

7

Protozoários Emergentes

Annette Silva Foronda

- ▶ *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* e criptosporidiose, 74
- ▶ *Cyclospora cayetanensis* e ciclosporíase, 78
- ▶ *Isospora belli* e isosporíase, 79
- ▶ Amebas de vida livre potencialmente patogênicas, 81
- ▶ Bibliografia, 86
- ▶ Leitura sugerida, 87



São considerados emergentes os protozoários que recentemente foram reconhecidos como patogênicos para o homem. Alguns deles assumiram importância significativa por causarem infecções oportunistas em indivíduos imunodeprimidos, em situações graves, muitas vezes levando à morte. Outros acometem indivíduos imunocompetentes por terem adquirido novas propriedades de virulência ou em decorrência da proximidade entre seus reservatórios e o hospedeiro humano (Mahmoud, 1998). O número de casos de protozooses por 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 dois grupos de protozoários: os coccídeos intestinais e as amebas de vida livre potencialmente patogênicas. Os coccídeos estudados são *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli*, membros do supergrupo Chromalveolata (Alveolata – Apicomplexa – Coccidia). As amebas de vida livre estudadas pertencem aos supergrupos Amoebozoa e Excavata; em Excavata encontra-se *Naegleria fowleri* (Vahlkampfiidae) e em Amoebozoa encontram-se *Acanthamoeba* spp. e *Balamuthia mandrillaris* (Acanthamoebidae) e *Sappinia pedata* (Thecamoebidae). Os agrupamentos taxonômicos mencionados baseiam-se na proposta da Sociedade de Protozoologistas publicada em 2005, que substituiu as categorias clássicas (Reino, Filo, Classe e Ordem) por seis supergrupos ou agrupamentos amplos, definidos com critérios morfológicos, bioquímicos e de filogenia molecular (Adl *et al.*, 2005). A nomenclatura das outras categorias foi mantida.

Cryptosporidium hominis, *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* estão primariamente associados a hospedeiros imunocomprometidos. *Cyclospora cayetanensis*, embora possa ser encontrada em imunocomprometidos, está mais ligada a quadros diarreicos de viajantes ou a surtos ocasionais em algumas comunidades. Amebas de vida livre podem ou não estar relacionadas com o comprometimento imunitário do hospedeiro. Recentemente foi identificado um parasito, *Myxobolus* sp., em fezes de pacientes imunodeprimidos, mas a etiologia da diarreia não foi confirmada, já que outros patógenos

também foram encontrados (Moncada *et al.*, 2001). Algumas semelhanças e diferenças entre os coccídeos intestinais que infectam o homem são listadas na Tabela 7.1.

► *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* e criptosporidiose

Discute-se atualmente a taxonomia dos organismos do gênero *Cryptosporidium* diante da dificuldade de aplicar o conceito biológico de espécie, como ocorre com a maioria dos protozoários, e da diversidade de hospedeiros parasitados. Baseando-se na morfologia de oocistos, sítios de infecção, especificidade de hospedeiros e diferenças genéticas, atualmente são aceitas como válidas, do ponto de vista taxonômico, 16 espécies de *Cryptosporidium* (Morgan-Ryan *et al.*, 2002; Putignani & Menichella, 2010). Oito espécies podem causar infecções humanas: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. muris* e *C. andersoni*. Dentre elas, as responsáveis pela maioria de casos de criptosporidiose humana são *C. hominis* e *C. parvum*, tema deste capítulo, mas é possível que todas as espécies do gênero *Cryptosporidium* sejam potencialmente patogênicas para o homem (Xiao *et al.*, 2000; Xiao, 2010; Jex & Gasser, 2010).

A criptosporidiose é considerada uma das infecções entéricas mais frequentes em seres humanos, principalmente em crianças, embora adultos sejam também acometidos. Nesses casos, 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 deste protozoário.

Tabela 7.1 Diferenças e semelhanças entre os coccídeos intestinais.

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

► Aspectos biológicos

Cryptosporidium hominis e *Cryptosporidium parvum* são protozoários do supergrupo Chromalveolata (Alveolata – Apicomplexa – Coccidia). Como membros do clado Coccidia, os protozoários dos gêneros *Cryptosporidium*, *Cyclospora* e *Isospora*, que habitam porções do sistema digestório, são conhecidos como coccídeos intestinais. *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium parvum* são organismos intracelulares obrigatórios, com a peculiaridade de serem extracitoplasmáticos. São intracelulares porque apresentam fusão com a membrana do enterócito, formando um vacúolo parasitóforo, e extracitoplasmáticos porque se localizam fora do citoplasma da célula hospedeira (Tzipori & Griffiths, 1998). Têm o ciclo vital desenvolvido em um só hospedeiro; 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, dando origem a seis ou oito merozoítos. Estas formas infectam novas células para uma segunda divisão esquizogônica, resultando em esquizontes tipo II, que originam quatro merozoítos. Os merozoítos tipo II dão início ao ciclo sexuado, com formação de gametócitos e gametas. O produto da fusão dos gametas é um zigoto que desenvolve um oocisto com quatro esporozoítos (Smith & Rose, 1998) (Figura 7.1).

A morfologia dos oocistos dos coccídeos intestinais é comparada na Figura 7.2. Os oocistos de *C. hominis* e *C. parvum* são idênticos; ambos são esféricos, medem de 2 a 4 μm e contêm quatro esporozoítos nus. Podem ser de dois tipos, de parede rígida e de parede delgada, e são eliminados esporulados, sendo 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: (a) pessoa a pessoa; (b) animal a animal; (c) animal a humano; (d) por água de abastecimento e recreacional; (e) por alimentos; e (f) possivelmente pelo ar. A autoinfecção é também relatada, principalmente em imunodeprimidos, explicando-se pela eliminação do oocisto já esporulado e a liberação de esporozoítos no lúmen intestinal (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). 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, IIf, IIg, IIh, Iii, IIk e III). O *habitat* das duas espécies é principalmente o intestino delgado, embora

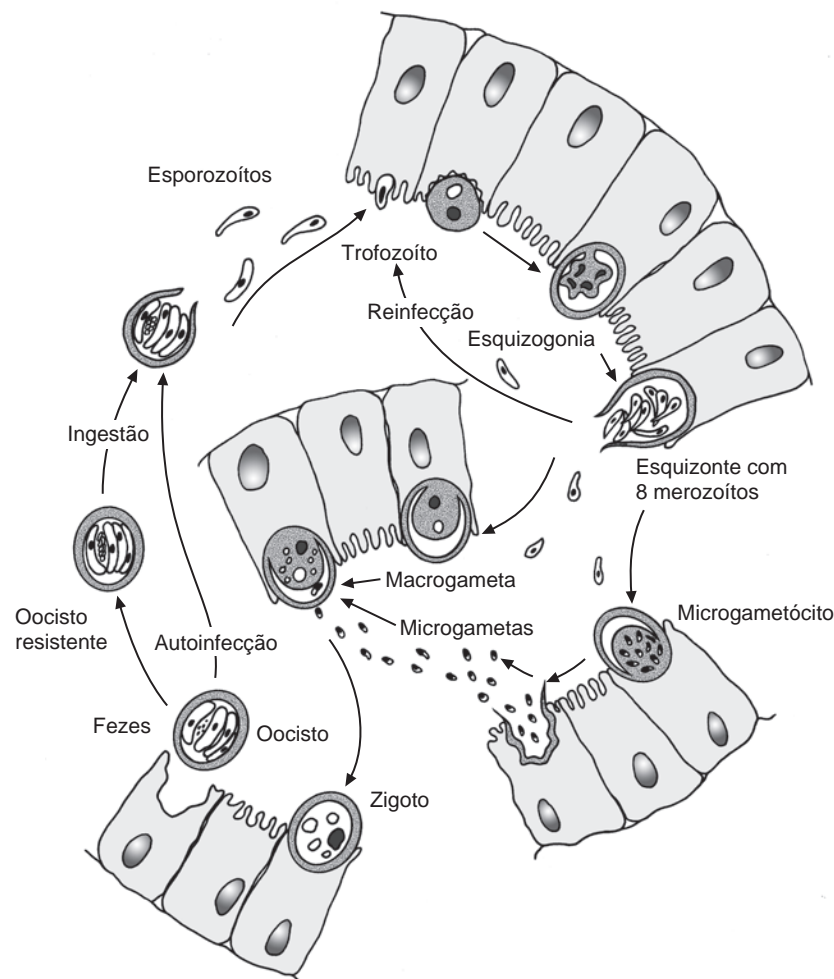


Figura 7.1 Ciclo vital de *Cryptosporidium parvum*.

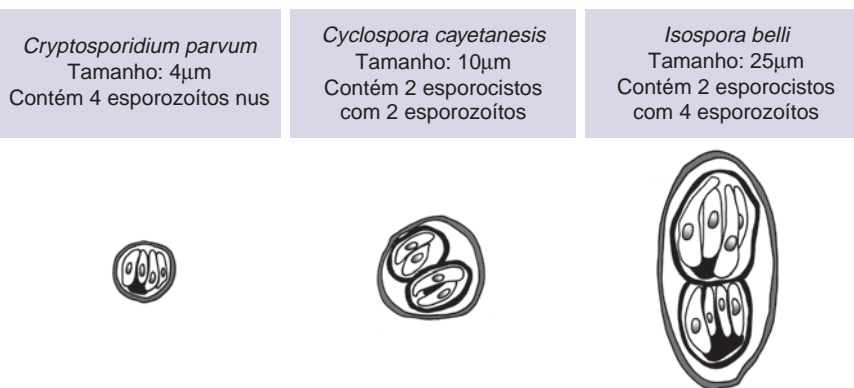


Figura 7.2 Coccídeos intestinais. Morfologia de oocistos esporulados de *Cryptosporidium*, *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli*.

possam ser encontradas em qualquer segmento do trato digestivo. Outras localizações, como o trato respiratório e as vias biliares, também são descritas (Xiao, 2010).

► Fatores de virulência

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

A maior parte do que se sabe sobre fatores de virulência em criptosporidiose é derivada de infecções agudas em animais normais e não em humanos imunodeprimidos. Desse modo, é difícil explicar os mecanismos envolvidos na diarreia profusa dos casos fulminantes. 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, levantam a hipótese de os criptosporídeos 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 correlaciona-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).

► 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: (a) assintomática; (b) autolimitada aguda ou transitória; (c) crônica; (d) 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 dutos hepatobiliares ou pancreáticos.

Não existe, até o momento, nenhum fármaco específico e efetivo para o tratamento de criptosporidiose. Recentemente, foi introduzido o uso de um composto tiazolídico, a nitazoxanida, no tratamento de criptosporidiose. Este fármaco tem ampla ação contra outros patógenos intestinais como bactérias, outros protozoários, nematódeos e cestódios. Por ser bem tolerado e ter baixa incidência de efeitos colaterais, tem sido usado em várias partes do mundo, especialmente Américas Central e do Sul. Não é efetivo, no entanto, para os casos de criptosporidiose em imunocomprometidos (Snellig *et al.*, 2007; Yoder, Beach, 2010). Cuidados gerais, hidratação e tratamentos sintomático e antiviral para os portadores de AIDS constituem-se nos únicos elementos disponíveis. A restauração da imunocompetência é a melhor arma contra a infecção (Griffiths, 1998).

► Diagnóstico laboratorial da criptosporidiose

O diagnóstico laboratorial baseia-se no achado de oocistos nas fezes, no escarro, na bile ou em material jejunal, após concentração por flutuação em sacarose ou centrifugação em formol-éter. Os oocistos podem ser visibilizados a fresco, com microscopia ótica comum ou microscopia de contraste de fase, ou em material corado pelas técnicas Ziehl-Neelsen modificada, Kinyoun (Figura 7.3), safranina-azul de metileno, auramina e similares. Oocistos de *Cryptosporidium hominis* e *C. parvum* não são diferenciados com base em critérios morfológicos.

É importante a medida dos oocistos para a diferenciação entre os criptosporídeos e *Cyclospora cayetanensis* (Figura 7.2). Diagnóstico histológico pode ser feito corando-se o material com hematoxilina-eosina ou utilizando-se 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. Os métodos imunodiagnósticos também são usados, como a pesquisa de

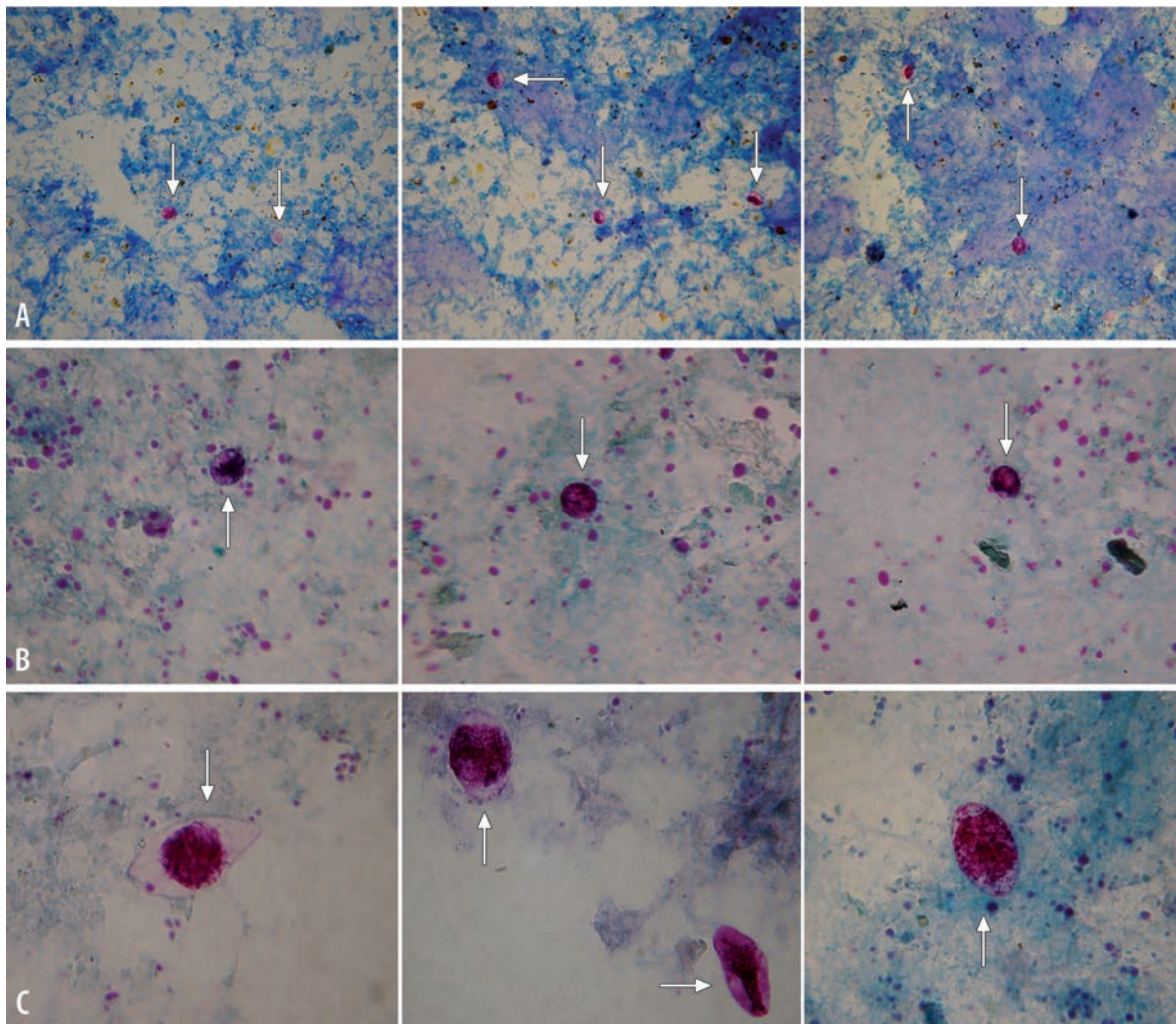


Figura 7.3 Oocistos de *Cryptosporidium* (A), *Cyclospora cayatanensis* (B) e *Isospora belli* (C) recém-eliminados nas fezes. Esfregaços corados com Kinyoun. Observe as diferenças de intensidade de coloração entre oocistos no mesmo campo microscópico (setas). (Fotografias cedidas por Marcelo Urbano Ferreira.)

antígenos nas fezes. A detecção de *Cryptosporidium 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.

► Prevenção e controle da criptosporidiose

C. 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 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 de difícil execução. As taxas de prevalência vão desde 0,1 a 2% em países desenvolvidos até 0,5 a 10% em regiões menos desenvolvidas. O pico de incidência em crianças ocorre entre 1 e 5 anos de idade. Uma pesquisa realizada no Brasil, em Fortaleza, mostra que quase todas as crianças têm anticorpos contra *C. parvum* quando completam 2 anos de idade, indicando a ocorrência de exposição prévia ao parasito. Aparentemente não existe rela-

ção entre sexo e predisposição à infecção. Nos portadores de AIDS, a prevalência média é de 3 a 4% nos EUA, chegando a 50% naqueles hospitalizados (Griffiths, 1998). Outros grupos de risco são indivíduos que vivem em instituições como orfanatos, viajantes para regiões endêmicas e 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, infecções por *C. hominis* são mais frequentes (Xiao, 2010). Surto epidêmicos ligados à transmissão por água têm sido registrados, o mais citado deles é o que ocorreu em Milwaukee, EUA, em 1993, afetando 400.000 pessoas, com cerca de 100 mortes. Depois deste, 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; resistem ao cloro; 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.

► *Cyclospora cayetanensis* e ciclosporíase

Entre 1986 e 1993, mais de 200 casos de diarreia em imunocompetentes e imunodeprimidos foram descritos, atribuindo-se a etiologia a “um *Cryptosporidium grande*” (Soave, 1996). Após um período de confusão entre esse organismo, cianobactérias, fungos e *Blastocystis*, Ortega *et al.*, em 1991 e 1992, conseguiram a esporulação, visibilização de esporozoítos dentro de esporocistos e excistamento dos oocistos em laboratório, estabelecendo-se então a classificação deste organismo como coccídeo, do gênero *Cyclospora*. A denominação de uma nova espécie, *Cyclospora cayetanensis*, foi proposta em publicações de 1993 e 1994, derivada da instituição onde o organismo foi inicialmente estudado – a Universidad Peruana Cayetano Heredia. Estudos com microscopia eletrônica e análises filogenéticas moleculares confirmaram a classificação deste organismo (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 a *Cryptosporidium*, não é um novo patógeno, apenas foi reconhecido recentemente (Soave, 1996; Herwaldt, 2000).

► Aspectos biológicos

Cyclospora cayetanensis é um protozoário pertencente ao supergrupo Chromalveolata (Alveolata – Apicomplexa – Coccidia). É intracelular obrigatório, com formação de vacúolo

parasitóforo dentro do citoplasma. Seu *habitat* 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. Estes oocistos necessitam de 7 a 15 dias para esporular no ambiente, sob condições ideais de temperatura (23 a 27°C). Quando atingem um hospedeiro suscetível, os oocistos 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 proposto de *C. cayetanensis* está esquematizado na Figura 7.4. Até o momento não foram encontrados outros hospedeiros de *Cyclospora*. Será necessário o desenvolvimento de modelos animais e de estudos *in vitro* para o esclarecimento de vários aspectos ligados à biologia desta espécie.

Os oocistos são esféricos e medem de 8 a 10 μm , contendo dois esporocistos com 2 esporozoítos cada um, quando esporulado (Figura 7.2). As vias de transmissão ainda não estão totalmente esclarecidas, embora a via orofecal, diretamente ou através da água e alimentos, deva ser a mais importante. Contaminação direta animal a humano e de pessoa a pessoa não tem sido comprovada. Reservatórios da infecção não foram identificados, afastando, até o momento, a transmissão zoonótica (Ortega & Sanchez, 2010).

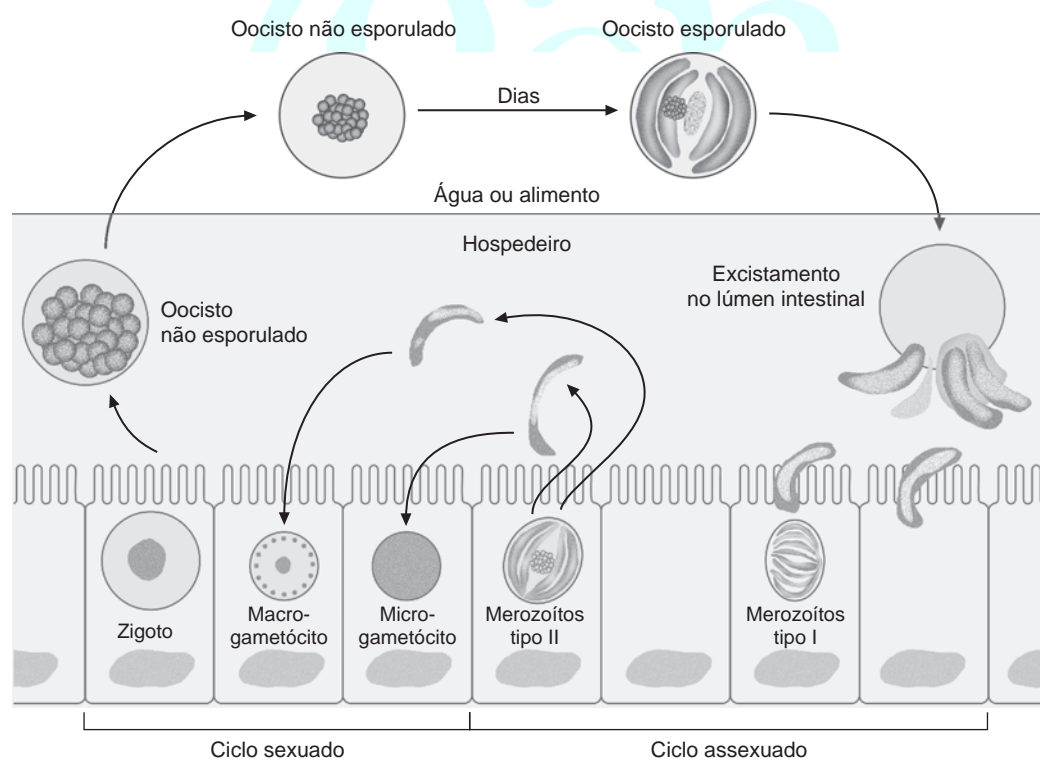


Figura 7.4 Ciclo vital de *Cyclospora cayetanensis*.

► Fatores de virulência

Os mecanismos pelos quais *Cyclospora* causa diarreia ainda são desconhecidos. Estudos histopatológicos detectam atrofia de vilosidades, hiperplasia de criptas e moderada inflamação aguda da lâmina própria. Estas alterações poderiam reduzir a área de absorção e, assim, causar diarreia. Relatos de diminuição de absorção de xilose em pacientes com infecção por *C. cayetanensis* reforçam esta 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).

► Aspectos clínicos e patológicos

Embora se afirme que a diarreia na infecção por *C. cayetanensis* seja indistinguível daquela causada por criptosporídeos e *Isoospora belli*, 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 associados, incluindo fadiga profunda, indigestão, sensação de queimação no 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 trimetoprima-sulfametoxazol. Tem-se proposto o uso de nitazoxanida, por 7 dias, nos pacientes com intolerância às sulfas (Ortega *et al.*, 1998; Ortega & Sanchez, 2010).

► Diagnóstico laboratorial da ciclosporíase

O diagnóstico laboratorial é feito pelo encontro de oocistos nas fezes, usando-se 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/parvum* (Figura 7.3). Outras técnicas de coloração como Giemsa, tricrômico e Gram-chromothrope não coram oocistos de *Cyclospora*. Os oocistos de *Cryptosporidium hominis/parvum* (tamanho de 2 a 4 μm) e *Cyclospora cayetanensis* (tamanho de 8 a 10 μm) têm morfologia interna distinta (Figuras 7.2 e 7.3), mas a medida dos oocistos para a diferenciação é fundamental. Os oocistos de *Cyclospora* são autofluorescentes e podem ser visualizados com microscópio de 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).

► Prevenção e controle da ciclosporíase

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 no ambiente. Há áreas endêmicas da ciclosporíase 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), a Europa Oriental, a Índia, a África do Sul e o Sudeste Asiático. Atinge pessoas de todas as idades. Existe uma marcada sazonalidade na infecção, coincidindo 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 este fato poderia estar ligada a fatores ambientais como temperatura e umidade, contribuindo para a esporulação e sobrevivência dos oocistos. As taxas de prevalência são subestimadas pela falta de diagnóstico. A maioria das infecções é relatada em pacientes que viajaram para regiões endêmicas. Surto epidêmico são observados na América do Norte, desde 1995. Em 1996, 1400 pessoas foram afetadas em 20 estados dos EUA e duas províncias canadenses (Connor *et al.*, 1999). Os oocistos são altamente resistentes a desinfetantes comumente usados na indústria alimentícia e ao cloro, mas são mais facilmente removidos por filtração convencional do que os de *Cryptosporidium hominis/C. parvum*.

As medidas de prevenção são semelhantes àquelas que se aplicam a *Cryptosporidium hominis/C. parvum* e incluem saneamento básico, tratamento e filtração da água, cuidados na ingestão de alimentos crus e educação sanitária, além de orientação de viajantes para zonas endêmicas (Ortega & Sanchez, 2010).

► *Isoospora belli* e isosporíase

Todas as espécies de *Isoospora* 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 *Isoospora natalensis* (casos registrados na África do Sul na década de 1950), considera-se *Isoospora 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 do gênero *Isoospora* são filogeneticamente mais próximos de *Toxoplasma* e *Neospora*, heteroxenos, do que de *Eimeria*. Seu ciclo vital compreende duas fases, uma assexuada e uma sexuada, como os outros coccídeos estudados neste capítulo. Na fase assexuada ocorre a esquizogonia e na fase sexuada ocorrem a gametogonia e a esporogonia (Figura 7.5). O produto final, forma infectante, é um oocisto ovalado que mede de 20 a 33 μm \times 10 a 19 μm de diâmetro, em média 25 μm . Estes oocistos são eliminados

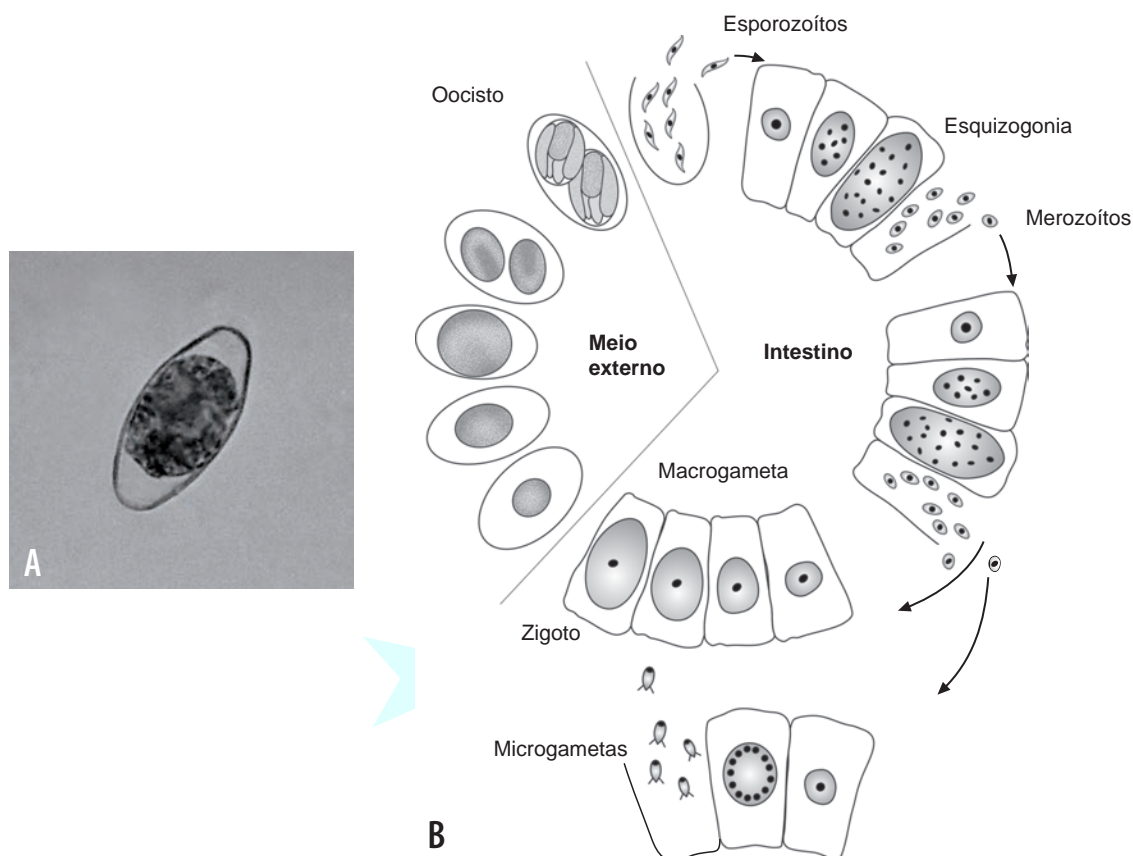


Figura 7.5 Ciclo vital de *Isospora belli*. **A.** Oocisto não esporulado, recém-eliminado nas fezes. **B.** Ciclo vital de *Isospora belli*. (Fotografia cedida por Cláudio Santos Ferreira.)

não esporulados, necessitando de algum tempo (24 a 48 h) no meio exterior para se tornarem infectantes. Contêm dois esporocistos, cada um com 4 esporozoítos (Figura 7.2). 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

Isospora belli produz citólise epitelial. Embora tenha sido sugerida a ação de uma toxina para explicar a patogenia do quadro digestivo, tal suposição não foi confirmada (Neira *et al.*, 2010). Como os conhecimentos sobre os mecanismos de imunidade contra este patógeno são limitados, evidentemente são necessárias mais pesquisas nesta área (Stark *et al.*, 2009). Histologicamente, encontram-se atrofia de vilosidades, hiperplasia de criptas, células inflamatórias, principalmente eosinófilos. Vários relatos descrevem má absorção. Alterações do sistema imunitário que levam à doença prolongada não estão esclarecidas.

► Aspectos clínicos

O quadro clínico da isosporíase pode desenvolver-se vários meses ou anos após a exposição ao agente causal. A infecção por este coccídeo pode ser oligo ou assintomática, com quadro diarreico de início brusco, com dores abdominais, náuseas, febre e mal estar geral, com 8 a 10 evacuações líquidas por dia e perda de peso importante (5 kg ou mais). Pode haver

leucocitose e eosinofilia moderada ou alta, sendo esta a única coccidiose 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 restrito ao intestino, existem relatos de disseminação para outros órgãos em indivíduos portadores de AIDS (Curry & Smith, 1998). A infecção por *I. belli* responde bem à terapia com cotrimoxazol, sulfadiazina e pirimetamina.

► Diagnóstico laboratorial da isosporíase

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 cayetanensis*: Ziehl-Neelsen modificada, Kinyoun, safranina-azul de metileno, auramina e similares (Figura 7.3). 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, podendo ser visualizadas por microscopia óptica e eletrônica. O diagnóstico de infecção por PCR pode basear-se tanto na técnica convencio-

nal como em PCR de tempo real, que chega a 100% de especificidade e sensibilidade (Stark *et al.*, 2009).

► Prevenção e controle da isosporíase

Isoospora belli tem distribuição mundial, embora a maioria dos casos seja encontrada nos trópicos, sendo endêmica em muitas regiões da África, sudoeste asiático e América do Sul. As infecções entéricas por *I. belli* eram relativamente raras até o advento das síndromes de imunodeficiência. As taxas de prevalência variam, chegando até a 15% de infectados (DeHovitz *et al.*, 1986). A prevalência em pacientes de El Salvador, México e outros países latinos é 7,4, 5,4 e 2,9%, respectivamente. Até 1935 havia registro de 200 casos humanos de infecção por *Isoospora 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 taxas 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.

Fontes animais para a infecção humana não foram identificadas, o ciclo é pois antroponótico. A prevenção da isosporíase 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 cotrimoxazol 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.

► Amebas de vida livre potencialmente patogênicas

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários amplamente dispersos na natureza, mas seu envolvimento em patologia humana só foi reconhecido a partir de 1965, quando casos fatais de meningoencefalite foram descritos na Austrália. Com esses relatos, *Entamoeba histolytica* deixa de ser reconhecida como a única espécie de ameba patogênica para o homem. Como estes protozoários podem ser encontrados tanto no ambiente quanto nos hospedeiros humanos, são também chamados de anfizoicos.

Desde então, vêm-se acumulando novos conhecimentos sobre este grupo de protozoários, antes de interesse apenas zoológico. Sabe-se atualmente que várias espécies podem ser encontradas no homem, algumas na dependência de estados de imunocomprometimento do hospedeiro, outras em consequência de traumas ou em situações ainda não esclarecidas, acometendo indivíduos imunocompetentes. A associação homem-AVL é um campo aberto para pesquisa.

Como a maioria dos médicos desconhece as infecções por AVL e a notificação não é obrigatória, difícil se torna saber a verdadeira incidência das infecções do sistema nervoso central (SNC) causadas por estes microrganismos. Cerca de 500 casos

já foram relatados; estima-se que 200 sejam por *Naegleria fowleri*, 200 atribuídos a espécies de *Acanthamoeba* e mais de 100 a *Balamuthia mandrillaris* (Schuster & Visvesvara, 2004). No Brasil, existem relatos de casos de infecções por AVL em São Paulo, Rio de Janeiro e Ceará. A partir de 1974, com a primeira comunicação do achado de *Acanthamoeba* sp. no olho, causando graves lesões de córnea, o interesse em sua pesquisa tem sido crescente. Observou-se a associação deste tipo de infecção com o uso de lentes de contato. Atualmente, acredita-se que os casos de ceratite estejam em torno de 3.000, embora este número possa estar subestimado. Em São Paulo, a experiência no isolamento, no diagnóstico e no atendimento aos casos de ceratite por *Acanthamoeba* acumula-se há mais de 20 anos (Carvalho *et al.*, 2009).

Estudos sobre *Acanthamoeba* spp. têm recebido maior atenção porque estas espécies, além de causar doenças por si mesmas, como as ceratites, podem albergar outros microrganismos patogênicos, como *Legionella* spp., *Francisella tularensis*, *Mycobacterium avium*, *Burkholderia* spp., *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Afipia felis*, *Escherichia coli* e mimivírus. O crescimento intracelular de bactérias em AVL pode aumentar-lhes a virulência e a resistência a antibióticos e biocidas (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Schuster & Visvesvara, 2004). Recentemente, sob condições experimentais, foi estudada a interação de trofozoítos de *Acanthamoeba* e oocistos de *Cryptosporidium*, demonstrando o potencial papel destas amebas na transmissão dos coccídeos (Gómez-Couso *et al.*, 2007).

► Aspectos biológicos

As espécies de AVL potencialmente patogênicas para a espécie humana, tema deste capítulo, são classificadas em dois supergrupos: Excavata e Amoebozoa. Em Excavata encontra-se *Naegleria fowleri* (Vahlkampfiidae); em Amoebozoa, *Acanthamoeba* (*A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. royreba*, *A. astronyxis*, *A. hatchetti*, *A. rhyssodes*, *A. palestinensis*) e *Balamuthia mandrillaris* (Acanthamoebidae), além de *Sappinia pedata* (Thecamoebidae). Informações sobre as infecções por AVL estão resumidas na Tabela 7.2.

Os protozoários do gênero *Naegleria* apresentam três tipos de formas evolutivas durante o ciclo vital: (a) trofozoítos, com movimentação rápida, através de pseudópodes, tipo lobópodes, que medem de 8 a 15 μm e têm apenas um núcleo; (b) cistos, formas de resistência a ambientes adversos, que medem de 7 a 12 μm e têm paredes lisas e poros; (c) flagelados, com dois flagelos, de aparecimento fugaz (Figura 7.6). Em algumas horas, ocorre reversão das formas flageladas para trofozoítos. *Naegleria fowleri* é a única espécie deste gênero com patogenicidade comprovada em humanos.

As espécies do gênero *Acanthamoeba* apresentam dois tipos de formas no ciclo vital: (a) trofozoítos, que medem de 15 a 40 μm , com movimentação lenta por subpseudópodes típicos, denominados acantopódios, expansões semelhantes a espinhos; e (b) cistos, que medem de 15 a 20 μm , formas de resistência, com paredes duplas, uma delas rugosa, dando-lhe aspecto de estrela (Figura 7.6).

Balamuthia mandrillaris tem duas formas no ciclo vital, trofozoítos e cistos. Os trofozoítos têm dimensões entre 50 e 60 μm , em geral são uninucleados, podendo, ocasionalmente, apresentar formas com dois núcleos. Durante a locomoção apresentam pseudópodes largos e dendríformes (Visvesvara *et al.*, 1993). Os cistos podem ser uni ou binucleados, medem

Tabela 7.2 Amebas de vida livre (AVL) potencialmente patogênicas: principais características clínicas e biológicas.

	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.	<i>Balamuthia mandrillaris</i>
<i>Doenças causadas</i>	Meningoencefalite amebiana primária (MAP)	Encefalite amebiana granulomatosa (EAG) Ceratites (CA)	Encefalite amebiana por <i>Balamuthia</i> (EAB) Lesões de pele e mucosas
<i>Posição taxonômica</i>	Supergrupo Excavata (Vahlkampfiidae)	Supergrupo Amoebozoa (Acanthamoebidae)	Supergrupo Amoebozoa (Acanthamoebidae)
<i>Epidemiologia</i>	Amplamente dispersa no ambiente, principalmente piscinas aquecidas. Acomete jovens imunocompetentes. Casos ligados a banhos em coleções de água.	Amplamente dispersas no ambiente, água, solo úmido e ar. São as mais frequentes dentre todas as espécies de AVL. EAG: imunodeprimidos CA: usuários de lentes de contato	Amplamente dispersas no ambiente. EAB e lesões de pele: imunocompetentes
<i>Quadro clínico</i>	Via de entrada: epitélio neuro-olfatório. Início súbito. Doença aguda, com evolução rápida para coma e morte em 4 a 6 dias. Patologia: leptomeningite aguda necrosante.	EAG: via de entrada: pele, pulmões e epitélio neuro-olfatório. Início insidioso. Sinais e sintomas dependem da localização das lesões. Evolução crônica, coma e morte em torno de 30 dias. Patologia: Encefalite granulomatosa. CA: lesão de córnea, úlcera, dor desproporcional à lesão, evolução lenta. Casos graves podem evoluir para perfuração da córnea.	EAB: semelhante ao de EAG por <i>Acanthamoeba</i> spp. Lesões de pele extensas podendo haver comprometimento de SNC e evolução para coma e morte. Nos últimos casos descritos, com diagnóstico precoce, houve boa evolução clínica.
<i>Diagnóstico</i>	Quadro clínico e achados líquóricos semelhantes ao de meningite bacteriana. Achado de amebas no LCR (direto e cultura). Técnicas imuno-histoquímicas. Dados epidemiológicos de contato com água.	EAG: em geral só feito <i>post mortem</i> . Sorologia. CA: achado de amebas no raspado da lesão de córnea (exame direto e cultura). Diferencial com ceratites fúngicas e herpéticas.	EAB: em geral só feito <i>post mortem</i> . Sorologia (CDC). Lesões de pele: achado de amebas no raspado (exame direto e cultura). Sorologia. Diferencial com leishmanioses tegumentares.
<i>Tratamento</i>	Anfotericina B associada a miconazol.	EAG: pentamidina, fluconazol, flucitosina, itraconazol, miconazol, sulfadiazina. CA: casos de evolução recente, sucesso com uso tópico de isotionato de propamidina (Brolene®), biguanida. Casos de evolução prolongada: transplante de córnea.	EAB: pentamidina, fluconazol, flucitosina, itraconazol, miconazol, sulfadiazina. Lesões de pele: pentamidina, cetoconazol creme, clorexidina.
<i>Nº estimado de casos</i>	Cerca de 200	EAG: cerca de 200 CA: > 3.000	EAB: > 100

Observações: *Sappinia pedata* (supergrupo Amoebozoa – Thecamoebidae) não foi incluída nesta tabela porque há apenas um relato de infecção humana e os dados disponíveis são insuficientes.

de 12 a 30 μm e a parede apresenta três camadas, detectadas à microscopia eletrônica.

Mais recentemente, uma nova espécie foi implicada na patologia humana: *Sappinia pedata*. Apresenta também dois tipos de formas evolutivas, trofozoítos e cistos, com dois núcleos em ambas as formas. Acreditava-se que a espécie patogênica deste gênero fosse *S. diploidea*, mas com o auxílio de técnicas moleculares chegou-se à caracterização de *Sappinia pedata* (da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

O ciclo vital de todas as espécies de AVL compreende divisão binária simples nas formas trofozoíticas, vida latente nas císticas e em *Naegleria* spp., uma fase flagelar, transitória. O metabolismo é aeróbico. A transmissão pode ser pela água, solo ou ar, em função da grande dispersão ambiental destes protozoários (Figura 7.6).

► Patologia e imunidade

A resposta imune na meningoencefalite amebiana primária (MAP) por *Naegleria fowleri* é pouco conhecida, pois o curso da infecção é extremamente rápido. Entretanto, com os dados de casos de sobrevivência, sabe-se que imunoglobulinas da classe IgM foram detectadas após o sétimo dia do início dos sintomas. Indivíduos em exposição prolongada a lagos de água doce mostraram IgM para *Naegleria fowleri*, não se sabe, porém, se estes antígenos são protetores. O primeiro caso diagnosticado de MAP foi feito por imunoperoxidase em tecido cerebral conservado desde 1909.

Como as espécies de *Acanthamoeba* são muito disseminadas na natureza, anticorpos contra elas foram detectados tanto em seres humanos infectados, como em indivíduos sadios. Embora a resposta de anticorpos seja expressiva, não se sabe se é protetora. Os estudos *in vitro* mostraram que estas espécies induzem ativação da via alternativa do complemento. Os pacientes com ceratite por *Acanthamoeba* têm níveis reduzidos de IgA secretora, indicando possível suscetibilidade. Embora imunoglobulinas desta classe não afetem a viabilidade dos protozoários, os mecanismos de proteção podem estar ligados à inibição de adesão dos trofozoítos às células epiteliais da córnea. Supõe-se que outros mecanismos de imunidade adaptativa possam estar envolvidos na resistência à ceratite por *Acanthamoeba*, mas a recorrência da infecção indica que a memória imunológica não se estabelece (Clarke, Niederkorn, 2006).

Na ceratite por *Acanthamoeba* a imunidade inata é a mais efetiva, sendo que os macrófagos têm papel importante. Acredita-se que constituam a primeira linha de defesa, matando diretamente os trofozoítos na superfície ocular por fagocitose. Os neutrófilos constituem uma linha de defesa complementar, prevenindo a evolução da ceratite para uma infecção intraocular (Clarke & Niederkorn, 2006).

Nas infecções por *Balamuthia mandrillaris*, detectam-se imunoglobulinas das classes IgM e IgG tanto em indivíduos sadios quanto nos acometidos por balamuthiase. O papel protetor destes anticorpos não foi esclarecido. Detectaram-se também anticorpos contra esta espécie em uma grande variedade de animais, como gorilas, babuínos, cavalos, ovelhas e

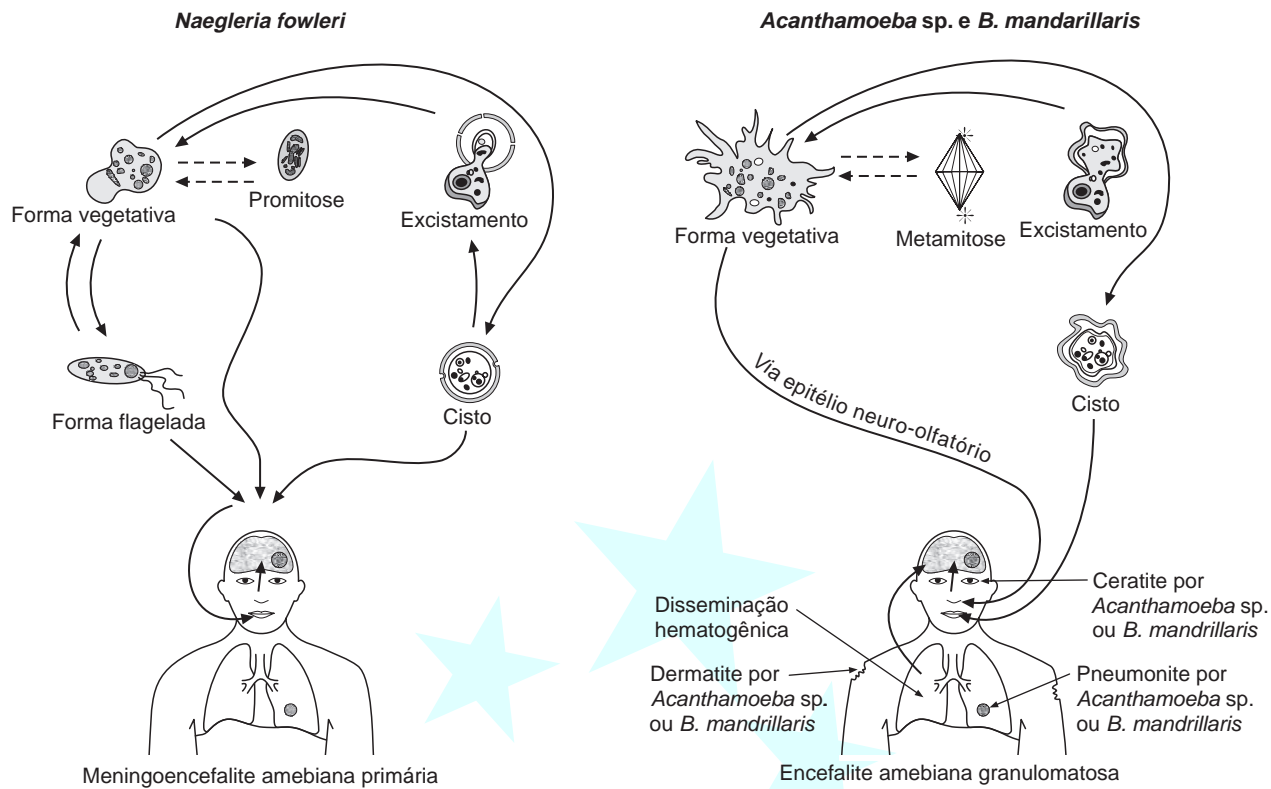


Figura 7.6 Ciclo vital das principais amebas de vida livre que infectam o homem.

cães. Como existe somente um caso de encefalite humana por *Sappinia pedata* descrito até o momento, os dados imunológicos e patológicos são inconclusivos.

► Patogenicidade e fatores de virulência

A associação homem-AVL não constitui ainda uma verdadeira relação entre parasito e hospedeiro. As amebas têm o ambiente externo como seu *habitat* natural e só algumas espécies eventualmente atingem o homem, apresentando reversibilidade de vida e não dependendo de hospedeiro para sua transmissão. Pode-se estar diante de um complexo de protozoários em transição para a vida parasitária. Desde que a primeira comunicação de MAP por AVL foi feita, relatos de novas espécies implicadas na etiologia de infecções humanas corroboram esta afirmativa (Foronda, 2009). Há cinco componentes de considerável importância na determinação da infecção por AVL: temperatura, capacidade de persistir nas mucosas, imunidade de mucosas, imunodeficiência e dose infectante (Ferrante, 1991).

As amebas do gênero *Naegleria* penetram a mucosa nasal, por aspiração de poeira ou água contaminada com trofozoítos ou cistos, onde são fagocitadas pelas células de sustentação do epitélio neuro-olfatório. Chegam depois ao bulbo e lobo olfatórios e daí a todo o encéfalo. A porta de entrada para o SNC nos indivíduos acometidos por *Acanthamoeba* spp. não está completamente esclarecida. Pode ser o epitélio neuro-olfatório, como em *Naegleria fowleri*, mas a pele e os pulmões poderiam apresentar lesões iniciais que, por via hematogênica, disseminariam os protozoários para o SNC (Martinez & Visvesvara, 1997).

Admite-se atualmente que a entrada e a colonização de *Acanthamoeba* spp. na córnea só são possíveis se houver traumatismo preexistente.

Interessante paralelo pode ser feito entre a cascata patogênica da ceratite por *Acanthamoeba* e a da colite amebiana por *Entamoeba histolytica*, pois ambas têm início com a adesão dos trofozoítos a glicoproteínas do hospedeiro. A diferença está apenas no açúcar, em que na ceratite é manose e na colite é galactose. A adesão nas ceratites é promovida por meio de uma proteína da superfície do trofozoíto com afinidade para manose, 136 kDa. Na sequência, tanto *Acanthamoeba* spp. como *Entamoeba histolytica* secretam diversas proteases que destroem as células epiteliais. Na ceratite, após a adesão e destruição do epitélio corneano, segue-se a invasão e a degradação do estroma. Os trofozoítos de *Acanthamoeba* muitas vezes se aglomeram ao redor dos nervos corneanos, produzindo neurites radiais. A cascata patogênica parece parar antes da destruição do endotélio (Clarke & Niederkorn, 2006). As espécies patogênicas de *Acanthamoeba* excretam mais fosfolipases do que as não patogênicas, bem como mostram mais atividade de proteases. Algumas cepas de *Acanthamoeba* produzem serina e cisteína-proteases, metaloproteases e ativadores de plasminogênio e também mostram resposta quimiotática a extratos endoteliais de córnea (Schuster & Visvesvara, 2004; Visvesvara *et al.*, 2007). Recentemente, a partir de isolados de casos de ceratite, no Brasil, foram feitas correlações entre o quadro clínico e o padrão de enzimas proteolíticas secretadas extracelularmente pelos trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.. A maior gravidade clínica observada nos pacientes foi relacionada com o predomínio de enzimas da classe das serina-proteases, de baixo peso molecular. Consequentemente, estes perfis enzimáticos podem caracterizar a virulência dos protozoários, tornando-se potenciais marcadores de patogenicidade (de Souza Carvalho *et al.*, 2011).

Pouco se sabe sobre mecanismos patogênicos de *Balamuthia mandrillaris*; acredita-se que sejam semelhantes aos de *Acanthamoeba*.

► Aspectos clínicos

Meningoencefalite amebiana primária (MAP) por *Naegleria fowleri*

A infecção tem, quase sempre, início abrupto, desenvolvimento agudo e término fatal. Depois de um período de incubação curto, de 3 a 7 dias, a doença se manifesta bruscamente por cefaleia bitemporal ou bifrontal, febre, náuseas, vômitos (em geral em jato) e rigidez de nuca. Segue-se rápida progressão do quadro clínico, até convulsões e coma. A morte se dá por comprometimento cardiorrespiratório como consequência de grave edema cerebral.

Encefalite amebiana granulomatosa (EAG) por *Acanthamoeba* e *Balamuthia mandrillaris*

Encefalite amebiana granulomatosa (EAG) por *Acanthamoeba* (*A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga* e *A. astronyxis*) e *Balamuthia mandrillaris* é uma infecção que incide geralmente em pacientes imunodeprimidos, tendo período de incubação desconhecido; várias semanas ou meses são necessários para o aparecimento da doença e a evolução clínica pode ser prolongada. Por ser doença não disseminada, as manifestações clínicas dependem da localização das lesões, como hemiparesias, convulsões e alterações de personalidade. A cefaleia é insidiosa e ocorre precocemente em alguns casos. A febre é esporádica e quase sempre baixa. Em geral, a morte é decorrente de broncopneumonia, insuficiência hepática ou renal, associadas ou em combinação com septicemia. As infecções do SNC por *Balamuthia mandrillaris*, além de incidirem em imunodeprimidos, têm sido descritas com frequência em indivíduos saudáveis. Há ainda descrição de quadro clínico com extensas lesões de pele, assemelhando-se a leishmanioses tegumentares (Recaverren-Arce *et al.*, 1999).

Ceratite por *Acanthamoeba* (CA)

O traumatismo é considerado pré-condição para que as amebas invadam a córnea, se for grave o bastante para causar abrasão; a ceratite por *Acanthamoeba* (*A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. rhyodes*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. astronyxis*, *A. quina*, *A. lugdunensis* e outras espécies que, embora isoladas de córnea, ainda não foram caracterizadas) tem desenvolvimento rápido, com ulceração da córnea, irite, muitas vezes esclerite, dor intensa, hipópio e acentuada perda de visão. Em alguns pacientes, a sucessão de períodos de remissão e recrudescência pode aparentar cura completa; acredita-se serem tais casos devidos a ciclos de encistamento e desencistamento das amebas. O quadro clínico caracteriza-se por infiltrados epiteliais que podem coalescer, formando anéis, centrais ou paracentrais, e dor de intensidade desproporcional à lesão (Freitas *et al.*, 2001).

► Diagnóstico laboratorial das infecções por amebas de vida livre

Mediante *exame direto*, pesquisam-se AVL em amostras clínicas (liquor, secreções faríngeas e pulmonares, lesões de pele, raspados de córnea e fragmentos de tecidos, como cérebro e pulmão, obtidos de biópsia ou necropsia) e em amostras ambientais (coleções de água, de solo ou de ar condicionado).

As *colorações* comumente usadas para o diagnóstico de amebas intestinais, como hematoxilina férrica, não diferenciam os trofozoítos de AVL, nem os cistos de *Naegleria*; se for

obtida a visualização dos cistos de *Acanthamoeba*, o diagnóstico é possível por causa de sua morfologia peculiar. Dentre as colorações utilizadas, para preparações diretas, estão hematoxilina férrica de Heidenhain, Wright e Giemsa. A coloração de Gram não é útil para o diagnóstico de amebas, pois não salienta as estruturas nucleares. A técnica de *Calcofluor white* surgiu recentemente, mas só cora os cistos, não acrescentando muito à metodologia usual. A coloração por laranja de acridina pode ser recomendada para um rápido diagnóstico histológico.

O *exame a fresco*, com a observação do material vivo e as amebas em locomoção, é o que oferece melhores condições de caracterização de AVL, usando-se microscopia de contraste de fase e/ou de contraste de interferência. Os padrões morfológicos adotados permitem a identificação até gênero, não sendo possível caracterização específica (Page, 1988; Pussard & Pons, 1977).

O *isolamento e cultivo de AVL* é ainda a metodologia considerada padrão-ouro no diagnóstico parasitológico. Cultivam-se as AVL semeando-se a amostra em placas de Petri contendo meios de cultura especiais para isolamento. Podem ser usados ágar não nutriente semeado com bactérias vivas ou mortas (*Escherichia coli* ou *Enterobacter aerogenes*) ou o meio de cultura de Foronda (1979) (Carvalho *et al.*, 2007). Se o material for muito abundante, recomenda-se filtração em membranas de 1,2 µm de porosidade, semeando-se as membranas diretamente nas placas de Petri com meio de cultura. As placas devem ser examinadas diariamente. Dependendo do inóculo, é possível conseguir crescimento em até 24 h após a semeadura. A precocidade do diagnóstico é fundamental nas infecções por AVL, diante das deficiências terapêuticas.

Para a caracterização de *Naegleria* pode-se fazer o *teste de flagelação*, auxiliar na identificação. Este teste consiste em se fazer uma preparação a fresco, em gota pendente, incubar-se a 37°C por cerca de 2 h, inverter a lâmina e observar eventuais formas flageladas. Embora haja informação de aparecimento de flagelados em outras espécies, este teste é bastante útil quando se trata de diagnóstico em meningoencefalite, pois dentre as AVL (pelos conhecimentos disponíveis) só *Naegleria fowleri* causa este tipo de infecção. Em ceratites, o material obtido de raspados de córnea é semeado e cultivado, podendo-se tentar também o isolamento de amebas a partir de lentes de contato e/ou materiais utilizados na desinfecção. Culturas positivas das lentes e/ou dos materiais não fecham o diagnóstico, apenas sugerem a fonte primária de infecção por *Acanthamoeba* (Foronda, 2009).

Após o isolamento, cultivos axênicos e clonagem de cepa devem ser feitos se houver interesse em caracterização específica ou para utilização de técnicas moleculares. Os meios usados são PYG e Neff modificado (Page, 1988; Band, 1959).

Não se consegue cultivar *Balamuthia mandrillaris* em placas com ágar e bactérias, a fonte alimentar desta espécie na natureza não está bem esclarecida. Este agente pode alimentar-se, *in vitro*, de outras AVL (*Acanthamoeba* e *Naegleria*). Cultivos de células são usados para seu isolamento. Embora infecções acidentais em laboratório não tenham sido relatadas, precauções são necessárias ao trabalhar-se com agentes reconhecidamente patogênicos.

As características antigênicas de amebas pertencentes aos gêneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* e *Hartmannella* têm sido intensamente estudadas. Com técnicas de imunoeletroforese, foi possível caracterizar espécies de *Naegleria*, mostrando pouca ou nenhuma reação cruzada com *Entamoeba* e *Acanthamoeba*. O soro humano contém anticorpos, das clas-

ses IgM e IgG, contra espécies de *Naegleria* e *Acanthamoeba*, patogênicas ou não. Verificou-se que 50 a 100% da população humana têm anticorpos contra espécies de *Acanthamoeba*. Os anticorpos contra *B. mandrillaris* não reagem cruzadamente com antígenos de outras espécies de amebas.

Análises de isoenzimas mostram que todas as cepas de *N. fowleri*, a despeito da origem geográfica, são basicamente homogêneas com base em zimodemas. As espécies de *Acanthamoeba*, não distinguíveis por critérios morfológicos, podem ser caracterizadas por análise de isoenzimas, até com descrição de novas espécies (Moura *et al.*, 1992). Apesar dos resultados não serem conclusivos, a utilização de técnicas de biologia molecular pode trazer novas perspectivas para a identificação de AVL (Alves *et al.*, 2000). A técnica de PCR utilizando a sequência da subunidade 18S do rDNA, permitiu o estabelecimento de 17 genótipos (T1-T17) e o agrupamento de cepas patogênicas e não patogênicas de *Acanthamoeba*. A maioria das cepas patogênicas tem genótipos T3 e T4. Atualmente há descrição de isolados de olho que seriam colocados em outros genótipos, como T5, T6 e T11 (Gast, 2001; Khan, Jarroll, Paget, 2002; Khan, 2006). Como a precocidade na detecção do agente etiológico a partir do sítio infeccioso pode estar diretamente relacionada com o sucesso da terapêutica, o diagnóstico molecular tem sido proposto como importante ferramenta complementar ao diagnóstico por cultivo na rotina laboratorial.

Apesar dos conhecimentos atuais, os *testes sorológicos* para o diagnóstico de infecções por AVL não estão padronizados, nem se mostram úteis, pelo menos até o momento. Nas infecções por *N. fowleri*, os pacientes geralmente morrem antes de produzir anticorpos; nas infecções por *Acanthamoeba* spp., dificilmente se suspeita da etiologia antes da morte. O diagnóstico específico de *Balamuthia mandrillaris* tem sido feito por sorologia no Center for Disease Control and Prevention (CDC) em Atlanta, EUA.

O exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) é o primeiro a ser feito, mas os achados não são patognomônicos; as alterações do aspecto do LCR (turvo ou opalescente), de celularidade (pleocitose com predomínio de polimorfonucleares) e bioquímicas (hiperproteinorraquia e hipoglicorraquia) são semelhantes às da meningite bacteriana. Só o encontro de trofozoítos de AVL permite firmar o diagnóstico.

Diagnóstico anatomopatológico e com técnicas de imagem

Nos casos de MAP, o exame de tecido cerebral, corado por hematoxilina-eosina (HE), mostra leptomeningite purulenta, meningoencefalite hemorrágica necrosante, edema cerebral, necrose de nervos e bulbos olfatórios. O exsudato é composto principalmente de polimorfonucleares, poucos eosinófilos e linfócitos. As amebas se encontram na forma trofozoítica, geralmente nos espaços perivascularares, em aglomerados, com pouca ou nenhuma reação inflamatória. A coloração por imunofluorescência indireta e imunoperoxidase facilita o reconhecimento dos protozoários nos tecidos.

Na EAG, há geralmente encefalite granulomatosa com necrose focal e leptomeningite localizada. O exsudato é composto, em geral, por linfócitos e monócitos, raros polimorfonucleares. As amebas se encontram nas formas trofozoítica e cística, tanto em *Acanthamoeba* quanto em *Balamuthia mandrillaris*, também nos espaços perivascularares e geralmente invadem a parede dos vasos (Martinez & Visvesvara, 1997). É interessante assinalar que os cistos de *Acanthamoeba* sp. e de *Balamuthia mandrillaris* podem mostrar semelhanças.

No quadro histopatológico de ceratites por *Acanthamoeba*, há destruição da córnea, com infiltrado inflamatório nas camadas superficiais e medianas do estroma corneano. A principal resposta inflamatória do hospedeiro consiste na existência de polimorfonucleares ao redor da parede cística das amebas. É bom enfatizar que amebas do gênero *Acanthamoeba* têm a capacidade de formar cistos nos tecidos. O exame em botão corneano permite a visualização, no estroma, de trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* spp., pela coloração de rotina, HE, embora a coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS) seja considerada melhor.

Em EAG, pode-se utilizar tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética para o diagnóstico; os achados, entretanto, não são específicos, observando-se apenas um processo expansivo. Na ceratite, o microscópio confocal permite a visualização de imagens de alto contraste de cortes corneanos contendo trofozoítos ou cistos de *Acanthamoeba*.

▶ Tratamento das infecções por amebas de vida livre

Meningoencefalite amebiana primária (MAP)

Anfotericina B, rifampicina, tetraciclina e miconazol têm ação *in vitro* sobre *Naegleria fowleri*. Em MAP, provavelmente não é desencadeada uma resposta protetora celular ou humoral; portanto, o diagnóstico precoce é essencial para o sucesso do tratamento. O paciente deve ser tratado imediatamente com altas doses de anfotericina B IV e intratecal, em associação com miconazol. Existem relatos bem documentados de sobrevivência em apenas quatro pacientes.

Encefalite amebiana granulomatosa (EAG)

Não há tratamento efetivo para EAG (por *Acanthamoeba* e *Balamuthia mandrillaris*). A maioria dos casos tem sido diagnosticada *post mortem*, não havendo assim experiência suficiente em relação a esquemas terapêuticos. Se a lesão cerebral for única, pode ser feito tratamento cirúrgico. Infelizmente, as lesões cerebrais são múltiplas e de localização profunda.

O principal fator associado ao mau prognóstico da EAG é a situação de imunodeficiência dos pacientes, agravado pelo fato de as espécies de *Acanthamoeba* serem, entre as AVL, as mais resistentes ao tratamento. Embora sulfadiazina, pentamidina, propamidina e cetoconazol pareçam ser eficazes *in vitro*, é questionável que sejam úteis em função do estado imunitário do hospedeiro.

Um importante fator em relação à terapêutica é a capacidade de *Acanthamoeba* e de *Balamuthia mandrillaris* formarem cistos nos tecidos quando as condições são adversas, podendo dar falsa impressão de cura. É interessante lembrar que as dificuldades terapêuticas aumentam em decorrência de não se dispor de um fármaco que atue tanto em trofozoítos quanto em cistos de *Acanthamoeba* e que há crescente risco de toxicidade com o uso combinado de vários medicamentos e possibilidade de interações entre eles. Cita-se relato de tratamento bem-sucedido em infecção disseminada por *Acanthamoeba rhysodes* em indivíduo imunocomprometido, com isotionato de pentamidina intravenosa, itraconazol por via oral, e tratamento tópico das lesões de pele com cetoconazol creme e gliconato de clorexidina. Foram relatados dois casos clínicos de encefalite por *Balamuthia mandrillaris* que sobreviveram em função de tratamento inicial com flucitosina, pentamidina, fluconazol, sulfadiazina e um antibiótico macrolídeo (azitromicina ou claritromicina), sendo também usadas fenotiazinas.

Ceratite por *Acanthamoeba* (CA)

Os resultados dos esquemas terapêuticos adotados dependem da precocidade do diagnóstico, da virulência da cepa da ameba e da eventual resistência adquirida pelos protozoários. Muitos fármacos foram usados, como cetoconazol, clotrimazol, miconazol, itraconazol, neomicina, isotionato de propamidina, poli-hexametileno de biguanida, com ação sobre os trofozoítos das amebas, exceto a biguanida, que atua também sobre os cistos. São usados atualmente agentes antissépticos catiônicos (biguanida ou clorexidina) e diamidinas aromáticas (propamidina [Brolene®] e hexamidina). Como primeira escolha, poli-hexametileno de biguanida, com apresentação sob forma de colírio a 0,02%, obtida em farmácias de manipulação a partir de Baquacil® + isotionato de propamidina, ou apresentação como colírio ou pomada, a 0,1%, Brolene® (disponível apenas na Inglaterra) de hora em hora, dia e noite, nos três primeiros dias e depois de hora em hora, em vigília, diminuindo-se paulatinamente conforme a evolução. Se a evolução for favorável, mantém-se a média de quatro aplicações por dia por um período prolongado (aproximadamente 4 meses). Se este esquema não funcionar, substitui-se a biguanida por clorexidina e se também não funcionar, tenta-se começar a hexamidina (disponível apenas na França). O uso de neomicina, relacionado em alguns esquemas, foi abandonado em decorrência da alta toxicidade.

Raramente são utilizados fármacos antifúngicos, quer por via tópica, quer por via sistêmica (cetoconazol – 400 mg/dia – ou itraconazol – 200 mg/dia por via oral).

Para outros, no entanto, os fármacos sistêmicos são úteis. Para controle da dor usa-se a associação de Tryptanol® com Tilatil®. O uso de corticoide, tanto tópico como sistêmico, é controverso e é indicado somente na vigência de resposta inflamatória muito importante, pois acredita-se que seja responsável pelo excistamento das amebas, aumentando a citopogenicidade. O *transplante de córnea* é indicado nos casos resistentes ao tratamento clínico ou com necrose e perfuração extensas. Deve ser feito somente após o controle da infecção ativa. Cita-se um caso submetido à ceratoplastia por quatro vezes, sem sucesso. Em casos de infecção grave e de disseminação, a enucleação pode ser indicada (Kumar & Lloyd, 2002; Freitas *et al.*, 2001).

Há relatos de desenvolvimento de catarata e atrofia de íris após tratamento prolongado de ceratite por *Acanthamoeba* spp. Tem sido constante a busca por fármacos efetivos contra *Acanthamoeba* spp. (Schuster & Visvesvara, 2004; Sacramento *et al.*, 2009; Cariello *et al.*, 2010).

► Prevenção e controle das infecções por amebas de vida livre

As AVL estão em praticamente todos os ambientes, nas mais diversas altitudes e em todos os continentes. Podem resistir a extremas condições de temperatura e de pH, bem como ao cloro e outros sistemas de desinfecção. As fontes de infecção podem ser as mais diversas, incluindo-se coleções de água (como piscinas, lagos, açudes e rios), solo e aparelhos de ar condicionado. Na MAP deve-se indagar sobre contato de indivíduos sadios com tais fontes. Na EAG, situações de imunodepressão e doenças intercorrentes devem ser levadas em conta. Indivíduos provenientes de certas regiões podem ser jovens sadios, como em uma série de casos de infecção por *Balamuthia mandrillaris* no Peru, não associados à imu-

nodepressão. Nas ceratites, os usuários de lentes de contato constituem o principal grupo de risco, principalmente por uso, manipulação e higiene inadequados das lentes. O uso de solução salina caseira para assepsia e a utilização das lentes de contato em atividades recreacionais são alguns exemplos de potenciais fontes primárias de infecção da superfície da córnea pelo protozoário. Relatos sobre origem da infecção por traumatismos de córnea em zona rural também têm sido observados.

Dentre todas as AVL, e mesmo dentre os protozoários em geral, as mais encontradas em qualquer ambiente são *Acanthamoeba* spp., explicando talvez os inúmeros casos de infecções a elas associados. Esta ampla disseminação ambiental, características de sobrevivência e aparecimento de novas espécies como agentes etiológicos de doenças humanas justificam o esclarecimento da classe médica e a inclusão das infecções por estes protozoários no diagnóstico diferencial de meningoencefalites, encefalites, lesões de pele e ceratites.

Não se dispõe, no momento, de medidas eficazes para a profilaxia das infecções por AVL, uma vez que vários aspectos da biologia e do comportamento destes protozoários ainda são desconhecidos. A orientação, no entanto, baseia-se na adoção de medidas de ordem geral, consideradas auxiliares para a solução do problema: educação sanitária junto aos banhistas, evitando-se a poluição da água com matéria orgânica (descamação da pele, secreções nasais, uretrais, vaginais etc.); limpeza sistemática de piscinas, pré-cloração e manutenção de níveis de cloro ativo; não contato de animais com águas destinadas ao uso da população humana; proibição do uso de lentes durante banhos de piscinas ou na vigência de qualquer sinal de irritação da córnea. As infecções podem ser adquiridas em atividades profissionais como também de lazer e de práticas esportivas.

► Bibliografia

- Adl, S.M., Simpson, A.G., Farmer, M.A. *et al.* 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52: 399-451.
- Alves, J.M.P., Gusmão, C.X., Teixeira, M.M.G. *et al.* 2000. Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of Brazilian keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 19-26.
- Band, R.N. 1959. Nutritional and related biological studies on the free-living soil amoebae, *Hartmannella rhyodes*. *Journal of General Microbiology* 21: 80-95.
- Cariello, A.J., Souza, G.F.P., Foronda, A.S. *et al.* 2010. *In vitro* amoebicidal activity of S-nitrosoglutathione and S-nitroso-N-acetylcysteine against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Antimicrobial Therapy* 65: 588-91.
- Carreno, R.A., Schnitzler, B.E., Jeffries, A.C. *et al.* 1998. Phylogenetic analysis of coccidia based on 18S rDNA sequence comparison indicates that *Isoospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45: 184-8.
- Carvalho, F.R.S., Foronda, A.S., Mannis, M.J. *et al.* 2009. Twenty years of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea* 28: 516-519.
- Carvalho, F.R.S., Foronda, A.S. & Pellizari, V.H. 2007. Detection of *Legionella pneumophila* in water and biofilm samples by culture and molecular methods from man-made systems in São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 743-51.
- Chacin-Bonilla, L. 2010. Epidemiology of *Cyclospora cayetanensis*: A review focusing in endemic areas. *Acta Tropica* 115: 181-93.
- Clark, D.P. & Sears, C.L. 1996. The pathogenesis of Cryptosporidiosis. *Parasitology Today* 12: 221-5.
- Clarke, D.W. & Niederkorn, J.Y. 2006. The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbes and Infection* 8: 1400-5.

- Clarke, D.W. & Niederkorn, J.Y. 2006. The pathophysiology of *Acanthamoeba keratitis*. *Trends in Parasitology* 22: 175-80.
- Connor, B.A., Reidy, J. & Soave, R. 1999. Cyclosporiasis: clinical and histopathologic correlates. *Clinical Infectious Diseases* 28: 1216-22.
- Curry, A. & Smith, H.V. 1998. Emerging pathogens: *Isospora*, *Cyclospora* and microsporidia. *Parasitology* 117: S143-S159.
- da Rocha Azevedo, B., Tanowitz, H.B. & Marciano-Cabral, F. 2009. Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. *Interdisciplinary Perspectives in Infectious Diseases* 2009: 251406.
- de Souza Carvalho, F.R., Carrijo-Carvalho, L.C., Chudzinski-Tavassi, A.M. et al. 2011. Serine-like proteolytic enzymes correlated with differential pathogenicity in patients with acute *Acanthamoeba keratitis*. *Clinical Microbiology and Infection* 17: 603-9.
- Fayer, R., Morgan, U. & Upton, S.J. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology* 30: 1305-22.
- Ferrante, A. 1991. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasite Immunology* 13: 31-47.
- Foronda, A.S. 2009. Infecções por amebas de vida livre. In: Veronesi, R., Focaccia, R. (Eds.). *Tratado de Infectologia*. 4 ed., São Paulo, Atheneu, 2009, pp. 1611-1620.
- Freitas, D., Alvarenga, L.S., Foronda, A. et al. 2001. Doenças emergentes em oftalmologia: ceratite por *Acanthamoeba*. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 64(S4): 7-63.
- Gast, R.J. 2001. Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 609-15.
- Gómez-Couso, H., Paniagua-Crespo, E. & Ares-Mazás, E. *Acanthamoeba* as a temporary vehicle of *Cryptosporidium*. *Parasitology Research* 100: 1151-4.
- Griffiths, J.K. 1998. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, and diagnosis. *Advances in Parasitology* 40: 37-85.
- Hamour, A., Curry, A., Ridge, A. et al. 1997. *Isospora belli* in a patient with AIDS. *Journal of Infection* 35: 94-5.
- Herwaldt, B.L. 2000. *Cyclospora cayetanensis*: A review, focusing on the outbreaks of cyclosporiasis in the 1990s. *Clinical Infectious Diseases* 31: 1040-57.
- Jex, A.R. & Gasser, R.B. 2010. 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. *Biotechnology Advances* 28: 17-26.
- Khan, N.A. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 564-95.
- Khan, N.A., Jarroll, E.L. & Paget, T.A. 2002. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Current Microbiology* 45: 197-202.
- Kumar, R. & Lloyd, D. 2002. Recent advances in the treatment of *Acanthamoeba keratitis*. *Clinical Infectious Diseases* 35: 434-41.
- Laurent, F., McCole, D., Eckmann, L. & Kagnoff, M.F. 1999. Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes and Infection* 1: 141-8.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P. & Blagburn, B.L. 1997. Biology of *Isospora* spp from humans, nonhuman primates and domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews* 10: 19-34.
- Marciano-Cabral, F. & Cabral, G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 273-307.
- Mahmoud, A.A.F. 1998. "New" Intestinal Parasitic Protozoa. In: Krause, R.M. *Emerging Infections*. New York: Academic Press, pp. 431-445.
- Martinez, A.J. 1985. Free-living amoebae: natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of the disease. Boca Raton, CRC Press.
- Martinez, A.J. & Visvesvara, G.S. 1997. Free-living amoebae, amphizoic and opportunistic amoebae. *Brain Pathology* 7: 583-98.
- Moncada, L.I., López, M.C., Murcia, M.I. et al. 2001. *Myxobolus* sp, another opportunistic parasite in immunosuppressed patients? *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1938-40.
- Morgan-Ryan, U.M., Fall A., Ward L.A. et al. 2003. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 433-40.
- Moura, H., Wallace, S. & Visvesvara, G.S. 1992. *Acanthamoeba healyi* n. sp. and the isoenzyme and immunoblot profiles of *Acanthamoeba* spp., groups 1 and 3. *Journal of Protozoology* 39: 573-83.
- Neira, O.P., Barthel, E.M., Wilson, G.L. & Muñoz, N.S. 2010. Infección por *Isospora belli* en pacientes con infección por VIH. Presentación de dos casos y revisión de la literatura. *Revista Chilena de Infectología* 27: 219-27.
- Ortega, Y.R., Sterling, C.R. & Gilman, R.H. 1998. *Cyclospora cayetanensis*. *Advances in Parasitology* 40: 399-418.
- Ortega, Y.R. & Sanchez, R. 2010. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clinical Microbiology Reviews* 23: 218-34.
- Page, F.C. 1988. A new key to freshwater and soil amoebae. Cumbria, England: Freshwater Biological Association Scientific Publications.
- Pussard, M. & Pons, R. 1977. Morphologie de la paroi kistique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica* XIII(4): 557-98.
- Putignani, L. & Menichella, D. 2010. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdisciplinary Perspectives in Infectious Diseases* 2010: 753512.
- Recaverren-Arce, S., Velarde, C., Gotuzzo, E. & Cabrera, J. 1999. Amoeba angiectic lesions of the central nervous system in *Balamuthia mandrillaris* amoebiasis. *Human Pathology* 30: 269-73.
- Sacramento, R.S., Martins, R.M., Miranda, A. et al. 2009. Differential effects of α -helical and β -hairpin antimicrobial peptides against *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitology* 136: 813-21.
- Schuster, F.L. & Visvesvara, G.S. 2004. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resistance Updates* 7: 41 a 51.
- Schuster, F.L. & Visvesvara, G.S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology* 34: 1001-27.
- Smith, H.V. & Rose, J.B. 1998. Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitology Today* 14: 14-22.
- Snelling, W.J., Xiao, L., Ortega-Pierres, G. et al. 2007. Cryptosporidiosis in developing countries. *Journal of Infection in Developing Countries* 1: 242-56.
- Soave, R. 2007. *Cyclospora*: An overview. *Clinical Infectious Diseases* 23: 429-37.
- Stark, D., Barrat, J.L.N., van Hal, S. et al. 2009. Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clinical Microbiology Reviews* 22: 634-50.
- Tzipori, S. & Griffiths, J.K. 1998. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. *Advances in Parasitology* 40: 5-36.
- Visvesvara, G.S., Schuster, F.L. & Martinez, A.J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. Sp., agent of amoebic meningoencephalitis in humans and other animals. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 40: 504-14.
- Visvesvara, G.S., Moura, H. & Schuster, F.L. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 50: 1-26.
- Xiao, L., Morgan, U.M., Fayer, R., Thompson, R.C.A. & Lal, A.A. 2000. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitology Today* 16: 287-92.
- Xiao, L. 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental Parasitology* 124: 80-9.
- Yoder, J.S. & Beach, M.J. 2010. *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. *Experimental Parasitology* 124: 31-9.

▶ Leitura sugerida

- Lainson, R. 2005. The genus *Cyclospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) with a description of *Cyclospora schneideri* n. sp. in the snake *Anilius scytale scytale* (Aniliidae) from Amazonian Brazil – A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 103-110.
- Jex, A.R., Pangasa, A., Campbell, B.E. et al. 2008. Classification of *Cryptosporidium* species from patients with sporadic cryptosporidiosis by use of sequence-based multilocus analysis following mutation scanning. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 2252-62.
- Karanis, P., Kourenti, C. & Smith, H. 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water Health* 5: 1-38.

