

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Farmácia**



**Parasitas que ocorrem no sangue:  
Diagnóstico e abordagens terapêuticas**

**Raquel Caldeira Coelho**

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2017**

**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



**Parasitas que ocorrem no sangue:  
Diagnóstico e abordagens terapêuticas.**

**Raquel Caldeira Coelho**

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas  
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Doutora Leonor Correia

**2017**

# Resumo

As infeções parasitárias afetam, globalmente, mais de dois biliões de pessoas e são uma causa substancial de morbilidade e mortalidade, particularmente nas regiões mais pobres do mundo. As diferentes infeções parasitárias em humanos ocorre, por norma, através da picada de um inseto, ácaro, infetado ou a partir da ingestão de um organismo já contaminado.

Os sintomas clínicos da malária são o resultado da replicação das fases assexuais dos diferentes parasitas do género *Plasmodium*, no sangue humano. O diagnóstico microscópico, através da observação de amostras sanguíneas é o método de eleição, pois consegue diagnosticar e diferenciar espécies causadoras de malária. A terapia combinada de artemisinina é, neste momento, a mais utilizada no tratamento da malária não complicada. A doxiciclina é recomendada como profilaxia durante viagens a zonas endémicas.

O *Toxoplasma gondii*, um dos agentes causais da toxoplasmose, é um parasita com um vasto número de hospedeiros, que inclui a maioria das espécies de aves e todos os mamíferos. A técnica mais utilizada para o seu diagnóstico é a observação microscópica contudo, o diagnóstico em mulheres grávidas, que adquiriram a infeção na fase gestativa, é crítico. A primeira linha de tratamento da doença consiste numa combinação de pirimetamina e sulfodiazina. Não existem, atualmente, tratamentos aprovados para mulheres grávidas infetadas.

A babesiose é uma doença transmitida através de carraças, causada por protozoários do género *Babesia*, que afetam os eritrócitos humanos. O diagnóstico é efetuado através da observação de esfregaços de sangue. As substâncias mais utilizadas como tratamento são: atovaquona, azitromicina, clindamicina e quinina.

Apesar de todos estes parasitas terem uma particular expressão em países em desenvolvimento, terá de haver um esforço a nível mundial para tentar compreender os mecanismos de invasão destes seres, aplicar mais medidas de prevenção, principalmente no controlo dos vetores, analisar a medicação já existente no mercado e procurar novas combinações que sejam eficazes para a sua erradicação, bem o como aperfeiçoamento das vacinas.

**Palavras-chave:** Malária; Toxoplasmose; Babesiose; Diagnóstico; Tratamento.

# Abstract

Parasitic diseases affect more than 2 billion people globally and cause substantial morbidity and mortality, particularly among the world's poorest people.

Parasitic transmission in humans occurs, as a rule, through the bite of an insect, infected mite or from the ingestion of an already contaminated organism

Clinical symptoms of malaria are the result of the replication of the asexual stages in human blood. Microscopic diagnosis using blood smears plays an important role in malaria diagnosis because of its ability to diagnose and differentiate each species of malaria. Artemisinin-based combination therapies are the current standard of care for uncomplicated malaria. Doxycilin is recommended as prophylaxis when traveling to endemic zones.

*Toxoplasma gondii*, one of the agents that cause toxoplasmosis, is a parasite with a broad host range that includes most bird species and virtually all mammals. The most commonly used and basic technique is bright-field light microscopy. First-line therapy consists of the combination of pyrimethamine and sulfadiazine. There are currently no approved treatments for infected pregnant women.

Human babesiosis is an emerging tick-borne infectious disease caused by protozoa of the genus *Babesia* that are obligate parasites of red blood cells. Babesiosis case is considered to be confirmed if pathogen or its genetic material is detected in peripheral blood. A list of drugs of choice includes: atovaquone, azithromycin, clindamycin and quinine.

Although all these parasites have a particular expression in developing countries, there will have to be a worldwide effort to try to understand the mechanisms of invasion of these beings, to apply more preventive measures, especially in the control of vectors, to analyze the existing medication in the market and seek new combinations that are effective for its eradication, as well as the improvement of vaccines.

**Key words:** Malaria; Toxoplasmosis; Babesiosis; Diagnosis; Therapeutics

# Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
<i>B.</i>	<i>Babesia</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunosorbent assay</i>
HRP2	<i>Histidine-rich protein II</i>
IFA	Ensaio de imunofluorescência
MGG	<i>May-Grunwald Giemsa</i>
OMS	Organização mundial da saúde
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
P-C	Pirimetanina-clindamicina
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
P-S	Pirimetanina-sulfodiazina
SP	Sulfadoxina-pirimetamina
TCA	Terapêutica combinada com artemisinina
TDR	Teste de diagnóstico rápido
TMP-SMX	Trimetoprim-sulfadiazina
<i>T.</i>	<i>Toxoplasma</i>
UV	Ultra violeta
VIH	Vírus da imunodeficiência humana

# Índice:

## Parasitoses sanguíneas

1. <b>Objetivos</b> .....	7
2. <b>Materiais e métodos</b> .....	8
3. <b>Introdução: Parasitas sanguíneos</b> .....	9
3.1. <b>Malária</b> .....	11
3.1.1. <b>Caraterização e ciclo de vida dos parasitas</b> .....	11
3.1.2. <b>Fatores de risco</b> .....	13
3.1.3. <b>Epidemiologia e distribuição geográfica</b> .....	14
3.2. <b>Toxoplasmose</b> .....	16
3.2.1. <b>Caraterização e ciclo de vida do parasita</b> .....	16
3.2.2. <b>Fatores de risco e prevenção</b> .....	18
3.2.3. <b>Epidemiologia e distribuição geográfica</b> .....	19
3.2.4. <b>Influência na gravidez</b> .....	19
3.3. <b>Babesiose</b> .....	20
3.3.1. <b>Caraterização e ciclo de vida dos parasitas</b> .....	20
3.3.2. <b>Epidemiologia e distribuição geográfica</b> .....	22
4. <b>Diagnóstico clínico e laboratorial</b> .....	24
4.1. <b>Malária</b> .....	24
4.2. <b>Toxoplasmose</b> .....	26
4.3. <b>Babesiose</b> .....	28
5. <b>Medidas terapêuticas e profilaxia</b> .....	31
5.1. <b>Malária</b> .....	31
5.2. <b>Toxoplasmose</b> .....	33
5.3. <b>Babesiose</b> .....	36
6. <b>Resultados e discussão</b> .....	38
7. <b>Conclusão</b> .....	40
8. <b>Perspetivas futuras</b> .....	41
9. <b>Referências bibliográficas</b> .....	42

# 1. Objetivo

A presente revisão bibliográfica pretende identificar parasitas sanguíneos responsáveis por infectar seres humanos, estudar os respectivos ciclos de vida, bem como investigar a sua epidemiologia e distribuição geográfica atendendo ao grande problema que representam para a saúde pública, ao nível mundial.

O trabalho destina-se, também, a sintetizar as metodologias atualmente usadas para o diagnóstico destas situações bem como à compilação das abordagens terapêuticas utilizadas no tratamento e profilaxia destas doenças.

## 2. Materiais e métodos

Inicialmente foi efetuada uma pesquisa em alguns livros e páginas eletrônicas, como por exemplo, o website: *Centers of Disease Control and Prevention* ([www.cdc.gov/](http://www.cdc.gov/)), a fim de obter uma visão abrangente do tema.

O material bibliográfico utilizado para a realização desta monografia foi obtido através de uma pesquisa efetuada na base de dados eletrônica PUBMED ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)).

As palavras-chave utilizadas na procura bibliográfica foram: *malaria, toxoplasmosis, babesiosis, treatment and diagnosis, new drugs, and blood parasites.*

### 3. Introdução: Parasitas sanguíneos

Os parasitas são dos organismos mais antigos existentes na natureza. A sua presença já foi detetada em fósseis com milhões de anos (1).

As doenças parasitárias afetam mais de 2 milhões de pessoas em todo o mundo e são uma causa substancial de mortes, principalmente em países do terceiro mundo (2).

Nas doenças parasitárias transmitidas por vetores (os artrópodes são a espécie mais comum) incluem-se a malária, a babesiose, a doença das Chagas, a leishmaniose e a filariose (1).

Os protozoários são organismos unicelulares e eucarióticos, capazes de causar uma grande variedade de doenças no ser humano. A maioria das doenças por eles causadas são assintomáticas, ocorrem no intestino e não causam eosinofilia (2).

O parasitismo é uma forma de coexistência antagónica de dois organismos, em que um obtém todos os benefícios, enquanto o outro sofre todos os danos. Os parasitas têm a capacidade de se adaptar ao seu hospedeiro, assegurando que retiram o máximo partido do mesmo. O hospedeiro é utilizado como fonte alimentar e, também, como o novo alojamento do parasita. Este tipo de interação resulta, frequentemente, em sintomas patológicos no organismo do hospedeiro. Os epidemiologistas estimam que, pelo menos 3/4 dos organismos vivos estão infetados por diversos parasitas. Alguns organismos utilizam mais que um meio de transmissão como modo de adaptabilidade ao hóspede. Por norma, a transmissão parasitária acontece por picada de inseto ou ácaro infetado. Outros métodos de transmissão ocorrem por ingestão de um organismo contaminado por parte de um animal vertebrado ou através da contaminação de uma ferida contendo formas evasivas do parasita (1).

A malária é provocada por um protozoário do género *Plasmodium* (*P.*) e é uma das principais causas de morte no mundo. Este parasita possui um ciclo de vida complexo, quer na fase do vetor, quer na fase do hóspede vertebrado. A malária é responsável pela morte de perto de um milhão de pessoas e de cerca de 300 milhões de doenças sintomáticas por ano. A sua distribuição geográfica passa por África, Ásia, Oceânia e América do Sul (2,3).

Existem cerca de 100 espécies do género *P.* capazes de infetar répteis, pássaros e vários mamíferos. No entanto, apenas quatro espécies de *P.* têm a capacidade de infetar humanos em condições normais: o *falciparum*, o *vivax*, o *ovale* e o *malariae*. Estas espécies são distintas morfológicamente, imunologicamente, na sua distribuição geográfica, no padrão dos surtos e na resistência à terapêutica (3).

A única grande ameaça global, quanto ao controlo da malária nos próximos 15 anos será a financeira. A erradicação da malária irá conferir enormes benefícios a nível económico, aliviando a pobreza nos países em desenvolvimento, visto que a população abdica, inclusive, de necessidades básicas para conseguir medicação. É essencial o investimento e doações para o desenvolvimento de novas terapêuticas, inseticidas e vacinas, e a Organização Mundial de Saúde (OMS) está a trabalhar nesse sentido (4,5).

A toxoplasmose, uma zoonose que afeta tipicamente zonas cosmopolitas, é transmitida principalmente através de água e alimentos. É também considerada uma parasitose de alto risco de mortalidade, principalmente em grávidas, recém-nascidos e pacientes imunocomprometidos. O *Toxoplasma gondii* é um protozoário polivalente, que se estima ser responsável pela infeção de um terço da população mundial (6,7).

A babesiose é causada por protozoários que infetam os eritrócitos e o seu principal vetor é a carraça; outros possíveis mecanismos de transmissão são por transfusão sanguínea e por via placentária. A babesiose foi documentada e descoberta por Babes em 1888, durante uma investigação acerca da causa de hemoglobinúria em gado (8). Apenas 3 das 100 diferentes espécies de babesiose foram diagnosticadas em humanos: *microti*, *divergens* e *venatorum*. A infeção deste parasita é tipicamente assintomática, no entanto, representa um risco elevado para pacientes com doença esplénica, com imunodeficiência e para a população idosa. A babesiose é pouco diagnosticada em regiões onde a malária prevalece (9).

A doença das Chagas afeta cerca de 21 países na América do Sul, pondo em risco cerca de 25 milhões de pessoas. Esta doença é causada por um protozoário chamado *Trypanosoma cruzi*. A sua principal via de transmissão é através do vetor *Triatominae*. Outros mecanismos de transmissão são por ingestão de água e alimentos contaminados, por via placentária e por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos (10). A doença de Chagas foi descoberta há cerca de 100 anos, no entanto, a sua patogénese e o seu tratamento são ainda alvo de debate e discordância (11). A leishmaniose, causada por um protozoário que pertence ao género *Leishmania*, tem sido uma das doenças mais ignoradas e negligenciadas. Foi diagnosticada em pelo menos 88 países de zonas tropicais e subtropicais em África, na Ásia, Mediterrâneo, sul da Europa, América do sul e central (12). Os métodos de tratamento da mesma ainda se encontram numa fase prematura, sendo necessário criar novos medicamentos e métodos para a erradicação deste parasita (13).

## 3.1. Malária

### 3.1.1. Caracterização e ciclo de vida dos parasitas

A malária, uma doença de importância global, que afeta 3.3 bilhões de pessoas em 97 países, já causou 200 milhões de casos de infecção e cerca de 600 mil mortes (14). É uma doença caracterizada por febre, dor de cabeça, arrepios, transpiração e vômitos. Estes sintomas devem-se à libertação de toxinas, provenientes do parasita, para a circulação sanguínea, durante o ciclo eritrocítico do merozoíto. Ao longo da progressão da infecção, o número de glóbulos vermelhos diminui, podendo causar anemia (15).

Os sintomas não são específicos e frequentemente incluem: calafrios, enxaquecas, náuseas e dores musculares. Quando tratados apropriadamente, os sintomas são eliminados em alguns dias. No entanto, é observável um elevado nível de exaustão (14).

Há estudos que demonstram que o *P. vivax* é frequentemente associado a infecções graves que podem levar à morte (16). O gênero *P.* é um agente patogênico com um ciclo de vida complexo, alternando entre fêmeas *anopheles*, mosquitos e hospedeiros vertebrados que requerem a formação de um único zoíte para a invasão em diferentes tipos de células durante estádios específicos. Após a invasão dos esporozoítos no hospedeiro, dá-se a infecção nos hepatócitos seguindo-se o ciclo assexuado no sangue (14). Durante o desenvolvimento da fase assexuada desenvolvem-se em esquizontes, que se replicam, libertando múltiplos merozoítos invasivos. Em cada ciclo de replicação, uma pequena quantidade de parasitas assexuados desenvolve-se em gâmetas femininos ou masculinos, sendo os únicos estádios transmitidos para o vetor, que é o mosquito, não contribuindo diretamente para a patologia da doença (17).

O *P. malariae* desenvolve ciclos no mosquito e no hospedeiro primário. Quando os gametócitos são ingeridos pelo mosquito, ocorre um processo denominado exflagelação dos microgametócitos, resultando na formação de até 8 microgametócitos móveis (18).

O *P. ovale* desenvolve ciclos no hospede humano e no vetor. Após a introdução do parasita, através da picada de mosquitos infetados, ocorre primeiramente a invasão no fígado, onde, numa célula do parênquima, o parasita se desenvolve durante aproximadamente 9 dias. Eventualmente, várias centenas de merozoítos, são produzidos (19).

Após a sua libertação, invadem os eritrócitos e iniciam o ciclo eritrocítico, sendo que se podem diferenciar em duas formas diferentes: microgametócitos (forma masculina) e macrogametócitos (forma feminina). Quando são ingeridos pelo mosquito, o ciclo repete-se

(18). O tempo necessário para a maturação dos gametócitos difere entre as diferentes espécies de *P.* (17).

Algumas das características que diferenciam o *P. vivax* do *P. falciparum* são: 1) no *P. vivax* o hipnozoíto causa um reaparecimento dos sintomas; 2) Os gametócitos aparecem na fase inicial da infecção, antes de qualquer sintoma; 3) O *P. vivax* possui um desenvolvimento mais acelerado no vetor, em comparação ao *P. falciparum* mediante as mesmas temperaturas e condições ambientais (16).

Estudos comparativos entre o *P. falciparum* e o *P. vivax* indicam que a malária transmitida pelo *P. vivax* tem uma eficácia superior, ainda que com menor percentagem de gametócitos (17).

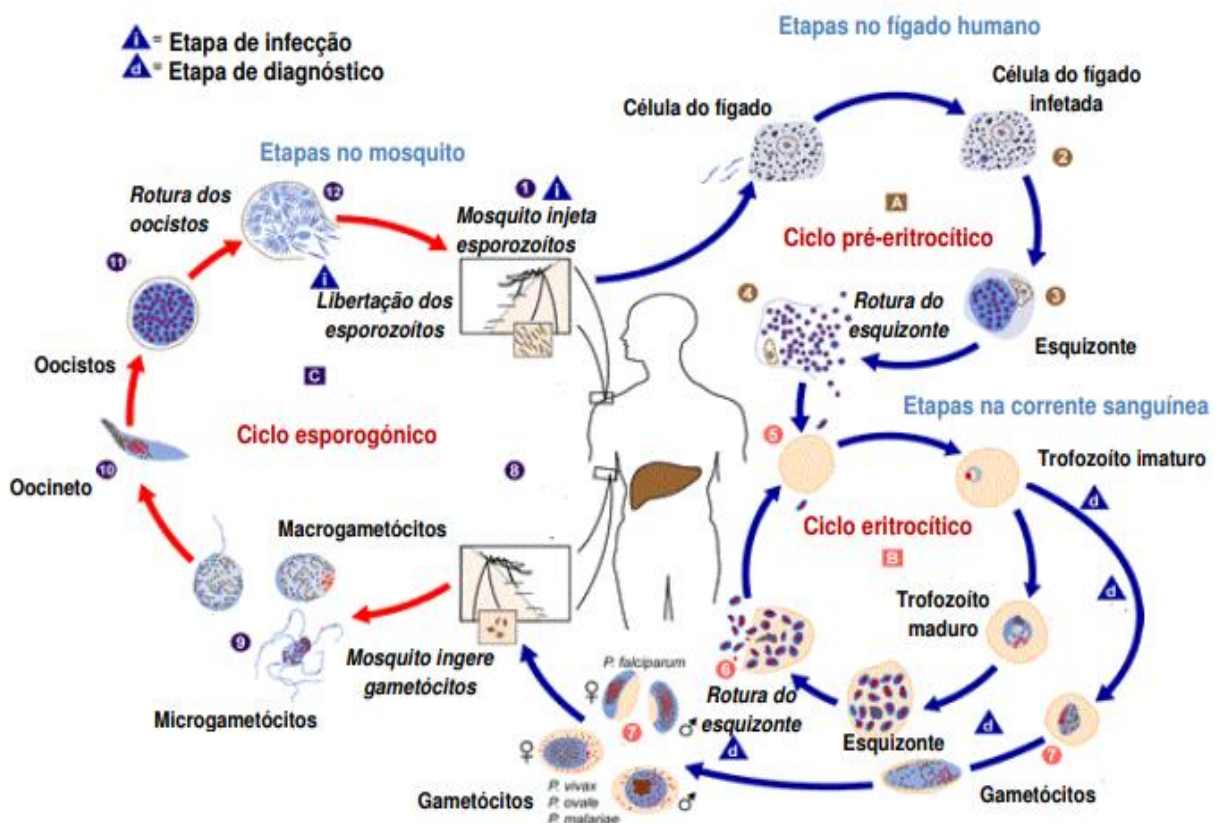


Figura 1. Ciclo de vida do parasita. Adaptado de: referência 77.

O ciclo de reprodução assexuada do *P. falciparum* causa mudanças nos eritrócitos do hospedeiro, aumentando algumas das suas atividades metabólicas, tornando-o permeável para vários nutrientes, bem como para metabólitos tóxicos, consumindo grande parte da hemoglobina da célula (20).

Os sintomas da malária são resultado da replicação dos estádios assexuais no sangue humano. No entanto, a transmissão para os mosquitos é apenas alcançada através do desenvolvimento dos estádios sexuados (gametócitos) (17).

No género *P.*, quatro espécies são conhecidas como parasitas humanos: *malariae*, *ovale*, *vivax*, e *falciparum*. Estas espécies estão relacionadas umas com as outras, o que sugere que a sua adaptação aos humanos ocorreu várias vezes durante a evolução do género (21). O *P. falciparum* é o que causa mais fatalidades e o *P. vivax*, considerado o mais presente em diferentes partes do mundo (14).

### **3.1.2. Fatores de risco**

Para avaliar o risco de malária é necessário examinar o ambiente, o setor biológico (espécies de mosquitos, ciclo de vida, percentagens de infeção dos diferentes tipos de *Plasmodium*), e populações humanas (atividades florestais e suscetibilidade do hospedeiro) (22). Populações que habitam em regiões de altitude superior, têm vindo a ser mais suscetíveis. Este acréscimo de vulnerabilidade deve-se ao aumento da temperatura global verificada nos últimos anos (23).

Acontecimentos como a desflorestação, a proliferação da floresta, a presença de riachos, rios e águas estagnadas nas margens das florestas, as reservas artificiais como aquaculturas, a caça, a extração de produtos florestais (frutas, plantas medicinais), e a evolução de tecnologias agrícolas são tudo fatores contribuintes para o aumento da transmissão da malária na Amazónia (22).

Regiões com maior densidade populacional foram também associadas a uma maior prevalência de malária. No entanto, a maioria destes locais tinham construção muito densa e cerrada, sem organização estrutural e muito pouca vegetação (muito espalhada) (23). Nas zonas mais afetadas por malária, tal como o noroeste da Tailândia, estudos recentes indicam que indivíduos mais velhos possuem maior imunidade ao *P. vivax*, que ao *P. falciparum*. O que sugere que as recaídas são menos frequentes em indivíduos mais velhos (24).

Os fatores socioeconómicos e a falta de cuidados higiénicos são também da maior importância para o aumento da prevalência da malária. Há investigações que mostram que o nível de riqueza está inversamente associado ao risco de infeções parasitárias (23).

A infeção humana está associada ao aumento da percentagem de formas assexuadas do parasita bem como dos gametócitos no sangue (17). A idade, a etnia, a proximidade da floresta, a densidade populacional e a altitude, foram os fatores linearmente associados ao risco de malária. Outros fatores ambientais também associados são as temperaturas elevadas, a humidade e as zonas chuvosas (23).

### **3.1.3. Epidemiologia e distribuição geográfica**

A malária é uma das doenças que mais impacto causa na saúde pública e que mais mortes representa (655.000 mortes e 200 milhões de infetados por ano) (25).

A malária está presente em 97 países do mundo. A transmissão é influenciada por vários fatores ambientais (temperatura, humidade, etc) e pela capacidade do vetor manter o desenvolvimento do parasita. Tendo em conta esses mesmos fatores, o nível de transmissão é determinado pela frequência de contacto entre os mosquitos vetores e os humanos. Subsequentemente, é afetado pelo local, a densidade populacional, a quantidade de vetores na zona e, até, os hábitos alimentares e higiénicos (14).

O *P. vivax* e o *P. falciparum* são os parasitas no género *P.* mais presentes e que mais contribuem para a taxa de mortalidade e a infeção humana (26).

Das 655.000 mortes associadas à malária, anteriormente referidas, 91% ocorreram em África, 6% no sudeste asiático e 3% na zona este do Mediterrâneo (25). Com o aumento da exposição ao parasita, a transmissão torna-se mais consistente com o passar dos anos, aumentando o nível de imunidade devido ao aumento da exposição (14).

O *P. malariae* apesar de presente em todas as zonas de risco de infeção por malária, existe em muito baixas quantidades. O *P. falciparum* e o *P. malariae* mostram casos de co-infeção nas zonas tropicais de África. O *P. ovale* tem uma distribuição geográfica bastante grande, principalmente nas zonas tropicais africanas (25), ocorre raramente no sudoeste do Sudão e é inexistente no norte do país (19).

O *P. falciparum* mostra-se também mais presente nas zonas tropicais africanas, enquanto o *P. vivax* é mais dominante na zona da América do sul. Tanto o *P. falciparum*

como o *P. vivax* demonstram uma presença importante na zona este asiática e na zona oeste do Pacífico (25). Em termos de distribuição geográfica, o *P. vivax* é o *Plasmodium* com maior distribuição por todo o globo, isto em parte devido à sua capacidade de adaptação a temperaturas rigorosas, em comparação, por exemplo, com o *P. falciparum* (26). 28% dos casos de *P. falciparum* ocorrem entre Maio e Junho (27). A área sob risco de *P. falciparum* está quantificada em cerca de 29.7 milhões de km<sup>2</sup> distribuídos em África (18.2 milhões de km<sup>2</sup>, 61.1%), América (6.0 milhões de km<sup>2</sup>, 20.3%) e Ásia central e sul (5.5 milhões de km<sup>2</sup>, 18.6%) (25). O *P. vivax* apesar de ser o mais abundante, possui apenas uma maior presença em África, nas zonas com baixa densidade populacional (26). O *P. vivax* é transmitido em 95 países tropicais, subtropicais e temperados. Cerca de 2.85 biliões de pessoas vivem sob o risco de infeção do mesmo. 91% vive na Ásia central e no sudeste asiático, 5.5% na América e 3.4% em África. Cerca de 57.1% das pessoas expostas ao *P. vivax* habita zonas de infeção de malária instáveis e de alto risco (25).

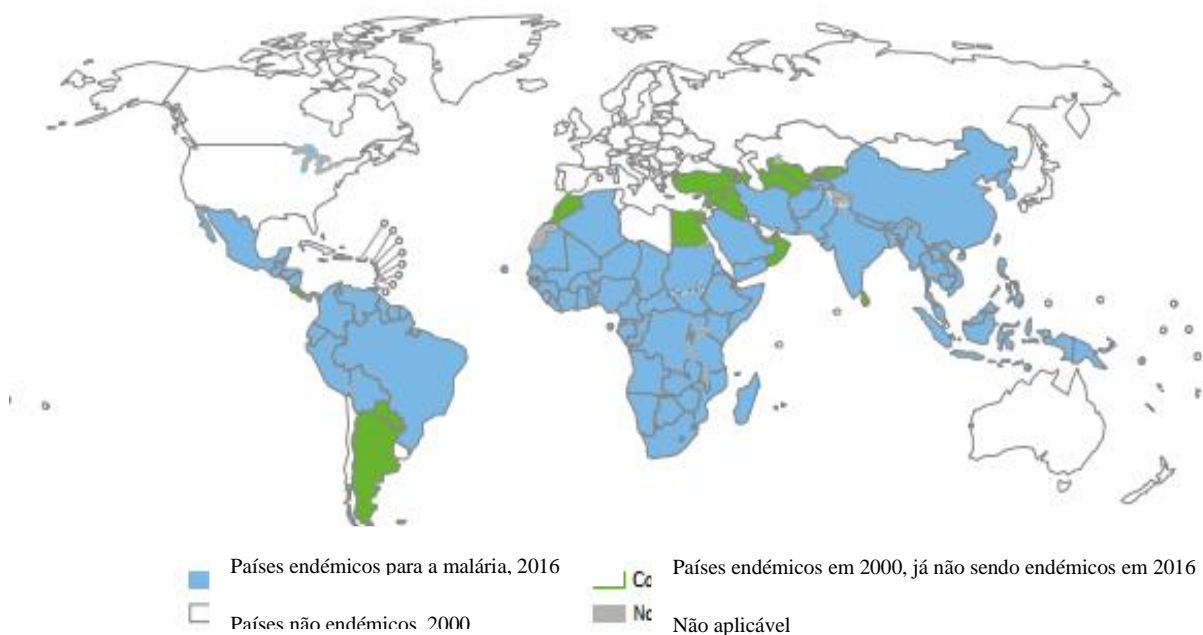


Figura 2. Países onde a malária era endêmica, em 2000 e 2016. Adaptado de: World malaria report, World Health Organization, 2016.

## 3.2. Toxoplasmose

### 3.2.1. Caracterização e ciclo de vida do parasita

A toxoplasmose é causada pelo *T. gondii*, um parasita intracelular com um leque variado de hospedeiros, que engloba a grande maioria de espécies de aves e quase todos os mamíferos, incluindo os humanos. Nestes, a infecção ocorre, frequentemente, a partir da ingestão de comida crua, mal cozida ou bebidas contaminadas por oócitos e quistos. A transmissão congênita e por transplante de órgãos representam, também, outros mecanismos de infecção (26, 27).

Alguns autores sugerem que um possível mecanismo de transmissão do *T. gondii* é a infecção por via de artrópodes. O vetor mais frequente é a carraça, que consegue transportar vários microorganismos enquanto se alimenta do sangue do hospedeiro.

Existem 3 fases no ciclo de vida infeccioso do *Toxoplasma*: os esporozoítos, os taquizoítos e bradizoítos (29,30). Os felinos fazem parte do ciclo de vida e são uns dos hospedeiros mais importantes: a reprodução sexuada acontece no intestino delgado dos gatos, resultando na produção de oócitos que, por sua vez, são libertados no meio ambiente, podendo contaminar humanos diretamente ou via hospedeiros intermediários (29).

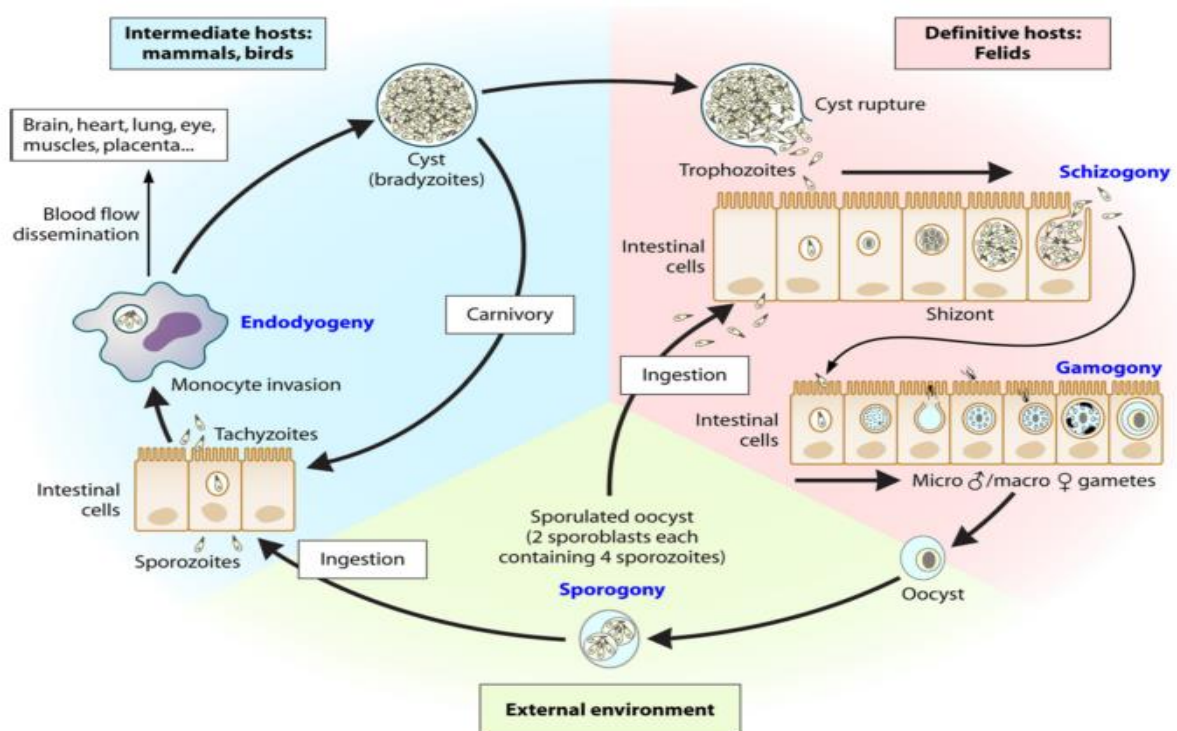


Figura 3. Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Retirado de: F. Robert-Fangneux, M. Dardé, 2012.

O parasita replica-se por reprodução assexuada num h6spede interm6dio, ap6s a ingest6o dos o6citos libertados anteriormente pelos felinos. Os esporozo6itos encontram--se em o6citos maduros. O processo de forma76o de esporozo6itos, conhecido por esporogonia, acontece cerca de 6 dias ap6s a liberta76o dos o6citos no meio ambiente. Ap6s a esporula76o, cada o6cito cont6m dois esporocistos, cada um com quatro esporozo6itos. Os mesmos esporozo6itos penetram o epitel6o intestinal, onde se diferenciam em taquizo6ito. Os bradizo6itos resultam da convers6o dos taquizo6itos (30) numa fase replicativa mais lenta, que resulta na forma76o de quistos tecidulares (31). O *Toxoplasma* persiste como bradizo6itos infetados nos quistos tecidulares, podendo estes serem consumidos por humanos que se infetam atrav6s do consumo da carne do animal contaminado. Outra via de transmiss6o 6 o contacto direto do humano com os o6citos presentes no meio ambiente (32).

O *T. gondii* 6 um parasita encontrado em todo o mundo, pois utiliza uma grande variedade de esp6cies como h6spede para se transportar de continente para continente, porque se adapta a varia76es clim6ticas (33). 6 um parasita presente em doentes infetados pelo v6rus da imunodefici6ncia humana (VIH), devido ao enfraquecimento do sistema imunit6rio, que permite a reativa76o de infe76es latentes e aparecimento de encefalite, que pode ser fatal (32).

Existem tr6s tipos de estirpes da toxoplasmose (tipo 1, 2 e 3), que foram previamente documentadas no norte da Am6rica e na Europa, com diferentes padr6es de crescimento e expans6o, capacidade de formar quistos e diferentes mecanismos de infe76o, em ratos. H6 testes que indicam que estas estirpes aparecem ap6s um cruzamento gen6tico e que se espalham por via oral. O tipo 1 (RH), alastra depressa e 6 virulento em ratos. Esta estirpe perdeu a capacidade de se desenvolver, frequentemente, em quistos, talvez devido a uma consequ6ncia de propaga76o prolongada *in vitro* (34). Foram documentadas infe76es em gr6vidas, pela estirpe tipo 1, associadas a um risco de dist6rbios psicol6gicos no feto (35).

A estirpe tipo 2 n6o 6 virulenta mas cria uma infe76o cr6nica com o aparecimento de quistos. Est6 muito associada a infe76es humanas na Europa e na Am6rica do norte. A estirpe tipo 3 n6o 6 virulenta para ratos e 6 menos frequente que a de tipo 2 (28).

A estirpe do tipo 1 est6 envolvida na manipula76o de genes respons6veis pelo desenvolvimento cerebral e pela transmiss6o de impulsos nervosos, enquanto que a infe76o provocada pela estirpe tipo 3 altera o RNA n6o codificante (35). Os parasitas da estirpe do tipo 1, dependem da sua capacidade de propaga76o como parasita extracelular para sobreviver

(34). Os mecanismos de propagação da infecção tipo 2 consistem na alteração de processos biológicos relacionados com hormonas, tais como a prolactina e a insulina (35). Sendo que os tipos 2 e 3 não possuem mecanismos apropriados para responder a stresses abruptos de origem extracelular, devem ficar confinados ao meio intracelular, fator determinante que limita o aumento da virulência de ambas as estirpes (34).

### **3.2.2. Fatores de risco e prevenção**

Surtos de toxoplasmose recentes, em várias regiões do globo, demonstraram que a fonte de infecção pode ser variada, em populações com diferentes culturas e hábitos alimentares (36). Os fatores externos que mais influenciam o risco de infecção pelo *T. gondii* são: ter animal de estimação (cão ou gato), trabalhos domésticos, baixo nível de escolaridade, maus hábitos higiénicos, consumo de vegetais crus e trabalho direto com o solo (37).

O risco de infecção com *T. gondii* está linearmente associado a zonas de temperatura e humidade elevada. Inversamente, o risco de contaminação com *T. gondii* é mais baixo em zonas áridas e com temperaturas mais frias. No entanto, os fatores socioeconómicos têm um papel bastante importante (31).

No Canadá, uma epidemia de toxoplasmose transmitida por via congénita, foi associada ao consumo frequente de veado, bem como ao esfolamento de peles de animais (36). O consumo de água não potável fora da Europa foi associado ao aumento do risco de infecção, assim como a prova de carne mal cozida, durante a preparação de refeições, por parte das mulheres (37). Para prevenir esta transmissão do parasita por via alimentar, é aconselhável a preparação da carne ou de outras partes comestíveis do animal a pelo menos 67°C e evitar produtos crus ou mal cozidos (36). O consumo de leite não pasteurizado e de laticínios também está associado ao aumento de infeções (37).

Outra medida de prevenção para a transmissão por via alimentar são os cuidados de higiene na cozinha, de modo a evitar a propagação dos quistos de *T. gondii* para os humanos. Lavar as mãos com frequência, e lavar os utensílios de cozinha de modo a evitar possível contaminação após o contacto com a carne foi linearmente associado à diminuição do risco de infecção em grávidas (36).

### **3.2.3. Epidemiologia e distribuição geográfica**

É, por norma, assumido que cerca de 25 a 30% da população mundial está infetada por toxoplasmose. No entanto, as taxas de infetados variam drasticamente de país para país (podendo variar de 10 a 80%) e podendo também haver discrepâncias no mesmo país entre as diferentes comunidades (31). O *T. gondii* tem as 3 diferentes estirpes (tipos 1, 2, e 3) presentes no norte da América e na Europa. Testemunhas recentes indicam a presença de uma estirpe com características semelhantes em África (28). Taxas entre os 10 e os 30% de seroprevalência têm sido relatadas no norte da América, no sudeste asiático, no norte da Europa e em África. Taxas entre os 30 e os 50% de seroprevalência foram relatados no centro e sul da Europa e taxas superiores a 50% foram relatadas na América do sul e em países tropicais africanos (31). As estirpes presentes na América do sul possuem maior diversidade genética, com diferentes genótipos, que as da América do norte e da Europa. Ao longo da investigação na América do norte e Europa, foram encontradas estirpes divergentes chamadas genótipos exóticos. A maioria dos casos de infeção por *T. gondii* nessas regiões estão ligados à estirpe tipo 2 e são transmitidos congenitamente ou em pacientes infetados por VIH (28).

Relativamente a mulheres grávidas, a incidência de infeção difere de 10% no Reino Unido para 55% em França, tal como na Grécia. No entanto, em vários países a taxa de incidência desceu consideravelmente nas últimas 3 décadas. Na Polónia, 50% das mulheres em idade reprodutiva são infetadas por *T. gondii* (37). No Brasil, as estirpes do tipo 1 são responsáveis por infeções oculares (28).

### **3.2.4. Influência na gravidez**

A infeção primária durante a gravidez pode ser transmitida para o feto e resultar em futuros problemas de saúde (38). Esta ocorre em cerca de 1/120 por cada 10 000 partos, dependendo da região e da população em estudo (36). No caso da infeção materna, 1 a 8% das mulheres, em cada 1000 gravidezes, estão suscetíveis. Em França é onde se encontra uma maior percentagem de mulheres infetadas. Não existem casos de transmissão de *T. gondii* por amamentação ou por contacto humano (38, 39).

A infeção maternal normalmente resulta da ingestão de oócitos presentes no meio ambiente, da ingestão de bradizoóitos ou taquizoóitos, presentes em carne e produtos animais (38).

A transmissão do *T. gondii* para o feto durante a gravidez está linearmente associada com o isolamento do organismo da placenta. Esta transmissão acontece durante a fase inicial da infecção por grávidas imunologicamente frágeis (36). Se a infecção tiver ocorrido há mais de 3 meses antes da gravidez, o feto não se encontra em risco de contaminação por parte do parasita. No entanto, se a mãe contrair a infecção nos 3 meses antes de engravidar, o feto poderá estar em risco de possível transmissão (39). O primeiro trimestre de gravidez representa um risco elevado de aborto, de nascimentos prematuros e de graves sequelas para o recém-nascido. A maioria das crianças com toxoplasmose congênita (70 a 90%) são assintomáticas e não aparentam qualquer espécie de anomalia à nascença (38). No neonato, a manifestação de toxoplasmose congênita pode incluir hidrocefalia, microcefalia, calcificações intracranianas, retino-coroidite, estrabismo, cegueira, epilepsia, atraso psicomotor e mental, petéquias devidas à trombocitopénia e à anemia (39).

### **3.3. Babesiose**

#### **3.3.1. Caracterização e ciclo de vida dos parasitas**

A babesiose humana é uma infecção que tem crescido nos últimos anos, transportada pela carraça, causada por um protozoário do género *Babesia* (parasita dos glóbulos vermelhos) (34), que invade e lisa os eritrócitos causando uma anemia febril hemolítica (40). A febre é o sintoma principal da babesiose, que é frequentemente acompanhada por uma série de sintomas não específicos (8). Inicialmente começa com fadiga, fraqueza generalizada e má disposição, seguida de dor abdominal, náuseas, vômitos, fotofobia e anorexia (40). Fases mais avançadas da infecção são geralmente observadas em pacientes imunodeprimidos como VIH, doença de Crohn, a tomar medicação imunossupressora e com esplenectomia (34).

Os sintomas das fases mais avançadas da infecção podem incluir falha respiratória aguda, edema pulmonar não cardiogénico, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência renal, enfarte da veia esplénica e linfo-histiocitose hemofagocítica (40). Os hospedeiros vertebrados são infetados por esporozoítos através de picada de carraça, cujo conteúdo entra diretamente nos glóbulos vermelhos, onde as diferentes etapas do ciclo de vida do parasita ocorrem (41). Uma vez alojados no hospedeiro, os esporozóitos infetam os eritrócitos, exceto no caso de uma espécie da *Babesia* que invade os linfócitos primeiro (42). Nestes casos, o parasita

reproduz-se por bipartição, produzindo 4 merozoítos (34). Este tipo de reprodução assexuada produz mais merozoítos, que lisam a célula e infetam mais eritrócitos (42).

A multiplicação é feita de forma assíncrona e é possível ver várias etapas do ciclo em simultâneo, na corrente sanguínea (41). A saída dos merozoítos dos glóbulos vermelhos resulta na desintegração da membrana celular. Com a progressão da infeção, uma das condições desenvolvidas é a anemia hemolítica que, por vezes, é acompanhada de hipoxia tecidual (34). Quando os eritrócitos previamente infetados pela *Babesia*, são ingeridos por carrças, a maioria dos parasitas desintegram-se e é destruída. No entanto, algumas etapas reprodutivas do parasita (pré-gametócitos) sobrevivem e continuam com o seu desenvolvimento, transformando-se assim em gametócitos (41).

Depois de os gametócitos terem sido ingeridos pela carrça, transformam-se em gâmetas (42).

O resto do ciclo de vida da *B.* inclui a multiplicação assexuada, esporogonia e o desenvolvimento de vários esporocinetos. Alguns dos cinetos invadem as glândulas salivares da carrça, local onde a fase final do ciclo de vida produz esporozoítos (41). Assim resumindo, o ciclo de vida em três fases: 1) gamogonia - formação e fusão dos gâmetas dentro da carrça; 2) esporogonia - reprodução assexuada nas glândulas salivares; 3) merogonia - reprodução assexuada no hospedeiro vertebrado (42). Os esporozoítos representam a etapa infecciosa do parasita quando este é introduzido no mamífero (41).

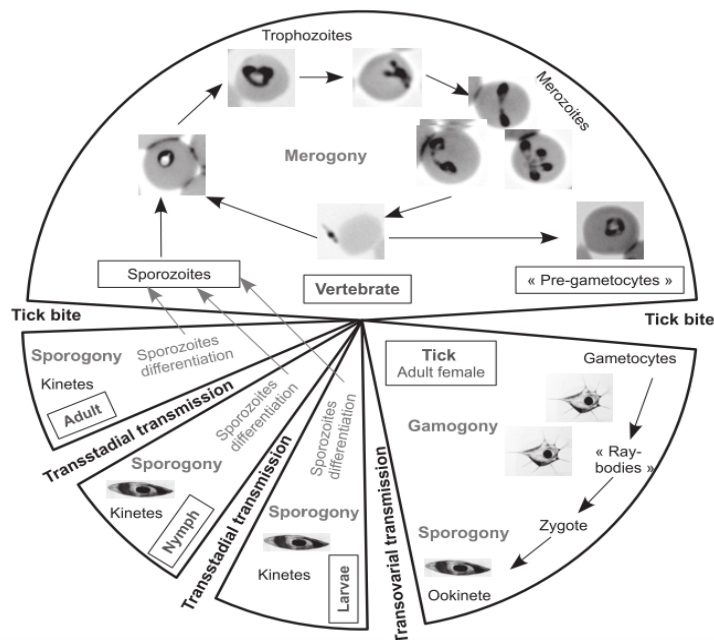


Figura 4. Ciclo de vida da *Babesia* spp. Retirado de: A. Chauvin, E. Moreau, S. Bonnetetal, 2009

Mais de 100 espécies de *B.* são responsáveis pela infecção de animais selvagens e domésticos. No entanto, apenas alguns são capazes de infectar o ser humano (40). O gênero *B.* é dividido em dois grupos: *Babesia grande* (*B. bigemina*, *B. canis*, *B. major*, *B. motasi*), na qual os merozoítos são mais compridos que o raio do eritrócito e *Babesia pequena* (*B. bovis*, *B. divergens*, *B. gibsoni*, *B. ovis*.), na qual os merozoítos são mais pequenos que o raio dos eritrócitos (41). As espécies mais responsáveis por mais infecções são: a *microti*, a *divergens* e a *venatorum* (40).

A *B. microti* é a fonte mais comum de babesiose humana (34). Há estudos que demonstram que é possível encontrar a *B. divergens* e a *B. microti* presentes em simultâneo numa carraça, sendo ambas infecciosas (42). A *B. microti* causa um estadio mais brando da doença, enquanto que, a infecção causada pela *B. divergens* provoca estadios mais avançados e graves. Um paciente na Suécia que adquiriu *B. divergens*, desenvolveu complicações graves, incluindo: coma, insuficiência renal, insuficiência respiratória, fibrilhação arterial, e colite associada ao consumo de antibióticos (43).

A espécie *B. venatorum* foi associada à infecção humana em alguns países europeus. Relatos de uma criança de 8 anos, infectada pela mesma espécie na China, descreveram febre (38° a 41°) durante 12 dias, anemia, mialgia, fadiga, cansaço, fraqueza geral e falta de ar (44).

### **3.3.2. Epidemiologia e distribuição geográfica**

A maioria dos casos de infecção por babesiose em humanos acontece em regiões de clima temperado nos Estados Unidos e na Europa (42). Na Europa, a espécie mais presente é a *B. divergens*, no entanto, estudos recentes confirmaram também a presença de *B. microti* (45).

A frequência da infecção de *B. microti* nos Estados Unidos é, provavelmente, muito superior aos números oficiais. As infecções de *B. microti* são endêmicas na zona nordeste de Grandes Lagos. No entanto, o alcance deste parasita está a alastrar (42). Ocorrem, esporadicamente, casos na Ásia, África, Austrália, Europa e América do sul (8). A taxa de mortalidade para infecções causadas por *B. microti* é de cerca de 5% nos Estados Unidos. A infecção por babesiose na Europa é considerada rara, com apenas 29 casos registados. No entanto, é uma infecção fatal com cerca de 42% de taxa de mortalidade nos países europeus (42). A construção de árvores e análises filogenéticas permitiram concluir que sequências genéticas identificadas como *B. divergens* e *B. microti* têm cadeias genéticas em comum com

as estirpes europeias, mas não com as americanas recebidas pelo banco genético (45). Alguns casos de babesiose têm sido esporadicamente descritos em outras partes do mundo, incluindo China, Tailândia, Egito, África do Sul, e México. Foram relatados vários casos de infecção por *Babesia*, adquirida através de transfusões sanguíneas nos Estados Unidos (42).

A maior parte dos casos diagnosticados ocorreram nos EUA. Só em Nova Iorque, entre o período de 1982 e 1991, 136 pessoas foram diagnosticadas com infecção causada por este parasita (45).

## 4. Diagnóstico clínico e laboratorial

### 4.1. Malária

O diagnóstico da malária é considerado difícil nos laboratórios da maioria dos países (46).

Para a otimização do processo de controlo da malária, é necessário um diagnóstico fidedigno e uma boa classificação do estadio da infeção. O diagnóstico desta doença é difícil devido à sua semelhança com outras, tais como a pneumonia e outras doenças infecciosas. Os sintomas da malária em crianças não são específicos e são semelhantes aos de outras doenças infecciosas como a meningite ou infeções bacterianas (47).

As análises microscópicas de amostras de sangue são uma ferramenta fundamental no diagnóstico da malária, devido à sua capacidade de distinguir as diferentes espécies dentro do género. No entanto, este método ainda tem aspetos a melhorar, sendo que é necessário um microscópio com ampliação de 1000x, e analistas experientes (48).

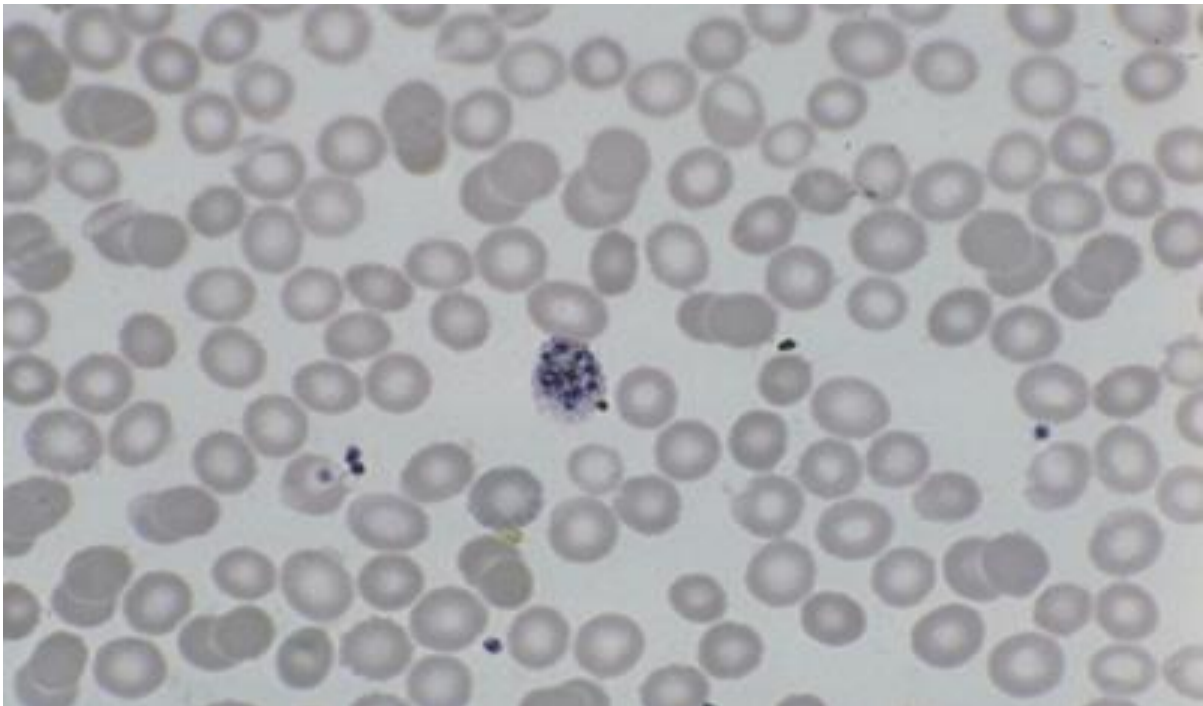


Fig. 5 Esquizonte de *Plasmodium ovale*. Retirado de: Charles Ochero Cornelio, 2011.

A amostra de sangue é, normalmente, obtida através de uma picada no dedo ou no lóbulo da orelha, pois são zonas ricas em capilares e a densidade do sangue nestas regiões é ideal, devido à quantidade de trofozoítos e esquizontes (46). Um diagnóstico fiável da malária é muito importante para diminuir a taxa de mortalidade associada a este parasita (47).

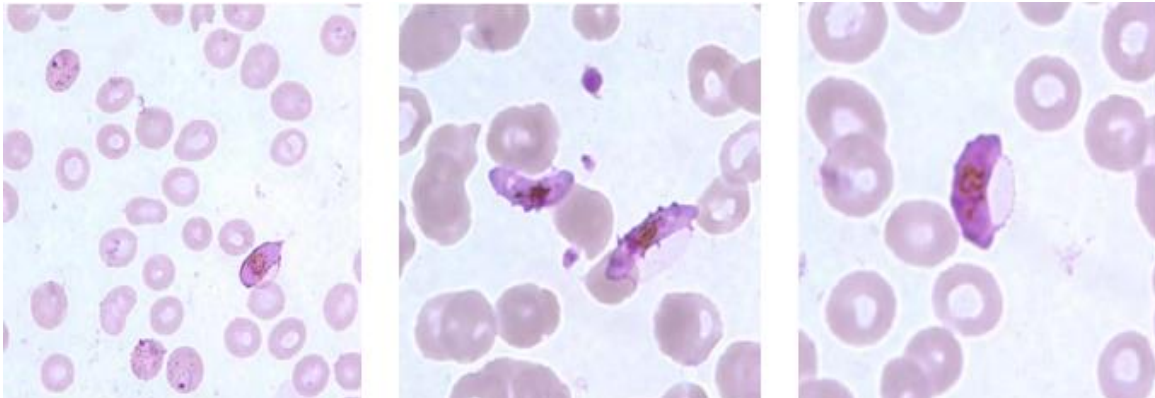


Fig. 6 Gametócitos de *Plasmodium falciparum* observados ao microscópio. Retirado de: referência 77.

Novos métodos tecnológicos para o diagnóstico deste parasita usam imunocromatografia, conjuntamente com anticorpos monoclonais, que servem de indicadores para zonas onde a infeção é mais frequente (46).

É esperado que o teste de diagnóstico rápido (TDR) tenha um impacto positivo no controlo da malária, num futuro próximo. O teste tem a capacidade de detetar imunologicamente os diferentes antígenos presentes na malária, através de enzimas como a desidrogenase láctica, a aldolase ou a *histidine-rich protein II* (HRP-2), seguindo assim o princípio de um teste de gravidez (48). A sensibilidade e especificidade do teste varia consoante o fornecedor ou consoante a espécie em estudo. Os testes diagnosticam, em média, de forma mais precisa, o *P. falciparum*, comparativamente ao *P. vivax* (49).

O TDR é um teste de fácil execução, com treino e precisão na sua execução, pode ser feito em hospitais ou em zonas rurais sem infraestruturas próprias para a deteção do parasita da malária no paciente. O aumento da utilização deste teste em situações menos ideais, em países de terceiro mundo, tem provado a estabilidade e rigor na utilização de testes comerciais de TDR sob tais condições (50).

Alguns métodos alternativos que utilizam a amplificação de ácidos nucleicos (teste de ácidos nucleicos) e marcadores serológicos estão a ser desenvolvidos. No entanto, as

ferramentas primárias de diagnóstico do parasita são o TDR e o microscópio. Os testes de amplificação de ácidos nucleicos e a tecnologia de marcadores serológicos é útil em áreas pouco endêmicas, em pesquisa epidemiológica e para questionários cujo objectivo é localizar infecções adormecidas com o intuito de prevenir futuros surtos (51).

Outras tecnologias, tais como o uso de corantes fluorescentes, têm sido utilizados com o intuito de melhorar a detecção da malária em amostras de sangue. Os corantes possuem uma afinidade por ácidos nucleicos e ligam-se ao núcleo do parasita. Quando excitados por luz ultra-violeta (UV) com o comprimento de onda apropriado, o núcleo reflete devido ao corante (46).

A *polimerase chain reaction* (PCR) é reconhecida como um dos métodos mais sensíveis na detecção do parasita da malária. Os "primers" do gene 18 S ribossómico das espécies *Plasmodium* são os mais frequentemente usados. Esta técnica tem limitações na detecção de determinados estadios do ciclo do parasita e na diferenciação dos estadios da doença.

A imunocromatografia funciona através de movimento de líquido pela superfície de uma membrana de nitrocelulose. Os testes de imunocromatografia são baseados na captura do antígeno do parasita do sangue, através da utilização de anticorpos monoclonais especificamente preparados para ele, enviando para um lipossoma com um corante (selénio) ou partículas douradas durante a fase móvel. Durante a fase imóvel, o anticorpo monoclonal é aplicado à tira de nitrocelulose. A migração do complexo antígeno-anticorpo na fase móvel, na tira, permite ao antígeno ser capturado pelo anticorpo monoclonal na fase imóvel, produzindo um linha colorida visível (46).

## **4.2. Toxoplasmose**

Existem quatro grupos cujo diagnóstico de toxoplasmose é crítico: mulheres grávidas que adquiriram a infecção durante a fase gestativa, fetos e recém-nascidos, pacientes com imunodeficiência e com coriorretinite (52). As ferramentas de diagnóstico escolhidas dependem do histórico do paciente, dos sinais clínicos da doença e do estadio da mesma, podendo indiretamente ser utilizados anticorpos de diferentes isótopos ou, diretamente, detetando parasitas ou ADN (31).

A detecção do *T. gondii* em fezes, em água, no meio ambiente e em amostras de tecidos tem sido possível através do exame microscópico (53).

A técnica mais comum, e a mais utilizada, é o microscópio de luz de campo aproximado, onde amostras de tecido são colocadas em lâminas e coradas com substâncias ácidas, básicas e corantes reativos para promover várias características das células (54).

Os métodos de coloração *May-Grunwald-Giemsa* (MGG) e hematoxilina e eosina são simples e economicamente viáveis, como tal são frequentemente utilizados para a detecção do *Toxoplasma*.

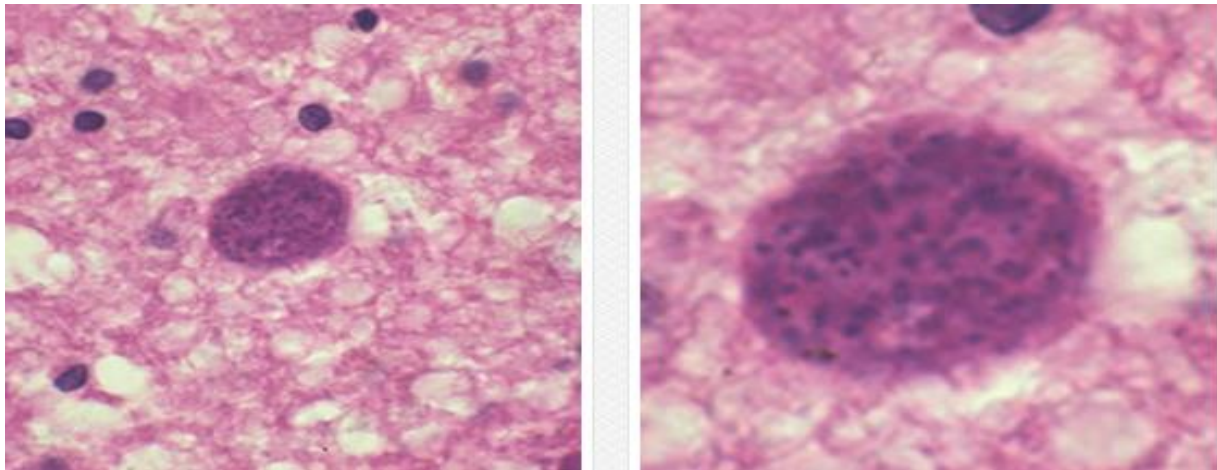


Fig. 7 Quisto de *Toxoplasma gondii* em tecido cerebral, colorado com hematoxilina e eosina. Retirado de: referência 77.

O método de coloração periódico ácido-schiff pode tingir grânulos de amilopectina nos bradizoítos (53). Para que as estruturas subcelulares sejam visíveis e para melhorar a sua resolução de imagem a elevadas percentagens de ampliação são utilizados feixes de electrões, criando assim uma tecnologia conhecida como microscopia electrónica (54).

A detecção do *T. gondii* em amostras biológicas pode ser feita através de técnicas moleculares, pela análise de material genético. Um fragmento do genoma pode ser amplificado por PCR, permitindo a observação do mesmo num gel de agarose ou de poliacrilamida, após ser tingido num sequenciador de laser automático ou, diretamente, por ampliação do produto através do método PCR em tempo real (55).

O imunoensaio enzimático de fase sólida, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), uma técnica concebida para detetar anticorpos, é uma alternativa na qual os produtos da PCR são hibridizados por uma sonda. Esta técnica tem sido utilizada para identificar as infeções das diferentes estirpes de *T. gondii* através da junção de cadeias pépticas sintéticas com mediadores químicos.

A recombinação dos antígenos pode também ser usada na técnica de serotipagem. A serotipagem é um método rápido, barato, relativamente não invasivo e não é necessário isolar os parasitas. Posto isto, esta técnica tem o potencial de vir a ser o método de eleição para identificar o *T. gondii* (53).

Nos últimos anos, a comunidade científica tem apostado no desenvolvimento e aperfeiçoamento de novos métodos de diagnóstico para infeções em mulheres grávidas e infeções congénitas no feto. Alguns dos métodos desenvolvidos com sucesso para tal fim são: o teste de imunoglobulina G, o teste PCR para tecidos e fluidos humanos e o teste "western blot" para soro mãe-bebé. Atualmente os dois primeiros acima mencionados estão a ser utilizados em larga escala, em toda a Europa (52). O diagnóstico pré-natal utiliza quase sempre o teste PCR com base na deteção do ADN do parasita, no entanto, por vezes o líquido amniótico também é inoculado em ratos (31).

É fundamental ter informação sobre a mãe, em regiões onde não existem programas de despistagem, podendo assim evitar a realização de testes desnecessários em crianças que não teriam risco de infeção. A realização desses mesmos exames desnecessários atrasa também o tratamento de crianças em que realmente há infeção.

A escassez de tratamento maternal em regiões sem programas de despistagem é uma razão para a utilização da PCR no diagnóstico de pacientes neonatais, devido à alta afinidade do teste (56). Após o nascimento, o recém-nascido é submetido a exames clínicos e neurológicos completos. Um exame chamado ultrassom transfontanelar é realizado, de forma a detetar calcificações cerebrais, podendo assim ser complementado com tomografia computadorizada em caso de anormalidades, no entanto, a eficácia da tomografia computadorizada é debatível. Por norma, durante a primeira semana de vida é feito um exame ao fundo ocular, que é repetido entre 3 a 4 meses dependendo da região no qual é executado. É importante a constante supervisão do recém-nascido, principalmente se não foi executado rastreio pré-natal ou se o resultado foi negativo (31).

### **4.3. Babesiose**

O diagnóstico da babesiose é feito com base no historial médico e epidemiológico, no exame físico, e em testes laboratoriais. O exame diagnóstico da babesiose deve ser considerado quando o paciente tem um historial de viagens e/ou habita numa das zonas endémicas do parasita, recebeu uma transfusão de sangue nos passados seis meses e

demonstra sintomas semelhantes aos do mesmo. Informação sobre uma possível exposição a carrapatos pode ser útil, no entanto a picada desta nem sempre é perceptível (8).

A infecção é considerada positiva, se o agente patogénico ou o material genético do parasita for encontrado no sangue. As amostras de sangue são frequentemente examinadas durante o diagnóstico laboratorial. A percentagem de glóbulos vermelhos infetados é, por norma, muito baixa, raramente excedendo os 5% em pacientes sem imunodeficiências, no entanto, no caso de pacientes com problemas esplénicos pode exceder os 85% (9).

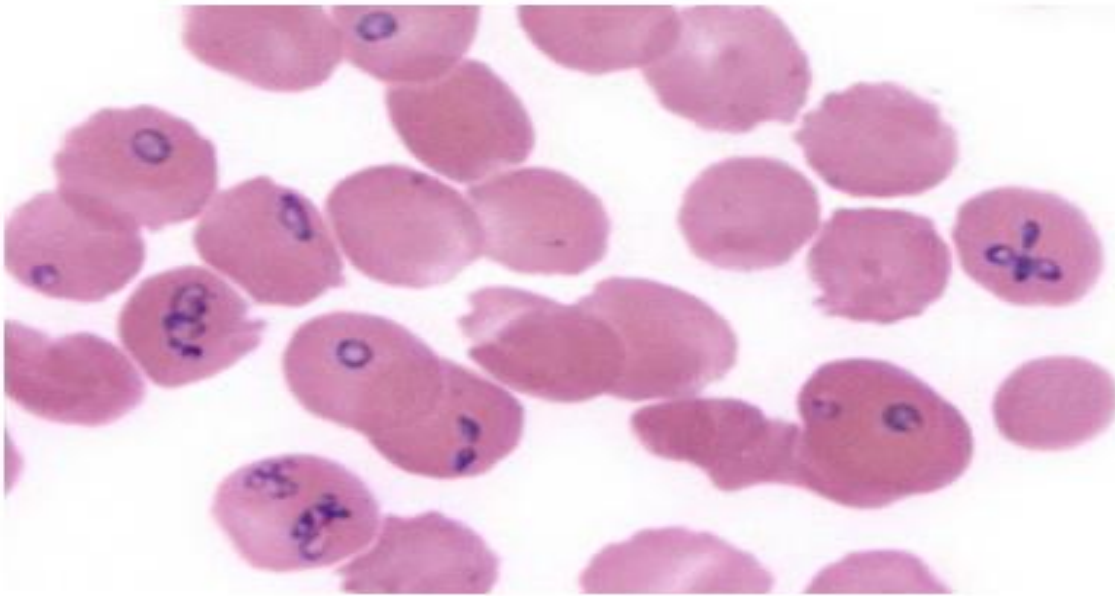


Fig 8. Amostras de sangue coradas com may-grunwald-giemsa mostrando 30% dos eritrócitos parasitados com *Babesia divergens*. Retirado de: Morch, K. et al, 2015.

Os trofozoítos do género *Babesia* podem ser redondos, ovais ou em forma de pêra e possuem um citoplasma azul com a cromatina vermelha. As formas anelares são as mais comuns, sendo bastante semelhantes às dos estadios iniciais dos trofozoítos do *P. falciparum*. As principais diferenças entre a *Babesia* e o *Plasmodium* são a ausência de depósitos de hemozoína nas formas anelares, a ausência de gametócitos em forma de "banana" e a presença de tétrades (8).

A parasitose pode continuar detetável no sangue entre 3 e 12 semanas, sendo que o período mais longo em que uma análise ao sangue deu positivo foi de 7 meses, após esplenectomia. Por norma, as análises sanguíneas são um teste bastante subjetivo, cujo resultado pode variar com a experiência do observador e o tempo que demora a analisar a amostra (42).

O diagnóstico da babesiose é, normalmente, feito através do exame de sangue após coloração com MGG, em que as formas intra-eritrocitárias anelares são observadas e, ao mesmo tempo, um exame serológico é utilizado para confirmar o diagnóstico do observador (43).

Um dos métodos mais comuns na detecção de protozoários da babesiose é a PCR ou o poliformismo de fragmentos de restrição de produtos da PCR (43,55). A escolha de marcadores genéticos apropriados para a detecção de ADN da babesiose é extremamente importante. Ao contrário da maioria dos patógenos transmitidos pela carraça, tal como a *B. burgdorferi*, o genoma da babesiose ainda não foi completamente sequenciado (45).

O teste de PCR é recomendado quando a espécie não é identificável nas análises sanguíneas, ou quando o diagnóstico não é conclusivo e o paciente apresenta sintomas indicativos de babesiose (9). É também considerado um teste mais sensível para infeções da *B. microti* e providencia informação sobre as características moleculares da espécie da *Babesia*. O aparecimento do teste PCR em tempo real baixou consideravelmente os limites da detecção dos testes diagnóstico. Ao injetar sangue do paciente em pequenos animais de laboratório (como roedores), o diagnóstico pode ser confirmado e a sequência genética do organismo amplificada, no entanto este método diminui a sensibilidade do diagnóstico, não é economicamente favorável e demora mais em relação ao método PCR (8).

Nos Estados Unidos da América, os testes serológicos e o ensaio de imunofluorescência (IFA) são utilizados para o diagnóstico da babesiose. Estes testes são difíceis de serem utilizados na Europa, devido à especificidade dos antígenos da babesiose, onde a maioria das infeções são causadas pela *B. divergens* e *B. venatorum* (9).

Os testes serológicos são utilizados para apoiar ou confirmar um diagnóstico. O teste IFA de detecção indireta é o teste serológico mais comum para a babesiose. Outros testes também utilizados são a ELISA e o "western blot" (8).

Os anticorpos são detetáveis assim que o paciente é diagnosticado pela primeira vez com *B. microti*. Os níveis de anticorpos podem manter-se elevados por um período de 13 meses a 6 anos, após a infeção. Elevados títulos de anticorpos não são necessariamente sinal de infeção, no entanto, os níveis do anticorpo IgG descem de forma menos acentuada em pacientes com infeções durante mais de 6 meses (principalmente infeções de *B. microti*) (42).

O antígeno utilizado na detecção da babesiose deve ser específico, quanto à espécie do parasita presente numa dada região. Por exemplo, um teste com o anticorpo *B. duncani* não

seria apropriado numa região endêmica da *B. microti*, onde a presença do *B. duncani* fosse inexistente. Também os valores dos anticorpos que definem se o teste serológico é positivo, diferem de espécie para espécie. O teste de anticorpos da babesiose não é útil em casos de infecções fulminantes como a da *B. divergens* porque nos estádios iniciais da infecção o teste dá negativo (8).

## 5. Medidas terapêuticas e profilaxia

### 5.1. Malária

Estão disponíveis vários medicamentos, no mercado, para o tratamento da malária, incluindo a cloroquina, a sulfadoxina/pirimetamina (SP) (50mg/kg + 2,5mg/kg), e a quinina, mostrando-se eficientes em várias partes do mundo (58).

A medicação anti-malária afeta e mata os parasitas da malária, limitando assim a infecção e as suas consequências patológicas. As mudanças na densidade do parasita que ocorrem após o tratamento anti-malária podem ser utilizadas para avaliar a eficácia do tratamento (59,76).

A adaptação dos parasitas da malária à medicação tem sido um problema para o controlo de zonas endêmicas. Observa-se resistência em estirpes como o *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (60).

Nos últimos quatro anos, tem sido recolhida informação sobre a segurança dos tratamentos atuais em mais de 10 mil estudos. Para detetar e diminuir os riscos de situações de estirpes raras, que colocam outros em risco de vida, e de eventos adversos, são necessários estudos em larga escala, e as zonas endêmicas com números suficientes para tal não proporcionam o "feedback" e a informação necessária (58). O desenvolvimento de tratamentos anti-malários pode seguir vários caminhos, sendo que pode variar desde pequenas modificações em agentes existentes até ao desenvolvimento de novos agentes, que agem contra novos alvos. Estão a ser combinados agentes já existentes, a fim de melhorar regimes medicamentosos anti-malária (61). A combinação de tratamentos medicamentosos pode limitar a resistência do parasita, no entanto, esta técnica não é infalível (62).

O fator mais importante a considerar no desenvolvimento de novos tratamentos anti-malária é o fator económico. As restrições financeiras são relevantes em medicação anti-

malária porque a medicação deve ser barata de modo a ser acessível ao comum da população em países em desenvolvimento (61). Os compostos que são utilizados em combinações com o intuito de atuar num radical têm de ter um efeito potente e serem bem tolerados. Há um aumento na quantidade máxima da concentração de plasma quando o tratamento é dado numa única dose (58).

A artemisinina é obtida através da erva *artemisininaannua*, utilizada na medicina chinesa. A estrutura deste composto é a *sesquiterpenlactona*, que contém uma ponte interna de peróxido, tornando-o diferente de outros compostos. Alguns dos derivados, tais como o artesunato, o arteméter, o artemimol, o ácido artelínico e outros, são mencionados como derivados semi-sintéticos (63).

As terapias que têm uma base de artemisinina são as mais utilizadas hoje em dia no tratamento da malária. Os derivados da artemisinina são de ação rápida, como tal, são misturados com compostos que diminuem a velocidade de atuação nos parasitas (62). A artemisinina é eficaz no tratamento de parasitas, tumores, inflamações, e bactérias. No que diz respeito a parasitas, não só se mostra eficaz no combate ao *P. falciparum*, como também a estirpes da *Babesia*, da *Eimeria*, da *Leishmania*, a infeções coccidianas, a esquistossomoses e a estirpes do *Toxoplasma* (64). Os derivados da artemisinina podem ser administrados por via oral, intravenosa, intramuscular e retal. Alguns casos têm apresentado neurotoxicidade, no entanto, está linearmente relacionada com a forma de administração e com a formulação (63).

Ao longo dos anos têm sido descobertas algumas falhas e deficiências no tratamento com artemisina, como tal, têm sido produzidos diferentes derivados para tratamento de patologias específicas com o intuito de aumentar os efeitos da mesma. Alguns desses derivados, indicados anteriormente, são a dihidroartemisinina (combinada com piremaquina 0,3mg/kg + 0,039 mg/kg durante 3 dias), artesunato (0,2mg/kg, uma vez por dia, durante 3 dias), o arteméter, ácido artelínico, artemisida, artemisona, entre outros (64,76). A combinação de um derivado da artemisinina com substâncias de desgaste lento têm a capacidade de curar a malária numa única dose de administração (62).

Em infeções pelo *P. vivax* e *P. ovale*, os esporozoítos formam uma fase dormente chamada de hipnozoítos, responsáveis pelo reaparecimento da malária por vezes semanas ou meses, após a infeção. Atualmente, os hipnozoítos, só podem ser tratados com 8-aminoquinolona (59).

A cloroquina combate a malária através de uma interferência na formação da hemozoína nos vacúolos digestivos do parasita. A hemozoína é um derivado cristalino do grupo heme

produzido pelo parasita, sendo uma forma de expelir o heme tóxico, resultante da digestão da hemoglobina (62).

A doxiciclina (100/mg/dia) é recomendada para a malária quimo-profilática durante viagens em zonas endêmicas, ou em combinação com quinina para o tratamento da malária no caso de indisponibilidade da terapêutica combinada com artemisinina (TCA) (65).

A amodiaquina também é eficaz no tratamento da grande maioria de estirpes resistentes à cloroquina, no entanto, a hepatite, a mielotoxicidade e a agranulocitose conseguem diminuir a capacidade de tratamento. A amodiaquina é absorvida rapidamente após a administração oral e é rapidamente metabolizada (62). Pessoas que já tiveram uma infecção por malária adquirem uma imunidade antitóxica, que resulta num aumento da tolerância e da densidade parasitária, sem apresentar sintomas de infecção (59).

Tem existido algum avanço científico no desenvolvimento de vacinas para a malária durante a última década. Após um estudo com 3 ensaios, em sete países africanos, a vacina eritrocitária RTS,S/AS01 recebeu a aprovação na comunidade europeia pela Agência Europeia do Medicamento e será colocada no mercado para venda em grandes quantidades (66).

## **5.2. Toxoplasmose**

Assim que a toxoplasmose é identificada através de diagnósticos de imagem e de testes serológicos, o tratamento é iniciado, e o progresso do tratamento é monitorizado clinicamente e através de tomografia computadorizada (67).

A escolha de diagnósticos, prevenção e tratamentos apropriados reduzem possíveis propagações de toxoplasmose congênita (34).

O tratamento atual do *T. gondii* e da *B. microti* é feito através de medicamentos utilizados no tratamento da malária. O exame do genoma do parasita, dos meios de transmissão, do ciclo de vida, dos hospedeiros e da manifestação da doença demonstra uma grande diversidade biológica dos parasitas (68).

Não existe atualmente nenhum tratamento que seja considerado mais aceite pela comunidade científica para o tratamento da toxoplasmose (69). A grande distribuição mundial do *T. gondii* e os escassos recursos existentes para controlar esta infecção são sinais da atual necessidade de um tratamento administrado por via oral, que tenha uma formulação

quimicamente estável e de baixo custo de produção (68).

O tratamento da toxoplasmose é problemático porque os atuais tratamentos existentes no mercado não têm a capacidade de erradicar a fase latente da infecção do *T. gondii*, podendo assim provocar toxicidade na medula óssea (30).

A penetração do *T. gondii* atravessa a barreira hemato-encefálica, criando a infecção durante a fase dos bradizoítos (fase resistente ao tratamento) (68), no entanto, alguns métodos de tratamento, têm sido experimentados, tais como a espiramicina, a azitromicina, a medicina tradicional chinesa, a combinação pirimetamina-sulfadiazina (P-S) (uma toma única de 100 mg, seguido de toma diária de 50 mg + 1g por dia de 4 em 4 horas), a combinação trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX), e a combinação pirimetamina-clindamicina (P-C) (69). A infecção na fase latente permanece por vezes após o tratamento. As recaídas são situações comuns em pacientes imunologicamente debilitados e em pacientes infetados por via congénita (30).

O tratamento ideal da toxoplasmose teria que ser eficaz terapêuticamente quer a nível sistémico, quer no cérebro e olhos, de modo atingir todos os órgãos afetados pela infecção. Teria que ser eficaz contra a fase aguda de replicação dos taquizoítos, bem como contra a fase latente dos bradizoítos (68).

Não existem atualmente tratamentos aprovados para grávidas infetadas (70). A primeira linha de tratamento consiste na combinação P-S (68) com acidoredutase, e sulfadiazina (71). O *leucovorin* pode também ser adicionado, a fim de impedir, ou diminuir, a toxicidade hematológica (68).

Durante o tratamento do *Toxoplasma* encefálico, a utilização de sulfadiazina-sulfonamida, que é utilizada como primeira linha, demonstra melhorias de 70 a 90% (69). A atovaquona e a azitromicina são, por vezes, utilizadas como alternativas ao tratamento anteriormente referido, em combinação com pirimetamina ou sulfadiazina, no tratamento e profilaxia da toxoplasmose, em casos onde o tratamento com P-S é contra indicado (68).

Quando pacientes portadores de doenças crónicas se encontram imunocomprometidos, os bradizoítos têm a capacidade de se reativar, causando encefalite e pneumonia. Atualmente não existe cura para eliminar a fase do bradizoíto do *T. gondii* (30). A encefalite toxoplasmática é normalmente tratada com sulfonamida em combinação com outros medicamentos, em pacientes infetados com VIH (69).

A toxoplasmose ocular é progressiva, com constante necrose da retina, causando assim complicações visuais tais como o deslocamento da mesma, neovascularização coroidal e glaucoma (72). Os corticóides têm sido utilizados durante anos no tratamento da retinocoroidite toxoplásmica, sendo que o seu mecanismo de tratamento é o impedimento da reação inflamatória que acompanha a doença (73).

Uma razão para uma elevada falha no tratamento é a resistência à medicação, e é difícil quantificar a resistência a este parasita pois, por norma, não é possível extrair o *T. gondii* de pacientes com toxoplasmose. Outras razões para a impossibilidade de se quantificar a falha no tratamento do parasita são a limitação da maioria dos diagnósticos, a tolerância ao medicamento, a falta de adesão à terapêutica, as variáveis de absorção da mesma e a morte dos pacientes (68).

É prioritário o desenvolvimento de vacinas que atuem no *T. gondii*, dadas as áreas endêmicas do mesmo tais como a América do sul, e a escassez de terapêuticas sem graves efeitos secundários (74).

Tabela 1. Lista de medicamentos mais comuns utilizadas contra a toxoplasmose. Adaptado de: A. Neville, et al. 2015

<b>Medicamentos</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
Pirimetamina Trimetoprim (usualmente combinado com o sulfametoxazol) Dapsona, sulfadiazina, sulfadoxina, sulfametoxazol	Antifolatos
Clindamicina Acetilespiramicina, azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, espiramicina, telitromicina e tilosina	Inibição da síntese proteica.
Atovaquona	Inibição da cadeia transportadora de elétrons (na mitocôndria)
Doxicilina, minociclina	Inibição da divisão do apicoplasto

### 5.3. Babesiose

A maioria dos tratamentos e recomendações para a babesiose humana é direcionada para infecções do *B. microti* e *B. divergens* (9). A maioria dos casos de infecção por *B. microti* são ligeiras e são normalmente controladas e curadas sem tratamento (42). Por norma, a utilização de terapêuticas contra a malária são usadas em quimioterapia. Alguns dos medicamentos utilizados são: atovaquona, quinina, azitromicina e a clindamicina (9).

O tratamento recomendado para infecções ligeiras e moderadas da babesiose é a combinação de atovaquona com azitromicina durante 7 a 10 dias. Existem, no entanto, casos raros de resistência a esta combinação de tratamento, sendo que, na maioria dos casos se demonstra um tratamento eficaz (8). A combinação da clindamicina e quinina é a optada em pacientes com os seguintes fatores de risco: mais de 50 anos, esplenectomia, neoplasia, infecção por HIV ou terapia imunossupressora (43, 8). Este regime terapêutico, em específico, foi descoberto durante o tratamento de um caso de uma presumida infecção por malária transmitida através de uma transfusão sanguínea (42).

Para além da combinação clindamicina/quinina têm sido observadas como sendo eficientes várias combinações no tratamento de pacientes imunodeprimidos.

Algumas dessas combinações alternativas são: atovaquona-proguanil, atovaquona, clindamicina-doxiciclina, artemisinina, atovaquona, azitromicina-clindamicina e azitromicina-quinina (8). Por norma, as medicações que provocam menos efeitos secundários, não são tão eficientes no tratamento da babesiose, como por exemplo a cloroquina, não sendo, assim, utilizados para esse fim. Apesar desta provocar menos efeitos secundários do que, por exemplo, a quinina, não é eficiente no tratamento das infecções causadas por *B. microti* (9).

As infecções provocadas por *B. divergens* requerem cuidados médicos imediatos, geralmente o tratamento inclui transfusão sanguínea com administração intravenosa de clindamicina e administração oral de quinina, com o intuito de parar a hemólise e prevenir uma insuficiência renal (42). Alguns medicamentos antiprotozoários e antibacterianos tais como a primaquina, a quinacrina, a pirimetamina, a sulfadoxina-pirimetamina, o artenusato, a sulfadiazina, a tetraciclina, a minociclina, a pentamidina ou a combinação trimetoprim-sulfametoxazol são ineficazes no tratamento da babesiose causada por *B. microti* e *B. divergens* (9).

Existem relatos de terapêuticas com outros agentes que demonstraram sucesso, tais como a pentamidina e o cotrimoxazol, contudo, os efeitos secundários da pentamidina tornam-na uma terapêutica menos utilizada (42).

Um caso de infeção de *B. divergens* foi tratado com sucesso através de uma mistura de pentamidina administrada por via intravenosa e a combinação trimetoprim-sulfametoxazol administrada por via oral (8).

A única vacina que contém a excreção-secreção de antigénios, deriva da cultura de parasitas *in vitro* e a sua produção é bastante cara e difícil (75).

A babesiose pode ser prevenida ao evitar o contacto com áreas onde existem carraças, veados e ratos. A utilização de dietiltoluamida, dimetilftalato, ou permetrina como "spray" na roupa é recomendada a indivíduos que visitem as zonas endémicas deste parasita. Deve ser feita uma inspeção frequente quanto à presença de carraças no corpo do indivíduo (8).

## 6. Resultados e discussão

Os parasitas têm a capacidade de se adaptar ao hospedeiro e de coexistir com ele, assegurando que retirem o máximo partido do mesmo. Este tipo de interação resulta, por norma, em sintomas patológicos da parte do hospedeiro.

A malária é uma das doenças que mais mortes causa e que mais impacto tem a nível da saúde pública. Existem apenas 4 espécies de *Plasmodium* capazes de infetar seres humanos e cerca de 100 espécies capazes de infetar répteis, pássaros e vários mamíferos. Os sintomas mais frequentes da malária são: a enxaqueca, calafrios, náuseas e dores musculares, podendo ocorrer também anemia devido à diminuição do número de glóbulos vermelhos.

Fatores que contribuem para o risco de malária são: o ambiente, o próprio setor biológico dos vetores e dos parasitas, e a susceptibilidade do hospedeiro humano.

O diagnóstico da malária passa essencialmente pela análise microscópica de esfregaços de sangue, através da picada do dedo ou do lóbulo da orelha por serem zonas muito ricas em capilares. Existem vários medicamentos disponíveis capazes de matar os parasitas que provocam malária, como por exemplo a cloroquina e a sulfadoxina em combinação com a pirimetamina. No entanto, algumas estirpes de *Plasmodium* têm estado a desenvolver resistência .

A toxoplasmose pode ser contraída através da ingestão de alimentos mal cozinhados ou crus, pelo consumo de bebidas contaminadas por oócitos e quistos ou pelo contato com fezes de animais domésticos. O risco de infeção pode estar associado a zonas de temperaturas e humidades elevadas.

Existem 3 diferentes estirpes de toxoplasmose, que têm padrões diferentes de crescimento e expansão.

Assume-se que 25 a 30% da população mundial possa estar infetada com toxoplasmose.

Relativamente a grávidas, se a infeção ocorrer 3 meses antes da gravidez, o feto não se encontra em risco de a poder adquirir. Se a infeção for contraída há menos de 3, antes da gravidez, o feto encontra-se em risco de contrair a infeção. A existência de meios de diagnóstico, a prevenção e tratamentos adequados previnem a propagação de toxoplasmose congénita.

O tratamento da toxoplasmose é efetuado, atualmente, com os medicamentos utilizados no tratamento da malária, e não existe um que seja mais aceite pela comunidade científica. No entanto, neste momento não existe nenhum tratamento capaz de erradicar a fase latente da infeção, podendo assim ocorrer toxicidade na medula óssea.

A babesiose humana é transmitida através da carraça, causada por um protozoário do género *Babesia*. Os sintomas da babesiose são: fadiga, fraqueza generalizada, dor abdominal, náuseas, vómitos, fotofobia e anorexia.

As espécies mais responsáveis por infeções são: a *microti*, a *divergens* e a *venatorum*. A maioria dos casos de infeções em humanos acontece em regiões de clima temperado.

O diagnóstico da babesiose é efetuado com base no historial médico e epidemiológico, no exame físico e em testes laboratoriais. Testes serológicos são usados para apoiar ou confirmar o diagnóstico.

O tratamento recomendado para infeções ligeiras a moderadas, na babesiose, é a combinação de atovaquona com azitromicina durante 7 a 10 dias. Existem outras medicações alternativas consoante a resistência do parasita ou o estado da infeção, tais como: quinina, clindamicina, artemisinina, entre outras.

A babesiose pode ser prevenida ao evitar o contacto com áreas onde existam carraças, e é recomendada a utilização de DEET, ou permetrina como "spray" na roupa para indivíduos que visitem zonas endémicas deste parasita.

## 7. Conclusão

A malária causada pela estirpe *P. falciparum* é uma causa de elevada mortalidade todos os anos quer em zonas tropicais como subtropicais. O maior foco está a ser direccionado para a estirpe *falciparum*, como tal, as outras estirpes acabam por ser negligenciadas. Há uma enorme necessidade quanto à criação de novos medicamentos e de vacinas que tenham a capacidade de interromper consistentemente e substancialmente o ciclo de vida dos parasitas.

Vários avanços foram acontecendo ao longo dos últimos 20 anos na compreensão da toxoplasmose, contudo grande parte do trabalho permanece inacabado, pois, na globalidade, não existe ainda um conhecimento total dos mecanismos moleculares na fase latente e no impacto da infeção crónica no hospedeiro. Apesar do leque de medicação existente, para o tratamento da toxoplasmose, seja ela congénita, cerebral ou ocular, há a necessidade de desenvolver tratamentos que não possuam tantos efeitos secundários e que contenham agentes capazes de atuar na fase latente da infeção. A melhor forma de travar a toxoplasmose continua a ser a prevenção. Deve-se, por isso, evitar principalmente o consumo de alimentos crus e o contacto direto com fezes de animais domésticos.

A epidemiologia de Babesia varia, e está em constante mudança. Não existe atualmente nenhum aumento dos casos de babesiose humana na Europa, no entanto, existe um número elevado de casos de Borreliose de Lyme, que é igualmente transmitida pela carraça. O diagnóstico e tratamento são ferramentas importantes no controlo da babesiose. Os métodos de diagnóstico através da observação microscópica são os mais rápidos e baratos, no entanto, não são métodos muito específicos nem sensíveis.

## 8. Perspetivas futuras

No caso da malária, terá que haver uma compreensão do mecanismo de transmissão do parasita no hospedeiro humano, tal será essencial na eliminação e controlo da doença, especialmente nas zonas endémicas. A eliminação e o controlo desta infeção recaem sobre o desenvolvimento de novas terapêuticas, quer sejam medicamentos, vacinas, vetores geneticamente alterados. O desenho de fármacos antimaláricos dirigido a apicoplastos, é uma nova dimensão no desenvolvimento de fármacos parasitários. Foram já identificados compostos com alvos direccionados ao apicoplasto. Se estas opções forem bem sucedidas nos ensaios clínicos, irão contribuir para um enorme avanço no desenvolvimento de novos fármacos. Para tal há necessidade de um investimento bastante elevado, de modo a podermos garantir o sucesso do desenvolvimento do mesmo e a total compreensão da biologia e epidemiologia dos parasitas que causam malária.

Relativamente à toxoplasmose, devemos aprofundar o estudo da formação dos braziozóitos e a eliminação de quistos tecidulares durante a infeção do *Toxoplasma*.

É possível desenvolver um mutante do *Toxoplasma* não virulento, com o intuito da criação de uma vacina. Este desenvolvimento seria especialmente útil no controlo da propagação deste parasita, em animais. O diagnóstico da toxoplasmose é conseguida, na maioria das situações, com as ferramentas e tecnologias que possuímos atualmente, no entanto, a pesquisa e desenvolvimento de novos biomarcadores que indiquem automaticamente a presença deste parasita seria extremamente útil para os casos raros e de difícil diagnóstico, como por exemplo nas infeções oculares e cerebrais.

Quanto à babesiose, podemos observar frequentemente casos de infeção nas populações de alto risco e assim, nestes casos, a prevalência de doença refratária ou persistente irá aumentar. Há então uma necessidade acrescida da combinação de medicamentos já existentes no mercado, de um prolongamento dos tratamentos e terá de haver uma diminuição da utilização de terapêuticas imunossupressoras. O projeto *Anti-tick Vaccines to Prevent Tick-borne Diseases in Europe* está a identificar antígenos da carraça que podem servir como candidatos para vacina. Todos estes fatores poderão ser vitais para a erradicação dos parasitas do género *Babesia*.

## 9. Referências bibliográficas

1. Cholewiński M, Derda M, Hadaś E. Parasitic diseases in humans transmitted by vectors. *Ann Parasitol.* 2015;61(3):137–57.
2. Pearson RD. Antiparasitic Therapy. *Goldman's Cecil Med Twenty Fourth Ed.* 2011;2009–13.
3. Tuteja R. Malaria - An overview. *FEBS J.* 2007;274(18):4670–9.
4. Owens S. Malaria and the Millennium Development Goals. 2015;100(Suppl 1):2013–7.
5. Purdy M, Robinson M, Wei K, Rublin D. Perspective Piece : The Economic Case for Combating Malaria. 2013;89(5):819–23.
6. Francisco M, Claudia M-Z, Marisa T, Oslando P. Toxoplasmosis, zoonosis parasitaria prevalente en Chile: recuento y desafíos. *Rev Chil infectología.* 2015;32(5):541–9.
7. Weiss L, Dubey J. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol.* 2009;39(8):895–901.
8. Vannier EG, Diuk-Wasser MA, Ben Mamoun C, Krause PJ. Babesiosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2015;29(2):357–70.
9. Health P, Health P. Department of Medical Parasitology Department of Virology. 2015;489–94.
10. Chatelain E, Konar N. Translational challenges of animal models in chagas disease drug development: A review. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:4807–23.
11. Tanowitz HB, Machado FS, Spray DC, Friedman JM, Oren S, Lora JN, et al. Developments in the management of Chagas cardiomyopathy. 2016;13(12):1393–409.
12. Srivastava S, Shankar P, Mishra J, Singh S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2016;9(1):277.
13. Hefnawy A, Berg M, Dujardin JC, De Muylder G. Exploiting Knowledge on Leishmania Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs. *Trends Parasitol.* 2017;33(3):162–74.
14. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell* 2016;167(3):610–24.
15. Rénia L, Goh YS. Malaria parasites: The great escape. *Front Immunol.* 2016;7(NOV):1–14.
16. Bassat Q, Velarde M, Mueller I, Lin J, Leslie T, Wongsrichanalai C, et al. Key knowledge gaps for Plasmodium vivax control and elimination. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(Suppl 6):62–71.
17. Sinden RE. The biology of malaria transmission. *Adv Malar Res.* 2016;(1):600.

18. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: Parasite and disease. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(4):579–92.
19. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium ovale*: Parasite and Disease. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(3):570.
20. Mauritz JMA, Esposito A, Ginsburg H, Kaminski CF, Tiffert T, Lew VL. The Homeostasis of *Plasmodium falciparum*-Infected Red Blood Cells. *PLoS Comput Biol.* 2009;5(4):11–4.
21. Prugnolle F, Durand P, Ollomo B, Duval L, Ariey F, Arnathau C, et al. A fresh look at the origin of *Plasmodium falciparum*, the most malignant malaria agent. *PLoS Pathog.* 2011;7(2).
22. Tucker Lima JM, Vittor A, Rifai S, Valle D. Does deforestation promote or inhibit malaria transmission in the Amazon? A systematic literature review and critical appraisal of current evidence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017;372(1722):20160125.
23. Kumar DS, Andimuthu R, Rajan R, Venkatesan MS. Spatial trend, environmental and socioeconomic factors associated with malaria prevalence in Chennai. *Malar J.* 2014;13:14.
24. White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J.* 2011;10(1):297.
25. Autino B, Noris A, Russo R, Castelli F. Epidemiology of malaria in endemic areas. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012;4(1).
26. Howes RE, Battle KE, Mendis KN, Smith DL, Cibulskis RE, Baird JK, et al. Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(Suppl 6):15–34.
27. Zhang Q, Lai S, Zheng C, Zhang H, Zhou S, Hu W, et al. The epidemiology of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria in China, 2004–2012: from intensified control to elimination. *Malar J.* 2014;13(1):419.
28. Dalimi A, Abdoli A. Latent toxoplasmosis and human. *Iran J Parasitol.* 2012;7(1):1–17.
29. Zhou Y, Zhang H, Cao J, Gong H, Zhou J. Epidemiology of toxoplasmosis: role of the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Infect Dis poverty.* 2016;5(1):14.
30. Murata Y, Sugi T, Weiss LM, Kato K. Identification of compounds that suppress *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites. 2017;1–14.
31. Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(2):264–96.
32. Halonen SK, Weiss LM. Toxoplasmosis. Vol. 114, *Handbook of clinical neurology.* 2014. 125–145 p.

33. Galvan-ramirez MDL, Troyo R, Roman S, Calvillo-sanchez C. A systematic review and meta-analysis of *Toxoplasma gondii* infection among the Mexican population. 2012;1–12.
34. Daniell H. NIH Public Access. 2012;76(October 2009):211–20.
35. Xiao J, Jones-Brando L, Talbot CC, Yolken RH. Differential effects of three canonical *Toxoplasma* strains on gene expression in human neuroepithelial cells. *Infect Immun*. 2011;79(3):1363–73.
36. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*. 2000;30(12–13):1217–58.
37. Bojar I, Szymańska J. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii* - State of the art. *Ann Agric Environ Med*. 2010;17(2):209–14.
38. Giannoulis C, Zournatzi B, Giomisi A, Diza E, Tzafettas I. Toxoplasmosis during pregnancy: A case report and review of the literature. *Hippokratia*. 2008;12(3):139–43.
39. Chaudhry SA, Gad N, Koren G. Toxoplasmosis and pregnancy. *Can Fam Physician*. 2014;60(4):334–6.
40. Akel T, Mobarakai N. Hematologic manifestations of babesiosis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017;16(1):6.
41. Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Plantard O, Malandrin L. Babesia and its hosts: Adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet Res*. 2009;40(2).
42. Homer MJ, Aguilar-delfin I, Iii SAMRT, Krause PJ, Persing DH, Ev CLINMIR. Babesiosis. 2000;13(3):451–69.
43. Morch K, Holmaas G, Frolander PS, Kristoffersen EK. Severe human *Babesia divergens* infection in Norway. *Int J Infect Dis*. 2015;33:e37–8.
44. Sun Y, Li SG, Jiang JF, Wang X, Zhang Y, Wang H, et al. *Babesia venatorum* Infection in Child, China. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(5):896–7.
45. Skotarczak B. Babesiosis as a disease of people and dogs. Molecular diagnostics: A review. *Vet Med (Praha)*. 2008;53(5):229–35.
46. Bisoffi, Z. Gobbi, F. Van den Ende J. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Bmj*. 2014;348(1):1–2.
47. Rubio M, Bassat Q, Estivill X, Mayor A. Typing malaria and microRNAs: From the biology to future diagnostic perspectives. *Malar J*. 2016;15(1):1–14.
48. Kasetsirikul S, Buranapong J, Srituravanich W, Kaewthamasorn M, Pimpin A. The development of malaria diagnostic techniques: a review of the approaches with focus on dielectrophoretic and magnetophoretic methods. *Malar J*. 2016;15(1):358.

49. Baird JK, Valecha N, Duparc S, White NJ, Price RN. Diagnosis and Treatment of *Plasmodium vivax* Malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(6 Suppl):35–51.
50. The malERA Consultative Group on Diagnoses. A research agenda for malaria eradication: Diagnoses and diagnostics. *PLoS Med.* 2011;8(1).
51. Ding XC, Ade MP, Baird JK, Cheng Q, Cunningham J, Dhorda M, et al. Defining the next generation of *Plasmodium vivax* diagnostic tests for control and elimination: Target product profiles. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(4):e0005516.
52. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis MINIREVIEW Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2004;42(3):941–945.
53. Liu Q, Wang Z-D, Huang S-Y, Zhu X-Q. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasit Vectors.* 2015;8(1):292.
54. McGovern KE, Wilson EH. Dark side illuminated: imaging of *Toxoplasma gondii* through the decades. *Parasit Vectors.* 2013;6(1):334.
55. Switaj K, Master A, Skrzypczak M, Zaborowski P. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(3):170–6.
56. Pomares C, Montoya JG. Laboratory Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. 2016;54(10):2448–54.
57. María R, Millán S, Martínez-ballesteros I, Rementeria A, Garaizar J, Bikandi J. Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments. 2013;2–5.
58. Burrows JN, Duparc S, Gutteridge WE, Hooft van Huijsduijnen R, Kaszubska W, Macintyre F, et al. New developments in anti-malarial target candidate and product profiles. *Malar J [Internet].* 2017;16(1):26.
59. White NJ. Malaria parasite clearance. *Malar J.* 2017;16(1):88.
60. Nik Kamarudin N, Mohammed N, Mustaffa K. Aptamer Technology: Adjunct Therapy for Malaria. *Biomedicines.* 2017;5(1):1.
61. Rosenthal PJ. Review Antimalarial drug discovery: old and new approaches. 2003;3735–44.
62. Manuscript A. *NIH Public Access.* 2014;23(10):2829–43.
63. Aderibigbe B. Design of Drug Delivery Systems Containing Artemisinin and Its Derivatives. *Molecules [Internet].* 2017;22(2):323.
64. Zuo S, Li Q, Liu X, Feng H, Chen Y. The Potential Therapeutic Effects of Artesunate on Stroke and Other Central Nervous System Diseases. *Biomed Res Int.* 2016;2016.

65. Lesens O, Haus-Cheymol R, Dubrous P, Verret C, Spiegel A, Bonnet R, et al. The end of a dogma: the safety of doxycycline use in young children for malaria treatment. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(3):488–90.
66. Greenwood B, Dicko A, Sagara I, Zongo I, Tinto H, Cairns M, et al. Seasonal vaccination against malaria: a potential use for an imperfect malaria vaccine. *Malar J.* 2017;16(1):182.
67. Carnero PR, Mateo PH, Martín-garre S, Pérez ÁG, Campo L. Unexpected hosts : imaging parasitic diseases. *Insights Imaging.* 2017;101–25.
68. Alday PH, Doggett JS. Drugs in development for toxoplasmosis: Advances, challenges, and current status. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:273–93.
69. Wei HX, Wei SS, Lindsay DS, Peng HJ. A systematic review and meta-analysis of the efficacy of anti-Toxoplasma gondii medicines in humans. *PLoS One.* 2015;10(9):1–12.
70. Neville AJ, Zach SJ, Wang X, Larson JJ, Judge AK, Davis LA, et al. Clinically available medicines demonstrating anti-toxoplasma activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(12):7161–9.
71. Butler NJ, Furtado JM, Winthrop KL, Smith JR. management. 2014;41(1):95–108.
72. Park Y-H, Nam H-W. Clinical features and treatment of ocular toxoplasmosis. *Korean J Parasitol.* 2013;51(4):393–9.
73. Stanford MR, Gilbert RE. Treating ocular toxoplasmosis - Current evidence. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(2):312–5.
74. Jongert E, Roberts CW, Gargano N, Förster-Wald E, Petersen E. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: Challenges and opportunities. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(2):252–66.
75. He L, Liu Q, Yao B, Zhou Y, Hu M, Fang R, et al. A Historical Overview of Research on *Babesia orientalis* , a Protozoan Parasite Infecting Water Buffalo. 2017;8(July):1–6.
76. Guidelines for the treatment of malaria, third edition. OMS, 2015.
77. Centers for Disease Control and Prevention [Internet].