

Prevalencia de *Encephalitozoon intestinalis* y *Enterocytozoon bieneusi* en pacientes VIH positivos de Maracaibo, Venezuela.

Zulbey Rivero-Rodríguez, Amparo Hernández Sierra, Nailet Arráiz, Ángela Bracho Mora y Rafael Villalobos Perozo.

¹Escuela de Bioanálisis, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela

²Facultad de Salud, Programa de Microbiología, Universidad Popular del Cesar, Valledupar. Cesar, Colombia

³Escuela de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: *Encephalitozoon intestinalis*, *Enterocytozoon bieneusi*, VIH-SIDA, PCR, Venezuela.

Resumen. Los microsporidios pueden provocar infecciones emergentes y oportunistas en individuos inmunocomprometidos de todo el mundo. Se realizó éste estudio para identificar las especies de microsporidios intestinales presentes en pacientes con VIH-SIDA del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM). Se recolectaron 50 muestras fecales de individuos con diagnóstico confirmado de VIH durante los años 2007-2008; se obtuvieron las cifras de CD4 de solo 42 pacientes. Las muestras se analizaron mediante PCR separadas para la identificación de *Encephalitozoon intestinalis* y *Enterocytozoon bieneusi*. Las especies de microsporidios presentaron un 36% de prevalencia, 10 pacientes presentaron *Encephalitozoon intestinalis*, 4 *Enterocytozoon bieneusi* y 4 ambas especies. Se determinó una relación inversamente proporcional y estadísticamente significativa entre el conteo de CD4 y la presencia de microsporidios en la muestra fecal. Es destacable la elevada prevalencia de especies de microsporidios observada en los pacientes VIH estudiados, donde predominó *E. intestinalis*.

Prevalence of *Encephalitozoon intestinalis* and *Enterocytozoon bienewsi* in HIV positive patients to Maracaibo, Venezuela.

Invest Clin 2013; 54(1): 58 - 67

Keywords: *Encephalitozoon intestinalis*, *Enterocytozoon bienewsi*, HIV/AIDS, PCR, Venezuela.

Abstract. Microsporidiosis are considered emerging and opportunistic infections in immunocompromised individuals worldwide. The purpose of this study was to identify the species of intestinal microsporidia in patients with HIV-AIDS from the Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, Venezuela (SAHUM). Fecal samples were collected from 50 patients with confirmed diagnosis of HIV, during the years 2007 and 2008; the CD4 values were obtained from 42 patients. The samples were analyzed by separate PCRs to identify *Encephalitozoon intestinalis* and *Enterocytozoon bienewsi*. Microsporidia species showed a 36% prevalence: ten patients had *Encephalitozoon intestinalis*, four *Enterocytozoon bienewsi* and four both species. An inverse and statistically significant relationship between the CD4 count and the presence of microsporidia in the fecal sample was also found. It is remarkable the high prevalence of microsporidia species observed in the HIV patients studied, with a predominance of *E. intestinalis*.

Recibido: 07-12-2012. Aceptado: 14-02-2013

INTRODUCCIÓN

Clasificados antes dentro de los protozoos, los microsporidios se consideran ahora hongos degenerados en función de las secuencias α y β -tubulina y los árboles de secuencia para el chaperon molecular hsp70. Evidencias adicionales de la naturaleza fúngica de los microsporidios son las esporas con pared de quitina, ausencia de aparato de Golgi y un mecanismo mitótico indistinguible del que tienen los ascomicetos fúngicos (1).

Se caracterizan por formar resistentes esporas que presentan en su interior una estructura peculiar denominada tubo o filamento polar, a través del cual infectan las células susceptibles donde desarrollan su ciclo vital (2). Son ubicuos por naturaleza y se consiguen ampliamente distribuidos en el ambiente. Las especies y genotipos que

infectan al hombre se han detectado también en el agua, alimentos y en animales salvajes, domésticos y de granja. Son microorganismos intracelulares obligados pertenecientes al phylum Microsporidia, compuesto por más de 160 géneros y 1.300 especies (3); en la actualidad son 7 los géneros que se han identificado en las infecciones humanas: *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Anncaliia* (*Brachiola*) y *Vittaforma* (4,5) y un "falso" género *Microsporidium*, donde se ubican los microorganismos que aún no han podido ser clasificados. Solo dos especies tienen hábitat intestinal: *Encephalitozoon intestinalis* y *Enterocytozoon bienewsi*.

Enterocytozoon bienewsi fue la primera especie identificada en pacientes VIH-SIDA con diarrea, posteriormente, se reconoce a *Encephalitozoon*, también como causa de

diarrea y de formas diseminadas de infección (6). La principal sintomatología de la microsporidiosis intestinal es la diarrea crónica acuosa (hasta 6-8 deposiciones diarias), sin moco ni sangre y acompañada de malabsorción. Puede presentarse además, anorexia, vómitos, fiebre, náuseas, deshidratación, pérdida de peso y a veces intensa caquexia (7).

Los pacientes con VIH-SIDA se caracterizan por presentar infecciones oportunistas secundarias que se originan como consecuencia de la pérdida en el número y la función de los linfocitos CD4, a causa de la infección con el Virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH). Este puede infectar y alterar macrófagos, células presentadoras de antígenos como células dendríticas y de Langerhans; además de los linfocitos TCD8, importantes en la inmunidad celular, haciéndolos más susceptibles a infecciones por microorganismos oportunistas como Microsporidios, *Cryptosporidium* sp., *Isospora belli* y *Cyclospora cayetanensis* (8).

El diagnóstico de la microsporidiosis intestinal humana, amerita la realización de técnicas especiales diferentes a las que se utilizan comúnmente para el estudio de la materia fecal, por tanto, los exámenes microscópicos con solución salina fisiológica y lugol no permiten identificar las esporas. Estas son sumamente pequeñas, midiendo generalmente 1,5 a 2 micras de longitud (7). Se han propuesto diversas coloraciones para ellas, entre las que destacan: Tricrómica modificada de Weber o de Ryan, Gram-cromotropo rápida caliente, tinciones con fluorocromos blanco calcofluor y Uvitex 2B. Aún así, éstas técnicas no permiten la identificación de microsporidios a nivel de especie, para ello se hace necesaria la realización de microscopía electrónica, utilización de anticuerpos monoclonales o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La identificación de la especie presente es importante, pues tiene implicaciones en el

manejo clínico del paciente, tanto desde el punto de vista terapéutico como de las previsiones en relación a una posible diseminación del microorganismo fuera del intestino.

Con la finalidad de poder identificar las especies de microsporidios intestinales presentes en los pacientes VIH-SIDA de nuestra región, se realizó el presente estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron las muestras fecales de 50 pacientes de la consulta VIH-SIDA del SAHUM, 40 de ellos con diarrea aguda o crónica, 4 con otros síntomas gastrointestinales y 6 asintomáticos. La selección del número de pacientes a estudiar, se vió limitada por la capacidad del kit de extracción de ADN (50 determinaciones). Las muestras fueron recolectadas durante el periodo Septiembre 2007-Octubre 2008. En dicho servicio, los pacientes se confirman como VIH positivos, mediante al menos dos técnicas inmunológicas (ELISA y Western Blot). La información relacionada con datos personales, clínica del paciente y otros, se obtuvo de la historia del mismo, archivada en la consulta. Se solicitó el consentimiento informado a cada uno de los individuos participantes en el estudio, para la realización del presente estudio. Se obtuvo una muestra fecal por individuo, recolectada en un envase plástico, limpio y seco, la cual se preservó congelada (-20°C), hasta el momento de la realización de la PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

1. Extracción y purificación del ADN.

Para extraer el ADN de las muestras de heces, se utilizó la técnica Fast DNA SPIN kit for Soil (kit de extracción rápida de ADN para suelos) Bio 101 Systems de la casa comercial Q-Biogene, según las instrucciones

del fabricante. El Fast DNA SPIN kit for Soil, está diseñado para extraer ADN genómico de bacterias, hongos, plantas y parásitos.

2. Amplificación del ADN. Se efectuaron reacciones de PCR individuales para cada una de las especies estudiadas, según el protocolo de Botero y col. (9). Las regiones SSU-ARNr (subunidad pequeña del ARN ribosómico) de los microsporidios se amplificaron utilizando cebadores específicos para *Encephalitozoon intestinalis*, SINTF 5'TTTCGAGTGTAAAGGAGTCTCGA3', cuya posición en la secuencia es de 362 a 382 y SINTR 5'CCGTCCTCGTTCTCCTGCCCG3', posición 861 a 881, que amplifican un producto de 520 pb; y para *Enterocytozoon bienewisi*, EBIEF1 5'GAAACTTGTCC ACTCCTT ACG3', cuya posición en la secuencia es 295 a 315 y EBIER1 5'CCATGCACCA CTCCTG CCATT3', posición 881-901, con un producto de amplificación de 607 pb. Así mismo, se procesaron en paralelo los respectivos controles negativos y positivos de acuerdo a las especie de microsporidios investigados. Como controles positivos se utilizaron fragmentos clonados de *E. bienewisi* y *E. intestinalis*. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50 μ L, conteniendo 10 μ L de buffer *Taq* DNA polimerasa 5X (Promega), 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M de cada desoxirribonucleótido, 25 pmoles de cada oligonucleótido, 1,25 U de *Taq* DNA polimerasa y 400 ng de ADN extraído de la muestra en estudio. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 95°C por 5 min y 35 ciclos de amplificación consistentes en: 1 min de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 45°C (*Encephalitozoon intestinalis*) o 55°C (*Enterocytozoon bienewisi*) y 90 segundos de extensión a 72°C. Se realizó una extensión final a 72°C por 8 minutos.

3. Análisis de productos de PCR por electroforesis. Los productos de PCR fueron analizados en geles de electroforesis de

agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio (5 μ g/mL), visualizados con lámpara de luces ultravioleta y fotografiadas con sistema de foto documentación Digi Doc UVP (USA).

Análisis estadístico

El análisis de los datos se efectuó a través de la estadística descriptiva, empleando valores absolutos y porcentajes, para lo cual se elaboraron tablas de los datos obtenidos en los resultados. Se utilizó para el análisis, el paquete estadístico SPSS versión 10. Se realizó Ji cuadrado y correlación de Spearman para realizar el análisis estadístico de las variables estudiadas. Para todos los análisis, un valor de $p < 0,05$ fue considerado como el nivel crítico de significación.

RESULTADOS

Colaboraron con su muestra fecal 50 individuos, con edades comprendidas entre 21 a 62 años (promedio $34,94 \pm 10,82$ años), de los cuales 21 eran mujeres y 29 hombres. Estos pacientes estaban diagnosticados como VIH positivos, desde hace 1 a 3 años, con un promedio de $1,67 \pm 0,75$ años. Al evaluar sus historias clínicas, se observó que 42 de ellos tenían resultados de CD4 relativamente recientes (uno a seis meses de emitidos) y presentaron valores de CD4 que variaban entre 4 y 716 células por mm^3 (promedio $208,62 \pm 166,24$).

Según su historia clínica, solo 6 individuos se encontraban totalmente asintomáticos al momento de ser solicitada la muestra fecal. El resto de los pacientes (44) refirieron como los síntomas más frecuentes, diarrea (80%), pérdida de peso (30%) y síntomas gastrointestinales que incluían dolor abdominal, cólicos, vómitos y/o estreñimiento en 10%. Once pacientes presentaron conjuntamente candidiasis oral y neumocystosis, por lo que podía presumirse que se encontraban en etapa SIDA.

Mediante PCR se detectó ADN de microsporidios en 18 individuos (18/50), representando esta parasitosis, el 36% de prevalencia en individuos VIH positivos. Diez muestras amplificaron para *E. intestinalis*, cuatro para *E. bienewsi* y cuatro amplificaron para ambos microsporidios. Las Figs. 1

y 2 muestran resultados de la electroforesis horizontal en geles de agarosa para cada especie de microsporidio estudiada.

En la Tabla I pueden observarse los síntomas más frecuentes manifestados por los pacientes infectados con *E. bienewsi* y/o *E. intestinalis*, donde destaca que 10 indivi-

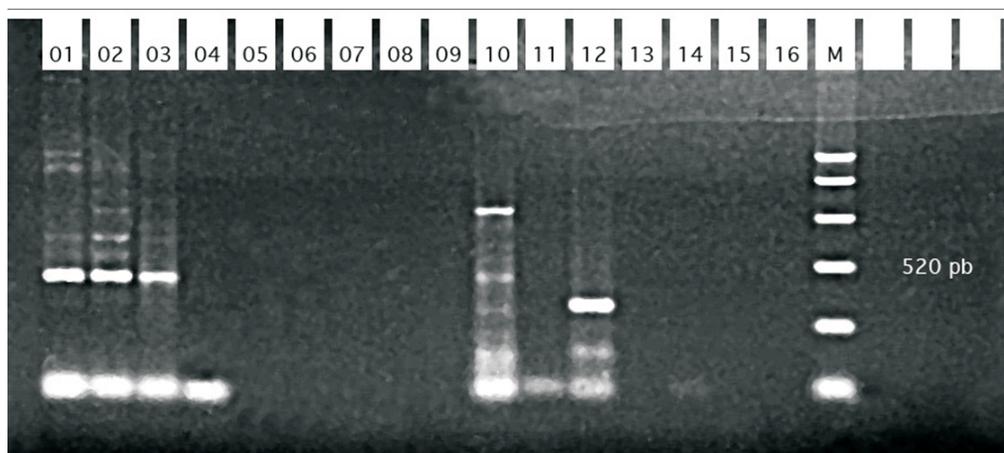


Fig. 1. Identificación por PCR de *Encephalitozoon intestinalis* en pacientes VIH positivos de Maracaibo, Venezuela. Carril M- Marcador de peso molecular. Carril 1: control positivo de referencia de *Encephalitozoon intestinalis*. Carril 16- Control negativo. Carriles 2 a 15: ADN extraído de muestras de pacientes utilizando oligonucleótidos SINTF-1 y SINTR. Carril 2 y 3 muestras positivas con *Encephalitozoon intestinalis*.

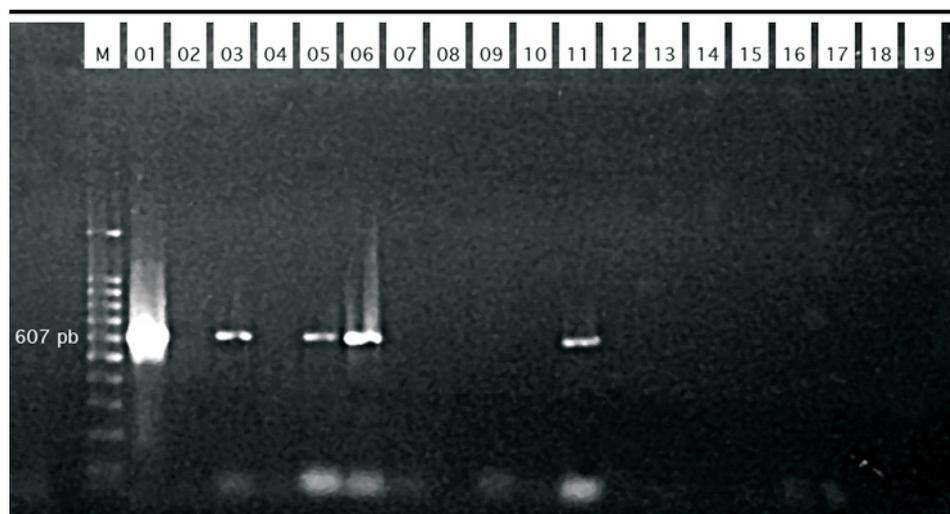


Fig. 2. Identificación por PCR de *Enterocytozoon bienewsi* en pacientes VIH positivos de Maracaibo, Venezuela. Carril M- Marcador de peso molecular. Carril 1: control positivo de referencia de *Enterocytozoon bienewsi*. Carril 2- Control negativo. Carriles 3 a 19: ADN extraído de muestras de pacientes utilizando oligonucleótidos EBIE-1 EBIER-1. Carriles 3, 5, 6 y 11 muestras positivas con *Enterocytozoon bienewsi*.

duos manifestaron diarrea, 7 presentaron pérdida de peso importante y 2 síndrome de desgaste.

El 42% de los individuos presentó valores de CD4 dentro de lo normal, es decir, mayor a 200 células/mm³, los resultados de estas pruebas pueden observarse en la Tabla II. Allí mismo puede apreciarse que, al bajar la cifra de CD4 aumenta la probabilidad de presentar infección por *E. bienewisi* y/o *E. intestinalis* y viceversa. Esta situación demostró ser estadísticamente significativa (p < 0,05).

En relación a la presencia de síntomas o no en los pacientes estudiados y las cifras de CD4, los asintomáticos (6 individuos) presentaron en su mayoría (4/5) cifras mayores a 200 células/mm³. No se pudo obtener el resultado de CD4 de uno de ellos.

DISCUSIÓN

La epidemiología de la microsporidiosis todavía está siendo determinada y la pre-

valencia varía enormemente en diferentes partes del mundo. No existen estudios en el país que revelen las prevalencias de *E. bienewisi* y/o *E. intestinalis* en específico, solo prevalencias generales en base a la presencia de esporas del phylum Microsporidia en las muestras fecales (10-12).

Al analizar los resultados obtenidos, en relación a las especies de microsporidios identificadas mediante PCR, se aprecia una mayor prevalencia de *E. intestinalis* que de *E. bienewisi*, situación diferente a la informada por la mayoría de las investigaciones previas a nivel mundial (9, 13-15), en donde *E. bienewisi* es más frecuente. Sin embargo, en un estudio realizado recientemente en pacientes VIH positivos en Francia, se refiere un mayor número de casos de infección por *E. intestinalis* que por *E. bienewisi* (16). Esta situación puede deberse a las variaciones epidemiológicas propias de cada región; pues aunque los mecanismos de transmisión de estos parásitos no han sido total-

TABLA I
SIGNOS Y SÍNTOMAS OBSERVADOS EN PACIENTES CON *Encephalitozoon intestinalis*
Y/O *Enterocytozoon bienewisi* DE MARACAIBO, VENEZUELA

Síntoma o signo	<i>Enterocytozoon bienewisi</i>	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	Ambas especies	Total
Diarrea	2	6	2	10
Pérdida de peso	3	2	2	7
Síndrome de desgaste	2	0	0	2
Síntomas gastrointestinales	1	0	0	1

TABLA II
VALORES DE LINFOCITOS CD₄ Y ESPECIES DE MICROSPORIDIOS EN PACIENTES VIH POSITIVOS DE MARACAIBO, VENEZUELA

Contaje	Nº	%	<i>E. intestinalis</i>	<i>E. bienewisi</i>	Ambas Especies	Total
Sin datos	8	16	0	2	1	3
≤ 200 células/mm ³	21	42	3	6	2	11*
> 200 células/mm ³	21	42	1	2	1	4
Total	50	100	4	10	4	18

*(p < 0,05).

mente definidos, se proponen la transmisión mediante aguas y alimentos contaminados, así como la transmisión zoonótica. La transmisión hídrica es una de las vías más estudiadas y existen informes de contaminación de aguas con *E. bienersi* y *E. intestinalis* en países latinoamericanos (17, 18).

Es importante reconocer la especie de microsporidio presente, pues el comportamiento biológico de cada parásito es relativamente diferente. *E. intestinalis* tiene riesgo de ocasionar infección diseminada, principalmente en riñón, hígado, vías biliares y aparato respiratorio (19). Generalmente *E. bienersi*, se limita a infectar el tracto gastrointestinal y causar diarrea; éste microorganismo en menor proporción puede infectar el epitelio de la vesícula biliar, conductos biliares, hígado, y aparato respiratorio alto (20). Por lo tanto, se requiere una mayor vigilancia clínica en el paciente infectado por *E. intestinalis*, situación que debe ser tomada en cuenta en los pacientes del SAHUM, donde fue la especie de microsporidio más prevalente. Se hace necesario conocer la prevalencia de la infección por microsporidios en la región, pues en muchos casos de diarreas crónicas en pacientes VIH positivos, no se llega a identificar algún patógeno entérico, por diversas razones; pero sobre todo porque no se solicita el descarte de estos parásitos en la muestra fecal. Además, existe el agravante de que en la mayoría de las instituciones de salud del estado y del país no se cuenta con la metodología necesaria, ni el personal entrenado para el diagnóstico de la microsporidiosis, esta situación debe ser atendida por los entes gubernamentales con prontitud.

La mayoría de los pacientes infectados por *E. intestinalis* y/o *E. bienersi* presentaron diarrea y pérdida de peso, en los pacientes inmunocomprometidos estas parasitosis provocan gastroenteritis secretorias con abundante pérdida de líquidos y electrolitos,

así como síndrome de mala absorción, caracterizado por pérdida de peso, desnutrición e hipovitaminosis. Además se observó, que 2 de ellos presentaban síndrome de desgaste. El síndrome de desgaste o emaciación suele ser uno de los primeros síntomas de SIDA, de acuerdo con la definición utilizada por el CDC (21), el síndrome de desgaste asociado a la infección por VIH se caracteriza por una pérdida de peso corporal (particularmente masa muscular) involuntaria y mayor del 10% respecto al peso normal de referencia, diarrea o debilidad crónica con fiebre durante un período superior a 30 días. Tal condición ha sido referida en pacientes VIH positivos infectados por microsporidios y/o coccidios intestinales con anterioridad (5, 22-24).

Aunque la mitad de los individuos estudiados presentaban contajes de CD4 dentro de los valores normales, en aquellos que tenían los valores más bajos de estos linfocitos ($< 100 \text{ cél/mm}^3$) se demostró infección por alguna de las especies de microsporidios estudiadas. Esto resultó estadísticamente significativo, demostrando una relación inversamente proporcional entre las cifras de CD4 y esta infección parasitaria. Tal situación ha sido descrita en investigaciones previas (25-27), Chabchoub y col. (16) refieren 23,9% de prevalencia de microsporidiosis en pacientes con contajes de $\text{CD4} < 200 \text{ cél/mm}^3$, en contraste con un 5,6% de prevalencia en los que tenían contajes de CD4 más altos. Esto sugiere que el paciente VIH positivo que presente cifras de CD4 muy bajas y diarrea crónica, debe ser arduamente estudiado para la detección e identificación de especies de microsporidios.

Efectivamente, en pacientes VIH positivos el mantener cifras de linfocitos CD4 superiores a 200 cél/mm^3 , permite una mayor protección contra muchos patógenos oportunistas. Aunque se estudiaron pocos individuos asintomáticos en la presente investigación, se evidenció que la mayoría de

ellos poseían valores de linfocitos dentro de los límites normales, presentando *E. intestinalis* solo 2 de ellos.

Según Abuín y Marino (28), el sistema inmune de la mucosa gastrointestinal juega un papel esencial en la fisiopatogenia de la infección por el VIH. Puede ser la puerta de entrada del virus VIH-1 y un sitio de infección y destrucción de linfocitos CD4. Se ha demostrado una marcada reducción en el número de células T CD4 de la población linfocitaria de la mucosa, acompañada de un incremento de células T CD8, que en ocasiones supera a lo encontrado en sangre periférica. La inmunodepresión de los órganos linfoides durante la infección crónica finalmente predispone al desarrollo de infecciones oportunistas, entre ellas las parasitarias. Aunque los factores de riesgo para la adquisición de infecciones parasitarias son las mismas en individuos inmunocompetentes que para los inmunodeficientes, la situación del sistema inmune define y modifica el establecimiento de la infección, controla la enfermedad una vez establecida (limitando la severidad y diseminación) y colabora en la eliminación o control del parásito.

Finalmente, es destacable la elevada prevalencia de especies de microsporidios observada en los pacientes VIH (considerando el bajo número de pacientes estudiados), con un predominio de la especie *E. intestinalis*. Así mismo, se observó una relación inversamente proporcional entre las cifras de CD₄ y la presencia de las especies de microsporidios.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Bornay Llinares, quien muy gentilmente obsequió el kit de extracción de ADN y los primers de microsporidios necesarios para la presente investigación.

Al Dr. Alexandre Dasilva del Center of Disease Control de Atlanta Estados Unidos (CDC/CCID/NCZVED), quien gentilmente

obsequió los controles clonados de *E. bienewsi* y *E. intestinalis*, usados en las PCR de este estudio.

REFERENCIAS

1. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología Médica. 6ta. edición. Barcelona, España. Editorial Elsevier. 2009. p. 839.
2. Bornay F, Acosta B, Peman J, Moura H, Schwartz D, Da Silva A, Vivesvara G, Figueras M, Gobernado M, Pieniazek N. Mantenimiento en cultivo y caracterización de un microsporidio (*Encephalitozoon hellem*) aislado en un paciente con SIDA y neumonía. Parasitol día 2000; 24:69-70.
3. Zhang X, Wang Z, Su Y, Liang X, Sun X, Peng S, Lu Hm jiang N, Yin J, Xiang M, Chen Q. Identification and genotyping of *Enterocytozoon bienewsi* in China. J Clin Microbiol 2011; 49:2006-2008.
4. Bedoya K, Montoya M, Botero J, Galvan A. Primer aislamiento de *Encephalitozoon intestinalis* a partir de muestra de material fecal de un paciente Colombiano con SIDA. Biomédica 2008; 28:441-447.
5. Stark D, Barratt J, van Hal S, Marriot D, Harkness J, Ellis J. Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. Clin Microbiol Rev 2009; 22: 634-650.
6. Fernández N, Combo A, Zanetta E, Acuña A, Gezuele E. Primer diagnóstico de microsporidiosis humana en Uruguay. Rev Méd Uruguay 2002; 18: 251-255.
7. **Protozoarios Intestinales módulo Microsporidiosis.** disponible en: http://unsl.edu.ar/~fqbf/departamentos/BioqBiol_/apuntes_archivos/analisis_clinicos/parasito/Modulo%204.doc
8. Botero J, Montoya M. Microsporidiosis intestinal: una visión integral. Infectio 2002; 6:213-225.
9. Botero J, Montoya M, Vanegas A, Diaz A, Martinez L, Bornay F, Izquierdo F, Del Aguila C, Agudelo S. Frecuencia de microsporidiosis intestinal en pacientes positivos para VIH mediante las técnicas de Gram cromotropo rápido y PCR. Biomédica 2004; 24:375-384.

10. Baez E, Arcay L, Reverand S, Otero E. Microspora: Etiological agent in chronic diarrhoea. *Rev Soc Ven Microbiol* 2000; 20:53-56.
11. Cermeño J, Hernández I, Uzcátegui O, Páez J, Rivera M, Baliachi N. Parasitosis intestinal en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana. *Kasmera* 2004; 32:101-107.
12. Chacín-Bonilla L, Panunzio A, Monsalve F, Parra I, Matínez R. Microsporidiosis in Venezuela: Prevalence of intestinal microsporidiosis and its contribution to diarrhea in a group of Human Immunodeficiency Virus-infected patients from Zulia State. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 482-486.
13. Muller A, Bialek R, Kamper A, Fatkenheuer G, Salzberger B, Franzen C. Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1630-1632.
14. Sarfati C, Bourgeois A, Menotti J, Liegeois F, Moyou-Somo R, Delaporte E, Derouin F, Ngole EM, Molina JM. Prevalence of intestinal parasites including Microsporidia in human immunodeficiency virus-infected adults in Cameroon: A cross-sectional study. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74:162-164.
15. Samie A, Obi C, Tzipori S, Weiss L, Guerrant R. Microsporidiosis in South Africa: PCR detection in stool samples of HIV-positive and HIV-negative individuals and school children in Vhembe district, Limpopo Province. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101:547-554.
16. Chabchoub N, Abdelmalek R, Issa S, Kanoun F, Ben T, Bouratbine A, Aoun K. Contribution of PCR for detection and identification of intestinal microsporidia in HIV-infected patients. *Pathol Biol* 2012; 60:91-94.
17. Dowd S, Gerba C, Pepper I. Confirmation of the human-pathogenic Microsporidia *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *App Environ Microbiol*. 1998; 64: 3332-3335.
18. Dowd S, John D, Eliopolus J, Gerba Ch, Naranjo J, Klein R, López B, De Mejía M, Mendoza C, Pepper I. Confirmed detection of *Cyclospora cayentanensis*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* in water used for drinking. *J Water Health*. 2003; 1:117-123.
19. Andrade R, Marcano M. Infecciones parasitarias en el paciente infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana: Aspectos etiológicos, clínicos, diagnósticos, terapéuticos y profilaxis. *Rev Soc Ven Microbiol* 2003; 23:169-174.
20. Matos O, Lobo ML, Xiao L. Epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* Infection in Humans. *J Parasitol Res*. 2012; 2012: 981424. 19 páginas.
21. Glosario de infoSIDA. Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC). Disponible en: <http://infosida.nih.gov/education-materials/glossary/4200/sindrome-de-emaciacion>;
22. Basak S, Bose S, Mallick S, Ghosh A. Intestinal parasitic infections in HIV seropositive patients-a study. *J Clin Diag Res* 2010; 4:2433-2437.
23. Raccurt C, Fouché B, Agnamey P, Menotti J, Chouaki T, Totet A, and Pape J. Short Report: Presence of *Enterocytozoon bieneusi* associated with intestinal coccidia in patients with chronic diarrhea visiting an HIV center in Haiti. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79: 579-580.
24. Endeshaw T, Kebede A, Verweij JJ, Zewide A, Tsige K, Abraham Y, Wolday D, Woldemichael T, Messele T, Polderman AM, Petros B. Intestinal microsporidiosis in diarrhoeal patients infected with the human immunodeficiency virus-1 using PCR and Uvitex-2B stain in Abbis Ababa. *Jpn J Infect Dis*. 2006; 59:306-310.
25. Asmuth D, DeGirolami P, Federman M, Ezratty C, Pleskow D, Desai G. Clinical features of microsporidiosis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1994; 18:819-825.
26. Sucilathangam G, Velvizhi G, Palaniappan N, Anna T. The prevalence of coccidian parasites in and around Tirunelveli in HIV positive individuals and its correlation with the CD4 count. *J Clin Diag Res* 2011; 5: 1182-1186.
27. Pavie J, Menotti J, Porcher R, Donay J, Gallien S, Sarfati C, Derouin F, Molina J.

Prevalence of opportunistic intestinal parasitic infections among HIV-infected patients with low CD4 cells counts in France in the combination antiretroviral therapy era. *Int J Infect Dis* 2012; 16:677-679.

28. **Abuín J, Marino R.** Diarreas de origen parasitario en pacientes HIV. Disponible en http://www.sasnac.org.ar/docs/cienciasclinicas/C/diarreas_de_origen_parasitario_en_pacientes_hiv.pdf.