

MARCELO URBANO FERREIRA

Parasitologia

CONTEMPORÂNEA

2ª EDIÇÃO



Os Protozoários Intestinais Emergentes

Annette Silva Foronda ■ Fábio Ramos de Souza Carvalho

Introdução

São considerados *emergentes* os protozoários recentemente reconhecidos como patogênicos para o ser humano. Alguns deles assumiram grande importância por causarem infecções oportunistas em indivíduos imunodeprimidos, com consequências graves, muitas vezes levando à morte. Outros acometem indivíduos imunocompetentes, e são emergentes por terem adquirido novas propriedades de virulência ou em decorrência da proximidade mais recente entre seus reservatórios e o hospedeiro humano (Mahmoud, 1998). O número de casos de infecções por protozoários intestinais emergentes transmitidos por alimentos e/ou água tem aumentado em função da globalização de fontes alimentares, viagens internacionais, consumo de frutas frescas e de alimentos crus ou malcozidos (Ortega; Sanchez, 2010).

Este capítulo compreende os principais *coccídeos intestinais* – *Cyclospora cayetanensis* e *Cystoisospora belli*, membros do supergrupo Chromalveolata (Alveolata – Apicomplexa – Coccidia) –, bem como *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium parvum*. Os agrupamentos taxonômicos mencionados baseiam-se na proposta da Sociedade de Protozoologistas, publi-

cada em 2005, que substituiu as categorias clássicas (Reino, Filo, Classe e Ordem) por supergrupos ou agrupamentos amplos, definidos com critérios morfológicos, bioquímicos e de filogenia molecular (Adl et al., 2005; revista em Adl et al., 2012). Algumas semelhanças e diferenças entre os principais protozoários intestinais emergentes que infectam o ser humano são listadas na Tabela 9.1.

Cryptosporidium hominis, *Cryptosporidium parvum* e *Cystoisospora belli* são primariamente encontrados em hospedeiros imunocomprometidos. *Cyclospora cayetanensis*, embora possa ser encontrada em indivíduos imunocomprometidos, está mais ligada a quadros diarreicos de viajantes e a surtos ocasionais em comunidades de países em desenvolvimento. As infecções causadas pelos protozoários intestinais emergentes, principalmente a criptosporidiose, podem ser também comuns em crianças imunocompetentes, associadas a sintomatologia intestinal (Kumar et al., 2017). A presença de *Myxobolus* sp., um novo parasito, foi descrita em fezes de pacientes imunodeprimidos, mas a etiologia da diarreia não foi confirmada, já que outros patógenos também foram encontrados nas mesmas amostras (Moncada et al., 2001).

TABELA 9.1 Diferenças e semelhanças entre os protozoários intestinais emergentes.

Espécies	<i>Cryptosporidium hominis</i> /C. <i>parvum</i>	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	<i>Cystoisospora belli</i>
Hospedeiros	Completa o ciclo em um só hospedeiro (monoxeno)	Completa o ciclo em um só hospedeiro (monoxeno)	Completa o ciclo em um só hospedeiro (monoxeno)
Ciclo vital	Esquizogonia Gametogonia Esporogonia	Esquizogonia Gametogonia Esporogonia	Esquizogonia Gametogonia Esporogonia
Localização	Intracelular e extracitoplasmática: intestino delgado, trato respiratório, ductos biliares e pancreáticos	Intracelular: intestino delgado	Intracelular: intestino delgado
Ocorrência	Não sazonal	Sazonal	Não sazonal
Transmissão	Orofecal e pessoa a pessoa	Orofecal. É necessário tempo de esporulação no ambiente, não pode ser pessoa a pessoa	Orofecal. É necessário tempo de esporulação no ambiente, não pode ser pessoa a pessoa
Diagnóstico	Exame de fezes: colorações de Ziehl-Neelsen modificada e similares. Oocistos de 4 mm com 4 esporozoítos nus	Exame de fezes: a fresco ou colorações de Ziehl-Neelsen modificada e similares, autofluorescência. Oocistos de 10 mm, contendo 2 esporocistos com 2 esporozoítos (total de esporozoítos: 4)	Exame de fezes: a fresco ou colorações de Ziehl-Neelsen modificada e similares. Oocistos de 25 mm, contendo 2 esporocistos com 4 esporozoítos (total de esporozoítos: 8)
Tratamento	Nitazoxanida em imunocompetentes	Sulfametoxazol-trimetoprima Nitazoxanida?	Sulfametoxazol-trimetoprima

Cryptosporidium hominis, *Cryptosporidium parvum* e a criptosporidiose

Discute-se atualmente a taxonomia dos organismos do gênero *Cryptosporidium* diante da dificuldade de aplicar o conceito biológico de espécie, neste e na maioria dos protozoários, e da diversidade de hospedeiros parasitados. Baseando-se em morfologia de oocistos, sítios de infecção, especificidade de hospedeiros e diferenças genéticas, atualmente consideram-se válidas, do ponto de vista taxonômico, 27 espécies de *Cryptosporidium* (Morgan-Ryan et al., 2002; Putignani; Menichella, 2010; Ryan et al., 2014; Ryan; Hijjawi, 2015). Oito espécies são frequentes em infecções humanas: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. muris* e *C. andersoni*, embora 20 espécies distintas de *Cryptosporidium* tenham sido encontradas em infecções humanas (Ryan et al., 2014). Dentre elas, as responsáveis pela maioria de casos de criptosporidiose humana são *C. hominis* e *C. parvum*, temas deste capítulo, mas é possível que todas as espécies do gênero *Cryptosporidium* sejam potencialmente patogênicas para o ser humano (Xiao et al., 2000; Xiao, 2010; Jex; Gasser, 2010).

Até recentemente, agrupava-se o gênero *Cryptosporidium* entre os coccídeos. Entretanto, sugere-se, há vários anos, que esses protozoários poderiam ser o elo perdido entre os coccídeos e as gregarinas, um grupo de protozoários primitivos do agrupamento Apicomplexa, predominantemente extracelulares, que tipicamente infectam o intestino de invertebrados e podem ou não causar-lhes doença (Rueckert et al., 2019). A similaridade entre *Cryptosporidium* e as gregarinas vem sendo confirmada com base em critérios biológicos, morfológicos, genômicos e bioquímicos (Aldeyarbi; Karanis, 2016; Clode et al., 2015). Entre os principais critérios biológicos, está a sua capacidade de desenvolvimento fora de células. De fato, em meio de cultivo contendo células hospedeiras, *Cryptosporidium* parece tornar-se progressivamente extracelular ao longo de seu ciclo; em meio axênico e em coleções hídricas na natureza, desprovidas de células, o parasito mostra-se capaz de completar seu ciclo de vida, não podendo mais ser classificado entre os coccídeos, organismos intracelulares obrigatórios. *Cryptosporidium* é atualmente o único membro de um novo agrupamento de gregarinas, criado em 2014 e denominado Cryptogregarina (Ryan et al., 2016).

Nos países em desenvolvimento, a criptosporidiose é considerada uma das infecções entéricas mais frequentes em seres humanos, principalmente em crianças, embora adultos sejam também acometidos. Em hospedeiros imunocompetentes, a evolução do quadro é autolimitada. É uma doença endêmica, com eventuais surtos epidêmicos ligados à transmissão pela água. A criptosporidiose ganhou grande destaque em decorrência das consequências letais das infecções em indivíduos imunodeprimidos, a partir dos primeiros casos humanos descritos no final da década de 1970. Desde então, relatos no mundo todo evidenciam a grande disseminação desse protozoário (Bouzid et al., 2013; Ryan et al., 2014).

Aspectos biológicos

Cryptosporidium hominis e *C. parvum* são protozoários do grupo Apicomplexa que, ao contrário dos coccídeos, são desprovidos de apicoplasto, um vestígio de cloroplasto adquirido mediante simbiose com algas verdes. São epitelocelulares facultativos. Apresentam estágios intracelulares alojados em vacúolos parasitóforos resultantes de sua fusão com a membrana da célula hospedeira, o enterócito. Ao mesmo tempo, esses estágios são extracitoplasmáticos porque se localizam fora do citoplasma da célula hospedeira (Tzipori; Griffiths, 1998). Têm uma estrutura de alimentação típica das gregarinas, conhecida como epimerito (*epimerite*, na literatura de língua inglesa), que resulta do redobramento da membrana da porção anterior do vacúolo que envolve o organismo. O epimerito forma-se tanto em estágios extracelulares como epitelocelulares. No primeiro caso, *Cryptosporidium* forma um vacúolo independentemente de qualquer interação com as células hospedeiras e o epimerito extrai alimentos diretamente do ambiente. No segundo caso, o vacúolo forma-se com a incorporação de componentes da célula hospedeira e do próprio parasito – é, portanto, definido como um vacúolo parasitóforo; o epimerito extrai os alimentos da própria célula hospedeira (Clode et al., 2015).

Seu ciclo vital transcorre em um só hospedeiro vertebrado; são, portanto, parasitos monoxenos, compreendendo uma fase de reprodução assexuada por esquizogonia (ou merogonia) e outra de reprodução sexuada por gametogonia e esporogonia. Há duas divisões esquizogônicas. A primeira resulta em esquizontes tipo I, e dá origem a seis ou oito merozoítos. Essas formas infectam novas células para uma segunda divisão esquizogônica, o que resulta em esquizontes tipo II, que originam quatro merozoítos cada. Os merozoítos tipo II dão início ao ciclo sexuado, com formação de gametócitos e gametas. Nessa etapa, ocorre *sizígia*, o pareamento entre trofozoítos que precede a formação dos gametócitos, comumente observado em gregarinas. O produto da fusão dos gametas é um zigoto que desenvolve um oocisto com quatro esporozoítos (Smith; Rose, 1998) (Figura 9.1). Especula-se que os oocistos possam também ser produzidos no lúmen intestinal dos hospedeiros, a partir da fusão de gametas no ambiente extracelular, como ocorre com as demais gregarinas (Ryan et al., 2016). É provável que existam outros estágios extracelulares, ainda não descritos, presentes no lúmen intestinal dos hospedeiros (Clode et al., 2015).

A morfologia dos oocistos esporulados de *Cryptosporidium* e dos coccídeos intestinais é comparada na Figura 9.2. Os oocistos de *C. hominis* e *C. parvum* são idênticos: ambos são esféricos, medem de 2 a 4 µm de diâmetro e contêm quatro esporozoítos nus. Podem ser de dois tipos, de parede rígida e de parede delgada, e são eliminados esporulados, e é até mesmo possível a liberação dos esporozoítos no lúmen intestinal.

A transmissão de *C. hominis/C. parvum* é principalmente orofecal, pela ingestão de oocistos. Como ainda não foi comprovada a especificidade de hospedeiros, caracteriza-se uma transmissão zoonótica. As vias de aquisição da infecção podem ser: (i) pessoa a pessoa; (ii) animal a animal; (iii) animal a pessoa; (iv) por água de abastecimento e recreacional; (v) por alimentos; e (vi) possivelmente pelo ar. A autoinfecção é também relatada, principalmente em imunodeprimidos,

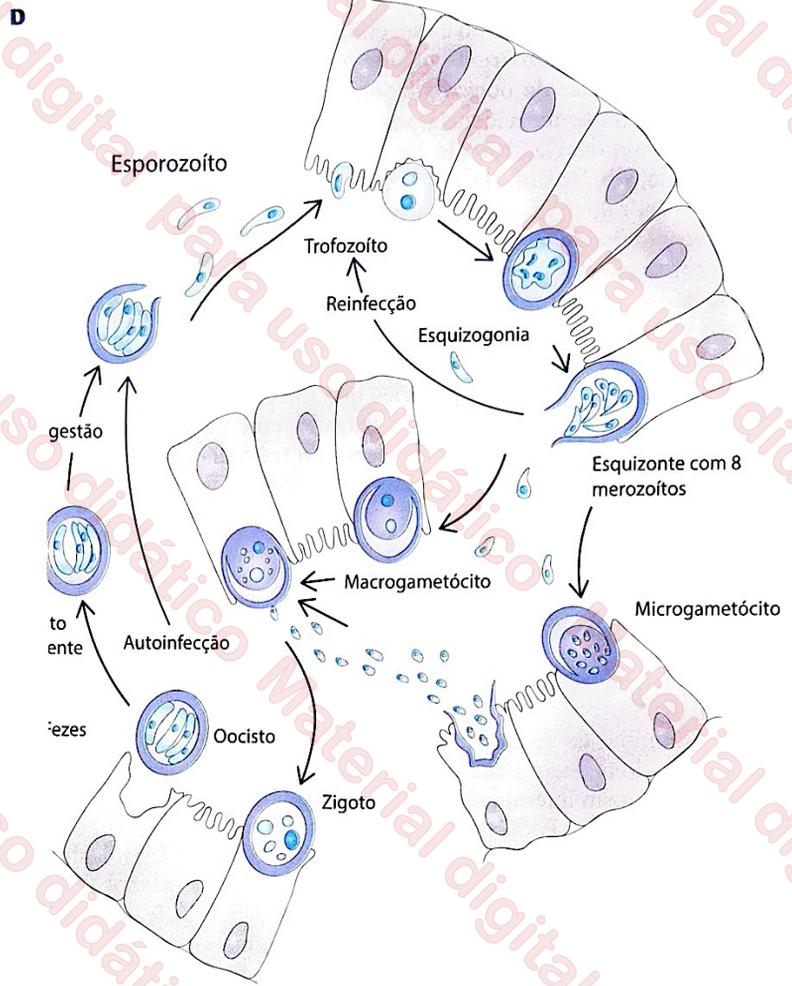
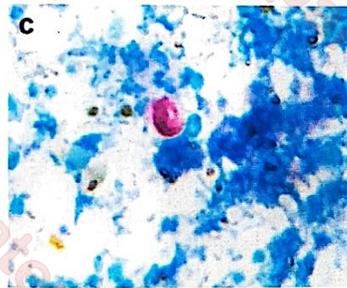
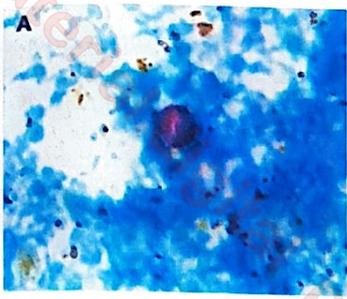
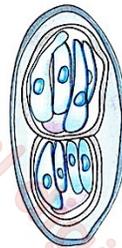


FIGURA 9.1 A, B e C. Oocistos de *Cryptosporidium parvum* corados com Kinyoun. Fotografias de Marcelo Urbano Ferreira. D. Ciclo vital de *Cryptosporidium*.



Cryptosporidium parvum
Tamanho: 4µm
Contém 4 esporozoítos nus

Cyclospora cayetanensis
Tamanho: 10µm
Contém 2 esporocistos
com 2 esporozoítos

Cystoisospora belli
Tamanho: 25µm
Contém 2 esporocistos
com 4 esporozoítos

FIGURA 9.2 Morfologia de oocistos esporulados de *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* e *Cystoisospora belli*.

explicando-se pela eliminação do oocisto já esporulado e a liberação de esporozoítos no lúmen intestinal, onde invadem enterócitos (Fayer et al., 2000).

Nos últimos anos, inúmeras técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para detectar e diferenciar linhagens de *Cryptosporidium*, caracterizando-se genótipos e subtipos. Uma das mais usadas é a análise da sequência de DNA do gene que codifica a glicoproteína de massa molecular de 60 kDa

(gp60). Esses estudos são complementados por análises da sequência nucleotídica do gene da subunidade menor do RNA ribossômico 18S (SSU rRNA) de espécies de *Cryptosporidium*, beneficiando-se da presença de múltiplas cópias do gene SSU rRNA no genoma do protozoário e da ocorrência, nesse gene, de regiões conservadas e variáveis, proporcionando maior sensibilidade e especificidade aos estudos de filogenia, evolução e epidemiologia (Xiao, 2010). Outro marcador molecular para

análise genotípica de espécies de *Cryptosporidium*, apesar de fatores limitantes intrínsecos quanto à especificidade restrita a algumas espécies do protozoário, é o gene que codifica a proteína da parede celular do oocisto, denominada COWP (Xiao, 2010). Até o momento, evidenciaram-se seis genótipos ou subtipos em *C. hominis* (Ia, Ib, Id, Ie, If e Ig) e 11 genótipos em *C. parvum* (IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIe, IIg, IIh, IIi, IIk e III) (Xiao, 2010). A partir de análises de sequências nucleotídicas, como novas tecnologias de sequenciamento de alta capacidade, descreveram-se mais de 40 genótipos de *Cryptosporidium* na literatura, havendo alta probabilidade de que muitos desses genótipos sejam elevados, a partir de estudos fenotípicos e genotípicos complementares, ao nível de espécies (Ryan; Hijjawi, 2015). O habitat das duas espécies que infectam o ser humano é principalmente o intestino delgado, embora possam ser encontradas em qualquer segmento do trato digestório. Outras localizações, como o trato respiratório e as vias biliares, também são descritas, ainda que mais raramente (Xiao, 2010).

Fatores de virulência

Cryptosporidium hominis e *C. parvum* invadem as células epiteliais, principalmente do intestino delgado, sem atingir as camadas mais profundas da mucosa. As alterações histológicas no intestino delgado incluem atrofia de vilosidades, variando de média a intensa, com intensidade correlacionada positivamente à carga parasitária. Pode-se também observar infiltrado inflamatório na lâmina própria, constituído por linfócitos, macrófagos e neutrófilos (Laurent et al., 1999).

A maior parte do conhecimento sobre fatores de virulência em criptosporidiose deriva de infecções agudas em animais, e não em seres humanos imunodeprimidos. Desse modo, é difícil explicar os mecanismos envolvidos na diarreia profusa dos casos fulminantes em seres humanos. A semelhança clínica com doenças diarreicas induzidas por toxinas, como a cólera, combinada com a observação de que a intensidade da infecção nem sempre está relacionada com a gravidade do quadro clínico, levantam a hipótese de os criptosporídios secretarem uma enterotoxina, embora ainda não tenha sido isolada (Clark; Sears, 1996; Laurent et al., 1999).

Na criptosporidiose, ocorre redução da absorção de nutrientes e da produção de enzimas digestivas, como a lactase e a fosfatase alcalina. A perda de absorção de vitamina B₁₂ e de D-xilose relaciona-se com a intensidade da infecção. Sugere-se que as prostaglandinas e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α , da abreviação em inglês) tenham papel na diarreia por *Cryptosporidium*; estudos nessa área podem levar a avanços terapêuticos. A resposta imune inata e a adaptativa, mediada por células, parecem estar igualmente envolvidas na imunidade contra a criptosporidiose, mas resta identificar a maioria dos componentes específicos dessas respostas (Griffiths, 1998).

A dificuldade de cultivo *in vitro* e de manipulação genética desses parasitos tem limitado a investigação de fatores que contribuem para a virulência das infecções por *Cryptosporidium*. Apesar disso, por técnicas imunológicas e moleculares, foram caracterizados, principalmente nas infecções por *C. parvum*, 25 possíveis fatores de virulência envolvidos em eventos que vão desde a adesão do parasito ao enterócito e sua locomoção até a invasão celular e a subsequente proliferação (Figura 9.3). Geralmente, *Cryptosporidium* não

causa uma infecção sistêmica nem penetra nos tecidos. O parasito aloja-se em um compartimento na superfície apical das células do epitélio intestinal, causando importantes mudanças nas funções de absorção e secreção intestinais, resultantes de lesões diretas ao epitélio ou indiretas pela ação de células inflamatórias e citocinas. No processo de adesão a células, desempenham importante papel a glicoproteína circunsporozoíta-símile (CSL, da abreviação em inglês) e a glicoproteína 900 (gp900). Na lesão celular, estão envolvidas fosfolipases, proteases e hemolisinas. Está em análise a função das proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSP) e de moléculas que modulam a resposta imune do hospedeiro. Aliás, entre os fatores ligados ao hospedeiro determinantes para o estabelecimento da criptosporidiose, a resposta imune parece ser o mais importante. A imunidade reduz não somente o risco de infecção como também a gravidade da doença. Embora nem todas as formas de imunossupressão levem a infecções mais graves, a perda ou disfunção de células T (especialmente em casos com contagem de células T CD4 abaixo de 50/ μ l de sangue), é um claro fator de risco (Bouزيد et al., 2013).

Aspectos clínicos e patológicos

Cryptosporidium hominis e *C. parvum* podem ser agentes de infecção intestinal, respiratória e hepatobiliar. Na doença intestinal, podem ser encontradas quatro formas: (i) assintomática; (ii) autolimitada aguda ou transitória; (iii) crônica; e (iv) fulminante. As duas primeiras formas são comuns em indivíduos imunocompetentes, e as duas últimas, em portadores de AIDS ou outros estados de imunocomprometimento grave. As formas intestinais têm período de incubação de 2 a 14 dias, caracterizam-se por diarreia aquosa, intermitente ou contínua, vômitos, dores abdominais e perda de peso. A diarreia em indivíduos imunodeprimidos geralmente é grave, com várias evacuações, podendo levar à perda de mais de 20 l de líquido diariamente. A forma fulminante é uma doença dramática, assemelhando-se à cólera. A infecção respiratória é comum, mas, em geral, inaparente. Pacientes com criptosporidiose persistente podem desenvolver infecção de ductos hepatobiliares ou pancreáticos.

Não existe, até o momento, nenhum fármaco específico e efetivo para o tratamento de criptosporidiose. Um composto tiazolídico, a nitazoxanida, que apresenta ampla ação contra outros patógenos intestinais, como protozoários, nematódeos e cestóides, foi introduzido mais recentemente no tratamento de criptosporidiose. Por ser bem tolerado e ter baixa incidência de efeitos colaterais, vem sendo usado em várias partes do mundo, especialmente nas Américas Central e do Sul. Não é efetivo, no entanto, para os casos de criptosporidiose em imunocomprometidos (Snelling et al., 2007; Yoder; Beach, 2010). Cuidados gerais, hidratação e tratamentos sintomático e antiviral para os portadores de AIDS são as melhores medidas terapêuticas disponíveis nesses casos. A restauração da imunocompetência é a melhor arma contra a infecção (Griffiths, 1998). Em indivíduos imunocompetentes, a infecção por *Cryptosporidium*, em geral, é autolimitada, mas os sintomas podem persistir além da fase aguda (Cacciò; Chalmers, 2016). Diante das limitadas opções terapêuticas disponíveis, a busca por novos fármacos ativos contra *Cryptosporidium* é uma área de investigação prioritária (Stebbins et al., 2018).

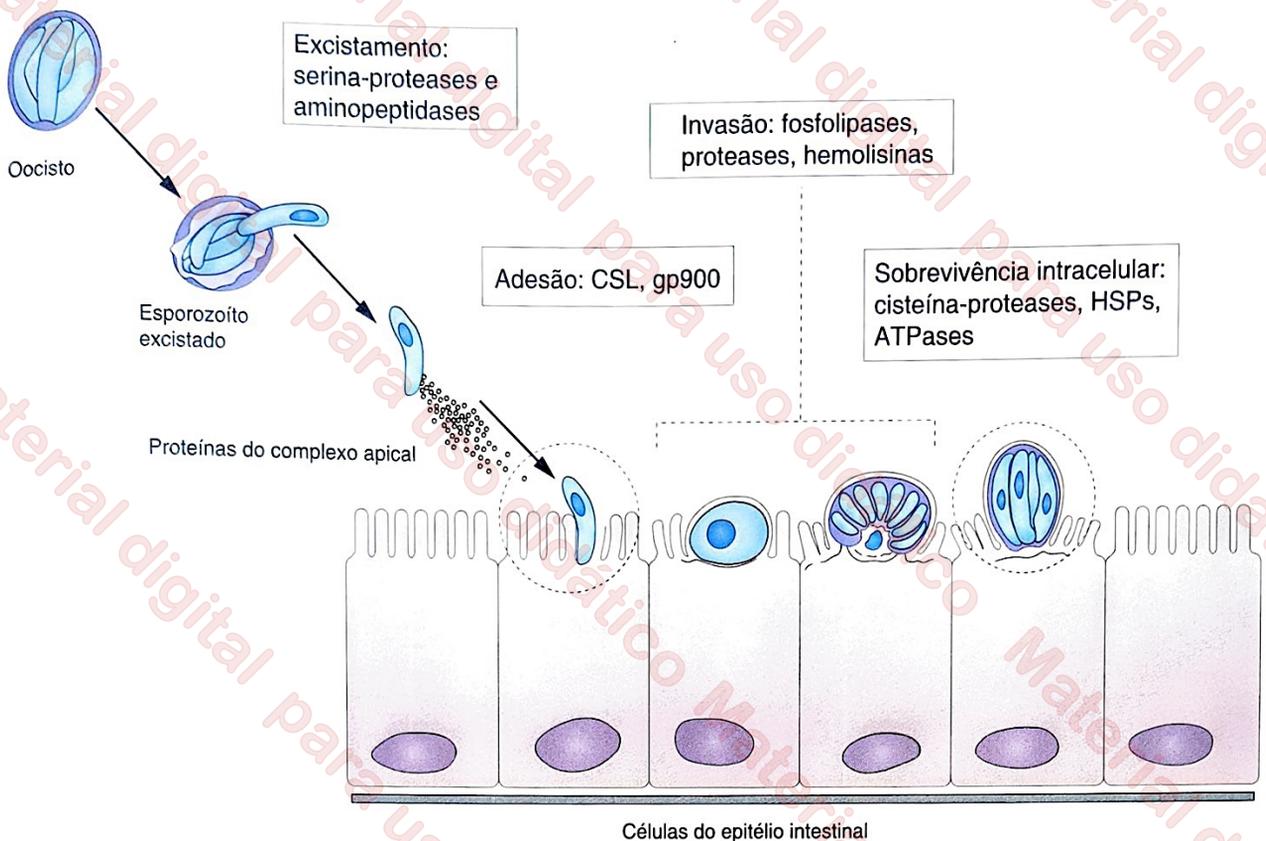


FIGURA 9.3 Fatores de virulência de *Cryptosporidium* e sua função em diferentes fases do ciclo vital. Cerca de 25 fatores de virulência foram descritos até o momento, com papel no excistamento dos esporozoítos, na adesão dos esporozoítos ao epitélio intestinal com a consequente invasão celular e na multiplicação do parasito no vacúolo parasitóforo. No processo de adesão, desempenham importante papel a glicoproteína circunsporozoíta-símil (CSL, da abreviação em inglês) e a glicoproteína 900 (gp900). Na invasão celular, estão envolvidas fosfolipases, proteases e hemolisinas. Proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock proteins*), ATPases e cisteína-proteases são necessárias para a sobrevivência intracelular. Adaptada de Bouzid M et al., 2013.

Diagnóstico laboratorial da criptosporidiose

O diagnóstico laboratorial baseia-se no achado de oocistos nas fezes, no escarro, na bile ou em material jejunal, em exame direto ou após a concentração do material com uso de flutuação em sacarose, centrifugação em formol-éter ou técnicas similares. Os oocistos podem ser visibilizados a fresco, com microscopia óptica comum ou microscopia de contraste de fase, ou em material corado, com o uso de técnicas de tipo Ziehl-Neelsen, incluindo a técnica de Kinyoun (ver Figuras 9.2 e 9.4), além de safranina-azul de metileno, auramina e corantes similares. Oocistos de *C. hominis* e *C. parvum* não são diferenciados com base em critérios morfológicos.

É importante a medida dos oocistos para a diferenciação entre os criptosporídios e *Cyclospora cayatanensis* (Figura 9.2). O diagnóstico histológico pode ser feito corando-se o material com hematoxilina-eosina ou utilizando-se a microscopia eletrônica. O principal elemento para o sucesso na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes consiste em solicitar a realização de técnicas específicas de diagnóstico, especialmente de coloração. Os métodos imunodiagnósticos também são usados, como a pesquisa de antígenos nas fezes. A detecção de *C. hominis/C. parvum* pode ser feita também por anticorpos monoclonais nas fezes ou na água de abastecimento. Técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de DNA de oocistos em amostras

de fezes são também utilizadas com finalidade diagnóstica, ainda que não estejam amplamente disponíveis em laboratórios de rotina.

Prevenção e controle da criptosporidiose

As infecções entéricas são responsáveis por cerca de 230.000 mortes anuais em todo o mundo. Entre as infecções entéricas causadas por parasitos, cerca de 104 milhões de casos anuais, a maioria está associada a protozoários (cerca de 77 milhões). Entre os protozoários, *Cryptosporidium* é responsável por 8,6 milhões de casos anuais, com 3.759 mortes em 2010 (Ryan et al., 2018). *Cryptosporidium hominis* e *C. parvum* são parasitos cosmopolitas, ainda que mais frequentes nos países em desenvolvimento. Infectam a maioria dos mamíferos e são altamente infecciosos; estima-se que o inóculo necessário para a infecção em indivíduos imunocompetentes seja de 30 oocistos, embora a dose infectante média seja de 132 oocistos (Fayer et al., 2000).

Acredita-se que a prevalência e a incidência sejam subestimadas, por serem as técnicas diagnósticas relativamente laboriosas. As estimativas de prevalência são em torno de 0,1 a 2% na população geral de países desenvolvidos, variando entre 0,5 e 10% em regiões menos desenvolvidas. O pico de incidência em crianças ocorre entre 1 e 5 anos de idade. Um estudo

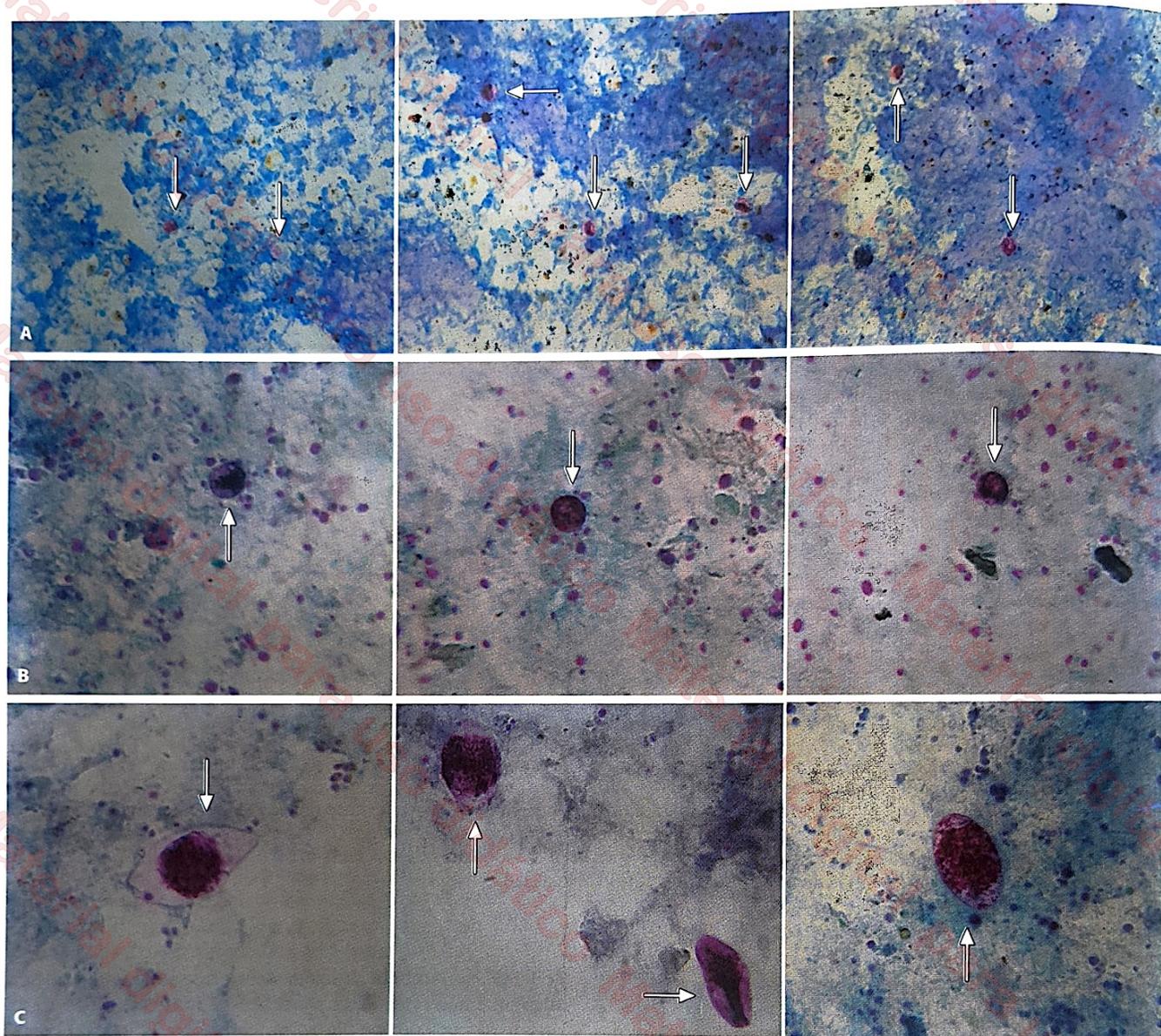


FIGURA 9.4 Oocistos de *Cryptosporidium* (A), *Cyclospora cayetanensis* (B) e *Cystoisospora belli* (C) recém-eliminados nas fezes. Esfregaços corados com Kinyoun. Observe as diferenças de intensidade de coloração entre oocistos no mesmo campo microscópico (setas). Fotografias de Marcelo Urbano Ferreira.

longitudinal na cidade de Fortaleza, no Nordeste do Brasil, mostra que quase todas as crianças têm anticorpos contra *C. parvum* quando completam 2 anos de idade, sugerindo intensa exposição ao parasito na primeira infância. Aparentemente não existe relação entre sexo e predisposição à infecção. Os fatores que explicam o acometimento preferencial de crianças são, além da baixa imunidade, os hábitos de higiene, a desnutrição e a contaminação de água e alimentos consumidos crus (Cacciò; Chalmers, 2016; Kumar et al., 2017; Ryan et al., 2018). Nos portadores de AIDS, a prevalência média é de 3 a 4% nos EUA, chegando a 50% entre pacientes com AIDS hospitalizados (Griffiths, 1998). Outros grupos de risco são indivíduos que vivem em instituições como orfanatos, os viajantes para regiões endêmicas e os trabalhadores rurais. A distribuição de casos humanos causados por *C. hominis* e *C. parvum* difere em várias regiões geográficas. Nos países europeus, as duas espécies são igualmente prevalentes, mas em outras regiões do mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, as

infecções por *C. hominis* são relativamente mais frequentes (Xiao, 2010). Têm sido registrados surtos epidêmicos ligados à transmissão por água, sendo o mais conhecido aquele que ocorreu em Milwaukee, EUA, em 1993, com 400.000 casos e cerca de 100 mortes. Depois desse, mais de 20 surtos foram relatados nos EUA, no Reino Unido e no Japão.

Os oocistos de *Cryptosporidium* podem permanecer viáveis por vários meses, mas altas temperaturas (60°C) levam à perda de infectividade. Os oocistos resistem ao cloro, mas morrem quando congelados e não suportam a dessecação (Fayer et al., 2000; Yoder; Beach, 2010; Jex; Gasser, 2010). A prevenção baseia-se em medidas gerais de saneamento básico, educação sanitária, filtração da água, controle de contaminação ambiental com fezes de animais infectados e evitando-se contato direto com animais. É importante ressaltar que a criptosporidiose ocorre não somente em hospedeiros imunocomprometidos, mas também em indivíduos imunocompetentes. Em pacientes com AIDS com controle da viremia, especialmente após

o tratamento com terapia antirretroviral, com células T CD4 em níveis elevados, a infecção pode ser autolimitada (Bouzid et al., 2013). O tratamento com fármacos antirretrovirais tem reduzido gradualmente a incidência de infecções oportunistas em pacientes com HIV/AIDS (Barcelos et al., 2018). Não há vacinas com eficácia comprovada contra *Cryptosporidium* (Ryan et al., 2018).

Cyclospora cayetanensis e a ciclosporíase

Os protozoários do gênero *Cyclospora* são importantes parasitos em várias espécies animais. Entretanto, das 20 espécies conhecidas, apenas *Cyclospora cayetanensis* infecta seres humanos. Entre 1986 e 1993, mais de 200 casos de diarreia em imunocompetentes e imunodeprimidos foram descritos, atribuindo-se a etiologia inicialmente a “um *Cryptosporidium* grande” (Soave, 1996). Após um período de confusão entre esse organismo e as cianobactérias, os fungos e *Blastocystis*, Ortega et al. obtiveram a esporulação, a visibilização de esporozoítos dentro de esporocistos e o excistamento dos oocistos em laboratório, estabelecendo-se então a classificação desse organismo como coccídeo, do gênero *Cyclospora*. A denominação de uma nova espécie, *Cyclospora cayetanensis*, foi proposta em publicações de 1993 e 1994, com base na instituição onde o organismo foi inicialmente estudado – a Universidad Peruana Cayetano Heredia. Estudos com microscopia eletrônica e análises filogenéticas moleculares confirmaram a classificação desse organismo como um coccídeo (Ortega et al., 1998; Ortega; Sanchez, 2010). A ciclosporíase é uma doença endêmica, como a criptosporidiose, com eventuais surtos epidêmicos. Os primeiros casos humanos foram descritos em 1979 e 1980, em Papua Nova Guiné. De modo semelhante, *Cyclospora* não é um novo patógeno, apenas foi reconhecida recentemente (Soave, 1996; Herwaldt, 2000).

Cyclospora cayetanensis difere de outras espécies de *Cyclospora* não só pela especificidade de hospedeiro, como também pela morfologia dos oocistos, esféricos e menores. A ciclosporíase está amplamente distribuída no mundo, como atestam os relatos de casos nas Américas, Europa, Austrália, Ásia e África (Chacín-Bonilla; Barrios, 2011).

Aspectos biológicos

Cyclospora cayetanensis é um protozoário pertencente ao supergrupo Chromalveolata (Alveolata – Apicomplexa – Coccidia). Por meio de técnicas de caracterização molecular, concluiu-se pela estreita relação desse protozoário com espécies de *Eimeria* (Chacín-Bonilla; Barrios, 2011). É um protozoário intracelular obrigatório, com formação de vacúolo parasitóforo dentro do citoplasma da célula hospedeira. Seu hábitat é o intestino delgado. Desenvolve-se em um só hospedeiro; é, portanto, um parasito monoxeno. Os indivíduos parasitados excretam oocistos não esporulados em suas fezes, que precisam de 7 a 15 dias para esporular no ambiente, em que precisam de 7 a 15 dias para esporular no ambiente, em condições ideais de temperatura (23 a 27°C). Quando ingeridos por um hospedeiro suscetível, os oocistos esporulados liberam os esporozoítos, infectando as células epiteliais do duodeno e do jejuno. A multiplicação assexuada resulta em

merontes tipos I e II. Os merontes tipo II diferenciam-se em formas sexuadas – os gametócitos. A fertilização das formas sexuadas femininas pelas masculinas dá origem ao zigoto. Formam-se os oocistos, excretados antes de sua esporulação, fechando-se assim o ciclo. Em outras espécies de *Cyclospora*, o ciclo varia conforme o hospedeiro. O tempo prolongado de esporulação no ambiente e tentativas malsucedidas de infectar animais com oocistos esporulados levantam a hipótese de haver estímulos desconhecidos para o desencadeamento da infecção (Ortega; Sanchez, 2010). O ciclo de *C. cayetanensis* está esquematizado na Figura 9.5. Até o momento, não foram encontrados outros hospedeiros de *C. cayetanensis*. Será necessário o desenvolvimento de modelos animais e de estudos *in vitro* para o esclarecimento de vários aspectos ligados à biologia dessa espécie.

Os oocistos são esféricos e medem de 8 a 10 µm de diâmetro; contêm, quando esporulados, dois esporocistos com dois esporozoítos cada um (Figura 9.2). As vias de transmissão ainda não estão totalmente esclarecidas, embora a via orofecal, diretamente ou por meio da água e de alimentos, deva ser a mais importante. A contaminação direta animal a ser humano e de pessoa a pessoa não foi comprovada. Possíveis reservatórios animais da infecção não foram identificados, afastando-se, até o momento, a transmissão zoonótica (Ortega; Sanchez, 2010; Chacín-Bonilla; Barrios, 2011).

Fatores de virulência

Os mecanismos pelos quais *Cyclospora* causa diarreia ainda são desconhecidos. Estudos histopatológicos de infecções humanas mostram atrofia de vilosidades, hiperplasia de criptas e moderada inflamação aguda da lâmina própria. Essas alterações poderiam reduzir a área de absorção e, assim, causar diarreia. Os relatos de diminuição de absorção de xilose em pacientes com infecção por *C. cayetanensis* reforçam essa hipótese. Em estudos clínicos e histopatológicos, observa-se que os sintomas cessam com a erradicação dos parasitos, mas as alterações inflamatórias associadas persistem (Connor et al., 1999).

Embora não se conheça exatamente a dose infectante, acredita-se, com base em estudos com outros coccídeos, que seja baixa, em torno de 10 a 100 oocistos. A variação de virulência e da suscetibilidade do hospedeiro à ciclosporíase permanece pouco explorada. Existem múltiplos clones de *C. cayetanensis*, caracterizados em áreas geográficas distintas com base na diversidade de sequência de nucleotídeos em certas regiões genômicas, que podem potencialmente diferir quanto à sua virulência (Chacín-Bonilla; Barrios, 2011).

Aspectos clínicos e patológicos

Embora se afirme que a diarreia na infecção por *C. cayetanensis* seja clinicamente indistinguível daquela causada por criptosporídios e *Cystoisospora belli* (Barta et al., 2005), nem sempre a diarreia é a manifestação predominante no quadro da ciclosporíase. Em regiões endêmicas, as infecções podem ser assintomáticas. Em áreas não endêmicas, o quadro clínico apresenta, além da diarreia aquosa (que pode ser cíclica, alternando-se com períodos de constipação intestinal), importantes sintomas e sinais associados, incluindo fadiga profunda, indigestão, sensação de queimação (pirose) no

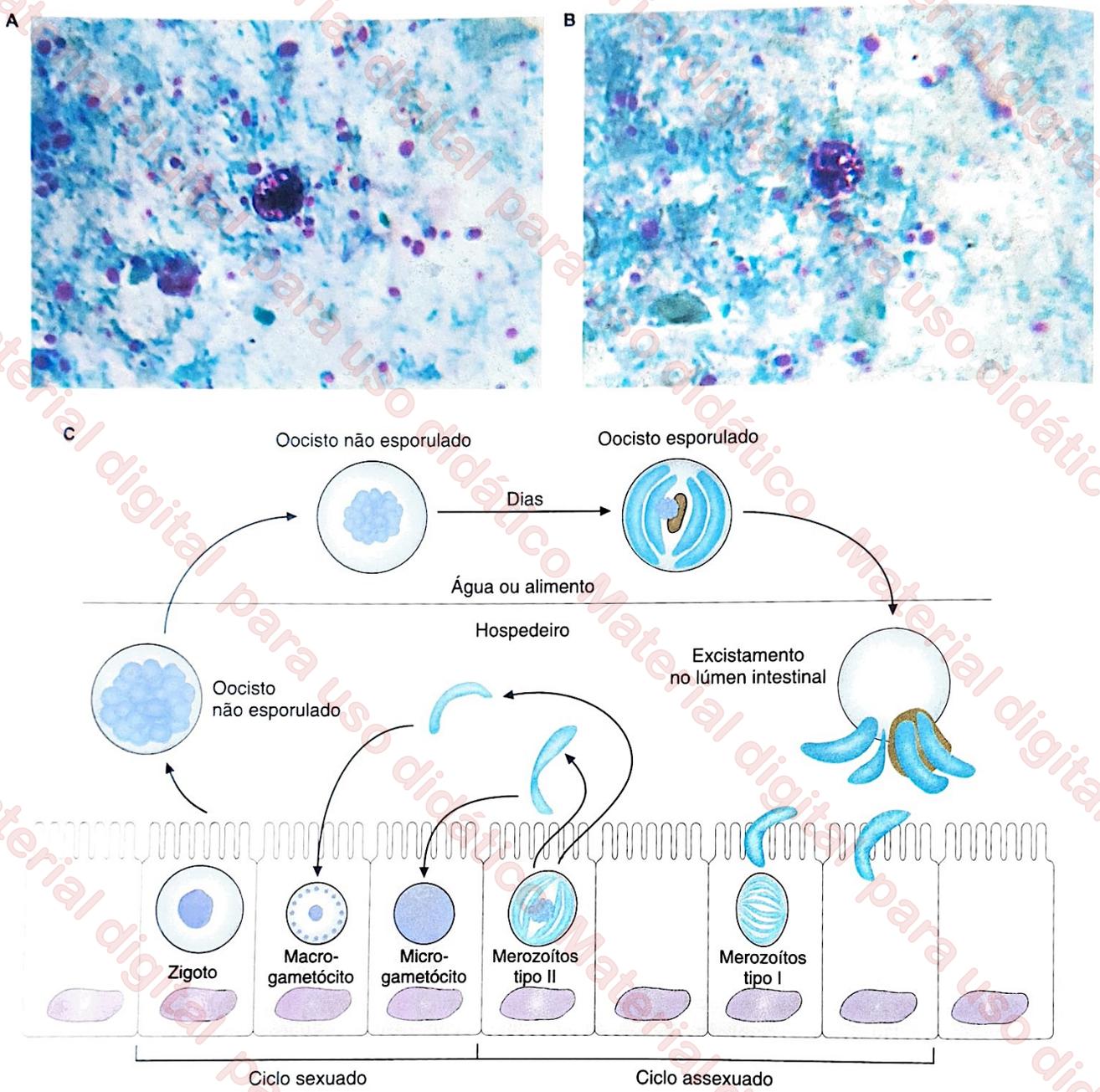


FIGURA 9.5 A e B. Oocistos não esporulados de *Cyclospora cayetanensis* recém-eliminados nas fezes e corados com Kinyoun. C. Ciclo vital de *C. cayetanensis*. Fotografias de Marcelo Urbano Ferreira.

estômago, náuseas, dores abdominais, perda de peso e vômitos. A ciclosporíase é autolimitada, apesar da possibilidade de prolongar-se por várias semanas. A demora em estabelecer o diagnóstico pode ocorrer em função da predominância dos outros sintomas, como fadiga e perda de peso, sobre a diarreia. Manifestações biliares também têm sido relatadas. Em pacientes imunocomprometidos, a infecção pode ser prolongada e grave, com alto grau de recorrência, atenuada, porém, com a terapêutica. O tratamento é bem-sucedido com sulfametoxazol-trimetoprima. Tem-se proposto o uso de nitazoxanida, por 7 dias, nos pacientes com intolerância às sulfas (Ortega et al., 1998; Ortega; Sanchez, 2010). Alguns autores recomendam sulfametoxazol-trimetoprima como primeira escolha (Weitzel et al., 2017).

Diagnóstico laboratorial da ciclosporíase

O diagnóstico laboratorial é feito pelo encontro de oocistos nas fezes, usando-se o exame direto ou métodos de concentração, como flutuação ou sedimentação. A visualização é possível com o material a fresco, em microscopia de contraste de fase ou corado pelas técnicas de Ziehl-Neelsen modificada, Kinyoun, safranina-azul de metileno, auramina e similares, como para *Cryptosporidium hominis*/*C. parvum* (Figuras 9.4 e 9.5). Outras técnicas de coloração, como Giemsa, tricrômico e Gram-chromothrope, não coram oocistos de *Cyclospora*. Os oocistos de *C. hominis*/*C. parvum* (diâmetro de 2 a 4 µm) e *C. cayetanensis* (diâmetro de 8 a 10 µm) têm morfologia interna distinta (Figura 9.2), e sua mensuração é fundamental para

a diferenciação entre as espécies. Os oocistos de *Cyclospora* são autofluorescentes e podem ser visualizados com microscópio de fluorescência com epiluminação. Além das fezes, os oocistos podem ser encontrados em aspirados jejunais e biopsias (Ortega; Sanchez, 2010). Estudos imunológicos para a detecção de anticorpos séricos contra *Cyclospora* estão em curso. A PCR tem potencial diagnóstico por ser mais sensível do que a microscopia, mas não é possível a distinção entre oocistos esporulados e não esporulados; entretanto, é a técnica de referência para a identificação de fontes de contaminação em grandes surtos (Herwaldt, 2000) e pode ser útil no diagnóstico de infecções humanas por *C. cayetanensis* (Weitzel et al., 2017).

A estrutura populacional e a diversidade genética de *C. cayetanensis* podem ser estudadas a partir do método de tipagem, utilizando sequenciamento de múltiplos loci (MLST, do inglês *multilocus sequence typing*). Observam-se padrões moleculares compatíveis com panmixia, com eventuais expansões clonais epidêmicas e subpopulações geograficamente segregadas. Análises moleculares adicionais de espécimes de outras regiões geográficas são necessárias para o melhor entendimento da genética populacional de *C. cayetanensis* (Guo et al., 2018).

Prevenção e controle da ciclosporiase

Cyclospora cayetanensis é amplamente disseminada no mundo. Pode ser adquirida pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados. A transmissão pessoa a pessoa não é observada, em função da necessidade de tempo de esporulação dos oocistos no ambiente. Há áreas endêmicas da ciclosporiase tradicionalmente reconhecidas, como Haiti, Guatemala, Peru e Nepal, mas a infecção é diagnosticada tanto em habitantes quanto em viajantes em várias regiões do mundo, incluindo as Américas (Venezuela, Brasil, Colômbia, Cuba e Argentina), Europa Oriental, Índia, África do Sul e Sudeste Asiático. A infecção acomete pessoas de todas as idades. Existe uma marcada sazonalidade na infecção, que coincide com a estação chuvosa, no Hemisfério Sul entre dezembro e julho. Nos EUA, as duas maiores epidemias ocorreram de maio a julho. A explicação para esse fato poderia estar ligada a fatores ambientais, como temperatura e umidade, o que contribui para a esporulação e sobrevivência dos oocistos. A prevalência pode ser subestimada pela falta de diagnóstico. Estudos realizados em comunidades de regiões em desenvolvimento registram estimativas de 0 a 41,6% (Chacín-Bonilla; Barrios, 2011).

A maioria das infecções nos países desenvolvidos é relatada em pacientes que viajaram para regiões endêmicas. Surtos epidêmicos são observados na América do Norte, desde 1995. Em 1996, 1.400 pessoas foram afetadas em 20 estados dos EUA e duas províncias canadenses (Connor et al., 1999). Em 2015 e 2016, foram descritos surtos de ciclosporiase em turistas na Península de Yucatán, México (Weitzel et al., 2017).

Os oocistos são altamente resistentes a desinfetantes comumente usados na indústria alimentícia e ao cloro. Podem sobreviver na água a 4°C por 2 meses e a 37°C por 7 dias, mas são muito sensíveis à dessecação e mais facilmente removidos por filtração convencional do que os de *C. hominis/C. parvum* (Chacín-Bonilla; Barrios, 2011). As medidas de prevenção são semelhantes àquelas que se aplicam a *C. hominis/C. parvum* e incluem saneamento básico, tratamento e

filtração da água, cuidados com a ingestão de alimentos crus e educação sanitária, além de orientação de viajantes para zonas endêmicas (Ortega; Sanchez, 2010).

Cystoisospora belli (syn *Isoospora belli*) e a cistoisporiase

A espécie *Isoospora belli*, citada como agente causal de infecções humanas, é agora denominada *Cystoisospora belli* (Barta et al., 2005; Lindsay et al., 2014). Todas as espécies de *Cystoisospora*, que infectam mamíferos, são parasitos intracelulares obrigatórios e geralmente parasitos de animais vertebrados. Diversos erros taxonômicos foram corrigidos nos últimos anos, como a exclusão da espécie *Isoospora hominis*, agora reclassificada como *Sarcocystis hominis*. Embora haja relatos de infecções humanas por *Cystoisospora natalensis* (originalmente descrita como *Isoospora natalensis*) na África do Sul na década de 1950, considera-se *C. belli* a principal espécie do gênero causadora de infecções humanas (Lindsay et al., 1997).

Aspectos biológicos

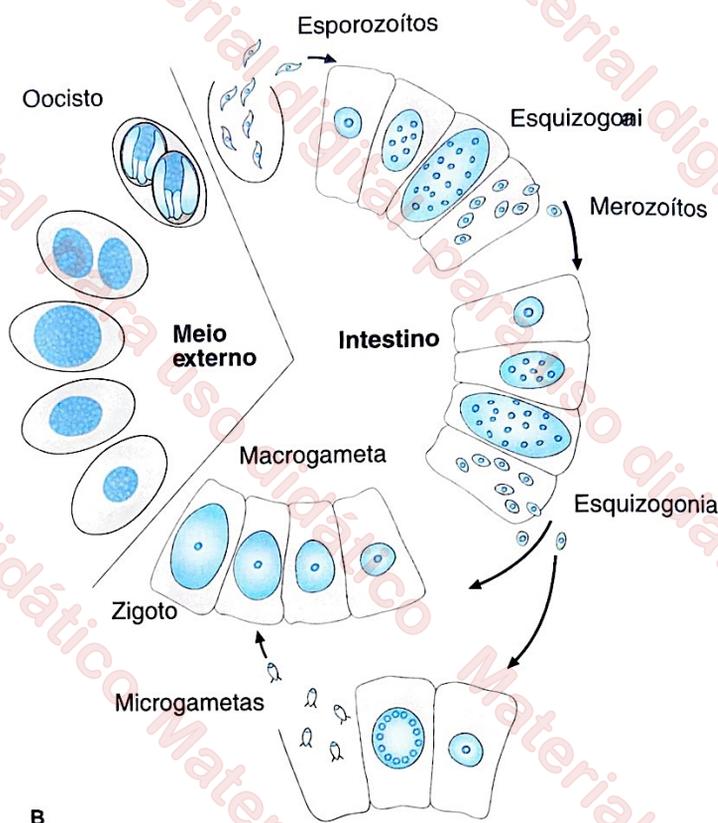
Este protozoário pertence ao supergrupo Chromalveolata (Alveolata – Apicomplexa – Coccidia) e completa seu ciclo em um único hospedeiro; é, portanto, monoxeno. Estudos moleculares indicam que os parasitos dos gêneros *Isoospora* e *Cystoisospora* são filogeneticamente mais próximos de *Toxoplasma* e *Neospora*, heteroxenos, do que de *Eimeria* (Carreno et al., 1998). Seu ciclo vital compreende duas fases, uma assexuada e outra sexuada, como os demais protozoários estudados neste capítulo. Na fase assexuada, ocorre a esquizogonia e, na fase sexuada, ocorrem a gametogonia e a esporogonia (Figura 9.6). O produto final, forma infectante, é um oocisto ovalado que mede de 20 a 33 µm × 10 a 19 µm de diâmetro, em média 25 µm. Esses oocistos são eliminados não esporulados, necessitando de 24 a 48 horas no meio exterior para se tornarem infectantes. Quando esporulados, contêm dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos (ver Figura 9.2). A transmissão ocorre por ingestão de oocistos presentes em água ou alimentos; não foi assinalada contaminação pessoa a pessoa em decorrência da necessidade da esporulação no ambiente.

Fatores de virulência

Cystoisospora belli produz citólise epitelial. Embora tenha sido sugerida a ação de uma toxina para explicar a patogenia do quadro digestório, tal suposição não foi confirmada (Neira et al., 2010). Os conhecimentos sobre os mecanismos de imunidade contra esse patógeno são limitados, com necessidade de mais pesquisa nessa área (Stark et al., 2009). Histologicamente, encontram-se atrofia de vilosidades, hiperplasia de criptas e células inflamatórias, principalmente eosinófilos, infiltrando as lesões. Vários relatos descrevem distúrbios de absorção de nutrientes. As alterações do sistema imunitário que levam à doença prolongada não estão esclarecidas.



FIGURA 9.6 A. Oocisto não esporulado, recém-eliminados nas fezes. B. Ciclo vital de *Cystoisospora belli*. Fotografia de Cláudio Santos Ferreira.



Aspectos clínicos

O quadro clínico da cistoisporíase pode desenvolver-se vários meses ou anos após a exposição ao agente causal. A infecção por esse coccídeo pode ser oligo ou assintomática ou ainda sintomática, com quadro diarreico de início brusco, com dores abdominais, náuseas, febre e mal-estar geral, com oito a dez evacuações líquidas por dia e perda de peso importante (5 kg ou mais). Pode haver leucocitose e eosinofilia moderada ou alta; esta é a única protozoose intestinal humana que causa eosinofilia. Em indivíduos imunocompetentes, pode ser autolimitada, desaparecendo em algumas semanas; em pacientes imunocomprometidos e em crianças, a diarreia pode ser grave. Em alguns pacientes, a infecção pode durar mais de 20 anos, com aparecimento intermitente da sintomatologia (Neira et al., 2010). Embora o protozoário seja geralmente restrito ao intestino, existem relatos de disseminação para outros órgãos em indivíduos portadores de AIDS (Curry; Smith, 1998). Em um indivíduo imunocomprometido, não portador de AIDS, foi relatada infecção fatal por *C. belli*. (Post et al., 2018). Outras localizações desse coccídeo foram descritas, como fígado, vesícula biliar e baço (Chiu et al., 2016). Em 2016, foi publicada uma avaliação clinicopatológica de 18 casos de cistoisporíase na vesícula biliar, em indivíduos imunocompetentes (Lai et al., 2016). A infecção por *C. belli* responde bem à terapia com sulfametoxazol-trimetoprima, sulfadiazina e pirimetamina.

Diagnóstico laboratorial da cistoisporíase

O diagnóstico laboratorial é estabelecido pelo achado de oocistos nas fezes, usando-se técnicas de concentração, como flutuação ou sedimentação. A visualização é feita a fresco, com microscopia óptica comum com pouca iluminação ou microscopia

de contraste de fase, ou com o material corado pelas mesmas técnicas usadas na identificação de *Cryptosporidium hominis*, *C. parvum* e *Cyclospora cayatanensis*: Ziehl-Neelsen modificada, Kinyoun, safranina-azul de metileno, auramina e similares (Figuras 9.4 e 9.5). Em caso de dificuldade do encontro de oocistos no material fecal, aspirados duodenais e eventualmente biopsias podem ser feitos. Algumas formas teciduais foram identificadas em casos humanos, e podem ser visualizadas por microscopia óptica e eletrônica. O diagnóstico de infecção por PCR pode basear-se tanto na técnica convencional como em PCR de tempo real, que chega a 100% de especificidade e sensibilidade (Stark et al., 2009; Chiu et al., 2016).

Prevenção e controle da cistoisporíase

Cystoisospora belli tem distribuição mundial, embora a maioria dos casos seja encontrada nos trópicos. É endêmica em muitas regiões da África, Sudeste Asiático e América do Sul. As infecções entéricas por *C. belli* eram relativamente raras até o advento das síndromes de imunodeficiência. Até 1935, havia o registro de somente 200 casos humanos de infecção por *C. belli* no mundo. Em uma revisão de 1960, 800 casos foram relatados, 43 deles nos EUA. Em pacientes com infecção pelo HIV, as prevalências vão de 0,2 a 6% na América do Norte; 1,5 a 15% na América Central; 1,8 a 32% na América do Sul. Em outros países, as prevalências estimadas são de 0,07% no Japão, 41,1% na Índia, 1,9% em Camarões e 16% em Zâmbia (Neira et al., 2010). A falta de diagnóstico, porém, pode falsear os dados de prevalência no mundo todo.

Como não se encontraram fontes animais para a infecção humana, a transmissão é considerada antroponótica. A prevenção da cistoisporíase baseia-se em medidas gerais de saneamento básico, educação sanitária, filtração da água e não

ingestão de alimentos crus. Indivíduos imunocomprometidos em viagem para zonas endêmicas devem ser orientados sobre os cuidados a serem tomados com a ingestão de água e alimentos. Em pacientes com manifestações clínicas de AIDS, recomenda-se profilaxia secundária com sulfametoxazol-trimetoprima e eventualmente pirimetamina para aqueles com hipersensibilidade às sulfas (Neira et al., 2010). Há um relato de possível transmissão pessoa a pessoa, talvez por contato sexual.

Referências bibliográficas

Adl SM, Simpson AG, Farmer MA et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol.* 2005;52:399-451.

Adl SM, Simpson AG, Lane CE et al. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol.* 2012;59:429-93.

Aldeyari HM, Karanis P. The ultra-structural similarities between *Cryptosporidium parvum* and the gregarines. *J Eukaryot Microbiol.* 2016;63:79-85.

Barcelos NB, Freitas e Silva L, Ferreira R et al. Opportunistic and non-opportunistic intestinal parasites in HIV/AIDS patients in relation to their clinical and epidemiological status in a specialized medical service in Goiás, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2018;60:e13.

Barta JR, Schrenzel MD, Carreno R et al. The genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a junior objective synonym of the genus *Isoospora* (Schneider 1881) species infecting birds and resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as the correct genus for *Isoospora* species infecting mammals. *J Parasitol.* 2005;91:726-7.

Bouazid M, Hunter PR, Chalmers RM et al. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:115-34.

Cacciò SM, Chalmers RM. Human cryptosporidiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22:471-80.

Carreno RA, Schnitzler BE, Jeffries AC et al. Phylogenetic analysis of *Coccidia* based on 18S rDNA sequence comparison indicates that *Isoospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora*. *J Eukaryot Microbiol.* 1998;45:184-8.

Chacín-Bonilla L. Epidemiology of *Cyclospora cayetanensis*: A review focusing in endemic areas. *Acta Trop.* 2010;115:181-93.

Chacín-Bonilla L, Barrios F. *Cyclospora cayetanensis*: Biología, distribución ambiental y transferencia. *Biomedica.* 2011;31:132-44.

Clark DP, Sears CL. The pathogenesis of cryptosporidiosis. *Parasitol Today.* 1996;12:221-5.

Chiu KW, Chiou SS, Lu LS et al. Molecular Identification of biliary *Isoospora belli*: A case report. *Medicine (Baltimore).* 2016;95:e3071.

Clode PL, Koh WH, Andrew Thompson RC. Life without a host cell: What is *Cryptosporidium*? *Trends Parasitol.* 2015;31:614-24.

Connor BA, Reidy J, Soave R. Cyclosporiasis: Clinical and histopathologic correlates. *Clin Infect Dis.* 1999;28:1216-22.

Curry A, Smith HV. Emerging pathogens: *Isoospora*, *Cyclospora* and microsporidia. *Parasitology.* 1998;117:S143-59.

DeHovitz JA, Pape JW, Boney M et al. Clinical manifestations and therapy of *Isoospora belli* infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med.* 1986;315:87-90.

Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, detection and identification. *Int J Parasitol.* 2000;30:1305-22.

Griffiths JK. Human cryptosporidiosis: Epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. *Adv Parasitol.* 1998;40:37-85.

Guo Y, Li N, Ortega YR et al. Population genetic characterization of *Cyclospora cayetanensis* from discrete geographical regions. *Exp Parasitol.* 2018;184:121-7.

Herwaldt BL. *Cyclospora cayetanensis*: A review, focusing on the outbreaks of cyclosporiasis in the 1990s. *Clin Infect Dis.* 2000;31:1040-57.

Jex AR, Gasser RB. Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of "next generation" technologies - Research review. *Biotechnol Adv.* 2010;28:17-26.

Kumar P, Vats O, Kumar D, Singh S. Coccidian intestinal parasites among immunocompetent children presenting with diarrhea: Are we missing them? *Trop Parasitol.* 2017;7:37-40.

Lai KK, Goyné HE, Hernandez-Gonzalo D et al. *Cystoisospora belli* infection of the gallbladder in immunocompetent patients: A clinico-pathologic review of 18 cases. *Am J Surg Pathol.* 2016;40:1070-4.

Laurent F, McCole D, Eckmann L et al. Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes Infect.* 1999;1:141-8.

Lindsay DS, Dubey JP, Blagburn BL. Biology of *Isoospora* spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10:19-34.

Lindsay DS, Houk AE, Mitchell SM et al. Developmental biology of *Cystoisospora* (Apicomplexa: Sarcocystidae) monozyotic tissue cysts. *J Parasitol.* 2014;100:392-8.

Mahmoud AAF. "New" Intestinal Parasitic Protozoa. In: Krause RM. *Emerging Infections.* New York: Academic Press, 1998. p. 431-45.

Moncada LI, López MC, Murcia MI et al. *Myxobolus* sp., another opportunistic parasite in immunosuppressed patients? *J Clin Microbiol.* 2001;39:1938-40.

Morgan-Ryan UM, Fall A, Ward LA et al. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J Eukaryot Microbiol.* 2002;49:433-40.

Neira OP, Barthel EM, Wilson GL et al. Infección por *Isoospora belli* en pacientes con infección por VIH: Presentación de dos casos y revisión de la literatura. *Rev Chilena Infectol.* 2010;27:219-27.

Ortega YR, Sterling CR, Gilman RH. *Cyclospora cayetanensis*. *Adv Parasitol.* 1998;40:399-418.

Ortega YR, Sanchez R. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:218-34.

Post L, Garnaud C, Maubon D et al. Uncommon and fatal case of cyclosporiasis in a non HIV-immunosuppressed patient from a non-endemic country. *Parasitol Int.* 2018;67:1-3.

Putignani L, Menichella D. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2010;2010:75312.

Rueckert S, Betts EL, Tsaousis AD. The symbiotic spectrum: Where do the gregarines fit? *Trends Parasitol.* 2019;35:687-94.

Ryan U, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: Current understanding and research needs. *Parasitology.* 2014;141:1667-85.

Ryan U, Hijjawi N. New developments in *Cryptosporidium* research. *Int J Parasitol.* 2015;45:367-73.

Ryan U, Hijjawi N, Xiao L. Foodborne cryptosporidiosis. *Int J Parasitol.* 2018;48:1-12.

Ryan U, Papparini A, Monis P et al. It's official - *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Res.* 2016;105:305-13.

Smith HV, Rose JB. Waterborne cryptosporidiosis: Current status. *Parasitol Today.* 1998;14:14-22.

Snelling WJ, Xiao L, Ortega-Pierres G et al. Cryptosporidiosis in developing countries. *J Infect Dev Ctries.* 2007;1:242-56.

Soave R. *Cyclospora*: An overview. *Clin Infect Dis.* 1996;2:429-35.

Stark D, Barrat JL, van Hal S et al. Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:634-50.

Stebbins E, Jumani RS, Klopfer C et al. Clinical and microbiologic efficacy of the piperazine-based drug lead MMV665917 in the dairy calf cryptosporidiosis model. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12:e0006183.

Tzipori S, Griffiths JK. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. *Adv Parasitol.* 1998;40:5-36.

Weitzel T, Vollrath V, Porte L. *Cyclospora cayetanensis*. *Rev Chilena Infectol.* 2017;34:45-6.

Xiao L, Morgan UM, Fayer R et al. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitol Today.* 2000;16:287-92.

Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp Parasitol.* 2010;124:80-9.

Yoder JS, Beach MJ. *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. *Exp Parasitol.* 2010;124:31-9.

Leitura sugerida

Bouazid M, Hunter PR, Chalmers RM et al. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:115-34.

Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health.* 2007;5:1-38.

Ryan U, Hijjawi N. New developments in *Cryptosporidium* research. *Int J Parasitol.* 2015;45:367-73.