riesgo de exposición, principalmente para aquellas personas que tienen un contacto directo con la cría de conejos y el manejo de sus desechos (heces, orina), ya que los animales infectados eliminan las esporas en la orina y heces.

El diagnóstico de las microsporidiosis resulta difícil y complicado ya que se basa principalmente en la observación de las esporas extremadamente pequeñas (1.0 a 4.0  $\mu\text{m}$  de largo por 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho) (Franzen *et al.*, 1999), difícilmente son observadas sin la ayuda de algún tipo de tinción o técnicas de microscopía estándar, el examen ultraestructural mediante microscopía electrónica es efectivo pero frecuentemente no está disponible en cualquier laboratorio de diagnóstico, además de ser una técnica costosa y requiere de personal especializado. Una alternativa a este problema, es el uso de técnicas de tinción para evidenciar las esporas en muestras biológicas, biopsias, preparaciones citológicas, muestras fecales y de orina.

En el presente trabajo se utilizaron 3 diferentes técnicas de tinción para la identificación de las esporas, se realizó la comparación de estas tres tinciones

para saber cual presentaba mejores resultados, dichas técnicas de tinción están al alcance de cualquier laboratorio ya que son sencillas y de bajo costo. La mayoría de la bibliografía recomienda las tinciones de Gram-Cromotropo y aquellas que utilicen algún colorante fluorescente, siendo el Blanco de Calcofluor el más utilizado (Bornay *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2010; Noda *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos con la tinción de Gram-Cromotropo en muestras de heces de conejos y sobrenadantes de los cultivos de células VERO fueron óptimos para teñir e identificar con más facilidad las esporas de microsporidios ya que permitió observar el filamento polar y dos polos en los extremos de las esporas (correspondientes a la vacuola posterior y al disco de anclaje), características exclusivas de microsporidios (Bornay *et al.*, 2000; Botero *et al.*, 2002; Botero *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2010).

Con lo que respecta a la tinción con Blanco de Calcofluor se utilizo el Flustain I, como colorante fluorescente el cual se unió a la quitina de la exospora y facilitó la identificación de las esporas presentes en heces de conejos y sobrenadantes de los cultivos de células VERO, tiñéndolas de un color azul rey intenso que resaltaron sobre un fondo negro correspondiente al colorante de contraste (Azul de Evans). A diferencia de la tinción de Gram-Cromotropo únicamente se puede observar la forma y tamaño pero ninguna parte interna de las esporas (Monheit, *et al.*, 1984; García, *et al.*, 2001).

Por último las esporas teñidas con la tinción de Ziehl-Neelsen se observaron de color rosa sobre un fondo verde o azul dependiendo del colorante de contraste utilizado, sin embargo esta tinción a comparación de las dos anteriores fue menos eficaz para la identificación de esporas de microsporidios ya que en algunas ocasiones las esporas no se tiñeron (Figura 7), esto quizá debido a su estado de madurez o a la viabilidad de las esporas, es decir que únicamente se encontraba la espora vacía, en la literatura no se reporta nada al respecto del por qué algunas esporas no se tiñen.

Por otro lado, se ha descrito la obtención de varios aislados de *E. cuniculi* y su cultivo *In vitro* a partir de muestras clínicas de pacientes generalmente inmunocomprometidos (con SIDA) entre las que se incluyen orina, esputo y lavado

bronqueo alveolar (De Groote *et al.*, 1995; Hollister *et al.*, 1995; Rossi, 1998; Del Aguila *et al.*, 2001) pero no se ha reportado ningún aislado y/o cultivo obtenido a partir de heces de humanos ni de animales inmunocompetentes, es importante resaltar que en este trabajo las heces se obtuvieron de conejos aparentemente sanos y sin ningún signo clínico, las esporas obtenidas de estas muestras fueron capaces de infectar células en cultivo.

El tiempo en que se cosecharon las esporas en los sobrenadantes de los cultivos celulares: en la muestra de machos correspondió a los 27 días posinoculación (Figura 13, 14 y 15) y para la muestra de hembras a los 45 días posinoculación (Figura 16, 17 y 18), cosechando grandes cantidades de esporas, presentando una forma oval y un tamaño de 1.5 a 2.5  $\mu\text{m}$  de largo X 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho en ambos casos, los tiempos de obtención de esporas en los sobrenadantes de los cultivos celulares reportados por diversos autores (4 a 6 semanas posinoculación) concuerdan con los obtenidos en este trabajo (De Groote *et al.*, 1995; Mathis *et al.*, 1996; Del Águila *et al.*, 2001, Joseph-Sharma, 2009). Es importante resaltar que las esporas cosechadas a los 27 días (machos) y 45 días (hembras) posinoculación presentaron un patrón de organización en forma de rosetas (Imagen 19 y 20) como lo muestran Del Águila y colaboradores (2001) en cultivos de *E. cuniculi*.

El resultado de la medición de 300 esporas obtenidas de los sobrenadantes de los cultivos celulares de las muestras de machos (27 días posinoculación) y hembras (45 días posinoculación) (Cuadro 9) mostraron que el tamaño de las esporas más frecuente fue de 2.0 a 2.5  $\mu\text{m}$  de largo por 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho, estos tamaños concuerdan con lo reportado en donde se menciona que las esporas de *E. cuniculi* son morfológicamente ovaladas, y con un tamaño que van de 1.0 a 3.0  $\mu\text{m}$  de ancho X 1.5 a 4.0  $\mu\text{m}$  de largo (Botero *et al.*, 2002; Yazar *et al.*, 2013).

Debido a que *E. cuniculi* es la especie de microsporidio que más comúnmente se encuentra en conejos (Didier *et al.*, 200), en el presente trabajo consideramos que el cultivo obtenido es de esta especie, sin embargo, se debe de realizar una PCR o algún otro método de diagnóstico para identificar la especie.



## 8. Conclusiones

- Se encontró una prevalencia del 100% de microsporidios en las muestras de heces de conejos machos y hembras aparentemente sanos (sin signos de enfermedad) obtenidas de la FES Cuautitlán, UNAM.
- Se logró la identificación de esporas en todas las muestras de conejos por medio de las tres técnicas de tinción utilizadas: Gram-Cromotropo, Blanco de Calcoflúor y Ziehl-Neelsen. La tinción de Gram-Cromotropo fue la mejor técnica para teñir las esporas, evidenciando la forma oval, el tamaño, el filamento polar como un cinturón en la parte media intensamente teñido, la vacuola posterior y el disco de anclaje en los polos de la espora característicos de microsporidios, esta tinción es altamente recomendada en la literatura para la tinción de esporas de microsporidios.
- Con la técnica de tinción de Blanco de Calcoflúor también se pudieron identificar claramente las esporas de microsporidios de las muestras de conejo machos y hembras, observándose únicamente la forma y tamaño ya que es una tinción fluorescente y sólo se puede observar el contorno muy brillante.
- La tinción de Ziehl-Neelsen permitió observar algunas características morfológicas como la forma, tamaño y los dos polos en los extremos correspondientes a la vacuola posterior y el disco de anclaje pero no permitió evidenciar el filamento polar, en comparación con las otras dos técnicas de tinción utilizadas en algunas ocasiones no logro teñir a las esporas, observándose traslucidas (como fantasmas).
- Se logro implementar un método eficaz de concentración de esporas a partir de materia fecal.
- La utilización de una solución de antibióticos para la axenización de las esporas fue óptima ya que los cultivos no presentaron contaminación de ningún tipo.
- La inducción de la germinación de las esporas por cambios de pH acido-base fue exitosa, ya que las esporas lograron infectar los cultivos celulares.

- Se logro obtener dos aislados de microsporidios autóctonos de México.
- Se logro establecer el cultivo *in vitro* de dos aislados de esporas de microsporidios: 1) machos a los 27 días posinoculación y 2) hembras a los 45 días posinoculación.
- El tamaño promedio encontrado en las esporas fue de 1.5 a 2.5  $\mu\text{m}$  de largo X 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho, que corresponden a lo reportado para *E. cuniculi*.
- La utilización del cultivo *in vitro* de células VERO resulto adecuado para el cultivo de esporas de microsporidios. Esta línea celular no había sido utilizada para tal fin.
- En este trabajo se reportan los primeros aislados (esporas) de microsporidios obtenidos de heces de conejos inmunocompetentes y su cultivo *in vitro* en células VERO.
- *Encephalitozoon cuniculi* es la especie de microsporidio que más comúnmente se encuentra en conejos, por lo que los aislados obtenidos en este trabajo pueden pertenecer a esta especie.

## 9. Perspectivas

La caracterización molecular de los aislados obtenidos de heces de conejos machos y hembras para determinar la especie y genotipo al que pertenecen, esto nos permitirá compararlo con otros aislados ya establecidos a nivel mundial.

El establecimiento de los dos aislados en la línea celular VERO ayudara en el conocimiento de la biología de esta parasito: mecanismos de patogenicidad, tiempo de multiplicación y cinéticas de infección, a partir de los cuales se puedan desarrollar herramientas que nos permitan la estandarización de técnicas diagnósticas y moleculares, así como la búsqueda de tratamientos alternativos eficaces ya que actualmente no se cuenta con un tratamiento optimo contra esta parasitosis. Además de conocer la prevalencia existente en la población mexicana, en animales de granja y de compañía, y establecer los riesgos de infección para las diferentes poblaciones susceptibles a esta parasitosis.

## 10. Apéndice

### Preparación de reactivos y soluciones

#### 1) Medio para cultivo DMEM para el cultivo de células Vero

Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 10.0 g Lote. 1214393 Gibco Invitrogen Corporation, bajo en glucosa con L-glutamina, 110 mg de piruvato de sodio, hidroxiclorigido de piridoxina y sin bicarbonato de sodio.

En un matraz aforado se colocaron 800 mL de agua destilada, se agregó el contenido del sobre (medio DMEM 10 g) y se agregaron 3.7 g de Bicarbonato de Sodio, se agitó hasta lograr una mezcla homogénea, después se aforó a 1.0 L. Posteriormente se esterilizó por filtración con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ , el medio ya filtrado se almacenó en el refrigeración (4°C) hasta su uso.

#### 2) Buffer TES (Tris 300 mM, EDTA 100 mM, SDS 1%)

Reactivo	Cantidad
Tris 300 mM	3.63 g
EDTA 100 mM	11.16 g
SDS 1%	
H <sub>2</sub> O	100 mL

En un matraz colocamos 80 mL de agua destilada, se fueron agregando cada uno de los reactivos y se agitó hasta obtener una mezcla homogénea, posteriormente se aforó hasta 100 mL.

### 3) Solución de Tripsina

Preparación para distintas cantidades dependiendo del volumen que se requiera.

Reactivos		Cantidad	
Tripsina (polvo)	0.05 g	0.15 g	0.250 g
NaCl (137 mM)	0.8 g	2.4 g	4.0 g
KCl (5.3 mM)	0.04 g	0.12 g	0.2 g
Dextrosa (5mM)	0.09 g	0.27 g	0.45 g
NaHCO <sub>3</sub> (7mM)	0.074 g	0.222 g	0.37 g
EDTA (0.5 mM)	0.190 g	0.57 g	0.95 g
H <sub>2</sub> O destilada	100 mL	300 mL	500 mL

Pesar todos los reactivos excepto la tripsina la cual se pesa al último, agregar la cantidad de agua requerida, mezclar con mucho cuidado procurando no hacer burbujas. Posteriormente se esterilizó por filtración con membrana de 0.22 µm, la solución ya filtrada se almacenó en alícuotas en frascos de 20 mL en congelación (- 20°C) hasta su uso.

#### 4) Amortiguador de Fosfato Salino (PBS)

Cantidades a utilizar dependiendo de la concentración que se quiera preparar. Al final ajustar a pH 7.4

Reactivos	Cantidad		
	1 x	10 x	10 x
NaCl (137 mM)	8.0 g	40 g	80 g
KCl (2.68 mM)	0.2 g	1.0 g	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (3.2 mM)	1.15 g	5.75 g	11.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2.0 mM)	0.25 g	1.25 g	2.5 g
H <sub>2</sub> O desionizada	100 mL	500 mL	1000 mL

En un matraz se agregó el 80% de volumen de agua desionizada de la cantidad deseada a preparar, se agregó uno a uno los reactivos y se agitó hasta disolverlos, se aforó con agua desionizada hasta obtener el volumen deseado y se ajustó el pH a 7.4, al finalizar se filtró con membrana de poro de 0.22 µm de diámetro.

## 5) Reactivos para tinción Gram-Cromotropo

### Solución de Cromotropo

Reactivo	Cantidad
Cromotropo 2RR	1.0 g
Fast Green	0.15 g
Ácido fosfotúngstico	0.25 g
Ácido acético glacial	3.0 mL
Agua destilada csp	100 mL

En un matraz se colocó 80 mL de agua destilada, se agregó cada reactivo, se agitó hasta obtener una mezcla homogénea, posteriormente se aforó a 100 mL y se filtró con papel filtro Watman No.1 y se almacenó hasta su uso.

### Solución alcohol-acido

Reactivo	Cantidad
Alcohol etílico 90%	995.5 mL
Ácido acético	4.5 mL

En un matraz se colocaron 995.5 mL de alcohol etílico al 90% y se le agregaron 4.5 mL de ácido acético y se guardó en un frasco bien sellado hasta su uso.

### Solución decolorante

Reactivo	Cantidad
Acetona	50 mL
Alcohol etílico 95%	50 mL

En un matraz se colocaron 50 mL de acetona y 50 mL de alcohol etílico y se guardó en un frasco bien sellado hasta su uso.

### Solución de Lugol

Reactivo	Cantidad
Cristales de yodo	0.33 g
Ioduro potásico	0.66 g
Agua desionizada	100 mL

En un matraz se colocaron 80 mL de agua desionizada y posteriormente 0.33 g de cristales de yodo y 0.66 g de ioduro potásico y agitamos hasta obtener una mezcla homogénea, al finalizar aforamos a 100 mL y se filtró con papel filtro Watman No.1 y se almacenó hasta su uso.



### Solución de cristal violeta

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Cristal violeta	0.5 g
Oxalato amónico	0.8 g
Metanol	20 mL
Agua desionizada	80 mL

En un matraz agregamos 80 mL de agua desionizada, 0.5 g de cristal violeta y 0.8 g de oxalato de amonaco, agitamos hasta obtener una mezcla homogénea y posteriormente agregamos 20 mL de metanol y se filtró con papel filtro Watman No.1 y se almacenó hasta su uso.

### 6) Reactivos para tinción Blanco de Calcoflúor

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Azul de Evans 0.5 %	8 mL
Fluostain 1%	1 mL
NaCl 5%	1 mL

Preparar al momento de utilizar.

En un matraz colocamos 8 mL de azul de Evans al 0.5 %, 1mL de Fluostain 1% y 1 mL de NaCl al 5 %, agitamos hasta obtener una mezcla homogénea y guardamos en un lugar oscuro

## 7) Reactivos para tinción Ziehl-Neelsen

### Solución madre de fucsina básica

Reactivo	Cantidad
Fucsina básica	5 g
Etanol 96%	100 mL

En un matraz colocamos 100 mL de etanol al 96% y 5 g de fucsina básica, agitar hasta disolver y obtener una mezcla homogénea y se guardo en un frasco ámbar protegido de la luz.

### De la solución madre de fucsina básica tomar

Reactivo	Cantidad
Solución madre de fucsina básica	10 mL
Fenol (cristales fundidos)	5 g
Agua destilada c.s.p.	100 mL

De la solución madre de fucsina tomamos 10 mL se coloco en un matraz, agregamos 5 g de fenol y posteriormente se aforamos a 100 mL con agua destilada y se filtró con papel filtro Watman No.1 y se almaceno hasta su uso.

### **Verde brillante 6%**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Verde brillante	6 g
Agua desionizada	100 mL

En un matraz agregamos 80 mL de agua desionizada y agregamos 6 g de verde brillante, agitamos hasta disolver y aforamos hasta 100 mL con agua desionizada y se filtró con papel filtro Watman No.1 y se almacenó hasta su uso.

### **8) Solución madre de antibióticos**

Para la axenización de esporas se utilizó una concentración de 10 mg/mL, se preparó una solución madre con una concentración de 100 mg/10 mL, de esta solución se tomaban 1 mL para obtener la concentración requerida.

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Eritromicina	100 mg
Claritromicina	100 mg
Amoxicilina	100 mg
H <sub>2</sub> O estéril	10 mL

En un matraz agregamos 8 mL de agua esteril y se fueron agregando cada uno de los antibióticos, se agitó hasta obtener una mezcla homogénea, Posteriormente se esterilizó por filtración con membrana de 0.22 µm y almacenó en el refrigeración (4°C) hasta su uso.

### 9) Solución Anfotericina B

La anfotericina B se utilizaba a una concentración de 50 µg/mL, se preparó una solución madre de 1mg /10 mL, de esta solución se tomaban 500 µl para obtener la concentración requerida

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Anfotericina B	1 mg
H <sub>2</sub> O estéril	10 mL

En un matraz agregamos 10 mL de agua estéril y 1 g de Anfotericina B, agitamos hasta disolver y obtener una mezcla homogénea.

## 10) Solución Salina Balanceadora de Hank's (SSBH)

Reactivos	Cantidad
CaCl anhidra (1.3 mM)	140.0 mg
KCl (5.4 mM)	400.0 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.4 mM)	60.0 mg
MgSO <sub>4</sub> anhidra (0.6 mM)	97.70 mg
NaCl (137 mM)	8000.0 mg
NaHCO <sub>3</sub> (4.2 mM)	350.0 mg
MgCl <sub>2</sub> con 6 H <sub>2</sub> O (0.5 mM)	100.0 mg
MgCl anhidra (0.5 mM)	47.0 mg
H <sub>2</sub> O desionizada	1000mL

En un matraz colocamos 800 mL de agua desionizada, posteriormente se agregaron uno a uno los reactivos y se agito hasta obtener una mezcla homogénea, al finalizar se aforo a 1000 mL. Se colocaron en frascos de 100 ml, se esterilizaron con calor a 121° C y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

## 11. Referencias

- Accoceberry I., Thellier M., Desportes-Livage I., Achbarou A., Biligui S., Danis M., *et al.* 1999. Production of monoclonal antibodies directed against the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi*. J Clin Microbiol; 37(12): 4107-12.
- Akerstedt, J., Kapel M. 2003. Survey for *Encephalitozoon cuniculi* in arctic foxes (*Alopex lagopus*) in Greenland. J. Wildl. Dis. 39(1):228–232.
- Akerstedt, J., Nordstoga K., Mathis A., Smeds E., y Deplazes P. 2002. Fox encephalitozoonosis: isolation of the agent from an outbreak in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*) in Finland and some hitherto unreported pathologic lesions. J. Vet. Med. B 49(8): 400–405.
- Albelo N., Cañete R., Britio K. 2013. Microsporidiosis gastrointestinal: una actualización. Rev. Med. Electrón. 35(2): 167-181
- Anane S., Attouchi H. 2010. Microsporidiosis: Epidemiology, clinical data and therapy. Gastroenterol Clin Biol. 34(8-9): 450—464
- Atias A. 1991. Microsporidiosis. En: Parasitología Médica. 3ª ed, Santiago de Chile: Mediterráneo, 291-5.
- Beauvais B., Sarfati C., Challier S., Derouin F. 1994. In Vitro Model To Assess Effect of Antimicrobial Agents on *Encephalitozoon cuniculi*. Antimicrob. Agent. Chemother. 38(10): 2440-2448
- Baneux, P., Pognan F. 2003. In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. Lab. Anim. 37(2):132–138.
- Becerril, Marco A. 2011. Parasitología Médica. 3º edición. Mc Graw Hill. Capítulo 19 “Microsporidiosis”. 111-119 pp
- Becnel, J., Andreadis, T. 1999. Microsporidia in insects. In *The Microsporidia and Microsporidiosis* (M. Wittner, Ed.), pp. 447–501. ASM Press, Washington, D.C
- Berg J., Diaz L., Bender B. 1996. Microsporidia in humans. Ann Intern Med; 125(6): 522-3.
- Bornay F., da Silva A., Moura H., Schwartz D., Visvesvara G., Pieniazek N. 1998. Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. J Infect Dis; 178(3): 820-6.

Bornay F., Acosta B., Moura J., Schwartz D., Da Silva A., Visvesvara G., Figueras M., Gobernado M., Pieniazek N. 2000. Mantenimiento en cultivo y caracterización de un microsporidio (*Encephalitozoon hellem*) aislado en un paciente con Sida y neumonía. *Parasitol. día.* 24(3-4): 69-70.

Botero J., Montoya M. 2002. Microsporidiosis intestinal: una visión integral. *Infection.* 6(4): 213-225.

Botero J., Montoya M., Vanegas A., Diaz A., Martinez L., Bornay F., Izquierdo F., Del Águila C., del Pilar S. 2004. Frecuencia de microsporidiosis intestinal en pacientes positivos para VIH mediante las técnicas de Gram cromotropo rápido y PCR. *Biomédica;* 24(4): 375-84

Brasil P., De Paiva D., de Lima D., Da Silva E., Peralta J., Da Silva A. 1998. A 3-year follow-up of a Brazilian AIDS patient with protracted diarrhea caused by *Enterocytozoon bieneusi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 40(4): 215-218.

Cali A., Takvorian P., Lewin S. 1996. Identification of a new *Nosema*-like microsporidian associated with myositis in an AIDS patient. *J Euk Microb;* 43(5): 108.

Cali A., Takvorian P., Lewin S. 1998. *Brachiola vesicularum*, n. g., n. sp., a new microsporidium associated with AIDS and myositis. *J Eukaryot Microbiol;* 45(3): 240-251.

Call A., Kent M., Sanders J., Pau C., Takvorian P. 2012. Development, Ultrastructural Pathology, and Taxonomic Revision of the Microsporidial Genus, *Pseudoloma* and Its Type Species *Pseudoloma neurophilia*, in Skeletal Muscle and Nervous Tissue of Experimentally Infected Zebrafish *Danio rerio* *J. Eukaryot. Microbiol.* 59(1): 40–48.

Canning, E. 1988. Nuclear division and chromosome cycle in microsporidia. *Biosystems* 21(3-4):333–340.

Canning E., Hollister W. 1990. *Enterocytozoon bieneusi* (Microspora): prevalence and pathogenicity in AIDS patients. *Trans Roy Soc of Trop Med and Hyg* 84(2):181-186.

Canning, E., Lom J, Dykova I. 1986. The microsporidia of vertebrates. Academic Press, Inc., New York. 289 pp.

Cavalier S. 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev.* 57(4): 953–994.

Cavalier S. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Boil Rev;* 73(3): 203-166.

Chalupsky, J., Vavra J., Gaudin J., Vandewalle P., Arthur C., Guenezan M., Launay H. 1990. Mise en évidence serologique de la présence d'encephalitozoonose et de toxoplasmose chez le lapin de Garenne (*Oryctolagus cuniculus*) en France. Bull. Soc. Fr. Parasitol. 8:91–95.

Cox, J., Hamilton R., Attwood H. 1979. An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. J. Protozool. 26(2): 260–265.

Csokai J., Joachim A., Gruber A., Tichy A., Pakozdy A., Künzel F. 2009. Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. Vet Parasitol. 163(1-2):18-26.

Del Águila, C., H. Moura, S. Fenoy, R. Navajas, R. Lopez-Velez, L. Li, L. Xiao, G. J. Leitch, A. J. da Silva, N. J. Pieniazek, A. A. Lal, and G. S. Visvesvara. 2001. In vitro culture, ultrastructure, antigenic, and molecular characterization of *Encephalitozoon cuniculi* isolated from urine and sputum samples from a Spanish patient with AIDS. J. Clin. Microbiol. 39(3): 1105–1108.

De Groot M., Visvesvara G., Wilson M., Pieniazek N., Slemenda S., da Silva A., G. Leitch J., Bryan R., and 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(5): 1375–1378.

Deplazes, P., A. Mathis, C. Muller, and R. Weber. 1996. Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples of pigs. J. Eukaryot. Microbiol. 43(5): 93S

Didier E., Didier P., Snowden K., Shadduck J. 2000. Microsporidiosis in mammals. Microbes Infect. 2(6): 709–720

Didier E., Stovall M., Green L., Brindley P., Sestak k., Didier P. 2004. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. Vet Parasitol. 126(1-2): 145–166.

Didier E., Vossbrinck C., Baker M., Rogers L., Bertucci D., and Shadduck J. 1995. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. Parasitology. 111(4): 411–421.

Didier E., Visvesvara G., Baker M., Rogers L., Bertucci D., De Groote M., Vossbrinck C. 1996. A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. J. Clin. Microbiol. 34(11): 2835–2837.

Didier E., Weiss L. 2006. Microsporidiosis: current status. Curr. Opin. Infect. Dis. 19(5): 485–492.



Didier E., Weiss L. 2011. Microsporidiosis: Not just in AIDS patients. *Curr Opin Infect Dis.* 24(5): 490–495.

Ditrich O, Chrdle A, Sak B, Chmelík V, Kubále J, Dyková I, Kvác M. 2011. *Encephalitozoon cuniculi* genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol.* 49(7): 2769-2771.

Ewringmann A., Gobel T. 1999. Clinical examination and therapy of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Kleintierpraxis* 44(5): 357–372.

Feaga W. 1997. Wryneck in rabbits. *JAVMA* 210(4):480.

Fedorko D., Nelson N., Didier E., Bertucci D., Delgado R., Hruszkewycz A. 2001. Speciation of human microsporidia by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. *Am J Trop Med Hyg;* 65(4): 397-401.

Findley A., Weidner E., Carman K., Xu Z., Godbar J. 2005. Role of the posterior vacuole in *Spraguea lophii* (Microsporidia) spore hatching. *Folia Parasitol.* 52(1-2): 111–117.

Flores C., Garcia D., Moncada L., Beltrán M. 2003. Prevalencia de microsporidios y otros parásitos intestinales en pacientes con infección por VIH, Bogotá. *Biomedica.* 23(3): 274-82.

Franzen C. 2008. Microsporidia: A review of 150 years of research. *The Open Parasitology Journal.* 2(1): 1-34.

Franzen C., Muller A. 1999. Cryptosporidia and microsporidia: waterborne diseases in the immunocompromised host. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 34(3): 245–262.

Franzen C., Muller A. 1999. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic of microsporidia. *Clin Microbiol Rev;* 12(2): 243-85.

Freshney, I. 2000. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 4° edición, John Wiley and Sons, New York. 589 pp.

Fuentealba I., Mahoney N., Shadduck J. 1992. Hepatic lesions in rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi* administered per rectum. *Vet Pathol* 29(6): 536-540.

Galvan A., Martin A., Perez M., Henríquez-Gil N, Izquierdo F., Fenoy S., del Aguila C. 2011. First Cases of Microsporidiosis in transplant recipients in Spain and review of the literature. *J Clin Microbiol.* 49(4): 1301–1306.

García P., Beltrán C., Guzmán A., León P, Arredondo M, Fonseca X. 2001. Diagnóstico rápido de dos casos de mucormicosis con tinción de blanco de calcoflúor. *Rev Chil Infect;* 18(4): 285-90.

Gamboa A., Bencosme C., Kato M. 1999. Microsporidiasis in AIDS patients with chronic diarrhea. Experiences at the National Institute of Nutrition "Salvador Zubiran". Rev Gastroenterol Mex.; 64(2): 70-74.

Ghosh K., Cappiello C., McBride S., Occi J., Cali A., Takvorian P. 2006. Functional characterization of a putative aquaporin from *Encephalitozoon cuniculi*, a microsporidia pathogenic to humans. Int J Parasitol. 36(1): 57- 62.

Gill E., Fast N. 2006. Assessing the microsporidia–fungi relationship: combined phylogenetic analysis of eight genes. Gene. 375(21):103–109.

Greene C. 2006. Infectious diseases of the dog and cat. Elsevier Indc. 3° edición.

Harcourt F. 2004. *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Rabbits. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine.13(2): 86-93

Harcourt F, Holloway H. 2003. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. Vet. Rec. 152(14): 427–431.

Harrington B, Hageage G. 1991. Calcofluor white: tips for improving the use. Clin Microbiol News; 13(1): 3-5.

Halánová M., Cisláková L., Valencáková A., Bálent P., Adam J., Trávnicek M. 2003. Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in humans and animals in Eastern Slovakia. Ann Agric Environ Med.10(1): 117-20.

Hersteinsson P., Gunnarsson E., Hjartardottir S., and Skirnisson K. 1993. Prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* antibodies in terrestrial mammals in Iceland, 1986 to 1989. J. Wildl. Dis. 29(2): 341–344.

Hollister W., Canning E., Colbourn N., and Aarons E. 1995. *Encephalitozoon cuniculi* isolated from the urine of an AIDS patient, which differs from canine and murine isolates. J. Eukaryot. Microbiol. 42(4): 367–372.

Hürková L., Modrý D. 2006. PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. Vet Parasitol. 137(1-2): 150-154.

Ignatius R., Lehmann M., Miksits K., Regnath T., Arvand M., Engelmann E. 1997. A new acid-fast trichrome stain for simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and microsporidial species in stool specimens. J Clin Microbiol; 35(2): 446-449.

Ignatius R., Henschel S., Liesenfeld O., Mansmann U., Schmidt W., Koppe S. 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(9): 2266-2269.

- Jaronski, S. T. 1984. Microsporidia in cell culture. *Adv. Cell Cult.* 18:183–22
- Joseph J., Sharma S. 2009. In vitro culture of various species of microsporidia causing keratitis: evaluation of three immortalized cell lines. *Indian J Med Microbiol.* 27 (1): 35-39.
- Jiménez G., Martínez M., Caballero S., Peralta G., Cárdenas R., Arzate P., Ponce M. 2012. Microsporidiosis en pacientes pediátricos con leucemia o linfoma. *Rev Invest Clin.* 64(1): 25-31.
- Kas̃ic̃kova´, D., B. Sak, M. Kva´cˇ, and O. Ditrich. 2009. Sources of potentially infectious human microsporidia: molecular characterisation of microsporidia isolates from exotic birds in the Czech Republic, prevalence study and importance of birds in epidemiology of the human microsporidial infections. *Vet. Parasitol.* 165(1-2): 125–130.
- Keeling, P., Fast, N.M., 2002. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 93–116.
- Keeling, P., Luker, M.A., Palmer, J.D., 2000. Evidence from b-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol. Biol. Evol.* 17(1): 23–31.
- Kotkova M, Sak B, Kvetonova D, Kvac M. 2013. Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with Albendazole. *PLoS One.* 8(4).
- Kotler D, Orenstein J. 1998-2002. Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals referred for gastroenterological evaluation. *Am J Gastroenterol.* 89(11).
- Kunstyr I., Naumann S. 1983. Head tilt in rabbits caused by Pasteurella and encephalitozoonosis. *Lab Anim* 19(3): 208-213.
- Lacey C., Clarke A., Fraser P., Metcalfe T., Bonsor G., Curry A. 1992. Chronic microsporidian infection of the nasal mucosae, sinuses and conjunctivae in HIV disease. *Genitourin Med* 68(3): 179-181.
- Lobo M., Xiao L., Antunes F., Matos O. 2012. Microsporidia as emerging pathogens and the implication for public health: A 10-year study on HIV-positive and -negative patients. *Int J Parasitol.* 42(2): 197–205.

Lores B., Lopez I., Arias C., Fenoy S., Torres J., del Aguila C. 2002. Intestinal Microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human Immunodeficiency Virus–Negative patients from Vigo, Spain. Clin Infect Dis. 34(7): 918-921.

Maeda H, Ishida N. 1967. Specificity of binding hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brighteners J. Biochem; 62(2): 267-278.

Manacorda A. M., Cuadros D. P, Álvarez A. S. 2007. Manual práctico de microbiología. Tomo I: Microbiología Ambiental I. En la página: <http://www.faciasuncoma.com.ar/Carreras/Saneamiento%20Ambiental/MicrobiologiaAmbiental/4%20COLORACIONES.pdf>

Matsubayashi H., Koike T., Mikata T., Hagiwara S. 1959. A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. Arch Pathol 67(2): 181-187.

Marchant C., Romero S., Jercic M. 2007. Pesquisa de la presencia de microsporidios en conejos de la Región Metropolitana de Chile. Parasitol Latinoam 62(1-2): 94–99.

Mathis A., Akerstedt J., Tharaldsen J., Odegaard O., and Deplazes P. 1996. Isolates of *Encephalitozoon cuniculi* from farmed blue foxes (*Alopex lagopus*) from Norway differ from isolates from Swiss domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Parasitol. Res. 82(8): 727–730.

Mathis A., Michel M., Kuster H., Muller C., Weber R., and Deplazes P. 1997. Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits. Parasitology 114(1): 29–35.

Mathis, A. 2000. Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. Int. J. Parasitol. 30(7): 795–804.

Mathis A., Weber R., Deplazes P. 2005. Zoonotic Potential of the Microsporidia. Clin Microbiol Rev. 18(3): 423–445.

Merino M, Garcia G, Díaz C. 1990. Encefalitozoonosis asintomática en conejos de la provincia de La Habana. Rev. Salud Animal; 12(1-3): 29-34.

Meyer A. 1996. Epidemiological and clinical studies on encephalitozoonosis in dwarf rabbits. Tesis, Tierärztliche Hochschule: Hannover, Germany.

Molina J., Sarfati C., Beauvais B., Lemann M., Lesourd A., Ferchal F. 1993. Intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic unexplained diarrhea. Prevalence and clinical and biological features. J Infect Dis. 167(1): 217-221.

Moncada L., Romero de Pérez G. 1998. Microsporidios en humanos. *Bioméd*; 18(3): 199-215.

Monheit J, Cowan D, Moore D. 1984. Rapid detection of fungi in tissues using calcofluor white and fluorescent microscopy. *Arch Pathol Lab Med*; 108(8): 616-618.

Moura H., Da Silva J., Sodre F., Brasil P., Wallmo K., Wahlquist S., *et al.* 1996. Gram-chromotrope: a new technique that enhances detection of microsporidial spores in clinical samples. *J Eukaryot Microbiol*; 43(5): 94S-95S.

Müller, M. 1997. What are the microsporidia? *Parasitol. Today* 13:455–456.

Müller C. 1998. Untersuchungen zur Diagnostik, Biologie und Verbreitung von Microsporidien bei Kaninchen und anderen Tierarten. Dissertation. University of Zürich, Zürich, Switzerland.

Nägeli K., 1857. Über die neue Krankheit die Seidenraupe unde verwandete Organismen. *Bot. Zeitung*. 15. 760–761.

Nast R., Middleton D., Wheler C. 1996. Generalized encephalitozoonosis in a Jersey woolly rabbit. *Can Vet J*. 37(5): 303–305.

Noda A., Cañete R., Brito K. 2013. Microsporidiosis gastrointestinal: una actualización. *Rev Méd Electrón*. 35(2): 167-181.

Patterson J., Caplazi P., Rurangirwa F., Tramontin R., Wolfsdorf K. 2003. *Encephalitozoon cuniculi* placentitis and abortion in a quarterhorse mare. *J. Vet. Diagn. Investig*. 15(1): 57–59.

Punpoowong B, Viriyavejakul P, Riganti M, Pongponaratn E, Chaisri U, Maneerat Y. 1998. Opportunistic protozoa in stool samples from HIV-infected patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 29(1): 31-34.

Rabeneck L, Gyorkey F, Genta RM, Gyorkey P, Foote LW, Risser JM. 1993. The role of Microsporidia in the pathogenesis of HIV-related chronic diarrhea. *Ann Intern Med*; 119(9): 895-899.

Rodríguez B., Cañas L., Zapata M., Álvarez L., Rico S., Garay F. 2001. Evaluación anatomopatológica de riñones leporinos y determinación de la prevalencia de la encefalitozoonosis en la hacienda El Progreso de la Universidad de Antioquia. *Rev Col Cienc Pec*; 14(2): 136-142.

Rodriguez L., Valdez Y., Nevarez A., Hernandez G., Riojas V., Ramirez R. 2010. Detection of Microsporidian spores in faeces of pigs of farms of Nuevo Leon, México. *Res J Parasitol*. 5 (4): 231-235.

- Rossi P., La Rosa G., Ludovisi A., Tamburrini A., Gomez M., and Pozio E. 1998. Identification of a human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* type I from Italy. *Int. J. Parasitol.* 28(9): 1361–1366.
- Sak B., Kváč M., Kučerová Z., Květoňová D., Sakova K. 2011. Latent Microsporidial Infection in Immunocompetent Individuals – A Longitudinal Study. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(5): 1064-1070.
- Schwartz D., Bryan R. 1997. Microsporidia. En: Horsburg C R Jr, Nelson AM, eds. *Pathology of emerging infections*. Washington: ASM Press; p. 61-94.
- Shadduck J. 1969. *Nosema cuniculi*: in vitro isolation. *Science* 166(3904): 516–517.
- Shadduck J., Pakes, S.P. 1971. Encephalitozoonosis (nosematosis) and toxoplasmosis. *Am. J. Pathol.* 64(3), 657–671.
- Shadduck J., Orenstein J. 1993. Comparative pathology of microsporidiosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 117(12): 1215–1219.
- Sharma S., Das S., Joseph J., Vemuganti G., Murthy S. 2011. Microsporidial Keratitis: Need for Increased Awareness. *Surv Ophthalmol.* 56(1): 1-22.
- Snowden K., Shadduck, J., 1999. Microsporidia of higher vertebrates. In: Wittner, M., Weiss, L.M. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, pp. 393–419.
- Sprague V., Becnel J., Hazard E. 1992. Taxonomy of phylum Microspora. *Crit Rev Microbiol.* 18(5-6): 285-395.
- Teachey D., Russo P., Orenstein J., Didier E., Bowers C., and Bunin N. 2004. Pulmonary infection with microsporidia after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 33(3): 299–302.
- Thomas C., Finn M., Twigg L., Deplazes P., Thompson R. 1997. Microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) in wild rabbits in Australia. *Aust. Vet. J.* 75(11): 808–810.
- Thomarat F., Vivares C., Gouy M. 2004. Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes. *J Mol Evol.* 59(6): 780–791.
- Vavra J. 2005. 'Polar vesicles' of microsporidia are mitochondrial remnants ('mitosomes')? *Folia Parasitol.* 52(1/2): 193–195.

Vavra J., Larsson R. 1999. Structure of the microsporidia. In: Wittner, M.; Weiss, LM., editors. The microsporidia and microsporidiosis. Washington, DC: American Society for Microbiology. p. 7-84.

Vivares C., Gouy M., Thomarat F., Metenier G. 2002. Functional and evolutionary analysis of a eukaryotic parasitic genome. *Curr Opin Microbiol.* 5(5): 499–505.

Visvesvara G. S. 2002. In Vitro Cultivation of Microsporidia of Clinical Importance. *Clin Microbiol Rev.* 15(3): 401–413.

Visvesvara G., Moura H., Leitch G., and Schwartz D. 1999. Culture and propagation of microsporidia, p. 363–392. In M. Wittner and L. M. Weiss (ed.), The microsporidia and microsporidiosis. ASM Press, Washington, D.C.

Weber R., Bryan R., Schwartz D., and Owen R. 1994. Human microsporidial infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 7(4): 426–461.

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. *N. Engl. J. Med.* 336(7): 474–478.

Wilson J. 1979. *Encephalitozoon cuniculi* in wild European rabbits and a fox. *Res. Vet. Sci.* 26(1):114.

Wolfer J., Grahn B., Wilcock B., Percy D. 1993. Phacoclastic uveitis in the rabbit. *Prog Vet Comp Ophthalmol* 3(3):92–97.

Wright J., Craighead E. 1922. Infectious motor paralysis in young rabbits. *J Exp Med.* 36(1): 135-141.

Yazar S., Koru Ö., Hamamcı B., Cetinkaya Ü., Karaman Ü., Kuk S. 2013. Microsporidia and Microsporidiosis. *Turkiye Parazitoloj Derg.* 37(2): 123-134.