

Trabajos de revisión

APLICACIONES DE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN EN EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

SB Jurado, MA Petruccelli

Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad Ciencias Veterinarias.
Universidad Nacional de La Plata

Resumen: La microscopía electrónica de transmisión (MET) puede ser usada para el diagnóstico de enfermedades de origen microbiana, aunque su principal aplicación es en investigación. La MET provee detalles ultraestructurales, los cuales son útiles para la identificación de virus, bacterias, parásitos y hongos. El mayor aporte de la MET es en el diagnóstico rápido de enfermedades víricas. Mediante este instrumento, se pueden examinar diferentes tipos de muestras clínicas: sangre, heces, orina, biopsias, fluidos corporales, etc. En este trabajo se describen los métodos utilizados para la recolección, preparación y observación de las diferentes muestras y la aplicación de técnicas de inmunomicroscopía electrónica. Si bien la MET es un método muy útil en el diagnóstico rápido y la investigación de casos nuevos de origen infeccioso, la explotación completa de su potencial requiere de una aplicación temprana y coordinada con otros procedimientos de diagnóstico. En conclusión, la MET es una herramienta valiosa de diagnóstico microbiológico tanto en medicina humana como en veterinaria y su alcance se puede incrementar con la aplicación de métodos inmunológicos.

Palabras clave: MET- diagnóstico microbiológico- muestras clínicas.

TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY APPLICATIONS FOR MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS

Abstract: Transmission electron microscopy (TEM) can be an important instrument in microbiology as well as in diagnosis and research. The TEM provides ultrastructural details which are useful for the parasitological, bacteriological and mycological agents identification, but it is particularly valuable in the rapid diagnosis in viral illness. It can be applied to many body samples: blood, fecal samples, urinal, fluids, etc. Details for sample collection, preparation and examination are given. TEM can be a useful method for rapid diagnosis and investigation of new and unusual cases of infectious origin. However, full exploitation of its potential requires early and coordinated application of TEM with other diagnostic procedures. In conclusion, TEM is a valuable tool in the microbiologic diagnosis as well as in human medicine and veterinary and it can be enhanced with the application of immunologic techniques.

Key Words: TEM- microbiological diagnosis- clinical samples.

Fecha de recepción: 14/06/04

Fecha de aprobación: 20/12/04

Dirección para correspondencia: Susana Jurado. Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata CC 296 (B1900AVW) La Plata. Argentina.
E-mail: sjurado@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La microscopía electrónica de transmisión (MET) es una herramienta de gran utilidad en microbiología, tanto para fines de diagnóstico como en la investigación de las relaciones entre los agentes patógenos y el huésped. La MET es particularmente valiosa en el diagnóstico rápido de enfermedades víricas y a menudo proporciona la respuesta mucho antes que los métodos de cultivo tradicionales.

La MET tiene menor importancia en el diagnóstico tisular de infecciones parasitarias, bacterianas y fúngicas, ya que estos microorganismos son suficientemente grandes como para ser detectados con microscopía óptica. Sin embargo, el aporte de la MET al diagnóstico microbiológico abarca también el de estos microorganismos, ya que sus características ultraestructurales son las que permiten, algunas veces, clasificarlos específicamente. En parasitología, un ejemplo de esto lo constituye la identificación de ciertos protozoarios. Algunas especies de *Tetratrichomonas* halladas en el tracto urogenital de toros (1), son morfológicamente similares a *Trichomonas foetus* y por lo tanto difíciles de distinguir en el microscopio de campo oscuro (2), confundiendo el diagnóstico y dando resultados falsos positivos. Mediante la MET se pudo diferenciar con éxito estas especies de protozoarios (1). Si bien la reacción en cadena de la polimerasa también es una prueba determinante en estos casos, a veces las contaminaciones cruzadas y el costo de los reactivos la hacen poco factible. Esto sugiere que la MET es una herramienta de diagnóstico apropiada en este campo y necesaria en muchos casos.

En bacteriología, también la MET resulta ser un instrumento valioso, fundamentalmente en lo que concierne a la determinación de los procesos por los cuales una bacteria entra a la célula y de su subsecuente destino intracelular (3). La caracterización estructural de las bacterias, además, puede combinarse con inmunocitoquímica (15). Esto se realiza sobre cortes ultrafinos marcando las bacterias con anticuerpos específicos y revelando la reacción antígeno-anticuerpo con proteína A conjugada con partículas de oro coloidal. De esta manera, mediante la MET el resultado es preciso, directo y cuantificable.

Sin lugar a dudas, fue en virología donde la MET hizo el mayor de sus aportes. Los virus pueden ser observados en el microscopio electrónico con alta resolución de detalles usando un método simple y rápido como la

tinción negativa con ácido fosfotúngstico (4). Esta técnica permite realizar una identificación morfológica rápida y un diagnóstico diferencial de los distintos virus contenidos en la muestra (5).

Las técnicas de MET son de gran utilidad en el diagnóstico de las gastroenteritis víricas. El procesamiento de las muestras no es complejo ni laborioso y en pocos minutos se puede realizar una tinción negativa. La gran ventaja de la MET respecto de otras técnicas diagnósticas es que permite encontrar cualquier virus, sin que el proceso limite la identidad del agente detectado, como sucede con las técnicas inmunológicas o moleculares (6). Aunque los virus no pueden ser identificados únicamente por su apariencia ultraestructural, sí puede establecerse fácilmente el grupo al que pertenecen.

Se puede examinar un rango muy amplio de muestras clínicas: fluidos corporales, sangre, heces, orina, biopsias, agua, etc. Las inclusiones víricas o algunos virus en particular pueden ser identificados fácilmente en tejidos que ya estén fijados en formol e incluidos en parafina. Este material puede ser reprocesado e incluido en resinas y aun cuando la ultraestructura de la célula huésped esté virtualmente destruida, los virus pueden ser identificados (8).

El objetivo de este trabajo es difundir las aplicaciones de la MET en el diagnóstico microbiológico y los métodos para la recolección, preparación y examinación de los diferentes tipos de muestras.

MÉTODOS DE MET APLICADOS EN MICROBIOLOGÍA

Los estudios ultraestructurales de los microorganismos, tanto para diagnóstico como para investigación, se abordan utilizando dos de los métodos de procesamiento general para la MET:

a) la tinción negativa: para la identificación de virus y de diferentes constituyentes bacterianos (como pilis y flagelos).

b) el procesamiento para la obtención de cortes ultrafinos, (la localización intracelular de un agente vírico, como los detalles ultraestructurales de cualquier otro patógeno, puede aportar información relevante para su caracterización definitiva).

La tinción negativa es una técnica sencilla y económica y su uso se ha generalizado como técnica fundamental para contrastar muestras particuladas (7). El contraste se ob-

tiene embebiendo la partícula a observar en una sal de un metal pesado (ácido fosfotúngstico al 2%, acetato de uranilo al 4%), que perfila mínimos detalles ultraestructurales sobre un fondo oscuro; de ahí su denominación como técnica de "contraste negativo", o de tinción negativa. Siempre que se aplique esta técnica, es necesario trabajar con grillas cubiertas por un soporte o membrana plástica (formvar o colodión), para evitar que la muestra líquida se escurra entre los agujeros de la grilla. La tinción negativa se aplica al estudio de microorganismos (virus, bacterias, protozoarios), fragmentos celulares (membranas) y macromoléculas aisladas (proteínas) (8).

Para la obtención de cortes ultrafinos, las muestras previamente deben ser fijadas con glutaraldehído al 2% en "buffer" de fosfato, posfijadas en tetróxido de osmio al 1%, deshidratadas en escala creciente de alcoholes e incluidas en resinas sintéticas (Epon, Araldita, etc.). Los cortes ultrafinos obtenidos por ultramicrotomía son montados sobre grillas de 3 mm de diámetro, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y examinados por MET.

Es importante mencionar que el laboratorio de MET recibe muestras potencialmente infecciosas, por lo tanto se deben tomar precauciones importantes para proteger al personal durante la manipulación de todas las muestras clínicas.

1) Procesamiento de muestras víricas:

Las muestras víricas que se derivan con mayor frecuencia para su análisis por MET son las que se presentan en fase líquida. Pueden tratarse de: a) muestras clínicas, b) sobrenadantes de cultivos celulares o c) virus purificados (cultivos celulares y suspensiones celulares).

Es importante destacar que el éxito del diagnóstico de un brote o caso nuevo comienza con la colecta de la muestra. Un muestreo insuficiente, inadecuado o impropio podría entorpecer o imposibilitar la identificación de un agente etiológico.

a) Muestras clínicas:

En fase líquida se presentan los siguientes tipos de muestras: orina, materia fecal, suero, plasma, lágrimas, líquido vesicular y líquido cefalorraquídeo. Para cada tipo de muestra existen variantes en el procesamiento para MET.

La colecta de fluidos de lesiones puede

envasarse en una aguja 26G colocada en una jeringa de tuberculina (9). Una vez puesto el capuchón de la aguja, la muestra puede ser transportada directamente al laboratorio de MET para realizar el diagnóstico rápido (Fig. 1 A). Alternativamente, la grilla que se usa en microscopía electrónica puede tocar en forma ligera el fluido vesicular, la base de la lesión o ambos; se deja secar al aire y se la transporta directamente para su examinación (Fig. 1 B). Se deberán obtener un mínimo de dos grillas por cada muestra de líquido vesicular. También pueden usarse los frotis de lesiones realizados sobre portaobjetos de vidrio, tanto para el examen en el microscopio electrónico como para el microscopio de inmunofluorescencia (Fig. 1 C). Los frotis de líquido vesicular, por ejemplo, deben ser resuspendidos y colocados sobre una grilla para poder ser observados con tinción negativa por MET. Los métodos de toque directo y frotis son útiles cuando las muestras deben ser transportadas a cierta distancia hasta llegar al servicio de MET. Las lágrimas se pueden recoger en forma similar.

La orina se clarifica por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos. El "pellet" es descartado y el sobrenadante se centrifuga a 15.000 rpm durante una hora (8). El "pellet" obtenido se usa para tinción negativa.

El suero o plasma se ultracentrifuga y se procede a la tinción negativa del sedimento.

La materia fecal se resuspende en agua destilada estéril o "buffer" de fosfato para obtener una concentración de 10-20% y se centrifuga a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se descarta el sedimento y el sobrenadante se ultracentrifuga como se describió anteriormente, procediendo a la tinción negativa del sedimento. El procesamiento para ultramicrotomía (fijación, deshidratación, inclusión en resina y cortes) se puede realizar tanto en los sedimentos de los clarificados como en los sedimentos de los ultracentrifugados, sobre todo para virus cuyo análisis morfológico puede ser dificultoso por tinción negativa o cuando ésta puede dañar estructuras del virus.

b) Sobrenadantes de cultivos celulares:

Normalmente son dos los objetivos del análisis del sobrenadante de un cultivo celular. Por un lado, el estudio ultraestructural del virus cultivado y por otro lado, la búsqueda de un agente que no pudo ser detectado por los métodos virológicos habituales.

Se realiza una tinción negativa del so-

brenadante y, además, se procede a su clarificación y ultracentrifugación según se ha descrito anteriormente.

c) Virus purificados:

c1) Cultivos celulares en monocapa: las muestras se fijan *in situ* sobre su correspondiente soporte (plástico o vidrio). Se levantan las células y se centrifugan a 3000 rpm durante 5 minutos. Al "pellet" obtenido se lo lava en "buffer" de fosfato y se procede a la posfijación en tetróxido de osmio, seguido de la deshidratación, inclusión en resina y ultramicrotomía.

c2) Suspensiones celulares: se realiza la fijación en suspensión. Se fijan en glutaraldehído y se lavan en "buffer". Posteriormente, se centrifuga y el "pellet" obtenido es sometido a los pasos descritos en el apartado anterior.

2) Procesamiento de protozoos:

Las muestras clínicas que poseen protozoos no pueden ser sometidas al método de tinción negativa debido a que la cantidad de material electrondenso que penetra en el espécimen y sus componentes es muy grande. Por eso los protozoos de muestras clínicas o cultivados *in vitro* son considerados células en suspensión y procesados como virus, ajustando el protocolo para cada microorganismo en particular.

3) Procesamiento de bacterias y componentes bacterianos:

El método de tinción negativa es de particular valor para el estudio de determinadas estructuras bacterianas (como pilis y flagelos) que se encuentran en suspensión (10, 11, 12).

También es posible realizar la inclusión en resina y la ultramicrotomía de "pellets" de suspensiones bacterianas obtenidos por centrifugación y posteriormente sometidos a la doble fijación con glutaraldehído-tetróxido de osmio. De esta manera se puede analizar la ultraestructura de los diferentes constituyentes bacterianos.

Es necesario tener en cuenta que las bacterias crecidas en agar tienen diferente composición que las crecidas en suspensión. Algunas cepas de gonococos de *Neisseria gonorrhoeae* o *N. meningitidis*, poseen cápsulas cuando se hacen crecer en un agar especial, y las pierden en suspensión (3). La fijación y coloración con azul alcian 0,5 % y aldehído glutárico 3 % sobre la superficie del agar antes de la manipulación de los microorganismos son importantes variables para la demos-

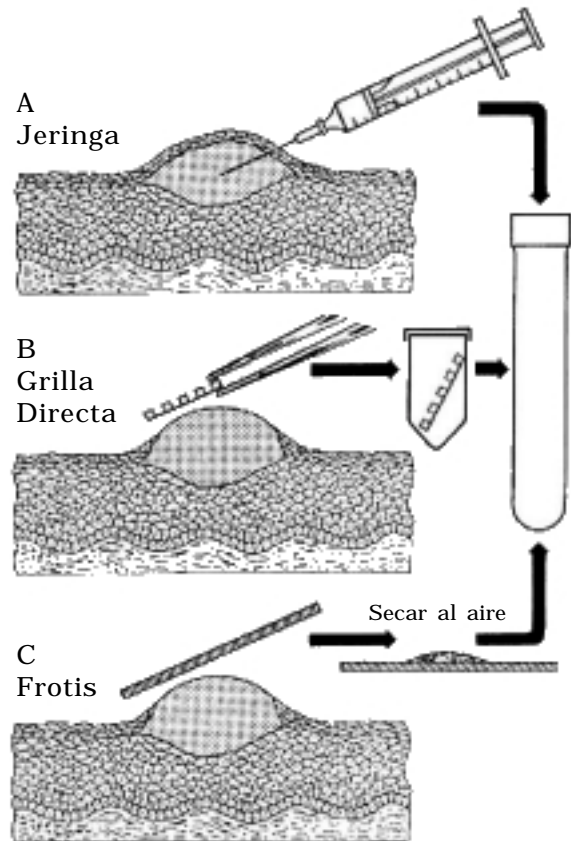


Figura 1. Tres métodos para la colecta de fluido vesicular y ampollas para el diagnóstico mediante MET.

A. El contenido de una vesícula es envasado en una aguja 26 G unida a una jeringa de tuberculina. B. Después de abrir la ampolla, se toca el fluido con una grilla y se deja secar al aire (microscopía electrónica directa). C. Se pone un portaobjetos de vidrio sobre una lesión sin cubierta y se prepara un frotis. Luego las muestras se colocan en contenedores rígidos para su transporte al laboratorio de microscopía electrónica (9).

Figure 1. Three methods for efficient collection of vesicular and blister fluids for diagnostic electron microscopy. A. The contents of a vesicle are collected into the barrel of a needle. B. After the blister is opened, a coated electron microscope grid is touched to the fluid and air-dried (direct electron microscopy). C. A glass microscope slide is touched directly to an unroofed lesion and a smear prepared. Samples are then placed in rigid containers for transport to the electron microscope laboratory (9).

tración morfológica de las cápsulas intactas. Esto es importante de lograr ya que el grosor de la cápsula diferencia a unas cepas de otras.

También es posible el estudio mediante MET de colonias bacterianas no homogéneas (micoplasmas y colonias-L) (4). Bonnová y Rýc (1976) desarrollaron un método que consiste

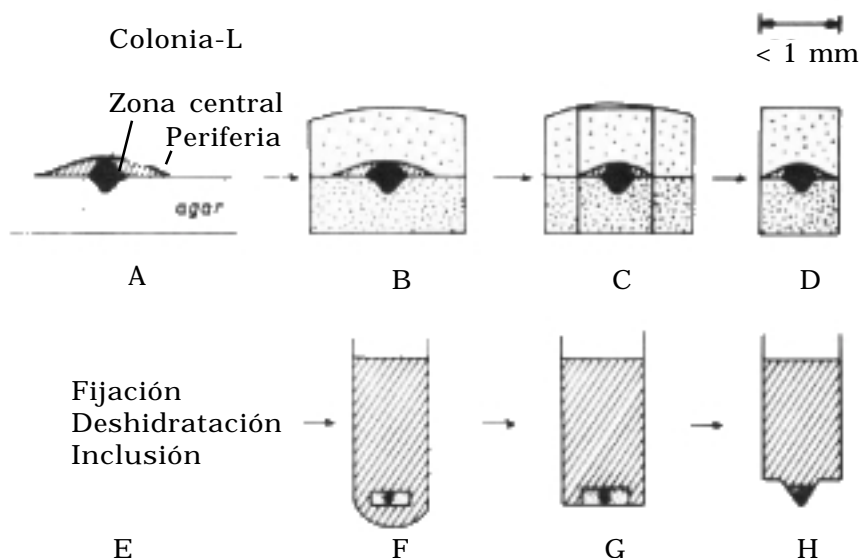


Figura 2. Diagrama esquemático de la inclusión y orientación de las colonias bacterianas (14).

Figure 2. Schematic diagram of embedding and orientation of bacterial colonies (14).

en cortar un trocito del agar que contiene la colonia (Fig. 2 A). A este trocito se lo cubre por completo con agar frío a una concentración más baja que la del medio de cultivo (Fig. 2 B). Se aplica un escalpelo caliente a los lados del trozo de agar a fin de unir ambas capas. Cada colonia bacteriana permanece intacta en el centro de cada bloque y no es dañada por el calor. Con una hoja de afeitar se recorta el bloque de agar conteniendo la colonia y posteriormente se somete a la fijación, deshidratación e inclusión en resinas (Fig. 2 E-H). Después de la polimerización el bloque es tallado, cortado y observado mediante MET (8).

Inmunomicroscopía electrónica:

Si bien la inmunomicroscopía electrónica (IME) puede ser usada para el diagnóstico de virus y bacterias (15), su principal aplicación es en investigación. En microbiología, la correcta localización de los antígenos, principalmente en estructuras de pequeño tamaño como los virus o componentes bacterianos como los pili, requiere un contraste alto y una buena resolución. La IME, utilizando antisueños o anticuerpos monoclonales, incrementa la sensibilidad de la MET (6) y es una técnica mundialmente utilizada para la detección de agentes patógenos.

Los métodos empleados en IME, ya sean de tipo experimental o diagnóstico, son: los métodos de pre-inclusión (o marcado previo al procesamiento de las muestras) y los métodos de pos-inclusión (o marcado posterior al procesamiento de las muestras).

Las técnicas pre-inclusión se utilizan básicamente para localizar antígenos externos. Son ideales para el estudio de la gemación viral desde la célula huésped (16); para bacterias en suspensión y para localizar antígenos de superficie en protozoos y hongos. Son una de las técnicas de IME más sensibles ya que los microorganismos son inmunomarcados antes de ser incluidos en resina y permite trabajar con muestras fijadas o sin fijar (en este último caso deberá trabajarse a 4 °C para evitar la degradación y, en consecuencia, la mala calidad ultraestructural). Para fijar se utiliza paraformaldehído, glutaraldehído y tetróxido de osmio. Luego, las muestras se incluyen en resina, se procesan para ultramicrotomía y, finalmente, se observan. Esta técnica preserva en óptimas condiciones la ultraestructura de las muestras y permite una buena localización de los antígenos de superficie.

Un problema en el uso de esta técnica es que la adición de anticuerpos a células en suspensión hace que éstas se aglutinen, interfiriendo en la inmunomarcación de los microorganismos más profundos. Este inconveniente puede resolverse usando diluciones de anticuerpos, lo cual no induce la aglutinación aunque reduce el valor de la inmunomarcación (17).

Las técnicas de pos-inclusión se basan en la obtención de secciones ultrafinas de la muestra y sobre éstas se realiza la inmunodetección de los antígenos a estudiar. Por lo tanto las muestras son primero fijadas, incluidas, cortadas y montadas sobre grillas antes de

hacer la inmunomarcación. Este método permite la localización de antígenos de superficie e intracelulares.

Las técnicas de inmunomarcación pos-inclusión aplicadas en microbiología permiten identificar y especificar el género y la especie de los agentes infecciosos presentes en las muestras biológicas, siempre que se disponga de los anticuerpos específicos. Con este método se estudiaron, por ejemplo, los procesos de aglutinación y maduración del virus de la inmunodeficiencia humana (16). Se lo utilizó para examinar la co-expresión de las proteínas adhesivas y polisacáridos de la cápsula de *E. coli* (18), como así también para localizar los principales inmunógenos en los estadios de taquizoito y bradizoito de *Toxoplasma gondii* en el encéfalo de pacientes inmunocomprometidos (19).

CONCLUSIONES

El uso de la MET como herramienta de diagnóstico microbiológico disminuyó en los comienzos de la década del '90, coincidentemente con la introducción de una amplia variedad de técnicas modernas de diagnóstico basadas en la biología molecular y la genética (20).

Comparado con otros métodos de diagnóstico, la MET los supera con respecto a la rapidez con que permite detectar e identificar tanto a los agentes infecciosos nuevos como a aquellos no considerados por el clínico. Sin embargo, una explotación completa de su potencial requiere de una aplicación temprana y coordinada de la MET con otros procedimientos de diagnóstico (9).

El diagnóstico mediante la MET no necesariamente es costoso o difícil de realizar si se ejecuta dentro de una red diagnóstica, trabajando en colaboración con otros laboratorios, como biología celular o patología (21).

La MET es un importante instrumento de diagnóstico de enfermedades virales debido a su rápido procesamiento. Uno de los principales beneficios es la identificación de virus gastrointestinales como adenovirus, calicivirus, astrovirus y coronavirus, así como de otros virus para los cuales no se tiene disponibilidad de pruebas diagnósticas comerciales o aquellos que no son cultivables (6, 22). Por esta razón, la detección de virus entéricos mediante la MET es esencial para realizar un diagnóstico epidemiológico correcto de las infecciones gastrointestinales no bacterianas (23).

La aplicación de técnicas rápidas, como

la tinción negativa, es fundamental para el establecimiento de la taxonomía vírica y en consecuencia, para el diagnóstico. Este se constituye en el método de elección para la identificación rápida de virus en muestras clínicas procedentes de infecciones emergentes de etiología desconocida (20). La MET es muy útil también en la detección rápida de infecciones virales colaterales en pacientes inmunocomprometidos (24).

Por todo lo expuesto, la utilidad de la MET en el diagnóstico de enfermedades víricas es indiscutible. Esto permitió el desarrollo de técnicas de procesamiento, adaptadas tanto al microorganismo en estudio como a las muestras clínicas del paciente afectado (25). Si bien la utilidad de la MET en otros campos de la microbiología es menos importante, existe una diversidad de infecciones cuyo diagnóstico requiere de la MET para la identificación del microorganismo implicado (1, 13, 26). También puede ser un método muy útil en el diagnóstico rápido y la investigación de casos nuevos e inusuales de origen infeccioso.

La MET, combinada con información clínica es, en muchos casos, suficiente para realizar un diagnóstico presuntivo o descartar infecciones más serias e iniciar un tratamiento sin esperar el resultado de otras pruebas (9).

En conclusión, la MET es un instrumento valioso de diagnóstico microbiológico tanto en medicina humana como en veterinaria y su alcance se puede mejorar con la aplicación de métodos inmunológicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cobo ER, Campero CM, Mariante RM, Benchimol M. Ultrastructural study of a tetratrichomonad species isolated from prepuccial smegma of virgin bulls. *Vet Parasitol.* 2003; 117 (3): 195-211.
2. Taylor MA, Marshall RN, Stack M. Morphological differentiation of *Tritrichomonas foetus* from other protozoa of the bovine reproductive tract. *Br Vet J.* 1994; 150 (1): 73-80.
3. Griffiths G, Lucocq JM, Mayhew TM. Electron microscopy applications for quantitative cellular microbiology. *Cell Microbiol.* 2001; 3 (10): 659-668.
4. Brenner S, Horne, RW. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta.* 1959; 34: 103-110.
5. Gelderblom HR, Hazelton PR. Specimen collection for electron microscopy. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6 (4): 433-434.
6. Buesa Gómez J, López-Andújar P, Rodríguez Díaz, J. Diagnóstico de las infecciones víricas gastrointestinales. *Control de Calidad. SEIMC* [citado

- 2003]. Disponible desde: http://www.seimc.org/control/revi_viro/pdf/rotavir.pdf.
7. Carrascosa JL, Castón JR. Tinción negativa. En: Piqueras JR y Megías Megías L, editores. Manual de técnicas de microscopía electrónica (M.E.T.). Aplicaciones Biológicas. Universidad de Granada (España). 1998. p. 21-30.
8. Hayat MA. Basic techniques for transmission electron microscopy. Academic Press (London). 1986, p. 232-264.
9. Hazelton PR, Gelderblom HR. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9 (3): 294-303.
10. Thornley MJ, Horne RW. Electron microscope observations on the structure of fimbriae, with particular reference to *Klebsiella* strains, by the use of the negative staining technique. *J Gen Microbiol.* 1962; 28: 51-56.
11. Duguid JP. Fimbriae and adhesive properties in *Klebsiella* strains. *J Gen Microbiol.* 1959; 21: 271-286.
12. Glauert AM, Erridgek D, Horne RW. The fine structure and mode of attachment of the sheathed flagellum of *Vibrio metchnikovii*. *J Cell Biol.* 1963; 18: 327-336.
13. Hendley JO, Powell KR, Salomonsky NL, Rodewald RR. Electron microscopy of the gonococcal capsule. *J Infect Dis.* 1981; 143 (6): 796-802.
14. Bonnová E, Rýc M. A method of orientation of embedded bacterial colonies prepared for ultrathin sections. *Folia Biol (Praha).* 1976; 22 (5): 366-367.
15. Beesley JE, Betts MP. Virus diagnosis: a novel use for the protein A-gold probe. *Med Lab Sci.* 1985; 42 (2): 161-165.
16. Katsumoto T, Asanaka M, Kageyama S, Kurimura T, Nakajima K, Noto A, Tanaka H, Sato R. Budding process and maturation of human immunodeficiency virus examined by means of pre- and post-embedding immunocolloidal gold electron microscopy. *J Electron Microsc.* 1990; 39 (1): 33-38.
17. Beesley JE. Electron microscopic immunocytochemistry in microbiology. En: Polak, JM y Priestleys, JV (Eds.). *Electron microscopic immunocytochemistry. Principles and Practice.* Oxford University Press. 1992. Chapter 10, p. 223-237.
18. Coyne MS, Arunakumari A, Pankratz HS, Tiedje JM. Localization of the cytochrome cd1 and copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *J Bacteriol.* 1990; 172 (5): 2558-2562.
19. Capron A, Cesbron-Delauw MF, Darcy F. New molecular approaches to the diagnosis and prevention of toxoplasmosis. *Bull Acad Natl Med.* 1990; 174 (3): 387-394.
20. Biel SS, Gelderblom HR. Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method. *J Clin Virol.* 1999; 13 (1-2): 105-19.
21. Biel SS, Madeley D. Diagnostic virology-the need for electron microscopy: a discussion paper. *J Clin Virol.* 2001; 22 (1): 1-9. Review.
22. Miller SE. Use of electron microscopy to diagnose viral illness. Review article. Disponible desde: <http://www.ktshrc.edu.sa/annals/1/1/96-172ra.html>.
23. Utagawa ET, Nakazawa E, Matsuo K, Oishi I, Takeda N, Miyamura T. Application of an automated specimen search system installed in a transmission electron microscope for the detection of caliciviruses in clinical specimens. *J Virol Methods.* 2002; 100 (1-2): 49-56.
24. Miller SE, Howell DN. Viral infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Electron Microsc Tech.* 1988; 8 (1): 41-78.
25. Cuevas L, Herrera MI. Métodos de aplicación en microbiología. En: Piqueras JR y Megías Megías L, editores. Manual de técnicas de microscopía electrónica (M.E.T.). Aplicaciones Biológicas. Universidad de Granada (España). 1998. p. 233-260.
26. Boldorini R, Tosoni A, Mazzucco G, Cernuschi M, Caramello P, Maran E, Costanzi G, Monga G. Intracellular protozoan infection in small intestinal biopsies of patients with AIDS. Light and electron microscopic evaluation. *Pathol Res Pract.* 1996; 192 (3): 249-259.