

Microsporidia intestinales en pacientes viviendo con SIDA en Honduras¹

Intestinal microsporidiosis in AIDS patients from Honduras

Rina G. Kaminsky,* Mary E. Stovall,† Monica L. Mayer,†
Aaron D. Martin,† Lisa C. Bowers,† Elizabeth S. Didier.†

ANTECEDENTES: Organismos pertenecientes al grupo *Microspora* son conocidos mundialmente como agentes de enfermedad oportunista en pacientes viviendo con SIDA. **OBJETIVOS:** Investigar la presencia de especies de microsporidia y la coinfección con parásitos intestinales en pacientes viviendo con SIDA en Honduras. **METODOLOGÍA:** Se examinó una muestra de heces de cada uno de 56 pacientes viviendo con SIDA del Hospital Mario Catarino Rivas, San Pedro Sula, Honduras, de mayo a agosto 1999, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y por coloraciones histoquímicas con Calcofluor Blanco 2MR y tricromo modificado y por cuatro métodos adicionales de rutina investigando la coinfección con parásitos intestinales. **RESULTADOS:** Se identificó esporas de microsporidia en 25% (14/56) de pacientes, por coloraciones histoquímicas de heces. La técnica de PCR, más sensitiva, identificó 41.5% (22/53) de pacientes con infección por microsporidia. Diez resultaron *Enterocytozoon bienewsi* o especies de *Encephalitozoon*; uno resultó *E. bienewsi*, 6 fueron positivos para *Encephalitozoon* spp, y 7 pertenecían a especies no determinadas. Diez y nueve de 22 individuos (86.3%)

identificados con esporas de microsporidia tenían también parásitos intestinales: *Isospora belli* (30.4%), *Strongyloides stercoralis* (21.4%), *Ascaris lumbricoides* (17.1%), *Cryptosporidium* spp. (16.1%), *Trichuris trichiura* (14.3%) y *uncinaria* (10.7%). Quistes de *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/E. dispar*, ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* y huevos de *Hymenolepis nana* se encontraron en menor porcentaje. **CONCLUSIÓN:** Este estudio permitió identificar por primera vez infecciones por microsporidia intestinales en personas viviendo con SIDA en Honduras, solas o en asociación con otras infecciones por nemátodos, céstodos y protozoos comunes y/u oportunistas.

Palabras clave: Honduras. Infecciones oportunistas. *Microsporidia* intestinales. SIDA.

ABSTRACT. BACKGROUND: Intestinal microsporidiosis is an emerging cause of morbidity in AIDS patients worldwide. **OBJECTIVES:** To investigate the frequency of these organisms associated or not with intestinal parasites in AIDS patients in Honduras by different laboratory methods. **METHODOLOGY:** Fifty six patients at Mario Catarino Rivas Hospital in San Pedro Sula, Honduras, participated voluntarily from May to August 1999, in this study. A polymerase chain reaction method (PCR) as well as histochemical staining with Calcofluor White 2MR and modified

* Universidad Nacional Autónoma de Honduras y Hospital-Escuela, Tegucigalpa, Honduras

† Tulane National Primate Research Center, 18703 Three Rivers Road, Covington, LA, 70433, USA

Dirigir correspondencia a: Rina G de Kaminsky, Departamento de Pediatría, Facultad de Ciencias Médicas y Hospital Escuela, o al Apartado Postal 1587, Tegucigalpa, Honduras. Correo electrónico rinagk@yahoo.com.

trichrome were performed in a stool sample provided by each of the 56 patients; four additional routine laboratory methods for stool examination were included to diagnose co-infections with intestinal parasites. **RESULTS:** Calcofluor White 2MR and modified trichrome identified microsporidia spores in 25.0% (14/56) of the stool samples. PCR was more sensitive, identifying 41.5% (22/53) of the patients with microsporidial infections where 10 were either *Enterocytozoon bieneusi* or *encephalitozoon spp.*; one contained *E. bieneusi*, 6 were positive for *Encephalitozoon spp.*, and 7 were of undetermined species. Other intestinal parasites found in these patients included *Isoospora belli* (30.4%), *Strongyloides stercoralis* (21.4%), *Ascaris lumbricoides* (17.1%), *Cryptosporidium parvum* (16.1%), *Trichuris trichiura* (14.3%), and hookworm (10.7%). *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/E. dispar* cysts, *Cyclospora cayetanensis*, and *Hymenolepis nana* were found to lesser extents. Nineteen of the 22 individuals (86.3%) identified with microsporidia also had other enteric parasites present in stool samples. This study is the first to identify microsporidia infections in AIDS patients in Honduras, alone or in association with common nematodes, cestodes, protozoa and other opportunistic parasites.

Keywords: AIDS. Honduras. Intestinal microsporidia. Opportunistic infections.

INTRODUCCIÓN

Microsporidia son organismos unicelulares intracelulares que infectan un amplio rango de hospederos vertebrados e invertebrados. Considerados antes como protozoos, han sido reclasificados recientemente como hongos.^{1,2} A la fecha, se han informado seis géneros de microsporidia que infectan al humano. Las esporas o estadios infectantes, pueden vivir fuera del hospedero por largo tiempo y debido a su tamaño pequeño y pared celular quitinosa, persisten en fuentes de agua y sobreviven a condiciones ambientales adversas, por lo que la exposición a estas esporas podría ser común.^{3,4}

Las especies *Enterocytozoon bieneusi* y *Encephalitozoon intestinalis* se reconocen cada vez con mayor frecuencia como organismos oportunistas. Desde el primer caso documentado de *E. bieneusi* en 1985⁵, la mayoría de los casos

de microsporidiasis entérica ha sido atribuida a este organismo, asociado a menudo con diarrea severa en pacientes viviendo con SIDA y cuentas de células CD4 <200/mm³, con o sin la presencia de otros patógenos intestinales^{6,7}. Más recientemente, *E. intestinalis* (sinónimo *Septata intestinalis*)^{8,9} ha sido informada tanto como causa de enteritis severa e infección diseminada con serio daño en la vesícula biliar y renal¹⁰ como en individuos seronegativos por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), con cuenta normal de células y sin enteritis.¹¹ Estas microsporidias entéricas tienen un aparente impacto sobre la absorción intestinal de grasas, carbohidratos y micronutrientes, lo cual afecta el estado nutricional en los infectados.¹²

De todos los casos de VIH/SIDA en Centro América, los casos de Honduras representan alrededor del 46-57%, una de las cifras más altas en la región.¹³ Desde 1985 el Programa Nacional de SIDA ha informado más de 16,000 casos de SIDA y este número podría representar el 55% de los casos reales debido a informes incompletos (Soto RJ, comunicación personal). Se ha descrito que predomina la transmisión por contacto heterosexual promiscuo, notándose un aumento de infección a la mujer a nivel nacional (1.4%) y en trabajadoras comerciales del sexo (14%) en Tegucigalpa y en San Pedro Sula, en la costa norte del país (Soto RJ, comunicación personal).

En Honduras las infecciones oportunistas aparecen en forma temprana durante la progresión de la infección a SIDA, exacerbada en parte por el acceso limitado a terapia antirretroviral, accesible apenas en forma reciente a nivel de salud pública.¹⁴ Un estudio sobre las características clínicas y epidemiológicas de pacientes viviendo con SIDA indicó que diferentes parasitosis eran responsables del 47% de la clínica en estos individuos.¹⁵ Por otra parte, entre 5% y 85% de la población adquiere en la infancia múltiples infecciones parasitarias que pueden permanecer crónicas hasta la edad adulta.¹⁶

Hasta la fecha, los estudios de prevalencia de infecciones por microsporidia se han limitado a publicaciones de Europa y América del Norte, con escasos informes de Asia o América Latina.¹⁷⁻²⁰ Tales estudios no se han llevado a cabo en Honduras, desconociéndose la prevalencia o presencia de especies de microsporidia intestinales en pacientes viviendo con SIDA,²¹ por lo que tal investigación adquiere importancia, tanto para documentarlas como para un mejor manejo de los pacientes. Esta oportunidad

se presentó mientras se evaluaba un grupo de 79 pacientes viviendo con SIDA en el Hospital Mario Catarino Rivas de San Pedro Sula, así como el interés de la Universidad de Tulane en Covington, Estados Unidos, para colaborar y estudiarlos con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

METODOS

Población. Este es un estudio descriptivo transversal que incluyó 56 de 79 pacientes viviendo con SIDA de la Consulta Externa y Salas del Hospital Mario Catarino Rivas que participaron voluntariamente para el estudio de microsporidiosis. **Métodos.** Se tomaron las historias médicas y se realizaron los exámenes físicos en los 56 participantes, incluyendo un examen hematológico completo, un recuento de células CD4 y un examen de orina. Alícuotas de muestras de heces codificadas anónimamente fueron enviadas al Centro Nacional de Investigación en Primates de la Universidad de Tulane (TNPRC siglas en inglés), Covington, Estados Unidos, para investigación de microsporidiosis por PCR y dos métodos histoquímicos: Calcofluor Blanco M2R (CFB - Sigma Chemical Co, St. Louis MO) y coloración tricromo modificada adaptada para uso en países en desarrollo (TM - Remel, Lenexa, KS).²²⁻²⁴

Para la técnica de PCR, se extrajo ADN de un volumen de 100 µl de cada muestra de heces fijada en formalina, previamente lavada con agua destilada, utilizando un estuche Masterpure de purificación de ADN (Epicentre Technologies, Madison, WI), según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron cuatro iniciadores o primers específicos para microsporidiosis: C1/C2, int530f/int580r, PMP1/PMP2 y EBIEF1/EBIER 1, según descrito anteriormente.^{25,26} El primer **C1/C2** (forward 5'-CACCAGG-TTGATTCTGCC-3', reverse 5'-GTGACGGGCGG-TGTGTAC-3') amplifica todo el gene de la sub-unidad ribosomal pequeña (SSUrRNA) de todas las especies de microsporidiosis de mamíferos y genera productos de PCR o amplicones de ~1200 pares de bases (pb). Los primers **int530f/int580r** (forward 5'-TGCAGTTTAAAATGT-CCGTAGT-3', reverse 5'-TTTCACTCGCCGCTACT-CAG-3') amplifican una porción grande de SSUrRNA, toda la región intergenética (ISR), y una pequeña porción de la subunidad ribosomal grande (LSUrRNA) de parásitos del género *Encephalitozoon*, generando amplicones de

~1000 pb. Los primers **PMP1/PMP2** (forward 5'-CAC-CAGGTTGATTCTGCCTGAC-3', reverse 5'-CCTC-TCCGGAACCAAACCTG-3') amplifican una porción de SSUrRNA de *Enterocytozoon* (250 bp) y *Encephalitozoon* (268-279 bp) spp, y los primers **EBIEF1/EBIER1** (forward 5'-GAAACTTGTCCACTCCTTACG-3', reverse 5'-CCATGCACCACTCCTGCCATT-3') amplifican la SSUrRNA de *E. bienewisi* (670 bp). Todas las amplificaciones de ADN se realizaron en un Termociclador Perkin Elmer 480 (Norwalk, CT), utilizando 35 ciclos de 94° C por 2 minutos, 55° C por 2 minutos y 72° C por 2 minutos, con una extensión final de 10 minutos a 72° C. Se realizó una electroforesis con los amplicones de PCR y los marcadores de ADN en 1.5% de agarosa (SeaKem® LE Agarose, Cambrex Bio Science, Rockland, ME), se colorearon con bromuro de etidio (Sigma) y se fotografiaron después de exposición a luz ultravioleta (UV).

Para el método de CFB, extendidos finos (10-20µl) de muestras de heces fijadas en formalina, secados y fijados en metanol se cubrieron con 1-2 gotas de una solución al 0.5% de CFB durante 2-3 min; se lavaron en agua corriente y se colorearon con una solución de azul de Evans al 0.1% (Sigma) a temperatura ambiente por 1 min. Para la coloración tricromo modificada, una solución de cromotropo se aplicó por 30 min a 37°C a extendidos finos de heces previamente fijados en metanol. Se lavaron con alcohol ácido 10 s, se deshidrataron en alcohol etílico al 95% 10 s, seguido de dos incubaciones de 5 min cada una en alcohol etílico al 100% antes de introducirlos por 5 min en xilol. Las tinciones fueron cubiertas con Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI) y examinadas con un microscopio fluorescente Olympus AH-2 a una longitud de onda de 395-415 nm para todas las muestras teñidas con CFB o bien un microscopio óptico Olympus BX-40, observando bajo aceite de inmersión todas las muestras teñidas con TM.

El examen de heces incluyó, adicionalmente, detección de otros parásitos intestinales por métodos de rutina, ejecutados en el Servicio de Parasitología del Hospital Escuela, Tegucigalpa (examen directo en solución salina fisiológica y solución de Lugol, una extracción de larvas por Baermann modificado, una concentración con formalina-acetato de etilo y una coloración ácido resistente modificada).²²

RESULTADOS

En el Cuadro No. 1 se presenta resultados de PCR y microscopía. De las 56 muestras de heces, 3 no pudieron ser evaluadas por PCR debido a una cantidad insuficiente de heces. Veinte y dos de 53 muestras (41.5%) fueron positivas en PCR (C1/C2) para especies de microsporidia de mamíferos, 12 de las cuales habían sido negativas en coloraciones histoquímicas. De las 22 PCR positivas, 10 (45.5%) se identificaron como *Encephalitozoon* spp. o *Enterocytozoon* spp. según determinado por la presencia de una banda diagnóstica entre 268-278 pb (usando los primers PMP1/PMP2). De estas, 6 se identificaron conteniendo esporas de *Encephalitozoon* al observar una banda diagnóstica de 1000 pb usando los primers int530/int580r; una muestra contenía esporas de *E. bieneusi* determinado por una banda diagnóstica a los 670 pb usando primers específicos y tres no se pudieron especificar por cantidad insuficiente de heces. Amplicones generados por los primers C1/C2 se ilustran en la Figura No. 1. Cuatro muestras positivas en coloración histoquímica fueron negativas por PCR utilizando primers C1/C2. Doce muestras positivas por microsporidia por los primers C1/C2 no pudieron identificarse a nivel de especie por PCR con

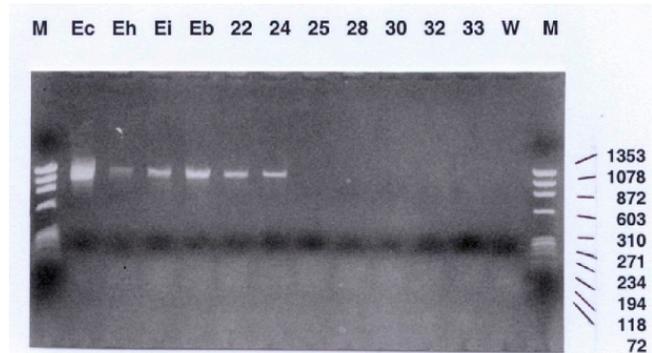


Figura No. 1. Este es un ejemplo de diagnóstico de microsporidia por PCR utilizando primers C1/C2. Estos primers amplifican la región SSUrDNA de microsporidia para generar amplicones de aproximadamente 1200 pb. Las columnas se han designado como sigue: M, marcadores de ADN (pb), Ec= *Encephalitozoon cuniculi*; Eh, *Encephalitozoon hellmii*; Ei, *Encephalitozoon intestinalis*; Eb, *Enterocytozoon bieneusi*; 22-33 equivalen a pacientes y W es un control de agua destilada.

los primers int530f/int580r, PMP1/PMP2, o EBIEF1/EBIER1. Los resultados de la amplificación del ADN por PCR utilizando diferentes pares de primers están asimismo incluidos comparativamente en el Cuadro No. 1.

Cuadro No. 1. Detección de microsporidia por microscopía óptica y PCR en muestras de heces de pacientes viviendo con SIDA, Honduras.

Método diagnóstico	Positivo N (%)
Microscopia óptica, n= 56	
Total Microsporidia	14 (25.0)
TM	12 (21.4)
CFB	6 (10.7)
Ambos	4 (07.4)
PCR con primers específicos (Especie)	
C1/C2 (microsporidia de mamíferos), n= 53	22 (41.5)
PMP1/PMP2 (<i>Encephalitozoon</i> o <i>Enterocytozoon</i> spp.), n= 22	10 (45.5)
Int530f/Int580r (<i>Encephalitozoon</i> spp.), n= 10	6 (60.0)
EBIEF1/EBIER1	1 (10.0)
(<i>Enterocytozoon bieneusi</i>), n= 10	3 (30.0)
(<i>Encephalitozoon</i> spp. o <i>E. bieneusi</i>), n= 10	12 (54.5)
Sin identificar, n= 22	

TM= Coloración de tricromo modificada para uso en países en desarrollo y vista bajo aceite de inmersión (100X). CFB= Coloración de Calcofluor Blanco M2R visualizada con longitud de onda 395-415 nm.

Catorce de 56 muestras de heces (25%) coloreadas con TM o con CFB fueron positivas para la presencia de esporas de microsporidia, siendo cuatro muestras positivas en ambos métodos. En general se detectaron escasas esporas por campo de 600X en cada preparación; solamente una muestra tenía numerosas esporas por campo. Las esporas teñidas con CFB se observaron como cuerpos ovales blanco-azulosos o color turquesa bajo luz fluorescente. En la coloración TM las esporas se observaron como organismos ovalados, de color rosado, a menudo con una vacuola posterior y una línea diagonal visible, tal como descrito por otros autores.²⁷

El Cuadro No. 2 demuestra los datos demográficos de 22/56 individuos participantes positivos por PCR para infección por microsporidia. Predominó el sexo masculino (59.1%), con edades entre 21-57 años. Todos los participantes recibieron alguna forma de tratamiento para infecciones oportunistas (tuberculosis,

candidiasis oral, toxoplasmosis cerebral, etc.); sin embargo, ninguno había recibido terapia antirretroviral. A pesar de que los 22 pacientes informaron tener episodios de diarrea desde que se diagnosticaron viviendo con SIDA, a ninguno se le había solicitado un examen de heces. De los 16 pacientes con cuentas de células CD4, dos tenían cuentas <200/mm³. Siete (33%) de los individuos positivos por microsporidia tomaban agua embotellada y 14 (66.7%) agua de la llave. Otros datos demográficos de los 56 participantes en este estudio eran similares a los de individuos positivos por microsporidia; es decir, eran masculinos, adultos, viviendo con SIDA, con historias de diarrea crónica e infecciones oportunistas, sin tratamiento antirretroviral y sin examen de heces. La mayoría utilizaba agua de la llave para sus necesidades diarias.

Cuadro No. 2. Características de 22 pacientes viviendo con SIDA identificados con infección por microsporidia intestinales.

Características	Valores N (%)
Media de edad en años	32.3
Proporción hombre:mujer	13:9
Con diarrea/heces líquidas	18 (82.0)
Con enfermedad crónica, con/sin malignidad	22 (100.0)
Medicamentos	
Terapia antirretroviral	0 (0.0)
Otros (tuberculosis, candidiasis oral, etc.)	22 (100.0)
Cuentas CD4 < 200/mm ³ , n= 16	2 (12.5)
Dos patógenos entéricos asociados	10 (45.5)
Un patógeno entérico asociado	9 (40.9)
Bebía agua de botella, n= 21	7 (33.3)

Cuadro No. 3. Patógenos entéricos identificados en heces de 56 pacientes viviendo con SIDA, Honduras.

Microorganismos	N (%)
<i>Microsporidia</i>	22 (41.5)
<i>Isospora belli</i>	17 (30.4)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	12 (21.4)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	9 (16.1)
<i>Trichuris trichiura</i>	8 (14.3)
Uncinarias del humano	6 (10.7)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	4 (7.1)
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	2 (3.6)
<i>Entamoeba histolytica</i> /E. <i>dispar</i> (quistes)	2 (3.6)
<i>Giardia lamblia</i>	2 (3.6)
<i>Hymenolepis nana</i>	1 (1.8)

La prevalencia de microsporidia en el contexto de otras parasitosis entéricas se presenta en el Cuadro No. 3. Microsporidia fueron los organismos identificados con mayor frecuencia en la población estudiada, seguido por *Isospora belli* (30.4%), *Strongyloides stercoralis* (21.4%), *Ascaris lumbricoides* (17.1%), *Cryptosporidium* spp. (16.1%), *Trichuris trichiura* (14.3%) y uncinaria (10.7%). Menos frecuente fue el hallazgo de *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/E. *dispar*, *Cyclospora cayetanensis* e *Hymenolepis nana*. Diez y nueve de 22 individuos (86.4%) positivos por microsporidia presentaron otros parásitos patógenos o conocidos como causantes de enteritis en el examen de heces, en infección única (10 pacientes), o con dos o más especies (9 pacientes).

DISCUSIÓN

El hallazgo de esporas de microsporidia en las muestras de heces de 22 de 53 pacientes (41.5%), confirma por primera vez la presencia de estas infecciones en pacientes viviendo con SIDA en San Pedro Sula, Honduras. Los tres métodos utilizados para identificar microsporidia en muestras de heces, sin embargo, variaron en sensibilidad y posibilidad de ejecución en países en desarrollo. Las esporas de microsporidia se identificaron microscópicamente con las coloraciones histoquímicas TM y/o CFB en 25.0% (14/56) de muestras de heces, pero los métodos basados en PCR fueron más sensitivos, identificando 41.5% (22/53) de los pacientes con infección por microsporidia. De igual manera, exámenes microscópicos de muestras de heces coloreadas con tricromo de pacientes VIH positivos en Zimbabwe identificaron microsporidia en 11% de muestras.²⁸ Sin embargo, cuando Gumbo y col.²⁹ utilizaron un protocolo basado en PCR, observaron una prevalencia de 51% de casos. Estos resultados sugieren que se hace necesario utilizar varios métodos diagnósticos para poder identificar el mayor número de casos en una población en estudio. En particular, cuando las muestras de heces se examinan por microscopía óptica, deberían aplicarse métodos moleculares en las mismas muestras para obtener resultados más confiables. Tal metodología no es del alcance de laboratorios de salud pública, en ocasiones ni en el tercer nivel de atención en países en desarrollo. Una solución razonable sería desarrollar experiencia para diagnosticar infecciones por microsporidia con coloraciones de CFB o TM o en su defecto, otras coloraciones que ofrezcan resultados confiables.

Treinta y cuatro por ciento de los 56 pacientes viviendo con SIDA en este estudio presentaba otros parásitos patógenos, además de microsporidia, aunque a ninguno se le había solicitado anteriormente examen de heces. Esto, unido al diseño de la investigación, no nos permite afirmar o negar la influencia de las especies intestinales de microsporidia en la etiología de la enteritis. En otros estudios, *I. belli* y especies de *Cryptosporidium* han sido asociados significativamente con diarrea en pacientes viviendo con SIDA en Honduras e *I. belli* es considerada como un marcador de SIDA en pacientes de cualquier edad que consultan el Hospital Escuela en Tegucigalpa.³⁰ Por otra parte, infecciones por *Cryptosporidium* spp. parecen estar asociadas a inmunodeficiencia o a SIDA en pacientes adultos con diarrea. Faltan estudios que determinen su prevalencia y estacionalidad en la población en general.³¹ Es de hacer notar que las infecciones por microsporidia fueron apenas un poco menos frecuentes que las por *I. belli* y *Cryptosporidium* spp. combinadas, por lo que al menos en pacientes viviendo con SIDA en países en desarrollo estas observaciones requieren acción inmediata. Como mínimo, los exámenes de heces por diferentes metodologías deberían ser de rutina para estos pacientes. En países como Honduras, en donde las coinfecciones de enfermedades parasitarias y VIH/SIDA son altamente prevalentes, la identificación y manejo de estas enfermedades y sus complicaciones son de mucha urgencia. Adicionalmente, el impacto de infecciones parasitarias sobre la progresión del VIH/SIDA son de interés particular,³²⁻³⁴ así como el papel que algunos de estos parásitos tienen sobre la nutrición en general y en pacientes viviendo con SIDA.³⁵

De las coloraciones histoquímicas, el método TM puede ser implementado fácilmente, aunque ambos tienen ventajas y desventajas. La coloración con CFB por ejemplo, requiere menos tiempo de coloración, las muestras teñidas pueden guardarse y verse algunos meses después sin perder la calidad de la tinción, el brillo de las esporas hace que se detecte microsporidia en agregados o en áreas más gruesas de la preparación.²⁷ Su mayor desventaja consiste en que las láminas deben ser vistas en un microscopio de luz ultravioleta, no siempre de fácil adquisición para laboratorios de salud pública en países como Honduras. En este estudio, solamente dos muestras fueron encontradas positivas en CFB negativas en TM, de modo que la necesidad de invertir en la compra de un microscopio de luz ultravioleta para ese uso únicamente no se justifica. Ni

la coloración de CFB ni la TM evitaron resultados falsos positivos y falsos negativos cuando se compararon con los resultados de PCR.

En este estudio, solamente una muestra se encontró positiva por *E. bienewisi*, a pesar de que esta especie ha sido la más comúnmente informada en otros estudios.³⁶ Doce muestras identificadas del género *Encephalitozoon* no pudieron identificarse a nivel de especie. Sin embargo, *E. intestinalis* se reconoce cada vez más como una especie causante de enteritis, así como en aguas para el consumo humano lo que podría sugerir infección con estos microsporidia por ingestión de aguas contaminadas.³⁷ Las identificaciones de microsporidia por técnicas más sensitivas para muestras del ambiente permiten nuevos cuestionamientos sobre la epidemiología y distribución de estas esporas en la naturaleza.

Los pacientes viviendo con SIDA deben recibir medidas simples pero eficaces para prevenir infecciones por microsporidia, tales como lavado frecuente de manos con agua y jabón, utilizar agua segura en bebidas y alimentos y una disposición adecuada de excretas. El personal médico y de laboratorio debe ser informado sobre las infecciones por microsporidia, es aconsejable implementar técnicas de diagnóstico parasitológico en todos los laboratorios del país, en especial para pacientes VIH/SIDA positivos, y al menos cuando tengan historia de diarrea, realizar examen de heces de rutina que incluya un examen para microsporidia. Si bien no existen terapias adecuadas para el tratamiento de infecciones por *E. bienewisi*, aquellas causadas por *E. intestinales* responden a drogas como el Albendazol, aliviando los síntomas entéricos de estos pacientes.³⁸⁻⁴¹ A medida que aumente la información sobre microsporidias y se desarrolle una experiencia y mejores técnicas de diagnóstico como PCR en países en desarrollo, estos hallazgos serán cada vez más comunes. Se requiere de más investigaciones en Honduras que confirmen estas observaciones y que asistan en el desarrollo de protocolos adecuados de manejo.

Agradecimiento: Se agradece al Dr. Tito Alvarado, Hospital Mario Catarino Rivas, actualmente del Servicio de Infectología, Hospital Escuela, por su colaboración con la asistencia clínica a los pacientes, así como a Magdalena Moreira y Herminia Valladares, por asistir con su experiencia técnica en parasitología diagnóstica.

Financiamiento: Esta investigación fue financiada parcialmente por los Laboratorios Columbia SA de CV, México, como parte de un estudio sobre criptosporidiasis. Los patrocinadores no participaron en el diseño de este experimento ni en la preparación del manuscrito. Los Institutos Nacionales de Salud (National Institutes of Health) de Bethesda, Maryland, ofrecieron ayuda parcial financiera bajo los grants RR0164 y AI39968.

REFERENCIAS

1. Sprague V. *Classification and phylogeny of the microsporidia*. In L A Bulla, T C Cheng, Comparative Pathology, vol. 2, Plenum Press, N Y, 1976. p. 1-30.
2. Vivares CP, Gouy M, Thoarat F, Metenier G. Functional and evolutionary analysis of a eukaryotic parasitic genome. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5:499-505.
3. Fournie S, Ligoury O, Santillana-Hayat M, Guillot M, Sarfati C, Derouin F, Molina JM. Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 29:95-100.
4. Didier ES, Stovall M E, Green LC, Brindley PJ, Sestak K, Didier PJ Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitol* 2004; 126:145-66.
5. Desportes I, Le Charpentier Y, Galian A Bernard F, Cochand-Priollet B, Lavergne A, Ravisse P, Modigliani R. Occurrence of a new microsporidian, *Enterocytozoon bieneusi* n g, n sp., in enterocytes of a human patient with AIDS. *J Protozool* 1985 ; 32:250-54.
6. Kotler DP & Orenstein JM. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Adv Parasitol* 1998; 40:321-49.
7. Weber R, Bryan RTD, Schwartz A, Owen RL. Human microsporidial infection. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7:426-61.
8. Cali A, Koller DP, Orenstein JM. *Septata intestinalis* N. G., N. Sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *J Eukaryot Microbiol* 1993; 40:101-12
9. Hartskeerl RA, Van Gool T, Schuitema ARJ, Didier ES, Terpstra WJ. Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitol* 1995; 110:277-85.
10. Orenstein JM, Dieterich DT, Kotler DP. Systemic dissemination of newly recognized intestinal microsporidia species in AIDS. *AIDS* 1992; 6:1143-150.
11. Sowerby TM, Contreas CN, Berlin OGW, Donovan J. Microsporidiosis in patients with relatively preserved CD4 counts. *AIDS* 1995; 9:975.
12. Lambi BB, Federman M, Pleskow D, Wanke CA. Malabsorption and wasting in AIDS patients with microsporidia and pathogen-negative diarrhea. *AIDS* 1996; 10:739-44.
13. Secretaría de Salud, Departamento ETS/SIDA/TB, Boletín Estadístico de VIH/SIDA. Tegucigalpa, Honduras 2001.
14. Wheeler D, Arathoon EG, Pitts M, Cedillos R, Bú FE, Porras GD, Herrera G, Sosa NR Availability of HIV care in Central America. *JAMA* 2001; 286:853-60.
15. Bú FE, Fernández J, Alvarado T. Características epidemiológicas y clínicas de los 100 primeros caso de SIDA en Honduras. *Med Clin* 1992; 1:9-13.
16. Kaminsky RG. *El Parasitismo en Honduras*. Serie de Diagnósticos No. 14, Organización de la Salud/Organización Mundial de la Salud, Honduras, 1996, p. 5-15.
17. Wuhib T, Silva TMJ, Newman RD, García LS, Pereira ML, Chaves CS, Wahlquist SP, Bryan RT, Guerrant RL, Sousa AQ, Queiroz TR, Sears CL. Cryptosporidial and microsporidial infections in human immunodeficiency virus-infected patients in northeastern Brazil. *J Infect Dis* 1994; 170:494-97.
18. Drobniowski F, Kelly P, Carew A, Ngwenya B, Luo N, Pankhurst C, Farthing MJG. Human microsporidiosis in African AIDS patients with chronic diarrhea. *J Infect Dis* 1995; 171:515-16.
19. Blanshard C, Ellis DS, Dowell S P Tovey G, Gazzard BG. Simultaneous infection with two types of intestinal microsporidia in a patient with AIDS. *J Clin Pathol* 1996; 46:898-902.
20. Kotler DP & Orenstein JM. Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV- infected individuals referred for gastroenterological evaluation. *Am J Gastroenterol* 1994; 89:1998-2002.
21. Kaminsky RG. Parásitos intestinales en diferentes poblaciones de Honduras. III. Prevalencia de parásitos intestinales en pacientes VIH/SIDA. *Rev Méd Hondur* 1999; 67:235-42.
22. Ash L & Orihel T. *Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification*, ASCP Press, Chicago, IL USA, 1987, p. 15-66.
23. Didier ES, Orenstein JM, Aldra AM, Bertucci DC, Rogers LB, Janney FA. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J Clin Microbiol* 1995; 33:3138-145.
24. Sianongo S, Mcdonald V. Kelly P. A method for diagnosis of microsporidiosis adapted for use in developing countries. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95:605-07.
25. Schuitema ARJ, Hartskeerl RA, Van Gool T, Laxminarayan R, Terpstra WJ. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of microsporidiosis. *AIDS* 1993; 7(Suppl. 3): S62-63.
26. Franzen C & Müller A. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:243-85.
27. Garcia LS. Laboratory identification of the microsporidia. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1892-901.
28. Van Gool T, Luderhoff E, Nathoo KJ, Kiire CF, Kankert J, Mason PR. High prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* infections among HIV-positive individuals with persistent diarrhoea in Harare, Zimbabwe. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 8:478-80.
29. Gumbo T, Gangaidzo IT, Sarbah S, Carville A, Tzipori S, Wiest PM. Intestinal parasites in patients with diarrhea and human immunodeficiency virus infection in Zimbabwe. *AIDS* 1999; 13:819-21.
30. Kaminsky RG, Soto R, Campa A, Baum M. Intestinal parasitic infections and eosinophilia in a human immunodeficiency virus positive population in Honduras. *Mem Inst Oswaldo*

- Cruz, Rio de Janeiro 2004; 99:773-76.
31. Kaminsky RG. Comparación epidemiológica entre apicomplexa intestinales en población hospitalaria en Honduras. *Rev Méd Hondur* 2002; 70:164-72.
 32. Vomer TL, Waldor MK, Steinman L, Conley FK. Depletion of T-4+ lymphocytes with monoclonal antibody reactivates toxoplasmosis in the central nervous system; a model of superinfection in AIDS. *J Immunol* 1987; 138:3737-741.
 33. Heyworth MF. Parasitic diseases in immunocompromised hosts. Cryptosporidiosis, isosporiasis and strongyloidiasis. *Gastroent Clin North Am* 1996; 25:691-07.
 34. Borkov G, Weisman A, Leng Q, Stain M, Kalinkovich A, Wolday D, Bentwich Z. Helminths, human immunodeficiency virus, and tuberculosis. *Scan J Infect Dis* 2001; 33:568-71.
 35. Borkow G & Bentwich Z. Host background immunity and human immunodeficiency virus protective vaccines: a major consideration for vaccine efficacy in Africa and in developing countries. *Clin Diagnost Laborat Immunol* 2002; 9:505-07.
 36. Schwartz DA & Bryan RT. *Microsporidial infections: progress in epidemiology and prevention*. In: WM Scheld, RM Craig, JM Hughes, *Emerging Infections*, vol 3. Am Soc Microbiol Press, Washington D C, 1999, p. 73-98.
 37. Dowd, SE, Eliopolus JD, Gerba J, Naranjo CP, Klein J, Lopez, Mejia B de Mendoza M, Pepper C E, Ian L. Confirmed detection of *Cyclospora cayetanesis*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* in water used for drinking. *J Water & Hlth* 2003; 1(3):117-23.
 38. Blanshard C, Ellis DS, Tovey DG. Treatment of intestinal microsporidiosis with Albendazole in patients with AIDS. *AIDS* 1992; 6:311-3.
 39. Dieterich DT, Lew E, Kotler DP, Poles MA, Orenstein JM. Treatment with Albendazole for intestinal disease due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1994; 169:173-83.
 40. Contreas CN, Berlin OG, Ash LR, Pruthi JS. Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63:121-27.
 41. Didier ES, Maddry JA, Brindley PJ, Stovall ME, Didier PJ. Therapeutic strategies for human microsporidia infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2005; 3:419-434.