

## Prevalencia de microsporidios en orinas de pacientes referidos para urocultivo en la Región Pacífico Central

Idalia Valerio-Campos,<sup>1</sup> Randolph Cedeño-Saldaña,<sup>1</sup> Marisela Umaña-Bolaños<sup>1</sup>, Misael Chinchilla-Carmona<sup>1</sup>

**Justificación:** La mayoría de las infecciones por microsporidios en el ser humano se han reportado en el tracto gastrointestinal, sin embargo, es posible hallarlos parasitando otros sitios anatómicos como el tracto genitourinario, en donde las patologías pueden variar desde uretritis hasta falla renal. Tradicionalmente esas infecciones se deben al género *Encephalitozoon*, parásito contra el cual el Albendazol ha demostrado ser un medicamento efectivo.

**Objetivo:** Determinar la prevalencia de microsporidios en personas que son referidas al laboratorio para urocultivo, dados los antecedentes clínicos que presentan.

**Métodos:** El procesamiento de las muestras incluyó su toma con técnica aséptica, su cultivo en los medios de Agar Sangre, MacConkey y Manitol – sal para su estudio por presencia de bacterias y/u hongos y la realización del antibiograma, según los parámetros establecidos por la CCSS para los urocultivos. Adicional a esto se centrifugó una alícuota de 9 ml separando 50 microlitos del sedimento urinario, al cual se le añadió igual volumen de KOH al 5%. Se hicieron frotis los cuales se fijaron con alcohol metílico una vez secos, y se tiñeron con la técnica tricrómica de Weber, obviando el paso de la decoloración y la deshidratación.

**Resultados:** Se encontró un 25% de orinas positivas por microsporidios. Los pacientes con edades entre 26 y 55 años presentaron mayor positividad.

**Conclusiones:** El porcentaje de prevalencia encontrado (25%) y el hecho de que estas infecciones pueden llegar a causar severos daños al ser humano, hacen imperativa la necesidad de realizar diagnósticos más certeros de esta parasitosis, para lo cual proponemos la tinción de Weber con la modificación presentada en este trabajo para el diagnóstico de las infecciones por microsporidios en el tracto urinario.

**Descriptores:** Microsporidios, urocultivo, diagnóstico, epidemiología

Recibido: 24 de septiembre, 2001

Aceptado para publicación: 11 de enero, 2002

Los microsporidios, protozoarios ubicuos, reconocidos como parásitos intracelulares obligados, pueden infectar tanto organismos invertebrados como vertebrados<sup>1,3</sup>. Fueron

descritos por primera vez en 1857 como parásitos de artrópodos, y Matsubayashi y colaboradores reportan la primera infección en humanos en 1959<sup>4</sup>. Estas infecciones, sin embargo, se consideraron cuadros poco comunes hasta 1985, cuando la epidemia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) produjo un aumento en el número de los pacientes inmunodeficientes y, consecuentemente, en las infecciones por parásitos oportunistas como los microsporidios<sup>5</sup>. Hoy estos parásitos constituyen un problema de salud pública, tanto para personas inmunocompetentes como inmunodeficientes, presentándose en éstos últimos, cuadros clínicos mucho más severos<sup>6</sup>. Por tradición, las infecciones por microsporidios se han asociado con el tracto gastrointestinal (*Enterocytozoon bienewisi* y *Encephalitozoon intestinalis*)<sup>7</sup> y a los tejidos oculares (*Microsporidium sp.* y *Vittaforma cornea*). Además, es bien sabido que pueden afectar otros órganos y tejidos del organismo como músculo, hígado y riñón, e incluso causar in-

**Abreviaturas:** CCSS, Caja Costarricense de Seguro Social, VIH, Virus de Inmunodeficiencia Humana, KOH, Hidróxido de Potasio, ITU, Infección del Tracto, col, colaboradores.

<sup>1</sup> Cátedra de Parasitología Médica, Departamento de Investigación, Escuela Autónoma de Ciencias Médicas de Centroamérica "Dr. Andrés Vesalio Guzmán" Universidad de Ciencias Médicas. Servicio de Cirugía, Hospital Monseñor Sanabria, Caja Costarricense de Seguro Social, Microbióloga, Región Pacífico Central. Costa Rica, América Central.

**Correspondencia:** Idalia Valerio Campos, Departamento de Investigación, Universidad de Ciencias Médicas. Apartado postal 638-1007, Centro Colón, San José, Costa Rica.

fecciones diseminadas, las cuales son producidas principalmente por *Encephalitozoon hellen* <sup>6,8</sup>. Más información sobre esta parasitosis se encuentra en el trabajo de Chinchilla y colaboradores <sup>9</sup>.

En 1997 se informó de la primera infección por microsporidios en Costa Rica <sup>10</sup>. A partir de ese momento y gracias a técnicas de tinción especiales que permiten detectarlo al microscopio de luz, cada vez son más frecuentes los reportes de este parásito en nuestro país, circunscritos sobre todo a los hallazgos en muestras de heces provenientes en su mayoría de pacientes que consultan por infecciones diarreicas <sup>5,10</sup>.

Dado lo anterior, el objetivo de este trabajo es determinar la prevalencia de microsporidios en muestras de orina de pacientes referidos al laboratorio clínico para urocultivo, por medio de la técnica tricrómica de Weber, previo tratamiento de las muestras con KOH.

## Métodos y materiales

### Pacientes

Se seleccionaron aquellos que fueron referidos al laboratorio clínico para practicarse un urocultivo y manifestaron su conformidad de que a la misma muestra se le realizara la tinción de Weber para detectar microsporidios.

### Selección de las muestras

Todas las muestras por estudiar fueron recolectadas por los pacientes o sus encargados (en el caso de los niños), según los lineamientos establecidos por los Laboratorios Clínicos de la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS), para la recolección de orinas para urocultivo (técnica aséptica).

### Procesamiento de las muestras

De cada una de las muestras de orina tomadas con técnica para urocultivo se separó una alícuota de 9 ml. La orina fue depositada en tubos de ensayo estériles, con su tapón de hule. Estas alícuotas se guardaron en refrigeración por un lapso no mayor de tres días, hasta ser procesadas por microsporidios. Todas las muestras se cultivaron en los medios tradicionales para urocultivo y se seleccionaron para la tinción tricrómica aquellas cuyo resultado indicaba que no había contaminación por materia fecal. Paralelamente se anotó el pH, la presencia de leucocitos y el diagnóstico previo determinado por el médico.

### Determinación de la influencia de la alcalinización de las muestras en la tinción de Weber

Cinco de las muestras recolectadas con técnica aséptica en frasco estéril, se procesaron de la siguiente manera. A 200 microlitros de sedimento urinario se les agregó igual volumen de KOH al 5%; luego de homogenizar ambas, se procedió a hacer un extendido que se secó al aire para su posterior fijación en alcohol metílico por 5 minutos, y se tiñó 90 minutos con el colorante de la tinción tricrómica <sup>11,12</sup>. Tras el paso de la coloración se lavó con abundante agua y se dejó secar al aire. Las muestras así tratadas se observaron a 100X en busca de las esporas y se compararon los resultados con las mismas

muestras, procesadas según la técnica de Weber y colaboradores <sup>12</sup>. Adicionalmente se prepararon sendos extendidos de una suspensión de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, los cuales se procesaron de las dos maneras mencionadas y se observaron a 100X.

### Tinción de las muestras y criterios de positividad

Se seleccionaron para estudio por microsporidios, aquellas muestras cuyo urocultivo no mostró signos de contaminación bacteriana ni fúngica provenientes del tracto gastrointestinal o externo, procesándose la totalidad de las muestras de la siguiente manera:

1. Se centrifugó la alícuota de 9 ml de orina contenida en el tubo de ensayo, a 2500 revoluciones por minuto, durante 5 minutos.
2. Se tomó 0.2 ml del sedimento urinario y se agregó 0.2 ml de KOH al 5%, y se tomaron alrededor de 50 microlitros para hacer los extendidos en portaobjetos, se deja secar al aire, luego se fijó con alcohol metílico por 5 minutos y se deja secar al aire, luego se tiñó con colorante de Weber por 90 minutos, se lavó con agua del grifo y se dejó secar al aire, se observaron 100 campos a 100X en busca de grumos o esporas sueltas.

Se estableció como muestra positiva aquella en la cual se observara al menos un grumo de microsporidios o esporas sueltas en 100 campos a 100X, y como negativas aquellas que no presentaran grumos o esporas en iguales condiciones de observación.

## Resultados

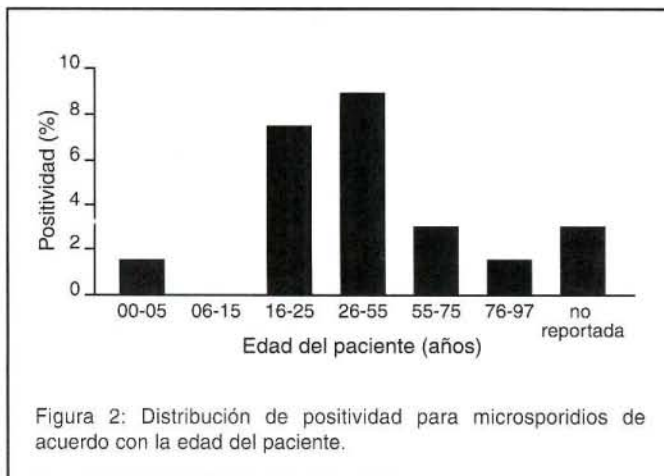
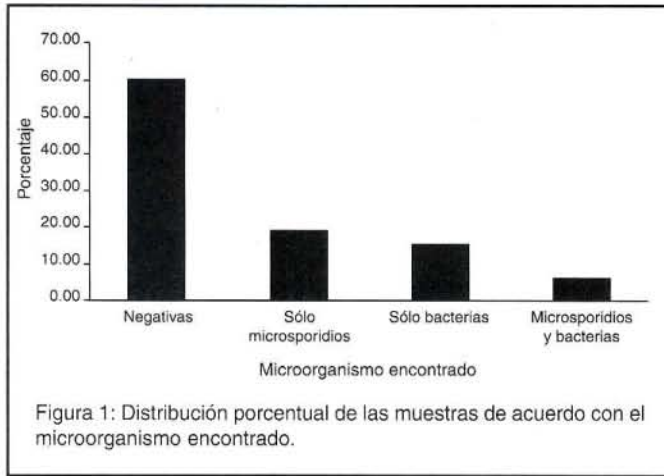
Un total de 67 muestras fueron recolectadas, 14 de hombres y 53 de mujeres, observándose una marcada diferencia entre el número de mujeres que consultan por infecciones de tracto urinario (79%) y el de los hombres (21%).

La edad de los pacientes varió entre 1 y 97 años. Todas las muestras fueron procesadas en busca de microsporidios, dado que ninguna presentó signos de contaminación fecal, ni de otra índole, en el urocultivo.

Catorce de las muestras estudiadas tenían el urocultivo positivo, lo que corresponde a un 21%; de estas, cuatro presentaron microsporidios concomitantemente, lo que corresponde a un 6% del total. De las muestras restantes, 11 presentaban microsporidios. (Figura 1)

El grupo etario más afectado fue el de 26 a 55 años, y los pacientes con edades entre 6 y 15 años no presentaron microsporidios. (Figura 2)

El mayor número de muestras positivas por microsporidios correspondió a pacientes cuyo médico no indicó un diagnóstico presuntivo en la boleta de solicitud de urocultivo, seguidas por aquellos donde el médico reportó infección del tracto urinario (Figura 3).

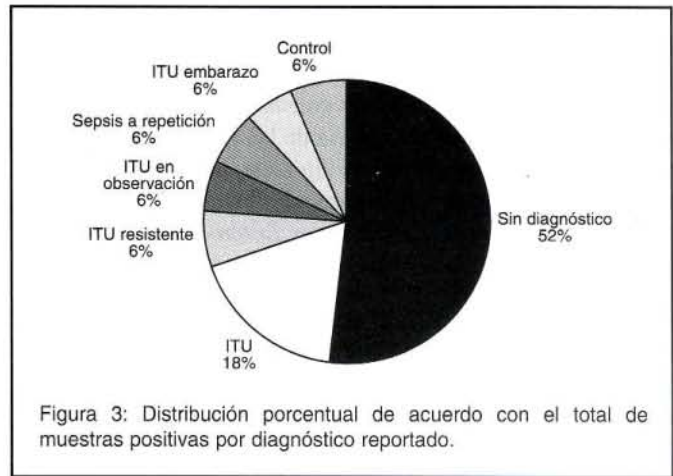


La leucosuria no fue muy evidente, de hecho solo tres muestras la presentaban en ausencia de bacterias. La bacteria de mayor prevalencia fue *Escherichia coli*.

## Discusión

Los microsporidios pueden relacionarse de tres formas con los mamíferos: un primer tipo ocurre en hospederos jóvenes, en donde se produce una aguda y a menudo letal enfermedad; el segundo tipo es en adultos inmunológicamente competentes, quienes desarrollan infecciones crónicas y subclínicas, y el tercero es en hospederos inmunológicamente deficientes, los que desarrollan infecciones clínicamente significativas, las cuales pueden ser mortales<sup>13</sup>.

Las infecciones extraintestinales por microsporidios se asocian de manera general con pacientes con SIDA, quienes presentan un compromiso de su sistema inmune, al sufrir la disminución de los linfocitos CD 4+. El género *Encephalitozoon* es el más implicado en este tipo de infecciones, donde el principal órgano afectado es el riñón. Estos pacientes pueden tener desde cuadros de uretritis y falla renal, con presencia de esporas intra y extracelulares en el sedimento urinario, hasta cuadros asintomáticos<sup>14-16</sup>.



La detección de estos protozoarios ha sido tema de interés por el pequeño tamaño que presentan las esporas y las dificultades para determinar las especies. De hecho, externamente, excepto por diferencias de tamaño difíciles de apreciar, son indistinguibles morfológicamente. Por ello el estudio por microscopía electrónica es la manera más aceptada para realizar diagnósticos en biopsias de tejidos<sup>14-17,19</sup>.

Para efectos de diagnóstico con microscopía de luz, las tinciones de frotis permiten la observación de las esporas, ya sean sueltas o en grumos. Dependiendo de la técnica tintorial empleada, así serán la sensibilidad y la especificidad<sup>19</sup>. En este momento la mejor opción la ofrecen Weber y colaboradores<sup>12</sup> con su tinción tricrómica modificada. Sin embargo, las características propias de cada muestra pueden variar ambos aspectos. En nuestro estudio habíamos notado una cierta indefinición de las esporas de tinciones provenientes de frotis de orinas. En estos casos, factores como el pH y la presencia de filamento mucoso podrían estar interfiriendo con la técnica tricrómica de Weber. Las observaciones realizadas nos demostraron que la adición de 50 microlitros de KOH al 5%, a igual volumen de sedimento urinario antes de hacer el extendido, así como obviar los pasos de decoloración y deshidratación recomendados en la tinción tricrómica modificada<sup>5,12,20,21</sup>, favorece de manera considerable la sensibilidad del diagnóstico, tal y como ya se había reportado en estudios de muestras de heces donde se agregó KOH como agente mucolítico<sup>17</sup>. En nuestro caso el KOH probablemente disuelve el filamento mucoso que con frecuencia aparece en las muestras de orina y la eliminación del paso de la decoloración intensifica el color de las esporas, pero no descartamos algún efecto potenciador de la coloración proveniente del tratamiento alcalino. Además, las bacterias se diferencian claramente de las esporas.

En este trabajo se encontró un 25% de muestras positivas por microsporidios, sin embargo, no podemos afirmar que las patologías que sufren estos pacientes se deban exclusivamente a tales parásitos.

El porcentaje de prevalencia, así como el hecho de que pacientes con edades tan variadas presenten microsporidios en

orina, nos da una idea de lo importante que puede llegar a ser el establecimiento de la tinción de microsporidios en aquellos pacientes que presenten infecciones del tracto urinario y que no respondan a los tratamientos convencionales, sobre todo si se tiene en cuenta que la mayoría de las infecciones urogenitales son por el género *Encephalitozoon*, para el cual sí existe un medicamento recomendado, el albendazol<sup>22</sup>, a diferencia de las infecciones causadas por *Enterocytozoon*<sup>1,20,23</sup>, las cuales aparentemente no pueden ser tratadas.

Estas infecciones consideradas como muy recientes en el ser humano, especialmente en los inmunosuprimidos, en donde pueden causar severas lesiones, deben ser diagnosticadas con mucha certeza. Por otro lado, cuando existe infección renal estamos en presencia, probablemente, de un proceso invasivo, lo que le da más importancia a este tipo de estudios. Se recomienda entonces practicar, en las orinas de pacientes debilitados inmunológicamente, la técnica de Weber con la modificación que aquí se describe.

Además, dado que existe la posibilidad de que estos parásitos sean transmitidos al ser humano, provenientes de animales domésticos tales como perros y conejos, sería interesante evaluar su prevalencia en estos animales y su posible relación con las infecciones humanas<sup>24,25</sup>.

## Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias a la subvención de la Junta Administrativa de la Fundación Escuela Autónoma de Ciencias Médicas.

## Abstract

Urine samples from patients with clinical antecedents of suspicion genitourinary pathology were studied for bacteria, fungi and for the presence of microsporidia. Usual culture media and methods were used to study bacteria and fungi organisms. To study for microsporidian parasites, nine ml were centrifuged and smears of the sediment were fixed, previous treatment with 5% KOH and then stained according to a modified Weber method.

Groups of Microsporidia spores were found in twenty five per cent of the samples, coming more frequently from people between 26 to 55 five years old.

Since these parasites cause important diseases, especially in immunosuppressed human beings, but also in immunocompetent persons, it is necessary to improve the methods for a better diagnosis of this parasitosis. Some modifications have been done to the Weber technique in order to have the best results.

## Referencias

1. Didier E, Snowden KF, Shabduck JA. Biology of Microsporidian Species Infecting Mammals *Adv Parasitol* 1998; 40:284-320.
2. Weber R, Bryan R, Schwartz D, Owen L. Human Microsporidial Infections. *Clin Microb Rev* 1994; 7:426-461.
3. Weiss LM, Vossbrinck CR. Microsporidiosis: Molecular and Diagnostic Aspects. *Adv Parasitol*. 1998; 40:351-417.
4. Matsubayashi H, Koike T, Mikata T, Hagiwara S 1959. A case of Encephalitozoon like body infection in man. *Arch Pathol* 1959; 67: 181-187.
5. Gutiérrez G, Reyes L, Chinchilla M, Herrera G, Rodríguez M, Frajman M. Presencia de Parásitos Intestinales en Pacientes HIV Seropositivos. Primer Informe de Microsporidiosis Humana en Costa Rica. *Parasitol al Día* 1997; 21:3-6.
6. Kotler D, Orenstein J. Clinical Syndromes Associated with Microsporidiosis. *Adv Parasitol*. 1998; 40:321-349.
7. Croft SL, Williams J, McGowan I. Intestinal microsporidiosis. *Smin Gastroint Dis* 1997; 8 (1): 45-55.
8. McDougall R, Tandy M, Robyn B, Boreham R, Stenzel D, O'Donoghue P. Incidental Finding of a Microsporidian Parasite from an AIDS Patient. *J Clin Microb* 1993; 31 (2): 436-439.
9. Chinchilla M, Reyes L, Guerrero OM, Castro A. Microsporidiosis: una parasitosis de reciente adaptación al hombre. *Rev Cost de Ciencias Médicas* 1998; 19(3-4): 209-221.
10. Chinchilla M, Reyes L, Guerrero O, Frajman M, Morales MT. *Enterocytozoon bienensei* (Orden Microsporidia, Familia Enterocytozooniidae) in Costa Rica: Report of the first human case in Central America. *Parasitol al Día* 1997; 21:119-122.
11. Ryan N, Sutherland G, Coughlan K, Globan M, Doultree J, Marshall J, Baird R, Pedersen J, Dwyer B. A New Trichrome-Blue Stain for Detection of Microsporidian Species in Urine, Stool, and Nasopharyngeal Specimens. *J Clin Microb* 1993; 31 (12): 3264-3269.
12. Weber R, Bryan R, Owen R, Wilcox M, Gorelkin L, Visvesvara G. Improved Light-Microscopical Detection of Microsporidia Spores in Stool and Duodenal Aspirates. *N Engl J Med* 1992; 326 (3): 161-166.
13. Didier E, Visvesvara G, Baker M, Rogers L, Bertucci D, De Groot M, Vossbrinck Ch. A microsporidian Isolated From an AIDS Patient Corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, Originally Isolated from Domestic Dogs. *J Clin Microb* 1996; 34 (11): 2835-2837.
14. Field A, Marriott D, Milliken S, Brew B, Canning E, Kench J, Darveniza P, Harkness J. Myositis Associated with a Newly Described Microsporidian, *Trachipleistophora hominis*, in a Patient with AIDS. *J Clin Microb* 1996; 34 (11): 2803-2811.
15. Lecuit M, Oksenhendler E, Safati C. Use of Albendazole for Disseminated Microsporidian Infection in a Patient with AIDS. *Clin Inf Dis* 1994; 19:332-333.
16. Molina JM, Oksenhendler E, Beauvais B, Sarfati C, Jaccard A, Derouin F, Modai J. Disseminated Microsporidiosis due to Albendazole therapy. *J Inf Dis* 1995; 171:245-249.
17. Carter P, MacPherson D, McKenzie R. Modified technique to recover microsporidian spores in sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed fecal samples by light microscopy and correlation with transmission electron microscopy. *J Clin Microb* 1996; 34:2670-2673.

18. Franzen C, Muller A. Molecular Techniques for Detection, Species Differentiation, and Phylogenetic Analysis of Microsporidia. *Clin Microb Rev* 1999; 12:243-285.
19. Simon D, Weiss L, Tanowitz H, Cali A, Jones J, Wittner M. Light Microscopic Diagnosis of Human Microsporidiosis and Variable Response to Octreotide. *Gastroenterology* 1991; 100 (1): 271-273.
20. Weber R, Bryan R. Microsporidial Infections in Immunodeficient and Immunocompetent Patients. *Clin Infect Dis* 1994; 19:517-521.
21. Sandford J, Hannemann A, Gelberblom H, Stark K, Owen R, Ruf B. Enterocytozoon bienewisi Infection in an Immunocompetent Patient who had acute diarrhea and who was not infected with the Human Immunodeficiency Virus. *Clin Infect Dis* 1994; 19:514-516.
22. Weber R, Sauer B, Spycher M, Deplazes P, Keller R, Ammann R, Briner J, Luthy R. Detection of *Septata intestinalis* in Stool Specimens and Coprodiagnostic Monitoring of Successful Treatment with Albendazole. *Clin Inf Dis* 1994; 19: 342-345.
23. Dieterich D, Lew E, Kotler D, Poles M, Orenstein J. Treatment with Albendazole for Intestinal Disease Due to Enterocytozoon bienewisi in Patients with AIDS. *J Infect Dis* 1994; 169:178-183.
24. Aguila C, Izquierdo F, Navajas R. Enterocytozoon bienewisi in Animals: Rabbits and Dogs as Hosts. *J Euk Microb* 1999; 46: 85-95.
25. Goodgame R. Understanding Intestinal spore-forming protozoa: Cryptosporidia, Microsporidia, Isospora, and Cyclospora. *Ann Intern Med* 1996; 124:429-441.