



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Detección de Encephalitozoon cuniculi en conejos y
desarrollo de un método para su diagnóstico clínico.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Giner Bosch, Adrián

Tutor/a: Sabater Marco, Consuelo

Cotutor/a: Morais Ezquerro, Sergi Beñat

Cotutor/a externo: VILLORA GONZALEZ, JOSE

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Agronómica y del Medio Natural**

**Detección de *Encephalitozoon cuniculi* en conejos y desarrollo
de un método para su diagnóstico clínico.**

TRABAJO FINAL DE GRADO

Grado en Biotecnología

Curso 2021-22

Autor: Adrián Giner Bosch

Tutor académico: Consuelo Sabater Marco

Cotutor académico: Sergi Morais Ezquerro

Cotutor externo: José Villora González

Valencia, 12 de septiembre de 2022

Detección de *Encephalitozoon cuniculi* en conejos y desarrollo de un método para su diagnóstico clínico.

Autor: Adrián Giner Bosch

Valencia, 12 de septiembre de 2022

Tutora: Consuelo Sabater Marco

Co-tutor: Sergi Morais Ezquerro

Tutor externo: José Villora González

RESUMEN: *Encephalitozoon cuniculi* es un microsporidio que afecta con frecuencia a los conejos domésticos. Una gran parte de conejos mascota son portadores de esta enfermedad, pero solamente, unos pocos la manifiestan. *E. cuniculi*, microorganismo intracelular obligado, es un patógeno emergente que puede causar zoonosis, además de afectar a otras especies animales como aves, roedores y perros, entre otras.

Establecer un diagnóstico en los conejos infectados es complejo debido a diversas causas, incluso en animales con signos clínicos severos. Un diagnóstico definitivo *antemortem* es complicado ya que es necesario realizar un estudio histológico para demostrar la presencia de *E. cuniculi*. Existen tests serológicos para su detección, pero son difíciles de interpretar porque un título positivo puede darse tanto en animales expuestos asintomáticos como en animales sintomáticos.

En este trabajo de investigación se utilizan diferentes técnicas para su posible aplicación en la detección y cuantificación del microsporidio. Un análisis serológico de muestras de conejo y otras especies mediante el uso de las tinciones (cromotropo y calcofluor) y extracción de *E. cuniculi* de muestras de orina de conejos positivos para la purificación de anticuerpos específicos con el objetivo de desarrollar un método de diagnóstico rápido basado en una tira reactiva para la detección de anticuerpos específicos contra *E. cuniculi*. Se trata de un proyecto de detección de una enfermedad que guarda relación con el tercer objetivo de desarrollo sostenible (ODS) de Salud y Bienestar, tanto animal como humana.

A partir de la información clínica recogida de conejos sanos y de conejos que muestran las diferentes formas de la enfermedad (renal, neurológica y ocular) se realizará un estudio estadístico para determinar si existen diferencias significativas entre los diversos parámetros relacionados con su manifestación clínica.

PALABRAS CLAVE: patógeno emergente, *Encephalitozoon cuniculi*, microsporidio, tinción cromotrópica tricrómica, calcofluor, inmunoensayo.

Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits and development of a method for its clinical diagnosis.

ABSTRACT: *Encephalitozoon cuniculi* is a microsporidium that frequently affects domestic rabbits. Many pet rabbits are carriers of this disease, but only a few manifest it. *E. cuniculi*, an obligate intracellular microorganism, is an emerging pathogen that can cause zoonosis, affecting other animal species such as birds, rodents and dogs, among others.

Diagnosis of infected rabbits is complicated due to various causes, even in animals with severe clinical signs. A definitive *antemortem* diagnosis is complex because it is necessary to perform a histological study to demonstrate the presence of *E. cuniculi*. Serological tests exist for its detection, but they are difficult to interpret because a positive titer can occur in asymptomatic exposed animals and in symptomatic animals.

In this research, different techniques are used for their possible application in detecting and quantifying of microsporidium. Serological analysis of samples from rabbits and other species using stains (chromotrope and calcofluor) and extraction of *E. cuniculi* from urine samples of positive rabbits for purification of specific antibodies to develop a rapid diagnostic method based on a test strip for detection of anti-*E. cuniculi* antibodies. This is a project to detect a disease that is related to the third Sustainable Development Goal (SDG) of Health and Welfare, both animal and human.

From the clinical information collected from healthy rabbits and rabbits showing the different forms of the disease (renal, neurological and ocular) a statistical study will be performed to determine if there are significant differences between the other various parameters related to its clinical manifestation.

KEYWORDS: emerging pathogen, *Encephalitozoon cuniculi*, microsporidium, trichrome chromotropic staining, calcofluor, immunoassay.

AGRADECIMIENTOS

Valencia, 12 de septiembre de 2022

La realización de este trabajo ha sido llevada a cabo en colaboración de dos departamentos de la Universidad Politécnica de Valencia, Química y Bioquímica, de una forma un tanto compleja y alargándose un tiempo. Por ello quiero dar las gracias a ambos departamentos, pero personalmente a...

A Consuelo por ofrecerme este proyecto con el que he aprendido, pero sobre todo por su tiempo y estar siempre que la he necesitado, y su esfuerzo y dedicación para que este trabajo haya sido llevado a cabo.

A Sergi por esperar a acabar en Bioquímica y enseñarme técnicas aplicables a un sinfín de cosas, he aprendido mucho. Por su tiempo, flexibilidad y dedicación. Gracias por ayudarme con este proyecto para que salga lo mejor posible.

A José por su tiempo dedicado en la clínica a pesar de estar ocupado y por seguir con este proyecto tras el parón de la pandemia lo que ha permitido la realización de mi TFG.

A Susi y a Laura, que han estado pendientes de mí y estar para todo lo que necesitara en este proyecto, y la confianza y ayuda que me han prestado en cada momento.

A Amadeo por estar esos últimos días trabajando conmigo para que los ensayos salieran bien, gracias por su tiempo y sus manos, sobre todo estos últimos días en los que yo lo he tenido complicado.

Gracias a todos vosotros y también a mi familia y amigos, por aguantarme durante este tiempo y ofrecerme ayuda cuando la he necesitado. Muchísimas gracias.

Adrián Giner Bosch

Índice de contenidos

INTRODUCCIÓN	1
Cuadro clínico de la enfermedad	1
Infeción en humanos	2
Agente infeccioso	2
Estructura infecciosa	3
Ciclo vital	3
Resistencia ambiental	5
Diagnóstico de la enfermedad	5
Detección histopatológica en tejidos	5
Detección mediante ensayos serológicos	6
Detección por PCR	6
Novedades en el diagnóstico de <i>E. cuniculi</i>	6
Terapia y control	7
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Muestras analizadas	9
Análisis serológico	9
Calcofluor white en seco	9
Calcofluor white en disolución	9
Chromotrope stain trichrome	9
Fast chromotrope stain trichrome.....	10
Análisis estadístico	10
Cultivos celulares	10
Purificación del microsporidio	11
Preparación del extracto de <i>E. cuniculi</i>	11
Purificación de anticuerpos del suero de conejos con encefalitozoonosis	11
Ensayo de flujo lateral en tira reactiva para la detección de anticuerpos anti-<i>E. cuniculi</i>	12
<i>Conjugación de los epítomos de la spora y los anticuerpos anti-BSA a las nanopartículas de oro</i>	12
<i>Fabricación de las tiras reactivas</i>	13
<i>Ensayo para la detección de anticuerpos anti-<i>E. cuniculi</i></i>	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15

Análisis serológico	15
Zoonosis	18
Análisis estadístico	18
Conclusiones	23
Cultivos celulares	23
Purificación del microsporidio	24
Purificación de anticuerpos del suero de conejos con encefalitozoonosis	24
Ensayo de flujo lateral en tira reactiva para la detección de anticuerpos anti-<i>E. cuniculi</i>.	25
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	29
ANEXO I	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes de conejos con síntomas de encefalitozoonosis.....	2
Figura 2. Estructura interna del microsporidio.....	3
Figura 3. Representación esquemática del ciclo asexual de la espora del <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	4
Figura 4. Representación gráfica de recuperación de la fracción retenida en el filtro 50K de anticuerpos.....	12
Figura 5. Imagen de la incubación en agitación de la solución de AuNP.....	12
Figura 6. Imagen de la impresión de las soluciones de anti-HIgG y BSA en la tira reactiva mediante el equipo BIODOT AD1500.....	13
Figura 7. Imagen de las tiras reactivas sumergidas en pocillos con diluciones de AuNP.....	14
Figura 8. Imágenes de las observaciones de las distintas tinciones para elegir las más adecuadas.....	15
Figura 9. Imágenes de las observaciones de distintas muestras con las tinciones de CST y CFW.....	16
Figura 10. Gráfico de mosaico para síntoma Nistagmo según SV.....	19
Figura 11. Gráfico de mosaico para síntoma ocular según SV.....	20
Figura 12. Gráfico de mosaico para Rolling según SV.....	21
Figura 13. Gráfico de mosaico para andar en círculos según Rolling.....	22
Figura 14. Gráfico de mosaico para ataxia general según SV.....	23
Figura 15. Imágenes de la visualización de las células MDCK en distintas condiciones.....	24
Figura 16. Imagen de la observación de las esporas del microsporidio aisladas.....	24
Figura 17. Medida de la intensidad de señal en la TL de las tiras reactivas utilizando la primera estrategia.....	26
Figura 18. Medida de la intensidad de señal exponencial en las tiras reactivas.....	27
Figura 19. Gráfico de mosaico para S. ocular según Rolling.....	33
Figura 20. Gráfico de mosaico para S. andar en círculos según SV.....	34
Figura 21. Gráfico de mosaico para S. ataxia en extremidades posteriores según SV.....	35
Figura 22. Gráfico de mosaico para S. ataxia en extremidades posteriores según Rolling.....	36
Figura 23. Gráfico de mosaico para S. ataxia general según Rolling.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestras de suero y su título de IgG anti- <i>E.cuniculi</i> utilizadas para formar una mezcla de IgGs.....	11
Tabla 2. Resultados del recuento de <i>E. cuniculi</i> de cada una de las muestras de conejo utilizando las tinciones de CST y CFW.....	17
Tabla 3. Resultados del recuento de <i>E. cuniculi</i> de cada una de las muestras de animales exóticos utilizando las tinciones de CST y CFW.....	18
Tabla 4. Frecuencias para Nistagmo según SV.....	19
Tabla 5. Test de independencia para Nistagmo según SV.....	19
Tabla 6. Frecuencias para S. ocular según SV.....	20
Tabla 7. Test de independencia para S. ocular según SV.....	20
Tabla 8. Frecuencias para Rolling según SV.....	21
Tabla 9. Test de independencia para Rolling según SV.....	21
Tabla 10. Frecuencias para andar en círculos según Rolling.....	22
Tabla 11. Test de independencia para andar en círculos según Rolling.....	22
Tabla 12. Frecuencias para ataxia general según SV.....	23
Tabla 13. Test de independencia para ataxia general según SV.....	23
Tabla 14. Concentraciones en mg/mL de los distintos extractos de <i>E. cuniculi</i> medidos con NanoDrop.....	25
Tabla 15. Frecuencias para S. ocular según Rolling.....	33
Tabla 16. Test de independencia para S. ocular según Rolling.....	33
Tabla 17. Frecuencias para S. andar en círculos según SV.....	34
Tabla 18. Test de independencia para S. andar en círculos según SV.....	34
Tabla 19. Frecuencias para S. ataxia en extremidades posteriores según SV.....	35
Tabla 20. Test de independencia para S. ataxia en extremidades posteriores según SV.....	35
Tabla 21. Frecuencias para S. ataxia en extremidades posteriores según SV.....	36
Tabla 22. Test de independencia para S. ataxia en extremidades posteriores según Rolling.....	36
Tabla 23. Frecuencias para S. ataxia general según Rolling.....	37
Tabla 24. Test de independencia para S. ataxia en extremidades posteriores según Rolling.....	37

ABREVIATURAS

Anti-BSA: Anticuerpos específicos contra albúmina de suero bovino.

Anti-*E. cuniculi*: Anticuerpos específicos contra *E. cuniculi*.

Anti-HIgG: Anticuerpos humanos contra IgG de conejo.

AuNP: Nanopartículas de oro.

BSA: Albúmina de suero bovino.

CFW: Calcofluor white.

CL: Control line.

CST: Chromotrope stain trichrome.

DMEM: Medio Eagle Modificado de Dulbecco.

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.

EMP: *E. cuniculi* purificado a partir de medio de cultivo sin sonicar.

EMS: *E. cuniculi* purificado y sonicado a partir de medio de cultivo.

EOP: *E. cuniculi* purificado extraído a partir de orina sin sonicar.

EOS: *E. cuniculi* purificado y sonicado extraído a partir de orina.

(GAR)-HRP: Immun-Star Goat Anti-Rabbit-HRP

IDM: Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico.

IFAT: Técnicas de inmunofluorescencia indirecta.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

MDCK: Riñón canino de Madin-Darby.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PBS: Tampón fosfato salino.

PBS-T: Tampón fosfato salino con Tween 20

SNC: Sistema nervioso central.

SNP: Sistema nervioso periférico.

SV: Síndrome vestibular.

TL: Test line.

TMB: Tetrametilbencidina.

UPV: Universitat Politècnica de València.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

INTRODUCCIÓN

ENCEFALITOOZONOSIS CAUSADA POR *ENCEPHALITOOZON CUNICULI*

La encefalitozoonosis es una enfermedad parasitaria sistémica de curso crónico, que afecta principalmente al sistema nervioso y urinario, provocada por *Encephalitozoon cuniculi*, un hongo intracelular obligado miembro del *Phylum Microsporidia* o microsporidio formador de esporas (Sak & Kváč, 2022). El principal hospedador de este parásito es el conejo, tanto doméstico como salvaje. Sin embargo, se han observado infecciones en aves y en un amplio rango de mamíferos como roedores, perros, gatos, cabras, cerdos, caballos e incluso en humanos inmunodeprimidos (Javadzade et al., 2021). Al tratarse de una enfermedad que puede transmitirse entre distintas especies de animales estamos hablando de una zoonosis.

El ciclo biológico de *E. cuniculi* dura de 3 a 5 semanas e implica un hospedador donde madura y se multiplica. La forma infecciosa de este microorganismo es una espora resistente, uninucleada, con un tamaño medio de 1-3 μm con un túbulo polar por el cual la espora inyecta el esporoplasma en la célula huésped. El esporoplasma se multiplica por fisión binaria y se desarrollan los microsporidios por esporogonia en el citoplasma del huésped o en una vacuola parasitófora creada por la espora. Una vez las esporas aumentan en número y colonizan el citoplasma, la membrana celular se rompe y libera las esporas (IVAMI, n.d.).

El principal método de transmisión de este parásito es mediante transmisión transplacentaria y la inhalación o ingestión de esporas presentes en agua, comida o secreciones contaminadas (Javadzade et al., 2021; Sak & Kváč, 2022).

Cuadro clínico de la enfermedad

El cuadro clínico que presenta la encefalitozoonosis es muy diverso, aun en el conejo, su huésped más común. Principalmente los síntomas son a nivel neurológico, a nivel renal y a nivel ocular (Javadzade et al., 2021). Estos síntomas pueden aparecer de forma individual o combinada.

Enfermedades neurológicas pueden ser consecuencia de la encefalitozoonosis como puede ser el síndrome vestibular en conejos, caracterizado por andar en círculos, nistagmo y tortícolis; afectando al Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP). También puede causar ladeo de cabeza, ataxia, convulsiones, parálisis o incontinencia urinaria; y meningoencefalitis granulomatosa caracterizada por la inflamación del SNC (Javadzade et al., 2021; Morsy et al., 2020).

A nivel renal se puede producir insuficiencia renal renal crónica o nefritis intersticial o granulomatosa (Harcourt-Brown, 2004; Morsy et al., 2020). Es común que estas características sean un hallazgo postmortem incluso sin anterior diagnóstico de *E. cuniculi*. Algunos conejos son poliúricos o polidípsicos, lo que provoca incontinencia urinaria (puede ser causada por manifestaciones neurológicas o renales). Esto puede provocar infección del tracto urinario, orina fangosa, urolitiasis o presencia de cálculos, incapacidad de levantar los cuartos traseros, problemas en la columna vertebral, obesidad o artritis.

En relación con lesiones oculares causadas por *E. cuniculi* encontramos cataratas, uveítis e hipopión con manchas blanquecinas. Puede producirse la ruptura espontánea de la cápsula anterior del cristalino provocando una uveítis granulomatosa zonal. Las afecciones suelen ser unilaterales, aunque pueden darse casos en ambos ojos.

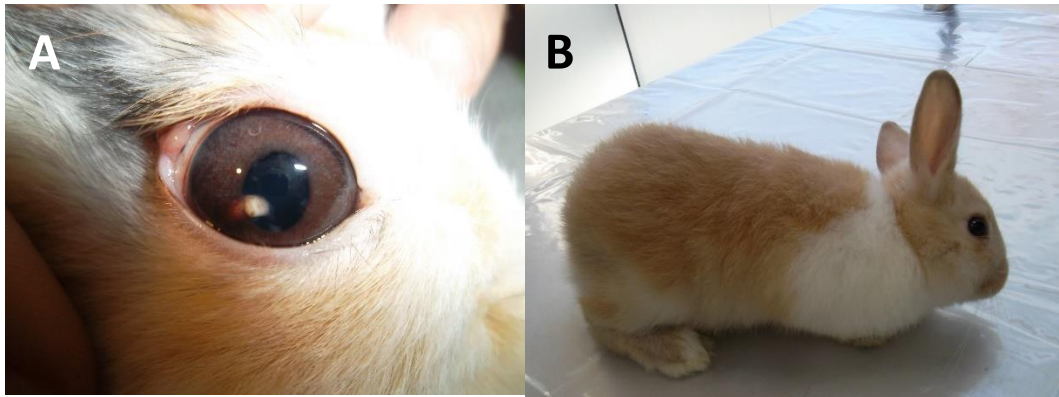


Figura 1. Imágenes de conejos con síntomas de encefalitozoonosis. A: Absceso y uveítis en conejo infectado por *E. cuniculi*. B: Ladeo de cabeza en conejo. Imágenes obtenidas vía web: <https://selvatica.es/encephalitozoon-conejo-compania/>

Infección en humanos

En humanos, *E. cuniculi* principalmente afecta a inmunodeprimidos y generalmente se ha asociado con niños con deficiencias inmunes que presentan enfermedades neurológicas. Todos los contagios confirmados se han descrito en pacientes inmunocomprometidos, la mayoría con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Sak & Kváč, 2022), personas con órganos trasplantados o con linfocitopenia T selectiva CD4+ idiopática; clasificando la encefalitozoonosis como una enfermedad oportunista ya que no pueden generar una respuesta inmune eficaz contra *E. cuniculi* (Künzel et al., 2008). Los síntomas mostrados son enfermedades renales y gastrointestinales, o bien trastornos oculares, neurológicos o psiquiátricos (Mathis et al., 2005). Los individuos con un sistema inmune competente infectados por el microsporidio no desarrollan síntomas y la infección se encuentra bajo control inmunitario (Sak & Kváč, 2022).

Agente infeccioso

E. cuniculi ha sido recientemente clasificado en el reino *Fungi*, aunque en primer lugar fueron considerados como protistas, debido a la presencia de ribosomas 70S y otras características como la ausencia de mitocondrias y peroxisomas. Sin embargo, debido a comparaciones filogenéticas de marcadores moleculares, se han definido como eucariotas relacionados con los hongos (Sak & Kváč, 2022). Sobre todo, porque poseen un núcleo eucariota rodeado de membrana nuclear, sistema de endomembranas y citoesqueleto. Dentro del reino *Fungi* pertenece a *Phylum Microsporidia*.

Hasta ahora, se han encontrado más de 1400 especies de microsporidios clasificados dentro de alrededor 200 géneros (Javadzade et al., 2021). Todos ellos tienen un amplio rango de hospedadores, tanto vertebrados como invertebrados.

Los microsporidios tienen de los genomas más pequeños conocido dentro de los eucariotas (Keeling & Slamovits, 2004), de alrededor 2.9 Mb (Ě Katinka et al., 2001). Su genoma se reparte en 11 pares de cromosomas, y contiene aproximadamente 2000 genes codificantes de proteínas (Pelín et al., 2016). Posee una compactación genómica que se manifiesta en un reducido espacio intergénico, con características como la ausencia de intrones, bajo número de secuencias repetitivas y muchos genes de copia única, etc.

Se han descrito 4 tipos de genotipos para *E. cuniculi* (I, II, III y IV). Cada cepa tiene preferencia para infectar huéspedes distintos (Sak & Kváč, 2022). Por ejemplo, los humanos pueden ser infectados por las cuatro cepas distintas, pero los genotipos I y III son más comunes. Estos genotipos han sido detectados en individuos con VIH, receptores de trasplantes de órganos o en pacientes con linfocitopenia T CD4 idiopática. En conejos, el genotipo I es el más común, conocido como la cepa de conejos (Javadzade et al., 2021; Sak & Kváč, 2022). La cepa de ratón

es la cepa II, y la III es conocida como la cepa de perro. En palomas se ha encontrado que los genotipos I y II son más comunes.

Estructura infecciosa

La forma infecciosa de *E. cuniculi* es la espora. El tamaño de éstas son de entre 1-1.5 x 2-2.5 μm (Franzen, 2004). Carecen de mitocondrias, pero en su lugar presentan orgánulos llamados mitosomas, que derivan de las mitocondrias (Bigliardi & Sacchi, 2001). Estas esporas son altamente resistentes, capaces de sobrevivir fuera del huésped durante años, ya que están rodeadas de una pared gruesa de tres capas: una capa externa o exospora compuesta por glicoproteínas, una capa interna o endospora compuesta por quitina y una membrana plasmática que envuelve el citoplasma o esporoplasma, que contiene el material infeccioso del parásito.

Este esporoplasma contiene un solo núcleo, una vacuola en la parte posterior, un disco de anclaje en ápice y el polaroplasto, una estructura membranosa que actúa en el proceso de inyección del material infeccioso y que está conformado por el polaroplasto lamelar, membranas aplanadas dispuestas de forma perpendicular al tubo polar, y el polaroplasto vesicular, estructuras tubulares situadas en la región media de la espora. La vacuola posterior se considera como parte del aparato de extrusión junto al polaroplasto.

Por otro lado, el tubo polar es un tubo hueco que comienza en el disco de anclaje en el ápice de la espora y se envuelve a la espora en su interior. El número de enrollamientos del tubo polar tiene importancia taxonómica. En *Encephalitozoon* da de cinco a once vueltas en una fila simple.

En *Encephalitozoon* el núcleo es monocarión. estado haploide del micelio del hongo, conteniendo típicamente un núcleo. En otras especies de microsporidio el núcleo puede ser diplocarión.

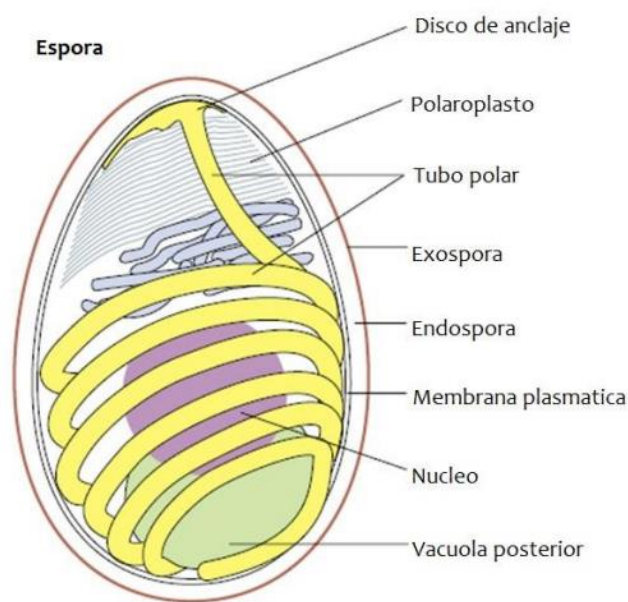


Figura 2. Estructura interna del microsporidio (Franzen, 2004)

Ciclo vital

El ciclo de vida de *E. cuniculi* comienza cuando la espora infecta la célula hospedadora a través de la extrusión y penetración del tubo polar. La duración completa del ciclo dura entre 3 a 5 semanas (Weiss, 2001).

La germinación de las esporas es iniciada por un desencadenante ambiental, variable entre especies. Ésta también puede tener lugar *in vitro* debido a estímulos físicos o químicos como

alteraciones en el pH, cambios en la hidratación, variaciones en las condiciones osmóticas, presencia de iones o exposición a radiación ultravioleta o peróxidos. Durante la germinación se pueden observar señales específicas como la hinchazón de la espora, especialmente del polaroplasto y la vacuola posterior, como aumento de la presión osmótica en el interior de la espora. Éstas presentan acuaporinas que transportan el agua a través de la membrana lo que explica este aumento de la presión osmótica.

Este aumento de la presión de la espora es la responsable de la salida del esporoplasma ya que provoca la ruptura del disco de anclaje y la descarga del filamento polar por eversión. Una vez el tubo polar está descargado, la presión obliga al esporoplasma a salir a través del tubo polar (Keeling & Fast, 2002).

Hay dos fases distintas en el ciclo vital de los microsporidios: la fase proliferativa o merogonia, responsable del aumento masivo en número de las esporas dentro del huésped, y la fase de maduración o esporogonia, donde los esporontes producen esporoblastos que maduran a esporas (Vivarès y Méténier, 2001).

Fase proliferativa o merogonia

Tiene lugar cuando el esporoplasma entra en la célula hospedadora. Las células proliferativas se denominan merontes. Son células simples y redondeadas, y se desarrollan en el interior del citoplasma de la célula huésped, y en una vacuola parasitófora en el caso de *Encephalitozoon sp.* La división de produce por fisión binaria.

Fase de maduración o esporogonia

Consiste en el paso de meronte a esporonte. Tiene lugar la formación de una capa superficial densa y engrosada, que da lugar posteriormente a la exospora. Los esporontes también se dividen por fusión binaria y se dividen en esporoblastos. Éstos finalmente se convierten en esporas maduras y sintetizan sus orgánulos

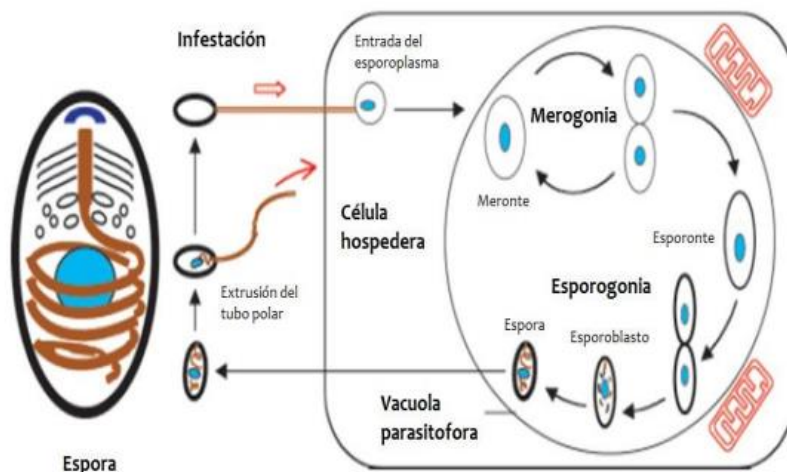


Figura 3. Representación esquemática del ciclo asexual de la espora del *Encephalitozoon cuniculi*. El tubo polar está enrollado dentro de la espora protegido por una compleja pared celular. En la región anterior, el disco de anclaje y la pila de membranas denominado polaroplasto se muestran después de su extrusión, el tubo polar asegura la entrada del esporoplasma dentro de una nueva célula huésped. En *E. cuniculi*, todas las etapas (merogonia y esporogonia) están confinadas dentro de una vacuola, la multiplicación celular se produce por fisión binaria y cada esporonte se divide en dos esporoblastos. La esporogonia siempre implica la formación de la pared celular y diferentes elementos del aparato de invasión de la espora (Vivarès y Méténier, 2001).

Resistencia ambiental

E. cuniculi y el resto de los microsporidios tienen una gran capacidad de infección y una amplia gama de hospedadores, desde insectos hasta toda clase de vertebrados. Éstos expulsan esporas, principalmente en la orina o excrementos, que contaminan el ambiente. Además, la pared de la espora contiene quitina que le ofrece protección frente a condiciones ambientales adversas. Es por ello, que tienen una gran capacidad de contaminación (Waller, 1979).

Los microsporidios son resistentes a temperaturas variables. La incubación de *E. cuniculi* en medio de cultivo a 22° durante 16 días, y a 4° durante 98 días, ha comprobado que al menos un porcentaje de esporas siguen siendo infecciosas. Estas también son resistentes a condiciones desfavorables de pH, congelación y descongelación e incubación en agua destilada.

Diagnóstico de la enfermedad

El diagnóstico de *E. cuniculi* es bastante complejo, especialmente en conejos debido a que la mayoría están infectados de forma subclínica. Sin embargo, la seroprevalencia es alta a pesar de la ausencia de sintomatología clínica. El diagnóstico completo se realiza por la combinación de ensayos clínicos, neurológicos, oftalmológicos, serológicos, histopatológicos y otras técnicas moleculares.

La encefalitozoonosis es una enfermedad de lento progreso y que los síntomas no son mostrados en la mayoría de los casos. Por tanto, la detección de anticuerpos específicos anti-*E. cuniculi* (anti-*E. cuniculi*) sólo confirma un contacto previo con el patógeno aun estando sanos. El diagnóstico de *E. cuniculi* ha cobrado importancia debido a la salud humana, ya que pacientes inmunodeprimidos pueden desarrollar enfermedades con gravedad significativa (Künzel et al., 2008).

Principalmente las estrategias utilizadas en el diagnóstico de *E. cuniculi* son los ensayos histopatológicos en tejidos o fluidos, serológicos como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o Western blot, y análisis moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Künzel et al., 2008).

Detección histopatológica en tejidos

Las esporas de *E. cuniculi* pueden ser detectadas en secciones de tejidos como pueden ser riñones o cerebro. La infección también puede extenderse al tracto urinario y a los órganos neurológicos. La identificación de esporas puede ser en muestras clínicas que incluyen heces, aspirado duodenal, esputo, biopsias; pero también en fluidos como la orina o el suero.

Este diagnóstico se realizaba originalmente por microscopía electrónica de transmisión, sin embargo, se han desarrollado técnicas nuevas histoquímicas y de tinción que permiten la identificación de esporas por microscopía óptica. Tinciones utilizadas son la hemotixilina-eosina, Gram, Giemsa, Warthin-Starry, aunque las que mejores resultados en la detección de estos parásitos son las que utilizan el cromotrope 2R como colorante base.

La tinción tricrómica modificada por Weber et al., (2000) aumenta la concentración de Cromotrope 2R, mejoró la calidad de detección de las esporas, que se observan de un color rosado claro sobre un fondo verde-azul, con una línea central (túbulo polar) y una zona decolorada (vacuola posterior). Aunque la desventaja de esta técnica es el tiempo de espera necesario de 90 minutos, a pesar de que existen modificaciones para realizarla en un menor tiempo como la tinción de Cromotrope rápida (Botero et al., 2004).

Otras tinciones empleadas en la detección de microsporidiosis son métodos quimiofluorescentes como el blanco de calcofluor, Uvitex 2B o fungifluor (Weber et al., 2000). Estos se unen a la quitina de la endospora, lo que permite su detección rápida y fácil utilizando microscopio de fluorescencia que es necesario para la detección, y aunque son un poco más sensibles, pueden

unirse a otros microorganismos como hongos y bacterias, comunes en las heces, que pueden dar lugar a falsos positivos.

Es por ello, que tinciones de ambos tipos deben utilizarse simultáneamente para tener una mayor certeza a la hora de identificar las esporas, especialmente en infecciones con baja carga parasitaria.

Detección mediante ensayos serológicos

La detección de anticuerpos en suero es un método de diagnóstico muy importante de *E. cuniculi*. Es la herramienta más sensible durante la etapa temprana de infección. La seroconversión se puede demostrar al menos 2 semanas antes que las esporas intracelulares en los tejidos y 4 semanas antes de encontrar lesiones histopatológicas en el riñón o esporas en la orina. Los títulos de anticuerpos IgG pueden persistir durante años con niveles variables, manteniéndose altos durante meses y disminuyendo más adelante.

Se han encontrado tasas de infección y anticuerpos anti-*E. cuniculi* en sueros de conejos con síntomas al igual que en pacientes aparentemente sanos y asintomáticos, aunque con niveles más bajos (Harcourt-Brown, 2004). Por ello se han desarrollado pruebas serológicas para detectarlos eficazmente. Las más comunes son las técnicas de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) o métodos de inmunoensayo de carbono (Toya et al., 2014).

Sin embargo, esta técnica tiene algunos inconvenientes, ya que la seroconversión indica infección crónica pero no que *E. cuniculi* sea responsable de los signos y síntomas de la enfermedad. Además, un resultado negativo en serología no descarta que el organismo esté presente y sea responsable de la enfermedad. También hay que tener en cuenta que resultados positivos en IgG indican que ha habido infección y exposición a *E. cuniculi*, pero no la manifestación de la enfermedad en ese momento. Los títulos de IgM sí son indicativos de que la enfermedad está en progreso (Toya et al., 2014). Por lo tanto, un diagnóstico definitivo de la enfermedad es complicado y requiere un estudio complejo.

Detección por PCR

El análisis molecular más importante y utilizado es la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR para la confirmación rápida y precisa de la enfermedad. Sin embargo, dependiendo de las muestras utilizadas puede ser más o menos fiable independientemente de individuos sintomáticos o asintomáticos. Muestras de orina o líquido cefalorraquídeo son utilizadas para la PCR, pero con resultados mejorables ya que puede dar lugar a falsos negativos (Toya et al., 2014), sin embargo, con material del cristalino de conejos con uveítis la PCR tiene una alta sensibilidad. Esto puede ser debido a una mayor concentración de esporas en ese tejido que en otros órganos o tejidos, o a la presencia de cristales en la orina.

Novedades en el diagnóstico de *E. cuniculi*

Recientemente, además de los métodos de diagnóstico presentados anteriormente, ha salido al mercado un test rápido basado en una tira reactiva que permite la detección cualitativa de anticuerpos específicos de *E. cuniculi* en sangre (con anticoagulante), plasma o suero de conejo. Este kit es llamado FASTest® ENCEPH y ha sido desarrollado por la empresa austriaca Diagnostik Megacor.

Esta prueba se basa en un “principio de sándwich” inmunocromatográfico. Los anticuerpos contra *E. cuniculi* contenidos en la muestra reaccionan en la zona de la almohadilla conjugada con anticuerpos móviles monoclonales, conjugados con partículas de oro. Estos complejos anticuerpos migran a lo largo de la membrana y son captados por antígenos de *E. cuniculi* fijados

a la membrana, formando una test line. La correcta realización del análisis se evidencia por la formación de una segunda línea control (Diagnostik Megacor, n.d.).

Este test posee una sensibilidad del 98,5% y una especificidad del 100%. Además, se trata de un test de fácil uso y rutinario que permite una rápida interpretación de los resultados tras 10 minutos.

Terapia y control

Las medidas tomadas para el control de la enfermedad dependen de la manifestación clínica de esta, debido a que se toman medidas para paliar los distintos síntomas y porque no existe un protocolo estándar para el tratamiento de conejos con *E. cuniculi*. Además, los individuos asintomáticos muchas veces no son diagnosticados lo que dificulta el control de la enfermedad.

Sin embargo, en pacientes que desarrollan síndrome vestibular se ha demostrado que tratamientos con glucocorticoides combinados con enrofloxacina, oxitetraciclina o fenbendazol son eficaces para la recuperación de individuos enfermos (Harcourt-Brown, 2004; Künzel & Fisher, 2018).

Muchos medicamentos han sido objeto de estudio para el tratamiento de la encefalitozoonosis y son eficaces antibióticos como la fumagilina o la oxitetraciclina y antiparasitarios como el tiabendazol o albendazol (Beauvais et al., 1994), considerado como el fármaco más eficaz contra microsporidios en humanos. No obstante, presenta numerosos efectos adversos ya que es embriotóxico y teratogénico.

Un medicamento ampliamente utilizado y que ha demostrado su utilidad es el fenbendazol, tanto para prevenir como para tratar las infecciones con *E. cuniculi*. Es otro antiparasitario que junto con el albendazol son derivados bencimidazólicos cuya diana es la subunidad beta de la tubulina. El mecanismo de acción trata de inhibir la división de microsporidios al impedir la síntesis de tubulina, empleada para la división celular en el citoesqueleto. Conejos infectados y tratados con fenbendazol no hacen seroconversión y no es posible aislar esporas del tejido cerebral. Ha sido elegido el fármaco de primera línea para el tratamiento de la encefalitozoonosis en conejos, con una dosis de 20 mg/kg/día durante 28 días (Suter et al., n.d.).

Por otro lado, corticosteroides pueden ser utilizados para reducir la reacción inflamatoria y tratar los síntomas neurológicos asociados a la enfermedad causados por la inflamación. Sin embargo, este tratamiento tiene efectos inmunosupresores y puede afectar a los mecanismos de defensa contra *E. cuniculi*, especialmente a los linfocitos T y las citocinas derivadas de ellos. Por tanto, se necesita un mayor estudio y control del uso de estos fármacos debido a sus efectos contradictorios.

Es importante controlar la aparición de signos vestibulares en conejos con encefalitozoonosis. El diagnóstico diferencial más importante es la otitis media o interna. La extirpación quirúrgica del cristalino junto con tratamiento médico ha resultado ser exitoso para conejos con uveítis facoclástica. Cuanto más rápido se realice la cirugía, mejores resultados se obtendrán.

En cuanto al control, los conejos que se diagnostiquen como seropositivos deben eliminarse y separarse de laboratorios y colonias de conejos para evitar la propagación de la infección, y llevar a cabo la desinfección de las instalaciones. Las esporas pueden ser eliminadas mediante tratamientos físicos o químicos. Son eliminadas cuando se hierven durante 5 minutos o en autoclave 10 minutos a 120°C. También se inactivan cuando se someten 30 minutos a la acción de etanol al 70%, formaldehído al 0.3%, hidróxido de sodio al 1% y peróxido de hidrógeno al 1%.

HIPÓTESIS

Establecer un diagnóstico clínico de encefalitozoonosis causada por *E. cuniculi* en conejos infectados es complejo, ya que es necesario realizar un estudio histopatológico para confirmar su presencia. Existen pruebas serológicas para su detección, pero son difíciles de interpretar porque un título positivo puede darse tanto en animales expuestos asintomáticos como en animales sintomáticos. Por lo tanto, hay una necesidad de desarrollar nuevas pruebas de diagnóstico rápidas, sencillas y baratas que proporcionen una información clínica de calidad.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo de investigación han sido:

1. Determinar la presencia de *E. cuniculi* en muestras de conejos infectados utilizando tinciones para detectar el microsporidio histopatológicamente.
2. Determinar del mismo modo la presencia de *E. cuniculi* en muestras de otras especies para demostrar el potencial zoonótico de éste.
3. Comprobar el crecimiento de *E. cuniculi* en un medio celular.
4. Realizar un estudio estadístico a partir de diferentes aspectos relacionados con la sintomatología propia de la encefalitozoonosis.
5. Poner a punto técnicas de inmunoensayo en formato de tira reactiva para su aplicación en la detección de síntomas de encefalitozoonosis causada por *Encephalitozoon cuniculi* en muestras de suero de conejos domésticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras analizadas

El análisis serológico se realiza a partir de 102 muestras de suero de conejos y otras especies aportadas por la clínica veterinaria Selvática (Valencia), especializada en animales exóticos. Las muestras se congelan a -80°C desde su extracción hasta que tuvo lugar su análisis. La mayoría se corresponden con conejos que han presentado síntomas de encefalitozoonosis causada por *E. cuniculi*.

Análisis serológico

Se descongelan las muestras y se numeran de acuerdo con la Tabla 2. De cada muestra se recogen $100\ \mu\text{L}$ de cada una de ellas en un microtubo de centrífuga de $1.5\ \text{mL}$, a excepción de las muestras 33, 41, 43, 44, 49, 54, 79 y 90; que se recogen $50\ \mu\text{L}$ por disponer de un menor volumen total. Se centrifugan 4 minutos a $1600\ \text{rpm}$ a 4°C , y se realiza un lavado con tampón fosfato salino (PBS); se repiten estos pasos una vez más (Han et al., 2019).

Para el análisis de las distintas muestras de suero se realizan dos tinciones distintas: Calcofluor white (CFW) y Cromotrope stain trichrome (CST). Con la primera tanda de muestras (1-14) se realizan dos variaciones de cada una de las tinciones, con el objetivo de ver con qué versión de cada tinción se visualizan mejor los resultados. Con el CST se realiza la tinción estándar y una versión rápida de la tinción mientras que de CFW se hace en seco y en disolución.

Calcofluor white en seco

Se pipetea $5\ \mu\text{L}$ de cada una de las muestras en PBS y se realiza un frotis en portaobjetos. Se dejan secar las muestras en la estufa a 60°C . Se fijan las muestras con metanol durante 10 minutos y se dejan secar al aire (Didier et al., 1995; Green et al., 2000; Luna et al., n.d.).

Se añade la solución de Calcofluor white durante 10 minutos. A continuación, se lava con PBS y se añade Evans Blue 30 segundos. Posteriormente se vuelve a lavar con PBS y se dejan secar las muestras. Se montan los portaobjetos con Eukitt antes de su visualización.

Calcofluor white en disolución

Se prepara una disolución de CFW 0.2% en PBS. La muestra se diluye en la disolución de CFW 0.2%, obteniendo una dilución 1:10 de la muestra en la disolución de CFW (Luna et al., n.d.). Esta dilución se carga directamente en la cámara de Neubauer lo que también sirve para realizar mejor el recuento del parásito.

El recuento se realiza en la cámara de Neubauer utilizando un microscopio de fluorescencia. Teniendo en cuenta las características de la cámara (superficie del cuadrado: $0.0025\ \text{mm}^2$ y profundidad de la cámara: $0.1\ \text{mm}$), la cantidad de partículas se calcula según la fórmula:

$$\text{Cantidad de } \frac{\text{partículas}}{\mu\text{L}} = \frac{\text{Partículas contadas}}{\text{Número cuadrados} * \text{Superficie cuadrado (mm}^2\text{)} * \text{Profundidad cámara (mm)}} * \text{Dilución}$$

Siendo la superficie del cuadrado de $0.0025\ \text{mm}^2$ y la profundidad de la cámara de $0.1\ \text{mm}$.

Chromotrope stain trichrome

En primer lugar, es necesario preparar la solución de la tinción. Cada $50\ \text{mL}$ de CST se preparan mezclando 3 gramos de Cromotrope 2R junto con 0.075 gramos de Fast Green, 0.35 gramos de ácido fosfotúngstico y $1.5\ \text{mL}$ de ácido acético glacial 100%. Estos componentes se mezclan bien y se dejan macerar 30 minutos antes de añadir $50\ \text{mL}$ de agua destilada. En todo momento se protege la solución de la luz (Degirolami et al., 1995; Didier et al., 1995; Ryan et al., 1993).

Por otro lado, también es necesario preparar alcohol ácido. Cada $100\ \text{mL}$, se mezclan $4.5\ \text{mL}$ de ácido acético glacial con $95.5\ \text{mL}$ de alcohol etílico 90%.

La preparación de los portaobjetos se realiza con un frotis de $5\ \mu\text{L}$ de cada una de las muestras. Se dejan secar las muestras en la estufa a 60°C . Se fijan las muestras con metanol durante 10 minutos y se dejan secar al aire.

A continuación, se sumergen los portaobjetos en la solución de CST durante 90 minutos, protegidos de la luz. Al finalizar este tiempo, se lavan rápidamente con agua destilada y después con alcohol ácido durante 10 segundos. Tras ello se lava en etanol 95% brevemente, y después se realizan dos lavados sucesivos con etanol 95% durante 5 minutos. Se realiza un último lavado de 10 minutos con etanol absoluto. Se dejan secar y se montan los portaobjetos con Eukitt antes de su visualización (Degirolami et al., 1995; Ryan et al., 1993).

El recuento se realiza basándose en un criterio de signos: se utiliza un signo negativo para las muestras en las que no se observa presencia del microsporidio (-) y signos positivos para las muestras en las que sí se observa presencia de la espora: se cuantifica según lo observado con un signo (+) para las que la presencia es menor, dos signos (++) para presencia intermedia de ésta y tres (+++) para las que se observa una mayor presencia de la espora.

Fast chromotrope stain trichrome

Se prepara una solución decolorante formada por etanol 95% y acetona 5%, en proporción 1:1. Se preparan y se fijan las muestras de forma similar al CST convencional (Degirolami et al., 1995; Ryan et al., 1993).

Tras dejar secar los portaobjetos se tiñen en primer lugar durante un minuto con violeta de genciana, se lava con agua y se añade lugol durante un minuto. Después se añade la solución decolorante y se lava de nuevo con agua. Se añade la solución de CST durante 5 minutos (Botero et al., 2004). Tras este tiempo transcurrido se decolora con alcohol ácido 3 segundos y tienen lugar dos lavados consecutivos con etanol 95% durante 5 minutos cada uno, y un último lavado con etanol absoluto durante 10 minutos (Botero et al., 2004). Se dejan secar y se montan los portaobjetos con Eukitt antes de su visualización.

Análisis estadístico

Se consulta el historial clínico de los animales, principalmente conejos, a los que corresponden cada una de las muestras en la base de datos Vetaminic, base de datos de la clínica veterinaria Selvática. Se toman datos respecto la edad y peso de cada animal, síntomas relacionados con la enfermedad de encephalitozoonosis, el tratamiento recibido por cada uno y si se realizó prueba de *E. cuniculi*. Se realiza un estudio estadístico relacionando distintos síntomas mostrados por los conejos infectados para observar la relación que hay entre ellos.

A los datos recopilados este año se les ha añadido los datos recogidos por Marta Bonillo Ortiz en el año 2016 en la clínica veterinaria Selvática, en un proyecto previo y similar al presente con el objetivo de aumentar el número de muestras.

Cultivos celulares

Tanto las células de riñón canino de Madin-Darby (MDCK) infectadas como las no infectadas se mantienen en placas de cultivo tisular utilizando el Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con 1 g de glucosa/L suplementado con 1% de L-glutamina, 2% de penicilina-estreptomomicina y 10% de suero fetal bovino inactivado. La incubación se realiza a 37 °C y 5% de CO₂ en una atmósfera humidificada. El medio se cambia dos veces a la semana aspirando y sustituyendo por medio fresco (Han et al., 2019b; Visvesvara, 2002).

Las células se cosechan por tripsinización (0,25% tripsina/EDTA) cuando la confluencia alcanza el 70-90%. Para establecer el subcultivo, se añade 1 mL de las células suspendidas y luego 9 mL de medio fresco a una placa de cultivo. Las placas de subcultivo se inoculan con esporas de *E. cuniculi* que se obtuvieron de la orina y el suero de conejos infectados (Han et al., 2019).

Las muestras de orina y suero se centrifugan a 1.500G y se aspira el sobrenadante. El sedimento se lava dos veces por centrifugación en PBS como se ha indicado anteriormente y el sedimento se inocula en placas de subcultivo. Después de 6 a 8 semanas de subcultivo, se recogen de nuevo los sobrenadantes del medio de cultivo en tubos de 15 mL, centrifugados a 1500G durante 10 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante y después se lava con PBS (Han et al., 2019). Se repiten estos dos pasos otra vez. Se observan las esporas en los sobrenadantes de los cultivos y en

las células MDCK. La presencia de esporas de los cultivos se confirma mediante tinción con CFW.

Purificación del microsporidio

Se recoge en un microtubo 1 mL de orina de conejo afectado por encefalitozoonosis y en otro 1 mL del medio de cultivo celular donde han proliferado las células MDCK con el microsporidio, con el objetivo de obtener una mayor cantidad de éste. Se centrifugan ambos tubos a 1600 rpm durante 4 minutos a 4°C, se descarta el sobrenadante y se lava con PBS (Han et al., 2019). Se repite el lavado dos veces más. A continuación, en lugar de añadir PBS se añade 1 mL de Histopaque 1077 y se centrifuga a 2000 x g durante 20 minutos a 4°C (Aguila et al., 1998; Pan et al., n.d.). Se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en 1 mL de PBS.

La espora aislada se visualiza por el método de Calcofluor white en disolución mezclando la solución obtenida con la solución de CFW 0,2% 1:1. El microsporidio se conserva congelado a -20°C hasta su posterior utilización, tanto el procedente de la orina como el procedente del medio.

Preparación del extracto de *E. cuniculi*

Las soluciones con *E. cuniculi* procedentes de orina y del medio celular se descongelaron a temperatura ambiente. A continuación, se separan 0.5 mL de cada microtubo en otros. Este volumen fue sonicado a 60 W junto con beads de vidrio de 0.5 mm de diámetro utilizando un sonicador Qsonica q55, con el objetivo de obtener un extracto de *E. cuniculi* lisado para analizar la unión de los anticuerpos específicos contra las distintas proteínas de la espora (Pan et al., n.d.).

Purificación de anticuerpos del suero de conejos con encefalitozoonosis

El suero de 7 conejos infectados con encefalitozoonosis y cuyo título de anticuerpos específicos de *E. cuniculi* es conocido (Tabla 1) se mezcla para obtener una mezcla con título 1/1120 de IgGs. Se utiliza una columna HiTrap Protein A HP de 1 mL de volumen de gel.

Tabla 1. Muestras de suero y su título de IgG anti-*E.cuniculi* utilizadas para formar una mezcla de IgGs.

Número de Historial	Nombre del conejo	Título de IgG anti- <i>E.cun</i>
5129	Kokoro	1/320
9075	Leia	1/320
10493	Cotonet	1/1280
10525	Hachiro	1/1280
7155	Kiss	1/640
2124	Lilo	1/1280
14774	Bigotes	1/1280

En primer lugar, la columna se equilibra pasando 10 mL de PBS, a un caudal de 1,0 mL/min (aproximadamente 40 gotas/min), utilizando una jeringa de 10 mL. Se evita que entrara aire en la columna. A continuación, se carga 1,0 mL del suero en la columna a 1,0 ml/min, utilizando una jeringa de 1,0 mL. Después, la columna se lava, pasando 5,0 mL de PBS 1X, a un caudal de 1,0 mL/min. Las IgGs retenidas en la columna se eluyen, pasando un volumen total de 4,0 mL de glicina 0,1 M, pH 2,7 a un caudal de 1,0 mL/min. Se recogen cuatro fracciones de 1,0 mL en viales eppendorf a los que previamente se han añadido 50 µL de Tris 1 M, pH 9,0.

Finalmente, la columna se lava primero con 5,0 mL de PBS 1X y luego con 5,0 mL de etanol 20% a un caudal de 1,0 ml/min.

Se mide la absorbancia a 280 nm de las fracciones recogidas, utilizando un espectrofotómetro NanoDrop. Se selecciona la fracción con mayor contenido de IgGs, y se introducen 500 µL de dicha disolución en el dispositivo de filtración de 50K. El dispositivo se centrifuga a 14000 rpm durante 5 min. A continuación, se vacía el vial eppendorf, se añade 450 µL de PBS 1X dentro del dispositivo de centrifugación, y se vuelve a centrifugar el dispositivo a 14000 rpm durante 5 min. Se repite esta última operación una vez más. A continuación, se vacía el vial eppendorf y se

recupera la fracción retenida, introduciendo el dispositivo boca abajo (Figura 4) en un vial vacío y limpio. Se mide el volumen recuperado (1mL) y la concentración de IgG mediante el NanoDrop del pool de anticuerpos.

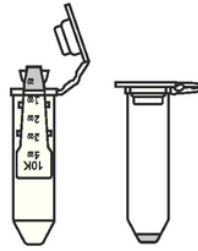


Figura 4. Representación gráfica de recuperación de la fracción retenida en el filtro 50K de anticuerpos.

Ensayo de flujo lateral en tira reactiva para la detección de anticuerpos anti-*E. cuniculi*.

Se siguen dos estrategias distintas en el desarrollo del ensayo en tira reactiva. Las tiras utilizadas están compuestas de nitrocelulosa que permite la adsorción de proteínas en su superficie (Parolo et al., n.d.).

Primera estrategia

La primera estrategia se basa en la inmovilización de albúmina de suero bovino (BSA) en la línea control (CL) e IgG humana anti-IgG de conejo (anti-HIgG) en la línea de test (TL). El objetivo es que la BSA forme un complejo junto a un anticuerpo anti-BSA conjugado a una nanopartícula de oro (AuNP) mientras que el anti-HIgG forme un complejo con los anticuerpos anti-*E. cuniculi* y los epítomos de la espora asociada también a AuNP que son las que permiten la detección colorimétrica.

Conjugación de los epítomos de la espora y los anticuerpos anti-BSA a las nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro se han sintetizado por medio del método Turkevich. La unión de los anticuerpos a la superficie de las nanopartículas de oro ocurre mayoritariamente por enlaces no covalentes, mediante atracción iónica entre la carga superficial negativa de las nanopartículas de oro y la carga positiva de los anticuerpos, y mediante atracción electrostática (Jazayeri et al., 2016). Para provocar esta unión se añade 1,5 mL de la solución de AuNP en un vial y un par de gotas de tampón borato (0,1 M y pH = 9,06) para ajustar el pH de la disolución. Después se añade por un lado el extracto de las esporas sonicado y anticuerpos anti-BSA a una concentración de 13 µg/mL. Ambas soluciones se incuban a temperatura ambiente y en agitación durante 1 hora. Tras este período, se centrifugan a 13000 rpm durante 30 minutos a 4°C para eliminar el exceso de sobrenadante, que se descarta (Parolo et al., n.d.).

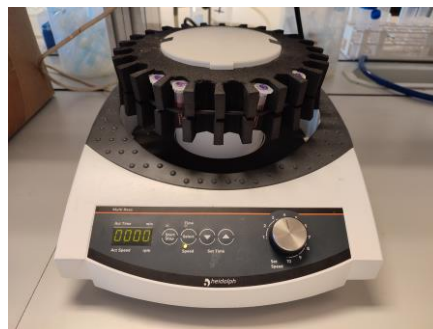


Figura 5. Imagen de la incubación en agitación de la solución de AuNP.

Fabricación de las tiras reactivas

El proceso de fabricación de las tiras de flujo lateral comienza con la inmovilización de los reactivos en la nitrocelulosa. Para ello se preparan disoluciones de la anti-HIgG y BSA de concentración 1 mg/mL en PBS 1X para la dispensación en la TL y CL, respectivamente. Esta dispensación fue realizada utilizando el equipo BIODOT AD1500. Tras la impresión en las tiras, se incuban durante 2 horas a 37°C antes de poder ser utilizadas en el ensayo (Parolo et al., n.d.). Por último, se añaden a la tira membranas absorción de celulosa que nos permite el flujo de la muestra en la tira, y se cortan tiras de 6 cm de largo por 4 mm de ancho utilizando una guillotina.

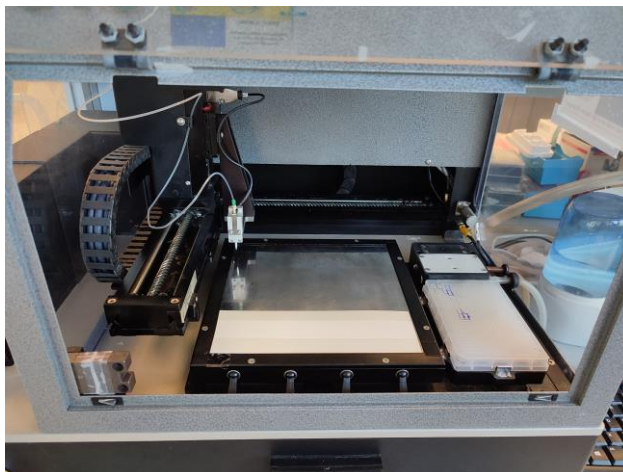


Figura 6. Imagen de la impresión de las soluciones de anti-HIgG y BSA en la tira reactiva mediante el equipo BIODOT AD1500.

*Ensayo para la detección de anticuerpos anti-*E. cuniculi**

En primer lugar, para la dispensación de muestras en la tira es necesario preparar un tampón de resuspensión que permita el correcto flujo de ésta en la tira. Este tampón de resuspensión se forma añadiendo 2 mL de tampón borato (20 mM y pH = 7,5) con un 5% de azúcar y un 0,5% de Tween-20. Es importante destacar la finalidad de la sacarosa y el Tween-20 en el tampón de resuspensión. La sacarosa permite la liberación de la disolución de conjugado de la membrana de fibra de vidrio una vez esta se rehidrate al añadir la muestra en la tira. Sin la cantidad adecuada de sacarosa, la disolución de conjugado no fluiría a lo largo de la tira. Por su parte, el Tween-20 es un surfactante que evita las interacciones no específicas entre las nanopartículas conjugadas y la superficie de la nitrocelulosa. Sin la cantidad adecuada de surfactante, las nanopartículas conjugadas se adherirían de manera inespecífica a lo largo de la superficie de la nitrocelulosa, generando una señal de fondo visible.

En primer lugar, se comprueba si la CL funciona correctamente. Para ello se añade en un pocillo la disolución de AuNP con anticuerpos anti-BSA en una dilución 1/8 en tampón de resuspensión, que permite observar óptimamente la señal de la CL. Se le añade PBS en lugar de muestra de anticuerpos para completar el volumen de 70 μ L en el pocillo. Se mete la tira en el pocillo para que fluya a lo largo de ella y se espera 10 minutos para la visualización de la señal.

Por otro lado, se comprueba la TL. Se añade en el pocillo donde se mete la tira lo mismo que con la CL, pero en este caso utilizando la disolución de AuNP con la espora, se probaron diluciones 1/8, 1/10, 1/12, 1/20 y 1/100. También se deja 10 minutos en la observación de la señal. En la comprobación de la TL se utilizó un blanco con PBS, donde no debería verse la TL marcada al no haber reconocimiento específico y una dilución con una concentración de 1 μ g/mL del pool de anticuerpos purificados, para ver si hay señal determinante.

Segunda estrategia

Esta estrategia por otro lado se basa en la inmovilización en la CL de los anticuerpos anti-BSA y en la TL los epítomos de la espora. Mientras que las AuNP se conjugan con BSA para que interactúen con la CL y con los anticuerpos anti-HiGg que reconocerán los anticuerpos que se hayan unido específicamente a la espora en la TL de la tira. Con esta estrategia nos evitamos que los anti-HiGg reconozcan los anticuerpos anti-BSA que están producidos en conejo, dando falsos positivos y reteniendo los anticuerpos anti-BSA en la TL.

Se conjugan tanto la BSA como los anticuerpos anti-HiGg mediante el mismo procedimiento que la estrategia anterior, a 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y realizando los mismos períodos de incubación y centrifugación.

Las tiras reactivas también se fabrican del mismo modo, pero en la TL se prueba a fabricar distintas tiras con distintas concentraciones de espora: 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,8 mg/mL y 1 mg/mL. En esta estrategia se utiliza un filtro de 100 kDa para filtrar el extracto de espora por si también existía la presencia de anticuerpos. Además, a una concentración de 1 mg/mL se prueba a utilizar tanto el extracto de la espora sonicada: filtrada y sin filtrar, y el extracto de espora sin sonicar. Tras la impresión, se incuba, se añade la celulosa de absorción y se cortan las tiras.

El ensayo se realiza utilizando el mismo tampón de resuspensión y las muestras que se prueban son tanto del pool de anticuerpos, como diluciones suyas en PBS de concentraciones de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. También se prueba suero de conejo infectado cuya concentración proteica se mide en el NanoDrop, y diluciones de 1/10 y 1/100 de dicho suero en PBS.

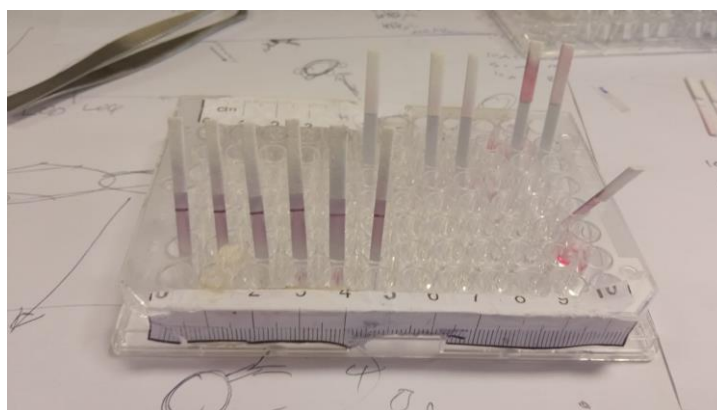


Figura 7. Imagen de las tiras reactivas sumergidas en pocillos con diluciones de AuNP.

Sin embargo, además de la composición de las tiras reactivas y de las disoluciones de AuNP conjugadas, existe otra diferencia sustancial respecto a la otra estrategia. Ésta se lleva a cabo en dos etapas: la primera se sumerge la tira en la disolución con la muestra del pool de anticuerpos anti-*E. cuniculi* o suero con tampón de resuspensión durante 10 minutos para que fluya y los anticuerpos específicos interactúen con la TL. Tras este periodo de tiempo, la tira se sumerge en PBS-T para un lavado previo a la segunda etapa en la que la tira se sumerge en distintas diluciones de la disolución de AuNP conjugadas con los anticuerpos secundarios: se prueban diluciones 1/2, 1/8, 1/14 y 1/25 en tampón de resuspensión; para así detectar los anticuerpos específicos unidos (Brangel et al., 2018). Mientras, la BSA también conjugada con las AuNP reacciona con la CL. Esta estrategia nos soluciona el problema de retención de la muestra y lavado de la tira reactiva, y es eficaz tal y como se muestra en Brangel et al., (2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis serológico

En primer lugar, se observan los distintos tipos de tinción en las muestras 1-14 para elegir qué métodos muestran los resultados más óptimos para la distinción de la espora y su recuento. Los resultados obtenidos muestran que el Calcofluor white se observa mejor en disolución que en seco y que el Chromotrope stain trichrome estándar obtiene mejores resultados que su versión rápida.

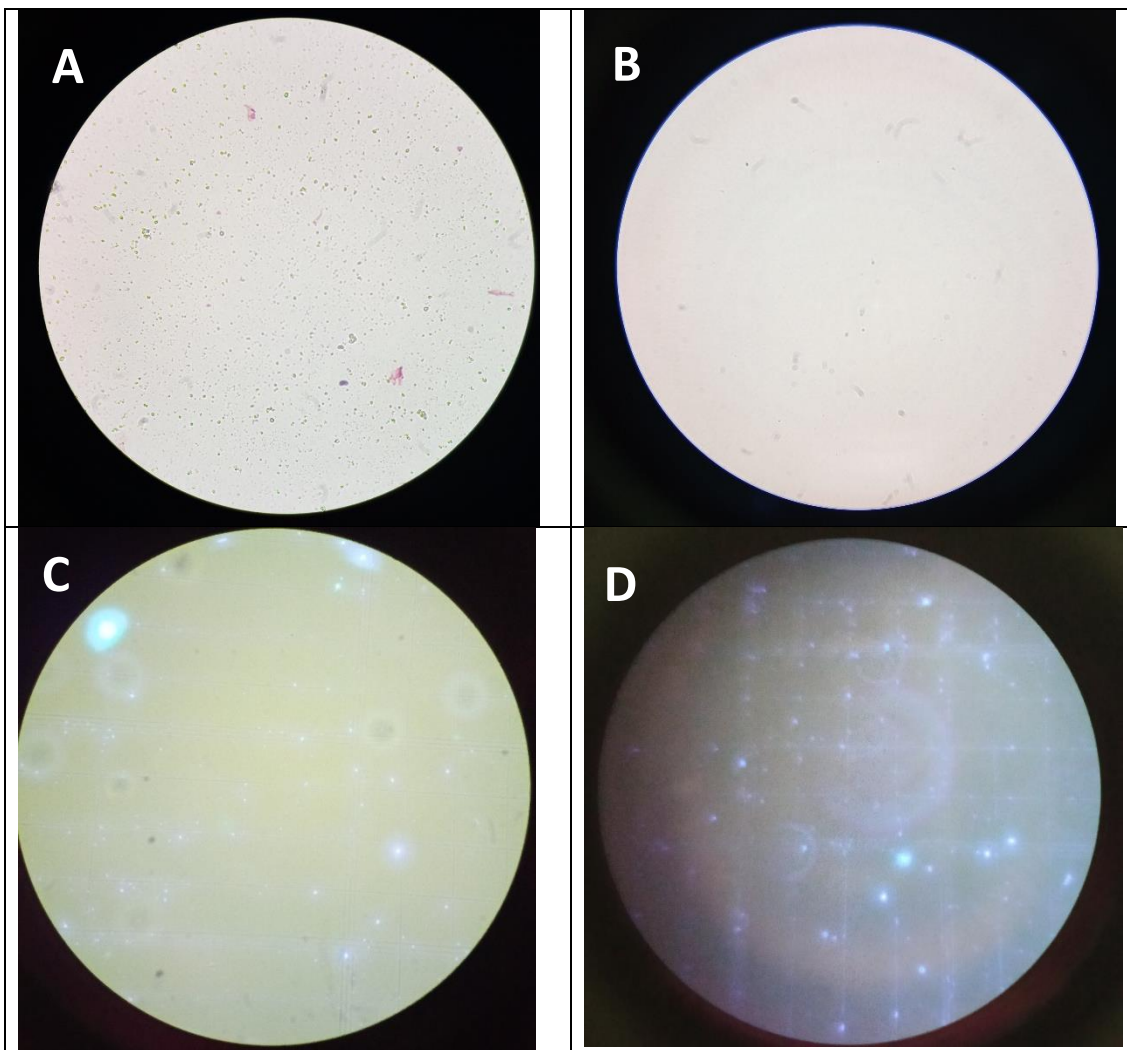


Figura 8. Imágenes de las observaciones de las distintas tinciones para elegir las más adecuadas. A: observación de la tinción con Chromotrope stain trichrome estándar. B: observación de la tinción con Fast Chromotrope stain trichrome. C: observación de la tinción con Calcofluor white en seco. D: observación de la tinción con Calcofluor white en disolución.

Por tanto, se seleccionan los métodos CFW en disolución y CST estándar para el análisis del resto de muestras serológicas. En la figura 9 se observan distintas muestras de ambas tinciones.

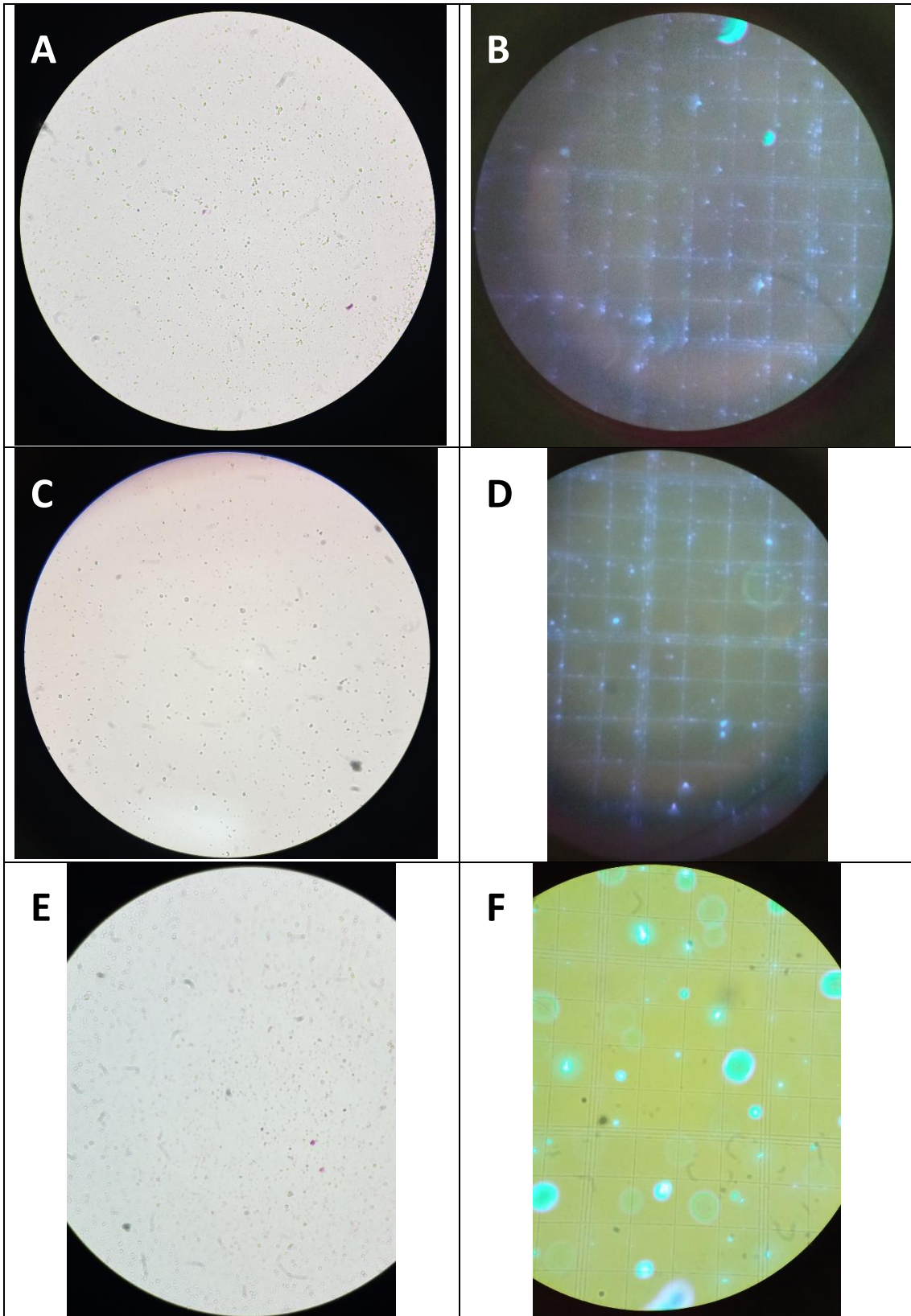


Figura 9. Imágenes de las observaciones de distintas muestras con las tinciones de CST y CFW. A: observación de la segunda tanda de muestras con CST. B: observación de la segunda tanda de muestras con CFW. C: observación de la tercera tanda con CST. D: observación de la tercera tanda con CFW. E: observación de la cuarta tanda de muestras con CST. F: observación de la cuarta tanda de muestras con CFW.

Los resultados de cada una de las muestras de conejo las clasificamos según el número de esporas observadas.

Tabla 2. Resultados del recuento de *E. cuniculi* de cada una de las muestras de conejo utilizando las tinciones de CST y CFW.

MUESTRA	Nº HISTORIAL	CST	CFW	MUESTRA	Nº HISTORIAL	CST	CFW
1	2124	+++	+++	47	7915	++	+++
2	14774	+++	+++	48	7424	+	+++
3	11632	++	++	49	SN	+	+++
4	10433	++	+++	50	7530	++	++
5	4860	++	++	51	2426	++	++
6	7607	+++	++	53	6681	-	-
7	9965	+++	+	54	8122	+	++
8	5970	+++	+	56	SN	++	+
9	10488	+++	++	57	5431	++	+
10	9260	++	++	58	8095	+	+
11	9773	+++	++	59	8539	++	+
13	4497	+++	++	60	12639	++	++
14	5811	+++	+++	61	8311	+++	+++
15	11182	+	+++	62	12537	+	+++
16	9065	+	++	63	6959	++	+++
17	11615	+	++	64	9899	+	+++
18	9878	++	+++	65	7958	++	+++
19	SN	++	++	66	10538	++	++
20	11365	+	++	67	7697	+	+
21	4401	++	++	68	10706	+	++
22	11201	++	++	69	10575	+	++
23	11046	+	++	70	10641	+	++
24	8728	++	++	71	4436	++	++
25	2603	+	+	72	8464	++	++
26	10509	++	+	73	10438	+	+++
27	7931	++	++	74	6013	+	++
28	528	+	+	75	7723	++	+++
29	11472	+	++	76	5455	+	+++
30	11196	+	++	77	9815	++	++
31	5742	+++	+++	79	10678	+	++
32	4318	++	+++	80	7557	+	++
33	11154	+	+++	81	9974	++	+
34	11211	++	+++	82	9815	++	++
36	10927	++	++	83	10290	+	+
37	2226	++	+++	84	2091	+	+
38	11502	+++	+++	85	9640	+++	+++
39	11402	+++	+++	86	10114	++	++
40	10687	+	++	87	10296	+	+++
41	9225	+	++	88	8834	+	++
42	4931	++	++	89	8095	+	+
43	6072	++	+++	90	2770	++	+++
45	5742	++	+++	91	8093	+	+++
46	11209	++	+++	92	9466	++	+++

MUESTRA	Nº HISTORIAL	CST	CFW	MUESTRA	Nº HISTORIAL	CST	CFW
93	7175	+	++	100	9269	+	++
94	7986	+	++	101	10084	+	++
95	528	+	+	102	9773	+++	++
96	8851	+	++	104	10284	+	++
97	9269	+	++	106	5670	-	-
98	9170	++	++	109	10518	+	+
99	9769	-	-	110	10860	+	+

SN: Sin número

Se observa que la tendencia de cada muestra en ambas tinciones se mantiene, con una mayor detección de esporas con CFW, ya que se trata de un método más sensible (bibliografía).

Zoonosis

Cabe destacar que la encefalitozoonosis causada por *E. cuniculi* puede también afectar a otras especies, aunque el conejo sea el huésped por excelencia y es un claro ejemplo de zoonosis. Por ello, además de las muestras de conejo se analizaron muestras de otros animales sospechosos de padecer dicha enfermedad. Estas muestras también fueron recogidas en Selvática, clínica de animales exóticos ideal para ver variación en distintas especies.

Tabla 3. Resultados del recuento de *E. cuniculi* de cada una de las muestras de animales exóticos utilizando las tinciones de CST y CFW.

MUESTRA	ESPECIE	Nº HISTORIAL	CST	CFW
12	<i>Mustela putorius furo</i>	10448	+++	++
35	<i>Cavia porcellus</i>	8584	++	++
44	<i>Cavia porcellus</i>	8850	++	+++
52	<i>Sus scrofa</i>	7035	+	+++
55	<i>Ara ararauna</i>	8362	+	+
78	<i>Cavia porcellus</i>	10250	++	+++
103	<i>Psittacus erithacus</i>	4544	+	++
105	<i>Mustela putorius furo</i>	7623	++	+++
107	<i>Iguana iguana</i>	10090	+++	+++
108	<i>Agrionemys horsfieldii</i>	9853	++	+++
112	<i>Psittacus erithacus</i>	10414	-	-
113	<i>Ara ararauna</i>	7643	+	++
114	<i>Agrionemys horsfieldii</i>	9534	-	-

Se puede observar que *E. cuniculi* es capaz de infectar a otras especies, aunque no sea tan habitual encontrarlo como en los conejos.

Análisis estadístico

A continuación, se comentan los datos obtenidos más significativos de cada uno de los estudios estadísticos realizados.

Sintomatologías nistagmo y síndrome vestibular

En primer lugar, se realizó un estudio entre conejos que presentan nistagmo y conejos con síndrome vestibular (SV) (Figura 14). Con este análisis, se obtuvo que el 100% de los conejos que padecen nistagmo, presentan simultáneamente síndrome vestibular (Tabla 5). En la Tabla 6 podemos observar también que el p-value es menor de 0,05 (p-value = 0,0000), dato que nos permite rechazar la hipótesis nula, ya que existe una relación entre las variables y por tanto se da una dependencia entre ambas.

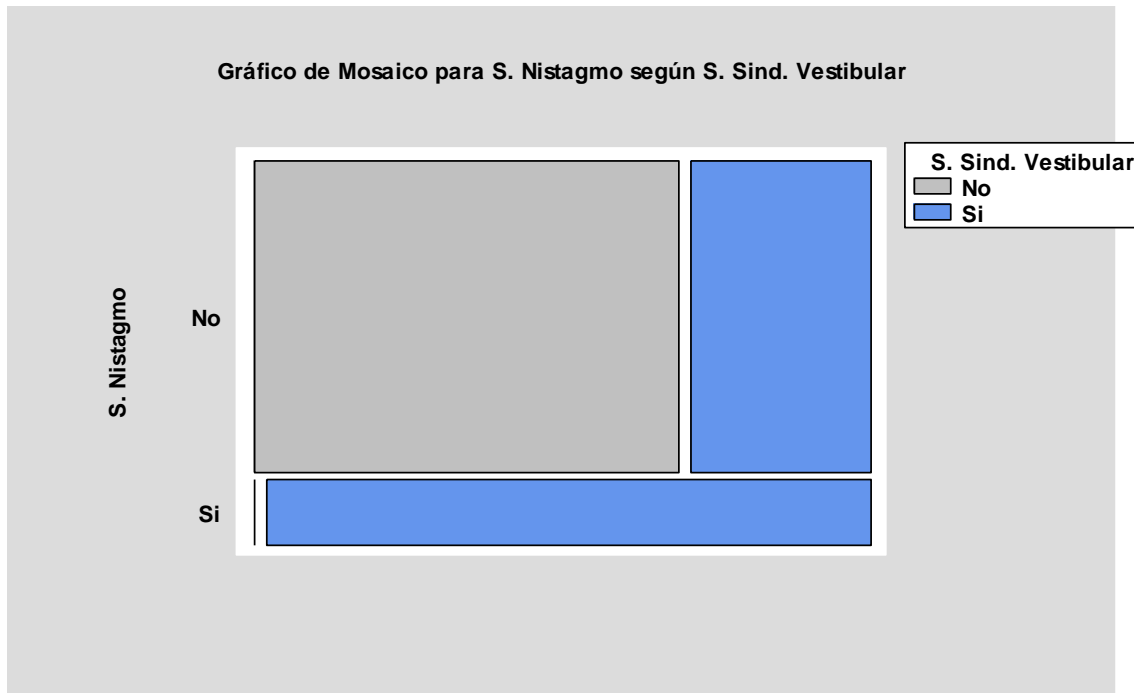


Figura 10. Gráfico de mosaico para síntoma Nistagmo según SV

Tabla 4. Frecuencias para Nistagmo según SV

	No	Si	Total por Fila
No	64	27	91
	58,18%	24,55%	82,73%
Si	0	19	19
	0,00%	17,27%	17,27%
Total por Columna	64	46	110
	58,18%	41,82%	100,00%

Tabla 5. Test de independencia para Nistagmo según SV.

Prueba	Estadístico	Gl	Valor-P
Chi-Cuadrada	31,954	1	0,0000

Sintomatologías ocular y síndrome vestibular

Por otro lado, se realizó un estudio entre conejos que presentan sintomatología ocular y conejos con síndrome vestibular (SV) (Figura 15). Con este análisis, podemos observar las frecuencias de los conejos que padecen sintomatología ocular y presentan simultáneamente síndrome vestibular (Tabla 7). En la Tabla 8 podemos observar también que el p-value es menor de 0,05 (p-value = 0,0327), dato que nos permite rechazar la hipótesis nula, ya que existe una relación ente las variables y por tanto se da una dependencia entre ambas.

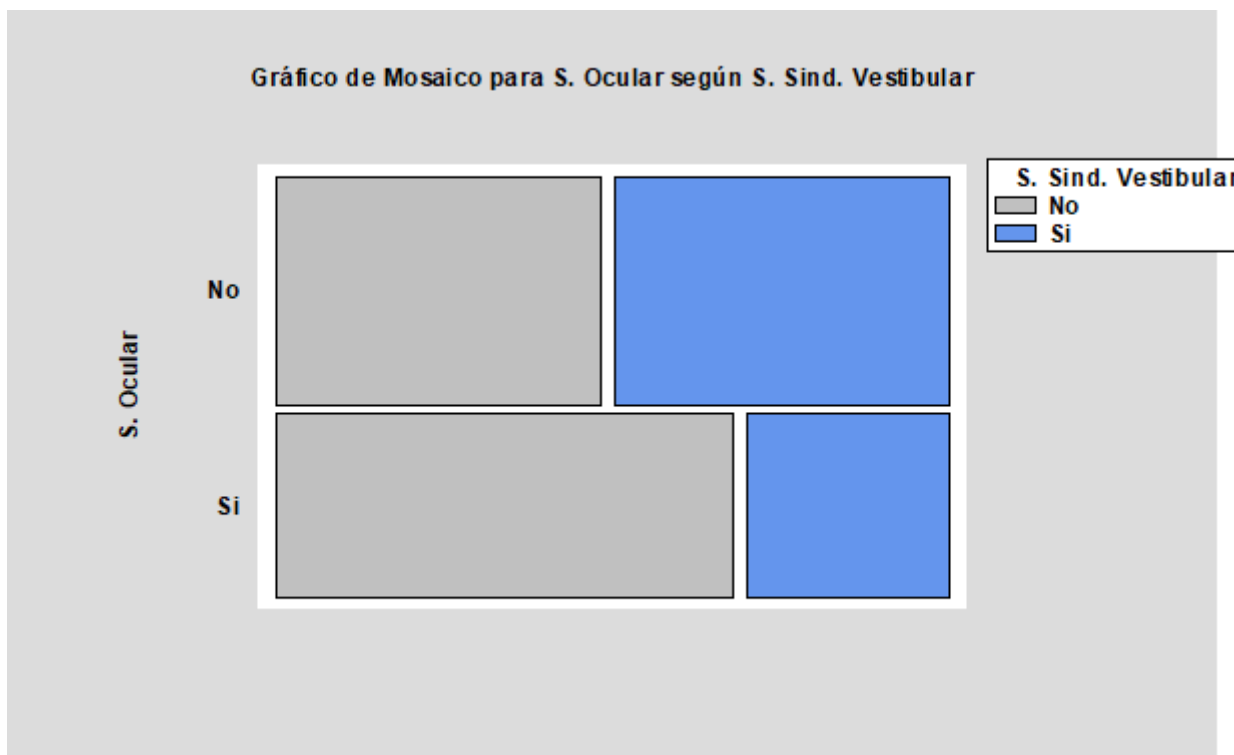


Figura 11. Gráfico de mosaico para síntoma ocular según SV

Tabla 6. Frecuencias para S. ocular según SV

	No	Si	Total por Fila
No	30	31	61
	27,27%	28,18%	55,45%
Si	34	15	49
	30,91%	13,64%	44,55%
Total por Columna	64	46	110
	58,18%	41,82%	100,00%

Tabla 7. Test de independencia para S. ocular según SV.

Prueba	Estadístico	Gl	Valor-P
Chi-Cuadrada	4,560	1	0,0327

Sintomatologías rolling y síndrome vestibular

Por otro lado, se realizó un estudio entre conejos que presentan sintomatología de Rolling y conejos con síndrome vestibular (SV) (Figura 16). Con este análisis, podemos observar las frecuencias de los conejos que padecen rolling y presentan simultáneamente síndrome vestibular (Tabla 9). En la Tabla 10 podemos observar también que el p-value es menor de 0,05 (p-value = 0,0000), dato que nos permite rechazar la hipótesis nula, ya que existe una relación entre las variables y por tanto se da una dependencia entre ambas.

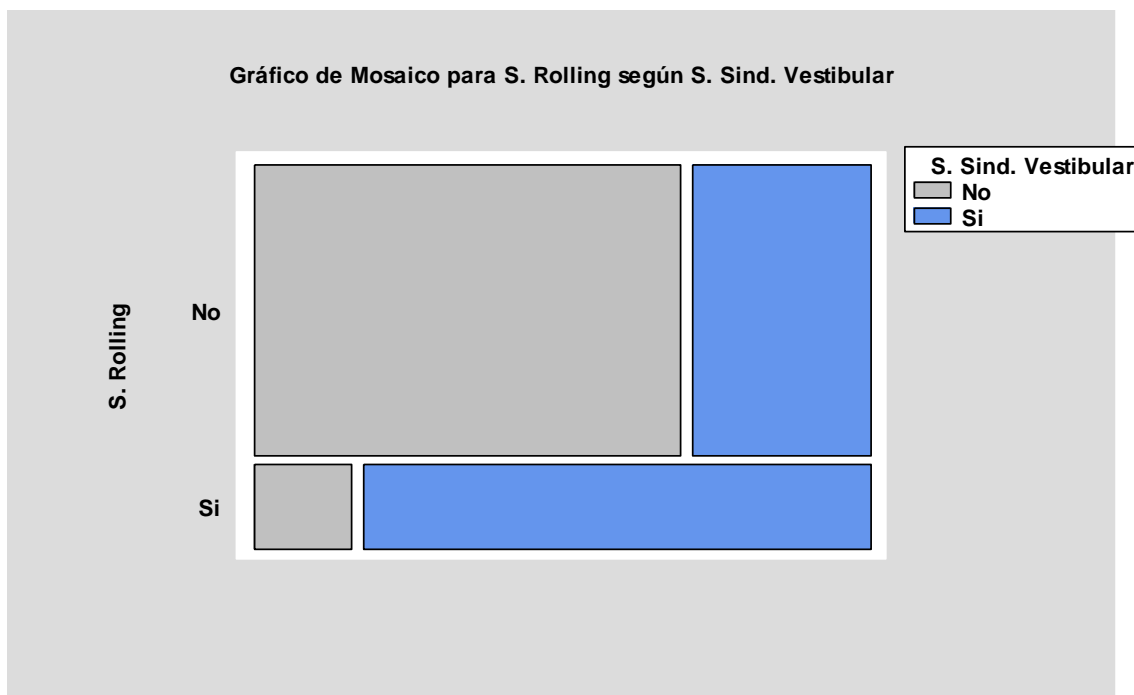


Figura 12. Gráfico de mosaico para Rolling según SV

Tabla 8. Frecuencias para Rolling según SV

	No	Si	Total por Fila
No	60	25	85
	54,55%	22,73%	77,27%
Si	4	21	25
	3,64%	19,09%	22,73%
Total por Columna	64	46	110
	58,18%	41,82%	100,00%

Tabla 9. Test de independencia para Rolling según SV.

Prueba	Estadístico	Gl	Valor-P
Chi-Cuadrada	23,660	1	0,0000

Sintomatologías andar en círculos y rolling

Por otro lado, se realizó un estudio entre conejos que presentan sintomatología de Rolling y conejos que andan en círculos (Figura 17). Con este análisis, podemos observar las frecuencias de los conejos que padecen rolling y simultáneamente andan en círculos (Tabla 11). En la Tabla 12 podemos observar también que el p-value es menor de 0,05 (p-value = 0,0015), dato que nos permite rechazar la hipótesis nula, ya que existe una relación ente las variables y por tanto se da una dependencia entre ambas.

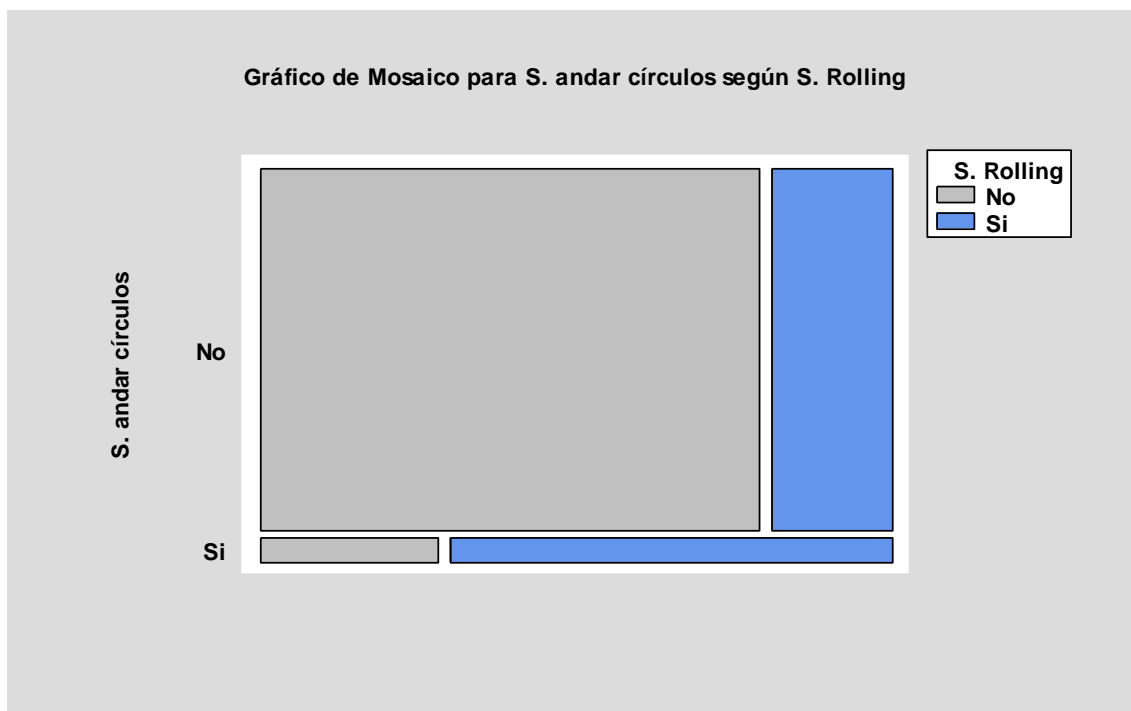


Figura 13. Gráfico de mosaico para andar en círculos según Rolling

Tabla 10. Frecuencias para andar en círculos según Rolling

	No	Si	Total por Fila
No	83	20	103
	75,45%	18,18%	93,64%
Si	2	5	7
	1,82%	4,55%	6,36%
Total por Columna	85	25	110
	77,27%	22,73%	100,00%

Tabla 11. Test de independencia para andar en círculos según Rolling

Prueba	Estadístico	Gl	Valor-P
Chi-Cuadrada	10,096	1	0,0015

Sintomatologías ataxia general y síndrome vestibular

Por otro lado, se realizó un estudio entre conejos que presentan sintomatología de ataxia general y conejos con síndrome vestibular (SV) (Figura 18). Con este análisis, podemos observar las frecuencias de los conejos que padecen rolling y presentan simultáneamente síndrome vestibular (Tabla 13). En la Tabla 14 podemos observar también que el p-value es menor de 0,05 (p-value = 0,0005), dato que nos permite rechazar la hipótesis nula, ya que existe una relación ente las variables y por tanto se da una dependencia entre ambas.

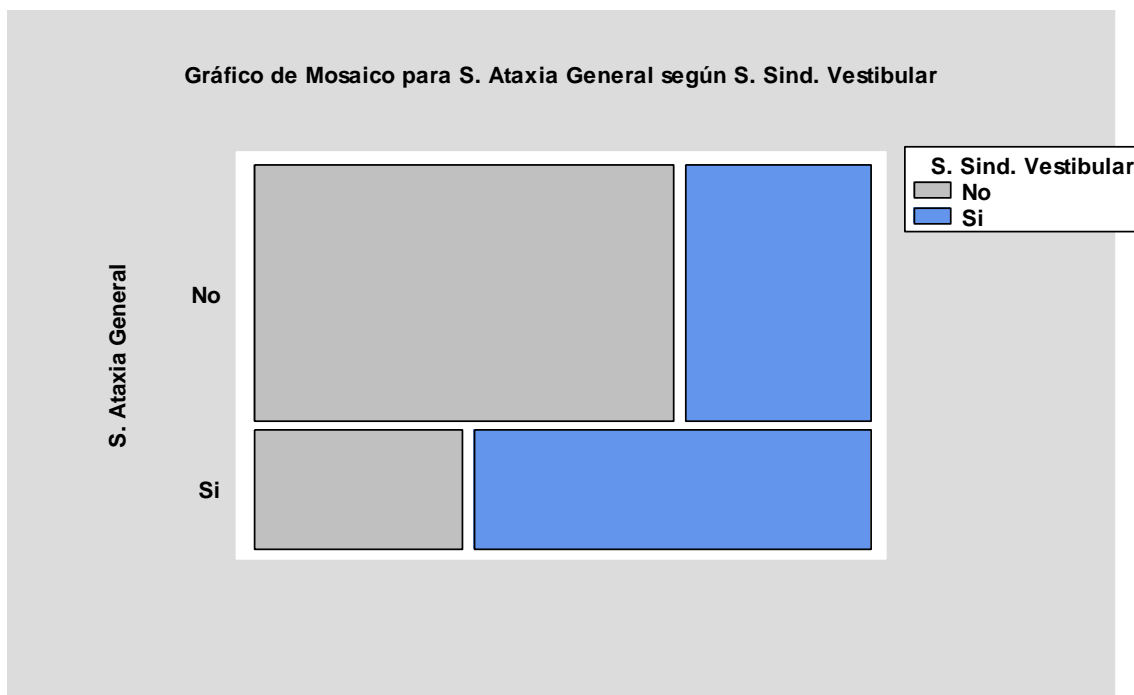


Figura 14. Gráfico de mosaico para ataxia general según SV

Tabla 12. Frecuencias para ataxia general según SV

	No	Si	Total por Fila
No	52	23	75
	47,27%	20,91%	68,18%
Si	12	23	35
	10,91%	20,91%	31,82%
Total por Columna	64	46	110
	58,18%	41,82%	100,00%

Tabla 13. Test de independencia para ataxia general según SV.

Prueba	Estadístico	Gl	Valor-P
Chi-Cuadrada	12,048	1	0,0005

Conclusiones

Estas sintomatologías son las que guardan dependencia entre sí y, por tanto, las más relacionadas entre ellas cuando un conejo está enfermo de *E. cuniculi*. Esto tiene una gran importancia ya que si se observan estos síntomas en conjunto es más probable pensar que se trata de una encefalozoonosis. Eso sí, cuanto mayor sea la población muestral más significativo es el estudio estadístico.

El resto del estudio estadístico completo puede visualizarse en el Anexo I.

Cultivos celulares

Los resultados de los cultivos celulares se observaron mediante CFW en disolución, tanto el cultivo celular como las células lisadas, con el objetivo de comprobar el crecimiento de las células y de *E. cuniculi*. Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes ya que no se observó un claro crecimiento de las esporas en el cultivo, como podemos ver en la siguiente figura, por lo que es probable que para esto sea más apropiado utilizar otro tipo celular o estudiar otras condiciones de cultivo.

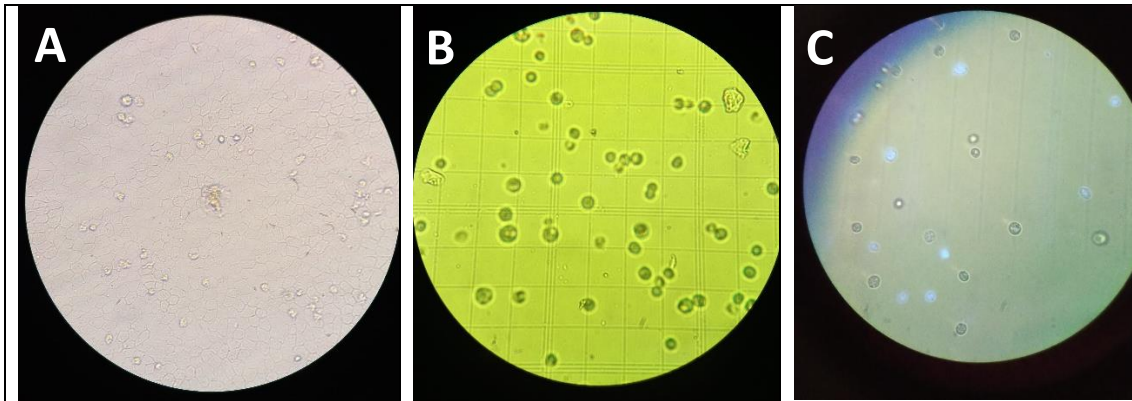


Figura 15. Imágenes de la visualización de las células MDCK en distintas condiciones. A: cultivo de células MDCK. B: observación de células MDCK sin infectar con CFW. C: observación de células MDCK infectadas con CFW.

Purificación del microsporidio

Con la metodología empleada se consiguió aislar el microsporidio separándolo del resto de elementos presentes. Para comprobarlo se visualizó con CFW como se muestra en la siguiente imagen.

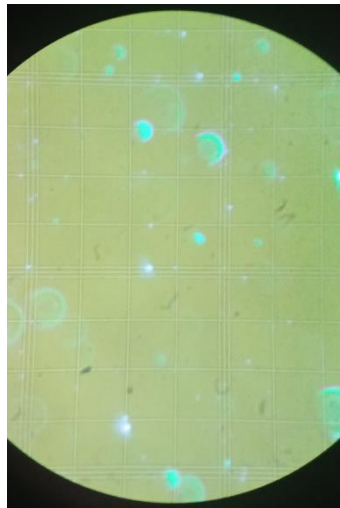


Figura 16. Imagen de la observación de las esporas del microsporidio aisladas.

Purificación de anticuerpos del suero de conejos con encefalitozoonosis

Con la mezcla de 7 sueros de conejos infectados de *E. cuniculi* se obtuvo un calibrador con un título de 1/1120. Para ver la concentración de anticuerpos se midió con el NanoDrop obteniendo un resultado de 4,65 mg/mL en la segunda fracción de la columna, en la que eluye la mayoría de la proteína.

Tras realizar los lavados con PBS y la filtración se obtuvo un total de 4,54 mg/mL de anticuerpos en la mezcla preparada.

Ensayo de flujo lateral en tira reactiva para la detección de anticuerpos anti-*E. cuniculi*.

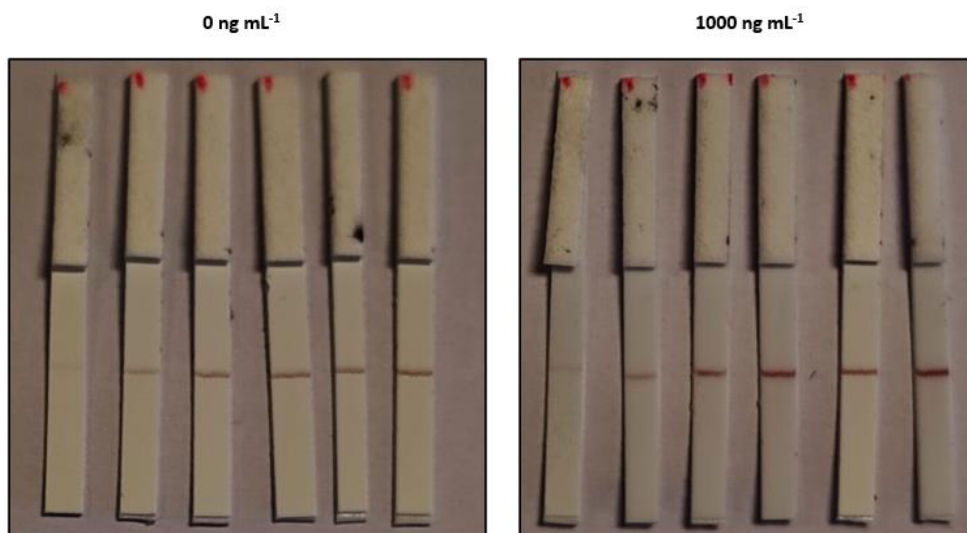
Las concentraciones de proteína medidas en NanoDrop de los distintos extractos fueron los que se observan en la siguiente Tabla:

Tabla 14. Concentraciones en mg/mL de los distintos extractos de *E. cuniculi* medidos con NanoDrop.

Extracto	CONCENTRACIÓN (mg/mL)
Esporas procedentes de orina sin sonicar (EOP)	6,101
Esporas procedentes de medio sin sonicar (EMP)	5,894
Esporas procedentes de orina sonicadas (EOS)	8,187
Esporas procedentes de medio sonicadas (EMS)	6,257

Los resultados de la primera estrategia seguida no fueron los esperados debido a un falso positivo ya que los anticuerpos anti-HIgG reconocen los anticuerpos anti-*E. cuniculi* y los anticuerpos anti-BSA ya que son producidos en conejo. Sin embargo, se puede observar una clara diferencia de intensidad de la señal entre el blanco con el ensayo el pool de anticuerpos 1 $\mu\text{g/mL}$, como se puede ver en la Figura 17. Esto es debido a un reconocimiento de las IgG anti-*E. cuniculi* y anti-BSA, mientras que en el blanco solo se reconoce las anti-BSA en la TL. Indica que sí existe reconocimiento específico entre los anti-*E. cuniculi* y los epítomos de espora conjugados a las AuNP, aunque este resultado no es concluyente además de que el principio para desarrollar la tira reactiva no es el adecuado.

A



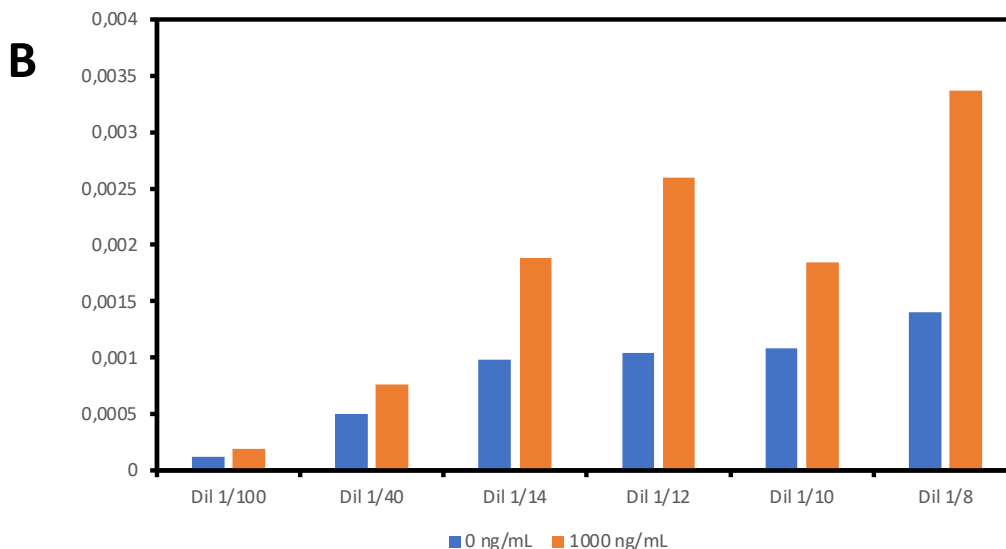


Figura 17. Medida de la intensidad de señal en la TL de las tiras reactivas utilizando la primera estrategia. A: Imágenes de las tiras reactivas sumergidas en blanco (0 ng/mL) y en muestra de anticuerpos (1000 ng/mL). B: Gráfico de barras de la intensidad de línea en las tiras de blanco y con muestra, donde se puede observar la diferencia entre ambas.

Es por eso por lo que se valoró el estudio de la segunda estrategia, más adecuada para la elaboración de la tira reactiva. En un principio se realiza también en una sola etapa con las AuNP conjugadas a BSA y anti-HIgG, y la muestra de pool de anticuerpos procedente del suero de conejo. Sin embargo, se observa que a la altura del pocillo se queda retenida gran parte de la muestra debido a la falta de un lavado de la tira y de surfactante adecuado junto con la muestra. Para que la muestra de anticuerpos fluya correctamente, se realiza en dos etapas en la que la primera fluye los anticuerpos con tampón de resuspensión para que reconozcan la espora que se encuentra en la nitrocelulosa, mientras que en la segunda etapa se pone sumerge la tira en distintas diluciones de AuNP para revelar la unión. Entre ambas etapas se realiza un lavado de la tira utilizando PBS-T para eliminar los anticuerpos que no interaccionen con la espora para que no interfieran con la señal.

En primer lugar, el ensayo se realiza en las tiras impresas de 0,2 y 0,4 mg/mL de espora. Sin embargo, en los resultados no se llega a ver señal en la TL para ninguna de las concentraciones de anticuerpos y de solución de AuNP estudiadas, a excepción de la tira de 0,4 mg/mL de espora, 5 µg/mL de muestra de anticuerpos y una dilución 1/8 de AuNP en tampón de resuspensión. Esto cuadra con que la CL cada vez que se disminuye la concentración de muestra marcaba una señal más clara. Estos resultados se pueden interpretar por el llamado “hook effect”. Este efecto nos dice que si existe una alta concentración de muestra puede no dar señal debido al impedimento estérico de la gran cantidad de anticuerpos, en tira reactiva asociado a la no aparición de la TL y la menor señal de la CL.

Por tanto, al aparecer una señal débil se piensa que es “hook effect” y se probaron diluciones de muestra de anticuerpos aún más pequeñas sin obtener resultados satisfactorios. También se varían distintas concentraciones de AuNP conjugadas y se fabricaron las tiras con mayores concentraciones de espora. Además, se prueba la espora sonicada y filtrada, la espora sonicada y no filtrada y la espora sin sonicar, por si el reconocimiento no era el adecuado, pero ninguna de las señales dio los resultados esperados en la TL.



B

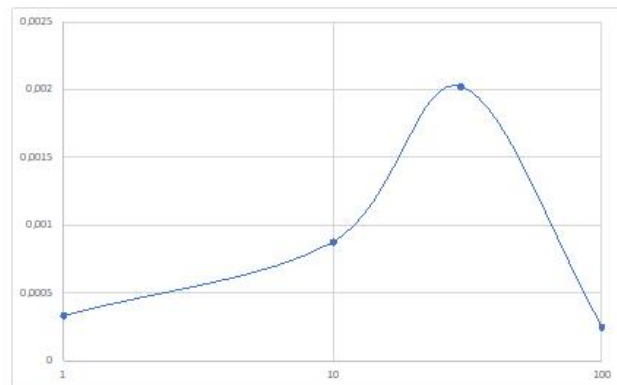


Figura 18. Medida de la intensidad de señal exponencial en las tiras reactivas. A: Imagen de las tiras en las que se observa la creciente intensidad, excepto en la última, esto es debido al “hook effect”. B: Representación gráfica de la señal de reconocimiento utilizando las cinco tiras para observar el “hook effect”.

Es por ello por lo que es necesario un estudio con mayor profundidad a la hora de optimizar el proceso para poder desarrollar una tira reactiva que permita diagnosticar *E. cuniculi* en suero. Un factor determinante puede ser la baja sensibilidad de estos métodos diagnóstico en comparación con otros, principalmente por la presencia de anticuerpos no específicos en las muestras que interfieren con la señal.

CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas de este Trabajo Fin de Grado son las siguientes:

1. El estudio serológico realizado mediante las tinciones Chromotrope stain trichrome (CST) y Calcofluor White (CFW) demuestra la necesidad de utilizar diferentes técnicas para determinar la presencia del parásito, sobre todo, en animales portadores y asintomáticos, ya que estos resultan seronegativos en muchas ocasiones, pero pueden excretar las esporas a través de la orina y/o heces.
2. La línea celular MDCK es adecuada para la amplificación de *E. cuniculi*, sin embargo, sería interesante probar otras líneas celulares con el fin de mejorar la amplificación.
3. El estudio estadístico muestra que gran parte de la sintomatología de la encefalitozoonosis es dependiente entre sí.
4. Se debe optimizar el desarrollo de las tiras reactivas para la detección de *E. cuniculi* para mejorar el diagnóstico de la encefalitozoonosis que afecta a conejos y otros animales, incluso pudiendo afectar a humanos inmunodeprimidos.

En conclusión, la encefalitozoonosis es una enfermedad que cursa con sintomatología muy diversa y, en muchos casos, los individuos son asintomáticos por lo que no se identifica correctamente la patología. Generalmente, el diagnóstico de la enfermedad es realizado por técnicas serológicas como el ELISA o IFAT, lo que en muchas clínicas dificulta su diagnóstico siendo necesario el envío de las muestras a otros laboratorios cada vez que se sospecha de un caso de encefalitozoonosis. Es necesario el desarrollo de métodos rápidos, como los descritos en este trabajo, para mejorar el diagnóstico de la enfermedad a nivel clínico y reducir su impacto, debido a su potencial zoonótico.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguila, C. del, Croppo, G. P., Moura, H., da Silva, A. J., Leitch, G. J., Moss, D. M., Wallace, S., Slemenda, S. B., Pieniazek, N. J., & Visvesvara, G. S. (1998). Ultrastructure, Immunofluorescence, Western Blot, and PCR Analysis of Eight Isolates of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* Established in Culture from Sputum and Urine Samples and Duodenal Aspirates of Five Patients with AIDS. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 36, Issue 5). <https://journals.asm.org/journal/jcm>
- Beauvais, B., Sarfati, C., Challier, S., & Derouin, F. (1994). In Vitro Model To Assess Effect of Antimicrobial Agents on *Encephalitozoon cuniculi* Spores were collected from the supernatant of MDCK cell cultures infected for at least 4 weeks. The supernatant was first centrifuged at 400 x g for 10. In *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. <https://journals.asm.org/journal/aac>
- Bigliardi, E., & Sacchi, L. (2001). *Cell biology and invasion of the microsporidia microsporidia / cytology / life cycle / invasion / polar tube*.
- Botero, J. H., Montoya, M. N., Vanegas, A. L., Díaz, A., Navarro-I-Martínez, L., Bornay, F. J., Izquierdo, F., del Águila, C., & del Pilar Agudelo, S. (2004). Frecuencia de microsporidiosis intestinal en pacientes positivos para VIH mediante las técnicas de Gram cromotropo rápido y PCR. In *Biomédica* (Vol. 24).
- Brangel, P., Sobarzo, A., Parolo, C., Miller, B. S., Howes, P. D., Gelkop, S., Lutwama, J. J., Dye, J. M., Mckendry, R. A., Lobel, L., & Stevens, M. M. (2018). *A Serological Point-of-Care Test for the Detection of IgG Antibodies against Ebola Virus in Human Survivors*. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b07021>
- Degirolami, P. C., Ezratty, C. R., Desai, G., Mccullough, A., Asmuth, D., Wanke, C., & Federman, A. M. (1995). Diagnosis of Intestinal Microsporidiosis by Examination of Stool and Duodenal Aspirate with Weber's Modified Trichrome and Uvitex 2B Stains. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 33, Issue 4). <http://jcm.asm.org/>
- Diagnostik Megacor. FASTEST ENCEPH. Prospecto obtenido en la web: https://www.megacor.at/veterinary/product/fastest_enceph.html
- Didier, E. S., Orenstein, J. M., Aldras, A., Bertucci, † Donna, Rogers, L. B., & Janney, F. A. (1995). Comparison of Three Staining Methods for Detecting Microsporidia in Fluids Downloaded from. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 33, Issue 12). <http://jcm.asm.org/>
- È Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Me Â te Â nier, G., Thomarat, F., Â rare Prensier, G., Â rie Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Â de Â ric Delbac, F., el Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J., & Vivare Á, C. P. (2001). *Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite Encephalitozoon cuniculi*. www.nature.com
- Franzen, C. (2004). Microsporidia: How can they invade other cells? *Trends in Parasitology*, 20(6), 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.04.009>
- Green, L. C., Leblanc, P. J., & Didier, E. S. (2000). Discrimination between Viable and Dead *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidian) Spores by Dual Staining with Sytox Green and Calcofluor White M2R. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 38, Issue 10). www.graphpad.com]

- Han, B., Moretto, M., & M. Weiss, L. (2019a). Encephalitozoon: Tissue Culture, Cryopreservation, and Murine Infection. *Current Protocols in Microbiology*, 52(1). <https://doi.org/10.1002/cpmc.72>
- Han, B., Moretto, M., & M. Weiss, L. (2019b). Encephalitozoon: Tissue Culture, Cryopreservation, and Murine Infection. *Current Protocols in Microbiology*, 52(1). <https://doi.org/10.1002/cpmc.72>
- Harcourt-Brown, F. M. (2004a). Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 13(2), 86–93. <https://doi.org/10.1053/j.saep.2004.01.004>
- Harcourt-Brown, F. M. (2004b). Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 13(2), 86–93. <https://doi.org/10.1053/j.saep.2004.01.004>
- IVAMI. (n.d.). *Encephalitozoon cuniculi - Diagnóstico molecular*.
- Javadzade, R., Rostami, A., Arabkhzaeli, F., Bahonar, A., Mohammad Rahimi, H., & Mirjalali, H. (2021). Molecular detection and genotype identification of E. cuniculi from pet rabbits. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 75. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101616>
- Jazayeri, M. H., Amani, H., Pourfatollah, A. A., Pazoki-Toroudi, H., & Sedighimoghaddam, B. (2016). Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. In *Sensing and Bio-Sensing Research* (Vol. 9, pp. 17–22). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.04.002>
- Keeling, P. J., & Fast, N. M. (2002). Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 56, pp. 93–116). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160854>
- Keeling, P. J., & Slamovits, C. H. (2004). Simplicity and complexity of microsporidian genomes. In *Eukaryotic Cell* (Vol. 3, Issue 6, pp. 1363–1369). <https://doi.org/10.1128/EC.3.6.1363-1369.2004>
- Künzel, F., & Fisher, P. G. (2018). Clinical Signs, Diagnosis, and Treatment of Encephalitozoon cuniculi Infection in Rabbits. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 21(1), 69–82. <https://doi.org/10.1016/J.CVEX.2017.08.002>
- Künzel, F., Gruber, A., Tichy, A., Edelhofer, R., Nell, B., Hassan, J., Leschnik, M., Thalhammer, J. G., & Joachim, A. (2008). Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*, 151(2–4), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.11.005>
- Luna, V. A., Stewart, B. K., Bergeron, D. L., Clausen, C. R., Plorde, J. J., & Fritsche, T. R. (n.d.). *CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE Use of the Fluorochrome Calcofluor White in the Screening of Stool Specimens for Spores of Microsporidia*. <http://ajcp.oxfordjournals.org/>
- Mathis, A., Weber, R., & Deplazes, P. (2005). Zoonotic potential of the microsporidia. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 18, Issue 3, pp. 423–445). <https://doi.org/10.1128/CMR.18.3.423-445.2005>

- Morsy, E. A., Salem, H. M., Khattab, M. S., Hamza, D. A., & Abuowarda, M. M. (2020). Encephalitozoon cuniculi infection in farmed rabbits in Egypt. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 62(1). <https://doi.org/10.1186/s13028-020-0509-6>
- Pan, Y., Wang, S., Liu, X., Li, R., Sun, Y., & Gadahi, J. A. (n.d.). Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in Humans and Rabbits in China (Vol. 10, Issue 2). <http://ijpa.tums.ac.ir>
- Parolo, C., Sena-Torralba, A., Bergua, J. F., Calucho, E., Fuentes-Chust, C., Hu, L., Rivas, L., Álvarez-Diduk, R., Nguyen, E. P., Cinti, S., Quesada-González, D., & Merkoçi, A. (n.d.). Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0357-x>
- Pelin, A., Moteshareie, H., Sak, B., Selman, M., Naor, A., Eyahpaise, M.-È., Farinelli, L., Golshani, A., Kvac, M., & Corradi, N. (2016). The genome of an *Encephalitozoon cuniculi* type III strain reveals insights into the genetic diversity and mode of reproduction of a ubiquitous vertebrate pathogen. *Heredity*, 116, 458–465. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.4>
- Ryan, N. J., Sutherland, G., Coughlan, K., Globan, M., Doultree, J., Marshall, J., Baird, R. W., Pedersen, J., Dwyer, B., & Pathology, M. (1993). A New Trichrome-Blue Stain for Detection of Microsporidial Species in Urine, Stool, and Nasopharyngeal Specimens. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 31, Issue 12). <http://jcm.asm.org/>
- Sak, B., & Kváč, M. (2022a). Chronic Infections in Mammals Due to Microsporidia. *Experientia Supplementum (2012)*, 114, 319–371. https://doi.org/10.1007/978-3-030-93306-7_12
- Sak, B., & Kváč, M. (2022b). Chronic Infections in Mammals Due to Microsporidia. *Experientia Supplementum (2012)*, 114, 319–371. https://doi.org/10.1007/978-3-030-93306-7_12
- Suter, C., Moller-Doblies, U. U., Hatt, J.-M., & Deplazes, P. (n.d.). *Prevention and treatment of Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits with fenbendazole; Prevention and treatment of Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits with fenbendazole.* <https://doi.org/10.1136/vr.148.15.478>
- Toya, L. ', Latney, V., Bradley, C. W., Wyre, N. R., & Ryan, M. J. (2014). Encephalitozoon cuniculi in pet rabbits: diagnosis and optimal management. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 5–169. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S49842>
- Visvesvara, G. S. (2002). In vitro cultivation of microsporidia of clinical importance. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 15, Issue 3, pp. 401–413). <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.401-413.2002>
- Waller, T. (1979). Sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* to various temperatures, disinfectants and drugs. In *Laboratory Animals* (Vol. 13).
- Weber, R., Deplazes, P., & Schwartz, D. (2000). Diagnosis and Clinical Aspects of Human Microsporidiosis. In *Contributions to Microbiology* (Vol. 6, pp. 166–192). <https://doi.org/10.1159/000060360>
- Weiss, L. M. (2001). Microsporidia: emerging pathogenic protists. In *Acta Tropica* (Vol. 78). www.parasitology-online.com

ANEXO I

Análisis estadísticos no significativos de la sintomatología de la encefalitozoonosis

Sintomatologías ocular y síndrome vestibular

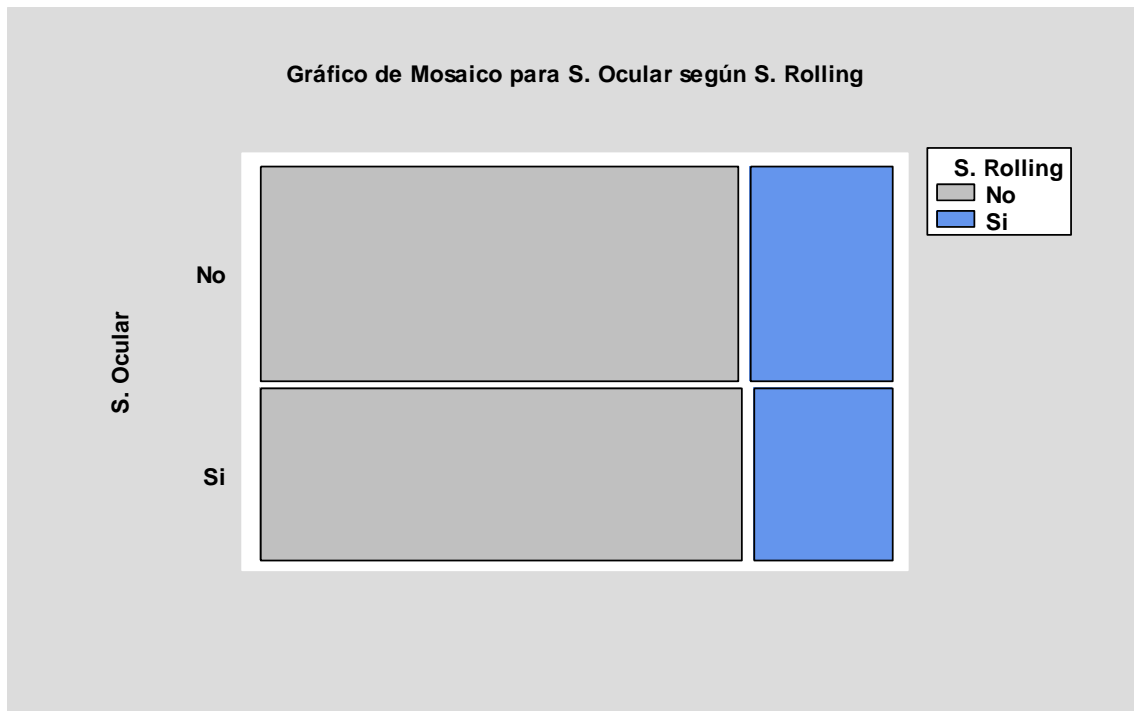


Figura 19. Gráfico de mosaico para S. ocular según Rolling

Tabla 15. Frecuencias para S. ocular según Rolling

	No	Si	Total por Fila
No	47	14	61
	42,73%	12,73%	55,45%
Si	38	11	49
	34,55%	10,00%	44,55%
Total por Columna	85	25	110
	77,27%	22,73%	100,00%

Tabla 16. Test de independencia para S. ocular según Rolling

Prueba	Estadístico	Gl	Valor-P
Chi-Cuadrada	0,004	1	0,9502

Sintomatologías andar en círculos y síndrome vestibular

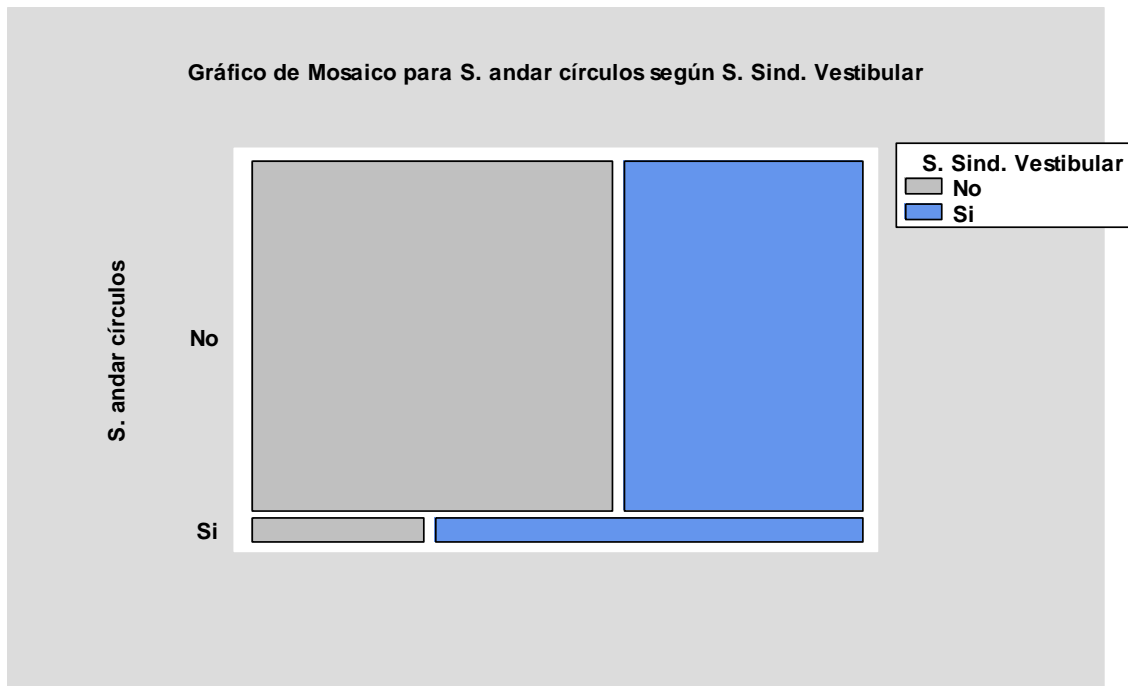


Figura 20. Gráfico de mosaico para S. andar en círculos según SV

Tabla 17. Frecuencias para S. andar en círculos según SV

	No	Si	Total por Fila
No	62	41	103
	56,36%	37,27%	93,64%
Si	2	5	7
	1,82%	4,55%	6,36%
Total por Columna	64	46	110
	58,18%	41,82%	100,00%

Tabla 18. Test de independencia para S. andar en círculos según SV

Prueba	Estadístico	Gl	Valor-P
Chi-Cuadrada	2,694	1	0,1007

Sintomatologías ataxia en extremidades posteriores y síndrome vestibular

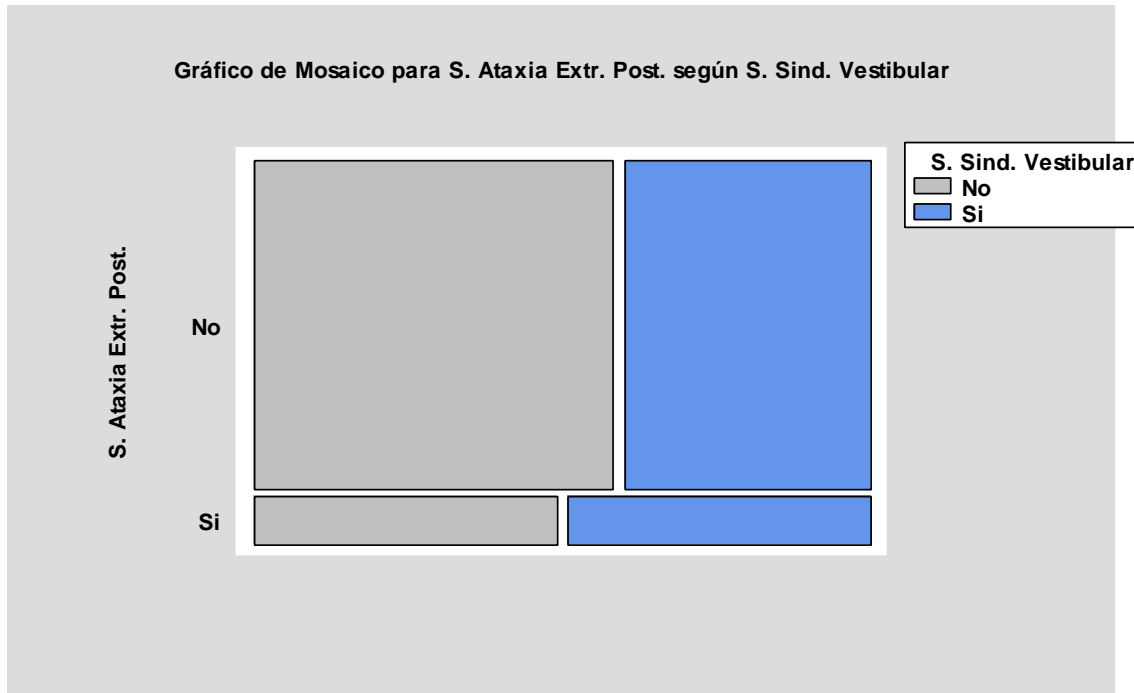


Figura 21. Gráfico de mosaico para S. ataxia en extremidades posteriores según SV

Tabla 19. Frecuencias para S. ataxia en extremidades posteriores según SV

	No	Si	Total por Fila
No	57	39	96
	51,82%	35,45%	87,27%
Si	7	7	14
	6,36%	6,36%	12,73%
Total por Columna	64	46	110
	58,18%	41,82%	100,00%

Tabla 20. Test de independencia para S. ataxia en extremidades posteriores según SV

Prueba	Estadístico	Gl	Valor-P
Chi-Cuadrada	0,441	1	0,5065

Sintomatologías ataxia en extremidades posteriores y Rolling

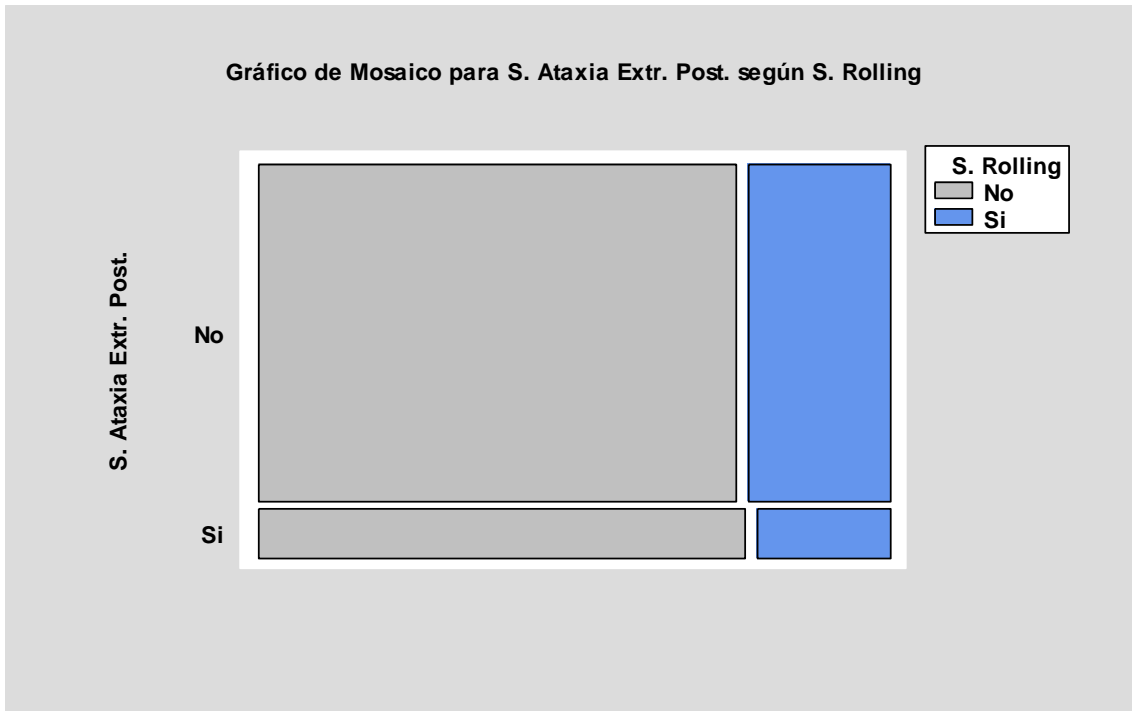


Figura 22. Gráfico de mosaico para S. ataxia en extremidades posteriores según Rolling.

Tabla 21. Frecuencias para S. ataxia en extremidades posteriores según SV

	No	Si	Total por Fila
No	74	22	96
	67,27%	20,00%	87,27%
Si	11	3	14
	10,00%	2,73%	12,73%
Total por Columna	85	25	110
	77,27%	22,73%	100,00%

Tabla 22. Test de independencia para S. ataxia en extremidades posteriores según Rolling.

Prueba	Estadístico	Gl	Valor-P
Chi-Cuadrada	0,015	1	0,9012

Sintomatologías ataxia general y Rolling

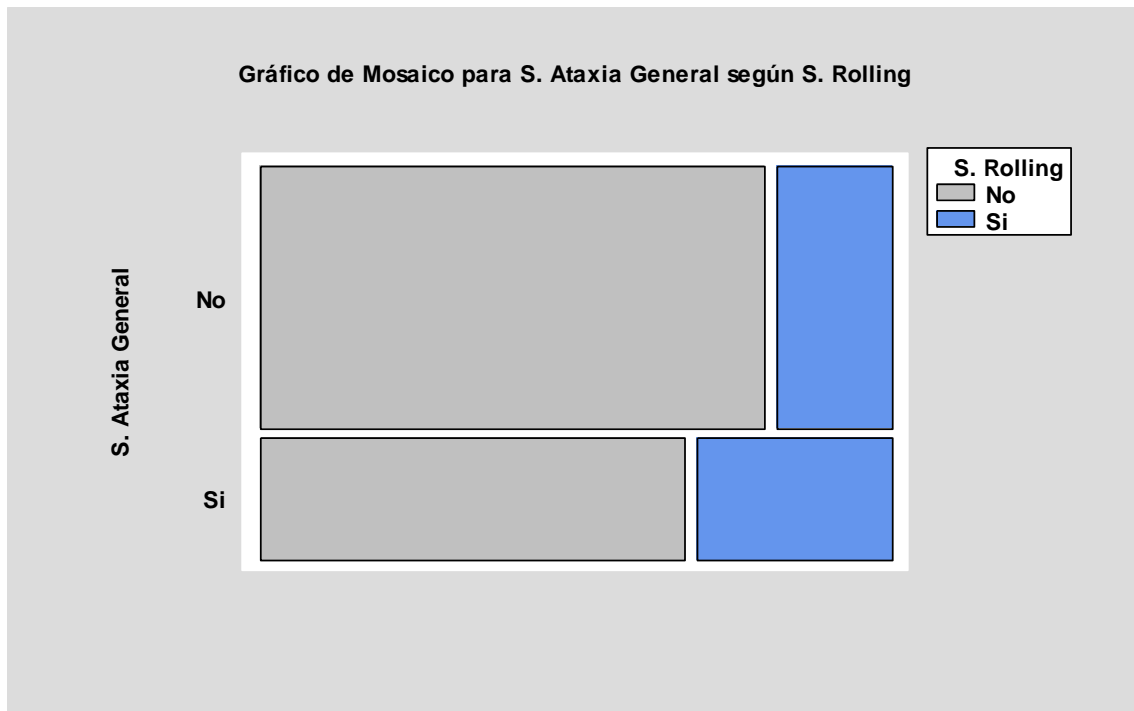


Figura 23. Gráfico de mosaico para S. ataxia general según Rolling.

Tabla 23. Frecuencias para S. ataxia general según Rolling.

	No	Si	Total por Fila
No	61	14	75
	55,45%	12,73%	68,18%
Si	24	11	35
	21,82%	10,00%	31,82%
Total por Columna	85	25	110
	77,27%	22,73%	100,00%

Tabla 24. Test de independencia para S. ataxia en extremidades posteriores según Rolling.

Prueba	Estadístico	Gl	Valor-P
Chi-Cuadrada	2,213	1	0,1368