

Prevalencia de microsporidiosis intestinal en niños con desnutrición severa de un hospital de la ciudad de Maracaibo

Intestinal Microsporidiosis Prevalence in Children With Severe Malnutrition at a Hospital in the City of Maracaibo

Acurero-Yamarte Ellen^{1*}, Maldonado Ibáñez Adriana², Grimaldos Olmos Riam², Rivero-Rodríguez Zulbey², Bracho Mora Angela², Calchi La Corte Marinella¹, Ávila Larreal Ayarí³, Arráiz Nailé⁴

¹Cátedra de Parasitología, * ellenyamarte@gmail.com,

²Cátedra de Práctica Profesional de Parasitología,

³Cátedra de Epidemiología y Estadística, ⁴Cátedra de Biología Molecular, Escuela de Bioanálisis, Universidad del Zulia

Resumen

Con la finalidad de comparar la prevalencia de Microsporidiosis intestinal en niños con desnutrición severa y niños eutróficos de la Unidad de Recuperación Nutricional del Hospital Chiquinquirá de Maracaibo, Estado Zulia, se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de *Encephalitozoon intestinalis* y *Enterocytozoon bieneusi* en las muestras de heces de 50 niños desnutridos graves y 50 niños eutróficos, cuyas edades fueron estratificadas de la siguiente manera: lactantes menores (0-11 meses), lactantes mayores (12-23 meses), preescolares (2-6 años), y escolares (7 a 12 años). De las especies de microsporidios investigadas, se evidenció *Enterocytozoon bieneusi* en el 14% de los niños desnutridos graves y 8% en los niños eutróficos, no se obtuvieron amplificaciones para *Encephalitozoon intestinalis* en los grupos estudiados; al aplicar la prueba estadística χ^2 , resultó no significativa para las variables microsporidiosis intestinal y desnutrición. Se concluye que la medida en la que se relacionan la desnutrición, y la microsporidiosis es difícil de esclarecer, ya que la desnutrición es una condición multifactorial y aún no está bien establecido cuál de estos dos factores es la causa y cual la consecuencia.

Palabras clave: Enterocytozoon bieneusi, Encephalitozoon intestinalis, PCR, microsporidiosis intestinal.

Recibido: 03-11-14 / Aceptado: 23-11-14

Abstract

In order to compare the prevalence of intestinal microsporidiosis in children with severe malnutrition and eutrophic children at the Nutritional Recovery Unit, Chiquinquirá Hospital in Maracaibo, State of Zulia, a chain reaction technique was performed on the polymerase (PCR) to identify *Encephalitozoon intestinalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in stool samples from 50 healthy and 50 severely malnourished children, whose ages were stratified as follows: younger infants (0-11 months), older infants (12-23 months), preschool (2-6 years) and school children (7-12 years). Of the microsporidia species investigated, *Enterocytozoon bieneusi* was evident in 14% of severely malnourished children and 8% of the eutrophic children. No amplifications for *Encephalitozoon intestinalis* were obtained in the groups studied. On applying the chi-square statistical test, the result was not significant for the variables intestinal microsporidiosis and malnutrition. Conclusions are that the extent to which malnutrition and microsporidiosis relate is difficult to clarify, because malnutrition is a multifactorial condition, and it is not yet well established which of these two factors is the cause and which is the consequence.

Keywords: *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, PCR, intestinal microsporidiosis.

Introducción

La Microsporidiosis es una infección emergente y oportunista producida por microorganismos intracelulares obligados formadores de esporas, que han sido taxonómicamente reclasificados como hongos y que se conocen con el nombre de microsporidios. Las infecciones por estos microorganismo en humanos eran prácticamente desconocidas antes de la epidemia de VIH/SIDA, cuando se identificó a *Enterocytozoon bieneusi* como principal agente causal de cuadros diarreicos en pacientes con cuentas linfocitarias CD4 bajas. Consecuentemente, se considera que el estado inmunológico y la presencia de otras deficiencias parecen ser determinantes en el riesgo para desarrollar enfermedades por microsporidios, por lo que aunque la infección puede también presentarse en pacientes inmunocompetentes, la microsporidiosis incide más frecuentemente en individuos inmunocomprometidos, especialmente pacientes con SIDA, ancianos, diabéticos, post-trasplantados y con neoplasias malignas,

niños, o individuos que utilizan lentes de contacto (1, 2).

Debido a que los microsporidios presentan un genoma reducido y compacto (3), se ha hecho difícil el estudio filogenético del grupo. En la mayoría de los textos clásicos de medicina y gastroenterología se estudian como parásitos; sin embargo, actualmente existen evidencias genéticas, estructurales y metabólicas suficientes para ubicarlos dentro del reino de los hongos. Algunos autores plantean que comparten un ancestro común con zygomycetes y quizás, con Mucorales (4, 5).

Actualmente se encuentran ubicados en el phylum Microsporidia, que comprende 150 géneros y agrupan aproximadamente 1200 especies, 14 de ellas descritas como productoras de enfermedad en humanos (2). Las especies que afectan humanos se distribuyen en 7 géneros: *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Anncaliia* (*Brachiola*), *Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora* y *Vittaforma*, y microsporidios no clasificados (denominados colectivamente *Microsporidium*) (2, 6).

Sin embargo, el tracto gastrointestinal es afectado solamente por *Enterocytozoon bieneusi* y *Encephalitozoon intestinalis*, lo que se conoce con el nombre de microsporidiosis intestinal. Estas dos especies han ganado una creciente atención debido a que provocan diarrea crónica en pacientes con SIDA comportándose como agentes oportunistas que, además de producir infección intestinal pueden, afectar otros órganos y sistemas (2). La infección intestinal provocada por *E. bieneusi* se caracteriza por una persistente, crónica y debilitante diarrea en el paciente inmunocomprometido y por una diarrea aguda y auto-limitada en inmunocompetentes incluida en el contexto de la denominada “diarrea del viajero”, *E. intestinalis* produce colangiopatía, colangitis, colecistitis, acalculosa, diarrea, perforación intestinal, sin embargo, es la segunda especie en importancia en el humano, la infección se produce por la ingestión, inhalación e inoculación directa de las esporas, se sospecha la transmisión a través del agua debido a su detección en este medio y aunque el intestino es la diana primaria de la infección, desde allí puede diseminarse a través de macrófagos infectados a otros órganos tales como: riñones, tracto respiratorio inferior y tracto biliar (2, 7).

Tanto *E. bieneusi* como *E. intestinalis* han sido asociados también con la desnutrición. Los niños desnutridos, especialmente los que se encuentran en las categorías de desnutrición grave padecen muchas complicaciones, tales como son infecciones respiratorias, sistémicas (que pueden cursar sin reacción febril), lesiones oculares, gastroenteritis, diarrea y malabsorción (8). La desnutrición generalmente es una enfermedad resultante de múltiples carencias nutricionales o derivado de una subutilización de los mismos, que a su vez provoca diversas alteraciones en la respuesta inmune, incluyendo tanto los mecanismos específicos como los inespe-

cíficos, haciendo que el paciente desnutrido sea susceptible a infecciones bacterianas, parasitarias producidas por parásitos oportunistas como son los coccidios, y por microsporidios *E. bieneusi* y *E. intestinalis* (9).

A pesar de la importancia de este tema, son pocas las investigaciones que se han realizado al respecto: Microsporidiosis intestinal y niños con desnutrición, por lo que los resultados de esta investigación contribuirían a la difusión del conocimiento de estos microorganismos en los niños desnutridos graves, y redundaría en un mejor abordaje clínico de estos pacientes, tanto desde el punto de vista terapéutico, como epidemiológico contribuyendo así, a la disminución de la morbi-mortalidad debida a infecciones intestinales.

Por lo anteriormente expuesto se consideró importante realizar este estudio con la finalidad de determinar la prevalencia de Microsporidiosis intestinal en niños con desnutrición severa, recluidos en la Unidad de Recuperación Nutricional del Hospital Chiquinquirá de Maracaibo, ubicado en el Municipio Maracaibo del Estado Zulia, efectuando una comparación con niños eutróficos que asistieron a la consulta de niños sanos del mismo hospital.

Material y Método

Tipo de investigación:

Se realizó un estudio de tipo descriptivo prospectivo no experimental de corte transversal (10).

Población y muestra

La población en estudio estuvo conformada por los niños hospitalizados en la Unidad de Recuperación Nutricional del Hospital Chiquinquirá de la ciudad de Maracaibo, de donde se seleccionaron los desnutridos graves, así como aquellos que asisten a la

Consulta de Niños Sanos del mismo hospital, de los cuales se escogieron los eutróficos. La muestra se calculó mediante la fórmula $Z2PQN/E2(N-1)+Z2QP$ que se emplea para poblaciones finitas en estudios cualitativos, eligiéndose los individuos en forma aleatoria (11). De esta manera, quedó constituida por un grupo de 50 niños desnutridos graves (muestra) y otro de 50 niños eutróficos, todos pertenecientes al estrato socioeconómico IV y V según el método de Graffar modificado para Venezuela (12), aplicado a través de datos obtenidos mediante una encuesta anexada a la historia clínica de cada individuo.

Los individuos fueron estratificados según sexo en femenino y masculino; según estado nutricional en desnutridos graves y eutróficos, según la edad en lactantes menores (0-11 meses), lactantes mayores (12-23 meses), preescolares (2-6 años), y escolares (7 a 12 años) (13).

Métodos

Se solicitó la autorización del representante de cada niño para realizar la valoración del estado nutricional, así mismo, se dieron las instrucciones para la obtención de las heces y se hizo entrega de un envase recolector desechable por cada individuo. A cada niño se le aplicó lo siguiente:

Evaluación nutricional: La valoración nutricional fue realizada por el personal médico de la Unidad de Recuperación Nutricional y de la consulta de niños sanos del Hospital Chiquinquirá de la ciudad de Maracaibo. Para ello se utilizó la evaluación clínica y la evaluación antropométrica, basándose en los indicadores de peso-edad, talla-edad, peso-talla, perímetro braquial y pliegue tricípital (14), de acuerdo a la Fundación de Centros de Estudios sobre el Crecimiento y Desarrollo de la población Venezolana (Fundacredesa), interpretando los valores mediante el parámetro Z-Score, método re-

comendado por la OMS para estimar la proporción de niños y niñas que podrían ser considerados en riesgo (15).

Evaluación parasitológica: Una vez emitidas las muestras fecales, fueron trasladadas al laboratorio de Parasitología de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad del Zulia, donde se procesaron a través del examen al fresco con solución salina fisiológica al 0,85%, colocación temporal de lugol y técnica de concentración de Ritchie el mismo día de su recolección (16). Una porción de la muestra fecal fue congelada para posterior análisis de PCR.

Análisis de Biología Molecular

A las 100 muestras de heces congeladas se le realizó:

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

1. Extracción del ADN

Para extraer el ADN genómico de *E. bienesi* y *E. intestinalis* a partir de muestras de heces, se llevó a cabo a través de un procedimiento estandarizado en el laboratorio que incorporó algunos pasos de protocolos de lisis enzimática, choques térmicos y mecánicos, descritos previamente (17). Se transfirió aproximadamente 0,5 a 0,7 gramos de heces a un tubo eppendorf de 2 mL, se resuspendió en 1 mL de buffer fosfato salino (PBS: 0,1M Na_2HPO_4 , 0,1M NaH_2PO_4 , pH 7,5) y se filtró a través de gasa estéril. El homogenizado fue centrifugado a 10.000 rpm y el sedimento resultante fue lavado 3 veces con 1,5 de buffer PBS para eliminar contaminantes solubles. El sedimento resultante se lavó con 1mL de NaCl 0,15M tres veces o hasta que el sobrenadante quedó claro. El sedimento se resuspendió en 600 μL de buffer lisis (Tris-Cl 100mM pH 8, 25 mM EDTA, 0,25% SDS) y se sometió a 5 ciclos de congelación-descongelación incubando el tubo en hielo seco-etanol por 5 min. Y descongelado a 37°C por tres minutos.

Después del último tratamiento, se agregó 10 μ L de proteinasa K de 20mg/mL. Y se incubó a 55°C durante toda la noche.

Se agregó 60 μ L de CTAB-NaCl (0,7M NaCl, 1% CTAB) y se incubó a 65°C por 1 hora. Se hizo una extracción con 500 μ L de cloroformo, luego de fenol-cloroformo y cloroformo. Se recuperó la fase acuosa en otro tubo eppendorf y el ADN se precipitó con 600 μ L de isopropanol incubándolo a temperatura ambiente por 45 minutos y luego centrifugando por 30 minutos a 14.000 rpm. El sedimento se resuspendió en 50 μ L de buffer TE. Se utilizó 10, 5 μ L de la muestra para ensayos de amplificación.

2. Amplificación del ADN

Las regiones SSU-ARNr (subunidad pequeña del ARN ribosómico) de los microsporidios se amplificaron utilizando cebadores específicos para *Encephalitozoon intestinalis*, SINTF 5'TTTCGAGTGTAAAGGAGTCGA3', cuya posición en la secuencia es de 362 a 382 y SINTR 5'CCGTCCTGCTTCTCCTGCCCG3', posición 861 a 881, que amplifican un producto de 520 pb; y para *Enterocytozoon bienensei*, EBIEF1 5'GAAACTTGTC ACTCCTTACG3', cuya posición en la secuencia es 295 a 315 y EBIER1 5'CCATGCACCACTCCTGCCATT3', posición 881-901, con un producto de amplificación de 607 pb.

Así mismo, se montaron los respectivos controles negativos (10 mL de agua destilada) y controles positivo, de acuerdo a las especie de microsporidios investigados (10 mL de ADN templado de *E. intestinalis* o *E. bienensei*). Para la amplificación se utilizó GoTaq Flexi DNA Polimerasa (Promega). Se cambiaron los cebadores y las condiciones de PCR necesarias para que la amplificación se produjera en cada caso.

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador (PTC-100 Peltier Thermal Cycler), se colocaron los tubos completamente

identificados. Los ciclos de PCR se realizaron según el protocolo determinado para cada par de cebadores, para lo cual, se debió realizar una estandarización previa. Para los oligonucleótidos SINT5/3, específicos de *E. ntestinalis*, se realizó en dos oportunidades continuas, el paso de la desnaturalización de 5 minutos a 94°C y 35 ciclos de amplificación, luego 30 segundos a 45°C (alineamiento de los oligonucleótidos) y 30 segundos a 72°C (polimerización). Para finalizar la amplificación, 5 minutos a 72°C.

Por otro lado, para los oligonucleótidos EBIE5/3 de *E. bienensei*, igualmente se le realizó 35 ciclos de 5 minutos a 94°C de desnaturalización, después 30 segundos a 94°C del mismo proceso, seguido de 30 segundos a 55°C (alineamiento de los oligonucleótidos) y para concluir 90 segundos a 72°C, última etapa llamada polimerización.

3. Electroforesis de los productos de ADN

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa, con cámaras horizontales (BIORAD). La concentración de agarosa utilizada fue de 2%. Como buffer de corrida se utilizó TBE (Tris-Borato 89mM, EDTA 2mM pH8). La corrida se llevó a cabo a 90v/cm por 40 minutos. Los geles fueron teñidos como bromuro de etidio, visualizados en un trasiluminador ultravioleta y fotografiados con sistema de fotodocumentación DigiDoc UVP. Se incluyó marcador de peso molecular de 1000 pb DNA Ladder de PROMEGA.

Metodología estadística

El análisis de los datos se efectuó a través de la estadística descriptiva empleando valores absolutos y porcentajes, para lo cual se elaboraron tablas de los resultados obtenidos, representando las principales variables en estudio. Se empleó el Chi cuadrado de Pearson (χ^2) con un nivel de confiabilidad del 95% ($p < 0,05$) para detectar las diferencias estadísticamente

significativas entre las variables estudiadas, aplicando el método de corrección de Yates en los casos que así lo ameritaron. Se utilizó para el análisis el paquete estadístico SPSS versión 17 para Windows.

Resultados

Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se detectó ADN de microsporidios en 11 individuos, se amplificaron 7 muestras para *E. bienewsi* del grupo de los niños desnutridos graves, representando una prevalencia por este microorganismo del 14%, mientras que para el grupo de los niños eutróficos, se amplificaron solo 4 muestras, obteniéndose una prevalencia del 8%, al aplicar la prueba estadística χ^2 ésta resultó no significativa para las variables desnutrición y microsporidios intestinales ($\chi^2 = 0,9 p < 0,05$). No se obtuvieron amplificaciones para *E.intestinalis* en los grupos estudiados. Los resultados obtenidos según la técnica empleada pueden observarse en la Tabla 1. Las Figuras 1 y 2 muestran algunos de los resultados de la electroforesis horizontal en geles de agarosa.

Tabla 1. Prevalencia de Microsporidios Intestinales detectada mediante PCR en Niños Desnutridos Graves de la Unidad de Recuperación Nutricional y en Niños Eutróficos de la Consulta de Niños Sanos del Hospital Chiquinquirá de Maracaibo, Estado Zulia. Venezuela, 2013.

Especie de Microsporidios (PCR)	Desnutridos Graves		Eutróficos	
	No	%	No	%
<i>Enterocytozoon bienewsi</i>	7	14	4	8
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	0	0	0	0

$\chi^2 = 0,9 p < 0,05$.

En el examen al fresco, del total de muestras estudiadas, en el grupo correspondiente a los niños desnutridos graves, se encontró una prevalencia de enteroparásitos del 38%, que corresponde a 19 individuos parasitados; mientras que en el grupo de los eutróficos se encontró una prevalencia de 40%, representando a 20 niños parasitados.

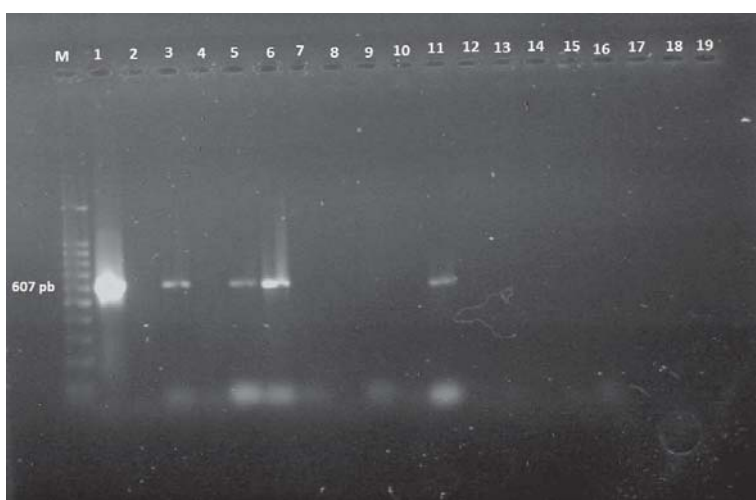


Figura 1. Identificación por PCR de *Enterocytozoon bienewsi*. Carril M- Marcador de peso molecular. Carril 1: control positivo de *Enterocytozoon bienewsi*. Carril 2-Control negativo. Carriles 3 a 19: ADN extraído de muestras de pacientes utilizando oligonucleótidos EBIE-1 EBIER-1.

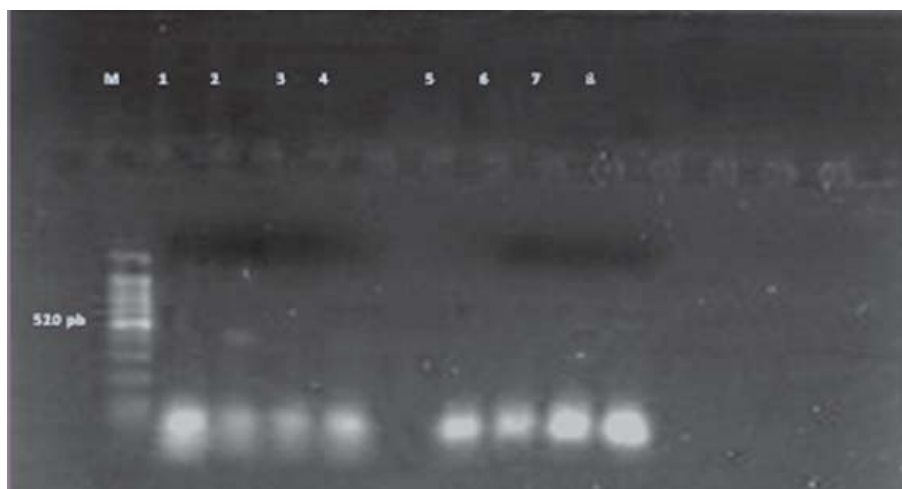


Figura 2. Identificación por PCR de *Encephalitozoon intestinalis*. Carril M- Marcador de peso molecular. Carril 1: control negativo de *Encephalitozoon intestinalis*. Carril 2-Control positivo. Carriles 3 a 8: ADN extraído de muestras de pacientes utilizando oligonucleótidos SINT-1 SINTR-1.

En cuanto a la presencia de parásitos y la edad, se encontró un predominio significativo de parasitados en el grupo de los preescolares de 2 a 6 años (χ^2 : 14,183 p<0,05). Sin embargo, cuando se utilizan como factor de comparación el estado nutricional, no existen diferencias estadísticas entre ambos grupos.

Las Tablas 2 y 3, muestran que el mayor porcentaje de parasitados fue de 24% y 34% para los desnutridos graves y eutróficos respectivamente en el grupo de los preescolares, y el menor porcentaje lo obtuvieron los lactantes menores (0 a 11 meses) para los desnutridos y los lactantes mayores (12 a 23 meses) para los eutróficos, ambos representados con un 2%.

Tabla 2. Prevalencia de Parasitismo por Grupo Etario en Niños Desnutridos Graves de la Unidad de Recuperación Nutricional del Hospital Chiquinquirá de Maracaibo, Estado Zulia. Venezuela, 2013.

Grupo Etario	Parasitados		No Parasitados		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
Lactantes menores (1-11 meses)	1	2	11	22	12	24
Lactantes mayores (12-23 meses)	4	8	8	16	22	24
Preescolares (2-6 años)	12	24	10	20	22	44
Escolares (7-12 años)	2	4	2	4	4	8
Total	19	38	31	62	50	100

$$\chi^2 = 3,537 \text{ p} = 0.316.$$

Tabla 3. Prevalencia de Parasitismo por Grupo Etario en Niños Eutróficos de la Consulta de Niños Sanos del Hospital Chiquinquirá de Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela, 2013.

Grupo Etario	Parasitados		No Parasitados		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
Lactantes menores (1-11 meses)	-	-	4	8	4	8
Lactantes mayores (12-23 meses)	1	2	4	8	5	10
Preescolares (2-6 años)	17	34	21	42	38	76
Escolares (7-12 años)	2	4	1	2	3	6
Total	20	40	30	60	50	100

$$\chi^2 = 4,457 \text{ p}=0.216.$$

Discusión

En el presente estudio, no se reveló una asociación estadísticamente significativa entre, microsporidiosis y el estado nutricional, tampoco con la prevalencia general de parasitosis intestinales lo cual concuerda con los hallazgos de investigaciones previas, que han tratado de relacionar los enteroparásitos con la desnutrición, anemia, niveles de hierro y de ciertas vitaminas (17, 19-26).

Contrario a lo antes expuesto, otras publicaciones han señalado asociación entre los enteroparásitos y la desnutrición (27, 28). Zonta y col., reseñan que sí existe una significación estadística entre la parasitosis y la desnutrición, debido a la precarización socioeconómica y socio sanitaria (29). Así mismo, otros autores confirman la existencia de una relación entre Microsporidios y desnutrición (30, 31).

Sin embargo, considerar el efecto que las infecciones parasitarias tienen en el estado nutricional, resulta de interés debido a que la reducción en la ingesta de alimentos por falta de apetito, la digestión y absorción incompleta de los alimentos, provoca pérdida de micronutrientes. Una nutrición insufi-

ciente predispone a infección, por cuanto afecta al sistema inmune e induce a presentar mayor vulnerabilidad frente a la entrada de otros microorganismos patógenos. Por ejemplo, algunos investigadores describen que la inmunidad funcional contra los parásitos, incluye citocinas y efectores sistémicos de tipo TH2, por lo cual durante las infecciones en hospederos con desnutrición proteico-calórica o con deficiencia de micronutrientes (vitamina A o zinc), ocurre una declinación de varios efectores TH2, tales como inmunoglobulina E (IgE), inmunoglobulina G (IgG) específica antiparásito y eosinófilos, que tienen un papel en la eliminación de los estadios larvarios infectivos, haciendo al individuo más susceptible a estas infecciones (32).

En el presente estudio, *E. bienewisi* se ubicó en primer lugar con un 14% en el grupo de desnutridos. Porcentajes ligeramente más elevados 17,4%, fueron encontrados por Tumwine y col., siendo una causa de diarrea y malabsorción intestinal (20), es importante acotar que esta especie de microsporidio intestinal fue hallada en el presente estudio solo entre los niños desnutridos (todos los casos entre 2 y 4 años de edad), no encontrándose entre los eutróficos. Por otra parte *E.in-*

testinalis, no se detectó en ningún individuo coincidiendo de esta manera con otros investigadores quienes han reseñado la ausencia o la poca significación de este microorganismo en sus estudios (20). Sin embargo, investigaciones realizadas, en poblaciones diferentes a la nuestra, específicamente en pacientes VIH, han demostrado la presencia de *E.intestinalis*, en porcentajes que varían entre un 10% a un 12% (6, 33).

Finalmente, se concluye que la medida en la que se relacionan la desnutrición, y la microsporidiosis, así como; las parasitosis intestinales, es difícil de explicar, ya que la desnutrición es una condición multifactorial, por lo que se hace difícil interpretar cuál de ellas es la causa y cuál la consecuencia o si una predispone a la otra. Probablemente esto pueda depender de la especie parasitaria, de la intensidad de la parasitosis, del medio socioeconómico en el que se desenvuelva el individuo, entre otros factores (26).

Referencias bibliográficas

- (1) Anane S, Attouchi H. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol Clin Biol*. 2010; 34: 450-464.
- (2) Noda Albelo A, Cañete R, Brito K. Microsporidiosis gastrointestinal: una actualización. *Rev Med Electrón*. 2013; 35:167-181.
- (3) Slamovits CH, Fast NM, Law JS, Keeling PJ. Genome Compaction and Stability in - Microsporidian Intracellular Parasites. *Current Biology*. 2004; 14: 891-6.
- (4) Stajich JE, Berbee ML, Blackwell M, Hibbett DS, James TY, Spatafora JW. The Fungi *Curr Biol* 2009; 19: 840-845.
- (5) Keeling PJ. Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. *Fungal Genet Biol*. 2003; 38: 298-309.
- (6) Rivero-Rodríguez Z, Hernández Sierra A, Arraiz N, Bracho-Mora A, Villalobos-Perozo R. Prevalencia de *Encephalitozoon intestinalis* y *Enterocytozoon bienewisi* en pacientes VIH positivos de Maracaibo, Venezuela. *Invest Clin* 2013; 54: 58-67.
- (7) Didier ES. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trp*. 2005; 94: 61-76.
- (8) Cegielski J, Ortega Y, Madden J. Cryptosporidium, Enterocytozoon, and Cyclospora in pediatric and adult patient with diarrhea in Tanzania. *Clin Infect Dis*. 1999; 28: 314-321.
- (9) Weiss L., Vossbrinck C. Microsporidiosis: Molecular and Diagnostic Aspects. *Adv Parasitol* 2008; 40: 351-395.
- (10) Cerda H. Los Elementos de la Investigación. 2da Edición Colombia: Editorial El Búho. 1995. p. 71-76.
- (11) García C, Almenara J. Determinación del tamaño de muestra en variables cualitativas en las que se desconoce el valor del parámetro. *Med Clin (Barc)*. 1999; 112:797-798.
- (12) Méndez H. Sociedad y estratificación. Método de Graffar-Méndez Castellano. Caracas: Fundacredesa. 1994. p. 7-35.
- (13) Masalan M, González R. Autocuidado del ciclo vital. 2003. Disponible en: <http://www.puc.cl/sw-educ/enferm/ciclo/index.html>
- (14) Botero J, Montoya M, Vanegas A, Diaz A, Martinez L, Bornay F, Izquierdo F, Del Aguila C, Agudelo S. Frecuencia de microsporidiosis intestinal en pacientes positivos para VIH mediante las técnicas de Gram Cromotropo Rápido y PCR. *Biomédica* 2004; 24: 375-384.
- (15) Lagrutta F, Castillo C, De La Rosa M. Evaluación nutricional del paciente pediátrico hospitalizado. *Rev Hosp Niño*. 1990; 9: 51-55.
- (16) CDC. National Center for Health Statistics. 2000. Disponible en: <http://www.cdc.gov/growthcharts/zscore.htm>
- (17) Melvin D, Brooke M. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de parasitosis intestinales. México: Editorial Interamericano. 1971. p. 198.
- (18) Núñez Y.; Fernández M.; Torres D.; Silva J.; Montano L.; Maestre J.: Multiplex polymerase chain reaction amplification and

- differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 64: 293-7.
- (19) Botero D, Restrepo M. Parasitosis humanas. 4ta ed. Medellín, Colombia: Ediciones Corporación para Investigaciones Biológicas. 2005. p. 418.
- (20) Chourio Lozano G, Díaz I, Rivero Rodríguez Z, Peña C, Cuenca E, Calchi M, Molero E. Prevalencia de enteroparásitos en niños inmunocomprometidos e inmunocompetentes. *Kasmera.* 2002; 30:156-173.
- (21) Tumwine J., Kekitiinwa A., Nabukeera N., Akiyoshi D., Buckholt M., Tzipori S., .Enterocytozoon bienesi entre los niños con diarrea del Hospital de Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 67: 299-303.
- (22) Figuera L., Kalale H., Marchán E., .Relación entre la helmintiasis intestinal y el estado nutricional-hematológico en niños de una escuela rural en el estado Sucre, *Kasmera.* 2006; 34: 14-24.
- (23) Barón M., Solano L., Páez M., Pabón M. Estado nutricional de hierro y parasitosis intestinal en niños de Valencia, Estado Carabobo Venezuela, *Nutrición y salud pública.* 2007; 20: 15-11.
- (24) Borjas P., Arenas F., Bazán Y., Enteroparasitismo en niños y su relación con la pobreza y estado nutricional. *CIMEL.* 2009; 14: 2-6.
- (25) Acuna, I., y Morón, S. Hipocromía y diagnóstico de talla en niños y adolescentes con parasitosis intestinales del Municipio Guácaro. Estado Carabobo. Venezuela. *Ibero-Latinoam. Parasitol.* 2011; 70: 85-92.
- (26) Jiménez J, Vergel K., Velásquez M, Vega F., Uscata R., Romero S., Flórez A., Posadas L., y col. Parasitosis en niños en edad escolar: relación con el grado de nutrición y aprendizaje. *Horizonte Médico.* 2011; 11: 3-5.
- (27) Maldonado A, Bracho A, Rivero Z, Atencio T, Acurero E, Calchi M, Villalobos R. Enteroparasitosis en niños desnutridos graves de un hospital de la ciudad de Maracaibo, Venezuela. *Kasmera* 2012; 40: 134-145.
- (28) Ubillus G., Ascarrus A., Soto C., Medina J., Falconí R., Franco J., Delgado V., Cuba V., Dávila M. Denegri G., Díaz D. Enteroparasitosis y estado nutricional en niños menores de 4 años de wawa-wasi de Pamplona Alta San Juan de Miraflores Lima- Perú. *Horizonte Médico* 2008; 8: 2-4.
- (29) Lozada S., Mendoza D. Parasitismo intestinal y malnutrición en niños residentes en una zona vulnerable de la ciudad de Santa Marta, Colombia. *Facultad de Ciencias de la Salud.* 2010; 7: 207-210.
- (30) Zonta L., Garraza M., Castro L., Navone T., Oyhenart E. Pobreza, estado nutricional y enteroparasitosis infantil: un estudio transversal en Aristóbulo del Valle, Misiones, Argentina. *Nutrición clínica y Dietética Hospitalaria.* 2011; 31: 48-57.
- (31) Mor S., Tumwine J., Naumova E., Ndeezi G., Tzipori S. Microsporidiosis y la malnutrición en los niños con diarrea persistente, Uganda. *Emerg Infect.* 2009; 15:49-52.
- (32) Sinan C., Ulku k., Cemil C. Prevalencia de *Microsporidium* y otros parásitos intestinales en niños de Malatya, Turquía. *Microbiol indio J.* Julio 2011; 51: 345-349.
- (33) Kosky G., Scott M., Gastrointestinal nematodes, nutrition and immunity: breaking the negative spiral. *Annu Rev Nutr.* 2001; 21: 297-321.
- (34) Małgorzata Bednarska, Anna Bajer, Edward Siński, Beata Wolska-Kucenierz, Bolesław Samoliński, Thadeus M. Graczyk. Occurrence of intestinal microsporidia in immunodeficient patients in Poland. 2014; *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 21: 244-248.