

Microsporidiosis en pacientes pediátricos con leucemia o linfoma

Gabriela Berenice Jiménez-González,* Mario Noé Martínez-Gordillo,* Silvia Caballero-Salazar,* Gustavo Esteban Peralta-Abarca,* Rocío Cárdenas-Cardoz,** Patricia Arzate-Barbosa,***Martha Ponce-Macotela*

* Parasitología Experimental, **Servicio de Oncología, ***Laboratorio de Bacteriología, Instituto Nacional de Pediatría.

Microsporidia in pediatric patients with leukemia or lymphoma

ABSTRACT

Introduction. *Microsporidia* are intracellular micro-organisms, characterized by mature spores with chitin walls and by one extrusive polar tube through which they pour their sporoplasm to the host cells. In immunocompromised patients, *Enterocytozoon bienewsi* and *Encephalitozoon intestinalis* produce diarrhea and systemic dissemination. In Mexico there is not information about microsporidia in children with cancer. **Objective.** The aim of this pilot study was to investigate the presence of microsporidia species in pediatric patients with leukemia or lymphoma. **Material and methods.** We obtained fecal samples from thirteen patients. The samples were processed to detect microsporidia by both modified Ziehl-Neelsen and clacofluor white stains, DNA was isolated to amplify rRNA specific sequences, to identify *E. bienewsi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi* and *E. hellem* by DNA polymerase chain reaction (PCR). Other parasites and pathogenic bacteria were also tested. **Results.** Based on morphologic traits 7/13 samples were found positives to microsporidia and 6/10 by PCR. Was identified *E. bienewsi* in three patients with leukemia and one with lymphoma, another two children with leukemia were infected with *E. intestinalis*. Almost all children were high-risk patients and in phase of re-induction, consolidation or with many chemotherapy treatments. All the patients with microsporidia did not present diarrhea at the moment of the sampling; however, in two children with diarrhea it was found *Cyclospora cayetanensis*. Also we obtained feces from five patients' mothers and microsporidia spores were identified by stain in all of them and by PCR it was diagnosed the species in three of them. **Conclusion.** It was demonstrated that the feces of patients with leukemia or lymphoma had microsporidia, therefore is necessary to know the prevalence of these microorganisms and to analyze their impact in evolution of cancer patients.

Key words. *Microsporidia*. *E. bienewsi*. *E. intestinalis*. *Cyclospora cayetanensis*. Leukemia. Lymphoma. Pediatric patients.

RESUMEN

Introducción. Los microsporidios son microorganismos intracelulares obligados caracterizados por producir esporas con pared de quitina y presentar un filamento polar mediante el cual vierten su esporoplasma a la célula huésped. En pacientes inmunocomprometidos *Enterocytozoon bienewsi* y *Encephalitozoon intestinalis* producen diarrea y diseminación sistémica. En México no hay información de microsporidios en niños con cáncer. **Objetivo.** El propósito de este estudio piloto fue identificar las especies de microsporidios en pacientes pediátricos con leucemia o linfoma. **Material y métodos.** Se obtuvieron muestras fecales de 13 pacientes, se procesaron para detectar microsporidios mediante tinciones de Ziehl-Neelsen y calcoflúor, se obtuvo DNA para amplificar secuencias específicas del rRNA para identificar *E. bienewsi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi* y *E. hellem* mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR), también se realizaron coproparasitoscópicos y coprocultivos. **Resultados.** Basados en caracteres morfológicos 7/13 muestras fueron positivas a microsporidios y con la PCR se determinó la especie en 6/10. Se identificó *E. bienewsi* en tres pacientes con leucemia y uno con linfoma; *E. intestinalis* se encontró en dos niños con leucemia. La mayoría de estos pacientes se encontraban en alto riesgo y en fase de reinducción, consolidación o con múltiples quimioterapias. Todos los pacientes con microsporidios no tuvieron diarrea en el momento del muestreo; sin embargo, en dos niños con diarrea se encontró *Cyclospora cayetanensis*. También se obtuvieron muestras de las madres de cinco pacientes, en las tinciones todas mostraron esporas de microsporidios y por PCR se identificó la especie en tres de ellas. **Conclusión.** Las muestras de heces de pacientes con leucemia o linfoma contenían microsporidios, por esta razón, es necesario implementar estudios enfocados en la búsqueda extraintestinal de estos microorganismos y analizar su impacto en la evolución de pacientes con cáncer.

Palabras clave. Microsporidios. *E. bienewsi*. *E. intestinalis*. *Cyclospora cayetanensis*. Leucemia. Linfoma. Pacientes pediátricos.

INTRODUCCIÓN

Los microsporidios son productores de enfermedades infecciosas emergentes. Análisis morfológicos y filogenéticos los han ubicado en el Reino Fungi, *Phylum Microsporidia*.¹⁻³ Se han descrito más de 100 géneros y más de 1,000 especies que infectan a invertebrados y vertebrados, incluido el hombre.⁴ Son microorganismos intracelulares obligados con pared celular de quitina, amitocondriados y con un tubo polar mediante el cual vierten el esporoplasma a la nueva célula hospedera.⁵

Antes de la aparición del HIV los casos con microsporidios fueron raros;^{6,7} posteriormente se incrementaron con el advenimiento del HIV.^{8,9} También se encontraron en pacientes sometidos a tranplantes¹⁰ y en personas inmunocompetentes,^{11,12} pero existen pocos reportes en pacientes con cáncer.¹³⁻¹⁶ En México solamente hay un estudio de microsporidiosis en un paciente con trasplante de riñón¹⁷ y otro en pacientes con SIDA.¹⁸ El propósito de este trabajo fue realizar un estudio piloto para investigar la presencia e identificación de especies de microsporidios en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia o linfoma.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se incluyeron niños de ambos sexos con diagnóstico de leucemia o linfoma e independientemente del estadio de evolución. Las características de los pacientes, el tipo de leucemia o linfoma, riesgo y fase del tratamiento se muestran en el cuadro 1. Se excluyeron los pacientes seropositivos al virus de inmunodeficiencia humana (HIV), hepatitis y a los que sus padres no otorgaron el consentimiento para su participación. Por otro lado, también se incluyeron a las madres de los niños que aceptaron participar en este estudio. Se contó con la carta de consentimiento informado para el paciente y para la madre.

De cada paciente y familiar se obtuvieron tres muestras de materia fecal para la realización de tinciones, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), coproparasitoscópicas y coprocultivos.

Tinción de Ziehl-Neelsen

Se hizo un frotis de materia fecal en un portaobjetos, se fijó con metanol absoluto; se colocó papel filtro sobre el frotis, se aplicó colorante carbol-fuchina, se calentó durante 20 min y se mantuvo emitiendo vapores. Se retiró el papel filtro, se decoloró

con alcohol-ácido (1%), se lavó con agua corriente y se aplicó azul de metileno (0.4%) durante 1 min. Se lavó, secó y se revisó al microscopio (Olympus BX41) 100X.

Tinción con blanco de calcoflúor

Al frotis fijado con metanol absoluto se le agregaron gotas de una solución que contenía: 1.0 mL de fluostain I (0.1 % en PBS pH 7.2), 1.0 mL de NaOH a 5% y 8.0 mL de azul de Evans (0.5% en PBS pH 7.2), se incubó durante 5 min en la oscuridad, se lavó con PBS hasta eliminar el exceso de colorante, se dejó secar a temperatura ambiente, se montó con resina sintética y se observó en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX50) con un objetivo 100X.¹⁹

Coproparasitoscópicas (CPS) y coprocultivos

Se realizaron coproparasitoscópicas directas en fresco y de concentración flotación para la búsqueda de parásitos intestinales, y coprocultivos para la identificación de bacterias que producen cuadros diarreicos.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- **Obtención del DNA.** De cada una de las muestras positivas a microsporidios en la tinción se realizó una suspensión homogénea, se tomaron 200 μ L y se sometieron a lisis celular mediante procedimientos físicos: cinco ciclos de congelación-descongelación (en nitrógeno líquido por 1 min y en agua en ebullición por 2 min). Posteriormente el DNA se obtuvo con el mini kit QIA-amp^R (QIAGEN, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.
- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Para la amplificación de los segmentos del gen del SSU-rRNA (subunidad pequeña del RNA ribosomal) de los microsporidios se utilizaron los oligonucleótidos específicos para cada especie: *E. bienersi* (EBIEF1-EBIER1) que amplifica un producto de 607 pb, *E. intestinalis* (SINTF1-SINTR1) para un producto de 520 pb, *E. cuniculi* (ECUNF1- ECUNR1) con un producto de 549 pb y *E. hellem* (EHEL1-EHEL2) con un producto de amplificación de 547 pb.²⁰⁻²²

Cuadro 1. Microsporidiosis en pacientes con linfoma o leucemia.

Paciente	Género	Edad (años)	Estado	Leucemia/Linfoma	Riesgo	Evolución (meses)	Fase de tratamiento	Diarrea	Tinción Microsp.	DNA	PCR
1	M	7.3	Hidalgo	LAL pre B	Habitual	5	Consolidación	Sí	Negativo	NO	-
2	F	5.6	Puebla	LAL pre B	Habitual	3	Consolidación	No	Positivo	Sí	E.b.
3	M	15	Estado de México	Linfoma de Burkitt	Etapas avanzadas EIII	2	Inducción a la remisión	No	Positivo	Sí	Neg
4	F	10	Estado de México	Linfoma linfoblástico, estadio III	Alto	10	Reinducción a la remisión por recaída a MO	No	Negativo	Sí	E.b.
5	M	4.2	Hidalgo	LAL pre B	Alto por edad y CT	2	Inducción a la remisión	Sí	Negativo	NO	
6	F	14	Hidalgo	LAL, no T no B	Alto	48	Reinducción a la remisión por recaída a SNC y MO	No	Positivo	Sí	E.b.
7	F	7	Puebla	LAL, L1 pre B	Alto por CT y cromosoma Filadelfia	15	Quimioterapia y Glivec	No	Negativo	Sí	Neg
8	F	9.5	Guerrero	LAL pre B	Habitual	1	Inducción a la remisión	Sí	Negativo	NO	
9	M	9	D.F.	Linfoma linfoblástico, estadio III	Alto por masa mediastinal	8	Consolidación	No	Negativo	Sí	Neg
10	M	15	D.F.	LAL pre B	Alto	22	Consolidación, recaída temprana y refractario a tratamiento	No	Positivo	Sí	E.i.
11	M	1.6	Veracruz	LAL pre B	Alto riesgo por expresión CD13, Sx Down	3	Inducción a la remisión	No	Positivo	Sí	E.b.
12	F	0.11	Estado de México	LAL pre B	Alto riesgo por edad, CT y traslocación 11q23	5	Consolidación	No	Positivo	Sí	Neg
13	F	2.9	Estado de México	Leucemia aguda mieloblástica. M2	Alto	24	Múltiples quimioterapias, múltiples recaídas, refractaria a tratamiento	No	Positivo	Sí	E.i.

LAL pre B: leucemia aguda linfoblástica precursor B. CT: carga tumoral. MO: médula ósea. SNC: sistema nervioso central. Microsp: microsporidiosis. E.b: *Enterocytozoon bieneusi*. E.i: *Encephalitozoon intestinalis*. NO: no se obtuvo.

La mezcla de la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μL que contenía: DNA, 1.5 μL ; dNTPs, 2.0 μL (200 μM); oligonucleótidos, 2.0 μL de cada uno en concentración de 2×10^{-5} M; Taq DNA polimerasa (Applied Biosystems), 1.0 μL (5U); MgCl_2 , 3.0 mM; amortiguador 1X para PCR y agua.

Las condiciones de corrimiento fueron: desnaturalización a 95 °C/10 min, 35 ciclos de 95 °C/30 seg; 56 °C/30 seg; 72 °C/90 seg y un tiempo de síntesis final de 72 °C/7 min, en un termociclador (Perkin Elmer).

Los productos amplificados se analizaron en un gel de agarosa a 2.0% con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en amortiguador de tris-boratos-EDTA (TBE 1X); a 60V, 30mA, 10W, durante 120 min y el patrón electroforético se registró en un digitalizador de imágenes (EpiChem).

RESULTADOS

Se estudiaron 13 pacientes, cuyas edades estaban entre 11 meses y 15 años. Ocho presentaron leucemia aguda linfoblástica (LAL) pre B, dos con linfoma linfoblástico estadio III y tres tuvieron LAL no T no B, leucemia aguda mieloblástica (M2) o linfoma de Burkitt estadio III, respectivamente. El tiempo de evolución del cuadro de base fue desde un mes hasta

48 meses. Nueve se encontraban en alto riesgo. Dos pacientes estaban en reinducción a la remisión por recaída a médula ósea, dos fueron refractarios al tratamiento, uno con quimioterapia más glivec y el resto en inducción a la remisión o consolidación (Cuadro 1).

Mediante las tinciones de Ziehl-Neelsen y calcoflúor se identificaron esporas de $\approx 1.5 \mu\text{m}$ en 7/13 muestras (53%) (Figura 1). Con la PCR se determinó la especie de microsporidios en 6/10 (60%); en las muestras de cuatro pacientes se amplificó un producto de ≈ 607 pb con los oligos (EBIEF1-EBIER1) específicos para *E. bienewsi* y en otras dos se amplificó un producto de ≈ 520 pb con los oligos (SINTF1-SINTR1) correspondientes a *E. intestinalis* (Figura 2).

Por otro lado, se obtuvieron muestras de las madres de cinco pacientes; en todas se encontraron esporas con las tinciones de Ziehl-Neelsen y calcoflúor. En el análisis molecular se detectaron microsporidios en tres. En una se encontró mezcla de *E. bienewsi*-*E. intestinalis*, las otras dos con *E. intestinalis* o *E. bienewsi*.

Tres pacientes presentaron evacuaciones diarreicas, pero en ninguno se identificaron esporas de microsporidios; sin embargo, dos estuvieron parasitados con *Cyclospora cayatanensis* (pacientes 1

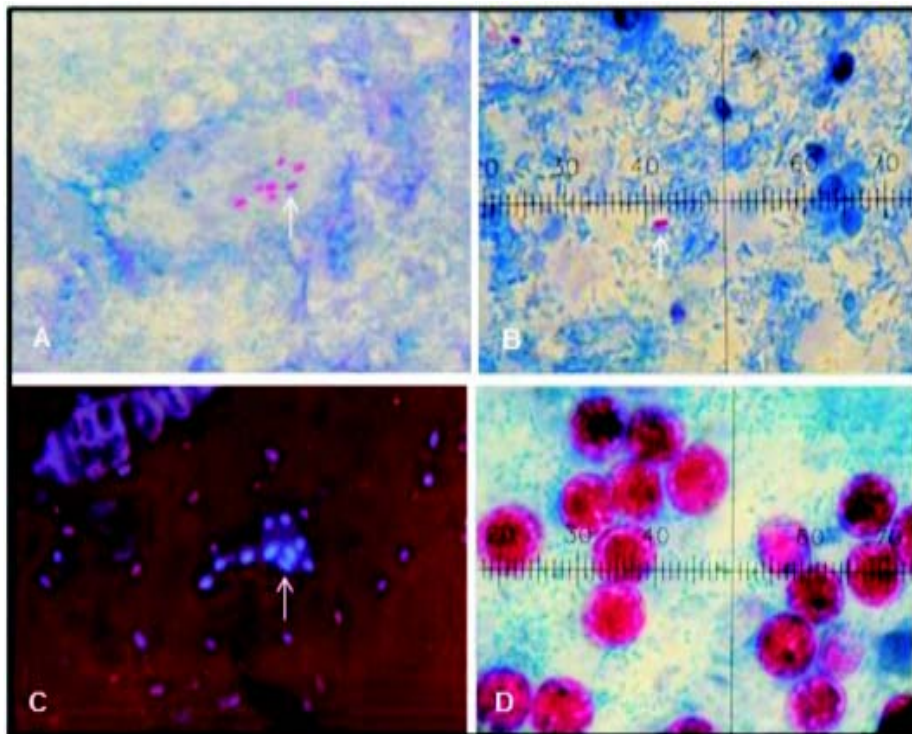


Figura 1. Tinción de Ziehl-Neelsen modificada y Blanco de calcoflúor. A, B. Muestras del paciente 10 teñidas con Ziehl-Neelsen, se observan estructuras (esporas) $< 2.0 \mu\text{m}$, rojas con polos intensamente teñidos (flechas), en un fondo azul. 100X. Cada línea corresponde a 1.0 μm . C. Muestra del paciente 2 teñida con calcoflúor, esporas que refringen de azul celeste. D. Muestra del paciente 1 teñida con Ziehl-Neelsen. Oocistos de *Cyclospora cayatanensis* $\approx 8.0 \mu\text{m}$ de diámetro, rojos en un fondo azul. 100X. Cada línea corresponde a 1.0 μm .

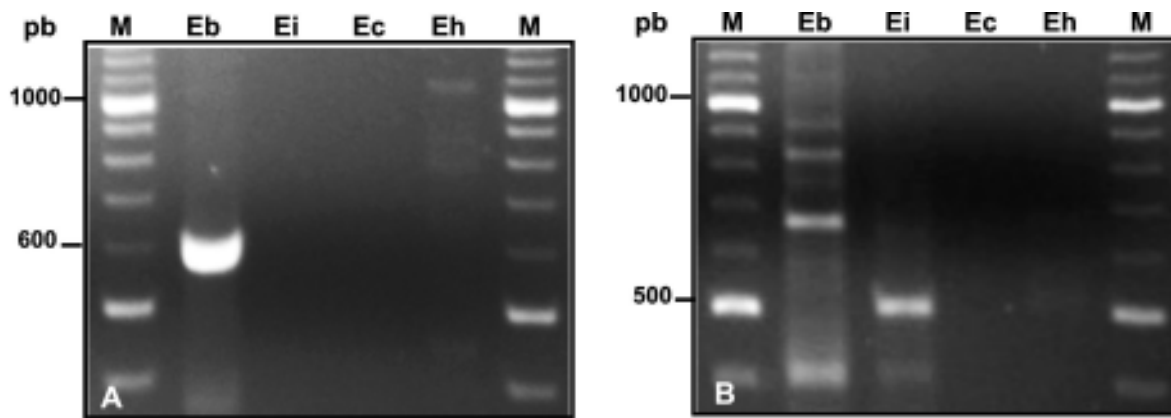


Figura 2. Electroforesis del DNA amplificado mediante la PCR. Productos amplificados con oligonucleótidos específicos para cada especie, en gels de agarosa a 2.0%, teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). A. Muestra del paciente 6. En el carril Eb se observa una banda de ≈ 607 pb., característica de *Enterocytozoon bienewisi*. B. Muestra del paciente 10. En el carril Ei se aprecia una banda de ≈ 520 pb., típica de *Encephalitozoon intestinalis*. Las bandas que se observan en Eb no son distintivas para *E. bienewisi*. M: marcador de pares de bases (escalera de 100 pb). Eb: *E. bienewisi*. Ei: *E. intestinalis*. Ec: *E. cuniculi*. Eh: *E. heleni*.

y 5) (Cuadro 1) (Figura 1). En el resto de los niños y en las madres no se encontraron otros parásitos ni bacterias patógenas en los coproparasitoscópicos y coprocultivos.

DISCUSIÓN

En este estudio, mediante la PCR con oligonucleótidos especie-específicos, se determinó la especie de microsporidio en las muestras de heces de seis pacientes con leucemia o linfoma. *E. bienewisi* en cuatro y *E. intestinalis* en dos. Estas especies de microsporidios son las más frecuentemente encontradas en pacientes inmunocomprometidos con cuadros diarreicos.²³

En México, hasta donde se sabe, solamente hay dos estudios de microsporidiosis: el caso de un paciente adulto sometido a trasplante de riñón que presentó infección diseminada por *E. cuniculi*;¹⁷ el otro se trató de un estudio retrospectivo de pacientes con HIV y diagnóstico de microsporidiosis detectados por microscopia de luz en biopsias teñidas con Giemsa.¹⁸

La mayoría de los pacientes tuvieron LAL pre B, seis de ellos en alto riesgo por edad, carga tumoral, recaída temprana, expresión CD13, síndrome de Down o Traslocación 11q23 (Cuadro 1). Se ha reportado que en la población infantil la forma más común de cáncer es la leucemia aguda linfoblástica (LAL) y es la primera causa de mortalidad en niños con cáncer. También la leucemia aguda mieloblástica (LAM) es otro de los cánceres en niños con baja tasa de curación (35-50%).²⁴ En relación con los lin-

fomas se sabe que los no Hodgking son los más frecuentes y su comportamiento tumoral es semejante al de la leucemia.

El paciente con LAL no T no B (paciente 6) (Cuadro 1) con 48 meses de evolución de la leucemia se encontraba en reinducción a la remisión por recaída a SNC y MO; falleció a la semana de la toma de la muestra de heces. El paciente con LAM-M2 (paciente 13) (Cuadro 1) presentaba 24 meses de evolución de la leucemia, múltiples recaídas, era refractario al tratamiento y falleció dos meses después de la obtención de la muestra. Estos pacientes no tuvieron sintomatología intestinal, desafortunadamente no se obtuvieron muestras de aspirado bronquioalveolar, sangre u orina y no se pudo corroborar si hubo diseminación extraintestinal de los microsporidios; sin embargo, se encontraban con actividad tumoral que probablemente fue el motivo que los llevó al fallecimiento. En la literatura existen dos reportes de casos de pacientes adultos con LAM y microsporidiosis en aparato respiratorio que presentaron insuficiencia respiratoria aguda y fallecieron.^{13,14} Es necesario investigar el impacto de estos microorganismos en la evolución de los pacientes con cáncer.

Adicionalmente a las muestras de los pacientes se detectaron microsporidios por PCR en las muestras de las madres de tres niños. En el paciente 6 (Cuadro 1) se encontró *E. bienewisi* y en su familiar mezcla de *E. bienewisi*-*E. intestinalis*. En el paciente número 11 y en su familiar se encontró *E. bienewisi*, y en el paciente número 7 no se encontraron microsporidios, pero en su madre se encontró *E. intestinalis*. Ellos provenían de Hidalgo, Veracruz y Puebla,

respectivamente. Estos hallazgos llevan a varias interrogantes:

- ¿Por qué en el familiar se encontraron microsporidios y en el paciente no?
- ¿Por qué los pacientes y los familiares no presentaron sintomatología intestinal?, y
- ¿Cuál fue la fuente de infección?

Se desconoce, pero es importante señalar que además de la microsporidiosis en pacientes inmunocomprometidos también se ha reportado en personas inmunocompetentes,²⁵ incluso es posible que en algunos lugares prevalezcan genotipos (tipos o subtipos) con grados de virulencia diferencial o, como se ha propuesto, evolutivamente la interacción durante mucho tiempo, hospedero-parásito (mamíferos-microsporidios) le ha llevado a la disminución de la patogenicidad.²⁶

Probablemente el agua bebida fue la fuente de infección de algunos de los pacientes y sus familiares, ya que se ha documentado que en personas inmunocompetentes el agua de beber es un factor de riesgo importante para la adquisición de la microsporidiosis.¹²

Por otro lado, para evitar infección en las salas de pacientes bajo quimioterapia se extreman las medidas de control del personal y familiares, tales como el lavado de manos y manejo adecuado de los fluidos, como fue el caso de los pacientes de este estudio.

El diagnóstico morfológico de microsporidios en muestras de heces es complicado por el tamaño de las esporas: *Enterocytozoon* (1.1 a 1.6 x 0.7 a 1.0 μm) y *Encephalitozoon* (2.0 a 2.3 x 1.0 a 1.5 μm).⁵ Para resaltar su morfología se han utilizado las tinciones de Weber, Gram cromotropeo, blanco de calcoflúor^{19,27,28} y en algunos estudios se reporta la tinción Ziehl-Neelsen.⁷ En opinión de los autores, la tinción de Ziehl-Neelsen tiene la ventaja de que las esporas se tiñen de color rojo con los polos intensamente teñidos, en un fondo azul o verde (Figura 1). Además, está estandarizada en la mayor parte de laboratorios de parasitología y microbiología, por lo que solamente faltaría el entrenamiento para observar y discriminar a las esporas.

Algunos estudios han mostrado mayor sensibilidad de la PCR.^{16,29} En este estudio se encontraron muestras positivas a la PCR y negativas a la tinción, y viceversa, pero la ventaja de la PCR es la identificación de las especies. Debido a la carencia de registros de microsporidiosis en pacientes mexicanos es necesario realizar estudios de epidemiología molecular que muestren las especies predominantes en poblaciones en riesgo.

Por otro lado, en los coproparasitoscópicos y coprocultivos no se encontraron parásitos ni bacterias patógenas. Sin embargo, con la tinción de Ziehl-Neelsen se encontraron ooquistes de *Cyclospora cayentanensis* en dos de tres pacientes con diarrea (negativos a microsporidios en la tinción). Este parásito intracelular, emergente, también coloniza el intestino delgado y produce diarrea en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos.^{30,31} En nuestro país son pocos los casos reportados de cyclosporiasis: dos pacientes pediátricos sin cuadro clínico de base³² en 3% de una población infantil³³ y en pacientes adultos con AIDS.³⁴ Pero no hay reportes en pacientes pediátricos con leucemia, revelando la importancia de los parásitos oportunistas en pacientes con padecimientos de base que alteran la respuesta inmunológica.

CONCLUSIONES

Debido a que los pacientes con LAL, LAM o linfoma se mantienen en hospitalización para quimioterapia y muchos de ellos se encuentran en alto riesgo es necesario buscar intencionalmente la infección intestinal por microsporidios, así como también su diseminación a otros órganos o sistemas. Además de las tinciones es necesario implementar estudios moleculares para conocer la predominancia de especies involucradas, medir la carga parasitaria en función del tiempo y demostrar *in vitro* o *in vivo* la virulencia de aislados clínicos obtenidos de las heces de este tipo de pacientes con o sin diarrea.

REFERENCIAS

1. Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev* 1998; 73: 203-66.
2. Hirt RP, Logsdon Jr JM, Healy B, Dorey MW, Doolittle WF, Embley TM. Microsporidia are related to fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 580-5.
3. Van de Peer Y, Ben Ali A, Meyer A. Microsporidia: accumulating molecular evidence that a group of amitochondriate and suspectedly primitive eukaryotes are just curious fungi. *Gene* 2000; 246: 1-8.
4. Sprague V, Becnel JJ, Hazard EI. Taxonomy of phylum microspora. *Crit Rev Microbiol* 1992; 18: 285-395.
5. Franzen C, Müller A. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 243-85.
6. Matsubayahsi H, Koike T, Mikata I, Takei H, Hagiwara S. A case of Encephalitozoon-like body infection in man. *Arch Pathol* 1959; 67: 181-7.
7. Margileth AM, Strano AJ, Chandra R, Neafie R, Blum M, McCully RM. Disseminated nosenmatosis in an immunologically compromised infant. *Arch Pathol* 1973; 95: 145-50.
8. Curry A, Mc William LJ, Haboubi NY, Mandal BK. Microsporidiosis in a British patients with AIDS. *J Clin Pathol* 1988; 41: 477-8.

9. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 426-61.
10. Lantienier F, Boutboul D, Menotti J, Chandesris MO, Sarfati C, Mamzer MF, et al. Microsporidiosis in solid organ transplant recipients: two Enterocytozoon bienewsi cases and review. *Transpl Infect Dis* 2009; 11: 83-8.
11. Wichro E, Hoelzl D, Krause R, Bertha G, Reinthaler F, Wenisch Ch. Microsporidiosis in travel-associated chronic diarrhea in immune-competent patients. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73: 285-7.
12. Enriquez FJ, Taren D, Cruz-López A, Muramoto M, Palting JD, Cruz P. Prevalence of intestinal Encephalitozoonosis in Mexico. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1227-9.
13. Yazar S, Eser B, Yalçın Şahin I, Koç N. A case pulmonary microsporidiasis in an acute myeloblastic leukemia (AML)-M3 patient. *Yonsei Med J* 2003; 44: 146-9.
14. Orenstein JM, Russo P, Didier ES, Bowers C, Bunin N, Teachey DT. Fatal pulmonary microsporidiosis due to Encephalitozoon cuniculi following allogeneic bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia. *Ultrastruct Pathol* 2005; 29: 269-76.
15. Lono AR, Kumar S, Chye TT. Incidence of microsporidia in cancer patients. *J Gastrointest Canc* 2008; 39: 124-9.
16. Chabchoub N, Abdelmalek R, Mellouli F, Kanoun F, Thellier M, Bouratbine A, et al. Genetic identification of intestinal microsporidia species in immunocompromised patients in Tunisia. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80: 24-7.
17. Gamboa-Domínguez A, De Anda J, Donis J, Ruiz-Maza F, Visvesvara GS, Diliz H. Disseminated Encephalitozoon cuniculi infection in a Mexican kidney transplant recipient. *Transplantation* 2003; 75: 1898-900.
18. Gamboa DA, Bencosme VC, Kato MM. Microsporidiasis en pacientes con sida y diarrea crónica. Experiencia en el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. *Rev Gastroenterol Mex* 1999; 64: 70-4.
19. Contreas CN, Sowerby T, Berlin GW, Dahlan F, Nguyen A, Porschen R, 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(9): 847-53.
20. Visvesvara GS, Leitch GJ, Da Silva AJ, Croppo GP, Moura H, Wallace S, et al. Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small-subunit rRNA identification of a microsporidian, Encephalitozoon hellem, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2760-8.
21. Da Silva AJ, Schwartz DA, Visvesvara GS, de Moura H, Slemenda SB, Pieniazek NJ. Sensitive PCR diagnosis of infections by Enterocytozoon bienewsi (Microsporida) using primers based on the region coding for small-subunit rRNA. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 986-7.
22. Da Silva AJ, Slemenda SB, Visvesvara GS, Schwartz DA, Wilcox CM, Wallace S, et al. Detection of Septata intestinalis (Microsporidia) Cali et al.1993 using polymerase chain reaction primers targeting the small subunit ribosomal RNA coding region. *Mol Diagn* 1997; 2: 47-52.
23. Didier ES. Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica* 2005; 94: 61-76.
24. Ravindranath Y. Recent advances in pediatric acute lymphoblastic and myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol* 2003; 15: 23-35.
25. Nkinin SW, Asonganyi T, Didier ES, Kaneshiro ES. Microsporidian infection is prevalent in healthy people in Cameroon. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2841-6.
26. Weber R, Bryan RT. Microsporidial infections in immunodeficient and immunocompetent patients. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 517-21.
27. Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorelkin L, Visvesvara GS. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N Engl J Med* 1992; 326: 161-6.
28. Moura H, Schwartz DA, Bornay-Llinares F, Sodr e FC. 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: 888-93.
29. M ller A, Stellermann K, Hartmann P, Schrappe M, F tkenheuer G, Salzberger B, et al. A powerful DNA extraction method and PCR for detection of microsporidia in clinical stool specimens. *Clin Diag Lab Immunol* 1999; 6: 243-6.
30. Ortega YR, Sterling Ch R, Gilman RH, Cama VA, Díaz F. Cyclospora species-A new protozoan pathogen of humans. *N Engl J Med* 1993; 328: 1308-12.
31. Shields JM, Olson BH. Cyclospora cayetanensis: a review of an emerging parasitic coccidian. *Int J Parasitol* 2003; 33: 371-91.
32. Ponce-Macotella M, Cob-Sosa C, Martínez-Gordillo MN. Cyclospora en dos niños mexicanos. *Rev Invest Clin* 1996; 48: 461-3.
33. Diaz E, Mondragon J, Ramirez E, Bernal RM. Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 384-5.
34. Sifuentes-Osornio J, Porras-Cort es G, Bendall RP, Morales-Villarreal F, Reyes-Ter n G, Ruiz-Palacios GM. Cyclospora cayetanensis infection in patients with and without AIDS: biliary disease as another clinical manifestation. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 1092-7.

Reimpresos:

Dra. Martha Ponce-Macotella
 Parasitología Experimental
 Instituto Nacional de Pediatría
 Insurgentes Sur, Núm. 3700-C
 Col. Insurgentes Cuicuilco
 04530, México, D. F.
 Tel.: (52 55) 1084-0900 Ext. 1454
 Correo electrónico: macotelam@yahoo.com

*Recibido el 25 de enero 2011.
 Aceptado el 11 de agosto 2011.*