
**MICROSPORIDIOSE HUMANA E
IMPORTÂNCIA MÉDICA: UMA REVISÃO**

Ricardo Sousa Manzi,¹ Marco Tulio A. Garcia-Zapata² e Edson Sidião de Souza Júnior³

RESUMO

A microsporidiose é uma doença humana pouco conhecida na classe médica. Afeta preferencialmente populações de pacientes imunossuprimidos, sendo catalogada como uma infecção oportunista e emergente. É produzida por diminutos protozoários intracelulares do *Phylum Microspora*, os quais ocasionam vários quadros clínicos, de localização intestinal ou sistêmica. Os esporos de alguns desses parasitos (*Encephalitozoon intestinalis* e *Enterocytozoon bieneusi*) são comumente eliminados nas fezes, possibilitando o seu diagnóstico pela microscopia óptica. Neste trabalho, fazemos uma revisão sobre os aspectos patogênicos, clínico-epidemiológicos e diagnósticos dessa doença, visando ampliar o conhecimento sobre esses intrigantes parasitos.

DESCRITORES: Microsporidiose humana. Aids. HIV. Imunossupressão. Infecções oportunistas.

ASPECTOS HISTÓRICOS

Mais de cem agentes patógenos – entre os quais se destacam vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos e artrópodes – já foram identificados até o presente momento. Esses agentes produzem infecção e enfermidades oportunistas em indivíduos imunodeprimidos, principalmente naqueles infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (3). É o caso, por exemplo, das enterites, agudas ou crônicas, e de etiologias variadas.

1 Mestre em Medicina Tropical pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG).

2 Professor titular do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia (DMIPP), IPTSP, UFG.

3 Mestrando em Medicina Tropical, IPTSP, UFG. E-mail: sidiao@hotmail.com.

Endereço para correspondência: Caixa Postal 12911 – Setor Leste Vila Nova 74643-970, Goiânia - GO. E-mail: zapata@iptsp.ufg.br

Recebido para publicação em 27/12/2001. Revisto em 12/12/2002. Aceito em 29/12/2002.

Com a Aids surgiram doenças caracterizadas como novas, emergentes ou reemergentes (2), cujos agentes etiológicos – em sua grande maioria – só tinham importância até então na medicina veterinária (28).

Esses agentes patógenos, especialmente os coccídeos intestinais (*Isospora belli*, *Cryptosporidium parvum* e a recém-descoberta *Cyclospora cayetanensis*) e os microsporídios, provocam infecções refratárias ou incuráveis, que podem inclusive levar a óbito (29). O primeiro caso de infecção por microsporídios em humanos foi relatado em 1959 (39); em pacientes HIV-positivos, em 1985 (17).

Em 1994 registrou-se um caso de microsporidiose associado com diarreia dos viajantes, aguda e autolimitada, em um indivíduo imunocompetente não-infectado pelo HIV (50). Há relatos de apenas dez casos dessa enfermidade em não-portadores de HIV, como é o caso de um paciente transplantado na França em 1996 (38).

Atualmente, a microsporidiose humana é uma das principais doenças de caráter oportunista em pacientes imunodeprimidos, em especial pelo HIV, com contagem de células CD4 inferior a 50–100/ μ l e com presença de diarreia crônica (8, 21).

Entre os agentes patógenos envolvidos, a *Enterocytozoon bieneusi* é a mais frequentemente encontrada, seguida da *Encephalitozoon intestinalis*, anteriormente classificada como *Septata intestinalis* (6, 15, 30). Essas duas espécies são habitualmente encontradas no trato gastrointestinal, podendo ocasionar infecção disseminada – especialmente a *Encephalitozoon intestinalis* – com comprometimento do trato urinário, fígado, vias biliares, trato respiratório, seios paranasais, peritônio, musculatura estriada, rins e SNC (64).

Casos de microsporidiose humana estão sendo relatados na literatura desde 1985 na Europa, África, Austrália e nos Estados Unidos (25). No Brasil, somente em 1993 identificaram-se esporos de microsporídios nas fezes de dois portadores de HIV que apresentavam diarreia crônica (7). No mesmo ano, em um estudo retrospectivo, foi evidenciado outro caso de microsporidiose em um paciente com ceratite de causa indeterminada (7). Desde então quarenta casos de infecções por microsporídios já foram observados no Rio de Janeiro, em São Paulo, no Ceará e em Pernambuco (7, 66).

Uma equipe multidisciplinar de investigadores vem desenvolvendo estudos para o diagnóstico e controle de doenças emergentes e reemergentes de interesse médico-sanitário no Estado de Goiás, particularmente sobre essa enfermidade, para analisar, compreender e identificar racionalmente este parasito.

Nesta atualização procuramos abordar sucintamente os aspectos gerais sobre a microsporidiose humana, enfocando principalmente as características clínicas e epidemiológicas e os métodos diagnósticos, para

uma melhor compreensão acerca da história natural dessa infecção no Brasil. O levantamento bibliográfico deste trabalho foi realizado entre janeiro de 2000 e dezembro de 2001, sendo, para tal, consultados vários bancos de informação.

BIOMORFOLOGIA

O termo microsporídio é usado como uma nomenclatura generalizada para designar um grupo de protozoários intracelulares obrigatórios, pertencentes ao *Phylum Microspora*. Sua taxonomia do microsporídio é complexa e controversa. Estudos recentes sugerem que esse microrganismo estaria filogeneticamente mais próximo de fungos do que de protozoários (33, 55), mas, por não apresentar mitocôndrias e aparelho de Golgi, o microsporídio é ainda caracterizado como eucarionte primitivo (58, 59, 62).

Desde 1857, há relatos sobre o acometimento de vários grupos de animais invertebrados por esse agente causal (61, 63). Além dos processos patológicos em humanos, esse parasito pode causar doenças em insetos, mamíferos e peixes e criar problemas econômicos nas indústrias de pescados, na produção da seda e em outros ramos de atividades. Vale ressaltar, entretanto, que os microsporídios podem ser benéficos para os humanos, ao atuarem como agentes de controle biológico contra pragas de gafanhoto (23).

Apesar de existirem mais de 140 gêneros e 1.200 espécies identificadas, apenas 14 espécies de microsporídios são reconhecidas como causadoras de patologias em humanos (11): *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellen*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Pleistophora* sp, *Trachipleistophora hominis*, *Trachipleistophora anthropophthera*, *Nosema ocularum*, *Nosema algerae*, *Vittaforma corneae*, *Microsporidium ceylonensis*, *Microsporidium africanum*, *Brachiola vesicularum*, *Brachiola connori* (Tabela 1).

A classificação dos microsporídios ainda se baseia em critérios primários, considerando as características morfológicas como o tamanho do esporo e o número de filamentos do tubo polar, a forma e o número de núcleos nos diferentes estágios de desenvolvimento, a morfologia, o sítio de desenvolvimento dos estágios intracelulares, bem como a presença ou ausência do vacúolo citoplasmático (14).

Dependendo da configuração dos núcleos, diferentes gêneros podem ser caracterizados. Os gêneros *Encephalitozoon* spp (esporo mononucleado) e *Pleistophora* spp (múltiplos esporos individuais) apresentam-se multiplicando-se dentro de um vacúolo parasitóforo, cuja membrana é de origem parasitária. Ambos pertencem à subordem Pansporoblastina.

Quando essa divisão parasitária efetua-se em contato direto com o citoplasma do hospedeiro, tem-se a subordem Apansporoblastina,

representada principalmente pelos gêneros *Enterocytozoon* spp (organismo mononucleado) e *Nosema* spp (esporos binucleados). Os dois modelos de configuração do núcleo podem ocorrer nas diferentes fases do ciclo de vida desses gêneros.

Tabela 1. Resumo dos principais gêneros e espécies de microsporídios patógenos para humanos e sua síndrome clínica

| Síndrome clínica | Gênero e espécie de microsporídios |
|----------------------------|---|
| Miosite | <i>Pleistophora</i> spp, <i>Trachipleistophora homminis</i> , <i>Trachipleistophora</i> spp, <i>Anthropophthera</i> spp |
| Infecção ocular | <i>Nosema conori</i> , <i>Nosema oculorum</i> , <i>Nosema algerae</i> , <i>Vittaforma corneae</i> , <i>Microsporidium ceylonensis</i> , <i>Microsporidium africanum</i> , <i>Brachiola vesicularum</i> , <i>Brachiola connori</i> , <i>Encephalitozoon hellen</i> , <i>Encephalitozoon cuniculi</i> |
| Peritonites, hepatite | <i>Encephalitozoon cuniculi</i> |
| Pneumonia | <i>Encephalitozoon hellen</i> , <i>Enterocytozoon bieneusi</i> |
| Rinossinusite | <i>E. cuniculli</i> , <i>E. hellen</i> |
| Diarréia | <i>E. bieneusi</i> , <i>E. intestinalis</i> |
| Infecção disseminada | <i>E. intestinalis</i> , <i>E. hellen</i> , <i>N. connori</i> |
| Bronquites | <i>E. bieneusi</i> , <i>E. hellen</i> |
| Colecistite e colangite | <i>E. bieneusi</i> , <i>E. intestinalis</i> |

Os microsporídios são parasitos intracelulares obrigatórios em todos os seus estágios, com exceção dos esporos, que apresentam um momento extracelular, quando eliminados pelas fezes ou por outro fluido corpóreo. Desenvolvem-se por divisão múltipla ou merogonia, seguida de esporogonia, no interior da célula do hospedeiro. O seu ciclo de vida é monoxeno e até agora não há evidências de participação de um hospedeiro intermediário e/ou vetor.

Após a infecção do hospedeiro, a contaminação de novas células se faz pela adesão dos esporos à membrana, com posterior influxo de cálcio coincidindo com a extrusão, por mecanismo de ejeção, do tubo ou filamento polar, através do qual se inoculam o esporoplasma e outros elementos infecciosos.

No caso do *E. bieneusi*, o mecanismo de entrada desse organismo não está bem elucidado e permanece hipoteticamente baseado no mesmo modelo supracitado de injeção do esporoplasma pelo tubo polar (27). Em resumo, podem-se caracterizar três estágios no seu ciclo biológico: uma fase infectante através dos esporos; uma fase de proliferação com formação dos

esquizontes e merontes originários do esporoplasma inoculados; e, por último, a fase esporogônica, com a diferenciação dos merontes em esporontes e com posterior formação dos esporos. A merogonia e a esquizogonia podem ocorrer, ao mesmo tempo, na mesma célula (Figura 1).

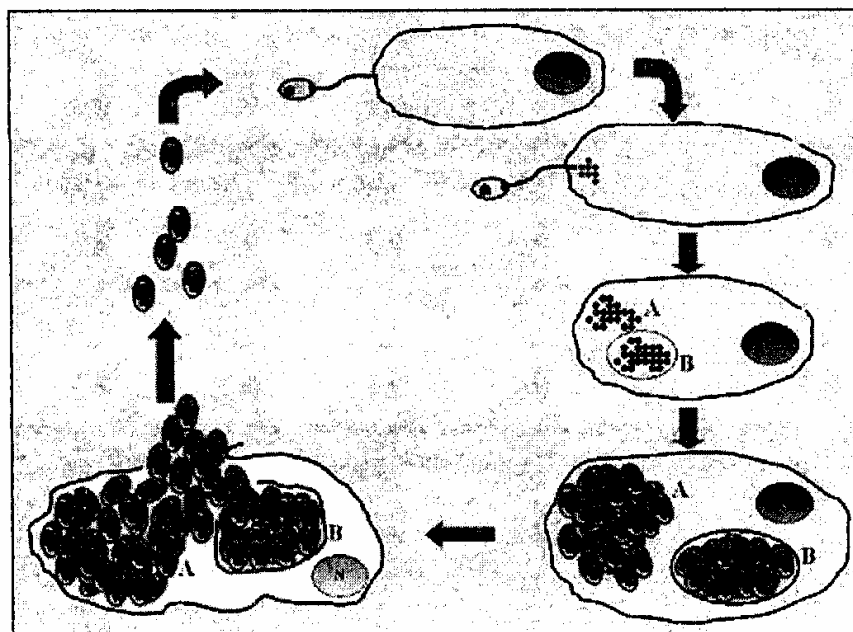


Figura 1. Ciclo biológico dos microsporídios

Fonte: adaptada de CDC (2000)

Os esporos dos microsporídios que parasitam o homem têm forma ovóide e medem em torno de 1-3 μm de diâmetro, dependendo da espécie envolvida. Análises por ME evidenciaram que os esporos são constituídos por dupla membrana: o exosporo, que é eletrondenso e constituído de material protéico, e o endosporo, que é mais espesso e formado por alfaquitinina. Esta última se responsabiliza pela durabilidade prolongada do esporo no meio externo adverso. O seu interior caracteriza-se pela presença de uma estrutura patognomônica, ou seja, pela presença de um tubo ou filamento polar aderido a um disco de ancoragem, fixo na extremidade do esporo. No interior dos esporos são encontradas outras estruturas, tais como núcleos, polaroplasto, plasmalema, vacúolo posterior e ribossomos (54).

EPIDEMIOLOGIA

Os relatos de microsporídios no homem revelam que esse agente patógeno tem ampla distribuição geográfica e afeta pessoas que viajam constantemente para regiões tropicais (36). Pouco se sabe, contudo, sobre a epidemiologia desse agente, mas acredita-se que ela varia de acordo com o estado imune do hospedeiro e com a espécie do parasito. Vale ressaltar que o

escasso conhecimento da microsporidiose no homem, por parte dos profissionais da área, e as dificuldades clínicas e laboratoriais para diagnóstico restringem a realização de inquéritos epidemiológicos.

A elevada prevalência de soropositividade ao *Encephalitozoon cuniculi*, sem correlação clínica ou epidemiológica, assim como a existência da possibilidade de reações cruzadas com antígenos de outras espécies de microsporídios, torna controverso o estudo de soroprevalência (37).

Na medicina humana, o microsporídeo tem sido objeto de estudo, principalmente quando afeta indivíduos que apresentam algum déficit imunitário, como é o caso dos portadores HIV e pacientes com Aids, com dados de prevalência oscilando entre 5 a 50% (38). Provavelmente a larga diferença entre esses dados pode ser atribuída ao emprego de técnicas diagnósticas diferenciadas, à diversidade de exposição e à variação geográfica.

Relatos de infecção pela espécie *Enterocytozoon bieneusi* em indivíduos assintomáticos sugerem a possibilidade da existência do portador sã. Recentemente essa espécie, até então exclusiva de pacientes com Aids, foi considerada como responsável por promover diarreia em um hospedeiro com competência imune (50), assim como em pacientes pós-transplantados (64) e com doença renal crônica (1).

As fontes de infecção e os mecanismos de transmissão não estão muito bem elucidados; a única fonte de infecção concreta são os indivíduos que eliminam esporos pelas fezes, urina, secreções respiratórias e outros fluidos corpóreos. Ultimamente, algumas investigações acerca do caráter zoonótico das microsporidioses revelam que o contato com animais pode representar um alto risco de infecção para a população, inclusive para os pacientes com Aids (6, 16, 52, 64). Acredita-se na existência de cepas de determinadas espécies que possuem esse caráter zoonótico, mas até o momento a hipótese mais plausível é a transmissão de pessoa a pessoa pela ingestão de esporos.

Recentemente foi relatado o primeiro caso confirmado de contaminação de água por microsporídios patógenos de humanos (12, 20). Suspeita-se que a inalação de esporos seja outra possibilidade de transmissão da microsporidiose extra-intestinal, devido à presença de esporos de *E. bieneusi*, *E. intestinalis* e de outras espécies na via respiratória (18, 65). A transmissão sexual, a inoculação direta e a via transplacentária são outras prováveis rotas de transmissão dessa parasitose.

Nos últimos anos, pesquisas estão sendo realizadas para determinar as diferentes cepas de espécies de microsporidiose humana, no intuito de servir como pré-requisito para um melhor esclarecimento acerca da história natural da infecção em humanos, bem como de sua própria epidemiologia (35, 48, 52).

Em resumo, os dados de prevalência da microsporidiose humana são ainda escassos, seja pela dificuldade no diagnóstico e em estudos de inquérito epidemiológico na população, ou pela sua baixa patogenicidade. Nos imunodeprimidos, pelo contrário, esse agente apresenta-se tipicamente com caráter oportunista, determinando quadros de morbidade e mortalidade. A prevalência nessa população específica é, portanto, bem mais acentuada.

PATOGENIA

Até o momento, pouco se sabe a respeito dos aspectos taxonômicos e clínico-epidemiológicos, da conduta terapêutica eficaz e da própria gênese dos processos fisiopatológicos envolvidos na microsporidiose humana.

Acredita-se que a longa evolução da relação parasito-hospedeiro tenha resultado em uma baixa patogenicidade no hospedeiro infectado por esporos de microsporídios, salvo alguns casos em que foram registradas infecções brandas e uma sintomatologia mais evidente, particularmente naqueles indivíduos com imunodeficiência celular grave, principalmente quando associada à redução de células do tipo CD4 (64).

Tal fato tem sido evidenciado em infecções de mamíferos por microsporídios, com persistência do parasito no organismo, promovendo uma infecção latente assintomática, devido à relação quase precisa entre a multiplicação e a sobrevivência desse parasito e à manutenção da resposta imune (62). Portanto, no instante em que há um desequilíbrio da interação parasito – hospedeiro, como em indivíduos com alteração da resposta imune, um processo provável de reativação é iniciado, condicionando as manifestações clínicas dessas doenças.

Estudos experimentais realizados em camundongos de laboratório, na tentativa de compreender e dirimir as dúvidas existentes a respeito dessa patologia, considerando os seus aspectos imunes e as investigações histopatológicas, demonstraram que a infecção por microsporídios ativa a resposta humoral. No entanto, somente os anticorpos não são suficientes para a proteção contra a doença, sendo necessária a presença da resposta imunocelular para que haja a supressão da multiplicação dos parasitos (62).

Há um estudo de manifestações de encephalitozoonosis em animais, em que se constatam reações inflamatórias intensas, infiltrações celulares difusas e/ou lesões granulomatosas caracterizadas com infiltrações por linfócitos, células do plasma e macrófagos, entre outras células linfoplasmocitárias, observadas em torno de centro necrótico. Essas lesões permanecem após o desaparecimento dos organismos responsáveis pela infecção (62).

Ao contrário, nos humanos imunodeficientes, essas reações são mínimas ou ausentes. De acordo com os dados obtidos no experimento, podemos suspeitar que indivíduos com falha na sua resposta imune,

especialmente na linhagem celular, são potenciais grupos de risco para o desenvolvimento da doença microsporidial, seja por uma reativação primária ou por uma infecção recentemente adquirida. Em suma, apesar de vários estudos desenvolvidos, a fisiopatologia da infecção microsporidial humana não é ainda suficientemente compreendida (37, 62, 64).

QUADRO CLÍNICO

O espectro clínico da microsporidiose humana encontra-se em franca expansão, podendo promover desde infecções locais, geralmente no trato gastrointestinal, até quadros sistêmicos, por vezes fatais, com acometimento principalmente do SNC, do trato hepatobiliar e dos rins.

Dependendo da espécie infectante envolvida, já que cada uma apresenta tropismo por um determinado sítio do organismo, e da resposta imune do indivíduo infectado, podem-se observar diferentes quadros de infecção, com acometimento de inúmeros órgãos do sistema.

Nesse caso, incluem-se as infecções oculares, que afetam a córnea e/ou conjuntiva, podendo estender para os seios paranasais; as infecções localizadas nos enterócitos, ocasionando uma diarreia crônica e profusa, responsável pela maioria das mortes de pacientes com Aids; o acometimento do trato biliar e/ou hepático com lesões granulomatosas, necrose hepática ou colangites esclerosantes; e a infecção da musculatura esquelética (38).

A condição clínica mais freqüente em pacientes com Aids é a enterite, provocada na maioria das vezes pelo *Enterocytozoon bienersi*, seguido do *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*). Os pacientes com Aids infectados por microsporídios apresentam geralmente diarreia crônica com uma média de seis evacuações diárias; as fezes são amolecidas ou aquosas, sem leucócitos ou hemácias.

Outros sinais e sintomas incluem dor abdominal difusa, náuseas, vômitos, anorexia e caquexia, que se não forem tratados podem levar a óbito (9, 60). A má absorção é evidenciada pelo teste anormal de D-Xylose e pelo baixo nível de vitamina B12, levando a uma acentuada perda de peso e caquexia (63).

A severidade da doença está diretamente relacionada com a competência imune do hospedeiro. A microsporidiose humana apresenta-se mais virulenta em indivíduos imunodeprimidos com contagem de células CD4 inferior a 100 mm^3 e com co-infecção com o HIV.

Nas formas disseminadas, os esporos dos microsporídios podem ser encontrados em vários fluidos corpóreos, incluindo fezes, urina, aspirados duodenais e secreções respiratórias e da córnea (57).

O gênero *Encephalitozoon* spp está envolvido com infecções locais; acomete preferencialmente a córnea e o intestino, dependendo da espécie

responsável pela infecção, além de provocar quadros assintomáticos ou disseminados.

Normalmente, o *Encephalitozoon hellen*, recentemente diferenciado filogeneticamente do *Encephalitozoon cuniculi* (59), ocasiona ceratoconjuntivite, nefrite intersticial, manifestações do trato respiratório e sinusite crônica. O acometimento de múltiplos órgãos também já foi reportado.

O *E. cuniculi* foi descrito por duas vezes associado com hepatites (53) e peritonites (67). Por sua vez, o *Encephalitozoon intestinalis*, anteriormente classificado como *Septata intestinalis*, é responsabilizado pelo acometimento primário dos enterócitos do intestino delgado e do trato biliar, causando diarreia crônica, colangites e colecistites (45). Em tais casos, esses parasitos podem infectar, por meio do macrófago intestinal, todos os órgãos extra-intestinais, incluindo rins, pulmões e mucosa nasal (18, 44). Tais situações poderiam explicar o comprometimento multissistêmico de infecções por *Encephalitozoonosis* em portadores de HIV e de Aids.

O *Enterocytozoon bieneusi* é o que tem sido assinalado com mais frequência em pacientes com Aids, com registro de mais 30% dos casos de diarreia crônica entre as causas parasitárias (56). Em 1992, esse agente foi etectado infectando o epitélio biliar de pacientes com manifestação clínica de colangite esclerosante (56). Outros órgãos também foram afetados, tais como o ducto pancreático e os pulmões.

O *Nosema corneae* – reclassificado como *Vittaforma corneae* – e o *Nosema ocularum* têm sido descritos como responsáveis por raros casos de microsporidioses em imunocompetentes, infectando a córnea e promovendo ceratites (26) ou ceratoconjuntivites (63).

Em contraste, o *Nosema conori* é responsabilizado por infecções multissistêmicas em imunocomprometidos. Recentemente foi descrito o primeiro caso de infecção do trato urinário relacionado ao *V.corneae* em pacientes com Aids.

Há raras descrições de miosites pelos gêneros *Pleistophora* sp e *Trachipleistophora* sp em indivíduos com comprometimento celular, inclusive em pacientes com Aids.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico clínico da microsporidiose se dá principalmente em indivíduos imunodeprimidos, em especial em pacientes HIV-positivo que apresentam contagem de células CD4 abaixo de 100/ μ L, diarreia crônica, perda de peso, colangiopatia inexplicável, ceratoconjuntivites ou doenças em múltiplos órgãos.

O diagnóstico conclusivo da infecção por microsporídios depende da demonstração morfológica do parasito por microscopia óptica e microscopia eletrônica.

Esporos de microsporídios são encontrados em fezes, urina, escarro, lavagem broncoalveolar, líquidos biliar e cefalorraquidiano e aspirado duodenal. As biópsias podem ser realizadas em tecido traqueobronquial, mucosa sinovial, córnea, conjuntiva, secreção nasal, intestino delgado, bexiga, seio paranasal, fígado, músculos e material de colecistectomia (37).

Exame direto

O laboratório baseia-se, para o diagnóstico, no exame direto pela microscopia óptica, que é realizado mediante o uso de técnicas especiais de coloração. Essas técnicas, entretanto, não permitem a caracterização das espécies dos microsporídios, o que depende de métodos mais sofisticados, como a microscopia eletrônica.

A microscopia eletrônica é um ótimo instrumento para o estudo das características ultra-estruturais dos esporos e, conseqüentemente, para a confirmação da espécie. É portanto o método “padrão-ouro” para o diagnóstico definitivo. Pode ser utilizada em amostras provenientes de biópsias, líquidos corporais, fezes e urina. Porém, esse modelo de diagnóstico é inviável economicamente para a rotina laboratorial, sendo utilizado somente em pesquisas e/ou em casos de dúvida diagnóstica.

O material obtido de tecidos por biópsias é normalmente embebido em parafina com cortes finos ou semifinos e corado posteriormente. Várias colorações foram avaliadas para detecção de microsporídios, entre as quais se destacam: gomori, HE, ácido periódico de Schiff (PAS), mepacrina, derivados de ZN, argêntica de Wilder, giemsa, prata-metamina (46) e Warthin-Starry (24).

Agentes quimiofluorescentes, como uvitex 2B e calcoflúor, são usados em amostras de fezes e tecidos e apresentam-se como meios rápidos, sensíveis e específicos para o diagnóstico e acompanhamento da evolução do tratamento da microsporidiose tanto intestinal quanto disseminada (56, 63).

Estudos iniciais de demonstração de esporos em amostras fecais foram realizados utilizando a coloração de giemsa. Esse método mostrou-se, porém, impraticável para a rotina diagnóstica, porque envolve falhas na diferenciação dos esporos de outros elementos presentes nas fezes.

A introdução de uma coloração específica para o diagnóstico de microsporídios, pela técnica do Chromotrope-modificado de Weber ou Tricrômico modificado (63), previamente concentrado pelo formol-éter modificado de Ridley (47), facilitou a demonstração de esporos em amostras de urina e, principalmente, de fezes.

A coloração de Chromotrope-modificado de Weber de fundo claro, desenvolvida no National Center for Infectious Diseases e no Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, Estados Unidos, possui a vantagem de ser pouco laboriosa e onerosa, além de eficiente para

diferenciar os esporos dos elementos fecais (fungos, bactérias e outros) do fundo da preparação.

Recentemente foram realizados estudos com outras técnicas de tingimento coprológica para microsporídios, tais como: Hot-Chromotrope-Kokoskin (34), coloração pelo Chromotrope ou modificação de Ryan (Ryan-Azul) (49) e Gram-Chromotrope (41). Estas duas últimas modificações foram otimizadas para melhorar o contraste entre os esporos e os outros elementos fecais.

Convém ressaltar que os esporos de microsporídios são difíceis de identificar, devido à dificuldade de se corarem e ao seu diminuto tamanho (*E. bienewisi* tem cerca de 0,9-1,8 μm e *E. intestinalis*, em torno de 1,5-2,5 μm).

Na análise coprológica com colorações específicas, os esporos eliminados nas fezes são refrativos, com forma ovalada ou piriforme, e apresentam-se com a parede corada de um vermelho intenso a um róseo-claro, com o seu conteúdo celular mais claro e, eventualmente, uma faixa diagonal ou equatorial referente ao tubo polar (Figura 2).

Os outros elementos presentes no material fecal estão geralmente em contraste verde no fundo claro, embora algumas bactérias e fungos corem com o Chromotrope, o que dificulta o diagnóstico, por suas características morfológicas e tintoriais semelhantes. A confecção de lâminas positivas para controle, a análise morfométrica e o exame múltiplo de amostras para aumentar a qualidade do resultado são indubitavelmente necessários.

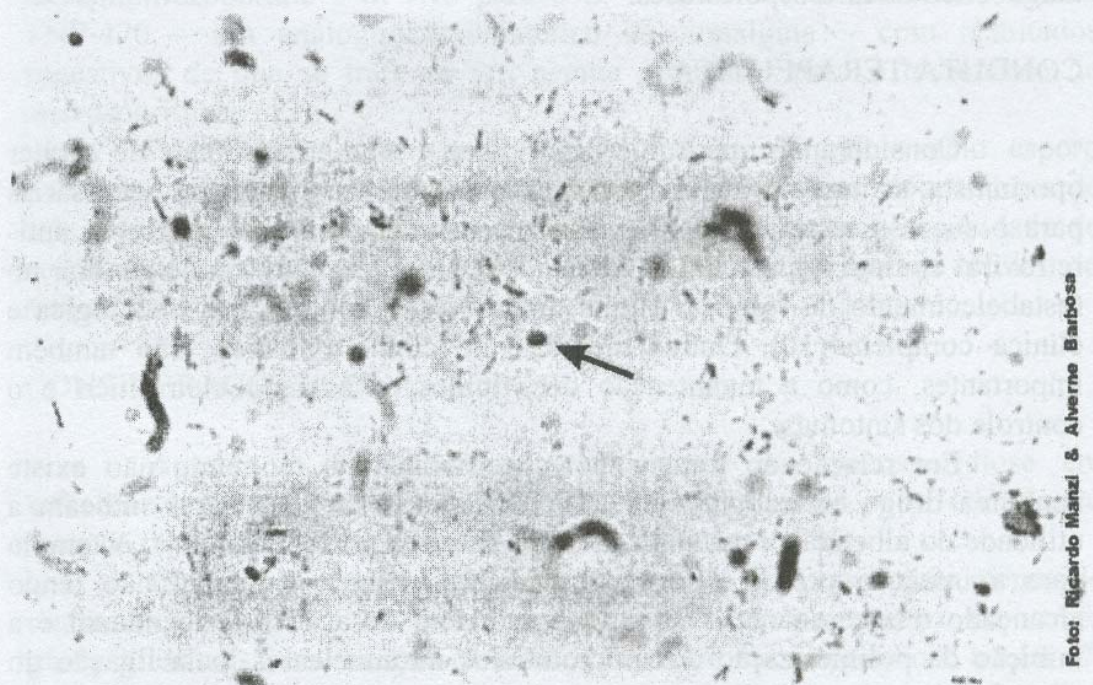


Foto: Ricardo Manzil & Alverne Barbosa

Figura 2. Esporo de Microsporídios em material coprológico (aumento 1.000 x). Coloração Tricrômico modificada a calor (Hot-Cromotrope-Kokoskin). Sistema Leica DMLS & MPS 32. IPTSP/UFG-2000.

Exame indireto

Estudos com técnicas sorológicas estão sendo utilizados para inquéritos epidemiológicos, porém a sua sensibilidade e especificidade são discutíveis para o diagnóstico. Algumas pesquisas concluíram que os testes de imunofluorescência (IFI) que usam fezes como material biológico são uma boa alternativa para a identificação específica de infecções por *E. intestinalis* (42). Anticorpos mono e policlonais têm sido utilizados para a identificação de algumas espécies de microsporídios humanos em amostras de diferentes secreções corpóreas (57). Outras provas incluem o teste imunoenzimático (ELISA), imunoperoxidase (4) e Western Blot.

O diagnóstico molecular, por meio da reação de polimerase em cadeia (PCR), só é possível em laboratórios de pesquisa que dispõem de *primers* específicos de alguns microsporídios investigados.

As culturas de células podem ser um recurso para isolamento de microsporídios de uma variedade de espécimes e linhagens celulares. *E. hellen*, *E. intestinalis* e *Vittaforma corneae* têm sido isolados de espécimes humanos e mantidos em cultura (23). Recentemente, culturas de *E. bienewisi* em *short-term* foram demonstradas em fibroblastos de humanos, mas com baixa produtividade e desenvolvimento incompleto (14). Entretanto, devido ao longo período para o cultivo, que pode durar de três semanas a seis meses, a cultura de células não é recomendada na rotina laboratorial para o diagnóstico de microsporidioses.

CONDUTA TERAPÊUTICA

Considerando que a microsporidiose é uma enfermidade de caráter oportunista, as modulações da resposta imune são absolutamente necessárias para o sucesso terapêutico. Registros recentes sugerem que a terapia anti-retroviral em indivíduos HIV-1, infectados pelo *E. bienewisi*, pode auxiliar no restabelecimento da resposta imune, inclusive microbiológica, histológica e clínica completa (10). Outras medidas, de cunho paliativo, são também importantes, como a manutenção dos fluidos, o balanço eletrolítico e o controle dos sintomas.

Em relação ao tratamento específico, até o momento não existe nenhuma droga antiparasitária eficaz. Observações preliminares indicam a utilidade do albendazol nas infecções por *E. intestinalis* (5, 40, 64). A terapia para a infecção por *E. bienewisi* permanece, porém, limitada, não tendo alcançado o sucesso necessário. O mecanismo de ação do albendazol é a inibição da polimerização dos microtúbulos intranucleares, pela ligação do albendazol com a tubulina, que interfere na aquisição dos nutrientes e na divisão nuclear. A inibição da reprodução desse organismo seria, contudo,

incompleta com os esquemas posológicos convencionais, em virtude do baixo poder de penetração celular dessa droga (5).

Em resumo, é provável que o albendazol atue nos estágios proliferativos, promovendo degeneração tanto na fase merogônica como na esporogônica. O tratamento usual com essa droga é realizado na dose de 400 mg/dia por quatro semanas ou mais, levando à melhora clínica, embora esporos de microsporídios continuem sendo detectados em biópsias da mucosa intestinal e no material fecal após o tratamento. Isso sugere um maior efeito parasitostático do que parasiticida do albendazol.

Em outros estudos preliminares não foram observadas boas respostas clínicas em pacientes tratados com metronidazol (22). Resultados satisfatórios foram assinalados com atavaquone e talidomida, mas não foram confirmados (51). Outros tratamentos sem sucesso foram realizados com vários antibióticos e drogas antiparasitárias. Pacientes com Aids e diarreia crônica causada por *E. bienersi* têm recebido tratamento com nitazoxanida, com respostas clínicas e parasitológicas, quando esse é aplicado juntamente com a terapia antiviral (4).

O tratamento da ceratoconjuntivite causada por infecção pelo *E. hellen* vem apresentando melhora clínica com a aplicação tópica da fumalgina (fumidil B), mas com recorrência dos sintomas após o término da terapêutica (19). Em virtude da provável toxicidade da fumalgina, estudos *in vitro* para o tratamento de microsporídios pertencentes à família *Encephalitozoonidae* e *in vivo* para o *E. cuniculi* foram realizados com o TNP-470 – um análogo semi-sintético da fumalgina – com resultados sugestivos de que se trata de um agente promissor para o tratamento da microsporidiose (13).

Por último, considerando que o influxo de cálcio pelo esporo coincide com a extrusão do tubo polar, estudos *in vitro* com bloqueadores de cálcio (nifedipina), como recurso terapêutico, apresentaram a capacidade de coibir esse processo e conseqüentemente a infecção de outras células do hospedeiro (31).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do conhecimento atual acerca da microsporidiose em infecções humanas, particularmente nos imunodeprimidos pelo HIV, pouco mais de quatrocentos casos foram descritos no mundo (23).

Essa baixa ocorrência é evidente também no Brasil, com menos de cinquenta registros, na sua maioria por acometimento do trato gastrointestinal, com exceção de poucos casos de microsporidiose ocular (7, 43) e microsporidiose urinária (7).

Casos de indivíduos não-portadores do HIV infectados por microsporídios foram também assinalados no país, bem como de pacientes

submetidos a transplante de medula óssea (32). Tal fato talvez possa ser creditado às dificuldades de diagnóstico, assim como à carência de laboratórios que possam fazê-lo. Inicialmente o diagnóstico se fundamentava em processos invasivos e sofisticados, através de biópsias, o que dificultava a promoção de inquéritos epidemiológicos.

A técnica de Tricromo modificado (Chromotrope-Weber) com microscopia de luz acabou com a necessidade do uso desses procedimentos invasivos, possibilitando dessa forma estudos mais freqüentes, para uma melhor compreensão e análise sobre esse agente oportunista, e propiciando o conhecimento de dados clínico-epidemiológicos, terapêuticos e profiláticos.

Contudo, restam ainda muitas perguntas sobre esse parasito e sua relação com doenças em humanos. Por exemplo: Quais das espécies consideradas exclusivas dos humanos podem acometer outros hospedeiros e/ou vetores? Existe a possibilidade de outras espécies de microsporídios causarem infecções oportunistas em humanos? Existe de fato o portador são, ocasionando patologias somente diante de uma situação de imunossupressão? Qual a incidência e prevalência em portadores imunocompetentes e imunodeprimidos? Qual é o tratamento específico mais eficaz? Quais das espécies apresentam a maior causa de morbimortalidade em pacientes com Aids? E por último: Qual o seu elo com a imunossupressão?

ABSTRACT

Human microsporidiosis: a review

Microsporidiosis is a human disease, poorly known by physicians. It usually affects populations of immunocompromised patients, being classified as an opportunistic infection. Microsporidiosis is caused by tiny intracellular protozoa, belonging to Phylum Microsporidia. They cause a variety of clinical manifestations, of systemic or intestinal location. The spores of these parasites are eliminated commonly in feces, making possible to do diagnosis with the light microscope. In this review some aspects of the pathogenic, clinical-epidemic and diagnostic aspects of this disease are described, aiming to increase the knowledge about this intriguing parasite.

KEYWORDS: Human Microsporidiosis. AIDS. HIV. Immunosuppression.

REFERÊNCIAS

1. Ali MS, Mahmoud LA, Abaza BE, Ramadan MA. Intestinal spore-forming protozoa among patients suffering from chronic renal failure. *J Egypt Soc Parasitol* 30: 93-100, 2000.
2. Anônimo. Infecciosas nuevas, emergentes y reemergentes. *Bol Epid Org Pan Salud* 16: 3, 1995.
3. Anônimo. Pautas para la prevención de infecciones oportunistas en personas con VIH o sida en América Latina y el Caribe. *Bol Ofic Sanit Panam* 121:5, 1996.

4. Bicart-Seé A, Massip P, Linas MD, Datry A. Successful Treatment Nitazoxanide of *Enterocytozoon bieneusi* Microsporidiosis in a Patient with AIDS. *Ant ag chem* 44:167-168, 2000.
5. Blanshard C, Ellis DS, Tovey DG, Dowell S, Gazzard BG. Treatment of intestinal microsporidiosis with albendazole in patients with AIDS. *AIDS* 6: 311-313, 1992.
6. Bornay-Llinares FJ, da Silva AJ, Moura H, Schwartz DA, Visvesvara GS, Pieniazek NJ, Cruz-Lopez A, Hernandez-Jauregui P, Guerrero J, Enriquez FJ. Immunologic, microscopic and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. *J Infect Dis* 178: 820-826, 1998.
7. Brasil P, Bonfim de Lima D, Moura H. Microsporidiose humana na síndrome de imunodeficiência Adquirida. *Rev Ass Med Brasil*, 43: 254-264,1997.
8. Brasil P, de Paiva DD, de Lima DB, da Silva EJ, Peralta JM, da Silva AJ, Sodre FC, Villela EV, Moura H. A 3-year follow-up of a Brazilian AIDS Patient with protracted diarrhea caused by *Enterocytozoon bieneusi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 40:215-218, 1998.
9. Brazil P, Sodré FC, Cuzzi-Maya T, Gutierrez MCGFS, Mattos H, Moura H. Intestinal Microsporidiosis In HIV-Positive Patients With Chronic Unexplained Diarrhea In Rio Janeiro, Brazil: Diagnosis, Clinical Presentation and Follow-Up. *Rev Inst Med trop São Paulo* 38: 97-102, 1996.
10. Carr A, Marriott D, Field A, Vasak E, Cooper DA. Treatment of HIV-1-associated microsporidiosis and cryptosporidiosis with combination antiretroviral therapy. *Lancet* 351:351-361,1998.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites and Health. Microsporidiosis. <http://www.dpd.cdc.gov/dp...Microsporidiosis>.
12. Cotte L, Rabodonirina M, Chapuis F, Bailly F, Bissuel F, Raynal C, Gelas P, Persat F, Piens MA, Trepo C. Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 180:2003-2008, 1999.
13. Coyle C, Kent M, Tanowitz HB, Wittner M, Weiss LM. TNP_470 Is an Effective Antimicrosporidial Agent. *J Infect Dis* 177:515-518, 1998.
14. Croft S.L; Williams J; McGrow I. Intestinal Microsporidiosis. *Sem Gast Dis* 8:45-55, 1997.
15. Da Silva AJ, Slemenda SB, Visvesvara GS, Schwartz DA, Wilcox CM, Wallace S, Pieniazek NJ. Detection of *Septata intestinalis* (Microsporidia) Cali et al.1993 Using Polymerase Chain Reaction Primers Targeting the Small Submit Subunit Ribosomal RNA Coding Region. *Mol Diag* 2:47-52, 1997.
16. del Aguila C, Izquierdo F, Navajas R, Pieniazek NJ, Miro G, Alonso AI, Da Silva AJ, Fenoy S. *Enterocytozoon bieneusi* in Animals: Rabbits and Dogs as New Hosts. *J Euk Microbiol* 46: 8S-9S, 1999.
17. Desportes I, Le Charpentier Y, Galian A, Bernard F, Cochand Priollet B, Lavergne A, Ravisse P, Modigliani R. Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* n. g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J Protozool* 32:250-254, 1985.
18. Didier ES, Rogers LB, Orenstein JM, Baker MD, Vossbrinck CR, Van Gool T, Hartskeerl R, Soave R, Beaudet LM. Characterization of *Encephalitozoon* (*Septata*) *intestinalis* isolates cultured from nasal mucosa and bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients. *J Eukaryot Microbiol* 43:34-43, 1996.
19. Diesenhouse MC, Wilson LA, Corrent GF, Visvesvara GS, Grossniklaus HE, Bryan RT. Treatment of Microsporidial keratoconjunctivitis with topical fumagillin. *Am J Ophthalmol* 115:293-298, 1993.
20. Dowd SE; Gerba CP, Pepper IL. Confirmation of Human Pathogenic Microsporidia *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Vittaforma corneae* in water. *Appl Environ Microbiol* 64:3332-3335, 1998.
21. DuPont HL, Marshall GD. HIV-associated diarrhoea and wasting. *Lancet* 346:352-356, 1995.
22. Eeftinck-Schattenkerk JKM, van Gool T, van Ketel R J, Bartelsman JFWM, Kuiken CL, Terpstra WJ, Reiss P. Clinical significance of small-intestinal microsporidiosis in HIV-1 infected individuals. *Lancet* 337:895-898, 1991.

23. Fedorko DP; Hijazi Y.M. Application of Molecular Techniques to the Diagnosis of Microsporidial Infection. *Emerg Infect Dis* 2:3, 1996.
24. Field AS, Marriott DJ, Hing MC. The Wathin -Starry in the diagnosis of small intestinal microsporidiosis in HIV-infected patients. *Fol Parasitol* 40:261-266, 1993.
25. Field AS, Hing MC, Marriott DJ. Small intestinal microsporidiosis in HIV infected patients in Sydney, Australia. In *Abstract 1st Workshop on Microsporidiosis and Cryptosporidiosis in Immunodeficient Patients, Ceske Budejovice, Czech Republic. 1993.*
26. Font RL, Samaha AN, Keener MJ, Chevez-Barrios P, Goosey JD. Corneal Microsporidiosis: Report of Case, including Electron Microscopic Observations. *Ophthalmology* 10:1769-1765, 2000.
27. Foucault C; Drancourt M. Actin mediates *Encephalitozoon intestinalis* entry into human enterocyte-like cell line, Caco-2. *Microb Pathog* 28:51-58, 2000.
28. Garcia-Zapata MTA, Cuba Cuba CA, Da Silva AE, Leite AS, Reis MI, Moreira AF, Maltarollo TAP, Gomes R, Fonseca RA. Infecções por parasitas oportunistas em pacientes HIV/AIDS positivos, no Hospital Universitário de Brasília. *Bras. Med;* 37:14-18, 2000.
29. Hamour AA, Mandal BK. Coccidian parasites in patients with AIDS, cryptosporidiosis, microsporidiosis, isosporiasis and cyclosporiasis. *Baillière's Clin Infect Dis* 3:1, 1996.
30. Hartskeerl RA, Van Gool T, Schuitema AR, Didier ES, Terpstra WJ. Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orestein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology* 110:277-285, 1995.
31. He Q, Leitch GJ, Visvesvara GS, Wallace S. Effects of nifedipine, metronidazole, and nitric oxide donors on spore germination and cell culture infection of the microsporidia *Encephalitozoon hellen* and *Encephalitozoon intestinalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 40:179-185, 1996.
32. Hirschfeld MPM, Cury AE, Moura H, Brazil P, Sodré F, Cury AE, Kamizaki SA, Amato Neto V. Identificação de Microsporidia em 5 pacientes com AIDS no Município de São Paulo. *Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia*. Res:95,1993.
33. Kelling PJ, Luker MA, Palmer JD. Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol Biol Evol* 17: 23-31, 2000.
34. Kokoskin E, Gyorkos TW, Camus A, Cedilotte L, Purtill T, Ward B. Modified technique for efficient detection of microsporidia. *J Clin. Microbiol;* 32:1974-1975, 1994.
35. Liguory O, David F, Sarfati C, Derouin F, Molina JM. Determination of types of *Enterocytozoon bienersi* strains isolated from patients with intestinal microsporidiosis. *J Clin Microb* 36:1882-1885,1998.
36. Lopez-Velez R, Turrientes MC, Garron C, Montilla P, Navajas R, Fenoy S, del Aguila C. Microsporidiosis in travelers with diarrhea from the tropics. *J Travel Med* 6:223-227;1999.
37. Mandell G.L; Bennett J.E; Dolin R. *Principles and practice of infectious diseases*; 4ed. Churchill Livingstone, 1-26,1995.
38. Markell E.K; John DT; Krotoski, AW. *Markell and Voge's Medical Parasitology*. 8th ed, W.B.Saunders Company; Philadelphia., 389-403,1999.
39. Matsubayashi H, Koike T, Mikata I Et Al. A case of Encephalitozoon-like body in man. *Arch Pathol* 67: 181-187, 1959.
40. Molina JM, Oksenhendler E, Beauvais B, Sarfati C, Jaccard A, Derouin F, Modai J. Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in patients with AIDS: Clinical features and response to albendazole therapy. *J Infect Dis* 171:245-249,1995.
41. Moura H, Schwartz DA, Bornay-Llinares F, Sodre FC, Wallace S, Visvesvara GS. 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* 211:888-893,1997.
42. Moura H, Sodre FC, Bornay-Llinares FJ, Leitch GJ, Navin T, Wahlquist S, Bryan R, Meseguer I, Visvesvara GS. Detection by an immunofluorescence test of *Encephalitozoon intestinalis* spores in routinely formalin-fixed stool samples stored at room temperature. *J Clin Microbiol*;37:2317-2322,1999.

43. Muccioli C, Belfort Jr, R, Guidugli T, Lottenberg C, Steck AD, Abreu MT. Ceratoconjuntivite por Microsporideo em AIDS: descrição do primeiro caso brasileiro e revisão da literatura. *Arq Bras Oftalm* 56:289-290,1993.
44. Ombrouck C, Desportes-Livage I, Achbarou A, Gentilini M. Specific detection of the microsporidia *Encephalitozoon intestinalis* in AIDS patients. *C R Acad. Sci III*;319:39-43,1996.
45. Oreste JM, Dieterich DT, Kotler DP. Systemic dissemination by a newly recognized intestinal microsporidia species in AIDS. *AIDS*; 6:1143-1150,1992
46. Peacock CS, Blanshard C, Tovey DG, Ellis DS, Gazzard BG. Histological diagnosis of intestinal microsporidiosis in patients with AIDS. *J. Clin. Pathol*;44:558-563,1991.
47. Ridley DS, Hangood BC. The value of Formol-ether concentration of faecal cysts and ova. *J Clin Pathol* 9:74-76,1956.
48. Rinder H, Katzwinkel-Wladarsch S, Thomschke A, Loscher T. Strain differentiation in microsporidia. *Tokai J Exp Clin Med.* 23: 433-437, 1998.
49. Ryan NJ, Sutherland G, Coughlan K, Globan M, Doultree J, Marshall J, Baird RW, Pedersen J, Dwyer B. A new trichrome-blue stain for detection of microsporidial species in urine, stool, and nasopharyngeal specimens. *J Clin Microbiol* 31:3264-3269,1993.
50. Sandfort J, Hannemann A, Gelderblom H, Stark K, Owen RL, Ruf B. *Enterocytozoon bieneusi* infection in an immunocompetent patient who had acute diarrhea and who was not infected with the human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 19:514-516, 1994.
51. Sharpstone D, Gazzard B. Gastrointestinal manifestations of HIV infection. *Lancet* 348:379-383,1996.
52. Snowden K, Logan K, Didier ES. *Encephalitozoon cuniculi* strain III is a cause of encephalitozoonosis in both humans and dogs. *J Infect Dis* 180:2086-2088, 1999.
53. Terada S, Reddy KR, Jeffers LJ, Cali A, Schiff ER. Microsporidian hepatitis in the acquired immunodeficiency Syndrome. *Ann of Intern Med* 107:61-62,1987.
54. Undeen AH. Microsporidia (Protozoa): A Handbook of biology and Research Techniques, 1997. <http://agweb.okstate.edu/pearl/scsb387/content.htm>
55. 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* 246:1-8, 2000.
56. van Gool T, Snijders F, Reiss P, Eeftinck Schattenkerk JK, van den Bergh Weerman MA, Bartelmsman JF, Bruins JJ, Canning EU, Dankert J. Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique. *J Clin Pathol* 46:694-699, 1993.
57. Visvesvara GS, Leitch GJ, da Silva AJ, Croppo GP, Moura H, Wallace S, Slemenda SB, Schwartz DA, Moss D, Bryan RT. Polyclonal and Monoclonal antibody and PCR-amplified small-subunit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellen*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. *J Clin Microbiol* 32:2760-2768, 1994.
58. Vossbrinck CR, Baker MD, Didier ES, Debrunner-Vossbrinck BA, Shaddock JA. Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon hellen* and *Encephalitozoon cuniculi*: species identification and phylogenetic construction. *J. Eukaryot Microbiol* 40:354-362,1993.
59. Vossbrinck CR, Maddox JV, Friedman S, Debrunner-Vossbrinck BA, Woese CR. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 326:411, 1987.
60. Wanachiwanawin D, Manatsathit S, Lertlaituan P, Thakerngpol K, Suwanagool P. Intestinal Microsporidiosis in HIV infected patients with chronic diarrhea in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 29:767-771, 1998.
61. Wasson K, Peper R. Mammalian microsporidiosis. *Vet Pathol* 37:113-128, 2000.
62. Weber R; Bryan R.T. Microsporidial Infections in Immunodeficient and Immunocompetent Patients. *Clin Infect Dis* 19:517-521, 1994.

63. 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 Eng J Med* 326:161-166, 1992.
64. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human Microsporidial Infections. *Clin. Microbiol Rev* 7:426-461, 1994.
65. Weber R, Kuster H, Keller R, Bachi T, Spycher MA, Briner J, Russi E, Luthy R. Pulmonary and Intestinal Microsporidiosis in a Patient with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Am Rev Resp Dis* 146:1603-1605, 1992.
66. Wuhib T, Silva TM, Newman RD, Garcia LS, Pereira ML, Chaves CS, Wahlquist SP, Bryan RT, Guerrant RL, Sousa Ade Q. Cryptosporidial and Microsporidial Infections in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients in Northeastern Brazil. *J Infect Dis* 170:494-497, 1994.
67. Zender HO, Arrigoni E, Eckert J, Kapanci Y. A case of *Encephalitozoon cuniculi* peritonitis in a patient with AIDS. *Am J Clin Pathol* 91:352-356, 1989.