



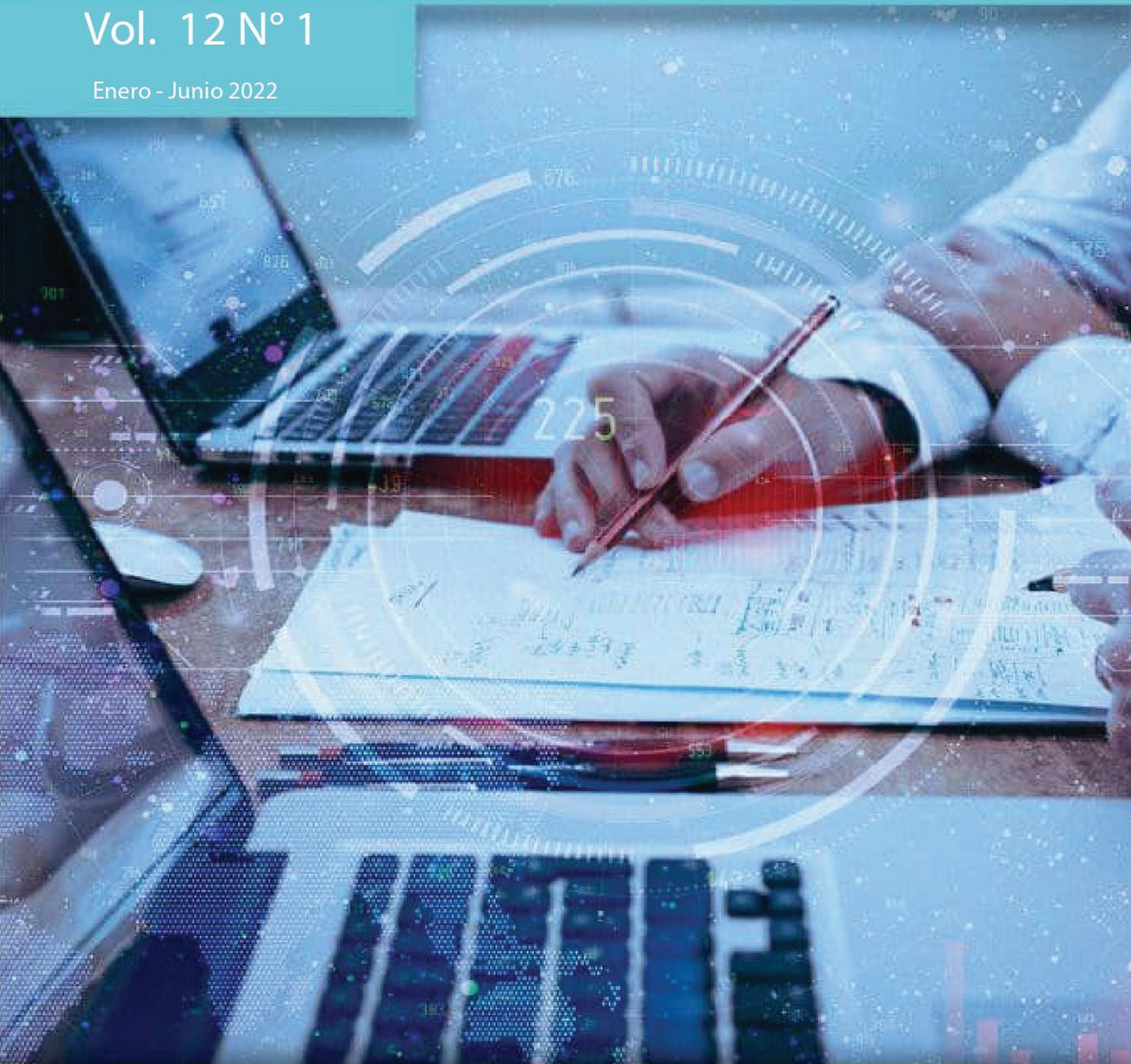
Red de Investigación Estudiantil de la Universidad del Zulia
Revista Venezolana de Investigación Estudiantil

REDIELUZ

Sembrando la investigación estudiantil

Vol. 12 N° 1

Enero - Junio 2022



ISSN: 2244-7334

Depósito Legal: pp201102ZU3769



VAC

Universidad del Zulia
Vicerrectorado Académico

ENTEROCYTOZOON BIENEUSI Y ENCEPHALYTOZOON INTESTINALIS EN PACIENTES VIH POSITIVOS CON SÍNDROME DIARRÉICO. REVISIÓN

Enterocytozoon bieneusi and Encephalytozoon intestinalis in HIV positive patients with diarrheal syndrome. Review

Betty Judith Pazmiño Gómez¹, Edgar Iván Rodas Neira²

¹Universidad Estatal de Milagro (UNEMI), ²Laboratorio Clínico y Microbiológico "PAZMIÑO"

<https://orcid.org/0000-0002-2611-2428>

bpazminog@unemi.edu.ec

RESUMEN

El Phylum Microsporidia es considerado un patógeno oportunista, capaz de producir desde una infección localizada hasta una infección sistémica. *Enterocytozoon bieneusi* fue la primera especie identificada en Haití en el año 1985 en pacientes VIH - SIDA con diarrea acuosa excesiva, desde entonces, es el más común de los Microsporidios que se presenta en los seres humanos. Posteriormente se identifica a *Septata intestinalis*, actualmente clasificado en el género *Encephalytozoon intestinalis*, siendo la segunda especie causante de diarreas diseminadas. Por otro lado, es necesario comentar que los métodos rápidos y sencillos por microscopía óptica, no son suficiente para dar el diagnóstico diferencial de los dos géneros, por lo tanto, es indispensable usar métodos como anticuerpos monoclonales por Inmunofluorescencia, biología molecular a través de la técnica reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), y microscopía electrónica de transmisión, cabe mencionar que los laboratorios de rutina no los pueden realizar por los altos costos de las pruebas y equipamiento. El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión bibliográfica de la prevalencia de *Enterocytozoon bieneusi* y *Encephalytozoon intestinalis*, epidemiología, diagnóstico, tratamiento y prevención.

Palabras clave: *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalytozoon intestinalis*, anticuerpos monoclonales, inmunofluorescencia, biología molecular, microscopía electrónica de transmisión, epidemiología.

ABSTRACT

Phylum Microsporidia is considered an opportunistic pathogen capable of producing from a localized infection to a systemic infection. *Enterocytozoon bieneusi* was the first species identified in Haiti in 1985 in HIV-AIDS patients with excessive watery diarrhea, since then it is the most common Microsporidia occurring in humans. Later, *Septata intestinalis* was identified and is currently classified in the genus *Encephalytozoon intestinalis*, being the second species causing disseminated diarrhea. On the other hand, it is necessary to comment that fast and simple methods by optical microscopy are not enough to give the differential diagnosis of the two genera, therefore, it is essential to use methods such as monoclonal antibodies by Immunofluorescence, molecular biology through the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, and transmission electron microscopy, it is worth mentioning that routine laboratories cannot perform them due to the high costs of tests and equipment. The objective of this work was to carry out a bibliographic review of the prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalytozoon intestinalis*, epidemiology, diagnosis, treatment and prevention.

Keywords: *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalytozoon intestinalis*, monoclonal antibodies, immunofluorescence, molecular biology, transmission electron microscopy, epidemiology.

Recibido: 16-01-2022 Aprobado: 15-03-2022

INTRODUCCIÓN

Los Microsporidios son parásitos obligados no poseen mitocondrias, centriolos, aparato de Golgi y cuenta con un RNA de tipo procariota al inicio se lo ubicó en el grupo de los protozoos, pero a través del tiempo con estudios genéticos, estructurales y metabólicos se reclasificaron en el reino Fungi, Filo: Zygomyceta, Clase: Microsporidia, Subclase: Diphlophasea y Haplophasea.

Hasta el momento se han descrito más de 1.700 especies que afectan a animales vertebrados e invertebrados, además ciertas especies atacan a las personas inmunodeprimidas, receptores de órganos y pacientes que han recibido quimioterapia inmunosupresora. (Neil A, Campbell J., 2017) (Han et al., 2021)

El CDC de Atlanta describe alrededor de 15 especies de Microsporidios patógenos para el ser humano: *Ancalia algarae*, *Ancalia connori*, *Ancalia vesicularum*, *Encephalytozoon intestinalis*, *Encephalytozoon hellem*, *Encephalytozoon cuniculi*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Microsporidium ceylonensis*, *Microsporidium africanum*, *Nosema ocularum*, *Pleistophora ronniaeaei*, *Trachipleistophora hominis*, *Trachipleistophora anthropophthera*, *Vittaforma corneae* y *Tubuli nosema acridophagus* y *endoreticulatus*. (CDC, 2019)

El primer caso de *Microsporidium* se identificó en 1959 por Matsubayashi y colaboradores, quienes aislaron en muestra de líquido cefalorraquídeo en un niño de 9 años con encefalitis. (Fernández et al., 2002)

Los géneros *Enterocytozoon bieneusi* y *Encephalytozoon intestinalis* afectan al tracto gastrointestinal actúan como microorganismos oportunistas con énfasis en pacientes con VIH-SIDA y trasplantados, siendo importante la diferencia de género para fines terapéuticos, es necesario señalar que la diseminación extra intestinal puede lesionar otros órganos como , riñones, corazón, tracto respiratorio, hígado y cerebro, se transmiten por vía oral causando calambres abdominales, diarrea, malabsorción y pérdida de peso diarrea, malabsorción y pérdida de peso en pacientes con sida. (Ghoshal et al., 2016) (Han & Weiss, 2017)

Cabe mencionar que *Enterocytozoon bieneusi* es el género más común e infecta al 90% de humanos y *Encephalytozoon intestinalis* al 10%, alterando y disminuyendo la capacidad inmunológica y son presa fácil de cualquier infección oportunista,

así como infecciones diarreicas agudas y crónicas siendo el blanco perfecto de microorganismos oportunistas que pueden llevarlos a la muerte, otro parámetro importante del laboratorio clínico es el recuento de linfocitos CD4+ que se encuentran en un nivel inferior a 100 células/mm³. (Noda et al., 2013)

Enterocytozoon bieneusi fue la primera especie identificada en Haití en el año 1985 en pacientes VIH - SIDA con diarrea acuosa excesiva, es un patógeno emergente en el trasplante de órganos sólidos, principalmente en los receptores de trasplante renal. (Bedoya et al., 2008) (Moniot et al., 2021) y posteriormente se observó en muestras de cerdo, animales, salvajes, domésticos y de granja, así como en aguas superficiales, se han detectado en 236 especies de animales,

Se considera que la transmisión zoonótica es la principal fuente de infección y puede ocurrir por contacto directo con animales, con saneamiento inadecuado, o indirectamente por la ingestión de agua o alimentos contaminados con estos microorganismos. (Kwon et al., 2021)

Encephalytozoon intestinalis conocido como *Septata intestinalis* se aisló en paciente colombiano con diarrea crónica en cultivo celular (mono capas de células). (Bedoya et al., 2008) (Da Silva et al., 1997) (T. Van Gool et al., 1994)

Este hongo infecta y se desarrolla dentro de los macrófagos intestinales, propagándose la infección desde el intestino a otros órganos, posiblemente responsable de infecciones oculares y hepáticas. (de Moura et al., 2019) (E. S. Didier & Weiss, 2006) La vía de transmisión es fecal-oral, oral-oral, inhalación de aerosoles, agua y alimentos contaminados, contacto directo con piel u ojos lesionados y transmisión sexual. (Halánová et al., 2019)

Se han notificado casos de Microsporidios a nivel mundial que fluctúan entre el 3.5% al 50% de casos, en Alemania, Argentina, Australia, Botswana, Brasil, Canadá, España, los Estados Unidos de América, Francia, India, Italia, Japón, Nueva Zelanda, los Países Bajos, el Reino Unido, la República Checa, Sri Lanka, Suecia, Suiza, Tailandia, Uganda, Zambia, Venezuela, Colombia, Ecuador. (Chacin-Bonilla et al., 2006) (Pazmiño et al., 2014) (Bedoya et al., 2008) (OPS/OMS, 2003)

El diagnóstico de laboratorio para Microsporidios requiere perseverancia, porque las esporas son tan pequeñas que resulta difícil su identificación. En la actualidad se procesan muestras de tejidos, heces,

fluidos corporales, escarificada corneal y posteriormente por microscopía se observan las esporas.

Existen diferentes métodos para identificar Microsporidios como Tinción de *Gram Chromotropo* rápido, Tricrómica modificada de Weber y Tricrómica de Rayan de alta sensibilidad y especificidad, el método de inmunofluorescencia, Microscopía de Barrido, Microscopía de transmisión, Western Blot y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Considerado por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) como los métodos de referencia para la identificación de Microsporidios. (Acha & Szyfres, 2001a) (Winn et al., 2008)

Enterocytozoon bienewisi

Es el más significativo de todos, produce patologías en el hombre se identificó por primera vez por Desportes en 1985 en pacientes con VIH.SIDA. Las esporas de este microorganismo son capaces de infectar a diferentes hospedadores desde protistas a mamíferos incluido el hombre, se ubica en los enterocitos del intestino delgado, causando un síndrome diarreico crónico o enfermedad biliar en pacientes inmunodeficientes se ha encontrado en el epitelio nasal, bronquial, y traqueal.

La espora es de forma ovalada con capacidad infectante y puede permanecer por largo tiempo en el medio ambiente ingresa al huésped e inyecta en el citoplasma su esporoplasma adhiriéndose a los tejidos, su tamaño es de 2 a 4 micras, tiene una exospora proteínica electro densa y una endospora quitinosa y electro lúcido confiriéndole resistencia a los factores ambientales, tiene además un esporoplasto uni o binuclear, el cual, es inyectado a la célula huésped a través del filamento polar que posee de 5 a 7 espiras, dispuestas en doble hilera y se lo identifica dentro de los enterocitos de la pared del intestino del hombre. (Romero Cabello, 2018),(Moncada & Pérez, 1998) (Fresnadillo et al., 2010)(Han et al., 2020)

Encephalytozoon intestinalis

Es la segunda especie que, ocasiona diarrea afectando principalmente a pacientes inmunodeprimidos con VIH-SIDA, además, puede ocasionar una enteritis severa, presenta mala absorción e infecciones generalizadas. Denominado anteriormente como Septata intestinalis y reclasificado como Encephalytozoon intestinalis en base a los estudios genéticos e inmunológicos, sus células se caracterizan por tener de uno a cuatro núcleos, se

desarrollan en el enterocito dentro de una vacuola parasitófora, separado por dos septos en estado esporogónica, las esporas miden de 1.2 a 2 micras y el filamento polar presenta de 4 a 7 vueltas.

Este género infecta las células epiteliales, endoteliales, células presentadoras de antígenos como las células dendríticas y de Langerhans, macrófagos del intestino. Fibroblastos, en el hígado infecta las células de Kupffer, y se disemina a los riñones ocasionado una nefritis túbulo intersticial que se presenta con dolor de espalda, disuria y hematuria, puede diseminarse al epitelio del tracto respiratorio causante de infecciones oculares, hepáticas queratitis, meningoencefalitis y miositis. (Romero Cabello, 2018) (Murray et al., 2021)

Hospedadores

Tiene un amplio reservorio tanto en vertebrados como invertebrados y se encuentra distribuida en todo el mundo, existen diferentes animales domésticos y salvajes que pueden infectarse con Microsporidios de importancia médica. *Enterocytozoon bienewisi* generalmente se considera un parásito humano, pero se ha identificado en cerdos, primates, ganado, gatos, perros, tejón europeo, garduña y zorro rojo, pollos y palomas, peces y otros mamíferos, se transmite a humanos por contacto directo fecal-oral, oral-oral, inhalación e ingestión de esporas. (Murray et al., 2021)(Ivarado G. et al., 2009)

Algunas, de estas cepas derivadas de animales se pueden presentar como genotipos zoonóticos. *E. intestinalis* casi nunca se identifica en animales diferentes al ser humanos.

No se ha informado en la actualidad de otras especies de Microsporidios infecten al hombre no se ha identificado ningún reservorio animal para el género *Vittaforma corneae*. *Pleistophora* spp. se encuentran en peces y reptiles, pero la forma de las esporas en estas especies es similar con la de las especies que ocasionan infecciones humanas (*P. ronneafiei*). *Tubuli nosema acridophagus*, *Trachipleistophora* spp. Y *Anncaliia algerae* están ligados con parásitos de insectos conocidos, sin embargo, la importancia de los insectos en la transmisión no es está despejada para la ciencia e investigación. (CDC, 2019)(Velásquez et al., 1996)(Santín et al., 2018)(Vergneau-Grosset & Larrat, 2015)

Ciclo Evolutivo de *Enterocytozoon bienewisi* y *Encephalytozoon intestinalis*

El hombre se ha infectado por Microsporidios a través de un traumatismo o por contacto directo. Existen estudios que evidencian que se ha tomado como patrón de estudio los animales de laboratorio inoculándoles Microsporidios a nivel intraperitoneal, intravenosa, intrarectal, intratraqueal e intracerebral (Gómez Puerta, 2013) (Shadduck & Orenstein, 1993; Snowden et al., 1998; Weber et al., 1994)

Se multiplican por merogonia (división binaria) y por esporogonia (producción de esporas), presentando tres fases: fase de infección, fase de merogonia y fase de esporogonia. (Madrid et al., 2012) (Moncada & Pérez, 1998)

Fase de Infección: El inicio de la infección depende de la vía de transmisión, que se produce en las células epiteliales del tracto gastrointestinal o respiratorio. Una vez ingerida la espora, se adapta en el ambiente gastrointestinal y condiciones de Ph adecuado, concentración de iones calcio y presión, pueden multiplicarse e invadir a la célula hospedera por el túbulo polar extruido e inyectar el esporoplasma infectivo en el citoplasma de la célula blanco. (Bigliardi & Sacchi, 2001; Delbac & Polonais, 2008; Caspar Franzen, 2004)

Después del contacto de la espora con la membrana celular inicia el proceso de endocitosis de la espora y el ingreso del esporoplasma del fago lisosoma maduro a través del túbulo polar, se presenta la infección secundaria en la vacuola parasitófora, así como en *Encephalytozoon* spp., que puede replicarse dentro de los macrófagos o desde el citoplasma de una célula a otra cercana y a través del túbulo polar extruido se produce la fagocitosis. (C. Franzen, 2008)

Las infecciones primarias por *E. bienewisi* se dan en las células endoteliales del intestino delgado y de la vesicular biliar, las esporas maduras son liberadas al lumen intestinal y eliminadas en las heces de los hospederos. (D. Kotler & Orenstein, 1999; D. P. Kotler & Orenstein, 1998) Las esporas maduras de *E. bienewisi* poseen un solo núcleo, contienen un filamento polar que se enrolla aproximadamente seis veces en una alineación de dos hileras, y son los más pequeños de los Microsporidios, midiendo aproximadamente 1,0 x 1,5 micras (Figura. 1) (Desportes et al., 1985)(Neil A., Camphell J., 2017) (Contreras, 2006)

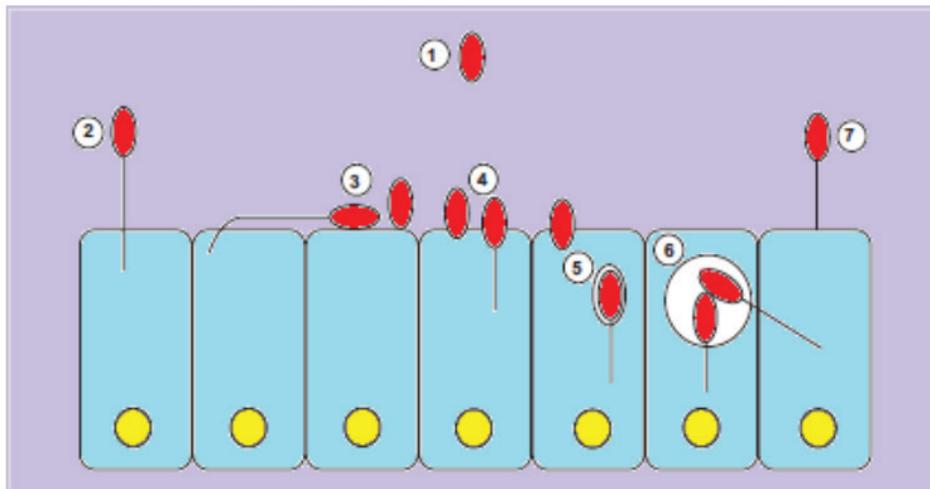


Figura 1. Diferentes mecanismos de invasión de la célula hospedadora por esporas de Microsporidios

Fuente: Tomado y modificado de Franzen (2008)

Fase de Merogonia: Llamada *esquizogonia* es la fase vegetativa, una vez que ingresa a la célula, el esporoplasma que es expulsado por el túbulo polar inicia la fase de merogonia transformándose en merontes, tienen forma redonda, elongadas e irregulares con escaso retículo endoplásmico no rugoso rudimentario, el citoplasma está rodeado

por una membrana plasmática con escaso retículo endoplásmico, los merontes son simples o dobles, pueden originar células multinucleadas, redondas refráctiles y plasmodiales.

En esta fase de merogonia se reproducen dentro de las vesículas parasitófora desprendiendo nue-

vas esporas y a través de su filamento polar llegan a otras células, a las que inyectan su material endoplásmico para infectarlas. *E. intestinalis*., en los seres humanos luego de la fase de merogonia en las células susceptibles se pueden diseminar por vía sanguínea o linfática (Botero-Garcés & Montoya-Palacio, 2002) (Romero Cabello, 2018)

Fase de Esporogonia: El proceso de la maduración de las esporas e inicia la esporogonia en el momento en que los merontes se rodean de una capa superficial amorfa y se forman los esporontes. Estos crecen y se multiplican por división binaria o múltiple hasta transformarse en los esporoblastos que son los precursores de las esporas maduras resistentes a las condiciones del medio ambiente. Estas estructuras al ser ingeridas, se adosan al tejido por medio del filamento polar implantando los ácidos nucleicos y el material citoplasmático al nuevo hospedero (Fernández et al., 2002) (Neil A., Campbell J., 2017). (Contreras, 2006) (Vesga et al., 2015)(Chinchilla et al., 1998)

Epidemiología de *Enterocytozoon bienewisi* y *Encephalytozoon intestinalis*

La Microsporidiosis humana es universal con un rango de prevalencia que oscilan entre 3.5% al 50% dependiendo de la región geográfica, es frecuente en individuos infectados por VIH - SIDA. En estudios realizados en Estados Unidos de Norte América, Australia, Países Bajos e Inglaterra se ha identificado *Enterocytozoon bienewisi* del 15 al 30% en pacientes con VIH, En Venezuela *Enterocytozoon bienewisi* se identificó el 14% en niños desnutridos y el 8% en niños eutróficos. (Acurero et al., 2015) (Vásquez et al., 1997)

En Argentina la infección por *E. intestinalis* que afecta al hombre es el 10%. en pacientes con SIDA y *E. bienewisi* oscila del 7 al 50%. (Ministerio_de_Salud_Argentina, 2001)

En los países en vía de desarrollo *E. bienewisi* presenta una tasa de prevalencia que oscila entre el 2.5 y 51%, el 0,8% en niños africanos VIH seronegativos. En Colombia, el 3% corresponde a *Enterocytozoon bienewisi* y 1% a *Encephalytozoon intestinalis*. En África la prevalencia de *E. intestinalis* y *Encephalytozoon intestinalis* varía entre 7 y 51%. Las tasas de infección por *Enterocytozoon bienewisi* en Tailandia fueron 2,15%.

Los estudios de Seroprevalencia en Suecia, indicaban rangos de 0 a 42% con altas tasas en homosexuales y personas con otra etología parasita-

rias. En un estudio en Francia, encontraron títulos de anticuerpos contra especies de *Encephalitozoon* en 5% en mujeres embarazadas y en Holanda 8% de donantes de sangre. (Tom Van Gool et al., 1997) (Ojuromi et al., 2012)(Matos et al., 2012)(Matos et al., 2012)

Respuesta inmune contra *Microsporidium*

La respuesta inmune contra *E. bienewisi* es escasa por cuanto existe ausencia de modelos animales apropiados y a lo complejo que es cultivarlo en tejido.

Los Microsporidios cuando tienen una respuesta inmune equilibrada pueden subsistir en estado de latencia en el interior del enterocito por largos periodos de tiempo, sin presentar manifestación clínica. En cambio, los pacientes con VIH-SIDA son más susceptibles a infecciones oportunistas secundarias como consecuencia de la disminución de los linfocitos TCD4+ menor a 100/mm³ en sangre y se puede aumentar con el uso de antirretroviral de alta eficacia (TARVAE) (Noda Albelo et al., 2013) es importante mantener fortalecida la respuesta inmune celular para protegerlo de los diferentes patógenos que invaden el sistema inmunológico.(Marchant, 2006) (Noda Albelo et al., 2013) la infección se activa con la producción de anticuerpos que aparentemente no tienen un efecto protector. (Moncada & Pérez, 1998)

Los anticuerpos reconocen la pared de la espora y el tubo polar (Noda Albelo et al., 2013), se evidencia la función de la inmunidad mediada por células en la resistencia contra la infección por Microsporidios al presentar formas graves de la enfermedad en pacientes VIH.SIDA y trasplantados, cabe mencionar que las especies de *Encephalitozoon* spp son capaces de evadir la respuesta inmune del hospedero sobreviviendo en el interior del macrófago (Moncada & Pérez, 1998)(Marchant, 2006) (Noda Albelo et al., 2013)

Se han realizado estudios experimentales en modelos murinos y estudios ex vivo activándose las citocinas pro inflamatorias como Interferón gamma- γ (IFN- γ), interleukina-12 (IL-12), y tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) que actúan luchan en la resistencia contra *Encephalitozoon* spp. (C. Franzen, 2008; Noda Albelo et al., 2013; Salát & Braunfuchsová, 2002)

Manifestaciones Clínica y Patogénesis

En Suecia se realizó un estudio de cohorte sobre *E. bienensii* y se lo asoció con un brote alimentario, se presume que el proceso de incubación se llevó a cabo en 9 días hasta el inicio de la sintomatología. (Decraene et al., 2012)

Las manifestaciones clínicas, se presentan con diarrea es el principal síntoma, dolor abdominal, fiebre, pérdida de peso, deshidratación y gases (flatulencia), la patogénesis a nivel intestinal está relacionada con la muerte de los enterocitos por efecto de la infección celular, clínicamente se presenta diarrea y pérdida de peso como consecuencia del daño, que se produce en el intestino delgado, mostrando atrofia parcial de las vellosidades e hiperplasia de las criptas y malabsorción (D. Kotler & Orenstein, 1999) Cabe resaltar que, estos trastornos dependen del estado inmunológico, edad, personas inmunodeprimidas, inmunocompetentes, pacientes geriátricos, trasplantados, cáncer y VIH seropositivos (Lores et al., 2002; Weiss & Becnel, 2014), en el caso de personas inmunocompetentes, la diarrea es auto limitada debido a la función de protección del sistema inmune. (Weiss & Becnel, 2014) No obstante, *E. bienensii*, puede diseminarse a otros órganos como el tracto, respiratorio produciendo tos, disnea asma y colangitis biliar. (Velásquez et al., 2012)

En países desarrollados la infección por este microorganismo está disminuyendo debido al uso de la terapia antirretroviral en inmunodeprimidos, en cambio en pacientes trasplantados, el número de casos se ha incrementado, presentándose la patología días o años después del trasplante. (Galván et al., 2011)

Trasmisión

La transmisión de la infección por Microsporidios ocurre tiene diversas formas de transmitirse a través de los alimentos en también se incluye la industria de la cadena alimentaria mundial de peces y crustáceos como camarones, langostas, almejas, a través del agua potable, incluido el agua del riego de cultivos, agua de mar, aguas subterráneas, aguas residuales, las excretas en el medio ambiente y espacios con lodos. (Stentiford et al., 2016)

La transmisión vertical de madre a hijo, pero de animales como conejos, ovejas se ha observado en conejos, ovejas. Algunos estudios manifiestan que, existe una la transmisión zoonótica a través de ani-

males que actúan como reservorios. (Fiuza et al., 2016; Stentiford et al., 2016) Aunque es inusual, la transmisión fecal-oral y aerosoles, también, puede ocurrir en casos de infección en los seres humanos. (P. J. Didier et al., 2006)

Tratamiento

El tratamiento para *E. bienensii*. Es albendazol 400 mg por vía oral 2 veces por 21 a 28 días al día en adultos, en niños 15mg/kg/ 2 veces al día durante 7 días 2 a 4 semanas, de acuerdo al cuadro clínico más el tratamiento antirretroviral eficaz. (OPS/OMS, 2022)(Pearson, 2020)

Algunos refieren que hay respuesta al albendazol, metronidazol, pero al realizar estudios histológicos, se evidencia que la infección persiste, (Contreras, 2006)(Murray et al., 2021) también, utilizan albendazol, furazolidone, thalidomide, azithromycin o atovaquone, que son eficaces dependiendo del estado del paciente y el compromiso inmunológico, Las alternativas terapéuticas, actualmente tienen mejor perspectiva puesto que existen otro tipo de hospederos diferentes al humano así como macacos y cerdos que pueden utilizarse como estudio piloto en busca de nuevas terapéuticas para el tratamiento de *E. bienensii*.

Además, el uso de la terapia de antirretroviral puede intervenir en la supresión del virus de inmunodeficiencia humana y disminuir la eliminación de esporas de *E. bienensii*, cabe indicar que, todavía no existe tratamiento para este microorganismo, se ha improvisado en muchos casos la acción terapéutica pero existe el riesgo de producir mala absorción decreciendo el nivel de los medicamentos anti-VIH que llegan a la sangre. Es necesario tener en cuenta en el tratamiento de la Microsporidiosis tres aspectos importantes: tratar la infección, controlar la diarrea y corregir la pérdida de peso, para evitar la descompensación del paciente inmunodeprimido. (Contreras, 2006)(Chinchilla et al., 1998) (Lobos et al., 2005)

El tratamiento que se utiliza para *E. intestinalis* es albendazol con dosis recomendada de 60 mg/día por 14 días, con excelente respuesta al tratamiento y clínicamente en la mayoría de los pacientes desaparece la diarrea y la eliminación de esporas por heces y orina, además se ha comprobado a través de biopsias del intestino delgado que las esporas desaparecen en el tejido, existen otros tratamientos que, aún están en pruebas, como la

fumagalina, derivados de imidazoles, entre otros. (Contreras, 2006) (Koltai & Researcher, 2011) (Velez, 2005)(MSP, 2012)

Prevención de microsporidio SIS

Prevención de la exposición: Es importante evitar, el contagio por Microsporidios, por lo tanto, es primordial el lavado de manos y la higiene personal, tomar agua hervida o consumir agua embotellada, lavar las frutas y verduras que se consumen crudas antes de consumir, cocinar la carne, pescado y mariscos, para disminuir el contagio. Investigaciones recientes indican que existe la posibilidad de transmisión zoonótica o de contaminación ambiental.

Prevención de la enfermedad: No se conocen fármacos quimio profilácticos eficaces contra la Microsporidiosis. **Prevención de recurrencias:** No se conocen regímenes terapéuticos eficaces para prevenir la recurrencia de Microsporidiosis. (OMS/OPS, 2000) (Morán & Ochoa, 2017)(Moncada & Pérez, 1998)

Métodos de estudio y diagnóstico

El diagnóstico de Microsporidios en el laboratorio microbiológico resulta complejo debido al tamaño pequeño de las esporas, los especímenes que se utilizan para realizar un diagnóstico acertado son: materia fecal, líquido bronco alveolar, biopsia de vellosidades intestinales y sedimento urinario, fluido duodenal- yeyunal que se puede obtener por aspirado colónico las muestras se pueden procesar por diferentes métodos con tinciones por microscopía óptica, sin embargo se requieren técnicas de microscopía electrónica de transmisión para observar las formas ultra estructurales de Microsporidios, también, son de gran aporte los métodos inmuno enzimáticos, inmunofluorescencia con blanco de calco flúor o anticuerpos monoclonales específicos, las tinciones siendo las más utilizadas para el diagnóstico de estos microorganismos. (Winn et al., 2008) (Acha & Szyfres, 2001b)

Fucsina fenicada y Tricrómica modificada por Didier, Weber, Ryan, Gram Chromotropo, hematoxilina-eosina, Es importante recalcar que los laboratorios de menor complejidad pueden pasar por alto la enfermedad por falta de equipos de tecnología de punta que no son fácil de adquirir por el costo elevado. Existen en la actualidad otras pruebas como la técnica de Western Blot y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) considerados por el Centro para el Control y Prevención de enferme-

dades (CDC) como los métodos de referencia para la identificación de *Microsporidium*. (Lobos et al., 2005)(Bedoya et al., 2008)

Métodos de tinciones por microscopía óptica

Los métodos de tinciones son importantes para el diagnóstico rápido y oportuno en la identificación de Microsporidios, pero no son específicas para el diagnóstico de especies de este microorganismo, se realiza un frotis de heces y de otras muestras clínicas a las cuales, se las tiñen de acuerdo a la coloración que se ajuste a las necesidades de la investigación. Actualmente, se usan diferentes técnicas de tinción que están disponibles para el diagnóstico de estos microorganismos como la tinción histológica de Hematoxilina-Eosina, el proceso se realiza sobre secciones de tejido fijadas en formalina o parafina, colorante de contraste de Weber, Ryan, Fascina fenicada y Tricrómica modificada por Didier y Gram Chromotropo 2R. (Fernández Vadiello, 2014)

Técnica de coloración de fucsina fenicada y Tricrómica modificada por Didier

Esta técnica se recomienda para el análisis de muestras de heces para identificar coccidios y esporas de *Microsporidium sp.* El procedimiento a seguir es el siguiente:

- Realizar un frotis, dejar secar y cubrir con fucsina fenicada de Kinyoun durante 10 minutos.
- lavar con agua destilada para retirar el colorante.
- Decolorar por 30 segundos con alcohol ácido clorhídrico.
- Lavar con agua destilada.
- Cubrir el frotis con solución Tricrómica por 30 minutos a 37 °C.
- Lavar con agua destilada.
- Decolorar por 10 segundos con alcohol ácido acético.
- Lavar el frotis durante 30 segundos usando etanol al 95 %.
- Dejar secar la placa y observar al microscopio con aceite de inmersión en lente de 100x, la presencia de esporas que miden de 1 a 2,5 μm

Control de calidad

Para el control de calidad se utiliza cepas de *Mycobacterium tuberculosis* como control positivo se preparan frotis y se tiñen con los reactivos preparados para verificar que los microorganismos tomen el color adecuado (rojo-fucsia). (Gil, 2019)

TINCIÓN DE GRAM CHROMOTROPE 2R

Esta es una tinción alternativa al procedimiento de tinción Chromotropo, es un método fácil, confiable y simple de teñir en un frotis y demostrar la presencia de esporas de Microsporidios en heces, orina, esputo, saliva, sobrenadante de cultivo celular y otras muestras clínicas, es importante recalcar, que para muestras fijadas con formol, o tejido en bloques de parafina, se debe remover la parafina, e hidratar la muestra en secuencia de alcoholes hasta llegar al agua, para así teñirlas con la tinción de Gram. (Figura. 2)

Reactivos:

1. Tinción de Gram

2. Tinción Chromotropo:

Chromotropo 2R	1.0 g
Verde brillante SF.	0.15 g
Ácido fosfotúngstico	0.25 g
Ácido acético glacial	3.0 ml

Mezcle los ingredientes y dejar en reposo por 30 minutos, agregar 100 ml de agua destilada. Se debe Preparar cada mes para tener una tinción fresca.

3. Alcohol ácido:

Etanol al 90%	995.5 ml
Ácido acético glacial	4.5 ml

1. Etanol al 95%

2. Etanol al 100%

Importante: Además de los reactivos necesarios para la tinción de Gram Chromotropo, se necesita de un método para calentar los reactivos a una temperatura específica, por cuanto la tinción Chromotropo requiere calentarse, siendo muy útil una platina caliente.

PROCEDIMIENTO:

- Calentar el frotis con calor ,3 veces por 1 segundo sobre la llama directa ó 5 minutos en una platina caliente de 50° a 60°C. Enfriar a

temperatura ambiente.

- Teñir con el método de tinción de Gram, no se procesa la tinción de safranina:
- Colocar solución de violeta de genciana en la lámina y dejar en reposo por 30 segundos. Para muestras de tejido, el tiempo será de 1 minuto.
- lavar suavemente la lámina con agua para eliminar la solución de violeta de genciana.
- Adicionar solución de yodo Gram en la lámina y dejar en reposo por 30 segundos. Para muestras de tejido, el tiempo de 1 minuto.
- Lavar suavemente la lámina con agua para eliminar la solución de yodo Gram.
- Agregar alcohol cetona eliminar el exceso de colorante.
- Enjuague la laminilla suavemente con agua fría y retire el exceso de solución decolorante.

Tinción Chromotropo:

- Coloque la laminilla en la tinción Chromotropo caliente (50° a 55°C) por 1 minuto cuando menos. Para muestra de tejidos de tejido 1min con30 segundos.
- Lavar con alcohol-ácido al 90% por 3 segundos.
- Lavar con etanol al 95% por 30 segundos.
- Lavar con etanol al 100% dos veces, por 30 segundos cada proceso, se requieren dos recipientes para este paso. Dejar secar la lámina, colocar el cubreobjetos y sellar con Cytoseal60, Bálsamo de Canadá u otro sellador.

Para muestras de tejido, es necesario, que antes de montar las laminillas estas sean enjuagadas brevemente en una solución de alcohol etílico al 50%, xileno al 50% por 15 segundos.

Control de calidad:

Se debe incluir en cada corrida una laminilla testigo de Microsporidia conservada en formol al10%. En muestras fecales u otros especímenes, las levaduras, se teñirán de color violeta oscuro o rojo-roáceo, también se observa en las esporas una cinta prominente en el Ecuador con apariencia de un cinturón, diferenciándose con facilidad las esporas de Microsporidia.(Vila et al., 2009)(Botero-Garcés & Montoya-Palacio, 2002)(Forbes, 2009)

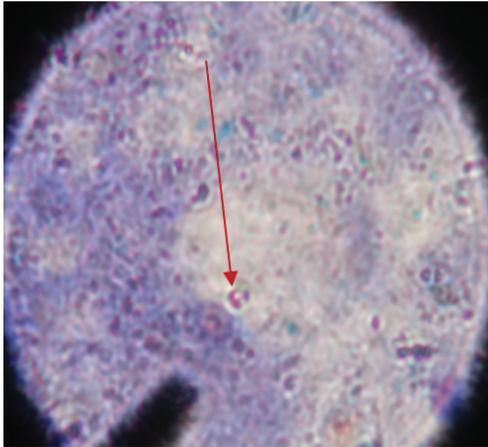


Figura 2. Esporas de Microsporidios con Tinción de Gram Chromotrope 2R
Fuente: Fotografía Pazmiño (2014)

Ensayo por inmunofluorescencia (IFI)

Es una técnica sencilla que permite la observación de muestras clínicas de manera rápida para detectar esporas de Microsporidios y otros microorganismos, así tenemos:

Técnica Blanco de Calcoflúor:

Se utiliza fluorescent brightener 28, Uvitex 2A y Rylux BA. Está tinción es efectiva para el diagnóstico de Microsporidios, además el tiempo del proceso es corto solo 15 minutos, la desventaja es que se requiere de un microscopio de inmunofluorescencia, además, pueden dar falsos positivos confundiendo el microorganismo con otras levaduras o artefactos.(Noda Albelo et al., 2013)(Cuenca et al., 2006) (Figura 3)

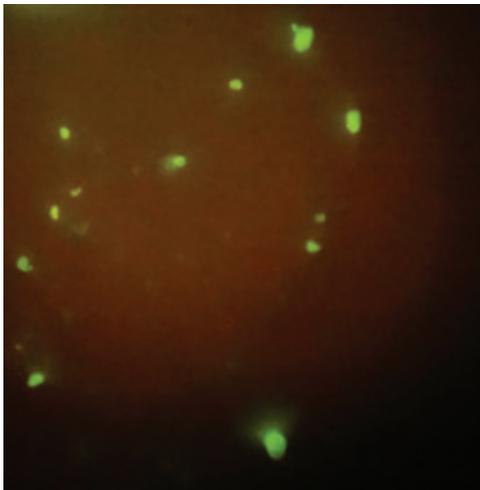


Figura 3. Esporas de Microsporidios con Tinción Blanco de Calcoflúor
Fuente: Fotografía Pazmiño (2014)

PROCEDIMIENTO

- Realizar un frotis de la muestra, dejar secar, fijar con metanol por cinco minutos y dejar secar al aire.
- Agregar la solución de Calcoflúor y dejar por cinco minutos a temperatura ambiente.
- Lavar con agua de chorro y agregar luego el colorante de contraste azul de Evans por un minuto a temperatura ambiente.
- Lavar los portaobjetos con agua y dejar secar al aire.
- Observar al microscopio fluorescencia de 1000X con filtro azul violeta a 395 o 415 nm de longitud de onda.
- Las esporas aparecen de color blanco azulado brillante sobre un fondo negro con filtro de 465 nm y verde brillante sobre un fondo negro con filtro de 450- 490 nm.

Control de calidad

- Se debe incluir en cada corrida un extendido testigo de Microsporidios conservados en formol al 10%
- Los agentes quimio fluorescentes como el Calcoflúor, son agentes luminiscentes ópticos que son sensibles, pero no específicos hacen fluorescer objetos y otros organismos que no son Microsporidios dando resultados inadecuados. (Contreras, 2006)

Ensayo por inmunofluorescencia (IFA)

Los anticuerpos monoclonales son un método de inmuno detección tipo sándwich, en este proceso el anticuerpo (Ac) de detección en el tampón se adhiere al antígeno(Ag) presente en la muestra, formándose de esta manera el complejo Ag-Ac, posteriormente se traslada a la matriz de nitrocelulosa donde es capturado por el Ac que se encuentra inmóvil en la tira de prueba, es importante conocer que mientras más Ag se encuentra en la muestra más fuerte es el complejo Ag-Ac que se genera, logrando una alta intensidad en la señal de fluorescencia en el Ac que se va a detectar, el resultado se expresa de manera cualitativa positivo o negativo. Actualmente se distribuyen reactivos de anticuerpos monoclonales para la identificación de *Enterocytozoon bienuesi* y *Encephalitozoon intestinalis*. (Alonso et al., 2005)

Métodos inmunoenzimáticos

Se han elaborado ensayos inmunoenzimáticos para la detección de anticuerpos y antígenos en muestra sanguíneas basados en las técnicas de ELISA, IFI, contra inmoelectroforésis y Western Blot, para detectar *Enterocytozoon bienewisi* y *Encephalitozoon intestinalis*, pero hasta el momento no se han comercializado, por lo que no existen estudios certificados que demuestren la confiabilidad, sensibilidad y especificidad de estas pruebas diagnósticas.

Se han desarrollado métodos con anticuerpos monoclonales y policlonales para la identificación de *Microsporidios* a partir de muestras clínicas.

Métodos moleculares Se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa, (PCR) de manera rutinaria y específica para el diagnóstico de *Enterocytozoon bienewisi*, *Encephalitozoon intestinalis*, puede aplicarse sobre muestras de fluidos biológicos como heces, orina, aspirado duodenal y material de biopsia, generalmente solo se procesan en laboratorios de investigación. (Mena et al., 2021) (Forbes, 2009)(Bornay-Llinares et al., 2000)

Para ambos microorganismos se amplifica el ADN de las regiones SSU-ARNr (subunidad pequeña del ARN ribosómico) utilizando cebadores específicos para *Encephalitozoon intestinalis*, SINTF 5'TTTCGAGTGTAAAGGAGTCTGA3', cuya posición en la secuencia es de 362 a 382 y SINTR 5'CCGTCCTGCTTCTCCTGCCCG3', posición 861 a 881, que amplifican un producto de 520 pb; y para *Enterocytozoon bienewisi*, EBIEF1 5'GAAACTTGTCCTACTCCTTACG3', cuya posición en la secuencia es 295 a 315 y EBIEF1 5'CCATGCACCACTCCTGCCATT3', posición 881-901, que amplifican 607 pb. (Botero et al., 2004) (Mena et al., 2021)

Microscopía de transmisión electrónica (TEM) Actualmente, sigue siendo el patrón de oro para el diagnóstico de gastroenteritis ocasionado por especies de *Microsporidios*, se emplean electrones acelerados dando un gran poder de resolución de la imagen. Además, las muestras deben tener el grosor adecuado 50-90 nm (ultra micrómetro), de tal forma que los electrones puedan atravesarlos, una vez fijada la muestra con glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 1% en solución buffer fosfato con Ph 7.2 y 260 mOsm/l, se utilizan resinas de baja viscosidad como epóxica Polyhed 812 que proporcionan consistencia a la muestra, para obtener secciones finas y se evidencien las caracte-

terísticas estructurales del esporoplasma y organelas de *Microsporidios*.

Para estos procesos se requiere la tinción electrónica con acetato de uranio al 6% y citrato de plomo, para observaciones y fotografías se puede utilizar el microscopio electrónico de transmisión JOE-JEM 1010 o en HITACHI H-600. (Amano & Díaz, 2012)

Sin embargo, este sistema es costoso, toma tiempo y no es apropiado como diagnóstico de rutina está disponible en los laboratorios de investigación observándose las ultra estructuras internas que permiten diferenciar una especie de otra. (Mena et al., 2021)

CONCLUSIONES

Existen agentes etiológicos reclasificado como especies fúngicas que son patógenos para los seres humanos, dentro de este grupo están *Enterocytozoon bienewisi* y *Encephalitozoon intestinalis* que producen diarrea crónica y constituyen un factor de riesgo para los pacientes VIH-SIDA, trasplantados y cáncer.

Las tinciones para observar por microscopía óptica simple, ayudan para un diagnóstico rápido y oportuno, por lo tanto, es esencial que los técnicos dominen los procesos tintoriales y puedan diferenciar claramente las estructuras morfológicas de *Microsporidios* gastrointestinal.

Las técnicas de inmunofluorescencia con marcadores específicos con anticuerpos monoclonales para *Enterocytozoon bienewisi* y *Encephalitozoon intestinalis* son de gran utilidad para el diagnóstico de los dos microorganismos, Las pruebas de RT-PCR y Microscopía electrónica de transmisión (TEM), pero estas técnicas solo se utilizan en los laboratorios de alta complejidad dedicados a la investigación por el alto costo, por ese motivo no se pueden adquirir en los laboratorios de menor complejidad, sin embargo, estos métodos deben ser estandarizados en cada laboratorio de referencia.

Las Industrias farmacéuticas deben innovar la producción de medicamentos específicos para *Microsporidios*, siendo de vital importancia para la toma de decisiones de los médicos en el uso adecuado del tratamiento terapéutico contra estos microorganismos que afectan a los pacientes VIH-SIDA,

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acha, P., & Szyfres, B. (2001a). Bacteriosis y Micosis. *Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes Al Hombre y a Los Animales*, 580, 266–283.
- Acha, P., & Szyfres, B. (2001b). Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a Los Animales. Volumen I: Bacteriosis y Micosis. *Organización Panamericana de La Salud*, 1(580), 76–252. <https://doi.org/10.1590/S1135-57272001000300009>
- Acurero, E., Maldonado, A., Olmos, G., Rivero, Z., Bracho, A., Calchi, M., Avila, A., & Arraiz, N. (2015). *Intestinal Microsporidiosis Prevalence in Children With Severe Malnutrition at a Hospital in the City of Maracaibo*. Kasmera. https://www.researchgate.net/publication/313577157_Intestinal_Microsporidiosis_Prevalence_in_Children_With_Severe_Malnutrition_at_a_Hospital_in_the_City_of_Maracaibo
- Alonso, C., Bartolomé, R., Matas, L., Domingues, J., Mata, L., & Rabella, N. (2005). Técnicas rápidas de detección de antígeno. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Amano, Y., & Díaz, L. (2012). *Introducción a la Microscopía Electrónica, principios-aplicaciones* (2nd ed.). Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical.
- Bedoya, K., Montoya, M. N., Botero, J., & Galván, A. L. (2008). Primer aislamiento de *Encephalitozoon intestinalis* a partir de muestra de materia fecal de un paciente colombiano con sida [JOUR]. In *Biomédica* (Vol. 28, pp. 441–447). Scielo.
- Bigliardi, E., & Sacchi, L. (2001). Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and Infection*, 3(5), 373–379. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01393-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01393-4)
- Bornay-Llinares, F. J., Acosta, B., Peman, J., Moura, H., Schwartz, D. A., Da Silva, A. J., Visvesvara, G. S., Figueras, M. J., Gobernado, M., & Pieniazek, N. J. (2000). Mantenimiento en cultivo y caracterización de un microsporidio (*Encephalitozoon hellem*) aislado en un paciente con Sida y neumonía. *Parasitología Al Día*, 24(3–4), 69–70. <https://doi.org/10.4067/S0716-07202000000300001>
- Botero-Garcés, J., & Montoya-Palacio, M. N. (2002). Microsporidiosis intestinal: una visión integral. *Infectio*, 6(4), 213–225.
- Botero, J. H., Montoya, M. N., Vanegas, A. L., Díaz, A., Navarro-i-Martínez, L., Bornay, F. J., Izquierdo, F., del Aguila, C., & Agudelo, S. del P. (2004). Frequency of intestinal microsporidian infections in HIV-positive patients, as diagnosis by quick hot Gram chromotrope staining and PCR. *Biomédica*, 24(4), 375–384. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.V24I4.1287>
- CDC. (2019). *Microsporidiosis- Identificación de laboratorio de parásitos de interés para la salud pública*. Centros Para El Control y La Prevención de Enfermedades. <https://www.cdc.gov/dpdx/microsporidiosis/index.html>
- Chacin-Bonilla, L., Panunzio, A. P., Monsalve-Castillo, F. M., Parra-Cepeda, I. E., & Martinez, R. (2006). Microsporidiosis in Venezuela: prevalence of intestinal microsporidiosis and its contribution to diarrhea in a group of human immunodeficiency virus-infected patients from Zulia State. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(3), 482–486. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16525110>
- Chinchilla, M., Lilliana, R., Olga, G., Alfredo, C., Lilliana, G., Marta, O., & Castro C, A. (1998). Microsporidiosis: una parasitosis de reciente adaptación al hombre. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 19(3–4), 209–221. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29481998000300010#3
- Contreras, K. (2006). Investigación de la presencia de Microsporidios en heces de niños desnutridos en Guatemala utilizando tres métodos diagnósticos de tinción. In *Tesis*.
- Cuenca, M., Gadea, I., Martín, E., Pemán, J., Pontón, J., & Rodríguez, J. (2006). Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. http://coesant-seimc.org/documents/Sensibilidad_Antifungicos.pdf
- Da Silva, A. J., Slemenda, S. B., Visvesvara, G. S., Schwartz, D. A., Mel Wilcox, C., Wallace, S., & Pieniazek, N. J. (1997). Detection of *Septata intestinalis* (microsporidia) cali et al. 1993 using polymerase Chain reaction primers targeting the small subunit ribosomal RNA coding region. *Molecular Diagnosis*, 2(1), 47–52. [https://doi.org/10.1016/S1084-8592\(97\)80010-0](https://doi.org/10.1016/S1084-8592(97)80010-0)
- De Moura, M. L. C., Alvares-Saraiva, A. M., Pérez, E. C., Xavier, J. G., Spadacci-Morena, D. D., Moysés, C. R. S., Rocha, P. R. D., & Lallo, M.

- A. (2019). Cyclophosphamide treatment mimics sub-lethal infections with encephalitozoon intestinalis in immunocompromised individuals. *Frontiers in Microbiology*, 10(SEP), 2205. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02205/BIBTEX>
- Decraene, V., Lebbad, M., Botero-Kleiven, S., Gustavsson, A. M., & Löfdahl, M. (2012). First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, October 2009. *Epidemiology and Infection*, 140(3), 519–527. <https://doi.org/10.1017/S095026881100077X>
- Delbac, F., & Polonais, V. (2008). The microsporidian polar tube and its role in invasion. *Sub-Cellular Biochemistry*, 47, 208–220. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_17
- Desportes, I., Charpentier, Y. Le, Galian, A., Bernard, F., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A., Ravisse, P., & Modigliani, R. (1985). Occurrence of a New Microsporidan: Enterocytozoon bienewsi ng, n. sp., in the Enterocytes of a Human Patient with AIDS. *The Journal of Protozoology*, 32(2), 250–254. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1985.tb03046.x>
- Didier, E. S., & Weiss, L. M. (2006). Microsporidiosis: current status. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19(5), 485–492. <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000244055.46382.23>
- Didier, P. J., Phillips, J. N., Kuebler, D. J., Nasr, M., Brindley, P. J., Stovall, M. E., Bowers, L. C., & Didier, E. S. (2006). Antimicrosporidial activities of fumagillin, TNP-470, ovalicin, and ovalicin derivatives in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(6), 2146–2155. <https://doi.org/10.1128/AAC.00020-06>
- Fernández, N., Combol, A., Zanetta, E., Acuña, A. M., & Gezeule, E. (2002). Primer diagnóstico de microsporidiosis humana en Uruguay. *Rev Med Uruguay*, 18(3), 251–255.
- Fernández Vadillo, C. (2014). Desarrollo de anticuerpos monoclonales frente a Nosema ceranae como aportación al diagnóstico del síndrome de despoblamiento. *Universidad Complutense De Madrid*, 225.
- Fiuzza, V. R. da S., Lopes, C. W. G., Cosendey, R. I. J., de Oliveira, F. C. R., Fayer, R., & Santín, M. (2016). Zoonotic Enterocytozoon bienewsi genotypes found in Brazilian sheep. *Research in Veterinary Science*, 107, 196–201. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2016.06.006>
- Forbes, B. A. (2009). Diagnóstico Microbiológico. In Panamericana (Ed.), *Panamericana* (12va ed.). Panamericana.
- Franzen, C. (2008). Microsporidia: A Review of 150 Years of Research. *The Open Parasitology Journal*, 2(1), 1–34. <https://doi.org/10.2174/1874421400802010001>
- Franzen, Caspar. (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>
- Fresnadillo, M., García, E., & García, J. (2010). *Introducción a la protozoología clínica II (Filos Apicomplexa y Microsporidia)*. <http://hdl.handle.net/10366/83398>
- Galván, A. L., Sánchez, A. M. M., Valentín, M. A. P., Henriques-Gil, N., Izquierdo, F., Fenoy, S., & Del Aguila, C. (2011). First cases of microsporidiosis in transplant recipients in Spain and review of the literature. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4), 1301–1306. <https://doi.org/10.1128/JCM.01833-10>
- Ghoshal, U., Khanduja, S., Pant, P., & Ghoshal, U. C. (2016). Evaluation of Immunofluorescence antibody assay for the detection of Enterocytozoon bienewsi and Encephalitozoon intestinalis. *Parasitology Research*, 115(10), 3709–3713. <https://doi.org/10.1007/S00436-016-5130-2>
- Gil, M. (2019). *Tinción de Kinyoun: fundamento y técnicas*. Lifeder. <https://www.lifeder.com/tincion-de-kinyoun/>
- Gómez Puerta, L. A. (2013). Caracterización molecular de genotipos de Enterocytozoon bienewsi y ensamblajes de Giardia duodenalis aislados de heces de cías de alpaca (Vicugna pacos). *Tesis UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS*, 120.
- Gool, T. Van, Canning, E. U., Gilis, H., Weerman, M. A. V. D. B., Schattenkerk, J. K. M. E., & Dankert, J. (1994). Septata intestinalis frequently isolated from stool of AIDS patients with a new cultivation method. *Parasitology*, 109(3), 281–289. <https://doi.org/10.1017/S0031182000078318>
- Halánová, M., Valenčáková, A., Jarčuška, P., Halán, M., Danišová, O., Babinská, I., Dedinská, K., & Čisláková, L. (2019). Screening of opportunistic encephalitozoon intestinalis and enterocytozoon bienewsi in immunocompromised patients in Slovakia. *Central European Journal of Public Health*, 27(4), 330–334. <https://doi.org/10.21101/cejph.a5407>
- Han, B., Pan, G., & Weiss, L. M. (2021). Microsporidiosis in Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00010-20>

- Han, B., Takvorian, P. M., & Weiss, L. M. (2020). Invasion of Host Cells by Microsporidia. *Frontiers in Microbiology*, 11, 172. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00172/BIBTEX>
- Han, B., & Weiss, L. M. (2017). Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens within the Fungal Kingdom. *Microbiology Spectrum*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.FUNK-0018-2016>
- Koltai, T., & Researcher, I. (2011). Manual de Biología Molecular: Técnicas de Laboratorio. In *ResearchGate* (Issue May).
- Kotler, D., & Orenstein, J. (1999). Clinical syndromes associated with microsporidiosis. In American & Society of Microbiology (Eds.), *American Society of Microbiology* (pp. 258–292). The Microsporidia and Microsporidiosis. https://socgenmicrobiol.org.uk/pubs/micro_today/book_reviews/MTNOV99/MTN99_07.cfm
- Kotler, D. P., & Orenstein, J. M. (1998). Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Advances in Parasitology*, 40, 321–349. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60126-8](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60126-8)
- Kwon, J. Y., Seo, J. Y., Kim, T. Y., Lee, H. II, & Ju, J. W. (2021). First Identification and Genotyping of Enterocytozoon bienewisi and Prevalence of Encephalitozoon intestinalis in Patients with Acute Diarrhea in the Republic of Korea. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10111424>
- Lobos, J., Parrilla, A., Guerra, G., Larios, P., & Bustos, M. (2005). Capacidad para el diagnóstico microscópico de "Criptosporidium parvum, Cyclospora cayetanensis, Blastocystis hominis, Isospora belli, Encephalocytozoon intestinales y Enterocytozoon bienewisi". *Tesis*. <https://biblioteca.medicina.usac.edu.gt/tesis/pre/2005/025.pdf>
- Lores, B., López-Miragaya, I., Arias, C., Fenoy, S., Torres, J., & Del Aguila, C. (2002). Intestinal microsporidiosis due to Enterocytozoon bienewisi in elderly human immunodeficiency virus--negative patients from Vigo, Spain. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34(7), 918–921. <https://doi.org/10.1086/339205>
- Ivarado G., J., González Z., A., Gillman, R., & López U., T. (2009). Infección experimental de cerdos de un mes de edad con esporas de Enterocytozoon bienewisi. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 291–296. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172009000200021
- Madrid, V., Fernandez, I., & Torrejon, E. (2012). Manual de parasitología Humana. In *Universidad de Concepción: Vol. 1*.
- Marchant, C. (2006). "Pesquisa de la presencia de Encephalitozoon cuniculi en conejos." *Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias Escuela de Ciencias Veterinarias*.
- Matos, O., Lobo, M. L., & Xiao, L. (2012). Epidemiology of Enterocytozoon bienewisi Infection in Humans. *Journal of Parasitology Research*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/981424>
- Mena, C. J., Barnes, A., Castro, G., Guasconi, L., Burstein, V. L., Beccacece, I., Paulin, P. C., Arneodo, J., Carnevale, S., Astudillo, G., Cervi, L., Theumer, M. G., & Chiapello, L. S. (2021). Microscopic and PCR-based detection of microsporidia spores in human stool samples. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(2), 124–128. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2020.04.005>
- Ministerio_de_Salud_Argentina. (2001). *Guía de Prevención, Procedimiento, Diagnóstico y Tratamiento de Parasitosis, incorporándola al Programa Nacional de Garantía de Calidad de la Atención Médica*. <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resolución-898-2001-68931/texto>
- Moncada, L., & Pérez, G. R. De. (1998). *Microsporidios en humanos*. 18(3), 199–215.
- Moniot, M., Poirier, P., & Nourrisson, C. (2021). Etymologia: Enterocytozoon bienewisi. *Emerging Infectious Diseases*, 27(6), 1587. <https://doi.org/10.3201/EID2706.ET2706>
- Morán, F., & Ochoa, T. J. (2017). *PREVENTION, DIAGNOSIS, AND TREATMENT OF PEDIATRIC INFECTIONS DURING NATURAL DISASTERS*. 34(4), 723–753. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.344.2810>
- MSP. (2012). Protocolos Terapéuticos. *Ministerio de Salud Pública*, 1–370. <https://eliochoa.files.wordpress.com/2014/05/guias-msp-protocolo-manejo.pdf>
- Murray, P. R., S., R. K., & Pfaller, M. A. (2021). *Microbiología Médica* (Elsevier (ed.); 9na ed.). Elsevier.
- Neil A., Campbell J., R. B. (2017). *Biología* (Panamericana (ed.); 7ma ed.).
- Nétor Velásquez, J., Marta, E., Alicia di Risio, C., Etchart, C., Gancedo, E., Victor Chertcoff, A., Bruno

- Malandrini, J., Germán Astudillo, O., & Carnevale, S. (2012). Molecular identification of protozoa causing AIDS-associated cholangiopathy in Buenos Aires, Argentina. *Acta Gastroenterologica Latinoamericana*, 42(4), 301–308. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23383524/>
- Noda, A., Cañarte, R., & Pérez, K. (2013). Revista médica electrónica. In *Revista Médica Electrónica* (Vol. 35, Issue 2). Centro Provincial de Información de Ciencias Médicas de Matanzas. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242013000200008
- Noda Albelo, A. L., Cañete, R., & Brito Pérez, K. (2013). Microsporidiosis gastrointestinal: una actualización. *Revista Médica Electrónica*, 35(2), 167–181.
- Ojuromi, O. T., Izquierdo, F., Fenoy, S., Fagbenro-Beyioku, A., Oyibo, W., Akanmu, A., Odunukwe, N., Henriques-Gil, N., & Del Aguila, C. (2012). Identification and Characterization of Microsporidia from Fecal Samples of HIV-Positive Patients from Lagos, Nigeria. *Plos One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035239>
- OMS/OPS. (2000). Pautas para la prevención de infecciones oportunistas en personas con VIH o sida en América Latina y el Caribe. *OMS/OPS*.
- OPS/OMS. (2003). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre ya los animales. *OPS*, III(580), 53–72.
- OPS/OMS. (2022). *TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS*. MANUAL OPS. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51695/9789275321133_spa.pdf?sequence=9
- Pazmiño, B., Rodas, E., Rodas, J., Zambrano, R., Davila, A., Matini, L., Pazmiño, C., & Díaz, L. (2014). Microsporidium spp. En Pacientes VIH Positivos con Síndrome Diarreico Atendidos en el Hospital de Infectología “Dr. José Daniel Rodríguez” de Guayaquil, Abril – Junio, 2013. *Revista Universidad de Giayaquil*, 17. http://www.ug.edu.ec/revistas/Revista_Ciencias_Medicas/REVISTA_N2_VOL17/Revista_2-201_Original_2.pdf
- Pearson, R. D. (2020). *Generalidades sobre las infecciones por protozoos intestinales y microsporidios - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales*. Manual MSD. <https://www.msmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infecciosas/protozoos-intestinales-y-microsporidios/generalidades-sobre-las-infecciones-por-protozoos-intestinales-y-microsporidios>
- Romero Cabello, R. (2018). *Microbiología y Parasitología Humana* (Panamericana (ed.); 4th ed.).
- Salát, J., & Braunfuchsová, P. (2002). Encephalitozoon cuniculi and Encephalitozoon intestinalis--causes of opportunistic infections. *Epidemiologie Mikrobiologie Immunologie Casopis Spolecnosti pro Epidemiologii a Mikrobiologii Ceske Lekarske Spolecnosti JE Purkyne*.
- Santín, M., Calero-Bernal, R., Carmena, D., Mateo, M., Balseiro, A., Barral, M., Lima Barbero, J. F., & Habela, M. Á. (2018). Molecular Characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in Wild Carnivores in Spain. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 65(4), 468–474. <https://doi.org/10.1111/jeu.12492>
- Shadduck, J. A., & Orenstein, J. M. (1993). Comparative pathology of microsporidiosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 117(12), 1215–1219. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8250691/>
- Snowden, K. F., Didier, E. S., Orenstein, J. M., & Shadduck, J. A. (1998). Animal models of human microsporidial infections. *Laboratory Animal Science*, 48(6), 589–592. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10090081/>
- Stentiford, G. D., Becnel, J. J., Weiss, L. M., Keeling, P. J., Didier, E. S., Williams, B. A. P., Bjornson, S., Kent, M. L., Freeman, M. A., Brown, M. J. F., Troemel, E. R., Roesel, K., Sokolova, Y., Snowden, K. F., & Solter, L. (2016). Microsporidia – Emergent Pathogens in the Global Food Chain. *Trends in Parasitology*, 32(4), 336. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2015.12.004>
- Van Gool, Tom, Vetter, J. C. M., Weinmayr, B., Van Dam, A., Derouin, F., & Dankert, J. (1997). High seroprevalence of Encephalitozoon species in immunocompetent subjects. *The Journal of Infectious Diseases*, 175(4), 1020–1024. <https://doi.org/10.1086/513963>
- Vasquez, O., Jimenez, R., Martinez, I., Ruiz, A., & Garcia, Y. (1997). Frecuencia de Cryptosporidium, Cyclospora y Enterocytozoon en pacientes pediátricos con diarrea. In *Patología Clínica de Mexico*. <https://books.google.com.ec/books?id=MMER1D9JVLIC&pg=PP35&lpg=PP35&dq=estadistica+mundial+de+enterocytozoon+bieneusi&source=bl&ots=tM3PhJ4NyY&sig=ACfU3U1GGD4ZCP2sVvUZ2O1OuvQFfvX-7BQ&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjCgKP5qK-T2AhVwRzABHekUBZUQ6AF6BAhCEAM#v=onepage&q=es>
- Velásquez, J. N., Carnevale, S., Guarnera, E. A., Labbé, J. H., Chertcoff, A., Cabrera, M. G., & Rodríguez, M. I. (1996). Detection of the microspo-

- ridian parasite *Enterocytozoon bieneusi* in specimens from patients with AIDS by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Velez, H. (2005). *Fundamentos de Medicina Manual del VIH/SIDA y otras Infecciones de Transmision Sexual | Ediciones Técnicas Paraguayas*. <https://www.etp.com.py/libro/fundamentos-de-medicina-manual-del-vihsida-y-otras-infecciones-de-transmision-sexual-64794.html>
- Vergneau-Grosset, C., & Larrat, S. (2015). Microsporidiosis in Vertebrate Companion Exotic Animals. *Journal of Fungi 2016, Vol. 2, Page 3*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.3390/JOF2010003>
- Vesga, O., Vélez, L., Leiderman, E., & Restrepo, Á. (2015). Enfermedades infecciosas de Homo sapiens. *Kasmera*.
- Vila, J., Álvarez-Martínez, M. J., Buesa, J., & Castillo, J. (2009). Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 27(7), 406. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2008.11.009>
- Weber, R., Bryan, R. T., Schwartz, D. A., & Owen, R. L. (1994). Human microsporidial infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4), 426–461. <https://doi.org/10.1128/CMR.7.4.426>
- Weiss, L. M., & Becnel, J. J. (2014). *Microsporidia : pathogens of opportunity*.
- Winn, Allen, Janda, Koneman, & Procop. (2008). *Diagnóstico microbiológico* (Panamericana (ed.)).
- Staphylococcus aureus* (MRSA) from Japanese children's oral cavities. *Pediatric Dent J*; 17(2):127-130.
- Vieira A, Hiller N, Powell E, Hak-Jin L, Spirk T, Modesto A, Kreft R. (2019). Profiling microorganisms in whole saliva of children with and without dental caries. *Clin Exp Dent Res*;1-9.
- Waleed AA. (2019). Detection of the Pantone-Valentine Leukocidin Gene in Swedish Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* using a Multiplex PCR Assay. *Journal of Bacteriology and Parasitology. J Bacteriol Parasitol*; 153(3): 215-8.
- Wang Y, Liu S, Li B, Jiang Y, Zhou X, Chen J, Li M, Ren B, Peng X, Zhou X, Cheng L. (2019). *Staphylococcus aureus* induces COX-2-dependent proliferation and malignant transformation in oral keratinocytes. *J Oral Microbiol*; 11:1-12.