

# Microsporidiosis intestinal: una visión integral

Jorge Botero-Garcés<sup>1</sup> y  
Martha Nelly Montoya-Palacio<sup>2</sup>.

## Resumen

La microsporidiosis intestinal es la infección del tracto digestivo alto, ocasionada por las especies de microsporidios, *Enterocytozoon bieneusi* y *Encephalitozoon intestinalis*, pertenecientes al phylum *Microspora*, que en el hospedero inmunocomprometido especialmente con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), produce cuadros de diarrea prolongada y malabsorción. Se revisarán sus aspectos históricos, biológicos, fisiopatológicos, inmunológicos,

epidemiológicos, clínicos y de tratamiento. **Método:** para la elaboración de esta revisión se emplearon las bases de datos MEDLINE y PUBMED a partir del año 1981, hasta la fecha. **Palabras claves:** Microsporidiosis, microsporidios, microsporida, *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, SIDA, quick-hot gram-cromotropo, Diarrea. ☉

*Infectio* 2002; 6(4): 213-225

## Introducción

Los microsporidios son protozoos pequeños, intracelulares obligados conocidos desde hace muchas décadas como patógenos de diferentes vertebrados e invertebrados. Recientemente, varios miembros del phylum *Microspora* han sido descritos como parásitos en humanos. Sin embargo, el tracto gastrointestinal es afectado solamente por *Encephalitozoon Intestinalis* y *Enterocytozoon bieneusi*, lo que se conoce con el nombre de microsporidiosis intestinal. Esos agentes parasitarios se comportan como agentes oportunistas en especial en pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), en quienes además de producir infección intestinal pueden afectar otros órganos y sistemas.

Debido a que las esporas de los microsporidios son muy pequeñas 1 a 2 mmm, el diagnóstico por laboratorio inicialmente se basó en la detección de estas esporas en biopsias intestinales, a través principalmente del uso

de la microscopía electrónica. Sin embargo, esta técnica es invasiva, costosa y muchas veces las esporas de los microsporidios son pasadas por alto. Por lo tanto, se han implementado diferentes métodos de tinción, tricrómica modificada por Weber, pruebas fluorescentes con fluorocromos como el uvitex o el blanco de calcoflúor, con resultado n de especie. Esto sólo es posible a la fecha a través de microscopía electrónica o mejor aún utilizado el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La diferenciación de especie constituye un hecho deseable para un mejor abordaje terapéutico de los pacientes y su manejo adecuado y racional.

Por lo anteriormente expuesto, esta revisión pretende abordar de manera integral la microsporidiosis intestinal desde sus aspectos históricos, biológicos, epidemiológicos, fisiopatológicos, inmunológicos, clínicos, diagnósticos y de tratamiento.

1. MD-MSc en Inmunología. 2. Bacterióloga y Laboratorista Clínica. Profesores Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Integrantes Grupo Interdisciplinario para el Estudio de las Parasitosis Intestinales-GIEPI, Corporación de Patologías Tropicales, Universidad de Antioquia.

Correspondencia: **Jorge Botero Garcés**  
Cr. 51D N° 62-29. Medellín-Colombia  
Teléfonos: 510-60-52 / 510-60-69  
Fax: 510-60-51  
Dirección electrónica: jbotero@quimbaya.udea.edu.co

## Historia

A mediados del siglo XIX, Pasteur y Garnez relacionaron por primera vez la presencia de un agente microscópico con la producción de enfermedad, la pebrina o calcina de los gusanos de seda (*Bombis mori*) y Nageli en 1857 denomina el agente causante del proceso como *Nosema bombycis*, literalmente enfermedad del gusano de seda, siendo este el primer microsporidio descrito. Pasteur estudia durante seis años la pebrina y descubre un método para evitarla, mediante la detección y eliminación de los gusanos infectados junto con las hojas de morera que comían; de este modo, se inician las primeras medidas de control y profilaxis de una enfermedad infecciosa (1860) y se demuestra experimentalmente por primera vez la conexión entre los microbios (como él los denominaba) y la enfermedad, o teoría de los gérmenes patógenos (Pasteur 1865): en Maitines Fernández, 1995). La descripción inicial de Pasteur alertó a la agricultura y a la industria sobre los importantes perjuicios económicos causados por este, hasta entonces, desconocido grupo de microorganismos.

El reconocimiento de los microsporidios como entidad de seres diferenciados del resto de Protozoos se debe a Balbini en 1882, al proponer la creación de un nuevo orden entre los esporozoos: protozoos que al final de su ciclo forman esporas de resistencia; en aquel momento, *Nosema bombycis* era la única especie de microsporidio conocida (Canning, 1993). A lo largo de este siglo, se habían propuesto varias clasificaciones para este grupo de Protozoos (Martínez Fernández 1995) hasta que Sprague (1977) crea el Phylum Microspora dentro del subreino Protozoa, para agrupar a todos los microsporidios. La confusión creada por esta denominación, ha sido finalmente resuelta por Becnel y Sprague (1998) al concluir que esta debe ser Microsporidia, (Balbini, 1882). Algunos autores, proponen incluir a estos organismos en un nuevo taxón que reúne a los eucariotas sin mitocondrias (1, 2).

## Generalidades

Los microorganismos pertenecientes al phylum Microspora (Balbini, 1882) son conocidos colectivamente como Microsporidios (1). Los microsporidios son parásitos intracelulares obligados de hospederos vertebrados e invertebrados, causando enfermedad en varias especies animales, particularmente conejos, zorros, perros y monos ardilla (3-5). Recientemente varios miembros del Phylum *Microspora* han sido reconocidos en tejidos humanos (6, 7), parasitan casi todos los tejidos y órganos del

hospedero, la mayoría infecta el tracto digestivo y/o órganos relacionados, pero también se les ha encontrado en el sistema reproductor, excretor, nervioso, tejido conectivo y músculo (3).

Cuatro géneros han sido reconocidos como patógenos humanos: *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Pleistophora* y *Nosema*. Las especies representantes de los dos primeros géneros son *Enterocytozoon bienewisi*, *Encephalitozoon Hellen*; y *Encephalitozoon intestinalis* los cuales se han encontrado en pacientes con SIDA en países desarrollados y se esta incrementando su importancia como causa de diarreas persistentes en este grupo de pacientes, especialmente en aquellos con enfermedad avanzada (8). En países en vía de desarrollo, particularmente como el nuestro, son escasos los estudios clínicos, epidemiológicos y de laboratorio, por lo tanto la incidencia real en el medio no la conocemos.

## Biología

Los microsporidios son verdaderos Eucariotes (9) porque ellos tienen un núcleo con membrana envolvente y membranas intracitoplasmáticas ordenadas, pero la configuración nuclear es diferente entre los géneros de microsporidios; en algunos se presentan dos núcleos juntos llamados Diplocaryon, mientras que en otros solo existe uno. En *Enterocytozoon* el diplocaryon ocurre tempranamente en el ciclo, mientras que un solo núcleo ocurre en los estadios tardíos; en otros géneros un solo núcleo es constante como en el *Encephalitozoon* o doble como en el género *Nosema*.

Estudios recientes sugieren que los microsporidios semejan Procariotes en muchos aspectos, en particular un microsporidio representativo como *Vairimorpha necatrix*, tiene una unidad ribosomal de 70S, que contiene RNA de 16S y 23S como los Procariotes. Además los microsporidios son microorganismos que no poseen mitocondrias, peroxisomas, membranas de Golgi ni otras estructuras típicas de Eucariotes, mas la pérdida de características previamente diferenciadas (5, 6, 10), por consiguiente, se ha sugerido que los microsporidios son el origen de una rama muy temprana de los Eucariotes.

Las esporas son de forma piriforme, presentan una pared Gram positiva indivisa de dos láminas (exo y endospora). La exospora que es electrodensa y la endospora electrolúcida compuesta en parte por quitina. Internamente se encuentra el germen ameboideo y el esporoplasma, que es la forma infectante del parásito. El esporoplasma está formado por el núcleo, citoplasma y un complejo aparato externo o de extrusión que

consiste en un tubo polar enrollado unido a un disco de anclaje; este filamento le brinda soporte a la espora (11) (Fig. 1, tabla 1).

**Ciclo de vida**

La infección con este grupo de parásitos ha sido recientemente conocida (4, 12). Algunas especies son altamente específicas en el tipo de célula que invade y otras utilizan un amplio rango de células, pero colectivamente ellos son capaces de infectar todos los órganos del cuerpo (4).

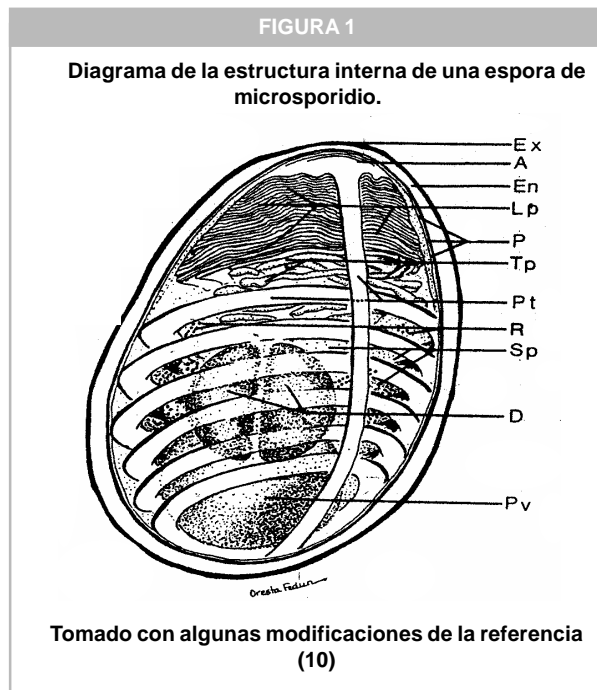
El ciclo biológico de los microsporidios se desarrolla en tres fases: Fig. 2.

Fase infectiva que comprende desde la liberación de la espora al medio extracelular, hasta el momento en que ésta infecta una célula susceptible (1, 13).

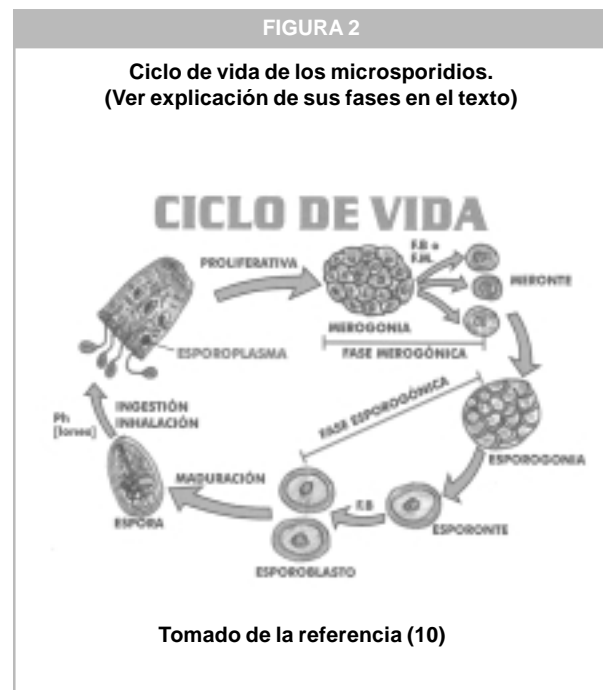
Fase de merogonia o fase proliferativa, denominada también esquizogónica por algunos autores; comienza cuando en el interior de una célula apropiada para su desarrollo, el esporoplasma evoluciona formando

merontes. Los merontes son células redondas, irregulares o elongadas con retículo no rugoso rudimentario en los estadios tardíos y membrana plasmática simple con núcleo aislado o doble, la división de los merontes puede presentar división por fisión binaria, o múltiple. La coriocinesis ocurre de forma repetida antes de que se presente la división celular, resultando formas redondeadas de plasmodio multinucleado como en el *E. bienewisi* o células multinucleadas semejantes a cintas como en *E. intestinalis*. En humanos luego de la merogonia en las células susceptibles se puede producir diseminación vía sanguínea o linfática (13).

Esporogonia. Los esporontes son estadios previos a los esporoblastos. Presentan en superficie una cubierta electrodensa, la cual forma la capa externa de la espora (exospora). Puede presentar un núcleo aislado o doble. Algunas veces los esporontes se dividen por fisión binaria en esporoblastos y otros forman estadios multinucleados (esporogonia plasmodial),



Capa externa electrodensa llamada exospora y una capa translúcida, endospora. El aparato de extrusión compuesto por: disco de anclaje, filamento polar, polaroplasto lamelar y polaroplasto tubular; este aparato ocupa el mayor espacio de la espora es característico de los microsporidios. El número de vueltas del filamento polar varía entre las especies de microsporidios. Abreviaturas: A. Disco de anclaje. D. Diplocarion. En. Endospora. Ex. Exospora. LP. Polaroplasto lamelar. P. Membrana unitaria. Pt. Filamento polar. Pv. Vacuola posterior. R. Ribosoma. Sp. Esporoplasma. Tp. Polaroplasto tubular.



Fase infectiva. Fase de merogonia o proliferativa. Fase esporogónica.  
Para más detalles ver el apartado "Ciclo de vida" en el texto.  
F.B= Fisión binaria  
F.M= Fisión múltiple

TABLA 1

## Características morfológicas de microsporidios que infectan el humano

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

Tomada con algunas modificaciones de la referencia (10).

pasan por procesos de división en dos fases o secuenciales. Las secuencias de división son muy variadas y características de cada género.

Taxonómicamente hablando los microsporidiam se dividen en dos subórdenes basados en la secuencia de la esporogonia, unas esporas se empaquetan en vesículas esporóforas, también conocidas como membranas pansporoblásticas (suborden Pansporoblastina) y otras aparecen dispersas en el citoplasma de la célula hospedera (suborden Apansporoblastina). Los esporoblastos generalmente son ovoides y su desarrollo es un proceso de maduración hasta convertirse en esporas, tienen mayor cantidad de retículo endoplásmico liso y rugoso y presentan aparato de Golgi responsable en parte de la formación del tubo y saco polar, estas vesículas se pierden al finalizar el proceso de maduración y se unen para formar la vacuola (1, 13).

Todo lo descrito anteriormente corresponde al phylum Microspora en general. Sin embargo, en lo que resta de esta revisión haremos mayor énfasis sobre los microsporidios intestinales *Enterocytozoon bienewisi* y *Encephalitozoon intestinalis*, que son las especies de microsporidios más importantes desde el punto de vista clínico y epidemiológico.

## Epidemiología

### Prevalencia y distribución geográfica

A partir de la descripción de estos parásitos como agentes de infección humana, el número de casos relatados se ha incrementado notablemente hasta el punto que la infección por microsporidios se le considera de distribución cosmopolita. A la fecha han sido documentados casos en individuos de los cinco continentes y la inmensa mayoría de éstos son enfermos con SIDA (14, 15). Este hecho llevó a sugerir que los microsporidios podían ser parásitos naturales del humano, causando enfermedad sólo en situaciones de inmunocompromiso (15-17).

Desde el primer reporte de infección intestinal por microsporidios en 1985, las especies *E. bienewisi* y *E. Intestinalis* han ganado atención como causa importante de diarrea persistente en pacientes con SIDA (17), con recuento de linfocitos CD4 entre 50-100 por mm<sup>3</sup> o menos (18, 19).

Es importante resaltar que debido a la carencia de buenos métodos diagnósticos, en un alto porcentaje de pacientes VIH positivos con diarrea persistente, no es posible definir la causa de ésta. Diferentes explicaciones han sido propuestas, la más

aceptada es que aún existen múltiples microorganismos de difícil identificación como bacterias, virus y parásitos; entre éstos últimos, se ha asociado como causa de síndrome diarreico prolongado a los microsporidios intestinales (20), *E. bienewisi* y *E. Intestinalis* (21, 22). Por esta razón, es necesario establecer una adecuada herramienta de laboratorio para el diagnóstico de microsporidiosis intestinal y poder realizar la diferenciación de especie, con el propósito de que los clínicos puedan hacer un tratamiento más específico y racional.

En el estudio prospectivo de Kotler y Orenstein (11), en donde se incluyeron 250 pacientes infectados con VIH, 179 de ellos con SIDA, 194 presentaron diarrea, en la que los microsporidios fueron los agentes microbianos más frecuentes (39% de los pacientes con SIDA y diarrea); además, fue encontrada una alta tasa de infecciones coexistentes en el tracto gastrointestinal, entre las cuales se presenta la criptosporidiosis (23, 24).

En general, existen diferentes series clínicas en las que se reportan frecuencias variables de microsporidiosis, con prevalencias entre el 7 y el 50% (1, 10, 25) en pacientes con SIDA y diarrea crónica. Estudios realizados en Europa y Estados Unidos de Norteamérica, han revelado cifras entre el 6 al 60%, en este mismo grupo de pacientes (20). Sin embargo, la infección por microsporidia no es exclusiva del hospedero inmunocomprometido severo; parece que puede emerger como infección en pacientes sometidos a trasplantes de órganos (26-28), VIH positivos asintomáticos, e inclusive individuos inmunocompetentes. Lo anterior conlleva a que la microsporidiosis puede ser más frecuente a lo estimado hasta la fecha y sostiene el escaso poder patógeno de este grupo de organismos en individuos inmunocompetentes (29).

### Fuentes de infección y mecanismos de transmisión

*E. bienewisi* ha sido recientemente identificado en muestras fecales de cerdos (30) y de monos infectados experimentalmente con el virus de la inmunodeficiencia simiana y patología hepatobiliar (31). Así mismo, *E. intestinalis* ha sido identificado recientemente en diferentes mamíferos, incluyendo hospederos humanos inmunocompetentes, lo que sugiere un origen zoonótico de las infecciones por esta especie (1, 30) (10, 32).

Observaciones experimentales y estudios clínico-patológicos, nos permiten señalar como posibles fuentes de infección al hombre y a los animales infectados. Además, se implica a la vía oral como la

más probable para su transmisión, debido a la alta prevalencia de *E. bienewisi* y *E. Intestinalis*, y a la escasa capacidad de diseminación en el hospedero, de este primer microsporidio enunciado. Lo anterior hace suponer que la contaminación fecal-oral puede jugar un papel importante en el modo de transmisión de la microsporidiosis intestinal (1, 26).

### Fisiopatología

Las esporas de los microsporidios invaden los enterocitos del duodeno y sobre todo del yeyuno; además células epiteliales del tracto biliar (33), se ubican principalmente en la región supranuclear o en la parte apical de la célula. Por un mecanismo a la fecha pobremente entendido producen atrofia de la vellosidad, desprendimiento de los enterocitos infectados (18, 33, 34), fusión e hiperplasia de criptas. Además, ocasionan disminución de la actividad específica de las disacaridasas del borde en cepillo con malabsorción y aunque existe poca reacción inflamatoria se observan macrófagos y células plasmáticas en la lámina propia de la vellosidad (18, 33, 34). Es de anotar que éstos cambios persisten, aún varios meses después de instaurado el tratamiento (34). Los hallazgos histopatológicos varían desde una arquitectura normal de las vellosidades hasta una severa degeneración epitelial (35, 36).

En pacientes con SIDA y diarrea crónica secundaria a *Enterocytozoon bienewisi* se ha descrito la presencia en material fecal a concentraciones relativamente altas del Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), una citocina proinflamatoria, implicada por lo menos en parte en el síndrome devastador de estos pacientes (36a).

Con relación a la infección por *Encephalitozoon intestinalis*, además de lo descrito anteriormente para los microsporidios en general, en los humanos produce necrosis del intestino delgado y tracto biliar, seguido por diseminación a diferentes órganos como riñón, hígado y cerebro entre los más frecuentes (36a).

### Respuesta inmune

Como se mencionó con anterioridad, la infección por microsporidios no es exclusiva del hospedero severamente inmunocomprometido (27, 28, 37); porque cuando existe una respuesta inmune balanceada, se sugiere que los microsporidios permanecen por largos periodos de latencia al interior del enterocito, sin presentación de ninguna manifestación clínica.

Los pacientes con SIDA se caracterizan por presentar infecciones oportunistas secundarias que se originan como consecuencia de la pérdida en el número y la

función de los linfocitos CD4 a causa de la infección con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana, VIH (4, 38). Este puede infectar y alterar macrófagos, células presentadoras de antígenos como células dendríticas y de Langerhans, además los linfocitos T CD8, importantes en la inmunidad celular, haciéndolos más susceptibles a otras infecciones por parásitos oportunistas como Microsporidios (39) *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Cyclospora* (21), aunque este último puede infectar también un número considerable de hospederos inmunocompetentes.

Existen evidencias en humanos que sugieren que los pacientes con inmunodeficiencia celular severa presentan mayor riesgo para desarrollar enfermedad por microsporidios (39-42). Sin embargo, no es claro si la enfermedad se debe a una reactivación de una infección latente adquirida antes de que ocurra la inmunosupresión o si ésta es causada por infección reciente. Faltan estudios que nos ayuden a elucidar éstos y otros datos como el origen de la infección, las fuentes de contaminación, las interacciones parásito-hospedero y la regulación del sistema inmunológico en el control de la enfermedad.

La respuesta inmune generada durante la infección natural con *E. bienensii* y *E. intestinalis* ha sido poco estudiada. En animales de experimentación se ha observado que la infección con *Microsporidium* induce la producción de anticuerpos, pero éstos parecen no ser protectores debido a que no inducen la destrucción del parásito por medio de los macrófagos (43, 44), por el contrario, en individuos con compromiso de la inmunidad celular, la persistencia de éstos es un reflejo de la cronicidad de la infección (43).

Los eventos inmunológicos de la microsporidiosis conocidos hasta la fecha, se basan principalmente en modelos experimentales en animales infectados con *E. cuniculi* (41, 42, 45), parásito que infecta roedores y en ocasiones al hombre, que están estrechamente relacionados con otros microsporidios como *E. intestinalis*.

En el estudio de diversas enfermedades parasitarias la utilización del modelo experimental ha permitido reproducir en el laboratorio los eventos biológicos que tienen lugar durante la infección humana. Se ha logrado establecer que en las enfermedades infecciosas las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 tienen un importante papel en la inmunoregulación (46)<sup>8</sup>. En la microsporidiosis los ratones C57BL/6 han sido de gran importancia para la adquisición de nuevos conocimientos sobre los mecanismos biológicos asociados con resistencia o susceptibilidad. En ratones resistentes se

presenta una inmunidad celular caracterizada por la linfoproliferación a antígenos de *Microsporidium* y un perfil de citocinas de tipo Th1, con producción de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 (14, 40, 46, 47). En los animales susceptibles el predominio de citocinas es de tipo Th2, lo que se asocia con la persistencia del parásito y por consiguiente, de la enfermedad.

Los estudios realizados en células esplénicas de ratones inmunocompetentes infectados experimentalmente con *E. cuniculi* y *E. intestinalis* demuestran la importancia del IFN- $\gamma$  en la respuesta inmune protectora contra los microsporidios, dado que cuando se utiliza ratones knockout para IFN-g desarrollan la enfermedad, mientras que los animales silvestres son capaces de eliminar la infección (41, 43, 46, 48-50). Esta protección parece ser mediada por la activación de los macrófagos y el incremento en la producción de Oxido Nitrico, NO<sup>5</sup>, aunque los estudios de Khan I. y Moretto M (41) 1999, no pudieron demostrarlo al retar con *E. cuniculi* ratones knockout para la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS<sup>t</sup>), ya que estos ratones sobrevivieron a dosis muy altas con el inóculo de infección, similar a la de los animales silvestres. En contraste, en este mismo estudio, los ratones que carecían de los genes de IFN- $\gamma$  o IL-12 fueron incapaces de sobrevivir aún a dosis muy bajas de inóculo.

En animales inmunosuprimidos se ha descrito una respuesta inmune humoral de tipo Th2 con producción elevada de IL 4 e IL10. Fakhry (46)<sup>18</sup> Y. y col 2001, utilizando el sobrenadante en cultivo células esplénicas de ratones genéticamente manipulados, negativos para el receptor del IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  R<sup>0/0</sup>) e infectados con *E. intestinalis*, demostraron que los niveles de IL-4 e IL-10, en esta clase de ratones, eran más elevados que en los ratones silvestres.

Con todas las evidencias anteriores puede resumirse, al menos en el modelo murino manipulado genéticamente, que la respuesta inmune protectora contra la infección por *E. intestinalis* y posiblemente para la gran mayoría de los microsporidios es la mediada por células tipo Th1, con predominio en la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2. Sin embargo, hasta la fecha no existen reportes en modelos murinos donde se evalúe la respuesta inmune Th1 y Th2 en ratones inmunosuprimidos experimentalmente, como un intento de simular la inmunosupresión natural ocasionada por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana, debido a que este virus, como se mencionó anteriormente, produce disminución progresiva de los LT CD4<sup>+</sup> y se ha observado que cuando éstos caen por debajo de 50 células/ml los pacientes presentan cuadros

clínicos de diarrea crónica secundaria a microsporidiosis como el *E. intestinalis*<sup>15,20</sup> entre otros. Por estas razones se hace necesario estudiar la respuesta inmune en el modelo murino, inmunocompetentes e inmunosuprimidos experimentalmente, infectados con *E. intestinalis*, como una aproximación a lo que puede estar ocurriendo en forma "natural" en el hospedero inmunocomprometido por el VIH.

### Manifestaciones clínicas

Los síntomas característicos son pérdida de peso, malabsorción -manifestada en los niveles subnormales de d-xilosa y vitamina B<sub>12</sub>, observados en algunos pacientes-, diarrea persistente, acuosa, abundante, no sanguinolenta, sin moco, sin leucocitos, litérica y más frecuente en la mañana. Dicho cuadro diarreico puede ocasionar deshidratación y debilidad marcada. Algunas veces puede presentarse anorexia y dolor abdominal antes de la deposición (11, 18, 21, 35, 51, 52).

Puede presentarse concomitantemente colangitis (19)<sup>6</sup> causada por el parásito, se manifiesta con dolor en el cuadrante superior derecho, el ultrasonido revela dilatación biliar y el laboratorio niveles elevados de fosfatasa alcalina y gg- glutaril transferasa (21, 22, 53).

En el 50% de los casos de pacientes con SIDA y diarrea crónica, se desconoce la etiología de dicho proceso diarreico. No obstante, en los últimos estudios se ha encontrado la presencia de *Enterocytozoon bieneusi* y *Encephalitozoon intestinalis* como agentes causales de estos casos diarreicos, que anteriormente eran considerados de origen desconocido (7, 33, 51).

### Diagnóstico

*E. bieneusi* y *E. intestinalis* parasitan primariamente los enterocitos del intestino delgado (13), sin embargo, pueden diseminarse a otros tejidos como vías biliares, pulmón, tracto genitourinario, entre otros. La diseminación se presenta con mayor frecuencia en las infecciones por *E. Intestinalis* (54), debido a su capacidad de invadir macrófagos y células endoteliales, por consiguiente, estas dos especies parasitarias pueden ser encontradas en muestras de materia fecal, aspirado duodenal, fluido broncoalveolar, orina entre otras (23, 24, 54).

El diagnóstico de microsporidiosis ha sido difícil por diferentes razones, entre las más importantes están: tamaño muy pequeño (1 a 2 mmm), su forma de espora que la hace fácilmente confundible con hongos, distribución en empalizadas; por lo tanto, pueden diagnosticarse como bacterias u otros artefactos.

Además, poseen propiedades de coloración variable y producen una respuesta inflamatoria mínima en el hospedero (23, 24). Los coprológicos seriados convencionales son leídos como negativos y no aportan ninguna información que sirva para sospechar la presencia de esta clase de parásito intestinal, no obstante, con los antecedentes clínicos de un paciente con diarrea prolongada, VIH positivo y un coprológico hecho con coloraciones especiales para *Cryptosporidium spp.*, Negativo, se debe sospechar la presencia de microsporidiosis intestinal.

Inicialmente el diagnóstico por laboratorio se realizaba con la obtención de biopsias de intestino delgado (21) y su posterior evaluación a través del microscopio electrónico, en donde se observan los microorganismos en la región supranuclear de la célula epitelial. Este procedimiento es invasivo, implica personal muy entrenado, inversión de gran cantidad de tiempo por prueba, utilización de equipos de alta tecnología y altos costos.

En la actualidad se utiliza la detección de esporas en muestras de materia fecal (23, 55-59) o aspirado duodenal (60), por medio de las técnicas de coloración, tricrómica modificada por Weber (61), quick-hot gram-cromotropo (1, 56) y el método de tinción por fluorescencia (59, 62-64). Ver anexo (Protocolos de los métodos por tinción).

No obstante en los últimos años se ha venido empleando la técnica de quick-hot gram-cromotropo, aunque también es una prueba de coloración, su sensibilidad y especificidad son ligeramente superiores a las técnicas anteriormente relacionadas, además es una prueba rápida, sencilla desde el punto de vista técnico y económica (55).

La coloración tricrómica emplea cromotropo que permite la observación con microscopio de luz, las esporas se colorean rosado claro con un fondo verde azul, algunas aparecen transparentes, pero la mayoría muestran una pequeña línea central que corresponde al túbulo polar, lo que confirma el diagnóstico de microsporidiosis intestinales (13, 21, 35, 51, 65). La prueba del quick-hot utiliza además del cromotropo la tinción de Gram, por lo tanto las esporas se tiñen de violeta oscuro, muestran como mínimo uno de los rasgos estructurales característicos de los microsporidiosis y además se observan las esporas como gránulos gram positivos. En la técnica por fluorescencia el extendido de la muestra de materia fecal se fija a la placa con etanol, se emplea el calcofluor y luego se observan al microscopio de fluorescencia (54, 64, 66).

Aunque hasta la fecha, existen datos muy limitados acerca de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de las técnicas por coloración, el trabajo de Ignatius y colaboradores (55), 1997, como uno de los más representativos, reporta una sensibilidad del 88% para la coloración tricrómica modificada versus 73% por la técnica de fluorescencia con uvitex<sup>R</sup> y una especificidad del 88% por ambos métodos diagnósticos. Los valores predictivos positivos y negativos por fluorescencia fueron de 88% y 76%, respectivamente. Estos mismos valores fueron del 88% en el caso de la coloración tricrómica modificada, por consiguiente, estas dos pruebas pueden ser comparables.

El diagnóstico general de microsporidiosis se hace por medio del microscopio de luz o fluorescencia, a través de las técnicas mencionadas con anterioridad; sin embargo, con estas técnicas no es posible realizar la diferenciación de especie, *E. bienewsi* o *E. intestinalis*, indispensable para el adecuado manejo y tratamiento de los pacientes con diarrea persistente ocasionada por alguno de estos microorganismos (11, 37, 64, 67, 68).

La diferenciación de la especie es sólo posible por medio de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta, con el empleo de anticuerpos policlonales o monoclonales (69) dirigidos contra cada una de estas especies de microsporidios intestinales (63, 64, 70) o por el uso de la PCR (68, 71-75), que amplifica segmentos de ácidos nucleicos al utilizar oligonucleótidos (iniciadores), con secuencias específicas que reconocen de manera exclusiva cada una de las especies de microsporidios intestinales implicadas, sin presentar reacciones cruzadas entre los microsporidios intestinales o de otras localizaciones (1). Una vez implementada la técnica de PCR, es rápida, sensible y específica comparada con las técnicas inmunofluorescentes; por esta razón, la PCR se constituye en una herramienta diagnóstica atractiva, para su empleo en la determinación específica de especie de microsporidios intestinales, bajo condiciones de laboratorio en su uso cotidiano (5, 18, 68, 76, 77).

En resumen, es importante resaltar que las pruebas por tinción son necesarias para el diagnóstico inicial de microsporidiosis intestinal, pero son incapaces de realizar diferenciación de especie. Esto solo es posible a la fecha por medio de microscopía electrónica o mejor aún utilizando la PCR (78). La diferenciación de especie constituye un hecho deseable para un mejor abordaje terapéutico de los pacientes y su manejo adecuado y

racional. Además se debe establecer la especie con el propósito de conocer la epidemiología real de cada uno de los microsporidios implicados en infecciones del tracto gastrointestinal; por estas razones se hace indispensable realizar el diagnóstico general de la microsporidiosis intestinal, a través de las pruebas por tinción y luego realizar la identificación de la especie implicada, por el método de la PCR (76,77).

La ausencia general en nuestro medio, de un método diagnóstico simple para la identificación de los microsporidios, ha limitado en gran medida nuestro conocimiento de la prevalencia de esta infección parasitaria en el medio, de su comportamiento en diferentes hospederos, inmunocompetente e inmunocomprometido, además de la incapacidad de establecer diagnósticos etiológicos en infecciones inaparentes, subclínicas y clínicas. De otro lado, la carencia de una buena herramienta diagnóstica hace que la mayoría de pacientes inmunocomprometidos, principalmente VIH positivos que consultan por procesos diarreicos prolongados, no se les reconozca la causa de su proceso y por lo tanto, su tratamiento y manejo no son los más adecuados.

Por lo anteriormente expuesto se hace necesario en nuestro medio, inicialmente, estandarizar métodos diagnósticos para la detección de microsporidiosis intestinal, por medio de las técnicas por tinción como el quick-hot gram-chromotropo o fluorescentes por blanco de calcofluor y posteriormente realizar la identificación de especie por medio de la técnica de la PCR.

## Tratamiento

El metronidazol ha sido utilizado con relativa eficacia a la dosis de 500 mg tres veces por día (79), mejora la sintomatología, la diarrea puede desaparecer o al menos disminuye la frecuencia, la pérdida de peso también presenta disminución, pero después del tratamiento se continúan observando los parásitos en el enterocito, lo que indica que la infección no es erradicada; sin embargo, este medicamento es ligeramente más efectivo para *E. bienewsi* que para *E. intestinalis*, para el cual ha resultado ser más útil el albendazol 800 mg/día (79-81). Por lo tanto, es importante realizar el diagnóstico general de microsporidiosis por medio de las pruebas por tinción y luego hacer la diferenciación de especie por medio de la PCR.

En pacientes con microsporidiosis intestinal, se recomienda conjuntamente con el tratamiento farmacológico, suministrar terapia y suplementación nutricional, baja en grasa y con carbohidratos simples,



al igual que ofrecer líquidos para hidratación oral o parenteral según el caso. Con este manejo adicional la mayoría de pacientes con síndrome de malabsorción presentan considerables beneficios (5, 18, 33, 35, 36, 82).

### Conclusión

Los microsporidios son actualmente reconocidos como agentes emergentes y reemergentes de enfermedades infecciosas en los seres humanos, especialmente desde el advenimiento de la pandemia del VIH. Por lo tanto, debe ser considerado un agente oportunista, aunque en diferentes casos ha sido informado en individuos inmunocompetentes.

En la actualidad solo *Enterocytozoon bieneusi* y *Encephalitozoon intestinalis* han sido reconocidas con capacidad de infectar el tracto gastrointestinal y ambos parásitos pueden ocasionar dolor abdominal, diarrea, malabsorción y pérdida de peso en pacientes con SIDA.

Es importante resaltar que con el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos, se ha logrado caracterizar y profundizar en el conocimiento de la biología, epidemiología y fisiopatología de la microsporidiosis, lo cual será de gran utilidad para la evaluación de factores de riesgo, la identificación de estrategias terapéuticas y profilácticas. 🌐

### Abstract

Intestinal microsporidiosis is the infection of upper gastrointestinal tract, generated by microsporidiosis species, *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis*, belonging to phylum *Microspora*, that in immunocompromised host, specially with Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), produce chronic diarrhea and malabsorption. However, this review focus on about some aspects such as biological, historic, fisiopatologic, immunological, epidemiological, clinic and treatment. **Method:** This review was made through of the research on MEDLINE and PUBMED since 1981 to present. **Key words:** Microsporidiosis, microsporidia, *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, AIDS, quick-hot gram-cromotropo, Diarrhea.

## Anexo

Protocolos de los métodos por tinción para la evaluación de microsporidios intestinales

### Tinción de gram-chromothropo (Quick-hot)<sup>55</sup>

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

1. Teñir las placas con los extendidos de materia fecal en violeta de genciana durante 30 segundos.
2. Lavar el exceso de colorante con agua de chorro.
3. Introducir las placas en solución de lugol durante 30 segundos.
4. Retirar el exceso de lugol por arrastre con una solución decolorante.
5. Lavar con agua de chorro para retirar el exceso de la solución decolorante.  
Seguidamente se hace la tinción con chromothropo como sigue:
6. Sumergir las placas en chromothropo caliente (50-55°C), durante dos minutos.
7. Decolorar con alcohol ácido durante tres segundos.
8. Deshidratar con alcohol etílico al 95% durante 30 segundos.
9. Deshidratar dos veces (30 segundos cada vez), con alcohol etílico puro.
10. Dejar secar y montar con Cytosel 60<sup>R</sup> (Stephens Scientific) o similar.

### Tinción con marcadores fluorescentes<sup>55</sup>

1. Dispensar sobre la muestra una solución de Calcofluor-White<sup>R</sup> (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) al 1% en PBS 0.001 M, pH 7.6.
2. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente en cuarto oscuro.
3. Lavar con PBS 0.001 M, pH 7.6 durante cinco minutos (tres veces).
4. Dispensar una solución de azul de Evans al 0.2% (p/v).
5. Lavar con PBS 0.001 M, pH 7.6 durante cinco minutos (tres veces).
6. Dejar secar y montar.
7. Examinar en microscopio de fluorescencia (Leitz, Laboulux K<sup>R</sup>) a una longitud de onda de 320-380 nm.

## Soluciones utilizadas en los métodos de tinción

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

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

*Solución alcohol-ácido.*

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

*Solución de cristal violeta*

Cristal violeta	0.5 g
Oxalato amónico	0.8 g
Metanol	20 ml
Agua destilada csp	100 ml

*Solución decolorante*

Acetona	50 ml
Alcohol etílico al 95%	50 ml

*Solución lugol*

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

Ejemplos de esporas de microsporidiosis intestinales (*E. bienensii* y *E. intestinalis*) detectadas por medio de los métodos por tinción descritos, pueden ser observadas en la dirección de la red electrónica siguiente:

[http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Microsporidiosis\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Microsporidiosis_il.htm)

## Referencias

- Bornay-Llinares FJ, da Silva AJ, Moura H, Schwartz DA, Visvesvara GS, Pieniazek NJ, et al.** Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. *J Infect Dis* 1998; 178 (3): 820-6.
- Didier ES.** Microsporidiosis. *Clin Infect Dis* 1998; 27 (1): 1-7; quiz 8.
- Weiss LM, Cali A, Levee E, LaPlace D, Tanowitz H, Simon D, et al.** Diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection by western blot and the use of cross-reactive antigens for the possible detection of microsporidiosis in humans. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47(4): 456-62.
- Simon D, Weiss LM, Tanowitz HB, Cali A, Jones J, Wittner M.** Light microscopic diagnosis of human microsporidiosis and variable response to octreotide. *Gastroenterology* 1991; 100(1): 271-3.
- Canning EU, Hollister WS.** *Enterocytozoon bienensii* (*Microspora*): prevalence and pathogenicity in AIDS patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84(2): 181-6.
- Shadduck JA, Greeley E.** Microsporidia and human infections. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2(2): 158-65.
- Franzen C, Muller A.** Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect* 2001; 3(5): 389-400.
- Abaza SM, Makhoul LM, el-Shewy KA, el-Moamly AA.** Intestinal opportunistic parasites among different groups of immunocompromised hosts. *J Egypt Soc Parasitol* 1995; 25(3): 713-27.
- Muller A, Bialek R, Kamper A, Fatkenheuer G, Salzberger B, Franzen C.** Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *J Clin Microbiol* 2001; 39(4): 1630-2.
- Franzen C, Muller A.** Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(2): 243-85.
- Kotler DP, Orenstein JM.** Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals referred for gastroenterological evaluation. *Am J Gastroenterol* 1994; 89(11): 1998-2002.
- Weiss LM, Keohane EM.** The uncommon gastrointestinal Protozoa: Microsporidia, Blastocystis, Isospora, Dientamoeba, and Balantidium. *Curr Clin Top Infect Dis* 1997; 17: 147-87.
- Berg J, Diaz LE, Bender BS.** Microsporidia in humans. *Ann Intern Med* 1996; 125(6): 522-3.
- Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL.** Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7(4): 426-61.
- Weber R, Deplazes P, Schwartz D.** Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. *Contrib Microbiol* 2000; 6: 166-92.
- Hollister WS, Canning EU, Anderson CL.** Identification of Microsporidia causing human disease. *J Eukaryot Microbiol* 1996; 43(5): 104S-105S.
- Hutin YJ, Sombardier MN, Liguory O, Sarfati C, Derouin F, Modai J, et al.** Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. *J Infect Dis* 1998; 178(3): 904-7.
- Brasil P, de Paiva DD, de Lima DB, da Silva EJ, Peralta JM, da Silva AJ, et al.** A 3-year follow-up of a Brazilian AIDS patient with protracted diarrhea caused by *Enterocytozoon bienensii*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1998; 40(4): 215-8.
- Beaugerie L, Teilhac MF, Deluol AM, Fritsch J, Girard PM, Rozenbaum W, et al.** Cholangiopathy associated with Microsporidia infection of the common bile duct

- mucosa in a patient with HIV infection. *Ann Intern Med* 1992; 117(5): 401-2.
20. **Goodgame R, Stager C, Marcantel B, Alcocer E, Segura AM.** Intensity of infection in AIDS-related intestinal microsporidiosis. *J Infect Dis* 1999; 180(3): 929-32.
  21. **Molina JM, Sarfati C, Beauvais B, Lemann M, Lesourd A, Ferchal F, et al.** Intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic unexplained diarrhea: prevalence and clinical and biologic features. *J Infect Dis* 1993; 167(1): 217-21.
  22. **Chukwuma C, Sr.** Microsporidium in AIDS patients: a perspective. *East Afr Med J* 1996; 73(1): 72-5.
  23. **García LS, Shimizu RY, Bruckner DA.** Detection of microsporidial spores in fecal specimens from patients diagnosed with cryptosporidiosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32(7): 1739-41.
  24. **García LS, Shimizu RY.** Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6): 1526-9.
  25. **Schwartz DA, Sobottka I, Leitch GJ, Cali A, Visvesvara GS.** Pathology of microsporidiosis: emerging parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1996; 120(2): 173-88.
  26. **Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR.** Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(1): 67-85.
  27. **Desportes-Livage I, Doumbo O, Pichard E, Hilmarsdottir I, Traore HA, Maiga, II, et al.** Microsporidiosis in HIV-seronegative patients in Mali. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92(4): 423-4.
  28. **Wanke CA, DeGirolami P, Federman M.** Enterocytozoon bieneusi infection and diarrheal disease in patients who were not infected with human immunodeficiency virus: case report and review. *Clin Infect Dis* 1996; 23(4): 816-8.
  29. **Enriquez FJ, Ditrich O, Palting JD, Smith K.** Simple diagnosis of *Encephalitozoon* sp. microsporidial infections by using a panspecific antiexospore monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 1997; 35(3): 724-9.
  30. **Deplazes P, Mathis A, Muller C, Weber R.** Mol powerful DNA extraction method and PCR for detection of microsporidia in clinical stool specimens. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6(2): 243-6.
  31. **Kotler DP, Orenstein JM.** Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Adv Parasitol* 1998; 40:321-49.
  32. **Brasil P, de Lima DB, de Paiva DD, Lobo MS, Sodre FC, da Silva SP, et al.** Emerging and opportunistic intestinal parasites in HIV-infected patients with chronic diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. *J Eukaryot Microbiol* 1999; 46(5): 40S-41S.
  33. **Asmuth DM, DeGirolami PC, Federman M, Ezratty CR, Pleskow DK, Desai G, et al.** Clinical features of microsporidiosis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1994; 18(5): 819-25.
  34. **Brasil P, de Lima DB, de Paiva DD, Lobo MS, Sodre FC, Silva SP, et al.** Clinical and diagnostic aspects of intestinal microsporidiosis in HIV-infected patients with chronic diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2000; 42(6): 299-304.
  35. **Didier ES, Didier PJ, Snowden KF and Shadduck.** Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection* 2000; 2(5): 709-20.
  36. **Cegielski JP, Ortega YR, McKee S, Madden JF, Gaido L, Schwartz DA, et al.** *Cryptosporidium*, enterocytozoon, and cyclospora infections in pediatric and adult patients with diarrhea in Tanzania. *Clin Infect Dis* 1999; 28(2): 314-21.
  37. **Simon D.** Microsporida: a new gastrointestinal AIDS pathogen? *Am J Gastroenterol* 1991; 86(11): 1684-5.
  38. **Orenstein JM, Benator D, Kotler DP.** Microsporidia and HIV-related diarrhea. *Ann Intern Med* 1994; 120(11): 973-4.
  39. **Moretto M, Casciotti L, Durell B, Khan IA.** Lack of CD4(+) T cells does not affect induction of CD8(+) T-cell immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun* 2000; 68(11): 6223-32.
  40. **Khan IA, Moretto M.** Role of gamma interferon in cellular immune response against murine *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun* 1999; 67(4): 1887-93.
  41. **Khan IA, Schwartzman JD, Kasper LH, Moretto M.** CD8+ CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol* 1999; 162(10): 6086-91.
  42. **El Fakhry Y, Achbarou A, Desportes-Livage I, Mazier D.** *Encephalitozoon intestinalis*: humoral responses in interferon-gamma receptor knockout mice infected with a microsporidium pathogenic in AIDS patients. *Exp Parasitol* 1998; 89(1): 113-21.
  43. **Schmidt EC, Shadduck JA.** Mechanisms of resistance to the intracellular protozoan *Encephalitozoon cuniculi* in mice. *J Immunol* 1984; 133(5): 2712-9.
  44. **El Naas A, Levkut M, Revajova V, Levkutova M, Hipikova V, Letkova V.** Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection in laboratory mice. *Vet Parasitol* 1999; 82(2): 137-43.
  45. **El Fakhry Y, Achbarou A, Desportes I, Mazier D.** Resistance to *Encephalitozoon intestinalis* is associated with interferon-gamma and interleukin-2 cytokines in infected mice. *Parasite Immunol* 2001; 23(6):297-303.
  46. **Braunfuchsova P, Kopecky J, Ditrich O, Koudela B.** Cytokine response to infection with the microsporidian, *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol (Praha)* 1999; 46(2): 91-5.
  47. **Achbarou A, Ombrouck C, Gneragbe T, Charlotte F, Renia L, Desportes-Livage I, et al.** Experimental model for human intestinal microsporidiosis in interferon gamma receptor knockout mice infected by *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasite Immunol* 1996; 18(8): 387-92.
  48. **Didier ES.** Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (phylum microspora) replication in murine peritoneal macrophages. *Parasite Immunol* 1995; 17(8):405-12.

49. **El Fakhry Y, Achbarou A, Franetich JF, Desportes-Livage I, Mazier D.** Dissemination of *Encephalitozoon intestinalis*, a causative agent of human microsporidiosis, in IFN-gamma receptor knockout mice. *Parasite Immunol* 2001; 23(1): 19-25.
50. **Eeftinck Schattenkerk JK, van Gool T, van Ketel RJ, Bartelsman JF, Kuiken CL, Terpstra WJ, et al.** Clinical significance of small-intestinal microsporidiosis in HIV-1-infected individuals. *Lancet* 1991; 337(8746): 895-8.
51. **Rabeneck L, Gyorkey F, Genta RM, Gyorkey P, Foote LW, Risser JM.** The role of Microsporidia in the pathogenesis of HIV-related chronic diarrhea. *Ann Intern Med* 1993; 119(9): 895-9.
52. **Fedorko DP, Nelson NA, Didier ES, Bertucci D, Delgado RM, Hruszkewycz AM.** Speciation of human microsporidia by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65(4): 397-401.
53. **Doultree JC, Maerz AL, Ryan NJ, Baird RW, Wright E, Crowe SM, et al.** In vitro growth of the microsporidian *Septata intestinalis* from an AIDS patient with disseminated illness. *J Clin Microbiol* 1995; 33(2): 463-70.
54. **Ignatius R, Henschel S, Liesenfeld O, Mansmann U, Schmidt W, Koppe S, et al.** Comparative evaluation of modified trichrome and Uvitex 2B stains for detection of low numbers of microsporidial spores in stool specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35(9): 2266-9.
55. **Ignatius R, Lehmann M, Miksits K, Regnath T, Arvand M, Engelmann E, et al.** A new acid-fast trichrome stain for simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and microsporidial species in stool specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35(2): 446-9.
56. **Van Gool T, Hollister WS, Schattenkerk WE, Van den Bergh Weerman MA, Terpstra WJ, van Ketel RJ, et al.** Diagnosis of *Enterocytozoon bienewsi* microsporidiosis in AIDS patients by recovery of spores from faeces. *Lancet* 1990; 336(8716): 697-8.
57. **Van Gool T, Canning EU, Gilis H, van den Bergh Weerman MA, Eeftinck Schattenkerk JK, Dankert J.** *Septata intestinalis* frequently isolated from stool of AIDS patients with a new cultivation method. *Parasitology* 1994; 109 ( Pt 3): 281-9.
58. **Van Gool T, Canning EU, Dankert J.** An improved practical and sensitive technique for the detection of microsporidian spores in stool samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88(2): 189-90.
59. **Orenstein JM, Zierdt W, Zierdt C, Kotler DP.** Identification of spores of *Enterocytozoon bienewsi* in stool and duodenal fluid from AIDS patients. *Lancet* 1990; 336(8723): 1127-8.
60. **Weber R, Sauer B, Spycher MA, Deplazes P, Keller R, Ammann R, et al.** Detection of *Septata intestinalis* in stool specimens and coprodiagnostic monitoring of successful treatment with albendazole. *Clin Infect Dis* 1994; 19(2): 342-5.
61. **Awadalla HN, el Naga IF, el-Temsahi MM, Negm AY.** Detection of Microsporidia by different staining techniques. *J Egypt Soc Parasitol* 1998; 28(3): 729-38.
62. **Sobottka I, Albrecht H, Schafer H, Schottelius J, Visvesvara GS, Laufs R, et al.** Disseminated *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infection in a patient with AIDS: novel diagnostic approaches and autopsy-confirmed parasitological cure following treatment with albendazole. *J Clin Microbiol* 1995; 33(11): 2948-52.
63. **Moura H, Sodre FC, Bornay-Llinares FJ, Leitch GJ, Navin T, Wahlquist S, et al.** Detection by an immunofluorescence test of *Encephalitozoon intestinalis* spores in routinely formalin-fixed stool samples stored at room temperature. *J Clin Microbiol* 1999; 37(7): 2317-22.
64. **Punpoowong B, Viriyavejakul P, Riganti M, Pongponaratn E, Chaisri U, Maneerat Y.** Opportunistic protozoa in stool samples from HIV-infected patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998; 29(1): 31-4.
65. **Da Silva AJ, Slemenda SB, Visvesvara GS, Schwartz DA, Wilcox CM, Wallace S, et al.** Detection of *Septata intestinalis* (Microsporidia) Cali et al. 1993 Using Polymerase Chain Reaction Primers Targeting the Small Subunit Ribosomal RNA Coding Region. *Mol Diagn* 1997; 2(1): 47-52.
66. **Moura H, Da Silva JL, Sodre FC, Brasil P, Wallmo K, Wahlquist S, et al.** Gram-chromotrope: a new technique that enhances detection of microsporidial spores in clinical samples. *J Eukaryot Microbiol* 1996; 43(5): 94S-95S.
67. **Talal AH, Kotler DP, Orenstein JM, Weiss LM.** Detection of *Enterocytozoon bienewsi* in fecal specimens by polymerase chain reaction analysis with primers to the small-subunit rRNA. *Clin Infect Dis* 1998; 26(3): 673-5.
68. **Aldras AM, Orenstein JM, Kotler DP, Shaddock JA, Didier ES.** Detection of microsporidia by indirect immunofluorescence antibody test using polyclonal and monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1994; 32(3): 608-12.
69. **Accoceberry I, Thellier M, Desportes-Livage I, Achbarou A, Biligui S, Danis M, et al.** Production of monoclonal antibodies directed against the microsporidium *Enterocytozoon bienewsi*. *J Clin Microbiol* 1999; 37(12): 4107-12.
70. **Fedorko DP, Nelson NA, Cartwright CP.** Identification of microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. *J Clin Microbiol* 1995; 33(7): 1739-41.
71. **Del Aguila C, López - Vélez R, Fenoy S, Turrientes C, Cobo J, Navajas R, et al.** Identification of *Enterocytozoon bienewsi* spores in respiratory samples from an AIDS patient with a 2-year history of intestinal microsporidiosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35(7): 1862-6.
72. **Visvesvara G, Leitch GJ, Pieniazek NJ, Da Silva AJ, Wallace S, Slemenda SB, et al.** Short-term in vitro culture and molecular analysis of the microsporidian, *Enterocytozoon bienewsi*. *J Eukaryot Microbiol* 1995; 42(5): 506-10.

73. **Visvesvara GS, da Silva AJ, Croppo GP, Pieniazek NJ, Leitch GJ, Ferguson D, et al.** In vitro culture and serologic and molecular identification of *Septata intestinalis* isolated from urine of a patient with AIDS. *J Clin Microbiol* 1995; 33(4): 930-6.
74. **De Groote MA, Visvesvara G, Wilson ML, Pieniazek NJ, Slemenda SB, daSilva AJ, et al.** Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. *J Infect Dis* 1995; 171(5): 1375-8.
75. **Da Silva AJ, Schwartz DA, Visvesvara GS, de Moura H, Slemenda SB, Pieniazek NJ.** Sensitive PCR diagnosis of Infections by *Enterocytozoon bienewisi* (microsporidia) using primers based on the region coding for small-subunit rRNA. *J Clin Microbiol* 1996;34(4):986-7.
76. **Fedorko DP, Hijazi YM.** Application of molecular techniques to the diagnosis of microsporidial infection. *Emerg Infect Dis* 1996;2(3):183-91.
77. **Carnevale S, Velásquez JN, Labbe JH, Chertcoff A, Cabrera MG, Rodríguez MI.** Diagnosis of *Enterocytozoon bienewisi* by PCR in stool samples eluted from filter paper disks. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7(3): 504-6.
78. **Conteas CN, Berlin OG, Ash LR, Pruthi JS.** Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63(3-4): 121-7.
79. **Dionisio D, Manneschi LI, Di Lollo S, Orsi A, Sterrantino G, Leoncini F, et al.** Persistent damage to *Enterocytozoon bienewisi*, with persistent symptomatic relief, after combined furazolidone and albendazole in AIDS patients. *J Clin Pathol* 1998;51(10):731-6.
80. **Lecuit M, Oksenhendler E, Sarfati C.** Use of albendazole for disseminated microsporidial infection in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 1994;19(2):332-3.
81. **Drug found effective against *E. intestinalis*.** *AIDS Patient Care STDS* 1998;12(3):231.