

OTRAS INFECCIONES CORNEALES POR HONGOS: MICROSPORIDIOS

José M. Hervás Hernandis, Rodrigo Clemente Tomás, Noemí Ruiz del Río, Antonio Duch Samper

INTRODUCCIÓN

¿QUÉ SON LOS MICROSPORIDIOS?

Los «microsporidios» son unos microorganismos unicelulares eucariotas primitivos, pertenecientes al phylum *Microspora*. Son parásitos intracelulares obligados y carecen de mitocondrias; se transmiten vía su estado de espora resistente, «micro-espora» de 2 a 10 micras, que pueden sobrevivir durante largos periodos en el medio ambiente. Estas esporas (parásito infectivo en estado latente) están dotadas de doble pared y su citoplasma (esporoplasma) contiene el núcleo rodeado por el túbulo o filamento polar espiral (estructura diagnóstica de phylum), ribosomas y una vacuola. Todas estas estructuras visibles por microscopía electrónica (fig. 1). Incapaces de conseguir generar su propia energía al carecer de mitocondrias son dependientes del ATP mitocondrial de sus células hospedadoras.

Considerados anteriormente como protozoos, desde el año 2009 han sido oficialmente reclasificados como **hongos derivados del phylum Zygomycota**, que durante la evolución han «perdido» las mitocondrias. Aunque poseen unas estructuras reducidas derivadas de las mitocondrias denominadas mitosomas, a diferencia de éstas los mitosomas no contienen ADN (1). Con los hongos comparten genes (2), proteínas, ribosomas semejantes (3,4), y la presencia de quitina en la pared de la espora (5,6).

Cuando un hospedador se infecta con esporas de microsporidios, al contacto de éstas con la célula

del huésped se produce la extrusión del filamento o túbulo polar (figs. 2 y 3), a través del cual se produce la inyección del citoplasma de la espora (esporoplasma) comenzando la infección intracelular, seguida de multiplicación binaria múltiple y producción de esporas que serán excretadas al medio (fig. 3).

Estos microorganismos pueden infectar prácticamente a todas las clases de animales especialmente a los invertebrados, insectos y pescados;

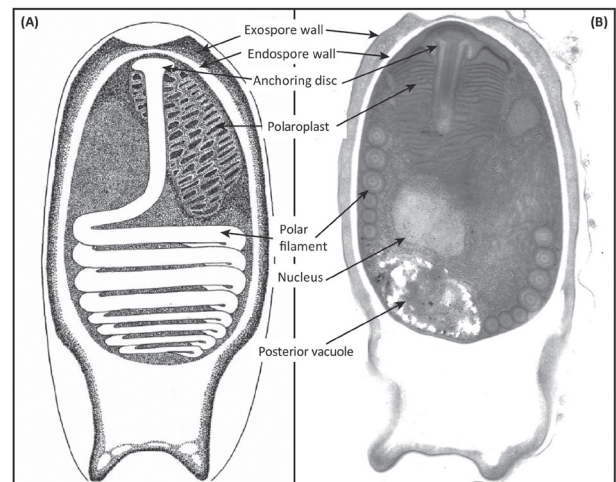


Figura 1. Ultraestructura de una típica espora de microsporidio. (A) Esquema. (B) Microscopía electrónica de transmisión. (Reimpreso de: *Trends in Parasitology* 2016, Vol: 32 (4); Stentiford GD, Becnel J, Weiss LM, Keeling P, Didier E, et al. *Microsporidia – Emergent Pathogens in the Global Food Chain*, pp. 336-348. Copyright 2016© The Authors, con licencia de Elsevier).



Figura 2. Micrografía electrónica de barrido de una espora de microsporidio con su túbulo polar extruido que está siendo insertado en una célula eucariota para su parasitación. La espora inyecta el esporoplasma infeccioso a través de su túbulo polar. (Cortesía de «DPDx - Parasite Image Library», CDC, EE.UU).

pero también a mamíferos e incluso a otros protozoos. Se han descrito más de 200 géneros con alrededor de 1.400 especies (7,8).

EPIDEMIOLOGÍA Y FUENTES DE INFECCIÓN

Sólo unas pocas especies pertenecientes a ocho géneros: *Nosema*, *Vittaforma*, *Brachiola*, *Pleistophora*, *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon* (anteriormente *Septata*) y *Trachi-*

pleistophora, han sido identificadas como patógenos en humanos (9) (tabla 1).

El primer caso de infección en humanos debido a estos organismos fue informado en 1959 en un niño con meningo-encefalitis (10), y posteriormente varios más fueron hallados en pacientes con SIDA, identificando el *Enterocytozoon bieneusi* como agente de graves infecciones gastrointestinales y del árbol hepato-biliar (11). En los años noventa se reporta el hallazgo de *Trachipleistophora hominis* (12) en un paciente con SIDA que padece una severa miositis. Pero estas situaciones no sólo se producen en individuos inmunodeficientes, las lesiones oculares causadas por estos parásitos pueden ocurrir en individuos sin problemas inmunológicos (13) (tabla 1).

Recientemente se ha evidenciado que la exposición a microsporidios en humanos es muy común y la «microsporidiosis intestinal crónica» generalmente no está ligada a ninguna manifestación clínica en la población sana (14-16).

Los microsporidios son organismos ubicuos encontrados en todo el medio ambiente. Considerados como zoonosis (enfermedad propia de animales que accidentalmente puede transmitirse a las personas) varias especies de microsporidios que infectan a seres humanos también infectan mamíferos salvajes y domésticos (tabla 1). Los animales infectados excretan las esporas con orina y heces y éstas se difunden y propagan en el medio ambiente, tierra y

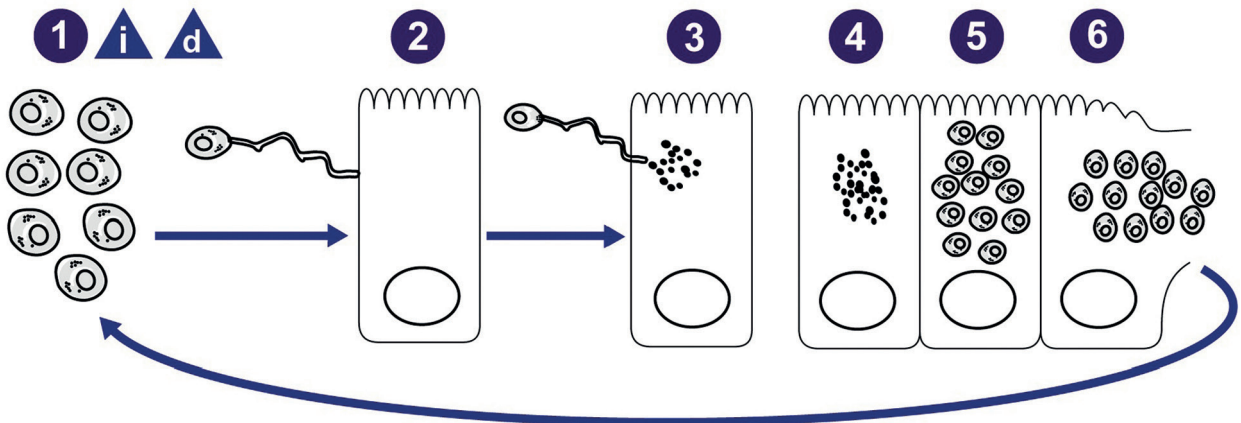


Figura 3. Ciclo biológico infeccioso de los microsporidios. (1) Espora (forma contagiosa). (2) La espora extruye su túbulo polar para infectar la célula huésped. (3) La espora extruye el túbulo polar e inyecta su citoplasma infeccioso en la célula huésped. (4) En el interior de la célula el esporoplasma sufre una amplia multiplicación asexual, con división múltiple (merogonia o esquizogonia). Este desarrollo puede ocurrir ya sea en contacto directo con el citoplasma de la célula huésped (p.ej., *E. bieneusi*) o dentro de una vacuola denominada vacuola parasitofórica (p.ej., *E. intestinalis*). (5) Libres en el citoplasma o dentro de una vacuola parasitofórica, los microsporidios se desarrollan por esporogonia a las esporas maduras. Durante la esporogonia, se forma una pared gruesa alrededor de la espora, que proporciona resistencia a las condiciones ambientales adversas. (6) Cuando las esporas aumentan en número y llenan completamente el citoplasma de la célula huésped, la membrana celular se rompe y libera las esporas a los alrededores. Estas esporas maduras libres pueden infectar nuevas células o ser excretadas al medio ambiente y así continuar el ciclo. (Cortesía de «DPDx - Parasite Image Library», CDC, EE.UU).

Tabla 1. Principales agentes de microsporidiosis humanas

MICROSPORIDIO		SÍNDROMES CLÍNICOS		Reservorio Animal
Género	Especie	Pacientes inmuno-suprimidos	Pacientes inmuno-competentes	
<i>Anncaliia</i> (antes: <i>Brachiola</i>)	<i>algerae</i>	Infección cutánea, miositis		Mosquitos
	<i>connori</i>	Infección diseminada		
	<i>vesicularum</i>	Miositis		Desconocido
<i>Pleistophora</i>	spp.	Miositis		
<i>Trachipleistophora</i>	<i>hominis</i>	Miositis Queratoconjuntivitis Queratitis estromal		
	<i>anthropoptera</i>	Queratitis Estromal		
Vittaforma	corneae		Queratoconjuntivitis Queratitis estromal	Desconocido
<i>Encephalitozoon</i>	<i>hellum</i>	Queratoconjuntivitis Queratitis estromal Bronquiolitis, neumonía, rinosinusitis, absceso prostático, infección diseminada		Loros, periquitos, tórtolas, aves en general
	<i>cuniculi</i>	Queratoconjuntivitis Peritonitis, hepatitis fulminante, encefalitis, rinosinusitis, infección diseminada		Conejos, roedores, perros, zorros, cerdos, gatos, cabras, caballos, monos, etc.
	<i>intestinalis</i> (antes: <i>Septata intestinalis</i>)	Queratoconjuntivitis Diarrea, infección diseminada	Diarrea Autolimitada	Cabras, vacas, burros, perros, cerdos, gorilas
<i>Enterocytozoon</i>	<i>bieneusi</i>	Diarrea crónica, síndrome de desgaste, colecistitis, colangitis, bronquiolitis, neumonía	Diarrea Autolimitada	Cerdos, conejos, perro, gato, vaca, cabra, llama, pavo, pollo, nutria, mapache, rata almizclera, monos
<i>Nosema</i>	<i>ocularum</i>		Queratitis estromal	Desconocido
« <i>Nosema-like</i> »		Miositis	Queratitis estromal	Desconocido
<i>Microsporidium</i>	<i>ceylonensis</i>		Queratitis estromal	Desconocido
	<i>africanum</i>		Queratitis estromal	Desconocido

agua. De este modo los posibles reservorios de microsporidios incluyen animales infectados, algunos humanos y aguas contaminadas (tabla 1).

En las microsporidiosis humanas no hay constancia, salvo excepciones (17), de la transmisión zoonótica directa de animales a los seres humanos. Los modos probables de transmisión humana incluyen la infección horizontal: fecal-oral, la ruta oral-

oral, la inhalación de aerosoles contaminados, y la ingestión de alimentos y agua. (18-20). En el caso de la infección corneal la transmisión se produciría habitualmente por una exposición ocular a una fuente de agua (o barro) contaminada (21) o una inoculación directa.

La transmisión hídrica es la fuente más probable para la propagación de esporas de microspo-

ridios. Éstas son generalmente resistentes al medio ambiente y sobreviven por largos períodos de tiempo en el agua. La detección de microsporidios en diferentes muestras de aguas indicaría que ésta sería la forma potencial de transporte de estos parásitos. Muchas especies de microsporidios patógenos son excretados con heces (*E. bienersi*), orina y secreciones respiratorias (*Encephalitozoon* sp.) de animales infectados que contaminarían el agua de suministros (20). Diferentes especies de microsporidios que infectan a los seres humanos, tales como *E. bienersi*, *E. intestinalis*, *E. hellem*, *E. cuniculi*, *A. algerae*, y *Vittaforma corneae* se han identificado en diversos orígenes de agua incluyendo aguas superficiales, subterráneas, agua de canales, agua de irrigación, agua de usos recreativos, agua potable, y aguas residuales en todo el mundo (21-25).

VITTAFORMA CORNEAE

Con un «nombre propio» dedicado a la córnea, este microsporidio fue el primero que se consiguió establecer en un cultivo celular a partir del estroma corneal de un paciente con queratitis, y se designó como *Nosema corneum* (13). En 1995 fue mejor caracterizado y se determinó que difería bastante del género *Nosema* y fue reubicado en un nuevo género pasando a denominarse como *Vittaforma corneae* (*V. corneae*) (26).

Entre aproximadamente 1.400 especies de microsporidios conocidas, resulta llamativo que las queratitis por microsporidios, tanto la forma epitelial como la estromal, están de forma predominante producidas por *V. corneae* (pacientes no VIH) (tabla 2). También, a diferencia de otros microsporidios que pueden producir patologías en diferentes órganos, *V. corneae* únicamente produce infección corneal (tabla 1), sólo se ha descrito en un único caso, otra forma de infección en humanos (27). Aunque es sabido que diferentes especies de microsporidios son transmitidas por varias rutas causando infecciones en diferentes órganos, es posible que este microsporidio posea una especial afinidad hacia el tejido corneal.

Se ha apuntado a amebas de vida libre como los posibles hospedadores de este hongo unicelular (28), y en el análisis filogenético su rRNA ha revelado especies de microsporidios que infectan artrópodos como las más estrechamente relacionadas con *V. corneae* (29). Pero, a diferencia del resto de los microsporidios, su reservorio animal se desconoce con certeza (tabla 1).

Aunque no se han identificado todavía sus reservorios naturales, parece ser un parásito ubicuo y ha sido detectado por PCR en investigaciones de aguas superficiales en los Estados Unidos, Europa y Asia (21,22,28).

QUERATITIS POR MICROSPORIDIOS

El primer caso descrito de microsporidiosis ocular en humanos fue documentado por Ashton y Wirasinha en 1973 al realizar el análisis histológico del botón corneal de un niño tamil «con una córnea cicatrizada y vascularizada» (tras haber sido corneado por una cabra en dicho ojo) que fue sometido a una queratoplastia penetrante. Denominaron a esta patología como **encefalitozoonosis** o **nosematosis ocular** (30).

Aunque existen casos aislados descritos de escleroqueratitis (31), endoftalmitis (32), limbitis y endotelitis difusa (33); se han descrito tres formas clínicas de afectación corneal por microsporidios bien diferenciadas (tabla 2):

- **Queratoconjuntivitis en pacientes con SIDA.**
- **Queratoconjuntivitis en pacientes sanos.**
- **Queratitis estromal («nosematosis corneal»).**

QUERATOCONJUNTIVITIS EN PACIENTES CON SIDA

A finales de 1989 y principios de 1990 fueron descritos en Estados Unidos los primeros casos de queratoconjuntivitis por microsporidios en pacientes con SIDA (34-36). Desde entonces hasta nuestros días son abundantes los casos referidos en la bibliografía. Al menos cuatro especies diferentes de microsporidios han sido reseñados como agentes de esta queratoconjuntivitis: *Encephalitozoon hellem* (37-42), *Encephalitozoon cuniculi* (34,43-45), *Encephalitozoon* (antes: *Septata*) *intestinalis* (46) y *Trachipleistophora hominis* (12) (tabla 2). La fuente de infección serían los animales domésticos como perros, gatos, aves, etc.

Del mismo modo que ocurre con otras múltiples infecciones oportunistas propias del SIDA (coriorretinitis por citomegalovirus), los pacientes afectados por esta patología se presentaban en un estadio avanzado de SIDA y un acentuado estado de inmunosupresión con contajes de linfocitos-T CD4 \leq 50 (47,48). En nuestros días, los regímenes de terapia combinada de anti-retrovirales, la denominada terapia HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy), han traído numerosos cambios en el contexto del SIDA al conseguir una efectiva restauración del sis-

Tabla 2. Microsporidiosis ocular: formas clínicas y especies implicadas

TIPO DE QUERATITIS	Presentación	Agente etiológico
Queratoconjuntivitis pacientes con SIDA	Bilateral	<i>Encephalitozoon hellem</i> <i>Encephalitozoon cuniculi</i> <i>Encephalitozoon intestinalis</i> <i>Trachipleistophora hominis</i>
Queratoconjuntivitis pacientes sanos	Unilateral o Bilateral	Vittaforma corneae Otros Microsporidios no filiaados
Queratitis Estromal («Nosematosis» corneal)	Unilateral	Vittaforma corneae Otros: <i>Nosema algera</i> <i>Nosema ocularum</i> <i>Trachipleistophora hominis</i> <i>Trachipleistophora anthropoptera</i> <i>Encephalitozoon hellem</i> <i>Microsporidium africanum</i> <i>Microsporidium ceylonensis</i>

tema inmune y con ello tanto ésta como el resto de las infecciones oportunistas se han visto relegadas. De este modo, los casos de queratoconjuntivitis por microsporidios que en la actualidad se diagnostican, corresponden generalmente a enfermos con diagnóstico de SIDA reciente y cifras bajas de linfocitos a los que se les inicia en la terapia HAART (49-51).

Manifestaciones Clínicas. - La afectación suele ser bilateral y generalmente asimétrica, discreta o moderadamente sintomática. Los pacientes refieren sensación de cuerpo extraño, fotofobia, irritación o leve dolor, ojo rojo y, en ocasiones, disminución de agudeza visual. En la exploración se aprecia conjuntivitis y queratitis punctata epitelial difusa de predominio interpalpebral, generalmente bilateral (fig. 4), que tiñe discretamente con fluoresceína. Habitualmente la hiperemia conjuntival es discreta y, de manera característica, localizada en fórnix y conjuntiva tarsal inferior. En ocasiones existe reacción folicular asociada. La agudeza visual se encuentra variablemente afectada entre 10/10 a 10/100 y puede asociarse a una iritis de intensidad mediana (47,48). Excepcionalmente, esta queratitis se puede complicar con un defecto epitelial y queratitis bacteriana secundaria (34). El diagnóstico diferencial debe realizarse fundamentalmente con la queratoconjuntivitis sicca, la queratitis trófica y la queratitis por ganciclovir (47).

Es importante considerar que la infección corneal en estos pacientes inmunodeprimidos suele ser, una manifestación más de una microsporidiosis

asociada en otro órgano: rinosinusal (52), intestinal, urinaria (40) o diseminada (53,54). Esto tiene importantes implicaciones de cara al diagnóstico y tratamiento. De este modo, ante una microsporidiosis ocular confirmada en un paciente con SIDA, se deberán obtener muestras de orina, heces y tracto respiratorio para descartar infección simultánea por microsporidios.

Se puede establecer el diagnóstico con el estudio del raspado corneal e incluso a pesar de la poca participación conjuntival a partir del frotis conjuntival, mediante microscopía óptica o PCR (47). Generalmente la biopsia será innecesaria (tablas 4 y 5). Los métodos de diagnóstico y el tratamiento se exponen con detalle en los siguientes apartados.



Figura 4. Queratoconjuntivitis por microsporidios en paciente con SIDA. (Cortesía de la Dra. M.^a Paz Rodríguez).

QUERATOCONJUNTIVITIS POR MICROSPORIDIOS EN PACIENTES SANOS

En 1997 (55) y 2001 (56) se describieron los primeros casos de microsporidiosis epitelial en individuos sanos sin inmunodeficiencia adquirida. Desde entonces no cesan de comunicarse otros casos similares (33,45,57-73) Esta afección es mucho más usual de lo que se cree y es habitualmente infradiagnosticada por el oftalmólogo y microbiólogo por su desconocimiento, inadecuado estudio y procesamiento de muestras, así como por su clínica en muchos casos autolimitada. En la mayoría de los casos en que se ha identificado la especie de microsporidio implicado, éste fue *Vittaforma corneae* (65-67,74,75) y sólo en una ocasión microsporidios del género *Nosema* fueron la causa (76) (tabla 2).

Como factores predisponentes de esta queratitis se describen el uso tópico de corticoides (57,77) el porte de lentes de contacto (56), pequeños traumatismos corneales (57), exposición a tierra y lodo (62,66,67), a aguas turbias de arroyos (57,60) o aguas termales (64), queratoplastia penetrante (77), la cirugía refractiva LASIK (58,78) y tras tratamiento del queratocono mediante CLX (69). También se han señalado como factores de riesgo la picadura de insectos (60), el contacto estrecho con animales domésticos que pueden ejercer de hospedadores (pájaros y gatos), e incluso la transmisión de la enfermedad al ojo desde una sinusitis por microsporidios (79).

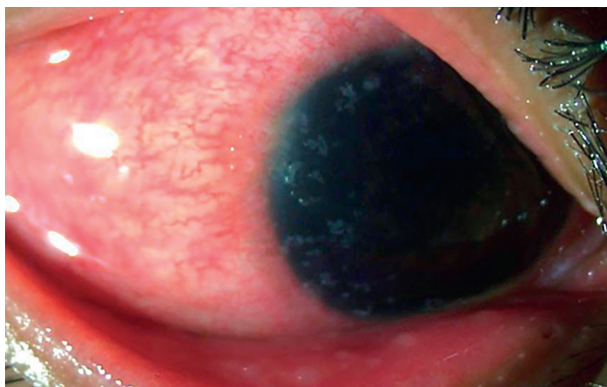


Figura 5. Queratoconjuntivitis por microsporidios, en paciente sano. Lesiones epiteliales parcheadas de aspecto rugoso, sobreelevadas y difusas, con hiperemia conjuntival. (Open Journal of Ophthalmology 2015. Vol: 05 (03); Sridhar U, Ur Rahman A, Batra J, Sapra N, *Ocular Microsporidiosis—Our Experience in a Tertiary Care Centre in North India*, pp: 130-138. Scientific Research Publishing Inc. Copyright ©2015 by authors and Scientific Research Publishing Inc. doi:10.4236/ojoph.2015.53020. Licencia Creative Commons CC BY 4.0, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Recientes estudios indican una mayor prevalencia en la estación lluviosa en la India (63). Asimismo, pueden darse situaciones de brotes epidémicos estacionales (80,81) o contagios simultáneos colectivos (66,67,82). No obstante, esta patología también se puede presentar sin ninguno de los antecedentes anteriores (59). **No se ha documentado la posible transmisión de esta infección de persona a persona.**

Manifestaciones Clínicas. - Los pacientes refieren irritación o dolor ocular leve, lagrimeo, enrojecimiento ocular, visión borrosa y agravamiento de la sintomatología previa si la había (45,55-59). La afección suele ser unilateral (33,45,55-71,73,83) aunque en algunos casos (5%) se puede presentar de forma bilateral (59,62,76,81).

La biomicroscopía revela en todos los pacientes múltiples lesiones epiteliales difusas, predominantemente en la zona interpalpebral, con tamaño y forma variables desde puntiformes a algo mayores, distribuidas por todo el epitelio, discretamente sobreelevadas y rugosas, situadas a nivel del epitelio o subepiteliales (incluso en estroma superficial), permaneciendo transparente el estroma y epitelio corneal entre las lesiones (figs. 5 y 6). Estas lesiones tiñen irregularmente con fluoresceína (fig. 7). Se asocia una conjuntivitis leve, no purulenta, en todos los casos y reacción papilar en conjuntiva tarsal superior e inferior en algunos. Incluso puede presentarse una reacción inflamatoria leve en cámara anterior con tyndall y precipitados endoteliales (33,45,55-59). En ocasiones puede aparecer endotelitis difusa, con edema corneal y limbitis (fig. 5) (33).



Figura 6. Queratoconjuntivitis por microsporidios. (Reimpreso de: British Journal of Ophthalmology 2017, Vol: 101 (10) pp: 1436-1439; Agashe R, Radhakrishnan N, Pradhan S, Srinivasan M, Prajna V et. al. *Clinical and demographic study of microsporidial keratoconjunctivitis in South India: a 3-year study (2013–2015)*. Copyright ©2017. doi:10.1136/bjophthalmol-2016-309845. Con licencia de BMJ Publishing Group Ltd).

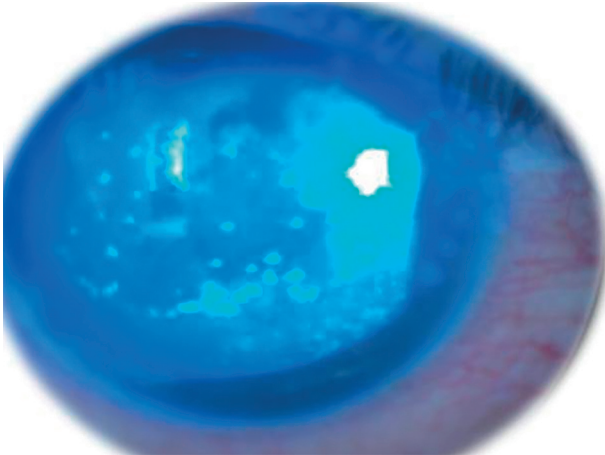


Figura 7. Queratoconjuntivitis por microsporidios. Las lesiones epiteliales tiñen irregularmente con fluoresceína. (Open Journal of Ophthalmology 2015. Vol: 05 (03); Sridhar U, Ur Rahman A, Batra J, Sapra N, *Ocular Microsporidiosis-Our Experience in a Tertiary Care Centre in North India*, pp: 130-138. Scientific Research Publishing Inc. Copyright ©2015 by authors and Scientific Research Publishing Inc. doi:10.4236/ojoph.2015.53020. Licencia Creative Commons CC BY 4.0, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

En la mayoría de los casos esta afección puede ser autolimitada e incluso cesar tras el uso de corticoides. En otros pacientes, la queratopatía puede persistir hasta que se instaura un tratamiento antiinfeccioso adecuado. La persistencia de la clínica es muy variable, desde uno o dos días hasta dos años (60), pudiendo recidivar tras el cese de la sintomatología (33).

En las etapas finales, algunos pacientes (25%) desarrollan una queratitis numular cicatricial con leucomas en estroma anterior y/o subepitelial (33,64). Estas lesiones son similares a la infiltración subepitelial después de una queratoconjuntivitis vírica (84).

El diagnóstico diferencial se debe realizar especialmente con la queratoconjuntivitis epidémica por adenovirus (fig. 8) y queratitis de Thygeson (fig. 9); pero también con la queratoconjuntivitis sicca, queratopatías por toxicidad epitelial, con la «queratitis numular de Dimmer» (que no sería una patología específica sino un grupo heterogéneo de enfermedades y probablemente esta misma), queratitis numular del herpes zóster, queratitis por *Acanthamoeba*, (85) y con las queratitis multifocales atípicas en portadores de lentillas.

Signos que nos ayudan a diferenciar los infiltrados en las queratitis por microsporidios de las producidas por el adenovirus y queratitis de Thygeson son, el mayor tamaño de las lesiones punteadas de la queratitis epitelial, su morfología

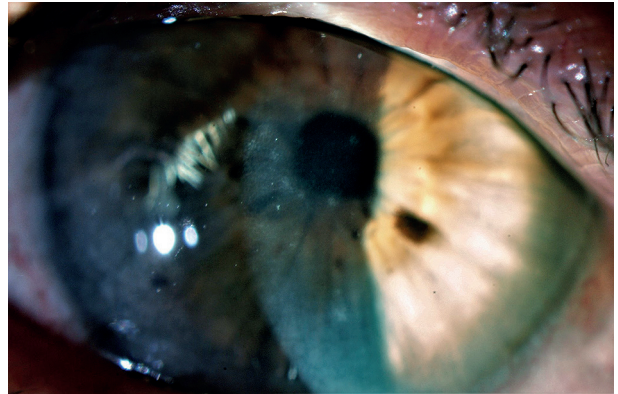


Figura 8. Queratoconjuntivitis epidémica por adenovirus.

grisácea-blanquecina, ligeramente sobreelevadas; y el que las lesiones se pueden retirar por desbridamiento corneal dejando pequeños hoyos en el epitelio corneal. El tratamiento con corticoides tópicos en las queratitis por microsporidios no produce mejoría de los infiltrados y sí en las otras dos entidades.

El diagnóstico de confirmación será microbiológico (se expone con detalle en el siguiente apartado) y se realiza a partir del estudio del raspado corneal o biopsia corneal, aunque ésta generalmente será innecesaria (tablas 4 y 5).

QUERATITIS ESTROMAL POR MICROSPORIDIOS

La microsporidiosis estromal es una afección ocular infrecuente y todos los casos descritos son unilaterales. El primer caso de queratitis estromal por microsporidios (30) fue atribuido a un microsporidio del género *Nosema* («**nosematosis corneal**»). Más tarde, el agente productor de esta ulceración fue tipificado como *Microsporidium ceylonensis* (86). En 1981 se comunica el segundo caso de «queratitis ulcerativa con perforación» por microsporidios (87), también atribuida inicialmente al género *Nosema* y posteriormente filiada como *Microsporidium africanum* (86). Estas dos primeras descripciones corresponderían a formas de queratitis estromal evolucionadas y diagnosticadas tardíamente. Tras estos primeros casos referidos, el número de pacientes descritos hasta la fecha va en constante aumento (30,72,75,87- 98).

Esta queratitis estromal se produce en pacientes sin patología general y no se asocia al SIDA. El mecanismo de contagio e inoculación es desconocido. Pueden existir antecedentes de traumatismo o cirugía corneal (99-101). En la mayoría de estas queratitis estromales el microsporidio

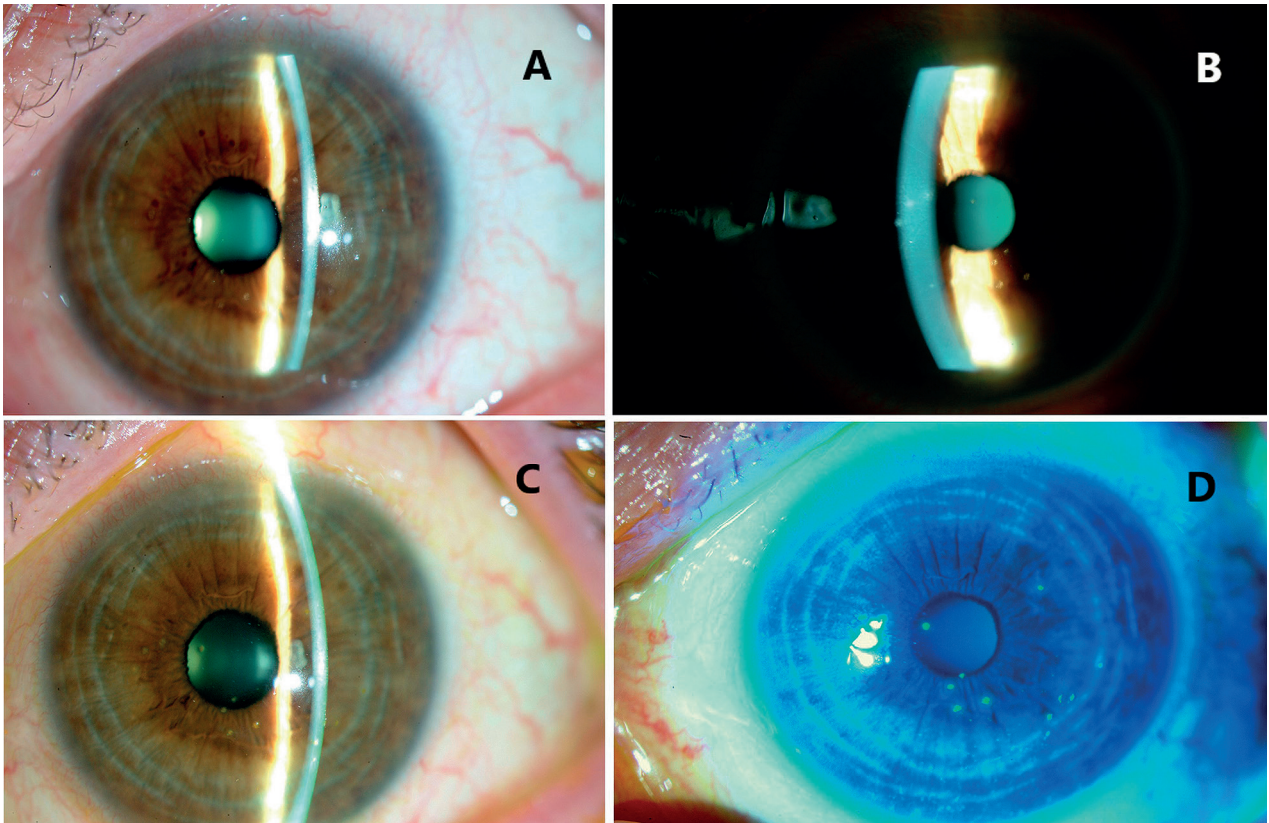


Figura 9. Queratoconjuntivitis de Thygeson. (C, D) Tinción con fluoresceína. En la exploración biomicroscópica, la queratoconjuntivitis de Thygeson es semejante a la queratoconjuntivitis por microsporidios en pacientes sanos.

responsable fue *Vittaforma corneae* (antes *Nosema corneum*) (88,102-104) aunque también están descritas por *Trachipleistophora hominis* (104),

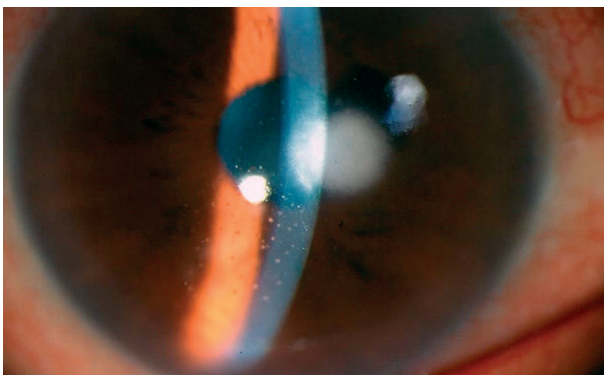


Figura 10. Queratitis estromal por microsporidios. Fotografía clínica que muestra una lesión blanquecina paracentral intraestromal y precipitados endoteliales retroqueráticos medianos. (Revista Mexicana de Oftalmología 2017, *Microsporidiosis corneal. Reporte de casos y revisión de la literatura*, vol:91(1) pp: 30-34; Gullías Cañizo R, Hernández Ayuso Y, Ríos y Valles D, Sánchez Huerta V, Rodríguez Reyes A. Copyright ©2016 Sociedad Mexicana de Oftalmología. <https://doi.org/10.1016/j.mexoft.2015.10.009>. Licencia Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Nosema algera (105) y *Trachipleistophora anthropoptera* (91) (tabla 2).

Aunque no existen referencias acreditadas de episodios de queratitis epitelial por microsporidios que hayan desembocado en una queratitis estromal por microsporidios, resulta razonable pensar, dado que el germen responsable en la mayoría de los casos en las dos formas clínicas es el mismo (*V. corneae*), que muchas de las queratitis estromales en las que no existió un antecedente traumático previo podrían ser formas evolutivas, sin una resolución espontánea, de queratitis epiteliales previas.

Manifestaciones Clínicas. - Clínicamente se presenta como una queratitis estromal unilateral no supurativa con infiltrados estromales de apariencia variable (figs. 10 y 11) (88,90,98,102-106). Los infiltrados estromales pueden ser únicos o múltiples y parcheados, blanco-amarillentos o blanco-grisáceos densos, centrales o paracentrales, en ocasiones con apariencia de queratitis cristalina (72,90), con edema corneal asociado y el epitelio suprayacente respetado. También puede presentarse como un único infiltrado central disciforme o infiltrado en anillo como en la queratitis por *Acanthamoeba*

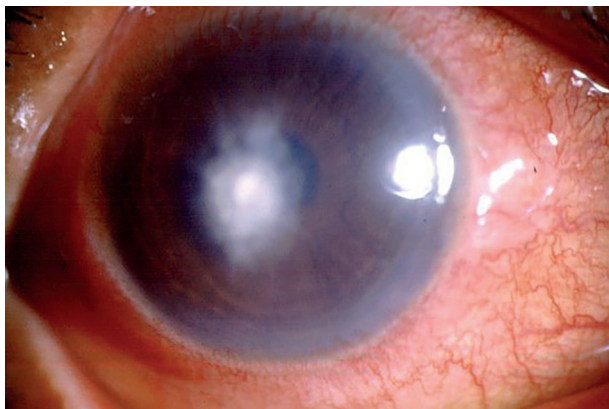


Figura 11. Queratitis estromal por microsporidios. (BMC Ophthalmology 2005, *¿Is Microsporidial keratitis an emerging cause of stromal keratitis? – a case series study*, vol: 5 (1) pp: 19; Vemuganti G, Garg P, Sharma S, Joseph J, Gopinathan U, et. al. Copyright 2005 ©Vemuganti et al. <https://doi.org/10.1186/1471-2415-5-19>. Licencia Creative Commons CC BY 2.0, <http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>).

(107). Suele existir una reacción inflamatoria asociada en cámara anterior (precipitados endoteliales, tyndall) (fig. 10) que puede llegar a ser importante, incluso con hipopión (107). La reacción hiperémica conjuntival puede ser de discreta a importante. En fases iniciales no existe neovascularización corneal, pero a medida que pasa el tiempo y avanza el infiltrado, aparecen neovasos corneales a partir del limbo. Los pacientes habitualmente son tratados con corticoides mejorando ostensiblemente la hiperemia, pero el infiltrado corneal sigue progresando. En algún caso más evolucionado puede asociarse un defecto epitelial persistente (103) y adelgazamiento progresivo que conduzca a la perforación (87,103).

La queratitis puede asemejar la producida por herpes simple o fúngica, con las que suelen ser confundidas (97,100), pero los pacientes carecen de antecedentes de queratitis herpética y todos los estudios a partir de los frotis y raspados corneales en busca de bacterias, virus y hongos son negativos. Así pues, a menudo los pacientes han sido tratados previamente sin éxito con antivíricos, antibióticos o antifúngicos. Se debe sospechar esta patología especialmente ante una queratitis estromal con un curso lentamente progresivo de la enfermedad, con todos los estudios negativos y refractaria al tratamiento (100).

En muchos de los casos no se consigue el diagnóstico hasta la evaluación de los botones corneales de los pacientes trasplantados por queratitis estromal «de causa desconocida». Histológicamente estos microorganismos no se tiñen

de forma predecible con las tinciones habituales (hematoxilina–eosina) y fácilmente pueden pasar desapercibidos; distinguiéndose una queratitis inflamatoria profunda con infiltración de células polimorfonucleares, histiocitos y neutrófilos y zonas de necrosis asociadas al engrosamiento de la córnea (90,108).

Ante una queratitis estromal con sospecha de esta patología habrá que emplear tinciones histológicas más específicas. Las técnicas de diagnóstico exponen con detalle en el siguiente apartado. Se puede realizar con microscopía confocal, a través del estudio histopatológico con microscopía óptica y electrónica, o también mediante técnicas moleculares; bien sobre el tejido obtenido mediante raspado (100) o biopsia corneal (88,102,104), o bien del botón corneal examinado tras una queratoplastia (87,103,104) (tablas 3, 4 y 5).

DIAGNÓSTICO

Hay que tener en cuenta que se debe hacer un diagnóstico diferencial para la microsporidiosis ocular cuando aparezcan queratitis epiteliales superficiales o estromales profundas que no respondan a la terapia convencional. El diagnóstico diferencial en la mayoría de los casos deberá apoyarse en análisis histopatológicos del tejido afectado. Se adjunta un resumen de las técnicas diagnósticas y tipos de muestra recomendadas para el diagnóstico de la microsporidiosis ocular (tablas 4 y 5).

TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras oculares para el diagnóstico puede realizarse mediante raspados, torundas de algodón o biopsias conjuntivales o corneales, incluso el botón corneal procedente de trasplante (tabla 4).

En general, en las queratoconjuntivitis se obtiene un buen rendimiento en organismos tanto en la conjuntiva como en el epitelio corneal. Si se van a realizar tinciones específicas o estudios de microscopía electrónica, es mejor tomar varias muestras. La morbilidad del raspado de la superficie corneal es mayor que la del raspado conjuntival, pero en varios días se realiza una completa reepitelización de la córnea (109).

La biopsia corneal es a menudo innecesaria, especialmente en los casos de queratoconjuntivi-

Tabla 3. Características ultraestructurales de microsporidios patógenos humanos

GÉNERO	VP	Núcleo	Merogonia	Esporogonia	VE	Espora
<i>Brachiola</i>	No	Doble	Fisión binaria	Disporoblástica	No	Binucleadas 2 x 2,9 µm. Tp: 8-10 vueltas en 1 a 3 hileras. (usualmente 2)
<i>Encephalitozoon</i>	Sí	Único	Fisión binaria	Fisión binaria	No	Uninucleadas 1,15 x 2-2,5 µm. Tp: 4-7 vueltas.
<i>Enterocytozoon</i>	No	Único	Plasmodios multinucleados	Poliesporoblástica	No	Uninucleadas 0,7-1 x 1-1,6 µm. Tp: 4-7 vueltas en doble hilera.
<i>Nosema</i>	No	Doble	Fisión binaria o múltiple	Disporoblástica	No	Binucleadas 2-2,5 x 5 µm. Tp: 11-12 vueltas.
<i>Pleistophora</i>	No	Único	Plasmodios multinucleados	Polloesporoblástica	Sí	Uninucleadas 2,8 x 3,2-3,4 µm. Tp: 9-12 vueltas.
<i>Trachipleistophora</i>	No	(*)	Fisión binaria o plasmotomía	Fisión binaria	Sí	Uninucleadas 2,4 x 4,0 µm. Tp: Vacuola posterior prominente.
<i>Vittaforma</i>	No	Doble	Fisión binaria	Polloesporoblástica	No	Binucleadas 1,2 x 3,2 -3,4 µm. Tp: 5-7 vueltas.

VP: vacuola parasitófora; VE: vesícula esporófora; Tp: tubo polar.
(*) Merontes: estadios con 2 a varios núcleos. Esporontes y esporoblastos: uninucleados.

vitis por microsporidiosis ocular, porque los parásitos pueden obtenerse muy bien de tejidos corneales o conjuntivales más superficiales (109). La biopsia corneal se utiliza generalmente en los

casos de queratitis estromal y, en general, en los casos en los que los cultivos y los raspados han fallado a la hora de mostrar los organismos implicados.

Tabla 4. Diagnóstico en microsporidiosis ocular: tipos de muestras

TÉCNICA	Tipo de muestra	Queratoconjuntivitis	Queratitis estromal	
Microscopía óptica	Citología			
		Frotis conjuntival	+ / ++	-
		Raspado corneal	++	+
	Histología	Biopsia corneal o botón corneal	++	++
Microscopía electrónica	Histología	Biopsia corneal o botón corneal	++	++
Métodos moleculares		Frotis conjuntival Raspado corneal Biopsia corneal o botón corneal	++	++

++ De elección. + Menor utilidad. - No útil.

Tabla 5. Técnicas diagnósticas microsporidiosis ocular		
MICROSCOPIA ÓPTICA		
• Querato-Conjuntivitis:	Citología	
Frotis conjuntival o raspado corneal		
Cromotrope:	+++	
<i>(Tricómico Weber, Ryan blue, Gram cromotrope)</i>		
Tinción ácido-alcohol 1% (Kinyoun, Ziehl-Neelsen)	+++	
Gram.....	++	
Giemsa	+/-	
Quimiofluorescencia* (Calcoflúor u otros).....	+++	
Inmunofluorescencia directa por anticuerpos	(++)	
• Queratitis Estromal:	Histología	
Biopsia ó botón corneal		
Gram chromotrope.....	+++	
Tinción histológica ácido-alcohol 1% (Ziehl-Neelsen).....	+++	
Tinciones de Gram histológicas:	++	
<i>(Brown-Brenn, Brown-Hopps)</i>		
Tinciones de plata:	++	
<i>(Warthin-Starry, Grocott-methenamina)</i>		
Hematoxilina – Eosina	+	
P.A.S.	+	
Giemsa	+	
Azul de toluidina (secciones plásticas finas)	++	
Quimiofluorescencia* (Calcoflúor u otros).....	+++	
Inmunofluorescencia directa por anticuerpos*.....	(++)	
MICROSCOPIA CONFOCAL		
• Querato-Conjuntivitis y Queratitis Estromal.....	++	
P.C.R. Y SECUENCIACIÓN DE ADN		
• Querato-Conjuntivitis:	Frotis conjuntival o raspado corneal	+++
• Queratitis Estromal:	Biopsia ó botón corneal	+++
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA		
• Querato-Conjuntivitis:	Frotis conjuntival o raspado corneal	+
• Queratitis Estromal:	Biopsia ó Botón corneal	++
+++ /++ Técnicas de elección. + Técnicas con menor utilidad.		
(++) Excelentes resultados, pero reactivos no comercializados.		
* Requieren la utilización de microscopios con luz fluorescente.		

Las muestras oculares para microscopía óptica habitualmente se fijan con metanol absoluto. Los tejidos para examen inmunopatológico se almacenan de forma ordinaria en solución salina. Para microscopía electrónica de transmisión (MET) los tejidos se fijan generalmente con glutaraldehído 2% en tampón de cacodilato y posteriormente con tetra óxido de osmio al 1-2%. En el caso de utilizar técnicas de biología molecular las muestras se colocan en un tubo de microcentrífuga (tubo de eppendorf) con suero estéril.

DEMOSTRACIÓN MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ÓPTICA

El aislamiento de microsporidiosis mediante cultivos es muy difícil, ya que son parásitos intracelulares obligados, exigiendo para su crecimiento medios de cultivo celulares. La serología carece de valor para su diagnóstico (110).

Por lo tanto, el diagnóstico clínico de rutina depende principalmente de la demostración morfológica por microscopía óptica de los microorga-

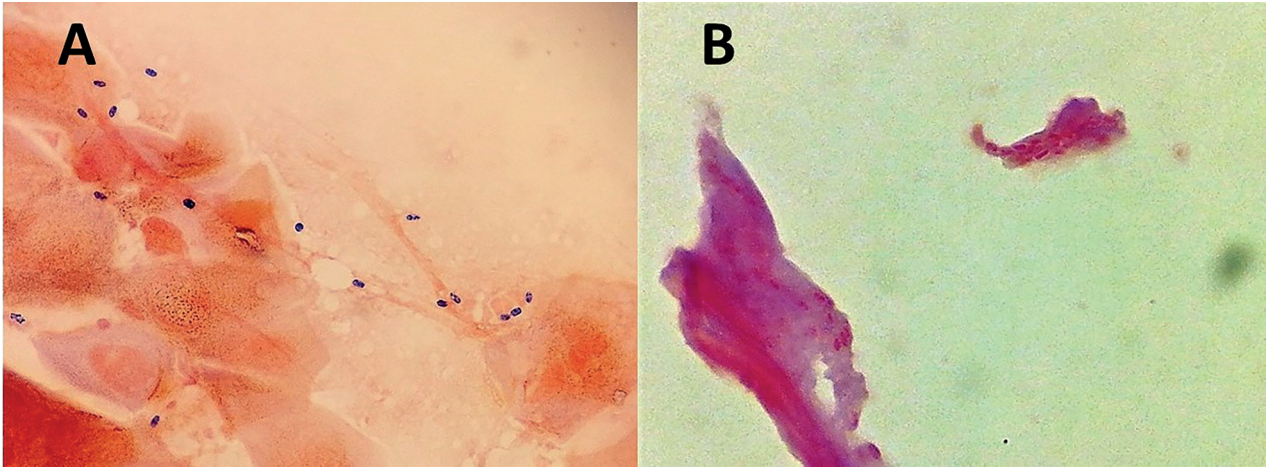


Figura 12. Tinciones de raspado corneal en paciente «sano» con queratoconjuntivitis por microsporidiosis. **(A)** Tinción de Gram evidenciando esporas gram-positivas de microsporidiosis; aunque no sospeche esta etiología, la tinción de Gram de rutina del frotis corneal es suficiente para su detección. **(B)** Tinción de tricrómico modificada; cuando se buscan microsporidiosis se utilizan estas tinciones más específicas. (Cortesía de «Department of Microbiology», Singapore General Hospital).

nismos en los raspados o tejidos; en ocasiones, con técnicas de coloración especiales (111). Sin embargo, es posible que estos microorganismos, dado su pequeño tamaño y a que pueden estar presentes en muy pequeño número, pasen inadvertidos durante este examen microbiológico o histológico. De este modo la principal desventaja de estos métodos es su baja sensibilidad y el que mediante los mismos no se pueda diferenciar el género y especie de microsporidio implicado en la infección.

Citología

La detección microscópica de las esporas en las muestras clínicas mediante tinciones microbiológicas de los frotis de raspados corneales es actualmente el diagnóstico de rutina. Las tinciones que se han utilizado para la identificación de esporas de microsporidiosis incluyen Gram, Giemsa, tricrómico modificado de Weber, tinciones ácido-alcohol 1% (Kinyoun modificada) y la tinción hidróxido potásico con blanco-calcoflúor (KOH+BCF) (60,112) (tabla 5); **siendo las tinciones de blanco-calcoflúor y Ziehl-Neelsen las más eficientes en su detección** y la de menor utilidad el Giemsa (112).

Los especímenes teñidos de **Gram** se muestran como esporas gram-positivas de mayor tamaño que las bacterias (de 1,5 a 3 micras), que pueden simular levaduras, pero a diferencia de éstas no presentan formas germinativas, son casi de la mitad de tamaño que *Candida* spp y no tiñen de forma homogénea (fig. 12A) (112).

En la tinción de **Giemsa** los microsporidiosis tiñen de manera subóptima, mostrándose de color azul. La pared celular no es teñida y solo tiñe el citoplasma, aparentando así las esporas menor tamaño que con las otras tinciones. Hay pobre diferenciación del fondo y de otros detritus inflamatorios. Sólo en ocasiones aparecen las esporas teñidas con una banda azul más oscura que permite su identificación (112).

El desarrollo de la tinción de **tricrómico modificado de Weber** descrito en 1992, en la que se utiliza una concentración de cromo tropo 2R diez veces mayor que en el tricrómico (113) permitió la tinción diferencial de las esporas de microsporidiosis, suponiendo un gran avance. Con esta tinción la pared de las esporas se tiñe de un color rosa-rojizo brillante y su interior puede aparecer con una tinción más clara en uno de sus extremos o presentar una banda que atraviesa la espora diagonal o ecuatorialmente. La mayoría de los restos de fondo y bacterias se teñirán de verde pálido, aunque algún hongo y bacteria puede teñirse también de rojo, se diferencian bien por el tamaño o el tono de la coloración (fig. 12B). Sin embargo, esta tinción es poco recomendable para estudio de tejidos, en los cuales ofrece poco contraste.

Los colorantes quimiofluorescentes como el **blanco-calcoflúor** (114) tiñen la quitina presente en las paredes de los microsporidiosis y con la utilización de microscopios con luz fluorescente se aprecia la fluorescencia de las esporas y aparecen brillantes azul turquesa o blancas sobre un fondo oscuro (fig. 13) (112). A través de las esporas teñidas no se pueden diferenciar las estructuras interiores. Compuestos semejantes son el **Fungi-Fluor**



Figura 13. Tinción blanco-calcoflúor, esporas de microsporidio quimiofluorescentes. (Cortesía de «DPDx - Parasite Image Library», CDC, EE. UU).

y Cellufluor, el Fungiquil A y el **Uvitex 2B** (111). Estos colorantes son muy empleados y resultan más sensibles y rápidos que el «cromotropo», pero sin embargo no son específicos y pequeñas levaduras o material artefactario pueden teñirse y producir falsos positivos (115-117). Las esporas pueden ser confundidas con levaduras, pero la ausencia de germinación nos confirmará el diagnóstico. Los estudios demuestran una sensibilidad del hidróxido de potasio con blanco-calcoflúor (KOH+BKF) del 93,5% (118).

Con la **Tinción ácido-alcohol** (Ziehl-Neelsen modificada o Kinyoun) las esporas aparecen de color rojo brillante sobre un fondo claro azulado y la vacuola posterior y una banda central en las esporas son visibles (112).

Histología

En las preparaciones tisulares histológicas de rutina (hematoxilina-eosina) estos microorganismos no se tiñen de forma predecible y fácilmente pueden pasar desapercibidos. Por ello hay que emplear otras tinciones histológicas más específicas en las que sí se logren poner de manifiesto. Las tinciones tisulares utilizadas son las tinciones histológicas de Gram (Brown-Brenn o Brown-Hoppes), la tinción de PAS (periodic acid-Schiff), tinciones de plata de Warthin-Starry o Grocott-metenamina, tinciones histológicas ácido-alcohol 1% (Ziehl-Neelsen, Kinyoun modificada), Giemsa etc. (108). Destacan como **de elección la tinción histológica de ácido-alcohol** (fig. 14) (Ziehl-Neelsen) por su rapidez y facilidad (108) **y el Gram cromotropo** (115) que consigue un contraste óp-

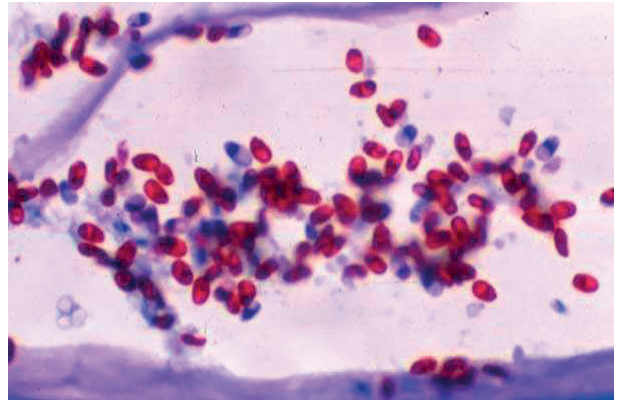


Figura 14. Queratitis estromal por microsporidios. Tinción histológica ácido-alcohol de botón corneal en el que se aprecian las esporas ovales de microsporidios teñidas de rojo con una banda oscura en el extremo. (BMC Ophthalmology 2005, *Is Microsporidial keratitis an emerging cause of stromal keratitis? – a case series study*, vol: 5 (1) pp: 19; Vemuganti G, Garg P, Sharma S, Joseph J, Gopinathan U, et. al. Copyright 2005 ©Vemuganti et al. <https://doi.org/10.1186/1471-2415-5-19>. Licencia Creative Commons CC BY 2.0, <http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>).

timo, existiendo una variante de esta denominada «Quick-hot Gram chromotrope» (119) que consigue acortar los tiempos de tinción notablemente.

Los tejidos también pueden ser embebidos en resinas plásticas blandas y se pueden conseguir cortes finos de 1-3 µm (el grosor medio de las secciones de parafina es de 5 a 10 µm). Estas secciones plásticas finas, teñidas con azul de toluidina pueden también ser útiles para la detección de las esporas de microsporidios (111).

También se pueden emplear sobre tejidos las técnicas de tinción quimiofluorescentes descritas (o técnicas de inmunofluorescencia) y ser combinadas con otras técnicas de tinción histológicas (108).

DETECCIÓN DE ANTÍGENOS

Las técnicas de tinción no permiten diferenciar las especies. Para ello, hay que utilizar técnicas de inmunofluorescencia por anticuerpos o de biología molecular.

Se han desarrollados test específicos **de inmunofluorescencia (IF) mediante anticuerpos** para el diagnóstico y diferenciación de especies de microsporidios (120-122).

La IF ha demostrado su utilidad en el diagnóstico de la microsporidiosis mediante el uso tanto de anticuerpos policlonales-AcPcs (purificados de sueros de animales y dirigidos frente a varios epitopos de proteínas) como monoclonales-AcMcs (purifica-

dos del sobrenadante de cultivos celulares). Se han generado un gran número de AcPcs y AcMcs frente a las especies de microsporidios más frecuentes en humanos (*E. bienewisi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi* y *E. Hellem*). La mayoría de estos anticuerpos reaccionan con antígenos presentes en la pared de la espora o en el túbulo polar (99,111,123,124).

La utilización de los AcPcs se ha restringido al diagnóstico a nivel de Phylum, teniendo en cuenta el alto grado de reacciones cruzadas documentadas entre *Encephalitozoon* spp. y otras especies de microsporidios, e incluso con antígenos de otros microorganismos incluyendo bacterias y hongos (99). Lo anterior, sumado a una sensibilidad menor de esta prueba a la observada con la tinción tricrómica modificada y agentes quimiofluorescentes, ha limitado el uso de los AcPcs como herramienta diagnóstica de rutina de la microsporidiosis. Se ha sugerido su aplicación sólo como prueba confirmatoria después de haberse realizado el diagnóstico inicial mediante otras técnicas (111).

MICROSCOPIA CONFOCAL

Es un método rápido no invasivo para detectar esporas de microsporidios en la capa de tejido afectado (79,125). No somete al paciente al aumento del riesgo del aumento de la infección secundaria que es causada por otras modalidades de diagnóstico que requieren el desbridamiento superficial del tejido (96). La resolución de la microscopía confocal *in vivo* (lateral 1-2 μm , axial 5-10 μm) está en el límite de la visualización de las esporas de los microsporidios (1,5-5 μm) (125). Esta técnica ha sido útil en el diagnóstico tanto en pacientes con SIDA con queratitis epitelial bilateral severa refractaria (126), en la queratitis epitelial de pacientes sanos (73,96) y en queratitis estromales (92,101). Las esporas de microsporidios se visualizan como puntos brillantes intraepiteliales o intraestromales de alto contraste alineados a lo largo de los queratocitos (73). La formación de rosetas epiteliales es otra imagen característica observada en la mayoría de estos pacientes (73). Es también una herramienta importante para supervisar la respuesta del tratamiento (92). En cualquier caso, los resultados de esta técnica diagnóstica deben ser confirmados (126).

TÉCNICAS MOLECULARES (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es uno de los principales métodos moleculares utiliza-

dos para el diagnóstico de la microsporidiosis con un límite de detección de esporas mucho menor que el de la microscopía óptica, pudiendo ser diagnóstica en muestras con microsporidios escasos.

Es una técnica rápida (puede ser realizada en unas 24-72 h) altamente sensible y específica (118) y permite el diagnóstico de microsporidiosis corneal, e incluso la tipificación de la especie de microsporidio que produce la queratitis. La confirmación de la presencia de ADN microsporídico en estas queratitis se considera diagnóstica pues estos microorganismos no son propios en la flora conjuntival.

Puede ser empleada como técnica diagnóstica primaria, y como diagnóstico de confirmación tras el diagnóstico morfológico en la microscopía óptica o microscopía confocal. En combinación con la microscopía óptica la PCR ofrece una excelente aproximación al diagnóstico de la queratitis por microsporidios con la ventaja de poder llegar a la identificación incluso de especies que no permiten los métodos directos de examen del frotis. (127,128). Aunque el aislamiento e identificación de especies también es posible mediante los cultivos tisulares, estos son un método caro y lento.

Presenta la desventaja de ser una técnica costosa que requiere equipamiento especializado. Por otro lado, las muestras biológicas pueden tener muchos inhibidores de la polimerasa por lo que se pueden generar falsos negativos, y teniendo en cuenta el grosor de la pared de la espora, se necesitan métodos de extracción agresivos para poder liberar el ADN del parásito

El ADN de las esporas puede extraerse a partir de muestras clínicas que incluyen tejidos obtenidos por biopsia, raspados corneales, o de las esporas obtenidas a partir de cultivos celulares, mediante ya sea kits de extracción comerciales EZ1mini kit (QIAGEN GmbH, Hilde, Germany) (98), Gentra Puregene kit (QIAGEN, Valencia, California, EEUU) (64) o por procedimientos de rutina como la digestión con proteinasa k seguido por una extracción con fenol cloroformo y precipitación con etanol (99,111,123,124). Incluso los ácidos nucleicos pueden ser extraídos y aislados a partir de muestras almacenadas, tanto de frotis de raspados corneales almacenados (129), como de material conservado en parafina por los métodos estándar o mediante kits comerciales como DexPAT® (123).

Los microsporidios son un grupo de patógenos muy diverso (más de 1.400 especies) y la información genética disponible de estos microorganismos es limitada. Aunque en comparación con otros eucariotas tienen genomas extremadamente pequeños, sólo un número limitado de genes se han ca-

racterizado, y sólo son unas pocas las secuencias de ADN cromosómico de algunas especies de microsporidios las que se han divulgado hasta ahora (99).

Para la mayoría de ellos, sólo se dispone de la información sobre los genes de su ARN ribosómico (ARNr) (recopilados en la base de datos GenBank®). Así pues, las técnicas de identificación basadas en el análisis mediante PCR, se fundamentan en la utilización de cebadores que se unen a secuencias diana de los genes del ARN ribosomal de estos parásitos (regiones del ADN que codifican los ARNr), para su detección y caracterización.

PCR clásica. Se utilizan diversos cebadores para amplificar ciertos genes de las subunidades ribosómicas del ARNr; habitualmente de la subunidad pequeña (SSU) pero también de la grande (LSU), o de los espacios intergénicos (IGS) (74,99,111,118,123). Algunos de estos cebadores son específicos de una sola especie, otros amplifican las especies de un sólo género y existen otros cebadores más universales denominados cebadores «pan-microsporídicos» (V1=PMP1 y PMP2, y otros) que engloban a la mayoría de las especies de los diferentes microsporidios, que habitualmente producen patología en humanos. Una descripción extensa de estos cebadores puede encontrarse en las revisiones realizadas por Franzen y colaboradores (99,123).

El diagnóstico de queratitis por microsporidios se puede realizar empleando los cebadores universales pan-microsporídicos (74,98) y seguidamente, se puede también realizar la identificación de especie (aunque no se considera esencial para el tratamiento pues actualmente es similar en todas) a través de la caracterización e identificación del ADN amplificado (99,111,123,124), mediante:

- a) Realización de forma consecutiva de PCR específica de especie, «PCR anidada» (130).
- b) Técnicas de secuenciación y análisis (lectura de la secuencia de nucleótidos) para su identificación comparando en las bases de datos de Genbank con el programa BLAST o MEGA-BLAST (74,118,130).
- c) Análisis del ADN amplificado, con técnicas de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).

Dúplex PCR. Una nueva dúplex-PCR (dPCR) para la rápida identificación simultánea de género y especie se encuentra en desarrollo. Se trata de una técnica que utiliza simultáneamente cebadores universales y específicos de especie de microsporidios que causan infecciones oculares (118) y permite el diagnóstico de microsporidiosis corneal, e incluso la tipificación de la especie que produce la queratitis. La dPCR con cebadores específicos es potencialmente más sensible, específica y de-

pende menos de métodos de análisis moleculares más complicados para la identificación exacta de la etiología de estas queratitis (75).

PCR cuantitativa o en tiempo real. También se están perfeccionando nuevos test de diagnóstico basados en técnicas de PCR cuantitativa o en tiempo real, que permiten la detección y cuantificación del producto de la PCR en el momento en que este es amplificado, y permiten la detección e identificación simultánea de especies en queratitis por microsporidios (131).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (ME)

El pequeño tamaño (1-4 μm) de las esporas de los microsporidios implicados en patologías humanas ha sido el factor limitante en el reconocimiento de estas parasitosis. Además, la mayoría de las tinciones citológicas de rutina (Gram y Giemsa) no permiten diferenciar las esporas del material contaminante. Por ello, la MET ha sido durante mucho tiempo la técnica de referencia para la confirmación diagnóstica (132) al permitir estudiar las características ultraestructurales del protozoo para clasificar la especie: tamaño de las esporas, número de núcleos, número de espirales de los túbulos polares y presencia de una membrana protectora alrededor del parásito en el citoplasma del huésped (tabla 3). Se ha confirmado mediante microscopía electrónica que el parásito se multiplica en los queratocitos (104) y macrófagos (fig. 15) (87,133).



Figura 15. Queratitis estromal por microsporidios. Examen con microscopía electrónica del botón corneal, se evidencia macrófago con tres esporas en su interior. (BMC Ophthalmology 2005, *Is Microsporidial keratitis an emerging cause of stromal keratitis? – a case series study*, vol: 5 (1) pp: 19; Vemuganti G, Garg P, Sharma S, Joseph J, Gopinathan U, et. al. © Vemuganti et al 2005. <https://doi.org/10.1186/1471-2415-5-19>. Licencia Creative Commons CC BY 2.0, <http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>).

CULTIVOS CELULARES

Debido a su desarrollo intracelular obligado, los microsporidios no pueden ser cultivados en los medios habituales, pero han sido cultivados con éxito en líneas celulares de mamífero.

El cultivo celular no es una prueba recomendada para el diagnóstico de rutina de la microsporidiosis, ya que es una técnica compleja, costosa y lenta (el crecimiento de las esporas puede tomar entre 3 a 10 semanas), aunque es deseable para las caracterizaciones inmunoquímicas y genéticas (134). Los microsporidios responsables de queratitis en humanos *Encephalitozoon spp.*, *Trachipleistophora hominis*, *Vittaforma corneae*, y *Brachiola algerae* han podido ser cultivados en cultivos celulares, utilizando líneas celulares de célula del riñón del mono y del conejo (Vero y RK-13), una línea celular humana de fibroblastos de pulmón fetal (MRC-5) y la línea celular del riñón canino de Madin-Darby (MDCK) (111). Otros como el *Enterocytozoon bieneusi*, el más frecuentemente identificado como causa de la enfermedad gastrointestinal en pacientes con SIDA, todavía no se ha podido cultivar de forma sistemática (135).

Estos cultivos han demostrado ser valiosos en la evaluación de la eficacia de agentes antimicrobianos. De tal forma el cultivo *in vitro* se ha utilizado para determinar la eficacia en varios microsporidios, incluyendo *Encephalitozoon cuniculi*, *E. hellem*, y *E. intestinalis* (111).

TRATAMIENTO

Actualmente no existen unas guías clínicas definidas para el tratamiento de las infecciones oculares por microsporidios. Los criterios de tratamiento se fundamentarán en el conocimiento de los fármacos disponibles con acción antimicrosporidios y en la experiencia clínica previa de los casos clínicos diagnosticados y publicados hasta la fecha.

FÁRMACOS ANTIMICROSPORIDIOS

Propamidina. La propamidina isetonato al 0,1% (Brolene®) instilado en forma de colirio fue el primer tratamiento utilizado (43,136) en la queratoconjuntivitis por microsporidios en el SIDA y, aunque en un principio se mostró efectivo, otros casos no mostraron buena respuesta (137). En las tres formas clínicas de microsporidiosis ocular detalladas puede ser útil aplicada tópicamente como

coadyuvante al tratamiento sistémico. Su eficacia es inferior a la fumagillina tópica y no está comercializado en España, aunque se puede conseguir a través del Servicio de Farmacia Hospitalaria como «Medicamento Extranjero». Se aplica 6 veces al día durante unas 3 semanas.

Fumagillina (Fumadil B®, Fumidil B®, Fumagilin B®). La fumagillina es un antibiótico insoluble producido por el hongo *Aspergillus fumigatus* que posee propiedades antiangiogénicas. Desde hace décadas se conoce su actividad antiprotozoaria frente a *Entamoeba histolytica* (138). Una sal soluble de esta sustancia, biciclohexilamonium fumagillina, es ampliamente utilizada en la práctica veterinaria en el control de la microsporidiosis de las abejas producida por *Nosema apis*. Aunque el mecanismo de acción de esta sustancia es en gran parte desconocido, se ha comprobado su eficacia *in vitro* frente a microsporidios (139,140). Su utilización sistémica se ha visto limitada por su importante toxicidad: trombopenia, neutropenia, hiperlipasemia, etc. (141). Se ha utilizado con éxito en forma de colirio en el tratamiento de la microsporidiosis ocular en pacientes con SIDA (38,39,46,137,142,143). Se utiliza una disolución de la sal soluble a la concentración de 70 microgramos por ml (0,07 mg/ml) aplicándose seis veces al día (39). Su seguridad y tolerancia local ha sido comprobada utilizándose en algunos pacientes durante periodos de más de 12 meses (143). No se dispone comercializado como colirio, pero para su preparación se puede conseguir como «medicamento huérfano» (<http://www.orpha.net>) o realizar a partir de la especialidad comercial que se utiliza para combatir la nosematosis de las abejas, Fumagilin-B® (Medivet Pharmaceutical Ltd, High River, Alberta, Canada. <http://medivet.ca>).

TPN-470 [O-(cloroacetil-carbamoil) fumagilol]. Se trata de una molécula sintética análoga a la fumagillina con propiedades antiangiogénicas y anticancerígenas derivadas de su capacidad antiangiogénica. Posee eficacia igual o superior a su análogo en el tratamiento *in vitro* de los microsporidios, pero parece presentar menor toxicidad sistémica y puede ser un fármaco prometedor en el tratamiento de las microsporidiosis (144).

Albendazol (Eskazole® comp. 400 mg). Perteneciente a la familia de los benzimidazoles (al igual que el antihelmíntico mebendazol) es el tratamiento de elección de cisticercosis e hidatidosis tisulares no operables. Administrado oralmente es bien absorbido y alcanza concentraciones elevadas en plasma y tejidos. El albendazol interfiere la función de la tubulina en los microsporidios (145) y posee

una comprobada actividad antimicrosporidios tanto *in vivo* (40,146-148) como *in vitro* (140,149,150). Dada su buena tolerancia ha sido utilizado vía oral para el tratamiento de la microsporidiosis intestinal o sistémica. Durante estos últimos años ha sido el tratamiento de elección de las microsporidiosis. Sin embargo, no es efectivo frente a *E. bienewisi* (150,151). Se ha evidenciado la curación de microsporidiosis ocular en pacientes con SIDA que recibían este tratamiento para una microsporidiosis rinosinusal coexistente (146). El albendazol está todavía disponible en España. En otros países actualmente no se comercializa, pero puede ser conseguido como «medicamento huérfano» (www.orpha.net).

Itraconazol (Canadiol® cápsulas 100 mg, Esteve S.A., Barcelona; Sporanox® cápsulas 100 mg, Janssen-Cilag, Madrid). El itraconazol es un antimicótico triazólico de administración oral, utilizado en infecciones fúngicas sistémicas especialmente en aspergilosis. En estudios *in vitro* se ha comprobado su actividad antimicrosporidios al actuar inhibiendo la extrusión del túbulo polar (152). Se ha apreciado la resolución de microsporidiosis epitelial en pacientes con SIDA que no respondían al tratamiento tópico tras la administración oral de este antifúngico, administrado para el tratamiento de una meningitis coexistente por criptococo (153). También en otros casos en que se utilizó para el tratamiento de sinusitis crónica por microsporidios se apreció la curación de una queratitis epitelial en la que el albendazol oral no había sido efectivo (52).

Nitazoxanida (alinia® comprimido 500 mg) es un agente antiparásito de amplio espectro eficaz contra protozoos como amebas, nematodos, cestodos y trematodos (124). Se prescribe a la dosis de 1 g dos veces al día, 60 días. Ha demostrado eficacia *in vivo* en cultivos celulares de *Encephalitozoon intestinalis* y *V. corneae* (14) y ha probado su utilidad en el tratamiento de la microsporidiosis humana causada por *Enterocytozoon bienewisi* en pacientes con SIDA (154). Este compuesto parece ser prometedor para el tratamiento de esta parasitosis (154).

Fluoroquinolonas. En estudios experimentales, se ha comprobado la actividad de las fluoroquinolonas frente a *Encephalitozoon intestinalis* y *Vittaforma cornea* evidenciando que pueden ser eficaces en inhibir su replicación. Pueden ser efectivas en tratamientos asociadas con otros fármacos como fumagillina; de forma que (dada la toxicidad de la fumagillina) ésta pueda ser administrada a menores dosis (124,155). Clínicamente se han uti-

lizado en monoterapia en queratoconjuntivitis por microsporidios revelándose como una opción de tratamiento válida (33).

Otros fármacos. Nuevas poliaminas sintéticas (tetraminas, pentaminas, oligoaminas) están siendo investigadas (156).

TRATAMIENTO QUERATOCONJUNTIVITIS EN PACIENTES CON SIDA

Dos fármacos tópicos han sido utilizados en el tratamiento tópico: propamidina isotionato 0,1% con pobres resultados (43,136,137) y la fumagillina (la sal soluble a la concentración de 70 microgramos por ml (0,07 mg/ml) aplicándose seis veces al día) con mayor éxito (39,46,137,142,143). La asociación de tratamiento sistémico con albendazol oral dos veces al día o itraconazol oral a dosis de 100 mg dos veces al día ayuda a la curación del cuadro en casos resistentes y será especialmente necesario en los casos en que se demuestre una microsporidiosis asociada en otro órgano que deberá ser siempre descartada.

Durante los años noventa, previamente a la terapia HAART, era frecuente observar la recidiva de esta queratitis tras la suspensión de la medicación tópica (39,146), lo que obligaba a mantener este tratamiento de forma casi indefinida tal como ocurría en muchas otras infecciones oportunistas asociadas al SIDA (coriorretinitis por citomegalovirus). En nuestros días, en los países desarrollados la mayor parte de las infecciones oportunistas del SIDA que eran frecuentes en la era pre-HAART son hoy rarezas. Actualmente, el pilar fundamental en el tratamiento de la queratitis por microsporidios en pacientes con SIDA es la restauración de las defensas mediante la terapia anti-retroviral combinada. Aunque se ha comprobado la resolución de estas queratitis únicamente con el tratamiento HAART (49) ocasionalmente la clínica puede persistir o recidivar a pesar de la restauración de la inmunidad en estos pacientes (51) y necesitan ser tratados con el tratamiento específico ya descrito.

TRATAMIENTO QUERATOCONJUNTIVITIS EN PACIENTES SANOS

En muchos casos esta afección puede ser autolimitada y cesar tras la suspensión de los corticoides tópicos o sistémicos si se estuvieran utilizando. En otros pacientes la queratopatía puede persistir hasta que se instaure un tratamiento adecuado, que

consistirá en la prescripción de colirio de fumagillina (su sal soluble biciclohexilamonium-fumagillina) y en caso de no poder disponer de ésta, la propamidina isetonato 0,1% o polihexametileno biguanida (PHMB) al 0,02% (61,83). También la monoterapia con fluoroquinolonas es una opción de tratamiento efectiva (33). Se ha preconizado el desbridamiento de los infiltrados comunicando buenos resultados (65), aunque un estudio prospectivo ha puesto de manifiesto que su utilidad no es superior al tratamiento con lubricantes oculares (70). Los corticoides no son eficaces y pueden empeorar la enfermedad.

En los casos más refractarios se puede asociar tratamiento sistémico con albendazol oral 400 mg dos veces al día o itraconazol oral 100 mg dos veces al día (45) durante 3-4 semanas.

TRATAMIENTO QUERATITIS ESTROMAL

Aunque existen algunos casos documentados de curación con tratamiento médico mediante terapia combinada tópica y oral (69,95,157), la queratitis estromal por microsporidios tiene un pronóstico pobre y una alta tasa de fracasos con tratamiento médico, requiriendo en la mayoría de los casos una queratoplastia penetrante. Existe consenso en que es necesario un tratamiento quirúrgico precoz. La queratoplastia penetrante muestra buenos resultados ya que, al retirar el estroma infectado la infección no suele recurrir. No está indicada la realización de una queratoplastia lamelar profunda, pues la recidiva de la queratitis estromal, a pesar del tratamiento antimicrosporídico específico, parece la norma (88).

A la espera de la queratoplastia penetrante se debe instaurar tratamiento con cobertura antimicrobiana específica oral y tópica. Tratamiento oral con albendazol oral 400 mg dos veces al día o itraconazol 200-400 mg dos veces al día; y tópico con fumagillina colirio 70 µg/ml (79) (o propamidina colirio en su defecto) o colirio moxifloxacino 0,5%, o voriconazol 1% tópico. Tras la queratoplastia, además del tratamiento antibiótico e inmunosupresor habitual, se deberá mantener profilácticamente el tratamiento antimicrosporidios tópico y sistémico para evitar la recidiva en el injerto.

Recientemente se ha descrito como causa de la recidiva de la queratitis estromal la probable capacidad de las esporas de atravesar (desde cámara anterior) una membrana de Descemet íntegra, al igual que ocurre con las queratitis fúngicas (158).

BIBLIOGRAFIA

1. Lee S, Corradi N, Byrnes E, et al. Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Curr Biol* 2008; 18: 1675-1679.
2. Gill EE, Fast NM. Assessing the microsporidia-fungi relationship: Combined phylogenetic analysis of eight genes. *Gene* 2006; 375: 103-109.
3. Fischer WM, Palmer JD. Evidence from small-subunit ribosomal RNA sequences for a fungal origin of Microsporidia. *Mol Phylogenet Evol* 2005; 36: 606-622.
4. Keeling PJ, Luker MA, Palmer JD. Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol Biol Evol*. 2000; 17: 23-31.
5. Hirt RP, Logsdon JMJr, Healy B, et al. Microsporidia are related to fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 580-585.
6. Franzen C. Microsporidia: A Review of 150 Years of Research. *Open Parasitol J* 2008; 2: 1-34.
7. Weiss LM, Becnel JJ. *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. Oxford, Wiley-Blackwell, 2014.
8. Han B, Weiss L. Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiol Spectr* 2017; 5: FUNK-0018-2016. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016.
9. Kotler DP, Orenstein JM. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. En M. Wittner and L. M. Weiss eds, *The microsporidia and microsporidiosis*. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1999; 258-292.
10. Matsubayashi H, Koike T, Mikata T, Hagiwara S. A case of Encephalitozoon-like body infection in man. *Arch Pathol* 1959; 67: 181-187.
11. Desportes I, Le Charpantier Y, Galian A, et al. Occurrence of a new microsporidian, *Enterocytozoon bienewsi* n.g., n.sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J Protozool* 1985; 32: 250-254.
12. Field AS, Marriott DJ, Milleken ST, et al. Myositis associated with a newly described microsporidian, *Trachipleistophora hominis*, in a patient with AIDS. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2803-2811.
13. Shadduck JA, Meccoli RA, Davis R, Font RL. First isolation of a microsporidian from a human patient. *J Infect Dis* 1990; 162: 773-776.
14. Didier E, Snowden K, Shadduck J. Biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv Parasitol* 1998; 40: 283-320.
15. Sak B, Kváč M, Kučerová Z, et al. Latent microsporidian infection in immunocompetent individuals – A longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e1162. doi:10.1371/journal.pntd.0001162.
16. Nkinin S, Asonganyi T, Didier E, Kaneshiro E. Microsporidian infection is prevalent in healthy people in Cameroon. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2841-2846.
17. Cama V, Pearson J, Cabrera L, et al. Transmission of *Enterocytozoon bienewsi* between a child and guinea pigs. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2708-2710.
18. Mota P, Rauch C, Edberg S. Microsporidia and *Cyclospora*: epidemiology and assessment of risk from the environment. *Crit Rev Microbiol* 2000; 26: 69-90.
19. Deplazes P, Mathis A, Weber R. Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. *Contrib Microbiol* 2000; 6: 236-260.
20. Didier E, Stovall M, Green L, et al. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol* 2004; 126: 145-166.

21. Dowd S, Gerba C, Pepper I. Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3332-3335.
22. Fournier S, Liguory O, Santillana-Hayat M, et al. Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 29: 95-100.
23. Izquierdo F, Castro Hermida J, Fenoy S, et al. Detection of microsporidia in drinking water, wastewater and recreational rivers. *Water Res* 2011; 45: 4837-4843.
24. Hu Y, Feng Y, Huang C, Xiao L. Occurrence, source, and human infection potential of *Cryptosporidium* and *Enterocytozoon bienersi* in drinking source water in Shanghai, China, during a pig carcass disposal incident. *Environ Sci Technol* 2014; 18: 14219-14227.
25. Ashbolt N. Microbial contamination of drinking water and human health from community water systems. *Curr Environ Health Rep* 2015; 2: 95-106.
26. Silveira H, Canning EU. *Vittaforma corneae* n. comb. for the human microsporidium *Nosema corneum* Shadduck, Meccoli, Davis & Font, 1990, based on its ultrastructure in the liver of experimentally infected athymic mice. *J Eukaryot Microbiol* 1995; 42: 158-165.
27. Deplazes P, Mathis A, van Saanen M, et al. Dual microsporidial infection due to *Vittaforma corneae* and *Encephalitozoon hellem* in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 1521-1524.
28. Chen J, Hsu T, Hsu B, et al. Surveillance of *Vittaforma corneae* in hot springs by a small-volume procedure. *Water Res* 2017; 118: 208-216.
29. Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 423-445.
30. Ashton N, Wirasinha PA. *Encephalitozoonosis* (nosematosis) of the cornea. *Br J Ophthalmol* 1973; 57: 669-674.
31. Mietz H, Franzen C, Hoppe T, Bartz-Schmidt KU. Microsporidia-induced sclerouveitis with retinal detachment. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 864-865.
32. Sood A, Debiec M, Yeh S, et al. Microsporidial stromal keratitis and endophthalmitis in an immunocompetent patient. *J Ophthalmic Inflamm Infect* 2016; 6:30. doi: 10.1186/s12348-016-0099-7.
33. Loh R, Chan C, Ti S, et al. Emerging prevalence of microsporidial keratitis in Singapore: epidemiology, clinical features, and management. *Ophthalmology* 2009; 116: 2348-2353.
34. Friedberg DN, Stenson SM, Orenstein JM, et al. Microsporidial keratoconjunctivitis in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Ophthalmol* 1990; 108: 504-508.
35. Lowder CY, Meisler DM, McMahon JT, et al. Microsporidia infection of the cornea in an HIV-positive man. *Am J Ophthalmol* 1990; 109: 242-244.
36. Orenstein JM, Seedor J, Friedberg DN, et al. Microsporidial keratoconjunctivitis in patients with AIDS. *Morbidity Mortal Wkly Rep* 1990; 39: 188-189.
37. Didier ES, Didier PJ, Friedberg DN, et al. Isolation and characterization of a new human microsporidia, *Encephalitozoon hellen*, from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *J Infect Dis* 1991; 163: 617-621.
38. Rosberger DF, Serdarevic ON, Erlanson RA, et al. Successful treatment of microsporidial keratoconjunctivitis with topical fumagillin in a patient with AIDS. *Cornea* 1993; 12: 261-265.
39. Diesenhouse MC, Wilson LA, Corrent GF, et al. Treatment of microsporidial keratoconjunctivitis with topical fumagillin. *Am J Ophthalmol* 1993; 115: 293-298.
40. Didier ES, Rogers LB, Brush AD, et al. Diagnosis of disseminated microsporidial *Encephalitozoon hellem* infection by PCR-Southern analysis and successful treatment with albendazole and fumagillin. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 947-952.
41. Schwartz DA, Visvesvara GS, Diesenhouse MC, et al. Pathologic features and immunofluorescent antibody demonstration of ocular microsporidiosis (*Encephalitozoon hellem*) in seven patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol* 1993; 115: 285-292.
42. Hollister WS, Canning EU, Colbourn NI, et al. Characterization of *Encephalitozoon hellem* (*Microspora*) isolated from the nasal mucosa of a patient with AIDS. *Parasitology* 1993; 107: 351-358.
43. Metcalfe TW, Doran RM, Rowlands PL, et al. Microsporidial keratoconjunctivitis in a patient with AIDS. *Br J Ophthalmol* 1992; 76: 177-178.
44. Aarons EJ, Woodrow D, Hollister WS, et al. Reversible renal failure caused by a microsporidial infection. *AIDS* 1994; 8: 1119-1121.
45. Sridhar MS, Sharma S. Microsporidial keratoconjunctivitis in a HIV-seronegative patient treated with debridement and oral itraconazole. *Am J Ophthalmol* 2003; 136: 745-746.
46. Lowder CY, McMahon JT, Meisler DM, et al. Microsporidial keratoconjunctivitis caused by *Septata intestinalis* in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996; 121: 715-717.
47. Durán de la Colina J, Martínez R. *Córnea y SIDA*. En: Díaz Lópiz M, eds, *Sida en Oftalmología*. Madrid, Sociedad Española de Oftalmología, 1996; 213-222.
48. Chronister CL. Review of external ocular disease associated with aids and HIV infection. *Optom Vis Sci* 1996; 73: 225-230.
49. Martins SA, Muccioli C, Belfort RJr, Castelo A. Resolution of microsporidial keratoconjunctivitis in an AIDS patient treated with highly active antiretroviral therapy. *Am J Ophthalmol* 2001; 131: 378-379.
50. Gajdatsy AD, Tay-Kearney ML. Microsporidial keratoconjunctivitis after HAART. *Clin Experiment Ophthalmol* 2001; 29: 327-329.
51. Didier E, Weiss L. Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr Opin Infect Dis* 2011; 24: 490-495.
52. Rossi P, Urbani C, Donelli G, Pozio E. Resolution of microsporidial sinusitis and keratoconjunctivitis by itraconazole treatment. *Am J Ophthalmol* 1999; 127: 210-212.
53. Fournier S, Liguory O, Sarfati C, et al. Disseminated infection due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: case report and review. *HIV Med* 2000; 1: 155-161.
54. Mohindra AR, Lee MW, Visvesvara G, et al. Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient. *Transpl Infect Dis* 2002; 4: 102-107.
55. Silverstein BE, Cunningham ETJr, Margolis TP, et al. Microsporidial keratoconjunctivitis in a patient without human immunodeficiency virus infection. *Am J Ophthalmol* 1997; 124: 395-396.
56. Theng J, Chan C, Ling ML, Tan D. Microsporidial keratoconjunctivitis in a healthy contact lens wearer without human immunodeficiency virus infection. *Ophthalmology* 2001; 108: 976-978.
57. Chan CM, Theng JT, Li L, Tan DT. Microsporidial keratoconjunctivitis in healthy individuals: a case series. *Ophthalmology* 2003; 110: 1420-1425.
58. Moon SJ, Mann PM, Matoba AY. Microsporidial keratoconjunctivitis in a healthy patient with a history of LASIK surgery. *Cornea* 2003; 22: 271-272.

59. Lewis NL, Francis IC, Hawkins GS, Coroneo MT. Bilateral microsporidial keratoconjunctivitis in an immunocompetent non-contact lens wearer. *Cornea* 2003; 22: 374-376.
60. Joseph J, Sridhar MS, Murthy S, Sharma S. Clinical and microbiological profile of microsporidial keratoconjunctivitis in southern India. *Ophthalmology* 2006; 113: 531-537.
61. Das S, Sahu, S Sharma S, et al. Clinical trial of 0.02% polyhexamethylene biguanide versus placebo in the treatment of microsporidial keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 2010; 150: 110-115.
62. Tung-Lien Quek D, Pan J, Krishnan P, et al. Microsporidial keratoconjunctivitis in the tropics: a case series. *Open Ophthalmol J* 2011; 5: 42-47.
63. Sengupta J, Saha S, Khetan A, Pal D, et al. Characteristics of microsporidial keratoconjunctivitis in an eastern indian cohort: A case series. *Indian J Pathol Microbiol* 2011; 54: 565-568.
64. Fan NW, Wu C, Chen TL, et al. Microsporidial keratitis in patients with hot springs exposure. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 414-418.
65. Fan NW, Lin PY, Chen TL, et al. Treatment of microsporidial keratoconjunctivitis with repeated corneal swabbing. *Am J Ophthalmol* 2012; 154: 927-933.e1.
66. Lam T, Wong M, Chuang S. Microsporidial keratoconjunctivitis outbreak among athletes from Hong Kong who visited Singapore. *Emerg Infect Dis* 2012; 19: 1484-1486.
67. Tan J, Lee P, Lai Y, et al. Microsporidial keratoconjunctivitis after rugby tournament, Singapore. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1484-1486.
68. Fernandes M, Sharma S. Polymicrobial and microsporidial keratitis in a patient using Boston scleral contact lens for Sjogren's syndrome and ocular cicatricial pemphigoid. *Cont Lens Anterior Eye* 2013; 36: 95-97.
69. Gautam, Jhanji V, Satpathy G, et al. Microsporidial Keratitis after Collagen Cross-linking. *Ocul Immunol Inflamm* 2013; 21: 495-497.
70. Das S, Wallang B, Sharma S, et al. The efficacy of corneal debridement in the treatment of microsporidial keratoconjunctivitis: a prospective randomized clinical trial. *Am J Ophthalmol* 2014; 157: 1151-1155.
71. Thanathanee O, Athikulwongse R, Anutarapongpan O, et al. Clinical features, risk factors, and treatments of microsporidial epithelial keratitis. *Semin Ophthalmol* 2014; 31: 1-5.
72. Sridhar U, Ur Rahman A, Batra J, and Sapra N. Ocular microsporidiosis—our experience in a tertiary care centre in North India. *Open J Ophthalmol* 2015; 5: 130-138.
73. Malhotra C, Jain A, Kaur S, et al. In vivo confocal microscopic characteristics of microsporidial keratoconjunctivitis in immunocompetent adults. *Br J Ophthalmol* 2017; 101: 1217-1222.
74. Reddy A, Balne P, Gaje K, Garg P. PCR for the diagnosis and species identification of microsporidia in patients with keratitis. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 476-478.
75. Bharathi MJ, Murugan N, Kumar GR, et al. Vittaforma corneae keratitis in southern India: role of a novel duplex PCR. *J Med Microbiol* 2013; 62: 553-559.
76. Curry A, Mudhar HS, Dewan S, et al. A case of bilateral microsporidial keratitis from Bangladesh infection by an insect parasite from the genus *Nosema*. *J Med Microbiol* 2007; 56: 1250-1252.
77. Kakrania R, Joseph J, Vaddavalli P, et al. Microsporidia keratoconjunctivitis in a corneal graft. *Eye* 2016; 20: 1314-1315.
78. Bommala ML, Nalamada S, Sharma S, Garg P. Microsporidial keratoconjunctivitis in an immunocompetent patient with a past history of laser in situ keratomileusis surgery. *Indian J Med Microbiol* 2011; 29: 428-30.
79. Sharma S, Das S, Joseph J, et al. Microsporidial keratitis: need for increased awareness. *Surv Ophthalmol* 2011; 56: 1-22.
80. Das S, Sharma S, Sahu SK, et al. New microbial spectrum of epidemic keratoconjunctivitis: clinical and laboratory aspects of an outbreak. *Br J Ophthalmol* 2008; 92: 861-862.
81. Agashe R, Radhakrishnan N, Pradhan, et al. Clinical and demographic study of microsporidial keratoconjunctivitis in South India: a 3-year study. *Br J Ophthalmol* 2017; 101: 1436-1439.
82. Kwok A, Tong J, Tang B, et al. Outbreak of microsporidial keratoconjunctivitis with rugby sport due to soil exposure. *Eye* 2013; 27: 747-54.
83. Das S, Sharma S, Sahu S, et al. Diagnosis, clinical features and treatment outcome of microsporidial keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 2012; 96: 793-795.
84. Dosso AA, Runger-Brandle E. Clinical course of epidemic keratoconjunctivitis: evaluation by in vivo confocal microscopy. *Cornea* 2008; 27: 263-268.
85. van Bijsterveld OP, Obster R. Keratitis nummularis Dimmer, Morbus dubius. *Klin Monbl Augenheilkd* 1983; 183: 169-172.
86. Canning, EU, Lom, J: The Microsporidia of Vertebrates. Harcourt Brace Jovanovich, New York, NY, 1986.
87. Pinnolis M, Egbert PR, Font RL, Winter FC. Nosematosis of the cornea. Case report, including electron microscopic studies. *Arch Ophthalmol* 1981; 99: 1044-1047.
88. Font RL, Samaha AN, Keener MJ, et al. Corneal microsporidiosis. Report of case, including electron microscopic observations. *Ophthalmology* 2000; 107: 1769-1775.
89. Fogla R, Padmanabhan P, Therese KL, et al. Chronic microsporidial stromal keratitis in an immunocompetent, non-contact lens wearer. *Indian J Ophthalmol* 2005; 53: 123-125.
90. Vemuganti GK, Garg P, Sharma S, et al. Is microsporidial keratitis an emerging cause of stromal keratitis? A case series study. *BMC Ophthalmol* 2016; 35: 1569-1574.
91. Pariyakanok L, Jongwutiwes S. Keratitis caused by *Trachipleistophora anthropoptera*. *J Infect* 2005; 51: 325-328.
92. Sagoo MS, Mehta JS, Hau S, et al. microsporidium stromal keratitis: in vivo confocal findings. *Cornea* 2007; 26: 870-873.
93. Ang M, Mehta JS, Mantoo S, Tan D. Deep Anterior Lamellar Keratoplasty to Treat Microsporidial Stromal Keratitis. *Cornea* 2009; 28: 832-835.
94. Das S, Sharma S, Sahu SK, Vemuganti GK. Intraocular invasion by microsporidial spores in a case of stromal keratitis. *Archives of ophthalmology* 2011; 129: 513-515.
95. Sangit VA, Murthy SI, Garg P. Microsporidial stromal keratitis successfully treated with medical therapy: a case report. *Cornea* 2011; 30: 1264-1266.
96. Hsiao Y, Tsai I, Kuo C, Yang T. Diagnosis of microsporidial keratitis with in vivo confocal microscopy. *J Xray Sci Technol* 2013; 21: 103-110.
97. Garg P. Microsporidia infection of the cornea—A unique and challenging disease. *Cornea* 2013; 32: S33-S38.
98. Mittal R, Balne P, Sahu S, et al. Coexistence of herpes simplex virus infection in microsporidial stromal keratitis associated with granulomatous inflammation. *Indian J Ophthalmol* 2017; 65: 276-281.
99. Franzen C, Muller A. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 243-285.

100. Sabhapandit S, Murthy S, Garg P, et al. Microsporidial stromal keratitis: clinical features, unique diagnostic criteria, and treatment outcomes in a large case series. *Cornea* 2016; 35: 1569-1574.
101. Devi L, Prajna N, Srinivasan M. Microsporidial infection masquerading as graft rejection post-Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty. *Indian J Ophthalmol* 2017; 65: 869-871.
102. Davis RM, Font RL, Keisler MS, Shaddock JA. Corneal microsporidiosis. A case report including ultrastructural observations. *Ophthalmology* 1990; 97: 953-957.
103. Font RL, Su GW, Matoba AY. Microsporidial stromal keratitis. *Arch Ophthalmol* 2003; 121: 1045-1047.
104. Rauz S, Tuft S, Dart JK, et al. Ultrastructural examination of two cases of stromal microsporidial keratitis. *J Med Microbiol* 2004; 53: 775-781.
105. Visvesvara GS, Bellosa M, Moura H, et al. Isolation of *Nosema algerae* from the cornea of an immunocompetent patient. *J Eukaryot Microbiol* 1999; 46: 10S.
106. Thomas K, Purcell T, Tanzer D, et al. Delayed diagnosis of microsporidial stromal keratitis: unusual Wessely ring presentation and partial treatment with medications against *Acanthamoeba*. *BMJ case reports* 2011; 2011:0820103233. doi:10.1136/bcr.08.2010.3233.
107. Gulias Cañizo R, Hernandez Ayuso Y, Rios y Valles D, et al. Microsporidiosis corneal. Reporte de casos y revisión de la literatura. *Rev Mex Oftalmol* 2017; 91: 30-34.
108. Joseph J, Vemuganti GK, Garg P, Sharma S. Histopathological evaluation of ocular microsporidiosis by different stains. *BMC Clin Pathol* 2006; 6:6. doi: 10.1186/1472-6890-6-6.
109. Friedberg DN, Ritterband DC. Ocular Microsporidiosis. En: Wittner M, Weiss LM, eds, *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington DC, Am Soc Microbiol, 1999; 293-314.
110. Didier ES, Shaddock JA, Didier PJ, et al. Studies on ocular microsporidia. *J Protozool* 1991; 38: 635-638.
111. Garcia L. Laboratory Identification of the Microsporidia. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1892-1901.
112. Joseph J, Murthy S, Garg P, Sharma S. Use of different stains for microscopic evaluation of corneal scrapings for diagnosis of microsporidial keratitis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 583-585.
113. Weber R, Bryan RT, Owen RL, et al. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N Engl J Med* 1992; 326: 161-166.
114. De Girolami PC, Ezratty CR, Desai G, et al. Diagnosis of intestinal microsporidiosis by examination of stool and duodenal aspirate with Weber's modified trichrome and Uvitex 2B strains. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 805-810.
115. Moura H, Da Silva JL, Sodre FC, et al. Gram-chromotrope: a new technique that enhances detection of microsporidial spores in clinical samples. *J Eukaryot Microbiol* 1996; 43: 94-95.
116. Conteas CN, Sowerby T, Berlin GW, et al. Fluorescence techniques for diagnosing intestinal microsporidiosis in stool, enteric fluid, and biopsy specimens from acquired immunodeficiency syndrome patients with chronic diarrhea. *Arch Pathol Lab Med* 1996; 120: 847-853.
117. Matos O, Lobo ML, Goncalves L, Antunes F. Diagnostic use of 3 techniques for identification of microsporidian spores among AIDS patients in Portugal. *Scand J Infect Dis* 2002; 34: 591-593.
118. Joseph J, Sharma S, Murthy SI, et al. Microsporidial keratitis in India: 16S rRNA gene-based PCR assay for diagnosis and species identification of microsporidia in clinical samples. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 4468-73.
119. Moura H, Schwartz DA, Bornay-Llinares F, et al. A new and 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: 888-893.
120. Aldras A, Orenstein J, Kotler D, et al. Detection of microsporidia by indirect immunofluorescence antibody test using polyclonal and monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbio* 1994; 32: 608-12.
121. del Aguila CH, Moura S, Fenoy R, et al. In vitro culture, ultrastructure, antigenic, and molecular characterization of *Encephalitozoon cuniculi* isolated from urine and sputum samples from a Spanish patient with AIDS. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1105-1108.
122. Visvesvara GS, Leitch GJ, Moura H, et al. Culture, electron microscopy, and immunoblot studies on a microsporidian parasite isolated from the urine of a patient with AIDS. *J Protozool* 1991; 38: 105-111.
123. Ghosh K, Weiss L. Molecular Diagnostic Tests for Microsporidia. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009; 2009:926521. doi: 10.1155/2009/926521.
124. Anane S, Attouchi H. Microsporidiosis: Epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol Clin Biol* 2010; 34: 450-464.
125. Jalbert I, Stapleton F, Papas E, et al. In vivo confocal microscopy of the human cornea. *Br J Ophthalmol* 2003; 87: 225-236
126. Shah GK, Pfister D, Probst LE, et al. Diagnosis of microsporidial keratitis by confocal microscopy and the chromatrope stain. *Am J Ophthalmol* 1996; 121: 89-91.
127. da Silva AJ, Bornay-Llinares FJ, del Aguila de la Puente A, et al. Diagnosis of *Enterocytozoon bienewsi* (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: 874-879.
128. Visvesvara GS, Leitch GJ, da Silva AJ, 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: 2760-2768.
129. Chant T, K Koh. Extraction of microsporidial DNA from modified trichrome-stained clinical slides and subsequent species identification using PCR sequencin. *Parasitology* 2008; 135: 701-703.
130. Conners M, Gibler T, Gelder R. Diagnosis of Microsporidia Keratitis by Polymerase Chain Reaction. *Arch Ophthalmol* 2004; 122: 283.
131. Polley S, Boadi S, Watson J, et al. Detection and species identification of microsporidial infections using SYBR Green real-time PCR. *J Med Microbiol* 2011; 60: 459-466.
132. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 426-461.
133. Canning EU, Curry A, Vavra J, Bonshek RE. Some ultrastructural data on *Microsporidium ceylonensis*, a cause of corneal microsporidiosis. *Parasite* 1998; 5: 247-254.
134. del Aguila C, Rueda C, Haro M, et al. Genetic and immunologic characterization of seven *Encephalitozoon hellem* human strains. 2001 *J Eukaryot Microbiol*; Suppl: 66S-68S.
135. Visvesvara G, Leitch G, Pieniazek N, et al. Short-term in vitro culture and molecular analysis of the microsporidian, *Enterocytozoon bienewsi*. *J Eukaryot Microbiol* 1995; 42: 506-510.
136. McCluskey PJ, Goonan PV, Marriott DJ, Field AS. Microsporidial keratoconjunctivitis in AIDS. *Eye* 1993; 7: 80-83.

137. Kersten A, Althaus C, Seitz HM, et al. Bilateral microsporidial keratitis in an HIV-positive patient with AIDS stage infection. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1998; 212: 476-479.
138. McCowen MC, Callender ME, Lawlis JF Jr. Fumagillin (H-3), a new antibiotic with amebicidal properties. *Science* 1951; 113: 202-203.
139. Shadduck JA. Effect of fumagillin on in vitro multiplication of *Encephalitozoon cuniculi*. *Protozool* 1980; 27: 202-208.
140. Beauvais B, Sarfati C, Challier S, Derouin F. In vitro model to assess effect of antimicrobial agents on *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2440-2448.
141. Molina JM, Goguel J, Sarfati C, et al. Potential efficacy of fumagillin in intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with HIV infection: results of a drug screening study. *AIDS* 1997; 11: 1603-1610.
142. Wilkins JH, Joshi N, Margolis TP, et al. Microsporidial keratoconjunctivitis treated successfully with a short course of fumagillin. *Eye* 1994; 8: 703-704.
143. Garvey MJ, Ambrose PG, Ulmer JL. Topical fumagillin in the treatment of microsporidial keratoconjunctivitis in AIDS. *Ann Pharmacother* 1995; 29: 872-874.
144. Didier ES. Effects of albendazole, fumagillin, and TNP-470 on microsporidial replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1541-1546.
145. Haque A, Hollister WS, Willcox A, Canning EU. The antimicrosporidial activity of albendazole. *J Invertebr Pathol* 1993; 62: 171-177.
146. Gritz DC, Holsclaw DS, Neger RE, et al. Ocular and sinus microsporidial infection cured with systemic albendazole. *Am J Ophthalmol* 1997; 124: 241-243.
147. Leder K, Ryan N, Spelman D, Crowe SM. Microsporidial disease in HIV-infected patients: a report of 42 patients and review of the literature. *Scand J Infect Dis* 1998; 30: 331-338.
148. Weitzel T, Wolff M, Dabanch J, et al. Dual microsporidial infection with *Encephalitozoon cuniculi* and *Enterocytozoon bieneusi* in an HIV-positive patient. *Infection* 2001; 29: 237-239.
149. Koudela B, Lom J, Vitovec J, et al. In vivo efficacy of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. *J Eukaryot Microbiol* 1994; 41: 49-50.
150. Weiss LM, Michalakakis E, Coyle CM, et al. The in vitro activity of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi*. *J Eukaryot Microbiol* 1994; 41: 65-66.
151. Dieterich DT, Lew EA, Kotler KP, et al. Treatment with albendazole for intestinal disease due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1994; 169: 178-183.
152. Leitch GJ, He Q, Wallace S, Visvesvara GS. Inhibition of the spore polar filament extrusion of the microsporidium, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient. *J Eukaryot Microbiol* 1993; 40: 711-717.
153. Yee RW, Tio FO, Martinez JA, et al. Resolution of microsporidial epithelial keratopathy in a patient with AIDS. *Ophthalmology* 1991; 98: 196-201.
154. Bicart-Sée A, Massip P, Linas MD, Datry A. Successful treatment with nitazoxanide of *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in a patient with AIDS. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 167-168.
155. Didier E, Bowers L, Stovall M, et al. Antimicrosporidial activity of (fluoro)quinolones in vitro and in vivo. *Folia Parasitol* 2005; 52: 173-181.
156. Bacchi CJ, Weiss LM, Lane S, et al. Novel synthetic polyamines are effective in the treatment of experimental microsporidiosis, an opportunistic AIDS-associated infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 55-61.
157. Coca M, Kim J, Shenoy S, et al. Microsporidial Stromal Keratitis: Successful Treatment with Topical Voriconazole and Oral Itraconazole. 2016, *Cureus*, Vol. 8 (12), p. e934.
158. Murthy S, Sangit V, Rathi V, Vemuganti G. Microsporidial spores can cross the intact Descemet membrane in deep stromal infection. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2013; 20: 80-82.