

Primer diagnóstico de microsporidiosis humana en Uruguay

Dra. Nora Fernández¹, Lic. Ana Combo², Dres. Elena Zanetta³, Ana María Acuña³, Elbio Gezuele³

Resumen

Los microsporidios son protozoarios conocidos desde hace mucho tiempo como causantes de plagas en invertebrados y vertebrados. En la década de 1980 se les reconoce como agentes etiológicos de diarrea en VIH-sida y posteriormente en trasplantados renales así como en personas inmunocompetentes (diarrea del viajero).

El objetivo de este trabajo es comunicar el primer hallazgo de estos agentes en un paciente VIH-sida y contribuir al conocimiento de las características patogénicas y diagnósticas más importantes de los microsporidios.

En 1998 en el Departamento de Parasitología se implementaron las técnicas de coloración para microsporidios, gram-cromotrope y tricrómica.

El primer hallazgo se observó en un paciente VIH-sida, con diarrea de nueve meses de evolución; no se realizó tratamiento específico ya que concomitantemente presentaba una meningoencefalitis criptocócica, la que precipitó su fallecimiento.

El reconocimiento de estos agentes oportunistas como causa de diarrea en Uruguay, contribuye al diagnóstico etiológico de la diarrea crónica en pacientes VIH-sida.

En adelante, las coloraciones específicas de microsporidios deberían ser incluidas en el algoritmo diagnóstico para enteroparasitosis en grupos de riesgo.

Palabras clave: *MICROSPORIDIOSIS - epidemiología.*

MICROSPORIDIOSIS - diagnóstico.

DIARREA - parasitología.

DIARREA - diagnóstico.

SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA - parasitología.

SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA - complicaciones.

Introducción

Los microsporidios son microorganismos eucariotas, parásitos intracelulares obligatorios de diversas especies animales. Fueron descritos en 1857 por Näegeli, quien reconoció por primera vez a *Nosema bombycis* como el agente causal de la "enfermedad del gusano de seda"⁽¹⁾.

El término microsporidio es una designación común, no taxonómica, que se utiliza para nombrar a los microorganismos pertenecientes al *Phylum Microspora*, caracterizados por la producción de esporas pequeñas y carencia de mitocondrias, lo que les diferencia de otros protozoarios y por esta razón no deben confundirse con coccidios como *Cryptosporidium sp*⁽²⁾.

Sección Enteroparasitosis. Departamento de Parasitología y Micología. Instituto de Higiene. Facultad de Medicina.

1. Ex Asistente del Departamento de Parasitología y Micología. Asistente del Departamento de Laboratorio Clínico. Unidad docente del Centro Hospitalario Pereira Rossell. Área de Parasitología y Micología.

2. Licenciada en Laboratorio Clínico.

3. Prof. Agdo. del Departamento de Parasitología y Micología. Instituto de Higiene. Facultad de Medicina.

Correspondencia: Dra. Nora Fernández

Instituto de Higiene. Departamento de Parasitología y Micología
Avda. Alfredo Navarro 3051 CP 11600. Montevideo-Uruguay

E-mail: dbilello@adinet.com.uy

Presentado: 7/6/02.

Aceptado: 1/11/02.

Su posición taxonómica es uno de los campos de investigación apasionante para los protozoólogos; en los últimos años el análisis de los genes del ARNr y de genes EF 1 α , demuestran que existe una relación filogenética con el reino Fungi⁽³⁻⁵⁾.

Históricamente, estos organismos han causado graves problemas económicos en la industria textil (sedas), apícola y en la industria pesquera. También dificultades en la interpretación de resultados experimentales, causando enfermedad intercurrente a animales de laboratorio^(6,7).

Se han comunicado infecciones humanas por microsporidios en todo el mundo, tanto en inmunodeprimidos como en inmunocompetentes⁽⁸⁻¹⁰⁾.

El primer diagnóstico de microsporidiosis humana sin identificación específica se efectuó en 1959⁽¹¹⁾. Posteriormente se describen casos muy esporádicos, hasta que con la pandemia del VIH los microsporidios cobran importancia como patógenos oportunistas. Esta población no es la única que puede padecer alguna de las formas clínicas de microsporidiosis, también se ha descrito en trasplantados renales y en los inmunocompetentes es una de las causantes de diarrea del viajero⁽¹²⁻¹⁹⁾.

Enterocytozoon bienewisi fue la primera especie identificada en VIH-sida con diarrea en 1985; desde entonces es el más prevalente⁽²⁰⁾. Posteriormente se reconoce a *Septata intestinalis*, actualmente clasificado en el género *Encephalitozoon*, también como causa de diarrea y formas diseminadas⁽²¹⁻²³⁾.

Otros géneros que pueden provocar enfermedad en el hombre son: *Vittaforma*, *Nosema*, *Brachiola*, *Trachipleistophora*, *Microsporidium* y *Pleistophora* produciendo diversas afecciones⁽²⁴⁾.

Las formas de resistencia y transmisión son las esporas. Las que se observan en el hombre miden entre 1 μm - 2 μm . Presentan una pared externa conformada por dos láminas, una de ellas compuesta por quitina, la que protege al esporoplasma (forma infectante) de las condiciones adversas del medio^(1,5).

Rodeándolo se halla el filamento polar, que dependiendo de la especie podrá presentar de 4 a 30 espirales⁽²⁾.

Las manifestaciones clínicas dependen de la especie, tipo de infección, edad y estado del sistema inmune del huésped⁽²⁴⁾.

Con relación a los mecanismos de transmisión así como las fuentes infectantes para el hombre y otras especies animales, se han planteado la transmisión fecal oral, los traumatismos con restos vegetales y la inhalación de esporas⁽²⁵⁻²⁸⁾.

La afección del intestino delgado es la más frecuente; causa diarrea de evolución variable, anorexia, pérdida de peso y dolor abdominal. En el VIH-sida puede manifestarse cuando el recuento de los linfocitos CD₄ es inferior a 100/mm³⁽²⁹⁾.

El diagnóstico de microsporidiosis está basado en la demostración microscópica de esporas en los tejidos infectados, heces o fluidos corporales, mediante diferentes técnicas tintoriales⁽³⁰⁻³³⁾.

Las coloraciones más utilizadas y confiables son la tricrómica modificada y gram-cromotrope⁽³⁴⁻³⁶⁾.

Para establecer una identificación definitiva se ha utilizado la microscopía electrónica y recientemente el Western Blot y reacción de la polimerasa en cadena (PCR)⁽³⁷⁻⁴³⁾.

Con relación a la evolución clínica, los casos asociados a *E. intestinalis* muestran una rápida mejoría y cura parasitológica luego del tratamiento con albendazol, a las dosis de 400-800 mg/día durante dos semanas; en tanto las infecciones provocadas por *E. bienewisi* son refractarias a este tratamiento; en algunos casos se ha observado aumento de peso pero persistencia de eliminación de esporas por las heces⁽⁴⁴⁾.

En nuestro país el primer diagnóstico de microsporidiosis fue realizado en setiembre de 1999⁽⁴⁵⁾.

El objetivo de este trabajo es brindar detalles de este primer hallazgo y dar a conocer los aspectos biológicos, epidemiológicos, clínicos y diagnósticos más relevantes de esta parasitosis emergente.

Material y método

En abril de 1998 se comenzaron a implementar las técnicas de coloración para esporas de microsporidios, gram-cromotrope y tricrómica modificada en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina.

A 20 muestras de heces pertenecientes a pacientes VIH-sida con diarrea crónica, se les realizó examen coproparasitario con coloración de Kinyoun para coccidios.

A las mismas muestras se les realizó una dilución 1/3 en formol al 10% y posteriormente se realizaron cuatro frotis finos por cada muestra con 2 μl de dicha dilución. De cada dilución de heces se guardó una alícuota a -20°C.

Luego se procedió a fijar los frotis con alcohol metílico y posteriormente se colorearon con las tinciones de gram-cromotrope y tricrómica modificada, en baño a 56°C.

Como testigos se usaron dos frotis de cultivo celular de *Enterocytozoon bienewisi*, cedidos por Fernando Bornay-Llinares, investigador del Departamento de Microbiología de la Universidad de Alicante, España.

Las láminas fueron examinadas con un microscopio óptico Nikon E 400, con ocular de 10x y objetivo de 100x.

Resultados

Luego de examinar 20 muestras de heces de pacientes VIH-sida con diarrea crónica, en tres de ellas pertenecientes a un paciente de 28 años de sexo masculino, estadio sida, con diarrea de nueve meses de evolución, se obser-

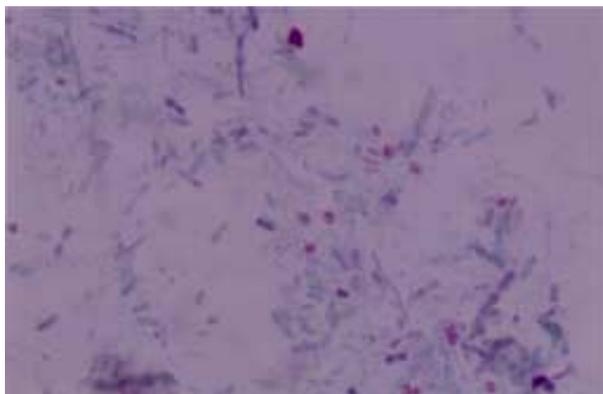


Figura 1. Esporas de microsporidios. Tinción de gram-cromotrope. Microscopio óptico con 1.000 aumentos

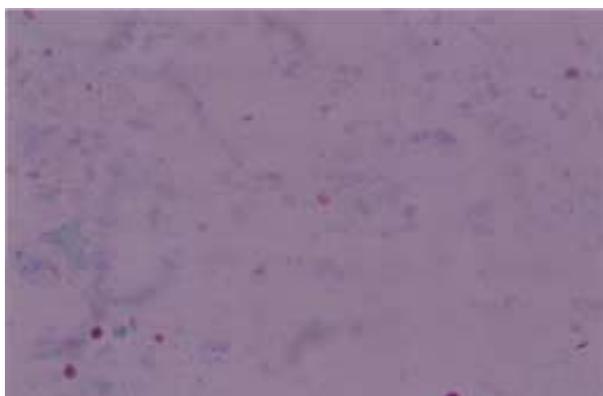


Figura 2. Esporas de microsporidios. Tinción tricrómica modificada. Microscopio óptico con 1.000 aumentos

varon con la coloración de gram-cromotrope, estructuras ovaladas de 1,5 μm - 2 μm de diámetro, de pared nítida, citoplasma de coloración inhomogénea rosa-morado, más intenso en uno de los polos (figura 1).

Con la tinción tricrómica modificada también se observaron los mismos elementos, en número de 4 - 8 por campo de 1.000 aumentos, ovalados de 1,5 μm - 2 μm de diámetro, con pared bien delimitada, citoplasma de coloración inhomogénea rosa-morado, más intenso en uno de los polos, esta zona de citoplasma está bien delimitada en el ecuador, dando el aspecto de un cinturón (figura 2).

Por las características morfológicas y tintoriales pudimos establecer que las estructuras que observamos en ambas coloraciones eran esporas de microsporidios.

A pesar de que contamos con láminas de control, decidimos enviar una alícuota de heces y tres frotis coloreados al Center for Diseases Control and Prevention (CDC), donde fue confirmado nuestro hallazgo por el doctor Henry Bishop. Si bien no se pudo realizar PCR, dado que no contábamos con heces sin formol (requisito para realizar técnicas de biología molecular como la PCR), el doctor Bishop nos comunicó que por las características morfológicas probablemente se tratara de esporas de *Enterocytozoon bieneusi*.

El paciente no pudo recibir tratamiento específico para la microsporidiosis ya que concomitantemente presentaba una meningoencefalitis criptocócica, la que precipitó su fallecimiento.

Discusión

Los microsporidios son reconocidos actualmente como microorganismos oportunistas, habiéndose reportado numerosos casos en pacientes VIH-sida en todo el mundo, así como también en individuos inmunocompetentes⁽¹⁰⁾.

De los múltiples cuadros clínicos que son capaces de ocasionar, la diarrea crónica, por *E. bieneusi* o *E. intestinalis*, es la más frecuente^(21,24).

Aunque esta parasitosis ocurre cuando el nivel de linfocitos CD₄ es inferior a 100 mm^3 , en este paciente se careció de este estudio; de todas formas el hecho de presentar una enfermedad como la criptococosis encefálica manifiesta su estado de etapa sida.

Las tinciones utilizadas para detectar esporas de microsporidios (Gram-cromotrope y tricrómica modificada) son las de elección para la pesquisa de estos microorganismos, permiten diferenciarlos de otros agentes como las bacterias, las que se encuentran en gran cantidad en heces y otros materiales donde exista una infección bacteriana asociada. Ambas técnicas son de bajo costo, se efectúan en corto tiempo (15 minutos), no requieren de una infraestructura compleja, son sencillas de realizar, pero difíciles de interpretar ya que exigen un adiestramiento en su visualización microscópica.

Posteriormente a este hallazgo, en el Departamento de Parasitología se han diagnosticado nuevos casos de microsporidiosis en pacientes VIH-sida con diarrea crónica, sin otra causa aparente de diarrea⁽⁴⁶⁾. Estos nuevos casos confirman el carácter de emergente de esta parasitosis en nuestro país.

En la Sección de Enteroparásitos contamos con láminas de referencia para ser utilizadas como controles positivos de microsporidios, en el análisis de muestras de materias fecales u otros fluidos biológicos en los cuales se sospeche la presencia de microsporidios.

El diagnóstico de esta parasitosis puede realizarse en todo laboratorio de parasitología que cuente con un parasitólogo entrenado en la visualización microscópica de microsporidios; de no ser así deberían derivarse las muestras a un centro de referencia, en nuestro país el Departamento de Parasitología en el Instituto de Higiene.

Conclusiones

Este nuevo agente de diarrea encontrado en nuestro país contribuye a establecer una nueva etiología de diarrea crónica en grupos de riesgo como los pacientes VIH-SIDA. Creemos que en adelante las coloraciones específicas de

microsporidios deberían extenderse a otros grupos poblacionales, como: casos de diarrea en personas que viajan al exterior (regiones tropicales) y niños con diarrea crónica, con el propósito de establecer cuál es la incidencia de esta parasitosis.

En un futuro, con la implementación de técnicas más sensibles como la PCR, no sólo se podrá diagnosticar el género y la especie de microsporidio implicada, sino también detectar un mayor número de casos. Por el momento sólo podemos establecer que estamos frente a una microsporidiosis, correlacionarlo con la clínica e instaurar el tratamiento con albendazol a las dosis recomendadas en los casos que así lo requieran.

Agradecimientos

Al Dr. Fernando Bornay-Llinanes del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina-Universidad de Alicante, España, por instruir al primer autor en las técnicas de tinción y en el reconocimiento microscópico.

Al Dr. Henry Bishop del Center for Diseases Control and Prevention, por confirmar el diagnóstico.

A la Dra. Raquel Ballesté, por la corrección de este trabajo que fuera presentado como monografía de posgrado de Laboratorio Clínico.

Summary

Microsporidia are protozoan parasites found in vertebrates and invertebrates. In the 80's they were recognized as a cause of diarrhea in HIV-AIDS patients and lately in patients with renal transplantation and immunocompetent patients (traveler's diarrhea).

The objective of this paper is to communicate the first founding of this agent in a patient with HIV-AIDS and to contribute to determine the most important pathogenic and diagnostic characteristics of microsporidia.

In 1998 the Parasitology Department implemented colouring techniques for microsporidia, gram-chromotrope and trichrome.

The first founding was observed in a HIV-AIDS patient with a 9 month-course of diarrhea; specific treatment was not performed since the patient carried a concomitant cryptococcal meningoencephalitis, that provoked his death.

Recognition of these oportunist agents as a cause of diarrhea in Uruguay contribute to determine the aetiologic diagnosis of chronic diarrhea in patients with HIV-AIDS.

Specific colouring techniques should be incorporated in diagnosis algorithm for enteroparasitosis in risk groups.

Résumé

Les microsporidiens ce sont des protozoaires connus depuis longtemps en tant que responsables de certains fléaux chez les vertébrés et les invertébrés. Aux années 80, on les reconnaît comme agents étiologiques de diarrhée

en VIH-sida et quelque temps après, chez des greffés rénaux ainsi que chez des personnes immunocompétentes (diarrhée du voyageur).

Le but de ce travail est de communiquer la première trouvaille de ces agents chez un patient VIH-sida ainsi que de contribuer à la connaissance des caractéristiques pathogéniques et diagnostiques les plus importantes de ces protozoaires.

En 1998, au Département de Parasitologie, on a utilisé les techniques de coloration pour microsporidiens, gram-chromotrope et trichomona.

La première observation a été faite chez un patient VIH-sida, avec diarrhée de neuf mois d'évolution; aucun traitement spécifique n'a été fait puisqu'il présentait une méningo-encéphalite cryptococcose qui a accéléré sa mort.

Le repérage de ces agents opportunistes responsables de diarrhée en Uruguay, contribue au diagnostic étiologique de la diarrhée chronique chez des patients VIH-sida.

Désormais, les colorations spécifiques de microsporidiens devraient être incluses parmi les techniques diagnostiques pour entéro-parasitoses dans des groupes de risque.

Bibliografía

1. **Martínez R.** Microsporidios: protistas parásitos, nuevos patógenos humanos. Publicación académica. Madrid: Real Academia de Farmacia-Instituto de España, 1994: 1-19.
2. **Atias A.** Microsporidiosis. In: Parasitología Médica. 3ª ed, Santiago de Chile: Mediterráneo, 1991: 291-5.
3. **Weiss LM, Edlind TD, Vossbrink CR, Hashimoto T.** Microsporidian molecular phylogeny: the fungal connection. J Eukaryot Microbiol 1999; 46(5): 17S-8S.
4. **Mathis A.** Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. Int J Parasitol 2000; 30(7): 795-804.
5. **Weiss LM.** Microsporidia: emerging pathogenic protists. Acta Trop 2001; 78(2): 89-102.
6. **Gannon J.** A survey of *Encephalitozoon cuniculi* in laboratory animals colonies in the United Kingdom. Lab Anim 1980; 14(2): 91-4.
7. **Cox JC.** Altered immune responsiveness associated *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. Infect Immun 1977; 15(2): 392-5.
8. **Escobedo AA, Núñez FA.** Prevalence of intestinal parasites in Cuban acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients. Acta Trop 1999; 72(1): 125-30.
9. **Chinchilla M, Reyes L, Guerrero OM, Frajan M, Morales MT.** *Enterocytozoon bienersi* (orden *microsporidia*, familia *enterocytozoonidae*) in Costa Rica: report of the first human case in Central America. Parasitol Día 1997; 21(3/4): 119-22.
10. **Weber R, Schwartz DA, Bryan RT.** Microsporidia. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolan R. Principles and practice of infectious diseases. 5ª ed. New York: 2000 (versión electrónica).
11. **Matsubayashi H, Koike T, Mikata M, Hagiwara S.** A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. Arch Pathol 1959; 67: 181-7.
12. **Pol S, Romana CA, Richard S, Amouyal P, Desportes-Livage I, Carnot F, et al.** Microsporidia infection in patients with the human immunodeficiency virus and unexplained cholangitis. N Engl J Med 1993; 328(2): 95-9.
13. **Metge S, Van Nhieu JT, Dahmane D, Grimbert P, Foulet F, Sarfati C, et al.** A case of *Enterocytozoon bienersi* infection in an HIV-negative renal transplant recipient. Eur J Clin

- Microbiol Infect Dis 2000; 19(3): 221-3.
14. **Wanke CA, DeGirolami P, Federman M.** *Enterocytozoon bienersi* 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.
 15. **Canning EU, Hollister WS.** Human infections with microsporidia. Rev Med Microbiol 1992; 3: 35-42.
 16. **Atías A.** Actualizaciones sobre microsporidiosis en el hombre. Rev Med Chile 1995; 123: 762-72.
 17. **Sandfort J, Hannemann A, Gelderblom H, Stark K, Owen RL, Ruf B.** *Enterocytozoon bienersi* infection in an immunocompetent patient who had acute diarrhea and who was not infected with the human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1994; 19(3): 514-6.
 18. **Raynaud L, Delbac F, Broussolle V, Rabodonirina M, Girault V, Wallon M, et al.** Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travelers with chronic diarrhea by specific PCR Amplification. J Clin Microbiol 1998; 36(1): 37-40.
 19. **Sing A, Tybus K, Heesemann J, Mathis A.** Molecular diagnosis of an *Enterocytozoon bienersi* human genotype C infection in a moderately immunosuppressed human immunodeficiency virus-seronegative liver-transplant recipient with severe chronic diarrhea. J Clin Microbiol 2001; 39(6): 2371-2.
 20. **Deportes I, Le Charpentier A, Galian F, Bernard B, Cochand-Priollet A, Lavergne P, et al.** Occurrence of a new microsporidian, *Enterocytozoon bienersi* n.g., n.sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. J Protozool 1985; 32: 245-50.
 21. **Cali A, Kotler DP, Orenstein JM.** *Septata intestinalis* n.g., n.sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. J Protozool 1993; 40(1): 101-12.
 22. **Franzen C, Müller A, Hartmann P, Kochanek M, Diehl V, Fätkenheuer G.** Disseminated *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infection in a patient with AIDS. N Engl J Med 1996; 335(21): 1610-1.
 23. **Canning EU, Hollister WS, Caun IG, Barrison RPH, Logan JR, Polson SM, et al.** Microsporidian infection due to *Enterocytozoon bienersi*: relationship with immunosuppression and HIV. Trans R Soc Trop Med Hyg 1988; 82: 661.
 24. **Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL.** Human Microsporidian Infections. Clin Microbiol Rev 1994; 7(4): 426-61.
 25. **Cali A, Meisler DM, Rutherford I, Lowder CY, McMahon JT, Longworth DL, et al.** Corneal microsporidiosis in a patient with AIDS. Am J Trop Med Hyg 1991; 44(5): 463-8.
 26. **Schwartz DA, Bryan RT, Hewan-Lowe KO, Visvesvara GS, Weber R, Cali A, et al.** Disseminated microsporidiosis (*Encephalitozoon hellem*) and acquired immunodeficiency syndrome. Autopsy evidence for respiratory acquisition. Arch Pathol Lab Med 1992; 116(6): 660-8.
 27. **Weber R, Kuster H, Keller R, Bachi T, Spycher MA, Briner J, et al.** Pulmonary and intestinal microsporidiosis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. Am Rev Respir Dis 1992; 146(6): 1603-5.
 28. **Schwartz DA, Sobottka I, Leitch GJ, Cali A, Visvesvara GS.** Pathology of microsporidiosis: emerging parasitic infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Arch Pathol Lab Med 1996; 120(2): 173-88.
 29. **Candida A, López-Vélez ME, Pérez MJ, Guerrero A, Moreira V, Redondo C.** *Enterocytozoon bienersi* infection in an AIDS patient in Spain. Res Rev Parasitol 1994; 54: 269-71.
 30. **Giang TT, Kotler DP, Garro ML, Orenstein JM.** Tissue diagnosis of intestinal microsporidiosis using the chromotrope-2R modified trichrome stain. Arch Pathol Lab Med 1993; 117(12): 1249-51.
 31. **Peacock CS, Blanshard C, Tovey DG, Ellis DS, Gazzard BG.** Histological diagnosis of intestinal microsporidiosis in patients with AIDS. J Clin Pathol 1991; 44(7): 558-63.
 32. **van Gool T, Sniijders F, Reiss P, Eeftinck Schattenkerk JK, van den Bergh Weerman MA, Bartelsman JF, et al.** Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique. J Clin Pathol 1993; 46(8): 694-9.
 33. **Conteas CN, Sowerby T, Berlin GW, Dahlan F, Nguyen A, Porschen R, et al.** Fluorescence techniques diagnosis intestinal microsporidiosis in stool, enteric fluid, and biopsy specimens from acquired immunodeficiency syndrome patients with chronic diarrhea. Arch Pathol Lab Med 1996; 120(9): 847-53.
 34. **Rijpstra AC, Canning EU, Van Ketel RJ, Eeftinck Schattenkerk JK, Laarman JJ.** Use of light microscopy to diagnose small-intestinal microsporidiosis in patients with AIDS. J Infect Dis 1988; 157(4): 827-31.
 35. **Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorelkin L, Visvesvara GS.** Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. The Enteric Opportunistic Infections Working Group. N Engl J Med 1992; 326(3): 161-2.
 36. **Moura H, Schawartz DA, Bornay-Llinares F, Sodre FC, Wallace S, Visvesvara GS.** A new improved "quick-hot Gram-chromotrope" technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin-embedded tissue sections. Arch Pathol Lab Med 1997; 121(8): 888-93.
 37. **Visvesvara GS, Leitch GJ, Moura H, Wallace S, Weber R, Bryan RT.** Culture, electron microscopy, and immunoblot studies on a microsporidian parasite isolated from the urine of a patient with AIDS. J Protozool 1991; 38(6): 105S-111S.
 38. **Weiss LM, Cali A, Levee E, LaPlace D, Tanowitz H, Simon D, et al.** Diagnosis of *Encephalitozoon cuculici* 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.
 39. **Bornay-Llinares FJ, Acosta B, Peman J, Moura H, Schwartz DA, Da Silva AJ, et al.** Mantenimiento en cultivo y caracterización de un microsporidio (*Encephalitozoon hellem*) aislado en un paciente con sida y neumonía. Parasitol Día 2000; 24: 69-78.
 40. **Visvesvara GS, Leitch GJ, da Silva AJ, Croppo AJ, Moura H, Wallace S, et al.** Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small-subunit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. J Clin Microbiol 1994; 32(11): 2760-8.
 41. **Da Silva AJ, Bornay-Llinares FJ, Del Aguila de la Puente C del A, Moura H, Peralta JM, Sobottka I, et al.** Diagnosis of *Enterocytozoon bienersi* (microsporidia) infections by polymerase chain reaction in stool samples using primers based on the region coding for small-subunit ribosomal RNA. Arch Pathol Lab Med 1997; 121: 874-9.
 42. **Coyle CM, Wittner M, Kotler DP, Noyer C, Orenstein JM, Tanowitz HB, et al.** Prevalence of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* among patients with AIDS-related diarrhea: determination by polymerase chain reaction to the microsporidian small-subunit rRNA gene. Clin Infect Dis 1996; 23: 1002-6.
 43. **Bornay-Llinares FJ, Da Silva AJ, Moura H, Schawartz 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.
 44. **Van Gool T, Dankert J.** Human microsporidiosis: Clinical, diagnostic and therapeutic aspects of an increasing infection. Clin Microbiol Infect 1995; 1(2): 75-85.
 45. **Fernández N, Combol A, Acuña AM, Zanetta E.** Microsporidiosis: primer hallazgo en Uruguay de *Enterocytozoon bienersi*. Rev Urug Pat Clín 2000; 33: 55.
 46. **Combol A, Fernández N, Acuña AM, Zanetta E.** Diagnóstico de Microsporidiosis en pacientes VIH-SIDA. Lab Día 2001; 10: 29.