



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“PESQUISA DE LA PRESENCIA DE *ENCEPHALITOOZON*
CUNICULI EN CONEJOS”

CAROLINA ANDREA MARCHANT CARRASCO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

Financiado por el Instituto de Salud
Pública de Chile

PROFESOR GUÍA: SERGIO ROMERO MEDEL

SANTIAGO, CHILE
2006



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“PESQUISA DE LA PRESENCIA DE *ENCEPHALITOZOON*
CUNICULI EN CONEJOS”

CAROLINA ANDREA MARCHANT CARRASCO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

Nota final: _____

		Nota	Firma
PROFESOR GUÍA	: SERGIO ROMERO MEDEL	-----	-----
PROFESOR CONSEJERO	: MARÍA LUISA SÁNCHEZ CHONG	-----	-----
PROFESOR CONSEJERO	: HÉCTOR ALCAÍNO CONTADOR	-----	-----

SANTIAGO, CHILE
2006

ÍNDICE

	<u>Página</u>
Resumen	I
Summary	II
Lista de Figuras, tablas y gráficos	III
Introducción	1
Revisión Bibliográfica	2
1.- Microsporidiosis	2
2.- <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	5
3.- Transmisión	6
4.- Presentación en el conejo	6
5.- Presentación en el hombre	7
6.- Respuesta inmunológica	8
7.- Métodos diagnósticos	9
8.- Tratamiento	10
Hipótesis	12
Objetivo General	12
Objetivos Específicos	12
Material y Métodos	13
Resultados	18
Discusión	32
Conclusiones	35
Bibliografía	36
Anexos	39

RESUMEN

Los microsporidios son protozoos, parásitos intracelulares obligados de distintas especies animales. Pertenecen al Phylum Microspora, caracterizada por producir esporas muy pequeñas y por carecer de mitocondrias. Entre los microsporidios, está el *Encephalitozoon cuniculi*, el cual es un parásito oportunista emergente.

El reservorio, en estudio, que pone en peligro la salud humana es el conejo (*Oryctolagus cuniculus*), el cual elimina al parásito principalmente por la orina, contaminando el medio ambiente.

En la prevalencia de *E. cuniculi* en conejos se reportan rangos de 15 al 76 % a nivel mundial (Ansbacher *et al*, 1988).

Con la finalidad de detectar la presencia de este parásito en nuestro país, se realizó la pesquisa de éste, en el laboratorio de parasitología del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).

La muestra estuvo constituida por 100 conejos normales sin distinción de sexo, pertenecientes a: Bioterio de ISP, Criaderos familiares de la localidad de Pirque, “Mundo Granja” perteneciente a la Universidad de Chile y a un Criadero comercial. Todos los conejos fueron previamente evaluados mediante un examen clínico.

Luego de procesar la muestra, de deposición y de orina, se procedió a teñirlas con colorantes tricrómicos: Cromotropo 2R y Gram Cromotropo.

Se obtuvo una positividad en un 55% de los individuos, donde el mayor porcentaje se presenta en conejos inmunosuprimidos y de crianza convencional.

El objetivo de este estudio es contribuir a la salud, en especial la del ser humano como la de los animales determinando la presencia de *E. cuniculi* en conejos de distintos orígenes.

SUMMARY

The microspore is protozoa, forced intracellular parasite, of different animal species. They belong to the Phylum Microspore, which produce very small spores and lack mitochondria. One of the microspores, there exists the *Encephalitozoon cuniculi*, which is an emergent opportunistic parasite.

The reservoir, in study, that puts in danger the human health is the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), which eliminates the parasite mainly by tinkles it, contaminating the environment.

In the prevalence of *E. cuniculi* in rabbits, ranks from 15 to 76 % at world-wide level are reported (Ansbacher *et al*, 1988).

With the purpose of detecting the presence of this parasite in our country, the search of this one was made, in the parasitology laboratory of the Institute of Public Health of Chile (ISP).

The sample was constituted by 100 normal rabbits without distinction of sex, pertaining to: Bioterio of ISP, familiar deposits from Pirque, “Mundo Granja” of the University of Chile and a commercial deposit. All the rabbits were previously evaluated by means of a clinical examination.

After processing the sample of deposition and tinkles, they were dyed with trichromic colorants: Cromotrope 2R and Gram Cromotrope.

A positive result was obtained in 55% of the individuals, where the greater percentage appears in immunosuppressed rabbits and conventional raising rabbits.

The objective of this study is to contribute to the health, in special the human being health, as well as the animals, determining the presence of *E. cuniculi* in rabbits of different origins.

LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS

FIGURAS:	PÁGINA
Figura N° 1: Espora de microsporidio	4
Figura N° 2: Ciclo biológico de los microsporidios	4
Figura N° 3 y 4 : Esporas de <i>E. cuniculi</i> en muestra de deposición. Tinción Cromotropo 2R.	26
Figura N° 5 y 6: Esporas de <i>E. cuniculi</i> en muestras de deposición. Tinción Gram Cromotropo.	27
Figura N° 7 y 8: Esporas de <i>E.cuniculi</i> en muestras de orina. Tinción Gram Cromotropo.	28
TABLAS:	
Tabla N° 1: Distribución total de los conejos según el origen de obtención de las muestras.	18
Tabla N° 2: Distribución de conejos de criadero positivos a <i>E. cuniculi</i> en la Región Metropolitana, por las técnicas de tinción Tricrómicas utilizadas.	19
Tabla N° 3: Resultados de conejos positivos a <i>E. cuniculi</i> , según la condición inmunológica en la población total.	21
Tabla N° 4: Distribución de animales positivos a <i>E. cuniculi</i> , según conejos inmunosuprimidos v/s no inmunosuprimidos en el Bioterio del ISP de Chile.	22
Tabla N° 5: Distribución de conejos positivos a <i>E. cuniculi</i> , según muestras de deposiciones u orina, en la población total.	23

Tabla N° 6:	Distribución de conejos positivos al Microsporidio <i>E. cuniculi</i> , establecido por las técnicas de tinción realizadas en el laboratorio de Referencia de parasitología del ISP, según el origen de las muestras	24
-------------	---	----

GRÁFICOS:

Gráfico N° 1:	Distribución de la población total de conejos, según su origen.	18
Gráfico N° 2:	Porcentajes de conejos positivos y negativos a <i>E. cuniculi</i> de la muestra total.	19
Gráfico N° 3:	Disminución del peso promedio inicial, de 3,1 kg. a un peso promedio final de 2,65 kg, por el tratamiento de inmunosupresión en conejos de Bioterio.	20
Gráfico N° 4:	Distribución de animales positivos a <i>E. cuniculi</i> , según estado inmunológico.	21
Gráfico N° 5:	Porcentaje de conejos positivos y negativos a <i>E. cuniculi</i> en los grupos inmunocomprometidos y no inmunocomprometidos.	22
Gráfico N° 6:	Porcentaje de conejos positivos en muestras de deposiciones v/s animales positivos en muestras de orina, según el origen de la muestra.	23
Gráfico N° 7:	Distribución de los conejos positivos a <i>E.cuniculi</i> , según su origen.	25

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias, constituyen un grupo importante de patologías que afectan a los animales, y son aún de mayor importancia cuando estas son zoonóticas, como es el caso del *Encephalitozoon cuniculi*, protozoo de la familia Microspora.

Es de importancia mundial, pues se trata de una infección humana emergente, provocando importantes lesiones a nivel orgánico, en individuos inmunocomprometidos.

El reservorio, en estudio, que pone en peligro la salud humana es el conejo (*Oryctolagus cuniculus*), el cual elimina al parásito principalmente por su orina, contaminando el medio ambiente.

Los animales de compañía son cada vez más numerosos y apreciados en la sociedad, constituyendo para el hombre un importante reservorio, entre otros, de parásitos por su cercanía a ellos. El aumento de la adquisición, por parte de la población humana, de mascotas menos habituales, como los conejos, involucra la interacción y exposición de nuevas enfermedades en el hombre, por lo que es necesario realizar una estimación de la presencia de este protozoo en estos animales a nivel nacional. Ya que de hecho, a nivel mundial, se reporta en la literatura, una prevalencia que esta entre rangos muy amplios de *E. cuniculi* en conejos.

En Chile, no se encontraron registros de estudios detallados sobre la presencia de este parásito, ni menos de su aislamiento.

La literatura consultada refiere que *E. cuniculi* es el único microsporidio que parasita naturalmente al conejo, es por esto que en este trabajo cuando se detecten esporas del microsporidio en las muestras teñidas con colorantes tricrómicos, se darán como positivos a *E. cuniculi*.

Es por esto, que se recopilaron muestras de orina y deposiciones de conejos provenientes de distintos orígenes, como Bioterio y de crianza convencional, para determinar la potencial presencia del *E. cuniculi*, siendo este el objetivo de este estudio.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.- Microsporidiosis:

Es una infección humana emergente, causada por protozoos de la familia *Microspora* (Acha y Szyfres, 2003).

Con el advenimiento de la epidemia de SIDA, a partir de 1985, se han descrito varias patologías en las que se encuentran los microsporidios como agentes etiológicos (Moncada y Romero de Pérez, 1998).

Se trata de pequeñísimos protozoos intracelulares que pasan primero por una fase de multiplicación asexual (merogonia), a nivel intestinal destruyendo las células intestinales y luego por vía sanguínea realiza una migración a distintos órganos, enseguida se desarrolla una fase sexual (esporogonia) donde producen esporas u ooquistes dentro de la célula parasitada (Acha y Szyfres, 2003).

Los microsporidios son organismos unicelulares, parásitos obligados de pluricelulares y se consideran eucariontes por poseer núcleo rodeado de membrana nuclear, un sistema de membranas intracitoplasmáticas y separación de cromosomas en los husos mitóticos; sin embargo, el grupo presenta algunas características comunes a los procariontes como el tamaño del rARN y la ausencia de mitocondrias, peroxisomas y membranas del aparato de Golgi (Weber *et al*, 1994).

Existen unas 700 especies que infectan a vertebrados e invertebrados (Scaglia *et al*, 1994). La afinidad de las especies de microsporidios por las células hospederas es variable; algunas pueden invadir diferentes tejidos mientras otras infectan un solo tipo (Moncada y Romero de Pérez, 1998).

Las especies identificadas hasta ahora como parásitos del hombre son: *Encephalitozoon bienersi*, *E. intestinales* (antes *Sepata intestinalis*), *E. hellem* y *Encephalitozoon cuniculi* (Acha y Szyfres, 2003).

El ciclo de vida de estos organismos incluye:

La espora: estadio invasor, forma infectante para los diferentes hospederos; dentro de los cuales va a liberar el filamento polar que le permite fijarse en los tejidos correspondientes. Sus membranas, exospora proteínica electrodensa y la endospora quitinosa la hacen resistente a los factores ambientales. Además posee un esporoplasto uni o binuclear el cual es inyectado a la célula hospedera mediante el filamento polar, que actúa en el proceso por un complejo sistema de membranas llamado polaroplasto lamelar.

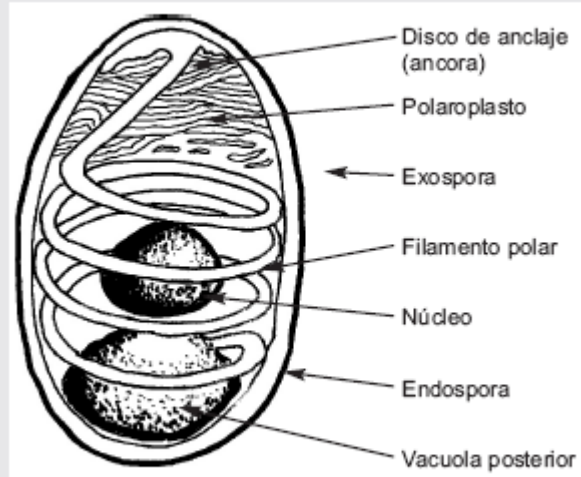
El filamento polar que nace en la parte anterior de la espora, atraviesa la célula y se enrolla en el extremo posterior; el número de sus vueltas disminuye a medida que la espora va madurando, hasta alcanzar el número de vueltas característico de cada especie (Weber *et al*, 1994). Figura N° 1 y 2.

Merontes: representan la fase asexual del parásito, son células simples, rodeadas por una membrana y que se multiplica por división binaria y por división múltiple.

Esporontes: se inicia tan pronto como los merontes se rodean de una capa superficial amorfa. Estos crecen y se multiplican por división binaria o múltiple hasta transformarse en los esporoblastos que son los precursores de las esporas.

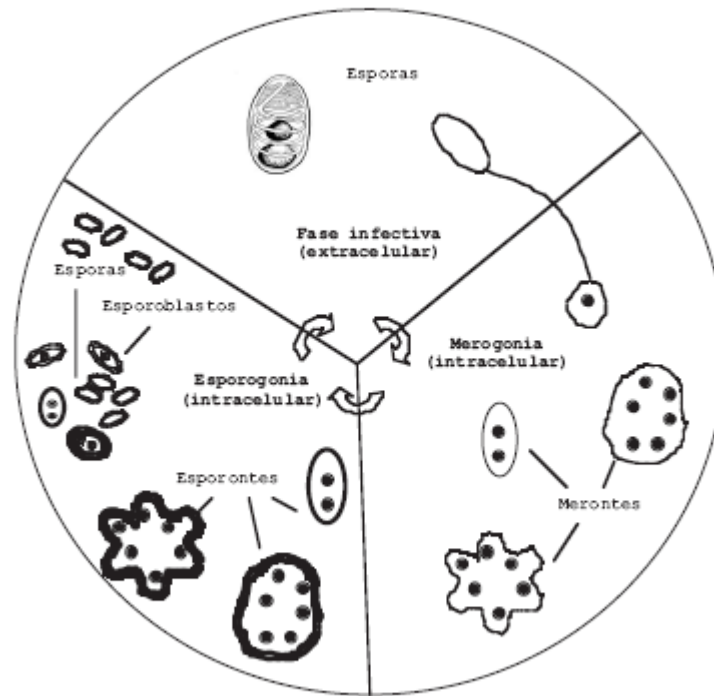
Una vez que las esporas maduran, pasan al medio ambiente para infectar nuevos hospederos (Moncada y Romero de Pérez, 1998).

Figura 1. Espora de microsporidio



Fuente: Tomado de Manual SEIMC de Enfermedades Infecciosas (del Aguila 2004).

Figura 2. Ciclo biológico de los microsporidios



Fuente: Tomado de Manual SEIMC de enfermedades infecciosas (del Aguila 2004).

2.- *Encephalitozoon cuniculi*

En 1922, Wriht y Craighead clasificaron por primera vez en mamíferos un protozooario asociado a encefalomiелitis en conejos, observación confirmada por Levaditi, en 1923, quien lo describió como *E. cuniculi* (Chinchilla *et al*, 1998).

El organismo denominado inicialmente *E. cuniculi* (1923), posteriormente fue cambiado a *Nosema cuniculi*, y trabajos recientes demuestran que debería ser nuevamente cambiado a *E. cuniculi*, este nombre está basado en las características de las lesiones que produce el microsporidio en los animales afectados y de las muestras estudiadas. La microscopía electrónica, ha mostrado que el organismo posee un núcleo a través de todo su ciclo vital en tanto que los parásitos del género *Nosema*, descubiertos inicialmente en el gusano de seda por Louis Pasteur, tienen doble núcleo (Russell y Schilling, 1988).

Por medio de la técnica de polimorfismo de los fragmentos de restricción (FRLP), se han identificado 3 cepas de *E.cuniculi*:

E.cuniculi I de conejo, *E.cuniculi II* de ratón y *E.cuniculi III* de perro (Dier *et al*, 1995).

El primer caso humano, documentado, fue informado en 1959 por Matsubayashi *et al*, quienes aislaron *Nosema cuniculi* de la sangre, el líquido cefalorraquídeo y la orina de un niño japonés de 9 años con meningo-encefalitis febril (Moncada y Romero de Pérez, 1998).

La prevalencia en algunas colonias de conejos, reportan rangos de 15 al 76 % (Ansbacher *et al*, 1988). También se informa que a nivel de Latinoamérica, Argentina y Cuba informan prevalencias entre un 50% y 70% en explotaciones cunícolas y bioterios, causando pérdidas económicas e interfiriendo en el desarrollo de trabajos de investigación (Rodríguez *et al*, 2001).

Afecta a mamíferos como conejos, ratones, hámster, cobayos, perros, gatos, zorros, visones, además de aves y al hombre (Vásquez *et al*, 2001).

El *Encephalitozoon* produce infecciones intestinales o sistémicas que pueden diseminarse a varios órganos (Acha y Szyfres, 2003).

3.- Transmisión:

Ya que se conocen varias especies que infectan al hombre y algunos datos sobre su patología, basados en la distribución de las lesiones en las vías oculares, orales y respiratorias, se cree que una posible vía de infección son los aerosoles porque se han encontrado esporas de *Encephalitozoon* en muestras de lavado bronquioalveolar, al igual que en la descarga nasal (Weber y Bryan, 1994), por lo que se estaría frente a una transmisión de tipo horizontal, por contacto directo, sobre todo por vía aérea a través de la orina y por contacto directo con animales infectados. Es probable que la mayoría de los conejos se infecten en una edad muy temprana desde su madre (Dykes y Davies, 2004).

La transmisión vertical o transplacentaria ha sido comunicada en conejos (Russell y Schilling, 1988).

Las esporas producidas son uninucleadas, miden 2 a 4 micrómetros de largo y 1 a 1,5 de ancho y presentan 5 a 7 vueltas del tubo polar, ordenadas en una hilera (Cali *et al*, 1996).

Después de la ingestión, el ooquiste entra al epitelio intestinal del anfitrión u hospedero, donde ocurre la primera fase de multiplicación sexual, esta multiplicación masiva rompe la célula hospedera, con la difusión por vía sanguínea a otros órganos como hígado, pulmones, cerebro y riñones (Harcout-Brown y Holloway, 2003).

Un mes después de la infección, el conejo comienza a eliminar las esporas a través de su orina o deposiciones, continuando hasta por tres meses y posiblemente por intervalos de por vida. Las esporas son muy resistentes al medio ambiente y permanecen viables por más de un mes (Dykes y Davies, 2004).

4.- Presentación en el conejo:

La mayoría de las infecciones parecen ser asintomáticas, pero cuando *E. cuniculi* afecta el sistema nervioso central, produce en el cerebro lesiones focales en forma de

pequeños granulomas ampliamente diseminados, con o sin necrosis. Los vasos sanguíneos contiguos a los granulomas exhiben, frecuentemente, varios grados de infiltración perivascular. Ocasionalmente, se observa una meningitis no supurada. Las lesiones que se encuentran más frecuentemente son las del cerebro (sustancia gris y blanca), pedúnculos cerebrales, puente de Varolio y, ocasionalmente, la médula.

Se manifiesta clínicamente por inclinación de la cabeza, incontinencia urinaria, paresis, temblores, convulsiones, ataxia y coma (Dykes y Davies, 2004).

Las lesiones se encuentran más comúnmente en los riñones, cerebro, pulmones, bazo, glándulas suprarrenales, páncreas y miocardio. Las lesiones microscópicas que se han reportado son: nefritis, granulomas con fibrosis y hialinosis (Fuentealba *et al*, 1992).

Las lesiones en el cerebro se presentan mayoritariamente como granulomas multifocales (encefalitis granulomatosa) rodeados de zonas de necrosis. También, puede producir lesiones oculares, incluso antes del nacimiento, la madre puede transmitir las esporas (Nicklas *et al*, 1999).

5.- Presentación en el hombre:

Las personas más susceptibles son los pacientes inmunocomprometidos y las transplantadas, pero es poco frecuente en inmunocompetentes. Por lo general, la infección provoca diarrea crónica en los casos de seres humanos infectados y con cuadros sistémicos, los órganos afectados principalmente son cerebro y riñones (Acha y Szyfres, 2003).

Los síntomas característicos son pérdida de peso, causada por la mala absorción y diarrea acuosa, abundante, no sanguinolenta, sin mucosidades ni leucocitos. Puede ocasionar deshidratación y debilidad marcada. Algunas veces puede presentarse anorexia y dolor abdominal. También, puede presentarse concomitantemente colangitis causada por el parásito, manifestándose con dolor en el cuadrante superior derecho (Botero y Montoya, 2002).

6.- Respuesta inmunológica:

Se cree que hay una interacción evolutiva muy antigua entre los microsporidios y los hospederos humanos, por lo cual la infección permanece en estado latente cuando la multiplicación de los parásitos es controlada por el sistema inmunológico competente del individuo. La infección, activa la producción de anticuerpos, que al parecer, no tienen un efecto protector (Moncada y Romero de Pérez, 1998).

Algunas esporas del género *Encephalitozoon* descargan su esporoplasma a través del filamento polar, escapando así del fagosoma antes de que ésta se una con el lisosoma; luego, los esporoplasmas libres se multiplican y, finalmente, se rodean de una membrana formando compartimentos que no se fusionan con los lisosomas. De esta manera, las especies *Encephalitozoon* spp. evaden la respuesta inmune del hospedero y sobreviven en el macrófago (Moncada y Romero de Pérez, 1998). Se ha observado en animales de experimentación que la infección con microsporidios induce la producción de anticuerpos, pero éstos al parecer no son protectores debido a que no inducen la destrucción del parásito; por el contrario, en individuos con compromiso de la inmunidad celular, la persistencia de macrófagos es un reflejo de la cronicidad de la infección (Botero y Montoya, 2002).

Por consiguiente, la infección por microsporidios no es exclusiva del hospedero severamente inmunocomprometido; porque cuando existe una respuesta inmune balanceada, se sugiere que los microsporidios permanecen por períodos de latencia al interior del enterocito, sin presentación de ninguna manifestación clínica (Botero y Montoya, 2002).

En encefalitozoonosis, la reacción inflamatoria es típicamente una infiltración celular difusa o una lesión granulomatosa caracterizada por infiltración de células mononucleares incluyendo linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, algunas veces alrededor de un centro necrótico. Estas lesiones pueden persistir aún después de la desaparición de los microsporidios.

En los pacientes humanos inmunodeficientes, la reacción en tejidos es mínima o aún puede estar ausente (Moncada y Romero de Pérez, 1998).

Existen evidencias en seres humanos que sugieren que los pacientes con inmunodeficiencia celular severa presentan mayor riesgo para desarrollar enfermedad por microsporidios. Sin embargo, no es claro si la enfermedad se debe a una reactivación de una infección latente previo a la ocurrencia de que ocurra la inmunosupresión o si ésta es causada por una infección reciente (Botero y Montoya, 2002).

7.- Métodos diagnósticos:

El diagnóstico se dificulta por el tamaño diminuto de las esporas, de 1 a 2 micrones (Acha y Szyfres, 2003).

En las primeras comunicaciones que se conocen, se señalaba que infectan el intestino humano (Moncada y Romero de Pérez, 1998). Con mayor precisión parasitan los enterocitos del intestino delgado, sin embargo, pueden diseminarse a otros tejidos como vías biliares, pulmón, tracto genitourinario, entre otros (Botero y Montoya, 2002).

El diagnóstico se realizaba a partir del estudio de biopsias por microscopía electrónica de transmisión; este método permite observar el filamento polar que es un carácter propio de los microsporidios, sin embargo, esta metodología tiene serias desventajas: es invasora, de alto costo y su sensibilidad es relativamente baja. Además, se requiere de un laboratorio que cuente con esas facilidades (Moncada y Romero de Pérez, 1998).

Otras técnicas diagnósticas utilizadas son: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Western blot, entre otros, pero aún son de difícil acceso como examen de rutina para laboratorios clínicos.

En la actualidad, las muestras se toman de fluidos orgánicos, deposiciones, aspirado duodenal, sedimento urinario y escarificado corneal, y se tiñen con métodos que facilitan la observación microscópica (Acha y Szyfres, 2003).

Las coloraciones empleadas para la detección de microsporidios en biopsias fijadas en parafina incluyen: hematoxilina-eosina, coloración de Gram, Giemsa y tinción tricrómica modificada de Weber como el Cromotropo modificado. Todas estas coloraciones

tienen un valor predictivo positivo de 100%, con excepción de la hematoxilina-eosina que es de 94%.

La búsqueda de esporas se realiza preferencialmente en: deposiciones u orina porque la obtención de estas muestras no significan un proceso invasivo y de procedimientos simples. Para estas muestras se utilizan tinciones específicas, como: modificación a la coloración del Cromotrofo de Gomori. (Moncada y Romero de Pérez, 1998), Quick-hot Gram-Cromotrofo (Moura *et al*, 1997) y el método de tinción por fluorescencia, mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos.

En los últimos años se ha empleado la técnica de Quick-hot Gram-Cromotrofo, aunque también es una prueba de coloración, su sensibilidad y especificidad son ligeramente superiores a las técnicas Cromotrofo y fluorescencia, además es una prueba rápida y sencilla desde el punto de vista técnico y económico.

La coloración tricrómica emplea Cromotrofo que permite la observación con microscopio de luz, las esporas se colorean de color rosado claro con un fondo verde azul, algunas aparecen transparentes, pero la mayoría muestran una pequeña línea central que corresponde al túbulo polar, lo que confirma el diagnóstico.

La prueba del Quick-hot utiliza además del Cromotrofo la tinción de Gram, por lo tanto, las esporas se tiñen de violeta oscuro, muestran como mínimo uno de los rasgos estructurales característicos de los microsporidios y además se observan esporas como gránulos Gram positivos.

La técnica de fluorescencia, con extendido de la muestra de deposiciones, se fija a la placa con etanol, se emplea el calcofluor y luego se observan al microscopio de fluorescencia (Botero y Montoya, 2002).

8.- Tratamiento:

Se ha publicado recientemente, quizás la primera evidencia de que el tratamiento del *E. cuniculi* con fenbendazole en conejos da buenos resultados. Dicho estudio consideró el uso del fenbendazole en dosis de 20 mg/kg peso vivo durante 28 días, para prevenir una infección experimental del *E. cuniculi* en conejos. Fenbendazole suministrado antes de la

exposición al parásito, previno con éxito la infección; por lo tanto puede ser una manera de controlar la infección en grupos de conejos donde algunos animales tienen la enfermedad y otros todavía no se infectan.

El tratamiento consistió en una alimentación medicada y por adición de 4 g/kg del febendazole mezclada a una ración normal para conejos. Si se presume que éstos consumieron el alimento medicado de 5 g por kilo de peso corporal por día, habrían recibido una dosis diaria de 20 mg de febendazole/kg. peso corporal (Suter *et al*, 2001).

HIPÓTESIS

Existe la presencia de *E. cuniculi* en la población de conejos en estudio y se presume que la población de conejos provenientes del Bioterio, presente menos individuos infectados, debido a las medidas de manejo sanitario a los que son sometidos.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la presencia o ausencia de *E. cuniculi* en conejos de distintos orígenes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir la presencia de *E. cuniculi* según la procedencia de los conejos en estudio.
- Obtener controles positivos, de las muestras obtenidas de los conejos, para que posteriormente sean procesadas por el Laboratorio del ISP y puedan ser suministrados a la Secretaria Regional Ministerial de Salud (Seremis) del país, para ser utilizados en el diagnóstico de casos sospechosos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material:

Animales:

La muestra en estudio comprendió a 100 conejos de edades similares, menores de 1 año, sin distinción de sexo y clínicamente normales; para esto último se les realizó una evaluación individual de variables como:

Peso: Macho adulto 1'5 - 5 Kg., Hembra adulta 1'5 – 6 Kg.

La temperatura corporal es de 38'5-40 °C, La frecuencia cardiaca es de 180-250 ppm.

La frecuencia respiratoria es de 30-60 respiraciones / minuto.

La frecuencia respiratoria y cardiaca se pueden duplicar por el estrés. (*)

La alimentación se mantuvo normal, con alimento y agua de bebida *ad limitum*.

100 conejos provenientes de distintos orígenes:

- Bioterio del Instituto de Salud Pública
- Dos Criaderos familiares de la localidad de Pirque
- “Mundo Granja”, perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.
- Criadero comercial de la comuna de La Pintana.

Tratamiento de inmunosupresión: Metil-prednisolona

Tratamiento para bacterias oportunistas: Tetraciclina

Toma de muestras:

- 2 Tubos de 50 ml para cada conejo, uno para la obtención de orina y el otro para la obtención de deposiciones (crotín).
- Guantes desechables.
- Jeringas de 10 ml, aguja 21G
- Bandeja de recolección plástica y de metal para orina.

Tinción:

- Preparación de frotis:
 - Tamizaje: -vaso
 - Malla de bronce fosfórico

(*)<http://canal-h.net/webs/sgonzalez002/Exoticos/CONEJOS.htm>

-Centrífuga

-Porta objetos

- Tinción de frotis
- Cromotropeo 2R
- Gram Cromotropeo Quick-Hot

Material de observación y Registro:

Microscopio de luz

Protocolo de trabajo observación microscópica (ver anexo 3)

Métodos de pesquisa de *E. cuniculi*:

Método: la investigación fue de carácter mixto, por una parte es exploratorio ya que es un tema poco abordado, con disponibilidad a información escasa, y es de carácter descriptivo, debido a que el objetivo es describir situaciones, eventos, especificando las propiedades de importancia y midiendo cada una de ellas.

El carácter de la muestra es de tipo no probabilística, debido a que la muestra es dirigida, en donde los individuos no tienen la misma oportunidad de ser elegidos, dejando a determinados conejos fuera, según la exclusión anterior. (Hernández *et al.* 1998)

Inmunosupresión:

Los conejos provenientes del Bioterio, situado en la Localidad de Chena, fueron divididos en dos grupos de 25 ejemplares cada uno.

Un grupo de 25 conejos fue sometido a un tratamiento de inmunosupresión, previo al estudio de pesquisa de *E.cuniculi* esperando que al disminuir la inmunidad del animal, el *E. cuniculi* como patógeno oportunista, apareciera en las heces y en la orina. El período para la obtención de las muestras de orina y deposiciones, fue posterior a una semana y media, puesto que los efectos de este corticoide disminuyen la actividad y número de linfocitos y alteran profundamente las reacciones inmunitarias de los mismos, lo que disminuiría el sistema de control de la flora oportunista dentro del organismo y por lo tanto la exacerbación del parásito. La administración de metilprednisolona 1 mg/kg de peso

vivo por vía subcutánea durante tres días consecutivos y considerando que el peso promedio de los conejos fue 3 kg, cada animal recibió 3 mg; junto a este tratamiento a estos animales se les proporcionó tetraciclina en el agua de bebida 500 mg por animal por tres días, y así controlar la flora bacteriana oportunista. (*)

Junto a esta medicación a los animales se les suministró en la alimentación pan seco, junto al pellet con el fin de reforzar la inmunosupresión.

El objetivo de la inmunosupresión fue deprimir el sistema inmunológico, sin llegar a enfermar a los animales, puesto que lo que se busca es aumentar en número de Microsporidios, sin que el animal alcance a enfermar y presentar signología asociada a microsporidiosis u a otra enfermedad, es por esto que se realizó el tratamiento durante tres días. Luego el sistema inmunológico del conejo volvería a su condición inicial.

Los restantes 25 conejos no fueron sometidos a inmunodepresión y sólo se les recolectó las muestras de orina y deposiciones.

Se realizaron visitas a los criaderos y se obtuvieron directamente las muestras.

Técnicas de extracción de muestras:

La obtención de orina y deposiciones, en el caso de animales inmunosuprimidos, se realizó una semana y media después al término del tratamiento de inmunosupresión.

Orina:

La orina fue obtenida, ya sea por:

- Masaje vesical ó
- Punción vesical ó
- Recolección directa mediante en tubo de 50 ml, luego de la micción voluntaria del conejo ó
- Recolección directa de una bandeja de recolección.

No es necesario que la obtención de la orina sea realizada de forma aséptica, puesto que en el ciclo de transmisión natural del microsporidio es a través de orina, donde puede permanecer por alrededor de 1 mes en el medio ambiente.

Deposiciones:

Se recolecta individualmente, de forma manual.

(*) Protocolo utilizado y supervisado por Dr. Sergio Romero Medel

Técnicas de laboratorio empleadas

Se utilizó la tinción Cromotropo 2R (ver anexo 1) para la visualización de presencia de esporas en 50 muestras de deposiciones y la tinción con Gram Cromotropo (ver anexo 2) para el total de muestras de orina y para las restantes muestras de deposiciones.

La observación de cada lámina se realizó en un microscopio de luz con objetivo de inmersión en aceite, con un aumento de 1 00 x.

Luego de realizar la tinción de las muestras se consideró como muestra positiva aquella en la que se observa al menos un grumo de microsporidios o esporas sueltas, en la muestra de orina o de deposición. Los datos fueron registrados en una ficha diseñada para tal efecto (ver anexo 3).

Las muestras de deposiciones fueron teñidas con la técnica de Cromotropo 2R, se observó: El tamaño de las esporas de microsporidios de 1 a 3 μm . La pared de las esporas que se tiñen de color rosado o rojo en el interior de la espora se observa claro o quizás muestra una barra horizontal o diagonal la que representa al tubo polar. El fondo aparece de color verde, las bacterias y algunas células también se tiñen de color rosado, la forma y el tamaño sirven para diferenciarlos.

Las muestras de orina que fueron teñidas con Quit-Hot Gram Cromotropo, se observaron: las esporas que se tiñen de violeta oscuro, muestran como mínimo uno de los rasgos estructurales característicos de los microsporidios y además se observan esporas como gránulos Gram positivos, contrastado con un fondo rosado y ligeramente verde.

El control positivo que se utilizó corresponde a una muestra (+) utilizada en la rutina del Laboratorio de Referencia de Parasitología del ISP.

Las técnicas de tinción fueron facilitadas por la Sección de Parasitología del Instituto de Salud Pública, donde además se procesaron las muestras. (*)

(*) Supervisión de la Tecnólogo Médico, Licenciado María Isabel Jercic.

Análisis estadístico

La selección de la muestra utilizada, fue dirigida a conejos clínicamente sanos, de distintos orígenes de la Región Metropolitana

El método estadístico utilizado en este estudio fue la de Ji cuadrado para la comparación de positividad a *E. cuniculi* en conejos de la Región Metropolitana, según estado inmunológico y según origen de los conejos.

La Prueba “exacta” de Fisher (Navarro, 1988) utilizada cuando el tamaño de la muestra fue pequeño.

Se utilizó además la Prueba de Bonferroni (Glantz,1997) empleada cuando se comparó muchas veces una proporción.

RESULTADOS:

En la tabla N° 1 se muestra la distribución de las 100 muestras analizadas según su origen, donde el mayor número de muestras provenía del Bioterio del ISP y que correspondían a 50 conejos; y el menor número del Criadero Comercial, con 8 muestras. Lo anterior se distribuye en frecuencias relativas para la muestra en estudio de conejos de distintos orígenes, como se puede observar en el gráfico N° 1.

Se utilizó este n° de individuos, porque dependía de la disponibilidad de conejos de cada origen y de las facilidades con la que sus propietarios entregaron.

Tabla 1: Distribución total de los conejos según el origen de obtención de las muestras.

Origen	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa
Bioterio ISP	50	50%
Mundo Granja	20	20%
Criadero Fliar. Pirque	22	22%
Criadero Comercial	8	8%
Total	100	100%

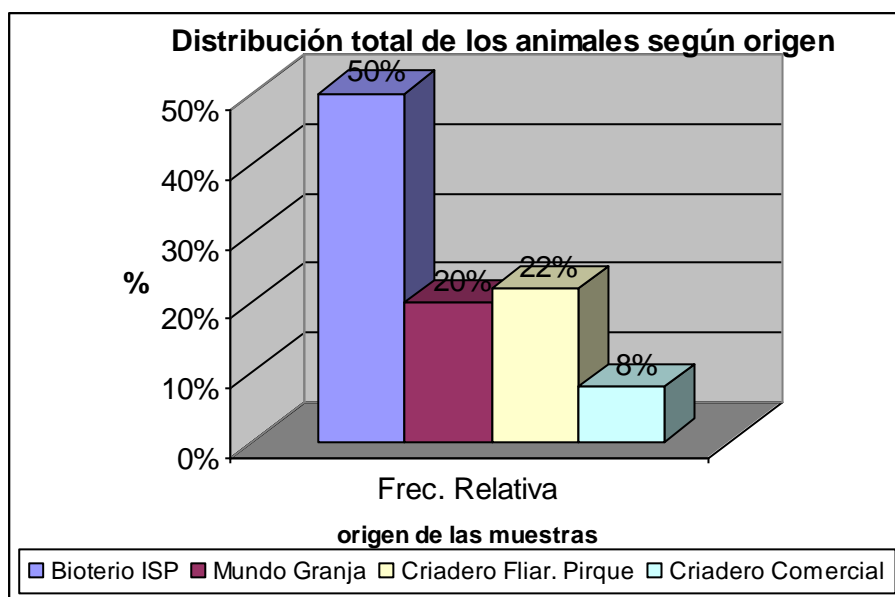


Gráfico N° 1. Distribución de la población total de conejos, según su origen.

La distribución de conejos, sin distinción de su estado inmunológico, sino de, si son positivos o no a *E. cuniculi* o no, según las técnicas de tinción Tricrómicas empleadas, se presentan en la tabla N° 2, donde el 55 % corresponde a individuos positivos a la presencia de *E. cuniculi*. Lo anterior se muestra, también en el gráfico N° 2 .

Tabla 2: Distribución de conejos de criadero positivos a *E. cuniculi* en la Región Metropolitana, por las técnicas de tinción Tricrómicas utilizadas.

<i>Categoría</i>	<i>Frecuencia Absoluta</i>	<i>Frecuencia Relativa</i>
positivos	55	55%
negativos	45	45%
total	100	100%

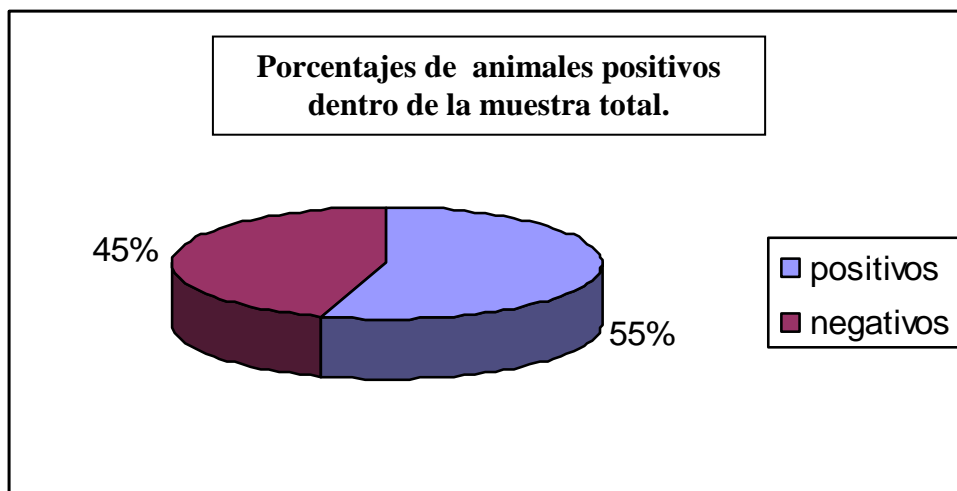


Gráfico N° 2: Porcentajes de conejos positivos y negativos a *E. cuniculi* de la muestra total .

Inmunosupresión:

El efecto de los corticoides administrados a 25 conejos del Bioterio del ISP, se manifestó en una marcada disminución de peso en estos, registrados antes del tratamiento de inmunosupresión y antes de la toma de muestras, como se puede observar en el gráfico N° 3.

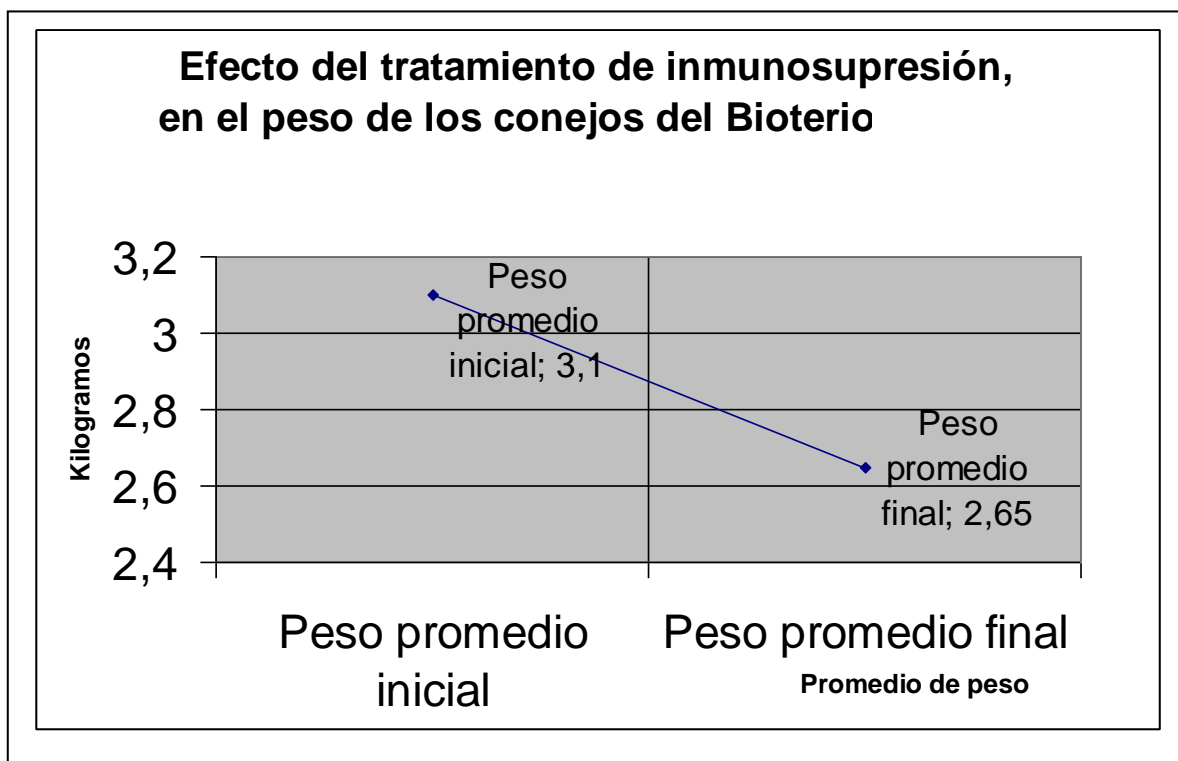


Gráfico N° 3: Disminución del peso promedio inicial, de 3,1 kg. a un peso promedio final de 2,65 kg, por el tratamiento de inmunosupresión en conejos de Bioterio.

Se observó, además, un aumento del consumo de agua y de la micción, en relación a los conejos sin tratamiento.

En la tabla N° 3 se muestran los resultados de positividad al Microsporidio *E. cuniculi*, obtenidas al analizar las muestras de orina y de deposición, según la condición inmunológica de los individuos. El 76% de los conejos inmunosuprimidos fueron positivos a *E. cuniculi* (19/25). En tanto que de los inmunocompetentes este fue de 48 % (36/75).

Tabla N° 3: Resultados de conejos positivos a *E. cuniculi*, según la condición inmunológica en la población total.

Categoría	NºAnimales Positivos	Nº Total de animales	Porcentaje
inmunocomprometidos	19	25	76%
inmunocompetentes	36	75	48%

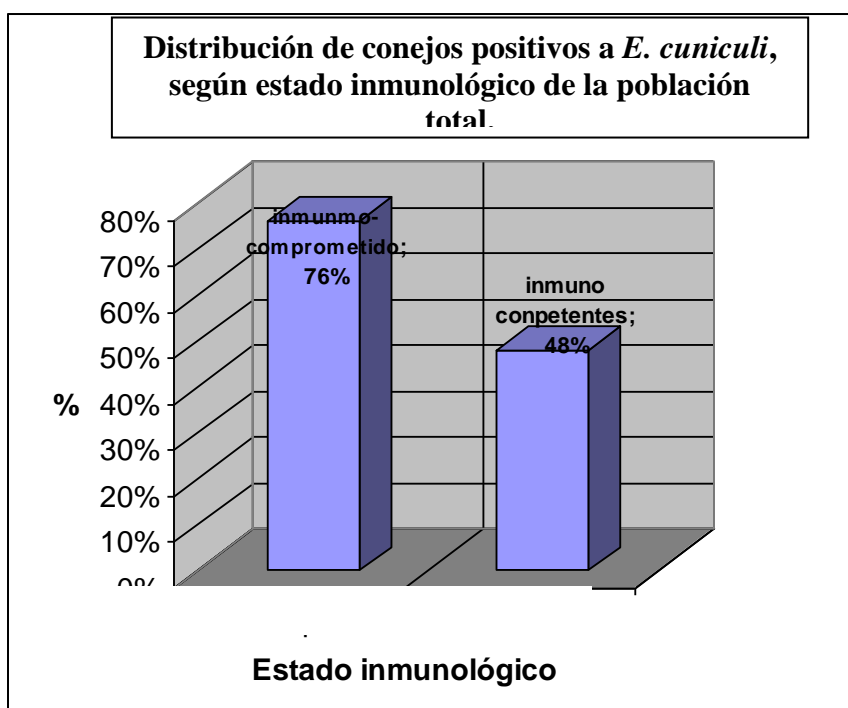


Gráfico N° 4: Distribución de animales positivos a *E. cuniculi*, según estado inmunológico.

La tabla N° 4 muestra en los conejos de Bioterio, la distribución de animales positivos a *E.cuniculi*, con las técnicas de tinción empleadas, según las categorías de estado inmunológico.

Tabla 4: Distribución de animales positivos a *E. cuniculi*, según conejos inmunosuprimidos v/s no inmunosuprimidos en el Bioterio del ISP de Chile.

Categoría	Animales Positivos	Animales Negativos	total
conejos inmunocomprometidos	19	6	25
conejos no inmunocomprometidos	7	18	25
Total	26	24	50

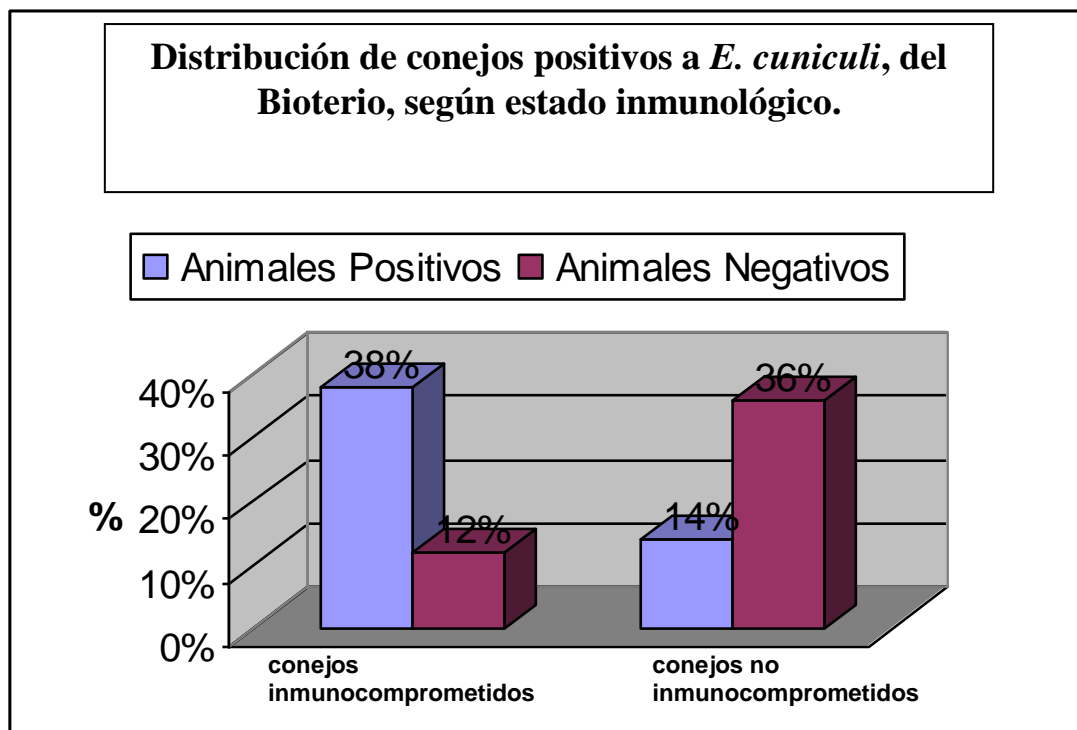


Gráfico 5: Porcentaje de conejos positivos y negativos a *E. cuniculi* en los grupos inmunocomprometidos y no inmunocomprometidos.

En la tabla N° 5, se muestra del total de la población, la distribución de positividad a *E. cuniculi*, según tipo de muestra, deposición u orina. Resultó que en las deposiciones se encontró mayor positividad, donde las muestras de individuos inmunocomprometidos son los más afectados, los que les siguen son los conejos del criadero familiar de Pirque. En muestras de orina la mayor cantidad de muestras positivas se encuentra en los animales inmunocomprometidos, le siguen los de Mundo Granja y Criadero familiar.

Tabla 5: Distribución de conejos positivos a *E. cuniculi*, según muestras de deposiciones u orina, en la población total.

Categoría	Positivos deposición	Positivos orina	Población según origen
Inmunocomprometido (ISP)	18	9	25
No inmunocomprometido (ISP)	7	6	25
Mundo Granja	11	8	20
Criadero Fliar. Pirque	12	8	22
Criadero Comercial	3	0	8
Total	51	31	100

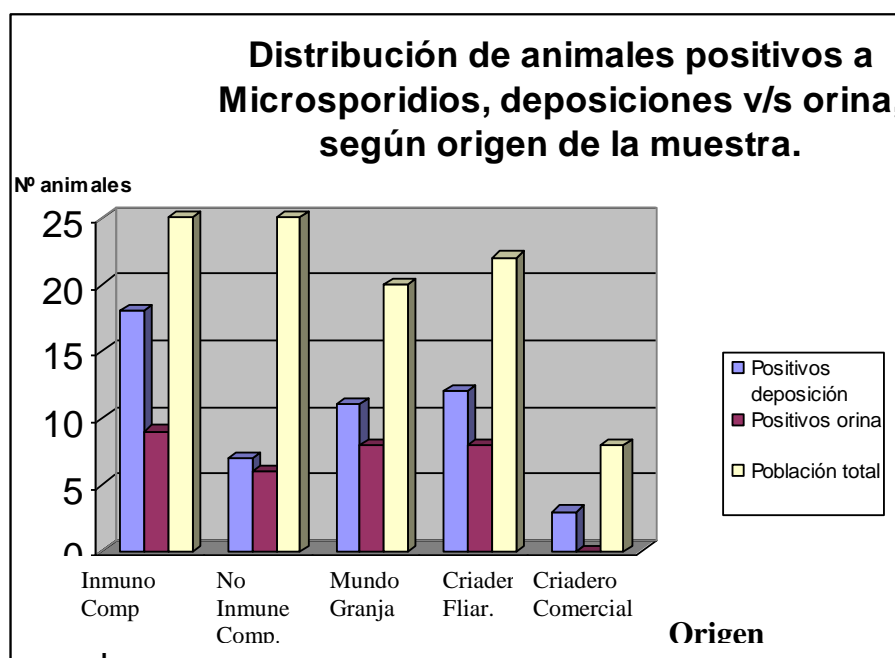


Gráfico 6: Porcentaje de conejos positivos en muestras de deposiciones v/s animales positivos en muestras de orina, según el origen de la muestra.

Del total de conejos positivos a *E. cuniculi* en uno a los dos tipos de muestra, se observó que 4 de ellas sólo fueron positivas a *E. cuniculi* en la muestra de orina. Estos corresponden a:

- 1 individuo inmunocomprometido del Bioterio del ISP de Chile.
- 2 individuos pertenecientes a Mundo Granja.
- 1 individuo perteneciente a un criadero familiar de Pirque.

La distribución de animales positivos a *E. cuniculi*, de acuerdo a las técnicas de tinción utilizadas, según el origen de las muestras, se presenta en la tabla N° 6. En esta tabla se representan los valores de positividad a *E. cuniculi* en los individuos y no según muestra.

Tabla N° 6: Distribución de conejos positivos al Microsporidio *E. cuniculi*, establecido por las técnicas de tinción realizadas en el laboratorio de Referencia de parasitología del ISP, según el origen de las muestras.

Categoría	Nº Positivos	Animales	Nº Total de la muestra
Bioterio ISP (inmunocomprometidos)	19		25
Bioterio ISP (no inmunocomprometidos)	7		25
Mundo Granja	13		20
Criadero Fliar. Pirque	13		22
Criadero Comercial	3		8
Total	55		100

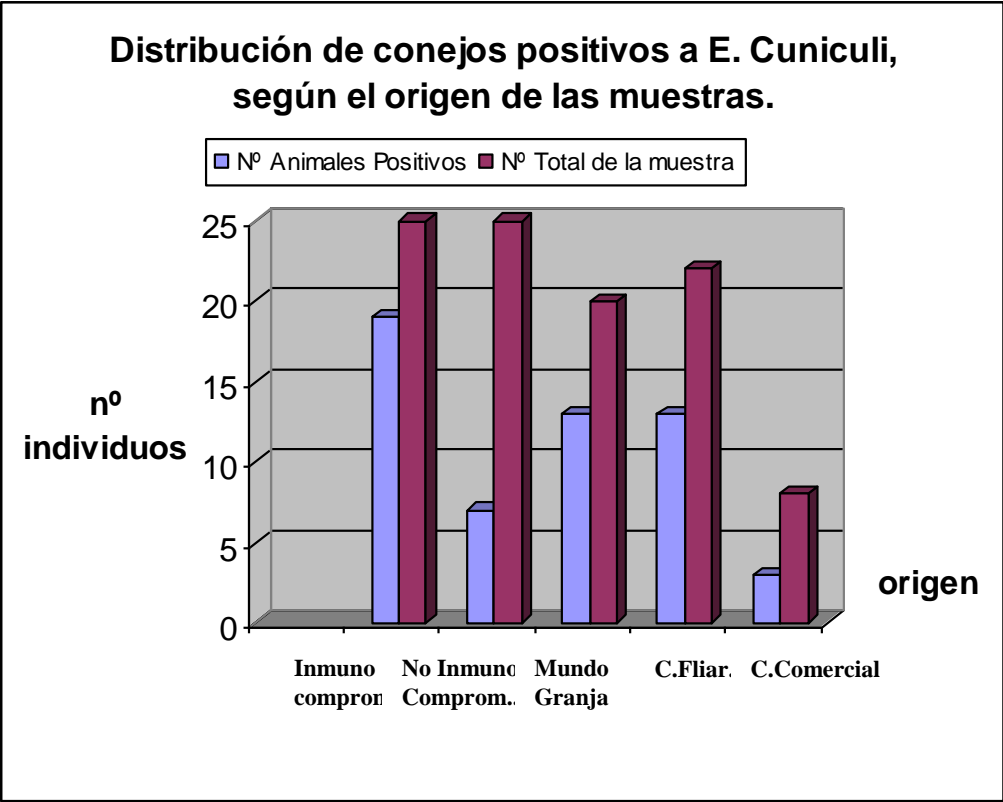


Gráfico N° 7: Distribución de los conejos positivos a *E.cuniculi*, según su origen.

La técnica de Quit-Hot Gram Cromotropo permite visualizar mejor las esporas de microsporidios, en este caso *E. cuniculi*, por la diferencia en contraste de coloraciones en la muestra teñida, en relación a la de Cromotropo 2R

Esto se puede observar en las figuras N° 3 y 4 que corresponden a fotografías obtenidas de muestras positivas para el Microsporidio *Encephalitozoon cuniculi* teñidas mediante la técnica de Cromotropo 2R.

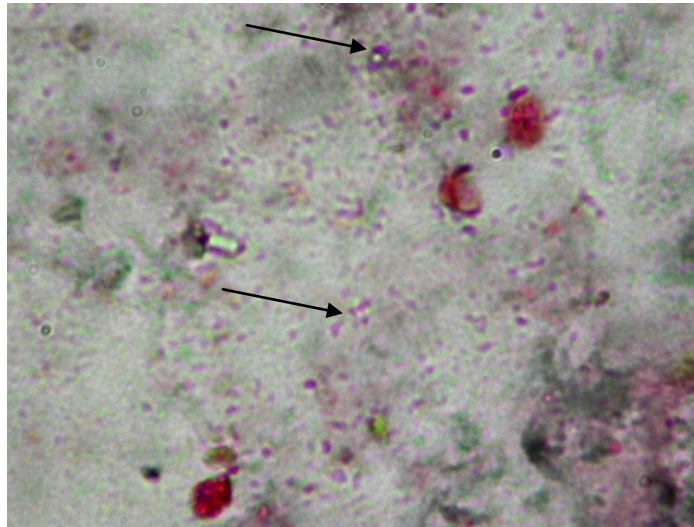


Figura 3: Esporas de *E. cuniculi* en muestra de deposición. Tinción Cromotropo 2R. Aumento de 100X. Cámara Digital NIKON COOLPIX 4.500.

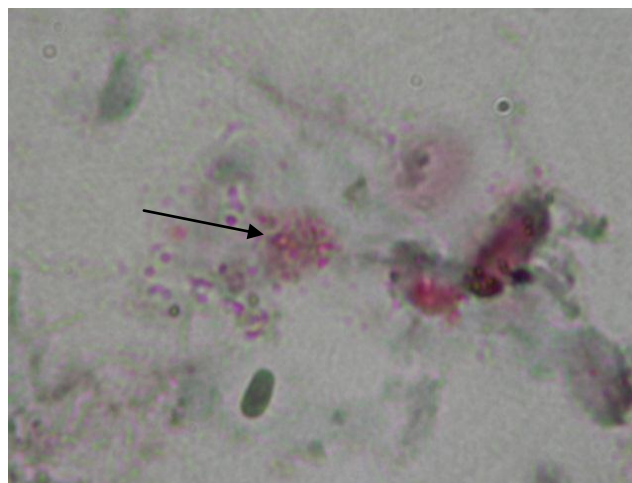


Figura 4: Esporas de *E. cuniculi* en muestra de deposición. Tinción Cromotropo 2R. Aumento 100X. Cámara Digital NIKON COOLPIX 4.500.

Las figuras 5 y 6 corresponden fotografías obtenidas de muestras positivas de deposiciones a *E. cuniculi* y a la utilización de Gram Cromotropo, donde se destaca el pequeño tamaño de las esporas (1 a 2 micras) que adquieren un color violeta. La visualización es posible gracias a un objetivo de 100 X.

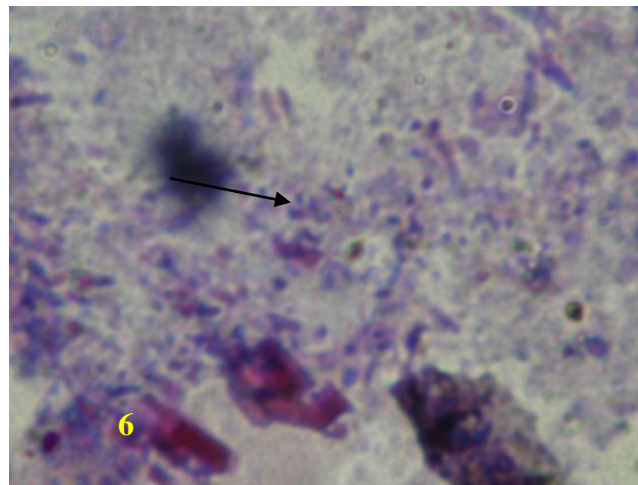
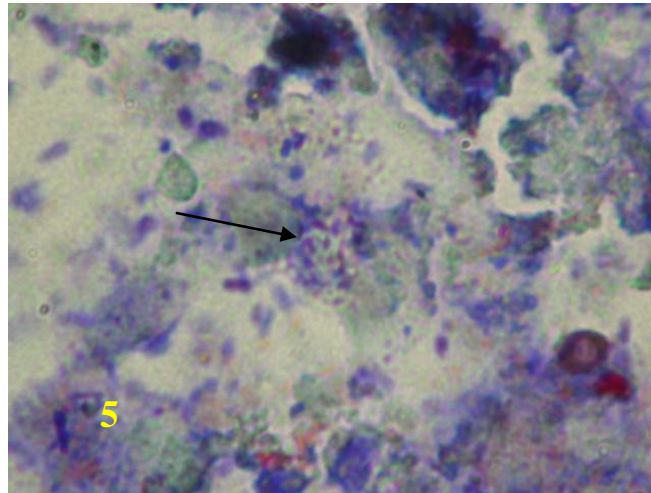
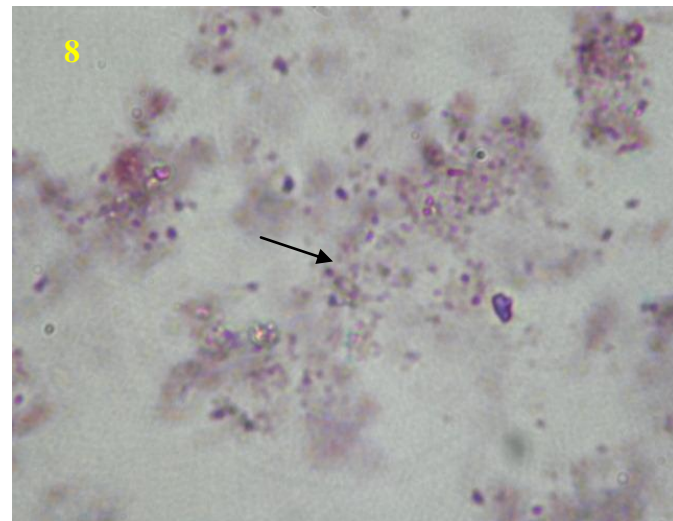
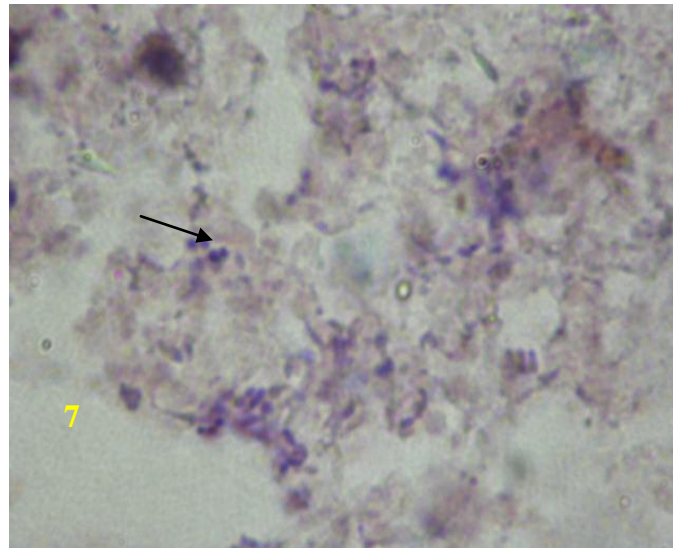


Figura 5 y 6: Esporas de *E. cuniculi* en muestras de deposición. Tinción Gram Cromotropo.

Aumento 100X. Cámara Digital NIKON COOLPIX 4.500.

Las figuras 7 y 8, muestran fotografías de muestras positivas a *E. cuniculi*, teñidas con Gram Cromotropo, donde se aprecia con mayor coloración las pequeñas esporas.



Figuras 7 y 8: Esporas de *E.cuniculi* en muestras de orina. Tinción Gram Cromotropo. Aumento 100 X. Cámara Digital NIKON COOLPIX 4.500.

Análisis de resultados:

Ho: La presencia de Microsporidios *E. cuniculi*, en conejos, no es dependiente del estado inmunológico.

H1: La presencia de Microsporidios *E. cuniculi*, en conejos, es dependiente del estado inmunológico.

En la muestra se determinó la variable estado inmunológico en: inmunocomprometido e inmunocompetente y la variable presencia de *E. cuniculi*, en dos posibles resultados: negativos y positivos a *E. cuniculi*. Se presentan a continuación los valores observados para estas dos variables.

Categoría	Nº Animales		Total
	Positivos	Nº Total de animales	
inmunocomprometidos	19	25	25
inmunocompetentes	36	75	75

Luego de realizar la prueba de Ji-Cuadrado utilizando la información de la tabla anterior, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se observa que Ji^2 calculado es mayor que el Ji^2 crítico, lo que entonces nos hace rechazar la hipótesis nula, se establece entonces que existe una dependencia estadísticamente significativa de la presencia de *E. cuniculi* con el estado inmunológico de la muestra.

Ji- crítico	$Ji^2 =$	3.8416
Ji-calculado	$Ji^2 =$	5.94

$$Ji^2_{[0.05;1]} = (19 \cdot 39 - 6 \cdot 36) \cdot 100 / 55 \cdot 45 \cdot 75 \cdot 25 = 5.94$$

Con un p exacto = 0.014801

$$\begin{aligned} \text{Donde el Intervalo de Confianza 95\% es} &= 0.28 \pm 1.96 \sqrt{0.1824 / 25 + 0.2496 / 75} \\ &= 0.078 \\ &= 0.482 \end{aligned}$$

Ho: La presencia de Microsporidios *E. cuniculi*, en conejos, no es dependiente del origen de la muestra.

H1: La presencia de Microsporidios *E. cuniculi*, en conejos, es dependiente del origen de la muestra.

En la muestra se determinó la variable origen en: inmunocomprometido del Bioterio del ISP, inmunocompetente del Bioterio del ISP, mundo Granja, Criadero familiar de Pirque y Criadero comercial. La variable presencia de *E. cuniculi*, en dos posibles resultados: negativos y positivos a *E. cuniculi*. Se presentan a continuación los valores observados para estas dos variables.

Luego de realizar la prueba de Ji-Cuadrado, con un nivel de significancia $\alpha= 0.05$, se observa lo siguiente: (comparando tablas de 2x2)

- inmunocomprometido del Bioterio del ISP con inmunocompetente del Bioterio del ISP, dando un $Ji^2_{[0.05;1]} = 9.68$ y un $p= 0.001862$
- inmunocomprometido del Bioterio del ISP con mundo Granja, dando un $Ji^2_{[0.05;1]} = 1.4$ y un $p= 0.236$
- inmunocomprometido del Bioterio del ISP con Criadero familiar de Pirque, dando un $Ji^2_{[0.05;1]} = 1.544$ y un $p= 0.214$
- inmunocomprometido del Bioterio del ISP con Criadero comercial, dando un mediante Prueba exacta de Fisher un $p= 0.076$
- inmunocompetente del Bioterio del ISP con Mundo Granja, dando un $Ji^2_{[0.05;1]} = 3.375$ y un $p= 0.066$
- inmunocompetente del Bioterio del ISP con Criadero familiar de Pirque, dando un $Ji^2_{[0.05;1]} = 4.424$ y un $p= 0.035$
- inmunocompetente del Bioterio del ISP con Criadero comercial, dando un mediante Prueba exacta de Fisher un $p = 0.290$
- Mundo Granja con Criadero familiar de Pirque, dando un $Ji^2_{[0.05;1]} = 0.00087$ y un $p= 0.976$
- Mundo Granja con Criadero comercial, mediante Prueba exacta de Fisher un $p= 0.234$
- Criadero familiar de Pirque con Criadero comercial, mediante Prueba exacta de Fisher un $p= 0.234$

Según la Prueba de Bonferroni, como se está usando un $\alpha = 0.05$, pero por haber utilizado muchas veces una misma proporción, debemos dividir el $\alpha = 0.05$, por el número de comparaciones y sólo serán significativos aquellos “p” que sean menores que 0.005.

Es así que, la única comparación que da un $p < 0.005$, es inmunocomprometido comparado con inmunocompetente, que provienen del Bioterio del ISP, lo que entonces nos hace establecer que no existen dependencia estadísticamente significativa entre los distintos orígenes de procedencia de las muestras con la presencia de *E. cuniculi*.

DISCUSIÓN

Los conejos incluidos en este estudio correspondieron a grupos de distintos orígenes, con el fin de pesquisar *E. cuniculi* en distintos sistemas de crianza y abarcar así una población más diversa, como se observa en el gráfico 1. Además, se consideraron las cantidades de conejos que allí se muestran, por la disponibilidad que ofrecían los distintos lugares de obtención de muestras.

La distribución de conejos positivos a *E. cuniculi*, que se muestra en la tabla N° 2, corresponde al 55 % de los 100 animales muestreados, donde en este porcentaje se incluyeron a los conejos sometidos a inmunosupresión, puesto que si bien estuvieron bajo un tratamiento que controlaba su estado inmunológico, su condición sigue siendo de positividad.

El tratamiento de inmunosupresión fue realizado con la finalidad de obtener una disminución del sistema inmunológico de 25 conejos provenientes de Bioterio. Es necesario determinar que no se buscó que los animales enfermaran, sino sólo que si poseían microsporidios, éstos se multiplicaran y fueran eliminados a través de las deposiciones u orina (Botero y Montoya, 2002). Para esto se les administró un tratamiento de inmunosupresión por un período de tres días, inferior al acostumbrado de 10 días, generalmente utilizado para experiencias con *Pneumocystis carinii* en ratón (Rudolph *et al*, 1996). La inmunosupresión produjo una disminución de peso notorio, entre el inicio del tratamiento y el principio de la toma de muestras, que se observa en el gráfico N° 3.

Sin embargo, estos conejos inmunosuprimidos se observaron por un período de un mes luego de realizado el tratamiento, para corroborar o no la manifestación de la enfermedad.

Un factor importante, que se evidenció en este trabajo fue el estado inmunológico de los conejos, influyó en la aparición de *E. cuniculi*, en la muestra, observándose una dependencia estadísticamente significativa de la presencia de *E. cuniculi* con el estado inmunológico de los conejos incluidos en la muestra. Esto se presenta en el trabajo

realizado por María Anete Lallo, donde se analizaron resultados obtenidos a partir de la inoculación experimental de *E. cuniculi* en ratones, donde reveló que existe diferencia significativa en el establecimiento de la infección entre animales sometidos a tratamiento de inmunosupresión y a no inmunosuprimidos, siendo los primeros los que mostraron más susceptibilidad a la infección (Lallo *et al*, 2002).

Se pudo apreciar además, de cómo el origen de la muestra influye en la presencia de *E. cuniculi*, quedando en claro mediante las pruebas estadísticas realizadas, que la única diferencia significativa correspondió entre los conejos del Bioterio inmunocomprometidos v/s inmunocompetentes ($p < 0.005$), mientras que no existe diferencias significativas entre criaderos de distintos orígenes. Por lo tanto, las distintas estancias de manejo y crianza de los conejos no determina la presencia del microsporidio. Es por esto que el Bioterio, no se excluye de la presencia de *E. cuniculi*, evidenciando que a pesar de las medidas de manejo sanitario a las que se somete el recinto, esto no basta para que la diseminación de estos parásitos se presente.

Existieron muestras de deposiciones positivas, en animales, donde la muestra de orina del mismo individuo fue negativa, lo que puede indicar dos situaciones:

- Que la muestra de orina tiene, para el método utilizado dificultades en la fijación al porta objeto.
- Que el microsporidio esté cursando una fase del ciclo parasitario, donde aún no llega a invadir el sistema urinario (Harcout-Brown y Holloway, 2003).

Además, existieron 4 muestras de orina positivas, en la que no se presentó positividad en la muestra de deposición del individuo respectivo, lo que podría indicar que el parásito este cursando una fase del ciclo, en la cual su multiplicación no es en el sistema digestivo, sino en el sistema urinario (Dykes y Davies, 2004).

Como se ha mencionado anteriormente, el diagnóstico de microsporidios, es muy dificultoso, aún más cuando no se tiene mayor conocimiento, como es el caso de *Encephalitozoon cuniculi*. A esto se le suma el pequeño tamaño de la espora, de 1 a 2 micrones y, por lo tanto, su difícil observación (Acha y Szyfres, 2003).

La búsqueda de esporas mediante, tinciones específicas, como: modificación a la coloración del Cromotropo de Gomori. (Moncada y Romero de Pérez, 1998), Quick-hot

Gram-Cromotrope (Moura *et al*, 1997), se realiza preferencialmente en deposiciones u orina, porque no es invasor y la obtención de la muestra es más fácil.

En este estudio, como se puede observar en las figuras de la 5 a la 8; se empleó la técnica de Quick-hot Gram-Cromotrope en una mayoría de las muestras, ya que es una prueba de coloración donde la sensibilidad y especificidad son ligeramente superiores a la técnica de coloración Cromotrope 2R; además es una prueba más rápida, sencilla desde el punto de vista técnico y económica (Botero y Montoya, 2002). Esto no indica que coloreen más esporas, sino que produce un mayor contraste en la visualización de la muestra.

Es necesario mencionar que las técnicas aquí utilizadas pueden complementarse con otras técnicas de laboratorio, como por ejemplo el método de tinción por fluorescencia, mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos o la técnica donde se emplea calcofluor y luego se observan al microscopio de fluorescencia (Botero y Montoya, 2002).

Este estudio, aporta datos importantes sobre la presencia de *Encephalitozoon cuniculi* en conejos provenientes de la Región Metropolitana.

Se logró determinar y registrar por primera vez en Chile, mediante las técnicas de tinción tricrómicas utilizadas en laboratorio, la presencia de este parásito zoonótico, en las muestras de los conejos estudiados.

La información actual de esta condición puede servir para iniciar otras investigaciones que produzcan nuevos hallazgos, con el fin de obtener un cuadro global que señale ampliamente y con más detalles, la situación que presenta nuestro país con respecto a la microsporidiosis.

Se puede señalar entonces, que este estudio servirá tanto a medicina veterinaria como para medicina humana, lo que permitirá realizar un mejor diagnóstico clínico e identificar fuentes de contaminación.

CONCLUSIONES

1. Los estudios realizados en el extranjero, muestran una prevalencia desde un 15 a un 75 %, por lo que los datos obtenidos se encuentran dentro de estos parámetros.
2. El porcentaje encontrado de 55 % animales positivos a microsporidiosis y el hecho de que estas infecciones pueden llegar a causar severos daños al ser humano, hace necesario realizar diagnósticos más certeros de esta parasitosis, es por esto que en este trabajo se propuso la tinción de Cromotrope 2R y Quick-Hot Gram Cromotrope, para las muestras de deposiciones y orina.
3. Tomando en consideración que el objetivo de este estudio era pesquisar la presencia del microsporidio *E. cuniculi*, los cuales fueron encontrados, se considera la hipótesis como verdadera.
4. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.005$) entre las muestras positivas entre los distintos orígenes de los conejos.
5. Los conejos inmunocomprometidos, fueron los que presentaron la mayor cantidad de muestras positivas, el cual fue el objetivo del tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- ACHA, P.; SZYFRES, B.** 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ª ed. Publicación Científica y Técnica N° 580 OPS/OMS. v. 3.
- ANSBACHER, L.; NICHOLS, M.; HAHN, A.** 1988. The influence of *Encephalitozoon cuniculi* on neural tissue responses to implanted biomaterials in the rabbits. Lab. Anim. Sci. 38 (6): 689-695.
- BOTERO, J.; MONTOYA, M.** 2002. Microsporidiosis intestinal: una visión integral. [en línea].
<http://66.102.7.104/search?q=cache:UiCrtJTxqjCJ:www.infectio.org/pdf/vol6/n4/V6N4_2002_ARTICULO03.pdf+gram%2Bcromotropo&hl=es>. [Consulta: 17-01-2006]
- CALI, A.; TAKVORIAN, P.M.; LEWIN, S.; RENDEL, M.; SIAN, C.; WITTNER M.** 1996. identification of a new *Nosema*-like microsporidian associated with myositis in an AIDS patient. J. Euk. Microb. 43: 108.
- CHINCHILLA, C. M; REYES, L. L.; GUERRERO, B. O.; CASTRO, C.A.** 1998. Microsporidiosis: una parasitosis de reciente adaptación al hombre. Rev. Cost. Cienc. Méd. 19 (3-4):209-221.
- DIER, E.S.; VOSSBRINK, C.R.; BAKER, M.; ROGERS, L.; BERTUCCI, D.** 1995. Identificatrion and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. Parasit. 111: 411-421.
- DYKES, L.; DAVIES, O.** 2004. *Encephalitozoon cuniculi*. [en línea]. <<http://www.houserabbit.co.uk/rwf/articles/ecuniculi.html>>. [consulta: 22-03-2005]
- DEL ÁGUILA, C.; IZQUIERDO, F.; NAVAJAS, R.; PIENIAZEK, N.J.; MIRO, G.; ALONSO, A.I.; DA SILVA, A.J.; FENOY, S.** 2004. *Enterocytozoon bieneusi* in animals: rabbits and dogs as new hosts. J. Euk. Microbiol. 46: 8-9.
- FERNÁNDEZ, N.; COMBOL, A.; ZANETTA, E.; ACUÑA, A.M.; GEZUELE, E.** 2002. Primer diagnóstico de microsporidiosis humana en Uruguay. Rev. Méd. Urug.18: 251-255.
- FISHER, P.** s.f. *Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*) in rabbits. [en línea].

< <http://www.petcarevabeach.com/ecun.html> > [consulta: 02-05-2006].

FUENTEALBA, I. C.; MAHONEY, N. T.; SHADDUCK, J. A.; HAVILL, J.; WICHER, V. 1992. Hepatic lesions in rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi* administered per rectum. [en línea]. Vet. Path. 29 (6): 536-540.

< <http://www.vetpathology.org/cgi/content/abstract/29/6/536> > [Consulta: 22-03-2005].

GLANTZ, S. 1997. A primer of Biostatistics. 4ª ed. Mc Graw Hill. New York. pp. 98-99.

HARCOUT-BROWN, F. M.; HOLLOWAY, H. K. R. 2003. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. Vet. Rec. 52: 427-431.

HERNÁNDEZ, R.; FERNÁNDEZ, C.; BAPTISTA, P. 1998. Metodología de la investigación. 2ª ed. Mc Graw Hill. México D.C., México. pp.197-198.

LALLO, M.; DO SANTOS, M.; FERNANDES, E. 2002. Experimental *Encephalitozoon cuniculi* infection in dexamethasone-immunosuppressed mice. Rev. Saúde. Públ. 36 (5): 621-626.

MONCADA, L.; ROMERO DE PÉREZ, G. 1998. Microsporidios en humanos. Bioméd. 18(3): 199-215.

MOURA, H.; SCHAWARTZ, D.A.; BORNAY-LLINARES, F. ET AL. 1997. A new and Improved « Quit-Hot gram-Chromotrope » The technique That Differentially Stains Microsporidian Soprores in Clinical Samples, Including paraffin-embedded tissue sections. Arch. Pathol. Lab. Med. 121: 888-893.

NAVARRO, R. 1988. Introducción a la bioestadística-Análisis de variables binarias. 1ª ed. Mc Graw Hill. México D.F., México. pp.88.

NICKLAS, W.; HOMBERGER, F.; ILLGEN-WILCKE, B.; JACOBI, K.; KRAFT, V.; KUNSTYR, I.; MÄHLER, M.; MEYER, H.; POHLMeyer-ESCH, G. 1999. Implications of infectious agents on results of animal experiments. Lab. Anim. 33 (1): 81-83

RODRÍGUEZ, B.J.; CAÑAS, L.; ZAPATA, M.; ÁLVAREZ, L.; RICO, S.; GARAY, F. 2001. Evaluación anatomopatológica de riñones lepóridos 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.

- RUDOLPH, R.J.; VARGAS, S.; ROMERO, S.; CERVA,J; LATORRE, J.**1996.Inducción de pneumonia experimental por *Pneumocistis carinii* con betametasona oral. Parasitología. Al Día.20:97-99.
- RUSSELL, R.J.; SCHILLING, P.W.** 1988. Temas Seleccionados sobre Medicina de Animales de Laboratorio: El Conejo. 3ª Ed. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.
- SCAGLIA, M.; SACCHI, L.; GATTI, S.** 1994. Isolation and identification of *Encephalitozoon hellem* an Italian AIDS patient with disseminated microsporidiosis. APMIS. 102: 817-827.
- SUTER, C.; MULLER-DOBLIES, U.U.; HATT, J.-M.; DEPLAZES, P.** 2001. Prevention and Treatment of *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits whit febendazole.Vet. Rec . 148: 478-480.
- STEVEN, H.; RONALD, E.; ALAN, L.** 1974. The biology of the laboratory rabbit. 3ª ed. Academic Press. INC. Orlando, EE.UU. pp. 156-160.
- VÁSQUEZ, O.; RODRÍGUEZ, R.; CAMPOS, T.; MORA, M. A.; AGUIRRE, E.; YAMAZAKI, M.; VALENCIA, S.; MARTINES, I.** 2001. Microsporidiosis generalizada por *Encephalitozoon sp.* en un paciente pediátrico con enfermedad de Bruton. [en línea]. Bol. Chil. Parasitol. 56 (1-2):16-21.
<http://www.scielo.../scielo.php?pid=s0365-94022001000100005&script=sci_arttext&tlng=e> [consulta: 22-03-2005].
- WEBER, R.; BRYAN, R.** 1994. Microsporidial infections in immunodeficient and immunocompetent patient. Clin. Infec. Dis. 19: 517-521.
- WEBER, R.; BRYAN, R.; SCWARTZ, D.A.; OWEN, R.L.** 1994. Human microsporidial infections. Cli. Microb. rev. 7: 426-461.

ANEXOS

Anexo 1

Técnica para el diagnóstico de *Microsporidium spp.*

Tinción Tricrómica modificada (Cromotrope 2 R).

1. Principio

El diagnóstico de *Microsporidium spp* se ha realizado por medio de procedimientos invasivos y el posterior examen de la biopsia usando métodos de microscopía electrónica. Sin embargo, la necesidad de realizar un método para el laboratorio de rutina llevó al desarrollo de métodos tintoriales que sirvieran para dicho propósito.

El método de tinción aquí descrito se basa en la factibilidad de que tiene el colorante para penetrar las esporas de *Microsporidium spp.*

2. Reactivos

Cromo-Tropo 2R

Light green SF yellowish (Verde brillante)

Ácido fosfotúngstico p.a.

Ácido acético glacial 100% p.a.

Alcohol etílico 90%, 95% y 100%

Agua destilada

3. Materiales

Coplin

Pipetas graduadas

Pisetas 2 vasos precipitados de 200 ml

1 malla de bronce fosfórico

Portaobjetos

Pipetas Pasteur

Mortero

Pipeta graduada de 5 ml

Matraz de aforo de 100 ml

4. Preparación de Reactivos

4.1. Solución de Cromotropo (preparación 50 ml)

- 3,0 gr. de Cromo Tropo 2R
- 0,075 gr. de Verde Brillante
- 0,35 gr. Ácido fosfotúngstico
- 1,5 ml Ácido acético glacial 100%

Mezclar macerando los activos.

Dejar reposar 30 min., protegido de la luz con papel aluminio, luego agregar 50 ml de agua destilada.

Proteger la solución de la luz envolviendo el matraz en papel aluminio.

4.2. Alcohol Ácido

- 995.5 ml Alcohol etílico 90%
- 4.5 ml Ácido acético glacial

5. Muestra

La muestra puede ser fresca o preservada en fijador PAFS, formalina al 5 % o 10%, SAF, etc.

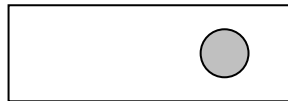
6. Preparación de Frotis

Se procesa la muestra al igual que para el Método de Burrows hasta la fase trofozoítica, es decir:

- 1) Numerar el tubo de 50 ml que contiene la muestra de deposición, con un mismo número.
- 2) Numerar 2 portaobjetos, 2 vasos y un tubo de centrifugación con el mismo número.
- 3) Abrir los frascos y agregar solución salina, teniendo la precaución de efectuar una buena dilución y homogenización de las muestras, con el fin de dar la oportunidad a los elementos parasitarios que se liberen de la deposición.
- 4) Tamizar la solución a través de la malla buscando parásitos macroscópicos.
- 5) Colocar aproximadamente 10 ml de la solución tamizada en el tubo de centrifuga numerado.

- 6) Centrifugar por 4 minutos entre 1500 y 1800 revoluciones por minuto (r.p.m.)
- 7) Eliminar el sobrenadante invirtiendo el tubo.
- 8) Resuspender el sedimento en solución salina isotónica hasta completar aprox. 10 ml.
- 9) Centrifugar nuevamente, como en 6.
- 10) Repetir 6, 7 y 8 hasta obtener un sobrenadante relativamente limpio.

- Se realiza un extendido con una gota de deposición, sacada del sedimento en un extremo del portaobjeto.
- Se deja secar a temperatura ambiente o en estufa a 60 °C.



7. Desarrollo del proceso

- 7.1. La tinción se realiza en coplin, a los cuales se les coloca primero el reactivo para luego sumergir los portaobjetos con la muestra.
- 7.2. Teñir en tinción cromo-tropo por 90 minutos. Este coplin debe estar protegido de la luz por papel aluminio.
- 7.3. Lavar con agua destilada con chorro de piseta.
- 7.4. Lavar en alcohol ácido por 10 segundos.
- 7.5. Lavar con alcohol 95%, breve.
- 7.6. Deshidratar en alcohol 100% por 5 minutos.
- 7.7. Deshidratar en alcohol 1005 por 10 minutos.

8. Lectura de las láminas teñidas

Se requiere de personal adecuadamente capacitado para la realización de esta técnica, por la dificultad para identificar estos parásitos.

Se deben observar los frotis con lente de inmersión aumento 100X, la muestra debe recorrerse completamente.

El tamaño de las esporas de microsporidios es de 1 a 3 μm . La pared de las esporas deben teñirse rosado o rojo en el interior de la espora se observa claro o quizás muestra una barra horizontal o diagonal la que representa al tubo polar. El fondo aparecerá de

color verde, las bacterias y algunas células también se tiñen de color rosado, la forma y el tamaño sirven para diferenciarlos.

Los resultados deben sólo ser informados cuando el control positivo resulte aceptable.

9. Informe de resultados

En muestras de deposiciones y también de orina.

10. Control de calidad

- Se deben incluir cada vez que se realiza la tinción un Control biológico positivo, particularmente, si se usa en forma frecuente y cada vez que se cambien los reactivos.
- Se debe chequear la fijación antes de comenzar la tinción, macroscópicamente, percatándose de observar la preparación en el portaobjeto.
- Se debe usar un microscopio calibrado poder medir los elementos observados.
- Los resultados del Control de calidad deben quedar adecuadamente registrados.

Anexo 2

Tinción de Quick-hot Gram-Cromotropo (Moura *et al*, 1997).

Primero se realiza la tinción de **Gram** de la siguiente manera:

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

Seguidamente se hace la tinción con cromotropo como sigue:

6. Sumergir las placas en cromotropo caliente (50-55°C), durante dos minutos.
7. Decolorar con alcohol ácido durante tres segundos.
8. Deshidratar con alcohol etílico al 95% durante 30 segundos.
9. Deshidratar dos veces (30 segundos cada vez), con alcohol etílico puro.
10. Dejar secar y montar con Cytosel 60 (Stephens Scientific) o similar.

Soluciones utilizadas en los métodos de tinción

Solución de Cromotropo (Modificada por Moura y col, 1996).

Chromotropo 2R	1.0 g
Fast Green	0.15 g
Ácido fosfotúngstico	0.25 g
Ácido acético glacial	3.0 ml
Agua destilada csp	100 ml

Solución alcohol-ácido.

Alcohol etílico al 90%	995.5 ml
Ácido acético glacial	4.5 ml

Solución de cristal violeta

Cristal violeta	0.5 g
Oxalato amónico	0.8 g

Metanol	20 ml
Agua destilada csp	100 ml

Solución decolorante

Acetona	50 ml
Alcohol etílico al 95%	50 ml

Solución lugol

Cristales de yodo	0.33 g
Ioduro potásico	0.66 g
Agua destilada csp	100 ml

Anexo 3

**Protocolo de trabajo
Observación Microscópica**

Nombre del examen : Encephalitozoon cuniculi
Parasitosis : Microsporidiosis
Observador : Carolina Marchant
Fecha : _____ **Control:** _____

N° registro	Resultado muestra deposición	Resultado muestra orina	<u>Observación</u>

A mis padres con amor

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todos aquellos que especialmente en estos años de universidad influyeron en mí crecimiento como alumna y ahora como profesional.

Quiero agradecer a Vania, porque si no fuera por nuestro sueño de niñas hoy no sería una realidad.

Agradecer profundamente al Dr. Sergio Romero Medel quién confió en mí, me obsequió muchos de sus conocimientos y me brindó todo su apoyo.

A mis padres, Rosita y Rodolfo, que con todo su esfuerzo y sobretodo con muchísimo amor han apoyado todas mis decisiones, acompañándome en los dulces y amargos momentos.

A mis hermanitos, Soledad y Alexis, por todo su amor y paciencia, porque ahora a la distancia se han fortalecido nuestros lazos.

A todos mis amigos, que me han acompañado hasta en los momentos más difíciles, siempre apoyándome y queriéndome. Primero comienzo por mi clan: Lore, Tere, Lulú y Danny.

A mis amigos de la universidad por los difíciles, pero hermosos años de estudio: Francisca Plaza, Pía Morales, Caro Durán, Coty Ruiz, Joselyn Mosquera, Walter Rivas, Felipe Pino, Mariel Jara, Caro Moreno, Pame Muñoz y Claudia Santander; quienes me apoyaron siempre.

Todos mis agradecimientos a la Universidad, a los profesores y auxiliares que hicieron durante estos 5 años de la Facultad mi hogar.

Agradecer sinceramente al Instituto de Salud Pública de Chile, que hizo posible este estudio, y en especial a la sección de Parasitología, a la Sra. María Isabel Jercic Licenciado Tecnólogo Médico, Cyntia, Rommy, Claudio, Bethy, Jose Luis y Roberto; quienes me ayudaron en la elaboración de este estudio y me brindaron su amistad.

Agradecer por su puesto a mi compañero y amigo por tantos años; Rodrigo Valenzuela, por darme todo su amor y apoyo, por creer en mí.