



Volume

5

CONCEITOS E
MÉTODOS
para formação
de profissionais
em laboratórios
DE SAÚDE

Organização
Etelcia Molinaro
Luzia Caputo
Regina Amendoeira

IOC
Instituto Oswaldo Cruz


ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO


Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Presidente

Paulo Ernani Gadelha Vieira

ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE JOAQUIM VENÂNCIO

Diretor

Mauro de Lima Gomes

Vice-diretora de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Marcela Pronko

Vice-diretor de Ensino e Informação

Marco Antônio Carvalho Santos

Vice-diretor de Gestão e Desenvolvimento Institucional

José Orbílio de Souza Abreu

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Diretora

Tânia Cremonini Araújo Jorge

Vice-diretora de Pesquisa, Desenvolvimento Tecnológico e Inovação

Mariza Gonçalves Morgado

Vice-diretora de Ensino, Informação e Comunicação

Helene dos Santos Barbosa

Vice-diretora de Serviços de Referência e Coleções Científicas

Elizabeth Ferreira Rangel

Vice-diretor de Desenvolvimento Institucional e Gestão

Christian Maurice Gabriel Niel

CONCEITOS E
MÉTODOS
para formação
de profissionais
em laboratórios
DE SAÚDE

Volume 5

ORGANIZADORAS
Etelcia Moraes Molinaro
Luzia Fátima Gonçalves Caputo
Maria Regina Reis Amendoeira

Copyright © 2012 dos autores
Todos os direitos desta edição reservados à
Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz

Conselho Editorial

Dr.^a. Maria Regina Reis Amendoeira (presidente)
Dr.^a. Ana Luiza Lauria Filgueiras
Dr.^a. Clarissa Menezes Maya Monteiro
Dr.^a. Fátima Conceição Silva
Dr. Herman Gonçalves Schatzmayr (*in memoriam*)
Dr.^a. Léa Camillo-Coura
Dr.^a. Lycia de Brito Gitirana
Dr.^a. Marcia Cristina Ferrão Alexandre
Dr. Marco Antonio Ferreira da Costa
Dr.^a. Margareth Maria de Carvalho Queiroz
Dr.^a. Maria Helena Miguez da Rocha Leão
Dr. Otílio Machado Pereira Bastos
Dr. Paulo Roberto Soares Stephens

Secretária-executiva da coleção

Josane Ferreira Filho

Coordenação Editorial

Cátia Guimarães

Edição de Texto

Lisa Stuart

Projeto Gráfico e Editoração

Marcelo Paixão

Capa

Zé Luiz Fonseca

Fotos

Rodrigo Mexas

Desenhos

Newton Marinho da Costa Junior

Catálogo na fonte

Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio

Biblioteca Emilia Bustamante

M722c Molinaro, Etelcia Moraes

Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 5 / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2012.

476 p. : il. , tab. , graf.

ISBN: 978-85-98768-41-0

1. Técnicas e Procedimentos de Laboratório. 2. Pessoal de Laboratório.
3. Laboratórios. 4. Formação de Técnicos. 5. Saúde e Educação. I. Título.
II. Caputo, Luzia Fátima Gonçalves. III. Amendoeira, Maria Regina Reis.

CDD 542.1

Autores

Alba Valéria M. Silva

Médica veterinária, mestre e doutora em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Aline Carvalho de Mattos

Bióloga, especialista em Malacologia de Vetores pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz); tecnologista em Saúde Pública do IOC/Fiocruz e gerente de qualidade do Laboratório de Referência Nacional em Malacologia Médica do IOC/Fiocruz.

André Figueiredo Barbosa

Biólogo, mestre em Ciências (Biologia Celular e Molecular) pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) e egresso do Curso Técnico de Pesquisa em Biologia Parasitária do mesmo instituto; técnico em Saúde Pública do IOC/Fiocruz e professor do Curso de Pós-graduação Lato Sensu em Entomologia Médica do IOC/Fiocruz.

Catarina Macedo Lopes

Bióloga, mestre em Biologia Animal pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e especialista em Entomologia Médica pelo curso de Entomologia Médica do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz); tecnologista em Saúde Pública do IOC/Fiocruz.

Danuzia Pinheiro Bastos Garcia de Mattos

Médica veterinária, doutoranda em Medicina Veterinária, Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal pela Universidade Federal

Fluminense (UFF) e mestre em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz); professora assistente da UFF.

Delir Correa Gomes Maues da Serra Freire

Historiadora natural, doutora em Medicina Veterinária/Parasitologia Veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ); pesquisadora titular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

Fernanda Barbosa de Almeida

Bióloga, doutoranda pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia da mesma universidade; tecnologista da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e mestre em Morfologia pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Uerj); gerente técnica do Serviço de Referência Nacional em Hidatidose.

Jacenir Reis dos Santos Mallet

Bióloga, doutora em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e mestre em Ciências Morfológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); pesquisadora titular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

João Carlos Araujo Carreira

Doutor e mestre em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz); pesquisador associado do Laboratório de Toxoplasmose do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

José Roberto Machado e Silva

Biomédico, doutor em Parasitologia Veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e mestre em Biologia Parasitária pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz); professor adjunto e chefe do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Uerj), e bolsista de Produtividade do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Lucas de Andrade Barros

Biólogo, mestre em Morfologia pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Uerj); gestor de Qualidade, Biossegurança e Ambiente do Serviço de Referência Nacional em Hidatidose e bolsista de produtividade do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Marcelo Knoff

Biólogo, doutor em Biologia Parasitária pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) e mestre em Medicina Veterinária/Parasitologia Veterinária pela Universidade Federal Rural

do Rio de Janeiro (UFRRJ); pesquisador titular do Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados do IOC/Fiocruz.

Margareth Maria de Carvalho Queiroz

Bióloga, doutora e mestre em Ciências Veterinárias (Parasitologia Médica e Veterinária) pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), e especialista em Parasitologia pela mesma instituição; pesquisadora em Saúde Pública do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) e de Produtividade do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

do IOC/Fiocruz.

Monique Albuquerque Motta

Bióloga, doutora em Biologia Parasitária pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz); pesquisadora adjunta em Saúde Pública do Laboratório de Transmissores de Hematozoários do IOC/Fiocruz e professora dos cursos de pós-graduação stricto sensu e lato sensu e do Curso Técnico de Pesquisa em Biologia Parasitária do (IOC/Fiocruz).

Nataly Araújo de Souza

Bióloga, doutora em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e mestre em Parasitologia Veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ); pesquisadora titular do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

Patricia Riddell Millar Goulart

Médica veterinária, doutora e mestre em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Fluminense (UFF); professora adjunta de Parasitologia da UFF.

Rosângela Rodrigues e Silva

Bióloga, doutora e mestre em Biologia Parasitária pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz); coordenadora do Serviço de Referência Nacional em Hidatidose e pesquisadora titular do Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados do IOC/Fiocruz.

Silvana Carvalho Thiengo

Bióloga, doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), mestre em Ciências Biológicas/Zoologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), com curso de aperfeiçoamento em Helmintos de Importância Econômica pelo International Institute of Parasitology (Inglaterra); pesquisadora titular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) e chefe do Laboratório de Malacologia do IOC/Fiocruz.

Teresa Cristina Monte Gonçalves

Bióloga, doutora em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e mestre em Ciências/Zoologia pelo Museu Nacional/Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); pesquisadora do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

Teresa Fernandes Silva do Nascimento

Bióloga, doutora e mestre em Biologia Parasitária pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz); pesquisadora em Saúde do IOC/Fiocruz, chefe do Laboratório de Transmissores de Hematozoários do IOC/Fiocruz e curadora da Coleção de Culicídeos do mesmo laboratório.

Sumário

Prefácio	11
Apresentação da coleção	15
Apresentação das organizadoras	17
Capítulo 1. Protozoologia	21
Capítulo 2. Introdução à helmintologia	191
Capítulo 3. Metodologia básica para a coleta e o processamento de helmintos parasitos	251
Capítulo 4. Entomologia	283
Capítulo 5. Malacologia	413

Prefácio

O Chico Trombone costumava me dizer:

– Isso eu sei fazer, dr. Luiz Fernando, aprendi com Joaquim Venâncio.

E era com orgulho que se referia a seu mestre.

Vimos, portanto, que a formação de técnicos já vem dos tempos de Oswaldo. É claro que não era institucionalizada como hoje. Eram outros tempos.

Joaquim Venâncio nasceu na fazenda Bela Vista, Minas Gerais. Era a fazenda da mãe de Carlos Chagas, pai. Em 1916, veio trabalhar no Instituto Oswaldo Cruz. Veio e deu certo. O dr. Lutz teria dito certa vez:

– Não troco o Venâncio por nenhum doutor de Oxford ou de Cambridge.

Se não disse, pensou.

Eficiência nos processos de seleção de pessoal? Competência do serviço de recursos humanos? Evidentemente que não. Não havia nada disso nessa época. As coisas eram muito mais simples, e davam certo. Veio porque era amigo do velho Carlos Chagas. Amigos de infância. Brincaram juntos na fazenda.

Quando Joaquim Venâncio faleceu em 27 de agosto de 1955, teve seu necrológio publicado na Revista Brasileira de Biologia – lugar de necrológio

de cientista famoso. Cito textual: “Joaquim Venâncio conseguiu durante cerca de 35 anos que trabalhou ativamente, aprender zoologia, que conhecia de modo invejável. Como decorrência das contingências da vida, não teve oportunidade de instruir-se, mas sua mentalidade era de um homem culto. Pela convivência com o dr. Lutz, pela observação direta do que via nas excursões e no laboratório, adquiriu conhecimento detalhado de vários grupos zoológicos, principalmente, anfíbios, moluscos fluviais e trematódeos. Chegou a conhecer muito bem os anfíbios e, com grande facilidade, os classificava nas excursões pela voz. Dadas as indicações feitas pelo dr. Lutz em seus trabalhos, há casos em que foi citado na literatura como colaborador direto.”

Joaquim Venâncio era, sem dúvida, um naturalista. Era competente, tinha o domínio do ofício, a maestria da arte.

E gostava de ensinar. Ensinou muita gente.

Certa vez, o Venancinho me disse:

– Era a Escola do Venâncio, né? Foi muito boa, né?

* * *

Na presidência de Sérgio Arouca, resolvemos atualizar a “Escola de Venâncio”. E foi assim que surgiu a Escola Politécnica, com o nome do seu patrono. Cresceu e abriu várias frentes, desde a vocação científica aos cursos de nível médio, complementados pela formação de técnicos. Foi um êxito, como a antiga. Aparece sempre nos primeiros lugares nas avaliações e já se estendeu a outras instituições.

* * *

E agora surgem os livros didáticos: organizada por Etelcia Molinaro, Luzia Caputo e Regina Amendoeira, vem à luz a coleção **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**, reunindo professores de várias unidades da Fiocruz.

Os capítulos oferecem a história da técnica, os seus fundamentos, a maneira moderna de realizá-la, as suas aplicações, a organização do laboratório etc.

É útil para os cursos da Fundação Oswaldo Cruz e para outros externos. Mostra, também, o quanto as unidades da Fiocruz estão integradas na realização de suas tarefas.

Ensino é questão primordial. Sem ele, o país não se desenvolve.

Está de parabéns a Fiocruz pela realização de mais uma tarefa de primordial importância.

Oswaldo Cruz está orgulhoso dos seus continuadores.

Luiz Fernando Ferreira

Pesquisador emérito da Fundação Oswaldo Cruz

Apresentação

A coletânea de livros intitulada **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**, organizada por Etelcia Molinaro, Luzia Caputo e Regina Amendoeira, é, antes de tudo, uma obra original, importante e necessária. Original porque não existe na literatura técnica em saúde, na área biomédica brasileira e internacional, ao menos que eu saiba, algo semelhante em abrangência, profundidade e seleção dos temas abordados; importante pelo público-alvo a que se destina, muito além da “formação de técnicos de laboratórios”, abrangendo certamente todos os profissionais de saúde; e necessária porque servirá como obra de referência para a formação dos mencionados técnicos e como consulta obrigatória para todos os profissionais de saúde que necessitem de esclarecimento dos aspectos técnicos ali abordados.

Versada em cinco volumes e 23 capítulos, organizados em sequência lógica, desde a biossegurança e as boas práticas de laboratório, passando por todos os fundamentos das técnicas laboratoriais – bioquímica básica, biologia celular e molecular, histologia e ultraestrutura –, até atingir o cerne da prática

laboratorial, da imunologia à infectoparasitologia – virologia, bacteriologia, micologia, protozoologia e helmintologia e seus vetores, com a entomologia médica e a malacologia. Os autores dos respectivos capítulos são do melhor nível intelectual e científico, com titulação de mestres, doutores e especialistas, e com grande experiência prática nos assuntos de que tratam.

Parabenizo o Instituto Oswaldo Cruz e a Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, que patrocinaram esta obra de referência, e que, desde os seus primórdios, valorizaram a qualidade da formação dos seus técnicos e com eles povoaram e estão povoando o Brasil de norte a sul e de leste a oeste com o que temos de melhor – os fundamentos para uma boa pesquisa. Aproveito esta oportunidade para homenagear a figura de Henry Willcox, que, no início da década de 1980, quando o convidei para me ajudar na coordenação dos cursos de Pós-graduação em Biologia Parasitária e Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, foi o grande incentivador para criarmos paralelamente o Curso de Técnico em Pesquisa, do qual foi o seu primeiro coordenador.

Igualmente parabenizo as organizadoras desta coletânea, e a Fiocruz como um todo, pelo lançamento desta obra pioneira.

José Rodrigues Coura

Pesquisador titular emérito da Fundação Oswaldo Cruz
Chefe do Laboratório de Doenças Parasitárias
do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Apresentação das organizadoras

“Um sonho quase realizado”

Oswaldo Cruz, 1872-1917

As alterações pelas quais passa o mundo com a globalização trazem como consequência o surgimento de novos paradigmas tecnológicos, fazendo-se necessário que o ensino na área da saúde atenda às exigências do mundo moderno, do trabalho e do atual perfil do técnico da área.

Os cursos para a formação de técnicos da Fundação Oswaldo Cruz (Fio-cruz) buscam demonstrar os princípios científicos envolvidos com as técnicas laboratoriais, preparando os alunos para as transformações no mundo do trabalho em saúde decorrentes do desenvolvimento tecnológico e científico. Nesse contexto, duas unidades técnico-científicas da instituição – o Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e a Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio (EPSJV) – são historicamente as responsáveis pela coordenação de cursos e especializações técnicas que se firmaram como modelos desses princípios. Essas unidades sempre estiveram intrinsecamente ligadas na área de ensino técnico,

e os professores realizam permanentemente parcerias entre si. Muitos de nós, egressos desses cursos, somos hoje docentes e autores desta coleção.

Além da formação técnica de profissionais em nível regional e nacional, intensificou-se a demanda pelo estabelecimento de cooperações técnicas internacionais na Fiocruz, que, por sua expertise e capacidade de produzir, passou a divulgar conhecimentos, elaborando cursos, metodologias e tecnologias educacionais. A Escola Politécnica Joaquim Venâncio, desde 2004, é um centro colaborador da Organização Mundial da Saúde (OMS) para a educação de técnicos em saúde.

A ideia da publicação desta coleção surgiu da necessidade conjunta das duas unidades citadas da Fiocruz de produzir material didático que atendesse aos alunos dos cursos de nível técnico em Saúde da Fiocruz e de outros locais. Desse modo, o nosso principal desafio é oferecer um conteúdo que abarque todos os temas da área técnica da saúde tratados nos principais cursos de nível médio e que, ao mesmo tempo, possa manter-se suficientemente atualizado.

Dada a complexidade da estrutura instrumental e pedagógica dos cursos técnicos, fez-se necessário publicar uma coleção escolhendo-se tópicos de importância básica. Para tanto, foram convidados pesquisadores e professores com experiência de ensino em cursos de nível técnico e com destacado conhecimento nos temas abordados nos 23 capítulos que integram os cinco volumes da coleção.

A coleção **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde** tem como objetivo integrar conhecimentos teóricos e práticos, proporcionando ao aluno informações que possibilitem uma permanente reflexão de seu papel como agente transformador dos processos e atividades de ensino, pesquisa científica e desenvolvimento tecnológico. Outro objetivo incontestável destes livros é servir aos professores, como norteadores da definição curricular de seus cursos.

Visando garantir a autonomia dos autores, e respectivas responsabilidades, foi mantida a formatação original dos textos, inclusive as fotos, figuras, diagra-

mas. Podem ocorrer, também, repetições de conteúdo em alguns capítulos, mas, a nosso ver, a retirada de partes já abordadas em capítulos anteriores, poderia descontextualizar o texto.

O pontapé inicial deste sonho só foi possível pelo incondicional apoio dado pelo professor André Paulo da Silva Malhão, pela dra. Isabel Brasil Pereira, pessoa-chave desencadeadora do processo, e a dra. Tânia Cremonini de Araújo Jorge, que apoiaram e incentivaram institucionalmente o projeto. Agradecemos especialmente aos autores que abraçaram este trabalho com muito entusiasmo e que possibilitaram a sua concretização. É um carinho especial para Josane Ferreira Filho pela organização paciente de nossas reuniões e textos, a gratidão das organizadoras e dos autores.

Agradecemos em especial aos renomados cientistas eméritos da Fundação Oswaldo Cruz, doutores Luiz Fernando Ferreira – patrono da EPSJV – e José Rodrigues Coura, que nos deram a honra de apresentar esta coleção.

Esperamos, assim, contribuir para a sistematização do conhecimento dos leitores sobre os diferentes tópicos abordados nos capítulos, apresentando cada assunto de forma didática e sintética, e recomendando a consulta à literatura especializada sempre que houver necessidade de aprofundamento do conhecimento em determinados temas.

Etelcia Molinaro
Luzia Caputo
Regina Amendoeira

Capítulo 1

Protozoologia

Maria Regina Reis Amendoeira
Danuza Pinheiro Bastos Garcia de Mattos
João Carlos de Araújo Carreira
Alba Valéria Machado da Silva
Patrícia Riddell Millar Goulart

Introdução

A protozoologia é o segmento da ciência que estuda os protozoários.

Protozoologia, do grego → protos = primeiro + zoon = animal + logos = ciência.

Dentro da classificação dos seres vivos, o estudo do reino Protista ganha importância por incluir o sub-reino Protozoa,¹ que engloba os protozoários:

¹ Organismos providos de organelas membranosas variadas: núcleo, mitocôndrias, aparelho de Golgi, lisossomas, vacúolos, entre outras.

seres unicelulares, eucariotas, que apresentam **organelas**² capazes de desempenhar funções em sua nutrição, locomoção e na reprodução de suas diferentes formas. As organelas dos protozoários podem ser estáticas ou dinâmicas:

- **organelas estáticas** → externas: membrana, película,³ teca,⁴ lorica,⁵ parede cística⁶
→ internas: axóstilos⁷
- **organelas dinâmicas** (locomoção) → pseudópodes⁸
→ flagelos⁹
→ cílios¹⁰

Os protozoários podem ter habitat:¹¹

- **aquático** → vivem na água do mar ou no fundo dos oceanos; em água doce, salobra ou poluída;
- **terrestre** → vivem no solo ou em matéria orgânica em decomposição.

² Estruturas celulares (mitocôndrias, aparelho de Golgi, ribossomas, entre outras) que, nos protozoários, diferenciam-se para desempenhar determinadas funções, as quais, no caso dos metazoários, são de competência de diferentes órgãos.

³ Membrana delgada.

⁴ Envoltório protetor de alguns protozoários.

⁵ Carapaça externa protetora de alguns protozoários.

⁶ Envoltório que protege o cisto, de estrutura resistente.

⁷ Estrutura celular formada por microtúbulos, encontrada em giárdias e tricômonas.

⁸ Projeções originadas por movimento do citoplasma que ocorrem em alguns protozoários.

⁹ Filamento protoplasmático, muito móvel, utilizado na locomoção de alguns protozoários.

¹⁰ Formação móvel presente na superfície de alguns protozoários e que os auxilia em sua locomoção nos fluidos que os circundam.

¹¹ Tipo de lugar onde um organismo vive e se reproduz.

Os protozoários estão divididos em protozoários de vida livre e protozoários parasitos:

- os **protozoários de vida livre**, que formam colônias, podem apresentar natação livre, ser sésseis¹² ou ter elementos de ambas as categorias;
- os **protozoários parasitos** vivem sobre (ectoparasitos) ou no ambiente interno (endoparasitos) de algumas plantas e animais. Nesse último caso, podem parasitar desde outros protozoários até o homem.

Das mais de 60 mil espécies descritas no sub-reino Protozoa, metade são fósseis, cerca de 25 mil são seres de vida livre e aproximadamente 10 mil são parasitos de diferentes animais ou vegetais, mas apenas algumas dezenas de protozoários têm o homem como hospedeiro. O sub-reino Protozoa é dividido em sete filios; quatro deles – Microspora, Sarcomastigophora, Apicomplexa e Ciliophora – apresentam interesse médico, por reunirem parasitos que podem ser patogênicos para o ser humano ou para outros animais.

- **Filo Microspora**

Dentre os protozoários patogênicos que o filo agrupa, sabe-se que são capazes de produzir esporos unicelulares contendo a forma infectante endoplasmática em seu interior. Esse filo recentemente passou a apresentar interesse médico, a partir da descoberta de que seus integrantes podem vir a parasitar o homem. Embora na maioria dos compêndios esse filo esteja classificado como protozoário, atualmente o grupo é enquadrado na classe dos fungos. O filo Microspora não será abordado neste capítulo.

- **Filo Sarcomastigophora**

Reúne os protozoários capazes de se locomoverem por flagelos (subfilo Mastigophora) e aqueles capazes de emitir pseudópodes (subfilo Sarcodina).

¹² Protozoário que adere diretamente ao substrato, sem pedículo ou haste de sustentação.

- Subfilo Mastigophora

Ordem: Kinetoplastida

Gêneros: *Trypanosoma* e *Leishmania*

Subordem: Diplomonadina

Gênero: *Giardia*

Espécie: *Giardia intestinalis*

Ordem: Trichomonadida

Gênero: *Trichomonas*

Espécie: *Trichomonas vaginalis*

- Subfilo Sarcodina

Ordem: Amoebida

Gêneros: *Entamoeba*

Endolimax

Iodamoeba

Acanthamoeba

Hartmannella

Naegleria

Vahlkampfia

- **Filo Apicomplexa**

São esporozoários que apresentam deslocamento por deslizamento (sem pseudópodos, flagelos ou cílios) determinado pela contração de microtúbulos subpeliculares e pelo complexo apical de penetração; todos os membros do filo são parasitos obrigatórios, ou seja, apresentam alguma deficiência metabólica e, por isso, dependem de um hospedeiro para sobreviver.

Ordem: Eucoccidiida

Gêneros: *Toxoplasma*

Isospora

Sarcocystis

Cryptosporidium

Ordem: Hemosporidiida

Gênero: *Plasmodium*

Ordem: Piroplasmida

Gênero: *Babesia*

- **Filo Ciliophora**

Assim chamados porque seu deslocamento é determinado pelo batimento de cílios. Dentre os protozoários desse filo, a única espécie que pode vir a parasitar o homem é o gênero *Balantidium*, espécie *Balantidium coli*, maior protozoário parasito humano.

Ordem: Trichostomatida

Gênero: *Balantidium*

1. Protozoários do filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae engloba oito gêneros: *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia* e *Phytomonas*.

Os gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum* são representados por organismos heteróxeos, parasitos de vertebrados; em sua maioria, são transmitidos por vetores hematófagos: artrópodes ou sanguessugas.

Os gêneros *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia* e *Blastocrithidia* são representados por organismos monoxênicos, descritos originalmente como parasitos de insetos e outros invertebrados.

O gênero *Phytomonas*, como os três primeiros, é representado por organismos heteróxicos, porém são parasitos de plantas, transmitidos por vetores hemípteros fitófagos.

Por serem capazes de causar graves doenças, os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são de grande importância no que se refere à saúde humana e animal. Em virtude disso, veremos a seguir as principais características de algumas das espécies de maior importância pertencentes a esses dois gêneros.

1.1 Gênero *Trypanosoma*

Nesse gênero, os parasitos são observados nos hospedeiros vertebrados sob a forma tripomastigota; por causa da sua grande variabilidade, têm sido agrupados pelas características de seus diversos hospedeiros vertebrados: tripanossomos de peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos.

Em relação aos tripanossomos de mamíferos, diferentes subgêneros foram criados e incluídos em duas seções: *Salivaria* e *Stercoraria*.

A seção *Salivaria* se caracteriza por parasitos que evoluem na porção anterior do vetor e que são transmitidos por inoculação, através da picada. Nessa seção estão incluídos quatro subgêneros: *Dutonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon* e *Pycnomonas*.

A seção *Stercoraria* se caracteriza por parasitos que se desenvolvem na porção posterior do tubo digestivo de seus vetores e pela transmissão ser feita pela contaminação por meio de suas fezes. Nessa seção, foram incluídos três subgêneros: *Megatrypanum*, *Herpetosoma* e *Schizotrypanum*.

1.1.1 Seção Stercoraria – principal representante

A) *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*

É o agente etiológico da doença de Chagas em humanos ou da tripanossomíase americana em animais.

a) Morfologia e biologia

Hospedeiros vertebrados: o homem e várias espécies de mamíferos silvestres e domésticos, inclusive o gambá.

Hospedeiros invertebrados: insetos (hemípteros) hematófagos conhecidos como triatomíneos e popularmente chamados de barbeiros – em virtude de seus hábitos de picarem as pessoas na face. Os principais gêneros de triatomíneos transmissores (vetores) da doença de Chagas em nosso país são *Triatoma*, *Rhodnius*, *Panstrongylus* e *Dipetalogaster*.¹³

Morfologia

Tripomastigotas: são as formas responsáveis pela transmissão natural do parasito; têm a forma de um “C” ou um “S” e um longo flagelo, que percorre, aderido, todo o corpo do protozoário e que conta também com uma porção livre, a qual emerge de sua extremidade anterior. Os tripomastigotas não têm capacidade de multiplicação e quando isolados a partir dos barbeiros (triatomíneos), são chamados de **tripomastigotas metacíclicos**. Os tripomastigotas metacíclicos, após serem eliminados nas fezes e na urina pelos triatomíneos, são responsáveis pela infecção dos mamíferos. Essas formas efetuam a invasão dos tecidos do hospedeiro através das mucosas ou da pele lesionada. As formas tripomastigotas, quando isoladas do sangue de mamíferos, são chamadas de **tripomastigotas sanguícolas** ou **circulantes**. Ao serem ingeridas juntamente com o sangue do hospedeiro vertebrado pelos triatomíneos, são as principais responsáveis pela transferência do parasito do mamífero para o inseto.

¹³ Ver o capítulo “Entomologia” neste volume.

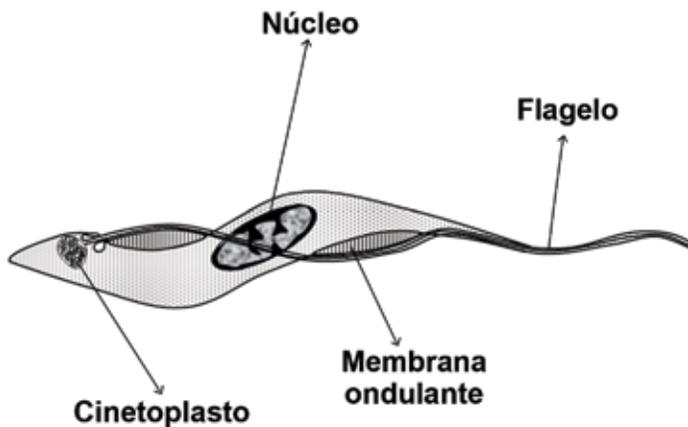


Figura 1. Desenho esquemático da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

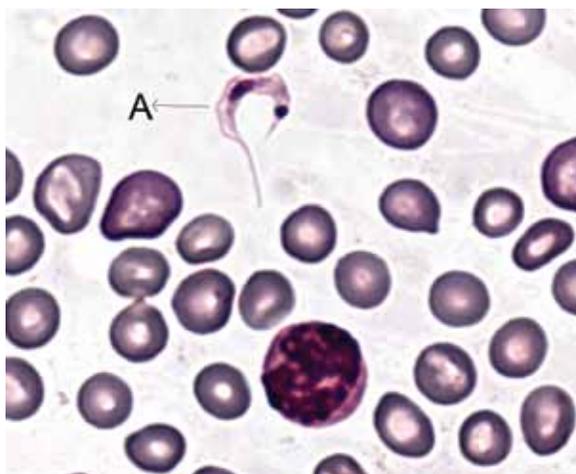


Figura 2. Esfregaço sanguíneo corado pelo Giemsa, com tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* (A), 1000X.

Foto: Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz.

Amastigotas: são as formas do parasito que fazem multiplicação intracelular obrigatória no hospedeiro vertebrado; têm formato arredondado ou ovoide e não apresentam flagelo livre.

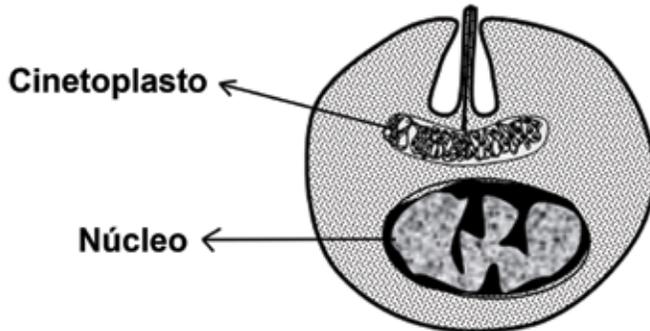


Figura 3. Desenho esquemático da forma amastigota do *Trypanosoma cruzi*.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

Epimastigotas: são as formas responsáveis pela multiplicação do parasito no tubo digestivo do vetor – o hospedeiro invertebrado. Têm formato fusiforme e um longo flagelo, que percorre, aderido, todo o corpo do protozoário, mas que também possui uma porção livre.

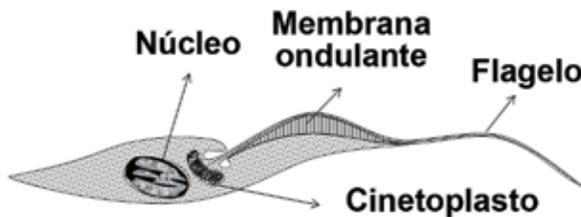


Figura 4. Desenho esquemático da forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

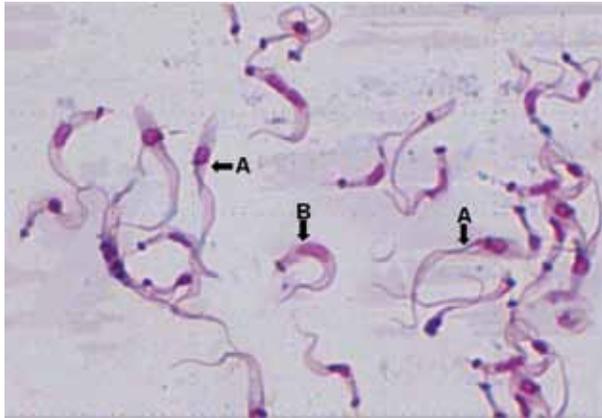


Figura 5. Formas epimastigotas (A) e tripomastigotas metacíclicas (B) de *Trypanosoma cruzi* em meio de cultura corado pelo Giemsa, 1000X.

Foto cedida pela Dra. Celeste Souza (Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia/IOC–Fiocruz).

Ciclo biológico do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*

Depois de serem sugados por um triatomíneo juntamente com o sangue de um mamífero infectado, os tripomastigotas sanguícolas iniciam, ainda no estômago do vetor, o processo de diferenciação para epimastigotas. Ao atingirem o intestino médio, as formas epimastigotas multiplicam-se por fissão binária, dando origem a várias gerações dessas formas. Grande quantidade de epimastigotas alcança a ampola retal e os túbulos de Malpighi do inseto. Nesses locais, os epimastigotas, por meio de seus flagelos, aderem às paredes, iniciando um processo de metacicloênese – diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos.

A transmissão do *T. cruzi* do inseto para o hospedeiro mamífero ocorre posteriormente, quando um triatomíneo infectado se alimenta em outro mamífero ainda não exposto ao parasito. Durante ou logo após o repasto sanguíneo, os triatomíneos têm como hábito defecar e urinar. Após a picada, o hospedeiro geralmente se coça, por causa da reação alérgica causada pelas

substâncias presentes na saliva do vetor. É desse modo que frequentemente os parasitos são veiculados para algum local de pele lesionada ou para as mucosas do hospedeiro.

Ao invadirem o organismo de um mamífero hospedeiro, os tripomastigotas metacíclicos penetram em células do local, mas também podem ser fagocitados por macrófagos. Uma vez no interior dessas células, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas e iniciam um processo de multiplicação por fissão binária. Após vários ciclos de multiplicação, as formas amastigotas iniciam a sua diferenciação em tripomastigotas. Durante o processo, as células hospedeiras são rompidas pela ação dos parasitos, e os tripomastigotas liberados atingem a circulação sanguínea, disseminando-se por todo o organismo. Essas formas tripomastigotas presentes no sangue, chamadas tripomastigotas sanguícolas, são capazes de invadir macrófagos, fibras musculares esqueléticas, cardíacas e nervosas. Os tripomastigotas sanguícolas também podem infectar os triatomíneos.

Todo o processo desde a ingestão dos tripomastigotas sanguícolas pelos triatomíneos até a liberação dos tripomastigotas metacíclicos nas suas fezes pode levar de 20 a 45 dias. Vale lembrar que o *Trypanosoma cruzi* possui várias cepas que podem apresentar diferenças nos padrões de crescimento e diferenciação celular, dependendo da espécie de triatomíneo envolvida na infecção.

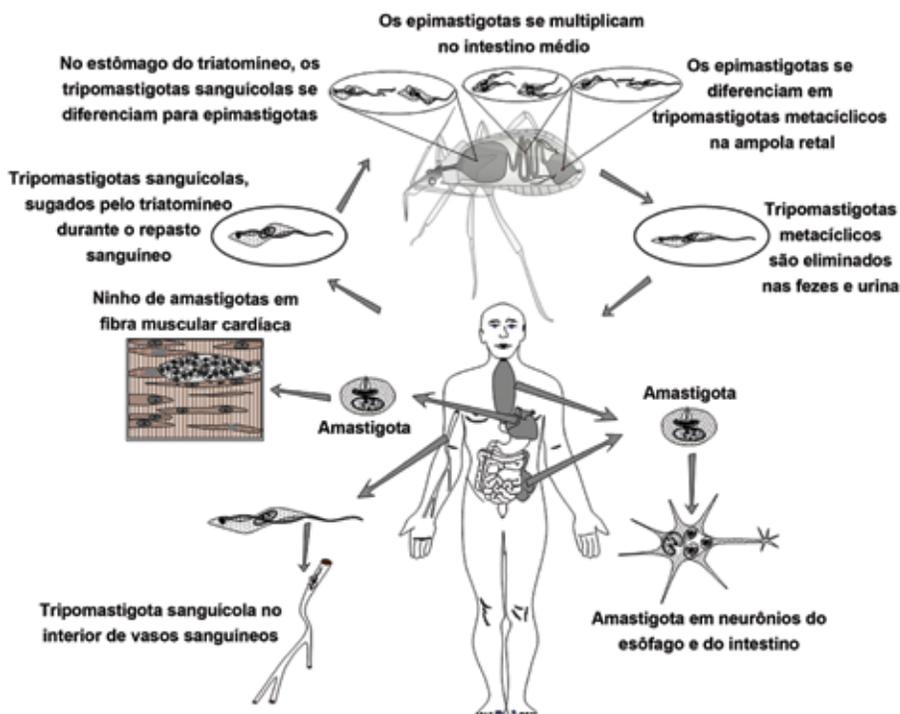


Figura 6. Ciclo biológico do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

Ciclo biológico do *T. cruzi* no gambá (*Didelphis spp*)

No gambá, o *T. cruzi* apresenta um comportamento ímpar: esse marsupial é o único hospedeiro no qual o *T. cruzi* é capaz de desenvolver todo o seu ciclo, tanto o que ocorre nos mamíferos quanto aquele que se dá nos vetores. No gambá, o ciclo referente aos mamíferos acontece no interior dos vasos sanguíneos, com a presença de tripomastigotas sanguíneas, e também em fibras cardíacas e plexos neurais, onde ocorre a multiplicação das formas amastigotas. O ciclo correspondente aos vetores ocorre na luz das glândulas de cheiro do gambá, onde o parasito se multiplica na forma epimastigota extracelularmente, diferenciando-se, também, em tripomastigota metacíclico. Apesar da importância biológica de tal ciclo, o número de infectados pelo gambá não tem grande impacto do ponto de vista epidemiológico.

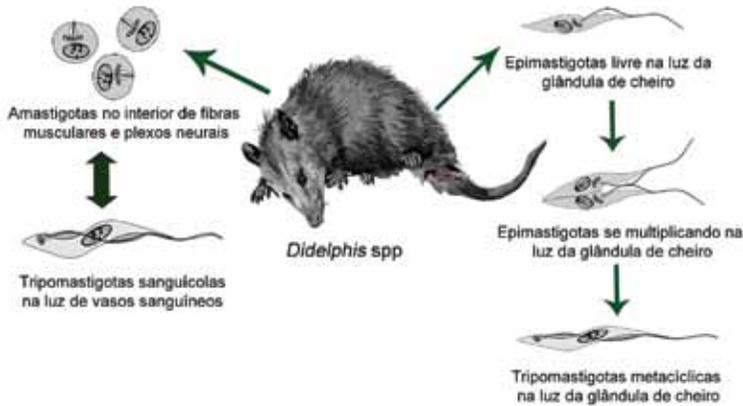


Figura 7. Ciclo biológico do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* no gambá.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

b) Relação parasito–hospedeiro

Habitat: sangue (extracelularmente), células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), fibras musculares cardíacas, esqueléticas ou lisas e células do sistema nervoso.

Após a fase da infecção, ocorre a evolução para a fase crônica – denominada por alguns autores de fase indeterminada, pois é uma fase latente onde não há sintomatologia clínica –, que pode evoluir para a fase crônica sintomática de 10 a 15 anos após a fase aguda da infecção, ou a doença pode permanecer assintomática por toda a vida do paciente. Nessa fase, a quantidade de parasitos no sangue é muito baixa.

Como já mencionado anteriormente, a doença causada pelo *T. cruzi* nos humanos chama-se doença de Chagas. Ela apresenta grande variabilidade em seus quadros clínicos e também nos aspectos histopatológicos. Em razão dos sintomas, a doença de Chagas é dividida em fase aguda e fase crônica. Na fase aguda, o paciente pode apresentar chagoma de inoculação (cutâneo) ou sinal de Romana (edema de pálpebra), febre, hepatoesplenomegalia (fígado e baço aumentados) e miocardite. Na fase crônica, o indivíduo pode

permanecer assintomático ou seu quadro evoluir para cardiopatia chagásica crônica, megaesôfago ou megacólon. A cardiopatia chagásica, que pode levar à cardiomegalia – aumento significativo do tamanho do coração –, ocorre basicamente por causa da destruição das fibras cardíacas, com sua substituição por tecido conjuntivo, o que prejudica a capacidade de contração do órgão. A destruição das células do coração responsáveis pelo controle dos batimentos (feixe de His) também leva a alterações cardíacas.

As formas conhecidas como megas caracterizam-se pelo aumento excessivo do esôfago (megaesôfago) ou do cólon (megacólon). Essas formas são provocadas pela destruição de fibras nervosas, principalmente parassimpáticas, que ocasionam descontrole dos movimentos peristálticos (disperistaltismo) e levam ao aumento excessivo do órgão: no caso do esôfago, pelo acúmulo de alimentos decorrente da dificuldade de deglutição; no caso do cólon, pela retenção do bolo fecal.

c) Diagnóstico

- Fase aguda

Métodos parasitológicos diretos

Pode-se fazer o exame direto do sangue utilizando-se o esfregaço sanguíneo, posteriormente fixado com metanol e corado por corantes derivados do Romanowsky. Já o método de Strout consiste na centrifugação do sangue sem a adição de anticoagulante e na observação do parasito entre as hemácias e o soro. Com a utilização dos métodos citados acima, é possível observar as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*. Outro método direto é a punção de linfonodos, principalmente quando se observa enfartamento ganglionar próximo ao chagoma de inoculação. Com essa metodologia, é possível observar as formas amastigotas em células do sistema fagocítico mononuclear – por exemplo, nos macrófagos.

Imunodiagnóstico

O diagnóstico sorológico da infecção chagásica baseia-se na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* das classes IgM (fase aguda) e IgG (fase crônica) no soro do paciente. Os testes sorológicos, em geral, apresentam variabilidade na sensibilidade e na especificidade. No entanto, fatores como imunocompetência do hospedeiro, qualidade do antígeno e dos reagentes e calibração dos instrumentos, entre outros, podem interferir no resultado do teste. Pode ocorrer, inclusive, reação cruzada com soro de pacientes de áreas endêmicas de leishmaniose. Alguns exemplos de métodos para o imunodiagnóstico de *T. cruzi* são a reação de imunofluorescência indireta (Rifi) e os testes imunoenzimáticos, como o ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), por exemplo.

Métodos moleculares

O método mais utilizado é o da reação em cadeia da polimerase, com detecção do DNA do cinetoplasto (kDNA) do parasito por meio da utilização de amostras de sangue e/ou tecidos dos indivíduos infectados.

- Fase crônica

Métodos parasitológicos indiretos

Xenodiagnóstico: tem por base a multiplicação das formas epimastigotas no trato digestivo do triatomíneo, permitindo sua detecção nas fezes ou na urina dos insetos alimentados com sangue do paciente após período de 1 a 3 meses. Existe ainda a opção do **xenodiagnóstico artificial**, utilizado quando não se pode praticar o **xenodiagnóstico natural** e quando se objetiva pesquisar o parasito em outros líquidos, como o cefalorraquidiano, que, misturado com o sangue, é sugado pelos triatomíneos. Para tanto, o sangue dos pacientes é coletado com anticoagulante, mantido a 37°C e oferecido aos insetos através de uma membrana.

Hemocultura: o isolamento do *T. cruzi* pode ser realizado em diferentes meios de cultivo acelulares (NNN, LIT) que contenham hemina ou derivados da hemoglobina. A hemocultura requer condições assépticas¹⁴ para a coleta e o manuseio da amostra de sangue, sendo pouco prática em trabalhos de campo. Outras desvantagens associadas a essa técnica são o grande volume do inóculo que deve ser utilizado e o período de exames das culturas. As formas observáveis em hemocultura são as epimastigotas e as tripomastigotas. As percentagens de positividade obtidas na hemocultura convencional por diferentes estudos são muito semelhantes àsquelas observadas no xenodiagnóstico.

Imunodiagnóstico

Por meio de imunofluorescência indireta (Rifi) e teste imunoenzimático de reação (ELISA).

Diagnóstico molecular

Reação em cadeia da polimerase (PCR).

e) Epidemiologia

Distribuição geográfica

O *T. cruzi* é encontrado somente no continente americano, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e do Chile. No entanto, em algumas áreas – nos Estados Unidos, por exemplo –, embora a infecção já tenha sido detectada em mamíferos silvestres, a infecção humana não ocorre ou é rara. A infecção humana é mais comum na América do Sul, e os países mais acometidos são Brasil, Argentina, Chile, Colômbia e Venezuela. A infecção por esse protozoário ocorre basicamente em áreas rurais e periurbanas pobres, onde o tipo de moradia (barro, palha) favorece a colonização por triatomíneos.

¹⁴ Livre de contaminação microbiana.

Prevalência

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2010), a doença de Chagas atinge cerca de 10 milhões de pessoas no mundo, principalmente na América Latina, tendo causado, em 2008, mais de 10 mil mortes, com uma incidência de 300 mil novos casos ao ano. No Brasil, cerca de 2 milhões de pessoas estão infectadas.

Mecanismos de infecção

Para o homem, o principal mecanismo de infecção é ativo cutâneo, com a penetração das formas tripomastigotas metacíclicas na pele lesionada, na mucosa ou na conjuntiva, sempre mediante o contato com as fezes de triatomíneos infectados, que ocorre durante a hematofagia, pois o inseto frequentemente defeca sobre a pele do hospedeiro. Outro modo comum de infecção é a transfusão sanguínea; pela transfusão é possível que um indivíduo que nunca tenha tido contato com barbeiros – por exemplo, indivíduos de áreas urbanas e que possuem melhores condições de moradia – seja infectado. Já foram descritos casos de infecção transplacentária e de infecção por transplante de órgãos. A infecção oral pode ocorrer pela ingestão de alimentos contaminados com material infectante – fezes, urina e triatomíneos triturados – proveniente especialmente de triatomíneos.

g) Profilaxia e controle

De maneira geral, a metodologia recomendada para o controle da doença de Chagas está relacionada aos seguintes fatores:

- controle dos triatomíneos, com o uso de inseticidas nos esconderijos dos insetos;
- educação ambiental, com a melhoria das habitações, para que os barbeiros não encontrem condições favoráveis de desenvolvimento;
- educação sanitária visando esclarecer a população sobre a doença, procedimento fundamental para que ela busque medidas práticas a fim de evitar a infecção;

- conscientização dos responsáveis por bancos de sangue, a fim de evitar a transmissão por meio de transfusão sanguínea: realização de testes sorológicos nos candidatos a doadores e quando isso não for possível, ou não for confiável a triagem sorológica dos doadores, ou, ainda, em regiões onde a prevalência da endemia seja elevada, adicionar substâncias tripanossomicidas às partidas de sangue destinadas à transfusão;
- controle da transmissão congênita: todo recém-nascido de mãe com sorologia positiva para *T. cruzi* deve ser examinado imediatamente após o nascimento para pesquisa de IgM anti-*T. cruzi*; no caso de resultado positivo, o recém-nascido deve ser tratado imediatamente;
- controle de transplantes de órgãos: doador e receptor devem ser examinados sorologicamente. Sendo o primeiro positivo e o segundo susceptível, o ideal é medicar o doador durante os 10 dias que precedem a cirurgia e o receptor, nos 10 dias seguintes ao ato cirúrgico. Não sendo isso possível, o receptor deve ser tratado como caso agudo da doença.

1.1.2 Seção Salivaria – principais representantes

A) Trypanosoma (Trypanozoon) brucei

○ *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei* apresenta três subespécies: *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *Trypanosoma brucei brucei*. *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense* são os agentes etiológicos da doença do sono, descrita em seres humanos, ao passo que o *Trypanosoma brucei brucei* causa a tripanossomíase africana, ou nagana, doença descrita em animais.

a) Morfologia e biologia

Hospedeiros vertebrados: para *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*, o homem e várias espécies de mamíferos silvestres

e domésticos; para *Trypanosoma brucei brucei*, várias espécies de mamíferos silvestres e domésticos.

Hospedeiros invertebrados: insetos (dípteros) vetores hematófagos, do gênero *Glossina*, conhecidos como glossínídeos e popularmente chamados de mosca tsé-tsé.

Morfologia

Tripomastigotas: são as principais formas responsáveis pela transmissão do parasito. Têm formato em “S” e possuem flagelo, que percorre, aderido, todo o corpo do protozoário e que apresenta também uma porção livre curta, a qual emerge de sua extremidade anterior. Os tripomastigotas, quando presentes no intestino médio das moscas tsé-tsé (glossínídeos), têm capacidade de multiplicação, sendo, nesse caso, chamados de **tripomastigotas procíclicos**. Já nas glândulas salivares das moscas tsé-tsé, os tripomastigotas não têm capacidade de multiplicação; nesse caso, são chamados de **tripomastigotas metacíclicos**. Os tripomastigotas metacíclicos são responsáveis pela infecção dos mamíferos, após serem introduzidos na corrente sanguínea juntamente com a saliva quando a mosca se alimenta, mediante a inserção da probóscide na pele do hospedeiro.

As formas tripomastigotas encontradas nos mamíferos podem ser observadas no sangue, na linfa e no fluido espinhal. Quando observados nos mamíferos, os tripomastigotas do *T. brucei* também apresentam diferenças morfológicas e podem ser descritos como formas finas ou formas largas e curtas. As formas finas alcançam $30\mu\text{m}^{15}$ ou mais de comprimento e são responsáveis pela multiplicação do parasito nesses hospedeiros; as formas largas e curtas, que não apresentam a porção livre do flagelo, com comprimento de $15\mu\text{m}$, são responsáveis pela transferência do parasito do mamífero para o inseto.

¹⁵ μm = micrômetro

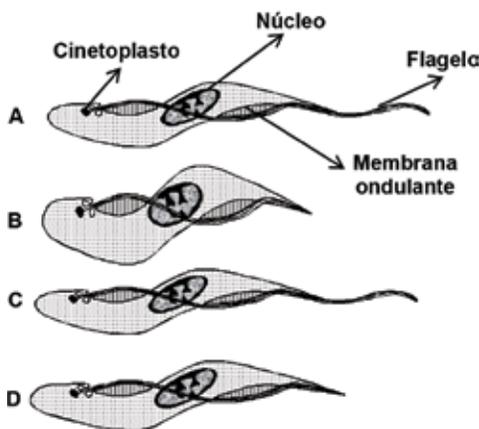


Figura 8. Desenho esquemático das formas tripomastigotas do *T. brucei*: A) forma fina; B) forma larga; C) forma procíclica; D) forma metacíclica.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

Epimastigotas: são as formas responsáveis pela multiplicação do parasito nas glândulas salivares das moscas tsé-tsé.

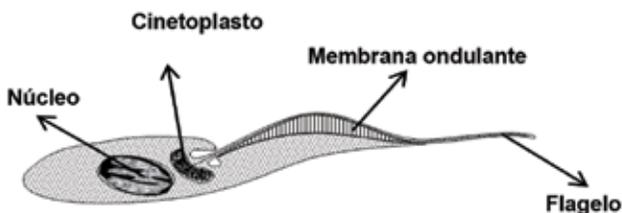


Figura 9. Desenho esquemático da forma epimastigota do *T. brucei*.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

Ciclo biológico do *Trypanosoma brucei*

Durante o repasto sanguíneo, a mosca tsé-tsé (glossina) inocula tripomastigotas metacíclicos na pele do hospedeiro mamífero. Os parasitos entram no sistema linfático e, posteriormente, na corrente sanguínea. No hospedeiro mamífero, essas formas metacíclicas se diferenciam em formas tripomastigotas

sanguícolas finas ou largas. As formas tripomastigotas sanguícolas finas se multiplicam por fissão binária e são carregadas para outras partes do corpo, podendo ser encontradas na linfa e no fluido espinal, entre outros.

As glossinas se infectam quando ingerem, durante o seu repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, formas tripomastigotas sanguícolas largas. No intestino médio das moscas, os parasitos se diferenciam em **tripomastigotas procíclicas**, os quais também se multiplicam por fissão binária e saem do intestino, diferenciando-se em **epimastigotas**. As formas **epimastigotas** migram, então, para as glândulas salivares, aderindo-se às microvilosidades das células e iniciando, em seguida, um processo de multiplicação por fissão binária. Após vários ciclos de multiplicação, parte dessas formas epimastigotas se diferencia em tripomastigotas metacíclicas. O ciclo na tsé-tsé dura em média três semanas.

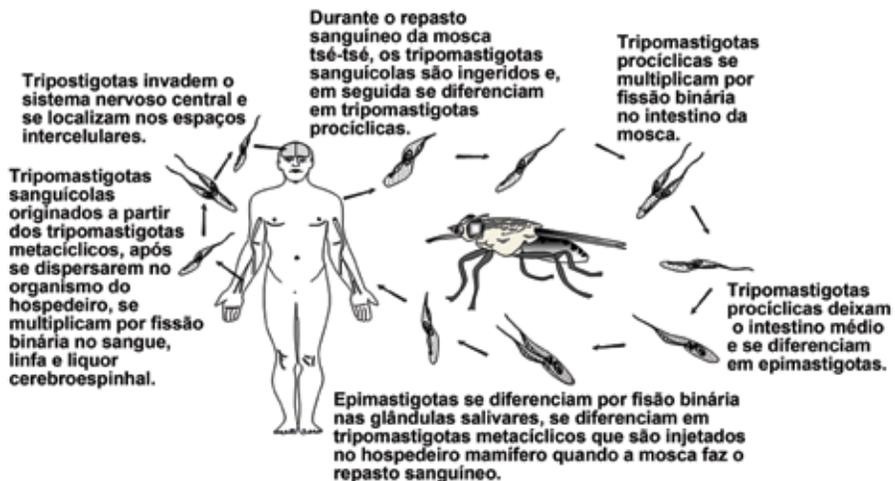


Figura 10. Ciclo biológico do *Trypanosoma brucei*.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

b) Relação parasito–hospedeiro

A infecção pode ocorrer em três estágios:

- **1º estágio** – pode haver o desenvolvimento de um cancro tripanossômico no local da picada, conhecido como cancro de inoculação, e inchaço edematoso, que desaparece após três semanas em média;
- **2º estágio** – denominado estágio hemolinfático, apresenta os seguintes sintomas: febre, tremores, dores musculares e articulares, linfadenopatia (gânglios linfáticos aumentados), mal-estar, perda de peso, anemia e trombocitopenia (redução do número de plaquetas no sangue);
- **3º estágio** – conhecido como estágio meningoencefálico, nele o parasito invade o sistema nervoso central, ocasionando dores de cabeça, sonolência, convulsões epilépticas e apatia que progride para o coma.

O curso da infecção é muito mais grave para o *T. b. rhodesiense* do que para o *T. b. gambiense*. A doença pode levar os indivíduos à morte num período médio de, para o *T. b. gambiense*, seis meses a seis anos e, para o *T. b. rhodesiense*, de até seis meses.

Acredita-se que a patologia da doença do sono esteja relacionada a mecanismos imunológicos.

c) Diagnóstico laboratorial

• Métodos parasitológicos diretos

Pode-se fazer o exame direto de amostras provenientes do sangue, do fluido do cancro, do aspirado de linfonodos, da medula óssea e, no estágio final da infecção, do líquido cefalorraquidiano. Com o exame a fresco dessas amostras, observa-se a motilidade do parasito; esse material pode ser fixado posteriormente com metanol e corado pelo Giemsa para visualização das formas tripomastigotas.

- **Métodos parasitológicos indiretos**

Inoculação do sangue em animais de laboratório (ratos e camundongos) para isolar o parasito; esse método, porém, tem seu uso limitado quando se trata do tipo 1 do *T. b. gambiense*, pois seu crescimento é muito lento nesses animais.

- **Imunodiagnóstico**

São utilizados os métodos Rifi, de hemaglutinação e ELISA.

d) Epidemiologia

A tripanossomíase africana é uma zoonose envolvendo animais, silvestres ou domésticos, e o homem.

A doença do sono, que atinge os humanos no continente africano e que pode levar à morte quando não tratada, é causada pelos parasitos *T. b. gambiense* tipo 1 (parte oeste da África e África central), *T. b. gambiense* tipo 2 (Costa do Marfim) e *T. b. rhodesiense* (porção leste da África) – essa última, a forma mais grave da doença. Já a subespécie *T. b. brucei* (África tropical) atinge somente os animais, causando uma doença denominada n-gana. Essa infecção se restringe aos países africanos, porque a transmissão da infecção depende somente das moscas tsé-tsé, presentes apenas na África subsaariana.

Segundo a OMS, têm sido reportados em média 20 mil novos casos ao ano, com uma prevalência de 50 mil a 70 mil casos (Organização Mundial da Saúde, 2010). São raras as infecções entre os viajantes e a maioria delas é causada pela subespécie *T. b. rhodesiense*.

A epidemiologia da doença do sono causada por *T. b. gambiense* tem como característica o fato de ser ela essencialmente rural; os humanos se infectam ao se aproximarem de cursos de água onde há a presença da mosca. Já *T. b. rhodesiense* é uma zoonose de animais selvagens que atinge o homem quando ele entra em contato com o foco epizootico, tornando-se hospedeiro acidental.

A transmissão da infecção se dá principalmente por meio da picada da mosca tsé-tsé infectada, podendo ocorrer, raramente, de forma congênita, por transfusão de sangue e por acidente de laboratório.

e) Profilaxia e controle

Uma das medidas para a profilaxia e o controle da infecção é a redução da exposição da população a áreas onde ocorre a presença da glossina, ou seja, lugares próximos de rios e matas. Em áreas de risco, os indivíduos devem usar roupas que cubram todo o corpo, de tecido pesado e com cores neutras, pois as moscas tsé-tsé são atraídas pelo movimento e por cores fortes. Outras medidas de controle são o diagnóstico e o tratamento dos pacientes e o controle vetorial.

B) *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*

a) Morfologia e biologia

Parasita o homem e grande número de mamíferos, mas não causa doença. Assim como o *T. cruzi*, o *T. rangeli* é transmitido ao hospedeiro vertebrado por triatomíneos, com a diferença de que o *T. rangeli* é transmitido pela picada principalmente de hemípteros do gênero *Rhodnius*. Os parasitos podem ser isolados da corrente sanguínea alguns meses após a infecção.

Morfológicamente, a forma **tripomastigota sanguícola** do *T. rangeli* é delgada e de extremidade bastante afilada, assemelhando-se à do *T. cruzi*; ele apresenta um cinetoplasto de formato arredondado, porém bem pequeno e pouco evidente.

b) Epidemiologia

Tem distribuição geográfica sobreposta (simpatria) ao *T. cruzi*. O *T. rangeli* já foi encontrado no Brasil, Venezuela, Colômbia, Panamá, El Salvador, Costa Rica, Guatemala e Honduras, sempre em situações nas quais o protozoário não causava doença sintomática no homem.

Em áreas onde o *T. cruzi* e o *T. rangeli* estão presentes, os testes sorológicos podem apresentar resultados falsos positivos, pois existe a possibilidade de reações cruzadas. Para distinguir essas duas protozooses, recorre-se ao xenodiagnóstico – uma vez que o *T. rangeli* coloniza as glândulas salivares do vetor –, à cultura tecidual ou, ainda, às técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase.

1.2 Gênero *Leishmania*

A) *Leishmania* spp (leishmaniose tegumentar e visceral)

a) Morfologia e biologia

As leishmanioses constituem um grupo de doenças, nas quais estão envolvidas mais de vinte espécies, causadas por parasitos intracelulares do gênero *Leishmania*. São protozoários digenéticos¹⁶ e que apresentam duas principais formas evolutivas: promastigota e amastigota; ambas se multiplicam por divisão binária e desenvolvem-se, respectivamente, no trato digestivo do inseto vetor ou em meios de cultura acelulares e no interior de células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros mamíferos.

Hospedeiros vertebrados: o homem, roedores, canídeos silvestres e domésticos, marsupiais, equinos, preguiças e felinos, entre outros.

Hospedeiros invertebrados: insetos flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia* e *Psychodopygus*, no Novo Mundo.

¹⁶ Parasito que necessita de dois ou mais hospedeiros para a realização de seu ciclo de vida.

Habitat: células pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear.

Morfologia

Forma amastigota: forma intracelular observada no hospedeiro vertebrado; possui formato ovoide ou esférico, núcleo arredondado, cinetoplasto em forma de bastão, reto ou curvo, sem flagelo livre.

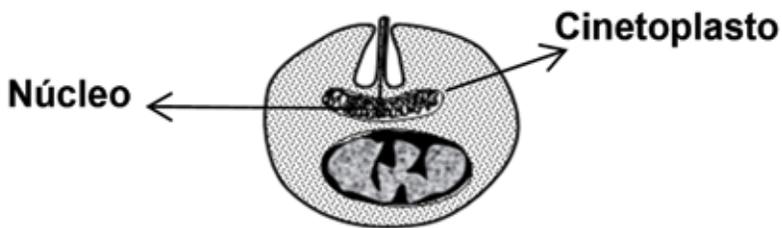


Figura 11. Desenho esquemático da forma amastigota de *Leishmania* spp.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

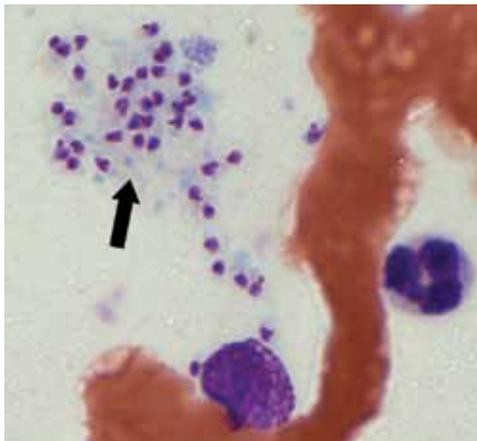


Figura 12. Amastigotas de *Leishmania*: material de medula óssea corado pelo método May-Grunwald–Giemsa, 1000X.

Foto cedida pela Dra. Celeste Souza (Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia/IOC–Fiocruz).

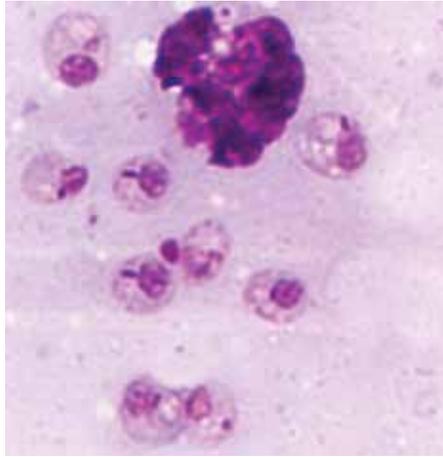


Figura 13. Amastigotas de *Leishmania*: imprint de lesão tegumentar, corado pelo método May-Grunwald–Giemsa, 1000X.

Foto cedida pela Dra. Celeste Souza (Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia/IOC–Fiocruz).

Forma promastigota: observada no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado e em meio de cultura acelular. Tem formato fusiforme ou piriforme, núcleo arredondado, cinetoplasto em forma de bastão e flagelo exteriorizado na porção anterior do parasito.

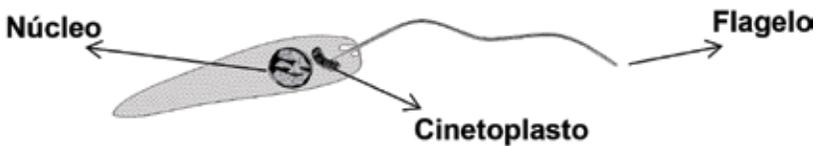


Figura 14. Desenho esquemático da forma promastigota de *Leishmania* spp.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

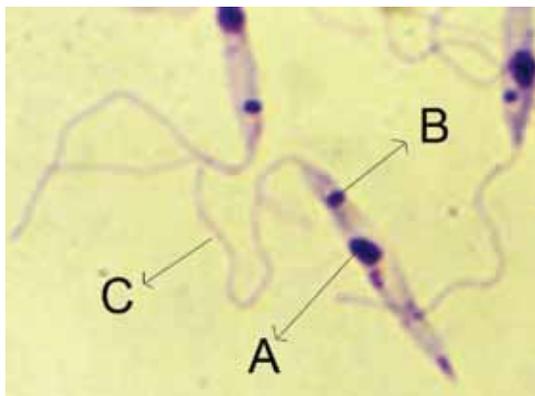


Figura 15. Formas promastigotas de *Leishmania* spp em meio de cultura, 1000X: A) núcleo; B) cinetoplasto; C) flagelo.

Foto cedida pela Dra. Celeste Souza (Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia/IOC–Fiocruz).

Ciclo biológico da *Leishmania* spp

A transmissão da leishmaniose ocorre no momento do repasto sanguíneo do vetor, com a inoculação de formas **promastigotas metacíclicas**, fagocitadas por macrófagos teciduais, na derme do hospedeiro mamífero. No interior dos macrófagos, os **promastigotas** sofrem alterações morfológicas e bioquímicas, resultando nas formas **amastigotas**, e se inicia o processo de reprodução por divisão binária no interior dos fagolisossomas. Posteriormente, após o rompimento da célula hospedeira, os amastigotas são liberados, disseminando-se no organismo do hospedeiro, mediante a fagocitose por outros macrófagos, células dendríticas e fibroblastos.

Nos flebotomíneos, o ciclo do parasito tem início no momento do repasto sanguíneo das fêmeas, quando são ingeridos **amastigotas** de mamíferos infectados. No intestino do flebotomíneo, os parasitos se diferenciam na forma **promastigota**, dando início a vários ciclos de multiplicação por divisão binária. Com isso, o grande número de parasitos acaba determinando a obstrução mecânica das partes altas do tubo digestivo do inseto, e isso dificulta a sua ingestão de sangue, levando-o a picar mais vezes para completar a sua

alimentação. As formas **promastigotas** tornam-se infectantes por volta do sétimo dia, estando aptas a prosseguir no ciclo evolutivo quando novamente o vetor se alimenta de sangue.

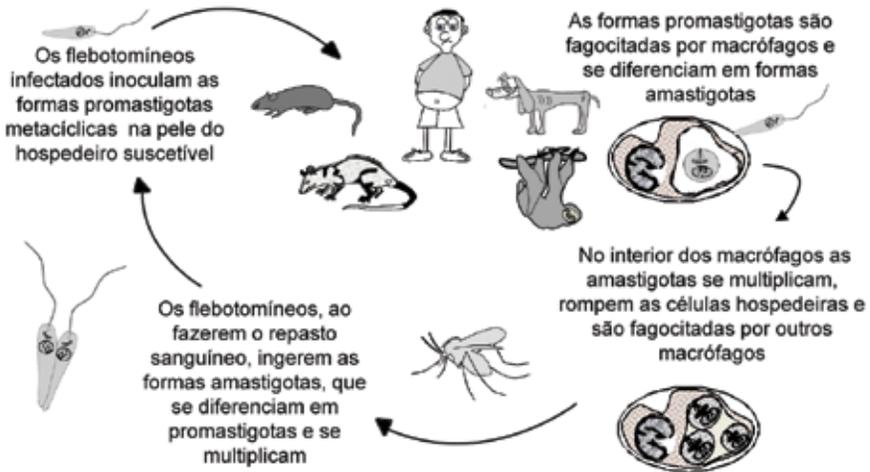


Figura 16. Ciclo evolutivo da *Leishmania* spp.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

b) Leishmânias e leishmaniose

Do ponto de vista clínico, as leishmanioses do Novo Mundo se dividem em dois grandes grupos: tegumentar (cutânea) e visceral.

• Leishmaniose tegumentar

Os parasitos do gênero *Leishmania* induzem respostas complexas no hospedeiro vertebrado, efetuadas e/ou moduladas pelo sistema imune do mesmo.

Principais formas cutâneas no Novo Mundo

A) *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Tem ampla distribuição no Brasil, na Venezuela, na Guiana Francesa e na América Central. É encontrada em áreas de colonização recente ou antiga,

e, nessas últimas, o ciclo de transmissão está associado a animais domésticos – como cães, equinos e mulas –, e a sinantrópicos – como roedores. A ocorrência de casos humanos está relacionada à ocupação desordenada na periferia dos grandes centros urbanos ou aos desmatamentos. As espécies vetoras mais comuns são *Lutzomyia intermedia*, *L. whitmani* e *Psychodopygus wellcomei*.

B) *Leishmania (Viannia) guyanensis*

Ocorre em territórios da Venezuela, na Guiana Francesa, no Suriname e no Brasil, podendo ser observada na Calha Norte da Amazônia, principalmente em áreas de desmatamento e de colonização recente. O ciclo epidemiológico está relacionado a alguns hospedeiros silvestres, tais como a preguiça, o tamanduá, marsupiais e roedores; os casos humanos ocorrem com a invasão da mata pelo homem, com finalidades de desmatamento ou agricultura. As espécies vetoras mais comuns são *Lutzomyia umbratilis*, *L. whitmani* e *L. anduzei*.

C) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Ocorre na Colômbia, no Panamá e no Brasil, onde é observada na Baía Amazônica e nos estados do Maranhão, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro. Seu ciclo epidemiológico é silvestre, envolvendo roedores silvestres e marsupiais como hospedeiros. A infecção no homem é pouco frequente. Seu vetor é *Lutzomyia flaviscutellata*.

D) *Leishmania mexicana*

Ocorre no México, na Guatemala e em Belize, como zoonose florestal. Seu ciclo epidemiológico é silvestre, sendo os roedores os principais reservatórios. A “úlceras dos chicleros”, como é conhecida, é uma doença ocupacional, visto que a população mais atingida é a dos trabalhadores extratores de chicle. As espécies vetoras mais comuns são *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia panamensis*.

Principais formas cutâneas no Velho Mundo

A) *Leishmania major*

Ocorre na África e na Ásia. Conhecida como leishmaniose cutânea úmida, esse tipo de *Leishmania* raramente afeta o homem. Seu ciclo é zoonótico, envolvendo roedores silvestres como reservatórios. A principal espécie vetora é *Phlebotomus papatasi*.

B) *Leishmania tropica*

Ocorre na Europa, na África e na Ásia. Possui características antroponóticas, ou seja, é transmitida de homem a homem pelo inseto vetor. A principal espécie vetora é *Phlebotomus sergenti*.

- **Leishmaniose visceral**

A relação parasito–hospedeiro pode levar a amplo espectro clínico, que vai desde infecções assintomáticas (leishmaniose visceral subclínica) – com ausência de sintomatologia, mas presença de anticorpos para o parasito – até formas mais graves, que culminam com o óbito. Nos quadros mais graves, a progressão da doença é geralmente insidiosa, com períodos de incubação que levam meses ou anos.

Forma visceral no Novo Mundo

A) *Leishmania infantum chagasi*

Ocorre nas Américas. Possui um ciclo doméstico – no qual, além do homem, o cão é o principal reservatório envolvido – e um ciclo silvestre – envolvendo canídeos silvestres e marsupiais. As espécies vetorais mais comuns são *Lutzomyia longipalpis*, *L. evansi* e *L. cruzi*.

Formas viscerais no Velho Mundo

A) *Leishmania donovani*

Ocorre na África Oriental, na Índia e na China. A *L. donovani* caracteriza-se por ser uma antroponose. Em cerca de 10% dos casos, os pacien-

tes desenvolvem uma síndrome denominada leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL, do inglês post - kala.azar. *dermal leishmaniasis*). A principal espécie vetora é *Phlebotomus argentipes*.

B) *Leishmania infantum*

Ocorre na África Ocidental e Central, no Oriente Médio, na China e no Mediterrâneo. A *L. infantum* acomete principalmente o cão e crianças abaixo de 5 anos, e, em contraste com *L. donovani*, o nível de infecção em flebotomíneos é geralmente baixo. A transmissão acontece essencialmente no ambiente rural, e os cães são considerados os principais reservatórios. As principais espécies vetoras são *Phlebotomus argentipes* e *P. perniciosus*.

Sintomatologia

As leishmanioses consistem em quatro principais síndromes clínicas: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea, leishmaniose visceral e leishmaniose dérmica pós-calazar.

Leishmaniose cutânea: no local da picada surge uma ferida na qual pode desenvolver-se um processo necrótico ou uma úlcera, que costumam curar-se espontaneamente. As principais espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea no Velho Mundo são *L. major* e *L. tropica*; as principais espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea no Novo Mundo são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. mexicana* e *L. (L.) amazonensis*. *L. (L.) amazonensis* é um parasito que normalmente causa leishmaniose cutânea, porém, em alguns indivíduos surgem lesões múltiplas difusas, com grande quantidade de parasitos. Esse tipo de leishmaniose, a leishmaniose cutânea difusa, é conhecido como forma anérgica da doença.

Leishmaniose mucocutânea: os pacientes apresentam ulcerações destrutivas e desfigurantes nas mucosas oral e nasal; em geral, não ocorre cura espontânea. As lesões são causadas por metástases que migram por via hematogênica. Essas lesões podem aparecer meses ou anos após o primeiro episódio

da leishmaniose cutânea ocasionada por *L. (V.) braziliensis*.

Leishmaniose visceral: é a síndrome clínica mais grave das leishmanioses e, quando não tratada, pode levar à morte. Os pacientes podem apresentar febre, cansaço e perda de peso, além de aumento de linfonodos, do fígado e do baço. As espécies responsáveis são *L. (L.) infantum*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi*.

Leishmaniose dérmica pós-calazar: é uma seqüela que costuma aparecer em média dois anos depois da cura completa, após o tratamento, da leishmaniose visceral. Caracteriza-se por lesões nodulares, com grande quantidade de amastigotas. A espécie responsável é *L. (L.) donovani*.

c) Diagnóstico

- Leishmaniose tegumentar

Métodos diretos (evidenciação do parasito)

Biópsia de lesões cutâneas: com a amostra retirada da lesão, realiza-se o *imprint* em lâmina, o qual é fixado posteriormente com metanol e corado pelo Giemsa, Leishman ou Panótico.¹⁷ Também é possível fazer a histopatologia do material. A utilização dessa técnica permite observar as formas amastigotas.

Punção da borda inflamada: o material é processado da mesma forma que no *imprint*. A utilização dessa técnica permite observar as formas amastigotas. É uma técnica pouco utilizada na rotina diagnóstica.

Meio de cultura (cultivo em meios acelulares)

Semear em meio apropriado – NNN, LIT, BHI ou Schneider – material obtido de punção ou biópsia. Manter na temperatura de 24 a 27°C e

¹⁷ No método panótico utilizam-se corantes capazes de evidenciar todas as estruturas histológicas existentes no material examinado.

observar semanalmente, por quatro semanas, em microscópio óptico. A utilização dessa técnica permite observar as formas promastigotas. É uma técnica pouco utilizada na rotina diagnóstica.

Inoculação em animal de laboratório

Inoculação do material obtido de punção ou biópsia por via subcutânea ou intradérmica em hamster. A inoculação de animais, embora não tenha aplicação prática para fins de diagnóstico imediato, pode ser útil para o isolamento do parasito visando à sua caracterização e aos estudos epidemiológicos. A utilização dessa técnica permite observar as formas amastigotas. É uma técnica pouco utilizada na rotina diagnóstica.

Métodos indiretos

Imunológicos

Teste intradérmico: é uma reação de hipersensibilidade celular retardada utilizada no diagnóstico da leishmaniose tegumentar, porém indica somente a reatividade aos antígenos utilizados; tem sido também empregado no controle da cura.

Pesquisa de anticorpos séricos: as técnicas mais utilizadas são a reação de imunofluorescência indireta (Rífi) e o teste imunoenzimático ELISA.

Moleculares

Reação em cadeia da polimerase: utilizada para detecção do kDNA (DNA do cinetoplasto) do parasito, por meio de amostras de sangue e/ou tecidos de pacientes infectados.

- **Leishmaniose visceral**

Métodos diretos (evidenciação do parasito)

Aspirado (punção) de material do baço, medula óssea ou linfonodo: com qualquer dessas amostras é realizado o esfregaço em lâmina, posteriormente fixado com metanol e corado pelo Giemsa, Leishman ou Panótico. A utilização desse método permite observar as formas amastigotas.

Biópsia de fígado ou baço: *imprint* e/ou histopatologia para observação das formas amastigotas. A biópsia de baço ou de fígado é um procedimento de elevado risco que só deve ser realizado em condições especiais e por médicos.

OBS.: Embora de maior simplicidade e menor risco para o paciente, o material de medula óssea, coletado através de punção do esterno, da tíbia ou da crista íliaca, também deve ser coletado por médicos, em ambiente com condições adequadas.

Esfregaços do material biológico coletado: devem ser feitos em papel de nitrocelulose, visando ao diagnóstico por PCR.

Meio de cultura (cultivo em meios acelulares)

Semear em meio apropriado – NNN, LIT, BHI, Schneider – material obtido de punção ou biópsia. Manter entre as temperaturas de 24 a 27°C e observar semanalmente, por quatro semanas, em microscópio óptico. A utilização dessa técnica permite observar as formas promastigotas.

Inoculação em animal de laboratório

Inoculação do material obtido de punção ou biópsia por via intraperitoneal em hamster. A utilização dessa técnica permite observar as formas amastigotas. Essa metodologia, embora não tenha aplicação prática para fins

de diagnóstico imediato, pode ser útil para o isolamento do parasito, visando à caracterização da *Leishmania* spp.

Métodos indiretos

Imunológicos

Pesquisa de anticorpos séricos: são utilizados os métodos Rifi (os títulos sorológicos costumam ser mais altos na leishmaniose visceral) e ELISA.

Antígenos recombinantes: têm sido usados nos testes imunoenzimáticos e em testes rápidos de *dip stick*, para diagnóstico de campo. Entre eles, temos o K39, um teste altamente específico na detecção de indivíduos na fase aguda da infecção.

Moleculares

PCR: detecção do kDNA (DNA do cinetoplasto) do parasito, utilizando amostras de sangue e/ou tecidos de pacientes infectados.

d) Epidemiologia

A leishmaniose acomete mais de 12 milhões de pessoas em 88 países; calcula-se que cerca de 350 milhões de indivíduos encontrem-se em situação de risco. A reemergência das leishmanioses é provavelmente consequência de novas características epidemiológicas, ocasionadas por fluxos migratórios, alterações antrópicas no ambiente, participação de novas espécies vetoras, bem como de reservatórios secundários, e ocupações desordenadas na periferia das grandes cidades. Em adição a esses fatores, a ocorrência de doenças imunossupressoras, tais como a Aids, e de outras situações que levam à imunossupressão – transplantes, drogas e desnutrição, muito comuns em países do Terceiro Mundo e em desenvolvimento – têm levado ao aparecimento de formas clínicas atípicas nos indivíduos com leishmaniose, pois é conhecido o comportamento oportunista desse protozoário.

A epidemiologia da leishmaniose visceral americana vem se alterando ao

longo dos tempos. Inicialmente, a doença mantinha um perfil rural, mas de transmissão peridomiciliar, sendo as crianças as mais acometidas. Nos últimos vinte anos, verificou-se grande emigração de pessoas de áreas rurais para áreas urbanas. Essas pessoas frequentemente se instalam na periferia das grandes cidades, lugares de crescimento rápido e desordenado, e trazem consigo animais domésticos, o que contribui para o processo de urbanização da doença. Ao serem criados no peridomicílio, esses animais propiciam a domicialização de *L. longipalpis*; conseqüentemente, a densidade desse vetor pode alcançar níveis bastante elevados nas habitações humanas e em criadouros de animais. Aos poucos, a doença passou a adquirir característica periurbana e, hoje, se encontra em plena urbanização, estando presente em bairros urbanizados de grandes cidades.

Atualmente a epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana (LTA) pode apresentar dois padrões epidemiológicos distintos:

- surtos epidêmicos, quando ocorrem desmatamentos e exploração da mata por ação antrópica;¹⁸ nesse caso, a LTA é fundamentalmente uma zoonose de animais silvestres que pode acometer o homem quando ele entra em contato com os focos zoonóticos.
- surtos relacionados ao fluxo migratório e às ocupações desordenadas na periferia dos grandes centros urbanos, nos quais animais domésticos – por exemplo, cães e equinos – e também sinantrópicos – por exemplo, roedores – podem ter papel importante como hospedeiros do parasito.

Segundo o Ministério da Saúde, a leishmaniose visceral é endêmica no país, ocorrendo surtos com alguma frequência. A protozoose está presente em 19 estados brasileiros, sendo que, em 2005, dos 3.203 casos notificados, a maior incidência foi observada no Nordeste (55,5% do total de casos), seguido pela região Sudeste (21,5%), região Norte (16%) e, finalmente, região Centro-Oeste (7%). Têm sido registrados em média

¹⁸ Por ação do homem.

cerca de 3.500 casos por ano, com uma taxa de letalidade que, em algumas regiões, atinge 10%.

e) Profilaxia e controle

Muitas vezes, a profilaxia e o controle das leishmanioses são de difícil execução. É preciso proceder à ampla análise local da epidemiologia da doença a fim de avaliar a utilização de medidas profiláticas e de controle, quando viáveis. As estratégias de controle utilizadas no Brasil devem estar integradas e focadas no diagnóstico e tratamento dos casos humanos, em inquéritos sorológicos, na eliminação de cães soropositivos, no manejo ambiental e no controle químico para a redução da espécie vetora.

Combate ao flebotomíneo: algumas medidas que podem ser adotadas são uso de inseticidas no ambiente (fumacê) em áreas endêmicas urbanas; uso de repelentes ao entrar na mata; uso de telas de malha fina, impedindo a entrada do vetor no domicílio. Em relação ao manejo ambiental, evitar desmatamentos e construções próximas de áreas de florestas.

Controle de reservatórios: segundo a Organização Mundial da Saúde (2010), cães comprovadamente parasitados por *Leishmania chagasi* devem ser submetidos à eutanásia. Atualmente outras medidas de controle também têm sido utilizadas, tais como borrifação de inseticidas nos cachorros, uso de coleiras com deltametrina e vacinação dos cães, porém algumas dessas estratégias exigem ainda maiores estudos.

2. Protozoários do filo Sarcocistophora, subfilo Mastigophora, ordem Diplomonadida

A) *Giardia lamblia*

a) Morfologia e biologia

A *Giardia lamblia*, também conhecida como *Giardia duodenalis* e *Giardia intestinalis*, pertence ao filo Sarcocistophora e ao subfilo Mastigophora. São parasitos do intestino delgado de uma série de mamíferos, incluindo o homem, no qual pode causar diarreia aguda e crônica. Anteriormente acreditava-se que homens e outros animais eram infectados por espécies diferentes, mas atualmente há uma tendência a se crer tratar-se de uma mesma espécie que pode parasitar homens, cães, gatos e mais uma série de outros mamíferos. Existem variações genéticas dentro do gênero e da espécie *G. lamblia*. Diferenças dos isolados¹⁹ influenciam diretamente a especificidade ao hospedeiro, crescimento, desenvolvimento, virulência, antigenicidade e sensibilidade a drogas. Vários estudos sugerem o risco de transmissão zoonótica, ou seja, entre homens e animais.

Morfologia

Os trofozoítas são piriformes,²⁰ apresentam simetria bilateral e dois núcleos anteriores. Sua porção dorsal é convexa, e a ventral, côncava com um grande disco suctorial²¹ em sua metade anterior que facilita a adesão do protozoário às células do epitélio intestinal. Como estrutura de locomoção, apresentam quatro pares de flagelos (dois anteriores, dois laterais, dois ventrais e dois posteriores), que se originam de blefaroplastos.²² Há dois axonemas paralelos que vão de sua extremidade anterior até a extremidade posterior em dois blefaroplastos. Abaixo do disco suctorial estão uma ou duas estruturas curvas,

¹⁹ Grupo de protozoários obtidos de um mesmo hospedeiro.

²⁰ Forma de pera.

²¹ Também chamado de disco ventral ou disco adesivo.

²² Corpúsculo basal do flagelo.

em forma de vírgulas, intensamente coradas, chamadas de corpos parabasais ou corpos medianos. Não há citóstoma. Seu tamanho varia de 9 a 20 μm – mais comumente têm de 10 a 18 μm de comprimento – por 5 a 10 μm de largura.

Os cistos possuem formato ovalado, elíptico ou mais raramente esférico, são refringentes, de parede bem fina, com tamanho variando de 8 a 14 μm de comprimento por 6 a 10 μm de largura. Apresentam as mesmas estruturas intracitoplasmáticas que os trofozoítas – corpos parabasais, núcleos, axonemas –, em mesmo número ou, quando o cisto está maduro, duplicadas.

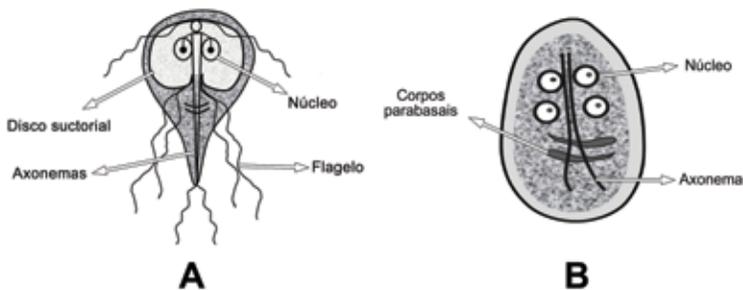


Figura 17. *Giardia lamblia*: A) trofozoíta; B) cisto.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

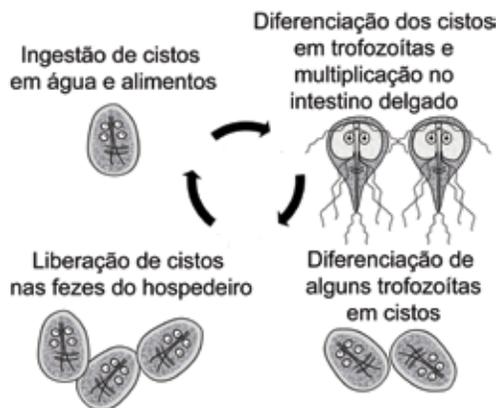


Figura 18. Ciclo biológico da *Giardia lamblia*.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

As formas trofozoítas encontram-se aderidas, por meio de seu disco suctorial, às células do epitélio intestinal do hospedeiro. Nesse local, utilizam produtos da digestão do hospedeiro para sobreviver. A multiplicação ocorre por divisão binária longitudinal. Alguns trofozoítas sofrem encistamento: recolhem seus flagelos, encurtam o corpo e formam uma parede ao seu redor.

Os cistos são eliminados para o meio ambiente nas fezes do hospedeiro. Essas estruturas resistem por cerca de duas semanas em condições favoráveis, permanecendo viáveis para infectar novos hospedeiros.

A infecção ocorre por meio da ingestão de cistos, principalmente por contaminação da água e de alimentos. No intestino delgado (criptas do duodeno) ocorre o desencistamento, que dá origem a dois trofozoítas.

b) Patogenia e manifestações clínicas

A presença dos trofozoítas aderidos à mucosa intestinal causa alterações locais que podem prejudicar a absorção de nutrientes, como vitaminas e gorduras lipossolúveis, pelo intestino. Alguns locais onde a *Giardia lamblia* se fixa podem apresentar impressões circulares deixadas por seu disco suctorial, com o que se altera a função das microvilosidades da região. Muitos casos de parasitismo podem passar despercebidos. As manifestações mais frequentes são quadros de diarreia, perda de peso e presença de muco e gordura nas fezes (esteatorreia). Quadros de intolerância à lactose já foram observados em associação com o parasitismo. A hipersensibilidade local, mediada por IgE, leva ao aumento do peristaltismo e, fora do intestino, pode ocasionar manifestações cutâneas, como lesões semelhantes à urticária, que já foram observados em indivíduos parasitados por *Giardia lamblia*.

c) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico é feito principalmente por meio de exames coproparasitológicos para pesquisa de cistos e trofozoítas. Em fezes diarreicas, é possível a

observação de trofozoítas por meio do exame direto (a fresco) ou mediante esfregaços fecais. Para uma melhor observação do trofozoíta, deve ser utilizado material fresco (até uma hora após a coleta das fezes) ou conservado pelo fixador de Schaudinn (1903). A simples visualização a fresco ou a coloração pelo lugol já são suficientes para diagnosticar a presença do trofozoíta. Em fezes moldadas, onde há grande número de cistos, os métodos de concentração são os mais indicados, por sua maior sensibilidade. Dentre os mais indicados, encontram-se os métodos de Faust e cols. (1938) e Ritchie (1948).

Como a liberação de cistos nas fezes pode ser irregular, recomenda-se a coleta de mais de uma amostra, em dias não consecutivos, mantendo-se o material em soluções conservadoras, tais como o MIF (mercurocromo ou mertiolate + iodo + formol).

Apesar de não fazer parte da rotina diagnóstica, em razão das dificuldades técnicas para a sua realização, a pesquisa microscópica do líquido jejunal ou de bile, obtidos por endoscopia, apresenta grande sensibilidade nessa parasitose.

A pesquisa de coproantígenos pode ser realizada principalmente pelo método ELISA; já a pesquisa de cistos pode ser feita por imunofluorescência direta. Geralmente, essas técnicas utilizam anticorpos monoclonais contra os antígenos dos cistos e dos trofozoítas de *Giardia lamblia*.

A sorologia tem sido empregada apenas em estudos epidemiológicos devido à alta prevalência de giardíase no mundo. Os títulos anti-*Giardia* IgM são apenas elevados naqueles indivíduos com infecção corrente. Aproximadamente um terço dos pacientes desenvolvem anticorpos específicos de resposta anti-*Giardia* IgA. Resultados negativos não afastam a doença. Anticorpos anti-IgG podem se manter elevados por longos períodos, o que prejudica o diagnóstico, principalmente em se tratando de regiões endêmicas.

A detecção do DNA de *Giardia lamblia* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) é altamente sensível, porém, ao menos atualmente, pelo alto custo relativo, é pouco realizada na rotina diagnóstica.

d) Epidemiologia

A distribuição geográfica desse gênero é mundial. Surtos de giardíase humana estão normalmente associados à contaminação de reservatórios de água para o abastecimento da população. Há maior prevalência da protozoose em regiões tropicais e subtropicais onde as condições sanitárias são precárias e há maior resistência do cisto – que pode se manter viável por vários meses – às condições ambientais. No Brasil, a prevalência geral oscila, segundo os pesquisadores, de 4 a 30%. A maior incidência ocorre entre 8 meses e 12 anos de idade, caindo significativamente na fase adulta. Alguns estudos indicam a possibilidade de existirem reservatórios não humanos dessa infecção – principalmente ratos e cães –, porém esses dados devem ser analisados mais profundamente para que fique clara a real importância desses animais na epidemiologia da giardíase humana. Pelas características de transmissão, comunidades fechadas como creches, escolas, enfermarias e afins se mostram mais propensas à transmissão entre seus membros. Além disso, como é possível encontrar cistos de *G. lamblia* na região embaixo das unhas, os manipuladores de alimentos podem transmitir o parasito para grande número de pessoas.

e) Profilaxia e controle

Como outras parasitoses intestinais de transmissão passiva oral, as medidas mais eficientes nesse campo são: educação sanitária da população; busca de casos, principalmente na população pré-escolar e escolar, seguida por tratamento específico; tratamento de água e esgoto; cuidados gerais no preparo de refeições; corte de unhas; lavagem das mãos após defecar, entre outras.

3. Protozoários do filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Trichomonadida

A) *Trichomonas vaginalis*

A espécie *Trichomonas vaginalis* pertence à ordem Trichomonadida, família Trichomonadidae. Acomete diversas regiões do sistema urogenital de mulheres e homens.

a) Morfologia e biologia

Existe apenas a forma trofozoítica, que tem de 8 a 32 μm de comprimento por 5 a 14 μm de largura, aspecto piriforme ou ameboide, quatro flagelos livres e um recorrente (formando uma membrana ondulante) e o axóstilo.

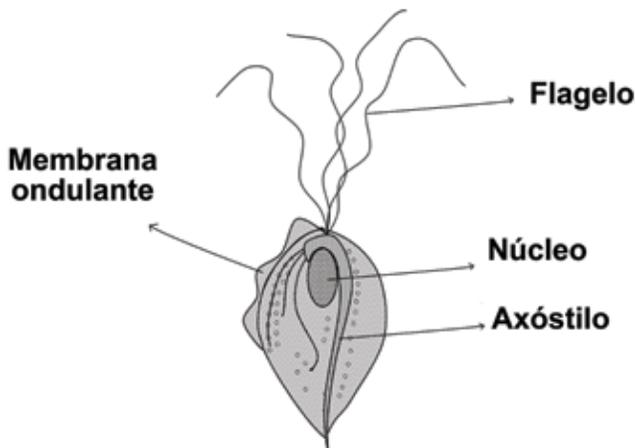


Figura 19. Trofozoíta de *Trichomonas vaginalis*.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC-Fiocruz).

O habitat principal do *T. vaginalis*, nas mulheres, é a cavidade vaginal, seguida por exo e endocérnix, útero, trompas de Falópio e uretra. Nos homens, uretra, próstata, vesícula seminal e epidídimo são os locais que podem albergar o parasito. Sua reprodução ocorre por divisão binária longitudinal, o que possibilita um grande aumento da população em seu habitat. A transmissão ocorre

principalmente durante o ato sexual sem o uso de preservativos. Em gestantes infectadas por esse parasito, pode ocorrer infecção dos bebês durante a passagem pelo canal de parto. Raramente, também pode ocorrer transmissão por meio de roupas íntimas e de material de exame ginecológico, ou pelo contato da genitália com meio contaminado, tal como banheiras e piscinas.

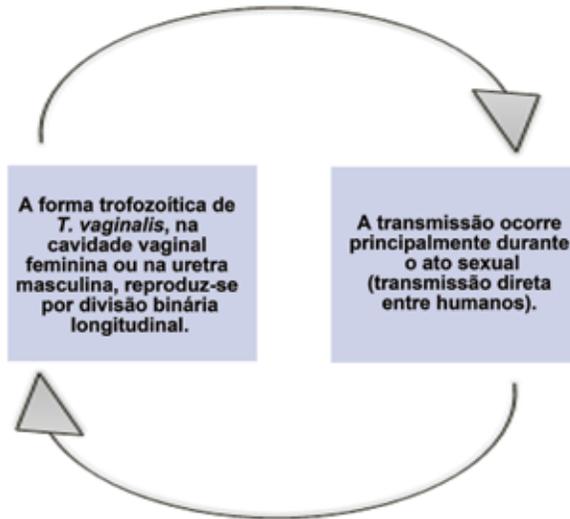


Figura 20. Ciclo biológico do *Trichomonas vaginalis*.

b) Patogenia e manifestações clínicas

As principais lesões determinadas pelo *Trichomonas vaginalis* são explicadas principalmente pela irritação da mucosa local causada pelos parasitos, que gera uma resposta inflamatória e lesões celulares.

Em mulheres, a tricomoníase manifesta-se sob a forma de vaginite com intenso corrimento fluido e aspecto bolhoso, com odor desagradável, mais frequente no período pós-menstrual, e cuja coloração, de acordo com a presença de elementos da microbiota normal feminina, pode variar de tons amarelados a esverdeados. O quadro pode estar acompanhado de prurido ou irritação vulvovaginal de intensidade variável e dores na região do baixo ventre. A mulher apresenta dor e desconforto nas relações sexuais e ao urinar, quando

ocorre uretrite. É comum também o aumento na frequência com que urina. A tricomoníase no homem é geralmente assintomática, ou apresenta-se como uma uretrite com leve prurido. Aproximadamente 25% a 30% das mulheres infectadas podem estar também infectadas nas glândulas de Skin e de Bartholin, podendo ou não existir sintomatologia. Pela dificuldade dos fármacos utilizados no tratamento chegarem a essas glândulas, pode ocorrer permanência do protozoário em tais locais, gerando insucesso terapêutico, e isso pode levar à ideia equivocada de resistência às drogas utilizadas. Por conta das alterações locais desencadeadas pelo protozoário, a tricomoníase urogenital tem sido apontada como um fator de risco para a aquisição do vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*).

c) Diagnóstico laboratorial

Em mulheres, são utilizados com mais frequência: exame microscópico da secreção vaginal ou cervical, diluída em solução fisiológica; análise do centrifugado do lavado vaginal; e pesquisa de trofozoítas no sedimento do centrifugado urinário. O cultivo desses materiais em meio nutritivo pode aumentar a quantidade de trofozoítas, melhorando a sensibilidade no diagnóstico.

Em indivíduos do sexo masculino com suspeita de tricomoníase, examina-se a secreção uretral ou a descarga decorrente de massagem prostática, utilizando-se as mesmas técnicas citadas para o diagnóstico em mulheres.

Para ambos os sexos, podem ser realizados mais raramente a reação de imunofluorescência direta e o teste ELISA.

d) Epidemiologia

A tricomoníase urogenital é a doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais comum no mundo. Em razão de sua forma de transmissão, a faixa etária sexualmente ativa da população é a mais acometida. Sua distribuição é cosmopolita²³ ou seja, é encontrada em diversas regiões do mundo —, e a chance de infecção é diretamente proporcional ao número de parceiros sexu-

²³ Com a ampla distribuição mundial; comum a vários países.

ais. Em razão dos preconceitos que cercam as DSTs e da não notificação obrigatória de tal infecção, não existem dados fidedignos sobre a prevalência e a incidência da tricomoníase, tanto em nível mundial quanto em nível nacional.

e) Profilaxia e controle

A educação sanitária da população quanto aos aspectos relativos à transmissão/prevenção de DSTs é a forma mais eficiente de controle dessa protozoose. É recomendável o uso de preservativos durante todo o ato sexual; o uso individual de roupas íntimas; a esterilização dos aparelhos ginecológicos; a higiene adequada de assentos sanitários e cuidados ao se utilizarem sanitários públicos; e o diagnóstico e tratamento dos indivíduos parasitados e do(s) seu(s) parceiro(s) sexual(ais). Para o caso da transmissão por canal de parto, a pesquisa cuidadosa de *T. vaginalis* deve ser incluída entre os exames pré-natais de rotina.

4. Protozoários do filo Sarcomastigophora, subfilo Sarcodina, ordem Amoebida

4.1 Principais amebas parasitos do intestino humano e amebas de vida livre oportunistas

As amebas mais comumente encontradas no intestino humano pertencem ao subfilo Sarcodina, classe Lobosea, ordem Amoebida, família Entamoebidae. Quatro espécies do gênero *Entamoeba* podem habitar o intestino grosso de humanos, sendo a *Entamoeba histolytica* a única espécie comprovadamente patogênica; as demais – *Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanni* e *Entamoeba coli* – são consideradas comensais. A espécie *Entamoeba gengivalis* pode ser encontrada na cavidade oral, mas não causa danos locais. Outras espécies de amebas comensais pertencentes a diferentes gêneros também são encontradas no intestino humano: *Endolimax nana* e *Iodamoeba bütschlii*, além de *Dientamoeba fragilis*, um flagelado com fase ameboide. Algumas

amebas de vida livre, como *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba castellanii* e *Acanthamoeba astronyxis*, podem causar, em determinadas situações, infecções severas, com quadros como os de meningoencefalite²⁴ em humanos.

4.2 Morfologia e biologia dos gêneros *Entamoeba*, *Endolimax* e *Iodamoeba*

A) *Entamoeba histolytica*

Hospedeiros: homem (hospedeiro principal), outros primatas, cães e gatos.

Habitat: intestino grosso, essencialmente ceco, reto, sigmoide e início do cólon ascendente, por serem locais de menor velocidade do trânsito intestinal. Eventualmente, principalmente na dependência do isolamento do parasito, pode ocorrer a forma extraintestinal da infecção, acometendo principalmente o fígado, o pulmão, o cérebro e a pele.

a) Morfologia

Trofozoíta: é a forma vegetativa do protozoário, encontrada no hospedeiro. Possui formato irregular (ameboide) por causa da emissão de pseudópodes. Sua membrana citoplasmática é delicada. Seu núcleo possui grânulos de cromatina periférica delicados e regularmente distribuídos na face interna da membrana nuclear. O cariossomo²⁵ é puntiforme e central. Quando na luz intestinal, os trofozoítas possuem dimensões entre 12 e 40 μm ; entretanto, nos quadros de amebíase invasiva, quando os trofozoítas estão em intensa atividade fagocítica, podem chegar a 60 μm de diâmetro, apresentando o citoplasma repleto de vacúolos digestivos contendo hemácias e restos celulares, e lesionar a parede intestinal, atingindo outros órgãos.

²⁴ Inflamação do cérebro e das meninges que o envolvem.

²⁵ Corpúsculo central ou excêntrico presente no núcleo de alguns protozoários, visualizado após a coloração por hematoxilina férrica; o mesmo que endossomo.

Cistos: são as formas de resistência do parasito fora do organismo do hospedeiro. São eliminados com as fezes no ambiente. Possuem forma arredondada, medem de 10 a 15 μm e podem apresentar de um a quatro núcleos, dependendo do estágio de maturação. Cistos imaturos podem apresentar um, dois ou três núcleos e corpos cromatóides em forma de bastão; pode-se observar também, nas colorações permanentes, como a hematoxilina férrica, um “vacúolo de glicogênio”.²⁶ As duas últimas estruturas não são visualizadas nos cistos tetranucleados e maduros.

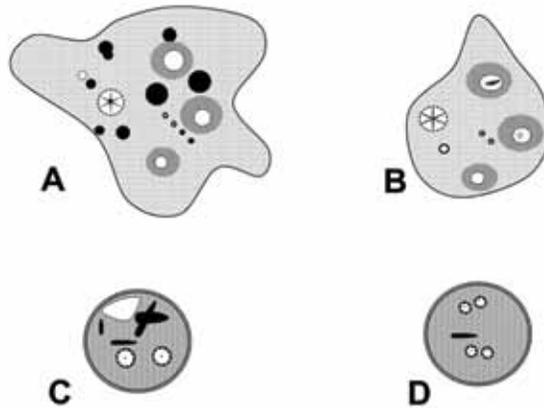


Figura 21. *Entamoeba histolytica*: A) trofozoíta grande; B) trofozoíta pequeno; C) cisto jovem ou imaturo; D) cisto maduro.
Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

²⁶ Região ocupada pelo glicogênio, que é removido pelo processo de coloração.

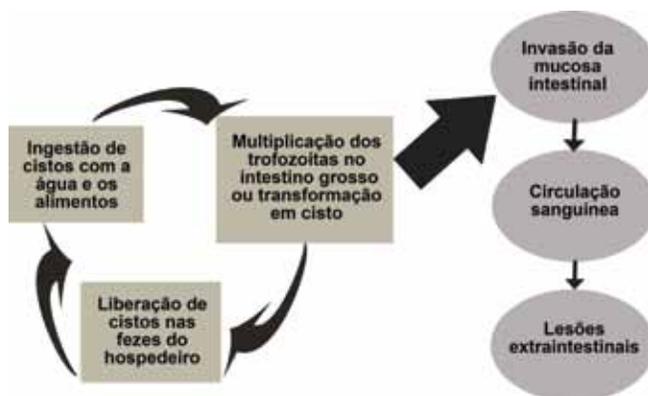


Figura 22. Ciclo biológico da *Entamoeba histolytica*.

b) Amebíase

Entende-se por amebíase a infecção causada pela espécie *E. histolytica*. Tal evento pode desencadear alterações como diarreia com presença de sangue (disenteria amebiana) em decorrência de lesões ulceradas causadas pelos trofozoítas da ameba. Em alguns casos, trofozoítas podem atingir outros órgãos, por meio da circulação sanguínea, gerando lesões necróticas principalmente no fígado, pulmão e cérebro. A amebíase extraintestinal pode ser fatal e, por causa de sua prevalência, é considerada a terceira infecção parasitária por protozoário que mais causa óbitos no mundo, colocando-se depois apenas da doença de Chagas e da malária.

A maior parte dos casos de infecção por *E. histolytica* registrados como amebíase são assintomáticos. Entretanto, sabe-se hoje que muitos casos de parasitismo por *Entamoeba dispar* (amebídeo morfológicamente idêntico à *E. histolytica*) foram erradamente considerados infecções por *E. histolytica*. Alguns pesquisadores consideram que a patogênese da amebíase depende de fatores inerentes ao parasito – cepas mais ou menos virulentas, produção de proteínas responsáveis pela adesão celular, formação de poros e lise das células-alvo –, e de fatores inerentes ao hospedeiro – resposta imunológica, dieta alimentar e sua microbiota intestinal.

c) Diagnóstico laboratorial

- **Forma intestinal**

A forma aguda da amebíase exibe quadros clínicos comuns a outras doenças que produzem disenteria ou diarreia. O diagnóstico deve basear-se em exames parasitológicos ou, quando isso não é possível, em provas indiretas e outros recursos laboratoriais. Como a liberação dos parasitos ocorre de modo intermitente, devem-se realizar vários exames (de 3 a 5), em dias diferentes, para que se possa obter um resultado mais seguro.

Fezes diarreicas: os trofozoítas são as formas mais encontradas em fezes diarreicas, sendo a primeira opção o exame direto, que deve ser feito com fezes coletadas e enviadas ao laboratório em menos de uma hora, a fim de se evitar a degradação dos trofozoítas. Caso esse exame resulte positivo para a presença de trofozoítas de amebídeos, o material é em seguida corado por hematoxilina férrica (HF) ou tricromo (corante alternativo), para exame pormenorizado da morfologia e dimensões dos trofozoítas, que vai permitir a diferenciação entre as diferentes espécies que podem ser encontradas no homem.

Fezes moldadas: os cistos resistentes a técnicas de concentração fecal como as descritas por Faust e cols. (1938) e Ritchie (1948) são as formas predominantes. Podemos ainda utilizar outros materiais para a pesquisa em casos particulares, tais como material aspirado de lesões ulceradas coletado por endoscopia (retossigmoidoscopia), com posterior coloração por HF.

Muitos pesquisadores têm utilizado o teste de imunoabsorção enzimática ELISA, com anticorpos policlonais anti-*Entamoeba*, a fim de detectar antígenos parasitários nas fezes de pacientes; no entanto, esse teste não é capaz de distinguir *E. histolytica* de *E. dispar*, sendo sua utilidade limitada.

- **Formas extraintestinais**

Alguns exames, tais como cintilografia, ressonância magnética e radiografia podem apresentar resultados que levantem a suspeita de amebíase extraintestinal. No entanto, para a sua confirmação, são necessárias técnicas que evidenciem diretamente a presença de trofozoítas: coleta de material em aspirados e/ou biópsias e coloração pela hematoxilina férrica. Essas técnicas apresentam alguns inconvenientes, por serem muito invasivas e por apresentarem baixa sensibilidade. Dessa forma, métodos de diagnóstico imunológico – imunofluorescência indireta (IFI), ELISA, hemaglutinação indireta, reação de fixação do complemento, aglutinação do látex, contraímunoeletroforese, imunodifusão dupla em gel de ágar – têm ganhado mais espaço no mercado.

Hemaglutinação, reação de fixação do complemento e contraímunoeletroforese são métodos muito sensíveis, mas como os anticorpos envolvidos nesses processos persistem durante muitos anos após a infecção, pouco informam sobre a situação atual do paciente. Contudo, apesar de estarem em desuso, podem ser utilizados em inquéritos epidemiológicos.

OBS.: Somente *E. histolytica* é responsável pelos quadros amebianos invasivos, levando à produção de anticorpos específicos; nas infecções por *E. dispar*, tais anticorpos não são encontrados no soro. *E. dispar* é indistinguível morfológicamente de *E. histolytica*; sua diferenciação é feita exclusivamente por técnicas moleculares ou imunológicas.

d) Diagnóstico diferencial morfológico

É importante fazer a diferenciação das espécies de amebas no diagnóstico coproparasitológico.

- ***Entamoeba hartmanni***

Os trofozoítas de *Entamoeba hartmanni* são pequenos e delicados (com 6 a 12 μm). Apresentam apenas um núcleo pequeno, com cariossoma em geral puntiforme e excêntrico. Em cerca de dois terços dos casos, a cromatina periférica é semelhante à da *E. histolytica*; em um terço dos casos, porém,

pode-se apresentar formando barras ou desenhos em forma de crescente, de tamanho variável, mas sempre colados à face interna da membrana nuclear. Os cistos são tetranucleados, com dimensões menores que os da *E. histolytica* (geralmente têm de 5 a 8 μm).



Figura 23. A) trofozoíta; B) trofozoíta; C) cisto.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

- *Entamoeba coli*

Os trofozoítas de *E. coli* variam geralmente de 18 a 28 μm de diâmetro, apresentam núcleo visível mesmo a fresco, com o cariossoma posicionado fora do eixo central do núcleo (excêntrico), e um anel de grânulos periféricos mais grosseiro e irregular. O endoplasma é bastante granuloso, com muitos vacúolos contendo grande número de bactérias fagocitadas, leveduras e, muito raramente, hemácias. No cisto, o citoplasma não apresenta vacúolo e, conforme o seu grau de desenvolvimento, pode apresentar de um a oito núcleos. A dimensão do cisto varia de 15 a 25 μm . Os cistos também podem apresentar corpos cromatóides lembrando agulhas ou espículas. Vacúolos de glicogênio e corpos cromatóides são raros em cistos maduros.

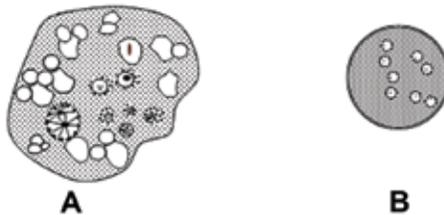


Figura 24. *Entamoeba coli*: A) trofozoíta; B) cisto.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

- ***Endolimax nana***

Seus trofozoítas são os menores encontrados nos humanos – seu tamanho varia de 6 a 12 μm . Apresentam núcleo pequeno, vesicular, com membrana nuclear delicada e sem revestimento interno de grânulos de cromatina; seu cariossomo é relativamente grande, compacto e irregular, e algumas vezes ligado à carioteca²⁷ por filamentos delgados. *Endolimax nana* emite lentamente seus pseudópodos grossos e hialinos. O núcleo não é visível nos exemplares vivos. Os cistos são elípticos ou ovoides, com quatro núcleos pequenos, pobres de cromatina, mas lembram o aspecto descrito nas formas trofozoíticas, com cariossoma grande e irregular. Algumas vezes, os corpos cromatóides, que têm tamanho reduzido e formato variável – arredondado, ovoide ou em forma de bastonete curto –, podem ser observados. Pode também haver um “vacúolo” de glicogênio.

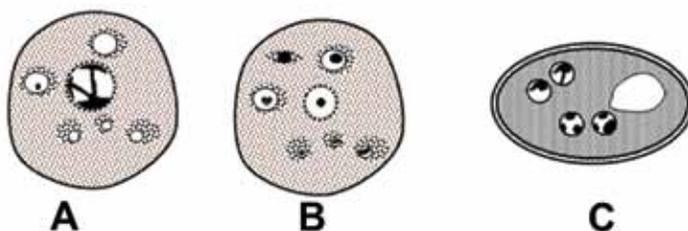


Figura 25. *Endolimax nana*: A) e B) trofozoítas; C) cisto.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

- ***Iodamoeba bütschlii***

Os trofozoítas variam geralmente de 6 a 16 μm , e seu núcleo possui uma membrana espessa sem cromatina periférica. O cariossoma é volumoso, central e está separado da membrana por uma fileira de grânulos acromáticos. Quando corado pela hematoxilina, pode-se observar que o cariossoma é constituído de vários grânulos escuros interligados por material um pouco menos denso. O citoplasma é muito vacuolizado, e dentro dos vacúolos

²⁷ Membrana que envolve o núcleo da célula.

encontram-se muitas bactérias e partículas fagocitadas. Seu aspecto granuloso e escuro lembra o citoplasma da *Entamoeba coli*. A forma cística tem contorno irregular e um único núcleo. Nas preparações coradas pelo lugol, os cistos são muito característicos, não só pela forma irregular, como também por conterem uma ou duas áreas de glicogênio, de limites nitidamente marcados.

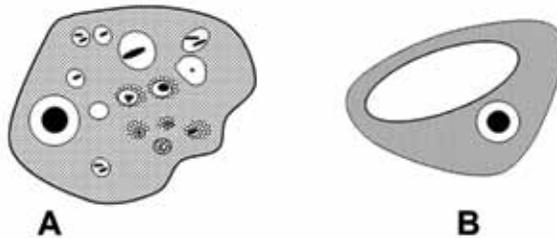


Figura 26. *Iodamoeba bütschlii*: A) trofozoíta; B) cisto.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

e) Epidemiologia

A infecção por *E. histolytica* é cosmopolita, sendo mais frequente em regiões de clima tropical e subtropical. As taxas de prevalência são influenciadas pelo nível sanitário das regiões, de modo que, quanto mais precário o saneamento básico local, tanto maiores as taxas de prevalência. A transmissão ocorre pela contaminação do meio ambiente com fezes de pessoas parasitadas. Os cistos tornam-se maduros em até dois dias em condições ambientais adequadas. Água e alimentos contaminados podem servir de veículo para os cistos. Alguns insetos, como baratas e moscas, podem carrear os cistos em sua superfície corporal. Sua prevalência e gravidade variam muito segundo as diferentes regiões, sendo a mortalidade mundial pela amebíase de 40 mil a 110 mil casos por ano. A frequência de localizações extraintestinais também varia geograficamente, sendo que México, Índia e norte da África apresentam as mais elevadas taxas das mesmas. No Brasil, a região Norte é onde ocorre a maior prevalência de amebíase e os casos mais graves, tanto intestinais quanto extraintestinais.

Os casos agudos de disenteria amebiana são pouco relevantes na transmissão do parasito, uma vez que os trofozoítas não sobrevivem muito tempo fora do organismo hospedeiro. Assim, os indivíduos assintomáticos ou oligossintomáticos²⁸ são os principais responsáveis pela contaminação ambiental com cistos.

f) Profilaxia e controle

- medidas de saneamento básico;
- educação sanitária;
- higiene pessoal (lavar as mãos antes de ingerir alimentos e após utilizar o banheiro) e de alimentos;
- controle de pragas (moscas e baratas);
- identificação e tratamento das pessoas parasitadas.

5. Protozoários do filo Apicomplexa (esporozoários)

Formam um grupo homogêneo de parasitos obrigatórios da classe Sporozoa, ou Sporozoa, com reprodução sexuada alternando-se com reprodução assexuada.

○ complexo apical dos esporozoários é uma estrutura especial, que auxilia o parasito a invadir as células do organismo hospedeiro.

a) Morfologia e biologia

Morfologia

○ **complexo apical** (fig. 27) é formado por anéis (a) localizados no polo anterior do parasito, embaixo da membrana celular; esses anéis envolvem o conoide (b) e são ligados entre si por fibras do conoide (c). As roptrias (d) e os micronemas (e) (organelas alongadas), na região anterior entre o

²⁸ Forma muito benigna da doença, apresenta manifestações clínicas atenuadas.

complexo apical e o núcleo, excretam materiais proteicos – para a aderência e a penetração do parasito na célula hospedeira –, atravessam o conoide e terminam em uma depressão central no polo anterior. Sob a membrana celular externa, está a membrana interna (f), porosa, sustentada por certo número de microtúbulos do conoide (g) que contribuem para manter a forma alongada do parasito.

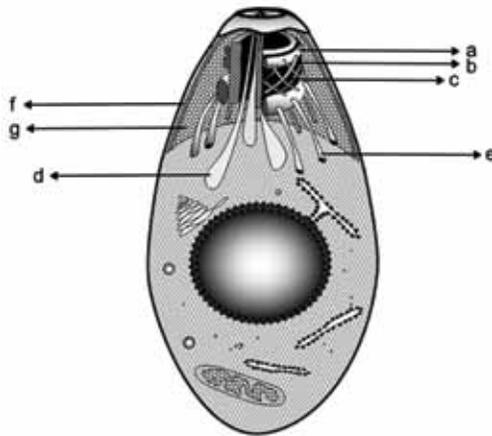


Figura 27. Desenho esquemático de um protozoário do filo Apicomplexa.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

Ciclo biológico dos esporozoários

Os esporozoários alternam dois ciclos reprodutivos: ciclo esquizogônico (reprodução assexuada) e ciclo esporogônico (reprodução sexuada) (fig. 28).

Ciclo esquizogônico: a esquizogonia (1) começa com a entrada do esporozoíta (a), forma invasiva, na célula hospedeira; no interior dessa, transforma-se em esquizonte (organismo arredondado) (b); o esquizonte passa por múltiplas divisões nucleares, que dão origem aos merozoítas (c), formas invasivas que podem repetir a esquizogonia ou produzir, por gametogonia, gametócitos masculinos (d) e femininos (e) que evoluem para gametas.

Ciclo esporogônico: a esporogonia (2) tem início com a fusão dos gametas (f) e a formação do ovo ou zigoto (g). Na ordem Eucoccidiida, o zigoto produz um envoltório resistente, tornando-se oocisto imaturo, que, no meio ambiente (h), evolui, e o esporoblasto no seu interior divide-se em esporocistos (i) no interior dos quais formam-se esporozoítas, com capacidade invasiva (j). Os oocistos maduros (infectantes) são ingeridos por um hospedeiro, fechando-se o ciclo biológico.

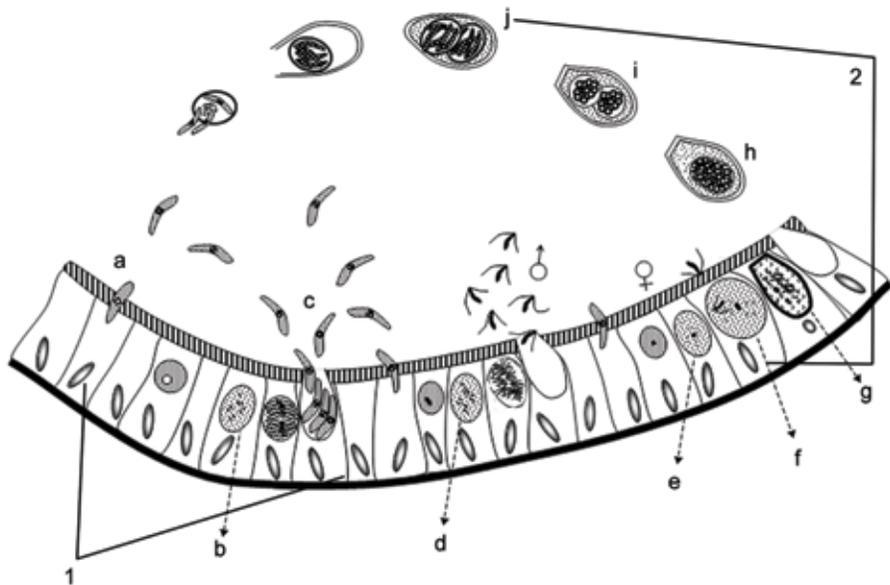


Figura 28. Desenho esquemático do ciclo evolutivo dos esporozoários:
1) esquizogonia precedendo gametogonia; 2) esporogonia → formação do zigoto → esporocistos → esporozoítas.

Ilustração: adaptada de Rey, 2008 por JCA Carreira e AVM Silva
 (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

b) Sistemática

A classificação utilizada neste capítulo é a proposta pelo Comitê de Sistemática e Evolução, da Sociedade de Protozoologia (Levine et al., 1980):

Reino Protista Whittaker, 1977

Filo Apicomplexa Levine, 1970

Classe Sporozoea Leuckart, 1879

Subclasse Coccidia Leuckart, 1879

- **Ordem Eucoccidiida** Léger & Duboscq, 1910

Subordem Eimeriina Léger, 1911

Famílias:

1) **Eimeriidae**

Gêneros: *Eimeria* e *Isospora* – que parasitam animais domésticos, inclusive *Isospora belli*, que infecta o homem.

2) **Cryptosporidiidae**

Gênero: *Cryptosporidium* – geralmente não são patogênicos; no entanto, em indivíduos imunodeprimidos (por exemplo, com Aids) causa doença.

3) **Sarcocystidae**

Gêneros: *Sarcocystis* e *Toxoplasma* – as espécies que têm importância médica são *Sarcocystis hominis*, *Sarcocystis suihominis* e *Toxoplasma gondii*.

- **Ordem Hemosporidiida**

Gênero: *Plasmodium*

5.1 Protozoários do filo Apicomplexa, ordem Eucoccidiida, gênero Toxoplasma

○ *Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório, eucariota, com capacidade para formar cistos teciduais na fase crônica da infecção. O parasito invade de preferência as células do sistema fagocítico mononuclear, os leucócitos e as células parenquimatosas.

○ *Toxoplasma gondii* foi descrito pela primeira vez em coelhos de laboratório por Splendore, em julho de 1908, no Brasil. Em outubro do

mesmo ano, na Tunísia, Nicolle e Manceaux observaram o parasito em um pequeno roedor africano (*Ctenodactylus gundi*), mas o denominaram *Leishmania gondii*. Somente em fevereiro de 1909, Nicolle e Manceaux o nomearam como o novo parasito *Toxoplasma gondii*.

A partir de sua descoberta, a lista de espécies de *Toxoplasma* foi aumentando conforme se encontravam animais naturalmente infectados. As espécies eram descritas de acordo com os diferentes hospedeiros.

Em 1939, Sabin concluiu que todas as espécies até então encontradas não eram nem hospedeiros específicos nem imunologicamente diferentes e que deveriam pertencer a uma só espécie. Sendo assim, segundo a lei da prioridade, deveriam ser chamados de *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909.

Seus hospedeiros intermediários compreendem diversas espécies de animais de sangue quente, como aves e mamíferos, incluindo o homem. Como hospedeiros definitivos, encontram-se apenas membros da família Felidae, sendo o gato o representante de maior relevância, em virtude de sua proximidade com humanos e animais domésticos.

Considerada uma das zoonoses parasitárias mais comuns em todo o mundo, a toxoplasmose possui importância médica humana e veterinária.

a) Morfologia e biologia

Morfologia

Taquizoítas (do grego *tachys* = rápido): formas encontradas tanto no interior de células nucleadas (fig. 29 e 30) quanto nos líquidos corporais (sangue, saliva e leite, entre outros). Responsáveis pela fase aguda da infecção em hospedeiros intermediários, têm reprodução rápida, dividindo-se assexuadamente por endodigenia (formação de células-filhas dentro da célula-mãe) no interior de vacúolo parasitóforo, formando com a célula hospedeira o denominado “grupo tecidual”. Apresenta forma alongada, ligeiramente arqueada, medindo de 2 a 4 μm de largura por 4 a 8 μm de comprimento, com extremidade an-

terior mais afilada do que a posterior. Ultraestruturalmente, os taquizoítas revelam inúmeras organelas e inclusões, sendo que um anel polar envolve conoide, roptrias, micronemas, microporo, mitocôndrias, microtúbulos subpediculares, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, ribossomas, núcleo e vacúolo de glicogênio (fig. 31).



Figura 29. Desenho esquemático de taquizoítas livres e no interior de macrófago, formando grupo tecidual.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

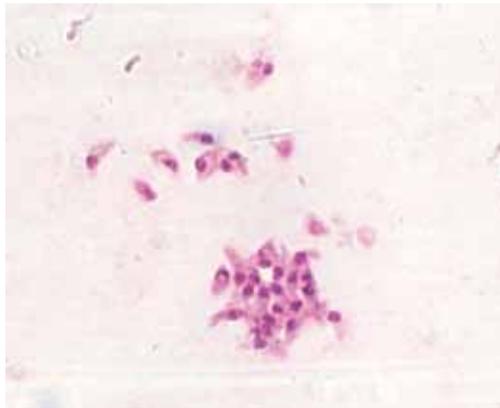


Figura 30. Taquizoítas de *Toxoplasma gondii* em exsudato peritoneal de camundongos, corado pelo método May-Grunwald–Giemsa, 1000X.

Foto: Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz.

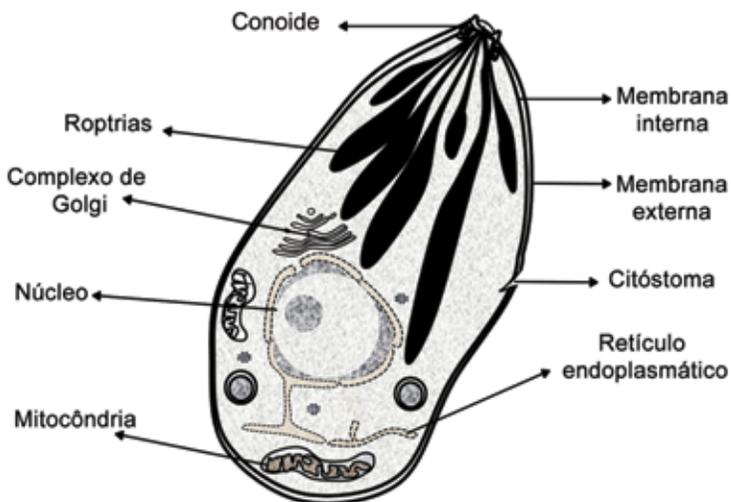


Figura 31. Desenho esquemático da ultraestrutura da forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

Bradizoítas (do grego *bradys* = lento): formas encontradas no interior de cistos teciduais (fig. 32), características da fase crônica da infecção em hospedeiros intermediários. Dividem-se assexuadamente, de forma lenta, por endogenia no interior de cistos. Os bradizoítas são as formas infectantes e são capazes de suportar temperaturas de geladeira.

Cistos: encontrados principalmente no tecido nervoso, na musculatura (cardíaca e esquelética) e na retina. Apresentam tamanho variável de até 300 μm , dependendo do número de bradizoítas em seu interior – que em alguns casos, pode chegar a centenas –, mas sem qualquer reação no tecido hospedeiro em redor do cisto. Os cistos permanecem vivos durante praticamente toda a vida do hospedeiro. Os cistos em carne de porco ou na carne de carneiro são inativados após 24 horas em temperaturas de -20°C e depois de três dias em temperaturas de -15°C . São mais resistentes à pepsina e à tripsina do que os taquizoítas, e a 61°C , morrem em quatro minutos.

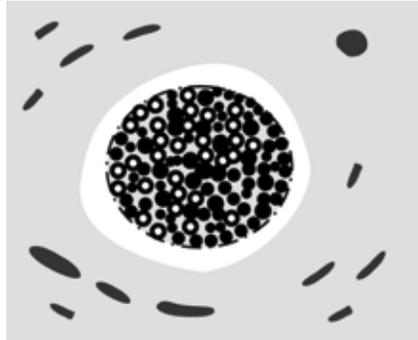


Figura 32. Desenho esquemático de bradizoítas no interior de cistos de *T. gondii*.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

Oocistos: formas imaturas, não esporuladas, produzidas no epitélio intestinal dos felídeos (hospedeiros definitivos) e eliminadas com as fezes desses animais. São arredondadas e medem de 10 a 13 μm por 9 a 11 μm , tendo uma parede que confere resistência às condições adversas do meio ambiente. Os oocistos esporulam e se tornam infectantes no meio ambiente em temperatura e umidade adequadas. Quando esporulados, ocorre a formação de dois esporocistos, cada um deles com quatro esporozoítas (fig. 33). Os oocistos maduros permanecem infectantes no meio ambiente úmido por cerca de um ano, em temperaturas variando de 4 a 37°C; morrem a - 21°C.



Figura 33. Desenho esquemático do oocisto maduro de *T. gondii*, com dois esporocistos, cada um deles com quatro esporozoítas.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

OBS.: Os taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas de *Toxoplasma gondii* são semelhantes ultraestruturalmente, mas diferem em certas organelas e inclusões.

Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* apresenta um ciclo biológico heteróximo facultativo, com baixa especificidade para hospedeiros, exceto no que se refere ao seu hospedeiro definitivo.

O ciclo do protozoário é complexo, alternando uma fase sexuada (isoporiária ou entérica), que ocorre nas células epiteliais do intestino delgado dos hospedeiros definitivos (felídeos) (fig. 34), com outra assexuada (extraintestinal) nos hospedeiros intermediários, que também pode ocorrer nos tecidos dos hospedeiros definitivos (fig. 35).

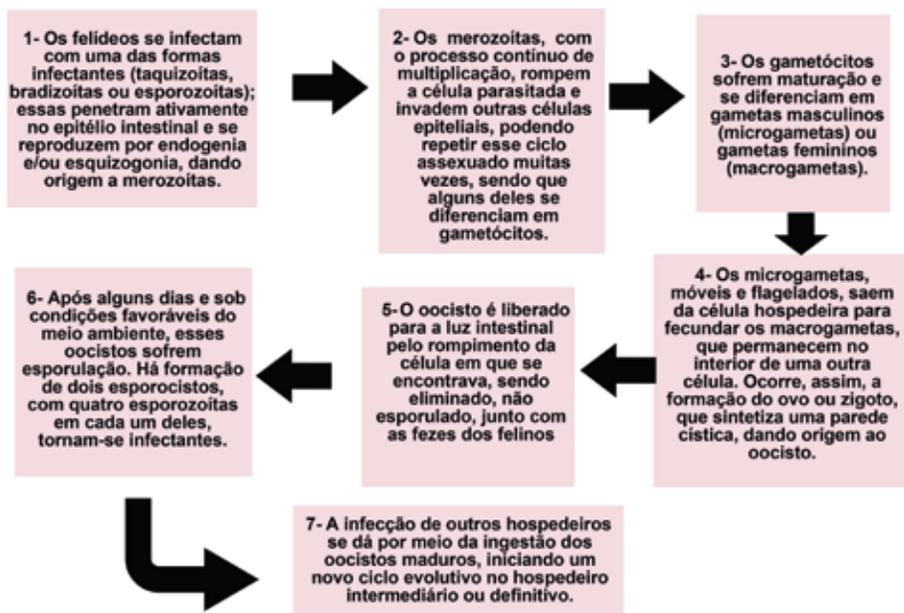


Figura 34. Fase sexuada (isoporiária ou entérica) nos hospedeiros definitivos.

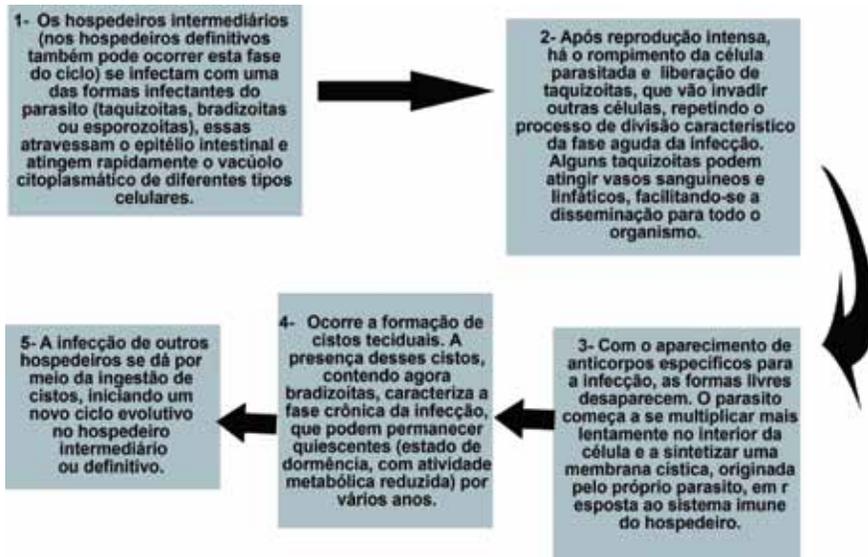


Figura 35. Fase assexuada (ciclo extraintestinal) nos hospedeiros intermediários.

Os gatos domésticos (principalmente jovens ou não imunes ao parasito), entre os outros felídeos, têm papel de maior destaque por sua importância na transmissão da toxoplasmose humana.

Em hospedeiros nos quais não houve ainda o desenvolvimento da imunidade específica, o *T. gondii* invade qualquer célula do organismo infectado, exceto as hemácias. Dentro do vacúolo parasitóforo, os taquizoítas sofrem multiplicação rápida, por endogenia, formando grupos teciduais repletos de parasitos que acabam por romper a célula e vão invadir outras células. Alguns deles caem nos líquidos biológicos (sangue, líquido amniótico, esperma, líquido cefalorraquidiano, saliva, lágrimas, entre outros) antes de entrar em outra célula. Após o desenvolvimento da imunidade, a multiplicação torna-se muito lenta; com isso, os bradizoítas, também por endogenia, passam a se multiplicar dentro dos cistos.

c) Relação parasito–hospedeiro

A virulência do *Toxoplasma gondii* varia segundo a cepa do parasito. As cepas estão agrupadas em três genótipos: tipos I, II e III. As do tipo I são altamente virulentas (mais patogênicas); as dos tipos II e III são relativamente de baixa virulência. As linhagens virulentas de *T. gondii* produzem infecção aguda, com os protozoários invadindo principalmente macrófagos e leucócitos, e distribuindo-se para todos os tecidos do organismo. As células hospedeiras se assemelham a um “envelope” repleto de taquizoítas, formando um grupo tecidual que acaba por romper-se e disseminar os parasitos, que passam a invadir novas células. O resultado, dependendo do caso, pode ser fatal em poucos dias.

O mecanismo que determina a virulência das diferentes cepas de *Toxoplasma gondii* e a sua patogenicidade no hospedeiro ainda não é conhecido.

Também ainda são pouco conhecidos os tipos de *gondii* que circulam entre os hospedeiros brasileiros e quais os mais prevalentes. Esse conhecimento pode ajudar na epidemiologia da toxoplasmose.

Na primeira semana de infecção, as linhagens não virulentas de *T. gondii* produzem grupos teciduais pequenos, que desaparecem depois de duas semanas. No entanto, no cérebro e em outros tecidos, bradizoítas envoltos por uma membrana cística se multiplicam, formando o cisto.

• Hospedeiro

A infecção por *T. gondii* varia de intensidade, de acordo com as diversas espécies de hospedeiros – por exemplo, diferentes linhagens de camundongos. A proteção do hospedeiro é decorrente principalmente da imunidade celular. Em humanos, a infecção por *T. gondii* tem graus diferentes de patogenicidade, variando desde casos assintomáticos até quadros severos, incluindo o óbito. Os casos mais graves são a infecção congênita e a toxoplasmose em imunossuprimidos.

- **Meio ambiente**

A frequência da infecção por *T. gondii* é influenciada pelos seguintes fatores: alimentar, cultural, idade, procedência rural ou urbana, condições socioeconômicas e características ambientais. A ocorrência de elevada precipitação pluvial tem papel importante no aumento das taxas de infecção

- d) **Toxoplasmose**

A toxoplasmose é, classicamente, dividida em **forma congênita** (que ocorre quando a gestante adquire a primo-infecção durante a gestação, passando o parasito para o bebê) e **forma adquirida** (que ocorre após o nascimento).

- **Toxoplasmose congênita**

As mulheres grávidas na fase crônica de infecção toxoplásmica geralmente não a transmitem para seus filhos no útero, nem abortam por isso. Porém, no caso de se infectarem durante a gestação, o risco de passarem a protozoose por via transplacentária é grande – e, principalmente no caso de a gestante ser imunossuprimida, podendo ocorrer reativação de uma infecção crônica, quando não protegerá o feto. A infecção será mais ou menos grave dependendo da virulência da cepa do parasito, da capacidade dos anticorpos maternos de protegerem o feto e do período gestacional em que a mulher se encontra. À medida que aumenta a idade gestacional, aumenta o risco de transmissão materno-fetal, porém decresce a severidade da infecção.

A ocorrência da infecção toxoplásmica congênita no primeiro trimestre da gravidez é menos frequente, fica em torno de 10 a 15% do total de gestantes infectadas durante a gestação, porém é mais grave, pois costuma levar a aborto espontâneo. No segundo trimestre, aumenta a possibilidade de transmissão (30%), podendo ocorrer toxoplasmose aguda ou subaguda do feto, com lesões disseminadas, principalmente no sistema nervoso e retina, causando um quadro chamado de tríade de Sabin, com retinocoroidite, calcificações cerebrais, microcefalia ou hidrocefalia e alterações neurológicas.

No terceiro e último trimestre da gestação, as chances de o feto adquirir a infecção aumentam para 60%. Geralmente a infecção é assintomática ou, ao nascer, a criança apresenta um quadro clínico relativamente brando. No entanto, em alguns casos as manifestações podem ocorrer mais tardiamente (dias ou mesmo anos após o nascimento), e a criança pode apresentar algum sinal ou sintoma sugestivo da infecção congênita, como comprometimento da visão, audição ou do sistema nervoso central. Caso apresente a forma aguda grave, podem ocorrer icterícia, exantema, hepatoesplenomegalia e, em alguns casos, linfadenopatia, hepatite, pneumonite, adenite e derrames cavitários. Nesses casos, pode haver abortamento, morte fetal ou morte do bebê após o nascimento.

OBS.: Na toxoplasmose congênita, em casos de infecção subaguda e crônica, as lesões viscerais regredem, permanecendo as neurológicas e oculares.

• **Toxoplasmose adquirida**

O curso clínico da toxoplasmose pode variar desde formas assintomáticas e subclínicas até formas generalizadas da doença, com o comprometimento do sistema nervoso central, podendo também evoluir para processos infecciosos agudos fatais, dependendo de vários fatores, principalmente idade e estado imunológico do indivíduo.

Em indivíduos imunocompetentes, a toxoplasmose tem curso benigno e autolimitado, e raramente evolui para a forma grave, sendo na maioria das vezes assintomática (cerca de 90% dos casos). Tais infecções só são detectadas casualmente, em inquéritos sorológicos. Por outra parte, quando sintomática, aparecem quadros de sintomatologia variável, durando de semanas a meses. As manifestações clínicas mais frequentes são linfadenopatia, febrícula, cefaleia, mialgia, artralgia e fadiga.

Durante a fase crônica da toxoplasmose, os cistos teciduais do *Toxoplasma gondii* são bem controlados pelo sistema imune do hospedeiro, que é

continuamente estimulado por antígenos parasitários, o que leva à aquisição de imunidade protetora contra reinfecções – entretanto, há evidências de que ela pode ocorrer, ao menos em crianças. Nas crianças, o *T. gondii* geralmente produz infecção subaguda – com encefalopatia e retinocoroidite – que, nos casos congênitos, é particularmente grave.

Em indivíduos imunodeficientes, o *T. gondii* é o mais frequente protozoário causador de enfermidades oportunistas, devido tanto à reativação de infecção latente quanto por primo-infecção, podendo manifestar-se de maneira grave, com quadros de encefalite e miocardite, ou de forma disseminada, acometendo diversos pontos do organismo, chegando a culminar no óbito.

A presença de cistos em indivíduos imunossuprimidos por qualquer razão – por exemplo, pessoas com infecções virais decorrentes do HIV, pessoas que receberam transplantes ou com algum tipo de câncer e em tratamento quimioterápico, entre outros – é sempre um grave risco, pois quando o sistema imune está comprometido, pode ocorrer reativação dos parasitos quiescentes encistados, levando à intensa proliferação de taquizoítas. Nos casos de imunossupressão, pode ocorrer subitamente uma encefalite aguda, levando o indivíduo a óbito em poucos dias. Em alguns casos, porém, pode haver evolução lenta, além de outras manifestações clínicas de intensidade variável.

A toxoplasmose ocular é caracterizada por retinocoroidite – lesão mais frequente associada à protozoose, com 30% a 50% dos casos atribuídos ao *Toxoplasma gondii*. A forma ocular resultante da toxoplasmose congênita pode se manifestar antes do nascimento ou tardiamente, após o mesmo. O número de casos de toxoplasmose ocular adquirida após infecção aguda por *T. gondii* não congênita tem aumentado consideravelmente. Erechim, no norte, do estado do Rio Grande do Sul, apresenta a maior prevalência mundial de toxoplasmose ocular adquirida: 17,7%.

d) Diagnóstico

O diagnóstico clínico da toxoplasmose adquirida é muito difícil, pois na maioria das vezes a infecção é subclínica e, quando com sintomatologia evi-

dente, pode ser confundida com outras afecções de etiologias diversas. Nesse caso, os sinais e sintomas da protozoose são apenas sugestivos, tornando-se necessária a utilização de métodos de diagnóstico laboratorial.

Mesmo nos casos de toxoplasmose congênita e de toxoplasmose ocular, com retinocoroidites, quando a clínica traz forte suspeita da protozoose, o diagnóstico é feito laboratorialmente. O diagnóstico da infecção pelo *T. gondii* pode ser feito por métodos sorológicos, histológicos, biológicos, moleculares ou pela combinação desses.

• **Imunodiagnóstico – métodos sorológicos**

A pesquisa direta para evidenciar o protozoário em material biológico suspeito é difícil, onerosa e requer tempo, por isso os métodos mais utilizados são os sorológicos.

Usualmente, o diagnóstico laboratorial é baseado na pesquisa de anticorpos específicos anti-*T. gondii*, principalmente imunoglobulinas das classes IgG e IgM; mais raramente, também são dosadas as imunoglobulinas IgA e IgE. Atualmente, a baixa avidéz de IgG tem sido referida como um bom marcador para infecções primárias recentes causadas por *Toxoplasma gondii*. Os anticorpos IgG sofrem progressivo “amadurecimento”, elevando a avidéz na fase crônica da toxoplasmose. Sendo assim, a baixa avidéz de IgG indica infecção aguda. O teste de avidéz IgG tem sido recomendado para mulheres grávidas, sendo utilizado para auxiliar em outros métodos sorológicos que doseem IgG e IgM.

OBS.: Teste de avidéz de IgG → avidéz corresponde à força de ligação entre o antígeno e o anticorpo, força que aumenta progressivamente com o passar do tempo.

A reação de Sabin-Feldman (“teste do corante”) foi muito utilizada no passado e é considerada clássica para o diagnóstico da toxoplasmose nas fases aguda ou crônica. Além de muito específica e sensível, não ocasiona reação cruzada com outras infecções, mas tornou-se obsoleta por necessitar de fator

acessório²⁹ e de parasitos vivos – o que constitui fator limitante para o seu uso. A reação de imunofluorescência indireta (Rifi), de sensibilidade igual à do “teste do corante”, tem sido utilizada como “padrão ouro” em alguns laboratórios. Porém, atualmente, o ELISA e suas variações são os métodos mais utilizados para o diagnóstico da infecção toxoplásmica, embora alguns laboratórios utilizem a reação de hemaglutinação, o ELIFA (do inglês *Enzyme Linked Immuno-filtration Assay*), a reação de enzimoimunoensaio de micro-partículas MEIA (do inglês *Microparticle Capture Enzyme Immunoassay*), a reação de aglutinação por imunoabsorção ISAGA (do inglês *Immunsorbent Agglutination Assay*) e os métodos *Immunoblotting* e *Western-blot*.

Testes sorológicos utilizados na captura de IgM anti-*T. gondii*

- ▶ mensurado pela cor → ELISA
- ▶ mensurado pela fluorescência → ELIFA
- ▶ mensurado pela aglutinação → ISAGA

• Detecção do parasito em material biológico suspeito

A evidenciação do parasito durante a fase aguda da infecção pode não ser muito fácil, pois a parasitemia³⁰ é fugaz e, na fase aguda da infecção, só é observável quando os taquizoítas podem ser encontrados no sedimento do líquor ou em cortes de tecidos corados pelo Giemsa; às vezes, quando o número de parasitos é reduzido, mesmo cortes de tecidos suspeitos corados pela hematoxilina eosina, como biópsias de gânglios, não permitem bons resultados.

²⁹ Conjunto de componentes do soro de humanos e animais sem anticorpos anti-*T. gondii*.

³⁰ Presença de parasitos na corrente sanguínea.

- **Métodos histológicos**

O diagnóstico histopatológico pode ser uma alternativa quando a evidência do parasito é necessária, como no caso de imunocomprometidos ou de toxoplasmose congênita.

A avaliação macro e microscópica do material biológico retirado de indivíduo com suspeita de infecção pelo *T. gondii* deve ser realizada por profissional patologista, uma vez que, mesmo quando se encontram estruturas sugestivas, torna-se necessário estabelecer a diferenciação com outros protozoários (*Leishmania*, *Sarcocystis*) e fungos (*Histoplasma*, *Cryptococcus*).

A técnica de histopatologia é realizada por meio de amostras de diversos tecidos, após processamento, corte e coloração.³¹

A presença de taquizoítas em tecidos e fluidos corporais pode revelar casos de infecção aguda; entretanto, dificilmente é detectada em preparações convencionais para histopatologia.

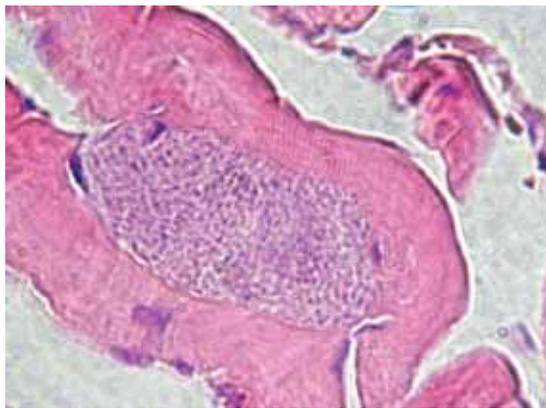


Figura 36. Cisto de *Toxoplasma gondii* em musculatura esquelética de camundongo, corado por hematoxilina eosina, 1000X.

Foto: Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz.

³¹ Ver o volume 2 desta coleção.

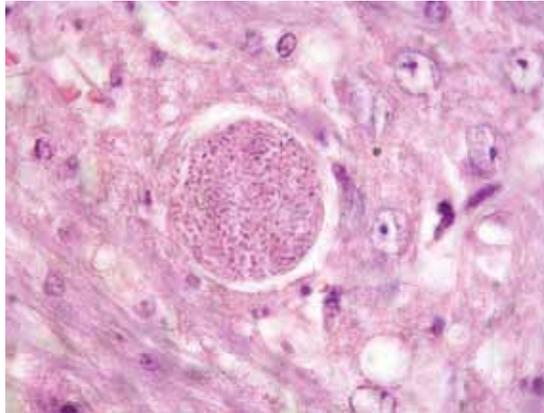


Figura 37. Cisto de *Toxoplasma gondii* em corte histológico de cérebro de camundongo, corado por hematoxilina eosina, 1000X.

Foto: Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz.

•Técnica de imuno-histoquímica

Para aumentar a eficiência da técnica de histologia, têm sido empregadas técnicas de imuno-histoquímica utilizando imunoperoxidase. A demonstração de taquizoítas pela imunoperoxidase, coloração com Giemsa ou PAS em qualquer tecido ou fluido corpóreo pode comprovar uma infecção ativa por *Toxoplasma gondii*.

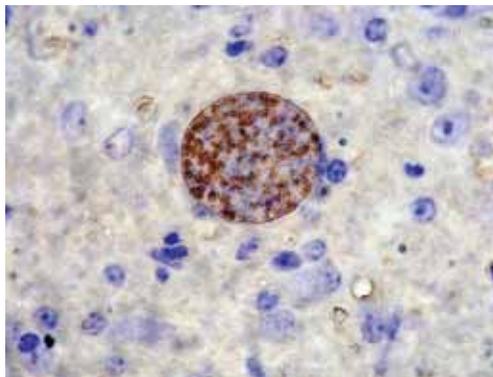


Figura 38. Corte de cérebro de camundongo com cisto de *Toxoplasma gondii* marcado por técnica de imuno-histoquímica peroxidase, 1000X.

Foto: Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz.

• Métodos biológicos – bioensaio

O isolamento do parasito é feito por meio da inoculação de material suspeito (sangue, creme leucocitário, saliva, macerado de tecidos, entre outros), proveniente de indivíduos com suspeita de infecção toxoplásmica, em animais susceptíveis (geralmente são utilizadas fêmeas jovens de camundongos ou galinhas). Embora apresente grande eficiência, é uma técnica demorada – seis a oito semanas – e que requer infraestrutura laboratorial com condições ideais para a sua implantação. Em caso de suspeita de toxoplasmose congênita, devem-se procurar parasitos na placenta.

No caso dos animais, o poder infectante do isolado de *T. gondii* pode variar e muitas vezes é necessário realizar “repiques cegos”, a fim de adaptá-lo ao novo hospedeiro.

Visando reduzir o tempo e aumentar a segurança laboratorial – e também evitar, por questões éticas, o uso de animais –, têm sido utilizados cultivos celulares. Esse método é sensível, mas requer até quatro semanas para a conclusão do diagnóstico. Embora seja um método menos eficiente do que o isolamento em animais, têm sido obtidos bons resultados.

• Métodos moleculares

O diagnóstico molecular baseia-se na detecção de DNA específico do *T. gondii* em tecidos ou fluídos biológicos; essa detecção pode ser realizada por meio da reação de polimerase em cadeia, utilizando materiais como líquido amniótico, placenta, tecido cerebral, sangue, líquido, humor vítreo, humor aquoso, lavados broncoalveolares e fluidos pleurais e peritoneais. A titulação de anticorpos em pacientes imunocomprometidos muitas vezes leva a resultados inespecíficos, o que aumenta a importância de metodologias como as da PCR e de isolamento parasitário para essas populações.

OBS.: A identificação de isolados de *T. gondii* por meio da genotipagem tem sido objeto de estudo.

e) Epidemiologia da toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em todos os continentes e nos mais variados climas. As menores prevalências têm sido encontradas em regiões frias ou áridas, onde a baixa densidade de felídeos, aliada à menor sobrevivência de oocistos no solo, diminui os índices de parasitismo de herbívoros, roedores e pássaros – e, consequentemente, dos carnívoros que deles se alimentam. A variabilidade na frequência da infecção está ligada a diversos fatores: padrões culturais da população, hábitos alimentares, idade, procedência rural ou urbana, entre outros.

A prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* varia entre as regiões e entre as populações abordadas. Não há relatos de toxoplasmose em ilhas do Pacífico onde não existem gatos. De 20% a 83% da população mundial estão infectados pelo parasito. No Brasil, de 50 a 80% da população adulta apresenta anticorpos anti-*T. gondii*: 74,5% na região do Alto Uruguai (Rio Grande do Sul); 72,16% no Rio de Janeiro; 58,9% a 77,9% em São Paulo; e 73,9% em Manaus.

O fator idade também tem sido associado ao aumento da frequência da infecção pelo *T. gondii*, pois com o aumento da faixa etária aumentam as chances de o indivíduo entrar em contato com um dos diversos mecanismos de transmissão, considerados como dados cumulativos.

A procedência rural ou urbana tem sido apontada como um fator importante para a prevalência da protozoose. No entanto, algumas vezes, não têm sido encontradas diferenças na prevalência entre as duas áreas. Isso pode sugerir que a causa da positividade nessas localidades seja devida, possivelmente, a fatores comuns tanto à zona urbana quanto à zona rural.

Em algumas regiões rurais, podem ocorrer casos humanos de reações cruzadas com *Sarcocystis* spp, mas os casos confirmados sorologicamente são raríssimos.

Há alta prevalência da infecção toxoplásmica, tanto em animais silvestres quanto nos domésticos, naturalmente infectados. Animais domésticos têm sido apontados como fonte de infecção para o homem. No entanto, esse fato só tem importância quando associado ao hábito de ingerir carne crua

ou malcozida. Por outra parte, a presença de gatos parece ser relevante, uma vez que esses animais têm comprovada importância na manutenção do ciclo do parasito.

Transmissão

Todas as três principais formas evolutivas do *T. gondii* (taquizoítas, cistos contendo bradizoítas e oocistos contendo esporozoítas) são capazes de infectar tanto o hospedeiro definitivo (os gatos) quanto o hospedeiro intermediário (várias espécies de aves e mamíferos, inclusive o homem), variando apenas o mecanismo.

Mecanismos de transmissão: um importante mecanismo de transmissão é a ingestão de carne crua ou malcozida de animais (hospedeiros intermediários), assim como a manipulação de animais de abate destinados ao consumo humano quando os mesmos alojam bradizoítas encistados. Embora a ocorrência da infecção por cistos de *T. gondii* na carne seja baixa, a frequência com que é consumida aumenta o risco de infecção toxoplásmica. Esse é um dos mecanismos mais frequentes, mesmo porque os produtos cárneos não cozidos – como é o caso de linguiças e outros embutidos e de carnes ingeridos crus, *carpaccios* entre eles – também estão envolvidos. A possibilidade de infecção de indivíduos que manuseiam de forma contínua produtos de origem animal – por exemplo, magarefes e donas de casa – no preparo das refeições também não deve ser descartada.

São considerados fontes de infecção animais bovinos, caprinos, ovinos, suínos, animais de companhia, ratos, aves e um grande número de animais silvestres. Esses últimos, quando caçados e ingeridos crus, só contaminam uns poucos predadores. No entanto, como a maioria dos animais utilizada na alimentação humana é herbívora, provavelmente sua infecção se dá pela ingestão de oocistos.

A ingestão de água ou alimentos crus (verduras e frutas sem lavar) contaminados com oocistos esporulados de *T. gondii* (contaminação do meio

ambiente, principalmente solo e água, por fezes de felinos parasitados e posterior manipulação do solo contaminado) é importante mecanismo de transmissão da protozoose. Esse meio de infecção possivelmente é o responsável pela prevalência da infecção por *T. gondii* em indivíduos vegetarianos e animais herbívoros. Crianças podem se infectar ao brincar em tanques de areia contaminados por gatos infectados, ou mesmo no contato com esses animais.

A cada evacuação, os gatos eliminam de 2 milhões a 20 milhões de oocistos. Com temperatura e umidade adequadas, os oocistos permanecem viáveis no meio ambiente por muitos meses —, às vezes, por até um ano. Os oocistos, que podem ser disseminados por vários meios — chuva, vento, fauna coprófila —, ampliam enormemente as fontes de infecção, inclusive no peridomicílio.

A ingestão de leite de vaca ou cabra e de ovos de galinha, pato ou outras espécies, contaminados com taquizoítas, pode ser considerada uma forma potencial de transmissão do *T. gondii*, embora o parasito raramente seja isolado desses produtos. A transmissão durante a amamentação não foi ainda comprovada em humanos, mas taquizoítas já foram isolados do leite de mulheres na fase aguda da infecção. Desse modo, é concebível que o leite não pasteurizado seja veículo de transmissão do parasito, porém a fervura destrói todas as formas de taquizoítas do *T. gondii*.

Existe ainda a possibilidade de transmissão congênita, pela passagem de taquizoítas através da placenta, nos casos de infecção aguda, durante a gestação não só da mulher, mas também de outros animais. Esse tipo de transmissão só ocorre após a infecção materna — logo, ocorre indiretamente, com a participação de oocistos ou cistos de *T. gondii*.

Outros mecanismos de infecção de menor importância epidemiológica, mas que não deve ser negligenciada, são os transplantes de órgãos — principalmente coração e rim, contendo cistos ou taquizoítas; a transfusão sanguínea e de leucócitos — taquizoítas são a principal forma envolvida; acidentes de laboratório — taquizoítas e oocistos são as principais formas envolvidas; ingestão de leite cru e por meio da saliva — taquizoítas é a forma envolvida;

e artrópodes – formigas, moscas e baratas, entre outros –, como carreadores mecânicos de oocistos. Além disso, as chuvas e os ventos podem carrear os oocistos para outros locais.

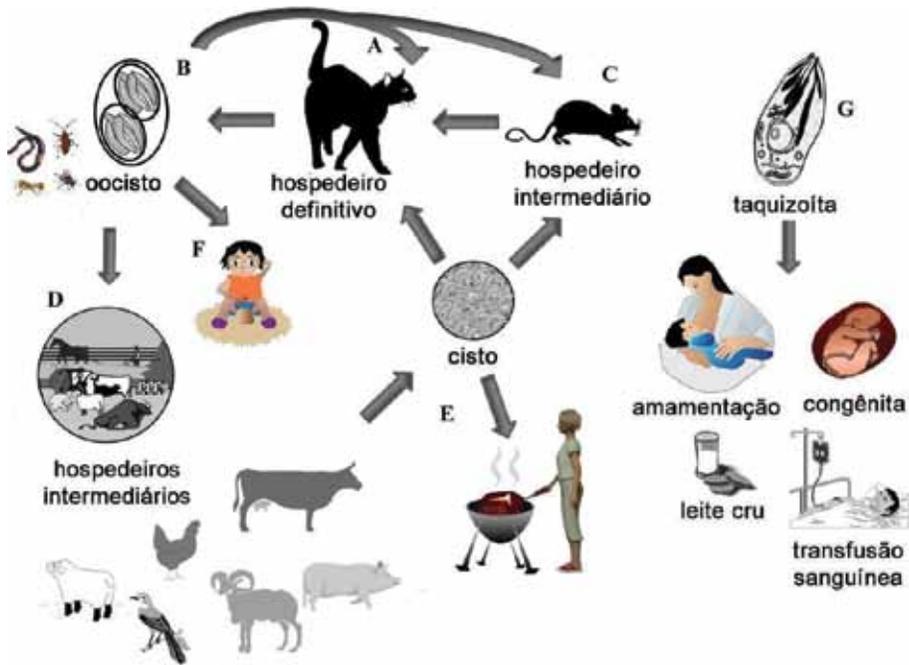


Figura 39. Ciclo de transmissão do *Toxoplasma gondii*: A) nos gatos, ocorre a fase sexuada do protozoário; B) os oocistos, eliminados com as fezes felinas, poluem o solo e podem ser carreados por vetores mecânicos (moscas, baratas, formigas, minhocas); C) e D) roedores e outros animais hospedeiros intermediários se infectam no pasto; E) ingestão de carne malcozida de animais infectados; F) as crianças se infectam ao brincarem na areia poluída por fezes de gatos; G) os taquizoítas são responsáveis pela transmissão por vários mecanismos, tais como a infecção transplacentária, pela ingestão de leite cru (incluindo amamentação) e por via transfusional.

Ilustração: MRR Amendoeira e DPBG Mattos (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

F) Profilaxia e controle

As medidas profiláticas que podem ser tomadas para prevenir a infecção por *Toxoplasma gondii* estão diretamente relacionadas aos mecanismos de transmissão do parasito:

- ingerir carne e derivados cárneos bem cozidos;
- ingerir hortaliças e frutas bem lavadas;
- ingerir leite fervido ou pasteurizado;
- lavar as mãos ao manipular esses alimentos crus; habituar as crianças a essa prática higiênica;
- tratar o mais precocemente mulheres grávidas com infecção recente possível;
- impedir o acesso de gatos aos tanques de areia (cobrindo-os ou telando o local);
- evitar contato com gatos errantes ou desconhecidos;
- evitar que os gatos domésticos cacem, fornecendo-lhes ração ou alimentos enlatados ou fervidos;
- esterilizar com água fervendo os lugares onde os gatos defecam.
- combater os ratos;
- evitar que moscas, baratas, formigas entrem em contato com os alimentos;
- evitar a presença de gatos errantes no local onde vivam crianças pequenas, mulheres no início da gravidez ou indivíduos imunossuprimidos.

Essas medidas podem ser atingidas com:

- saneamento básico;
- educação sanitária;
- incineração das fezes de gatos;
- controle de roedores;
- utilização de tampas nas caixas de areia de praças públicas;
- controle de insetos sinantrópicos;
- controle da produção de produtos cárneos;
- higienização adequada de hortaliças e frutas.

5.2 Protozoários do filo Apicomplexa, ordem Eucoccidiida, gênero *Isopora*

a) Morfologia e biologia

A infecção por *Isopora belli* é chamada de isosporíase ou isosporose. Os oocistos de *Isopora belli* são elípticos e algumas vezes apresentam estreitamento de uma ou ambas as extremidades, lembrando a forma de um pescoço. Medem cerca de 30 μm de comprimento por 10 a 12 μm de largura.

Hospedeiro: homem.

Habitat: intestino delgado.

OBS.: Cistos teciduais já foram identificados em vários casos de isosporose humana. Eles podem ser vistos com exame cuidadoso de microscopia de luz ou por microscopia eletrônica. É possível que essas formas císticas sejam as responsáveis pela latência da infecção por *Isopora* observada em algumas situações e também pela resistência ao tratamento com o medicamento de escolha.

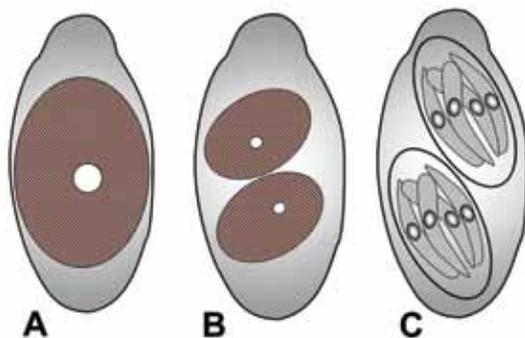


Figura 40. Oocistos de *Isopora belli*: A) imaturo, com um só esporoblasto; B) com dois esporoblastos que evoluirão para dois esporocistos; C) oocisto maduro, contendo quatro esporozoítas em cada um dos esporocistos.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).



Figura 41. Oocisto imaturo de *Isospora belli* corado por safranina-azul de metileno, 1000X.

Foto cedida pelo professor Sidnei Silva (Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/IOC–Fiocruz).

Ciclo biológico da *Isospora belli*

O ciclo de vida da *Isospora belli* é monoxênico, pois exige somente um hospedeiro para completar o seu ciclo evolutivo. Apesar disso, há relatos de hospedeiros paratênicos³² que podem apresentar fases do ciclo biológico em seus tecidos.

³² Seres vivos que albergam e transportam parasitos sem fazerem parte de seu ciclo evolutivo, ou seja, não há evolução do parasito nesse tipo de relação.

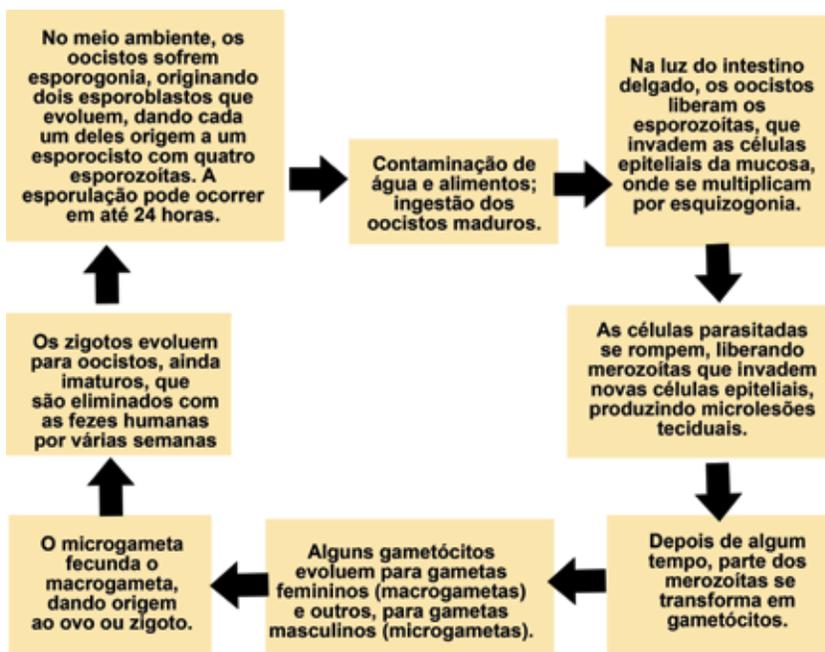


Figura 42. Ciclo biológico da *Isospora belli*.

b) Relação parasito–hospedeiro

Em geral, a infecção por *Isospora belli* permanece assintomática. Porém, algumas vezes podem ocorrer cólicas abdominais, meteorismo,³³ diarreia, febre, anorexia,³⁴ dor de cabeça e náuseas. O início das manifestações clínicas ocorre, provavelmente, de 7 a 10 dias após a contaminação do indivíduo, e os sinais e sintomas podem durar 10 dias ou mais. No entanto, a evolução é para a cura espontânea, mesmo sem medicação.

Em pacientes com Aids ou com outras condições que determinem imunocomprometimento, geralmente a isosporose se torna crônica e intermitente.³⁵ Já no caso de indivíduos imunocompetentes, a evolução da infecção por *Isospora belli* é, em geral, benigna.

³³ Flatulência (excesso de gases nos intestinos ou estômago).

³⁴ Diminuição ou falta de apetite.

³⁵ Períodos com manifestações clínicas que se alternam com períodos sem sintomas.

c) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico é feito por meio de exames de fezes para pesquisa de oocistos a partir da terceira semana de infecção. Dentre os exames mais indicados, estão os métodos de Faust e cols. (1938) e de Ritchie (1948), que são métodos de concentração.

Geralmente acopla-se a técnica de concentração (sedimentação ou flutuação) a técnicas de coloração. Considerando-se que *Isospora belli* é um coccídeo entérico, devem-se utilizar as técnicas de coloração derivadas do Ziehl-Neelsen ou a safranina-azul de metileno, que são bastante eficientes na identificação dos oocistos.

Como a liberação de oocistos nas fezes pode ser irregular e com carga parasitária pequena, recomenda-se a repetição dos exames negativos, devendo-se fazer coleta de mais de uma amostra em dias não consecutivos.

d) Epidemiologia

A infecção por *Isospora belli* em humanos é cosmopolita. Por causa de sua ampla distribuição geográfica e por sua ocorrência ser rara, a manutenção de casos de infecção faz supor a existência de hospedeiros não humanos.

Com o aparecimento dos casos de Aids na década de 1980, a isosporíase tem sido responsabilizada por surtos de diarreia. Estudos de prevalência mostram que esses casos atingem 0,2% dos pacientes com Aids submetidos a exames de fezes nos Estados Unidos, 10,5% dos imunodeficientes no Rio de Janeiro e 15% dos pacientes com Aids do Haiti.

A frequência do encontro de *Isospora belli* em comparação com casos de infecção por *Sarcocystis hominis* é variável, dependendo da região estudada. No Chile, os casos de isosporose são nove vezes mais frequentes do que os de *S. hominis*; já em São Paulo, ocorrem três casos de *S. hominis* para cada dois de *I. belli*.

Pouco se sabe sobre a forma de transmissão da isosporíase; provavelmente a infecção se dê por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos de *I. belli*.

e) Profilaxia

Como em outras parasitoses intestinais, a profilaxia é baseada na educação sanitária das populações residentes.

5.3 Protozoários do filo Apicomplexa, ordem Eucoccidiida, gênero *Sarcocystis*

Existem diversas espécies de *Sarcocystis* e elas são encontradas numa grande variedade de vertebrados: desde peixes até mamíferos.

a) Morfologia e biologia

Os oocistos das duas principais espécies de *Sarcocystis* que parasitam o homem – *Sarcocystis hominis* e *Sarcocystis suihominis* – são muito parecidos, de forma que não é possível distinguir uma espécie da outra por meio do oocisto. Como a membrana dos oocistos é muito frágil, na maioria das vezes são encontrados esporocistos isolados ou dois esporocistos acoplados, um ao lado do outro, com quatro esporozoítas bem definidos dentro de cada um deles.

Os esporocistos, ovoides, medem de 10 a 18 μm de comprimento por 7,5 a 12 μm de largura.



Figura 43. Desenho esquemático de esporocistos unidos de *Sarcocystis hominis*.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

b) Relação parasito–hospedeiro

A doença provocada pelas espécies de *Sarcocystis*, que recebe os nomes de sarcocistose, sarcosporidiose e sarcosporidíase, não é muito frequente no homem. *Sarcocystis hominis* e *Sarcocystis sui hominis*, espécies que parasitam o homem, possuem ciclo evolutivo heterógeno obrigatório, envolvendo um hospedeiro definitivo e um intermediário.

- *Sarcocystis hominis*

Hospedeiro definitivo (ciclo sexuado do protozoário): homem e alguns macacos.

Hospedeiro intermediário (ciclo assexuado do protozoário): gado bovino.

- *Sarcocystis sui hominis*

Hospedeiro definitivo (ciclo sexuado do protozoário): homem.

Hospedeiro intermediário (ciclo assexuado do protozoário): músculos do porco.

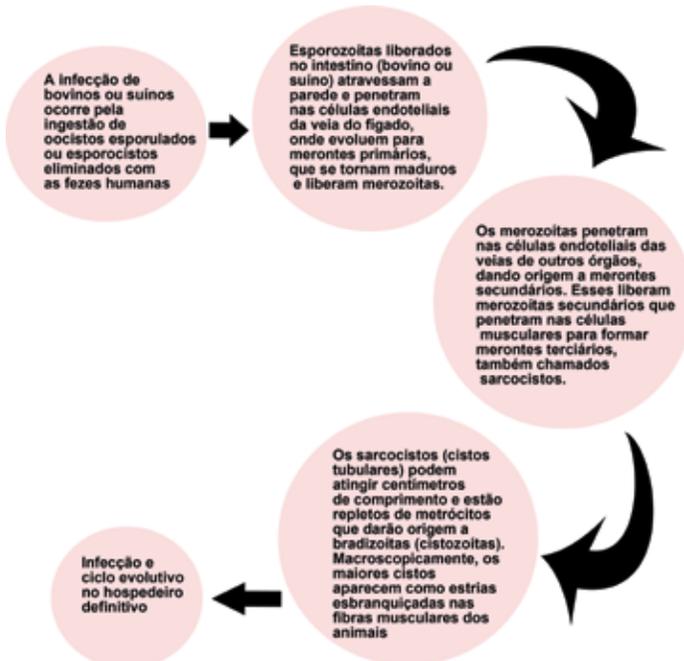


Figura 44. Evolução de *Sarcocystis* sp no hospedeiro intermediário.

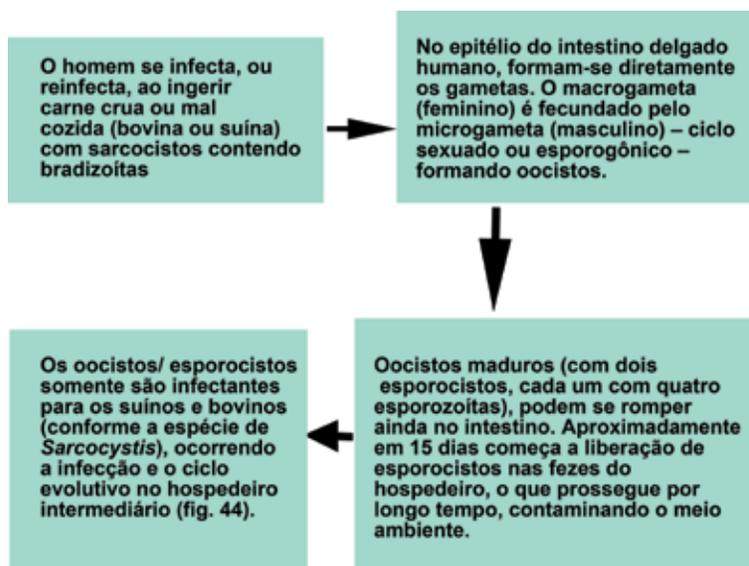


Figura 45. Evolução de *Sarcocystis* sp no hospedeiro definitivo.

OBS.: Como a formação de gametas ocorre diretamente – ou seja, não há ciclo esquizogônico –, as lesões da mucosa intestinal no homem são mínimas e, em geral, os casos são assintomáticos e de cura espontânea. A infecção por *Sarcocystis* sp atinge a musculatura esquelética e cardíaca dos animais, sendo um problema para a medicina veterinária.

c) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico é feito pelo encontro de oocistos esporulados ou esporocistos nas fezes. Técnicas de concentração, como as de Faust e cols. (1938) e Sheather (1923) – usando-se solução açucarada, em lugar de sulfato de zinco, pois os oocistos e esporocistos são leves e flutuam bem em soluções que contenham açúcar ou sal em elevadas concentrações, com densidades altas –, são as mais utilizadas.

d) Epidemiologia

A infecção por *Sarcocystis* sp é cosmopolita. Em alguns lugares, 100% dos bovinos e caprinos estão infectados com alguma espécie de *Sarcocystis*.

Os esporocistos esporulados resistem bem nos esgotos e no meio ambiente. Por isso, em regiões onde existe contaminação das pastagens com resíduos de esgotos aumenta a probabilidade de infecção do gado bovino.

Os herbívoros se infectam ao ingerirem pasto poluído com fezes humanas que contenham oocistos maduros ou esporocistos; os porcos se infectam ao ingerirem alimentos contaminados com fezes humanas contendo oocistos. O homem se infecta pela ingestão de carne crua ou malcozida de bovinos (*S. hominis*) ou porcos (*S. suihominis*).

Há relatos de que o homem pode funcionar como hospedeiro intermediário, desenvolvendo o ciclo do protozoário no tecido muscular, porém de forma assintomática ou com sintomatologia branda.

e) Profilaxia e controle

- **para prevenir a infecção humana:** as carnes de bovinos e suínos devem ser ingeridas bem cozidas e os abatedouros de animais devem ser fiscalizados.
- **para evitar a infecção de bovinos e suínos:** deve-se dar destino adequado às fezes humanas, impedindo que contaminem o meio ambiente.

5.4 Protozoários do filo Apicomplexa, ordem Eucoccidiida, gênero *Cryptosporidium*

Cryptosporidium são protozoários, encontrados em grande variedade de vertebrados, que podem parasitar aves, peixes, répteis e mamíferos – inclusive o homem. Atualmente contam-se 22 espécies desse protozoário.

Cryptosporidium spp é considerado um dos principais responsáveis por diarreias infantis em crianças de 2 a 5 anos que frequentam creches. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção é autolimitada, causando diarreia com

cura espontânea. Já em indivíduos imunodeficientes por diversas causas, os casos de diarreia são prolongados e graves.

Apesar de existirem 16 espécies consideradas válidas, as principais espécies que infectam o homem em todo o mundo, incluindo o Brasil, são *C. hominis* e *C. parvum* – sendo a espécie *C. hominis*, com ciclo de transmissão basicamente antroponótico (de homem a homem), a mais prevalente entre a população humana e a espécie *C. parvum* está mais envolvida na transmissão zoonótica, uma vez que é responsável pela infecção de diversas espécies de animais, entre outros, bovinos e macacos.

20% dos oocistos têm parede fina → se rompem → continua a esquizogonia.

80% dos oocistos têm parede espessa → vão para o meio ambiente.

a) Morfologia e biologia

Morfologia

Os oocistos maduros são esféricos ou ovoides, com quatro esporozoítas, e medem de 4 a 5 μm ; é essa a forma infectante, que é eliminada, em fezes diarreicas, pelos pacientes ou animais parasitados. A maioria dos oocistos tem parede cística dupla e espessa e é muito resistente ao meio ambiente. Alguns oocistos, porém, possuem parede cística única e delgada, tão frágil que muitas vezes se rompe ainda dentro do intestino do hospedeiro.

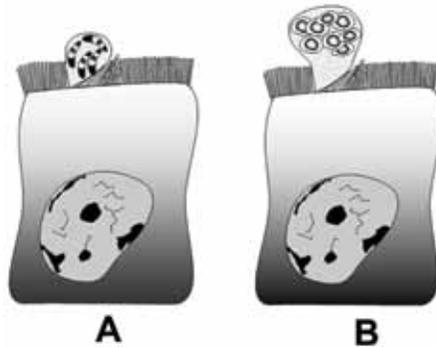


Figura 46. Desenho esquemático do *Cryptosporidium parvum* no intestino do camundongo: A) oocisto maduro com quatro esporozoítas; B) esquizonte após a esquizogonia.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

Ciclo biológico do *Cryptosporidium* sp

O ciclo de vida do *Cryptosporidium* sp é monoxênico.

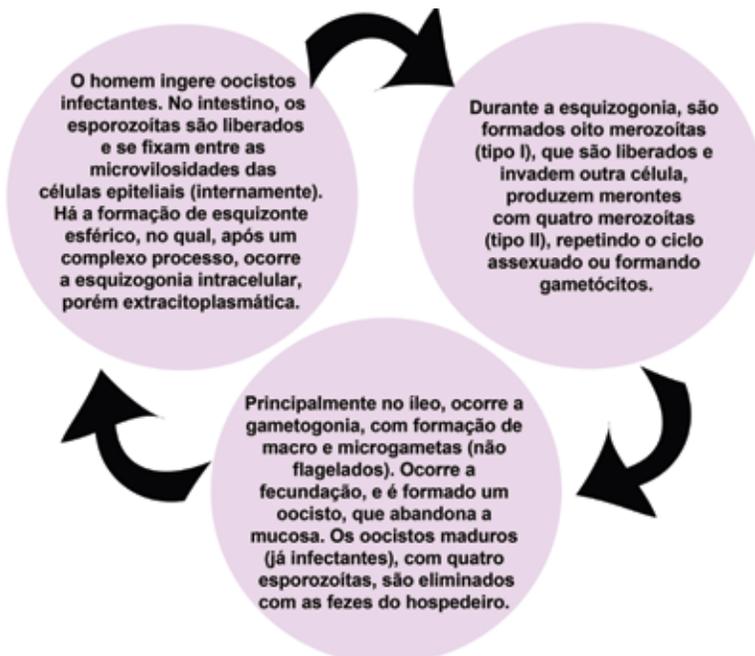


Figura 47. Ciclo biológico do *Cryptosporidium* sp.

b) Relação parasito–hospedeiro

A transmissão da protozoose se dá pela contaminação fecal/oral entre pessoas, ou por meio de animais – daí ser considerada uma zoonose –, ou, ainda, por água ou alimentos contaminados com oocistos.

○ período de incubação da infecção dura de 4 a 14 dias, e o início das manifestações clínicas é explosivo, com enterocolite aguda. Em indivíduos imunocompetentes, o quadro clínico de diarreia e cólicas é autolimitado, com cura espontânea ao fim de uma ou duas semanas.

A gravidade da criptosporidiose é maior quando há imunodeficiência de qualquer natureza, principalmente em casos de Aids. Nesses casos, o início é insidioso e se agrava progressivamente, com diarreia aquosa, cólicas, dor epigástrica, náuseas e vômitos, mal-estar e perda de peso, podendo ocorrer desidratação e caquexia e até a morte. Os pacientes imunodeprimidos com criptosporidiose têm intolerância à lactose e má absorção de gorduras. Vários antibióticos têm sido ensaiados para diminuir a diarreia, mas até o presente não há nenhum tratamento eficaz.

Como os oocistos se tornam maduros (infectantes) dentro do organismo do hospedeiro, há possibilidade de autoinfecção. A presença de oocistos de parede fina pode ocasionar seu rompimento ainda no interior do intestino, provocando a chamada infecção interna; já a autoinfecção externa se dá quando o hospedeiro ingere as formas infectantes do parasito, geralmente oocistos de parede espessa.

c) Diagnóstico laboratorial

○ diagnóstico é feito pela pesquisa de oocistos nas fezes (por métodos de concentração e coloração) ou sorologicamente (pelas técnicas de ELISA ou Rifi).

○ diagnóstico laboratorial da criptosporidiose se baseia no encontro e na identificação dos oocistos nas fezes dos hospedeiros infectados. Para tanto, devem ser realizadas técnicas de concentração e colorações específicas. As fezes podem ser concentradas por metodologias convencionais – como a

técnica de centrifugo-sedimentação em formol-éter e o método de Ritchie (1948), ou mesmo técnicas de centrifugo-flutuação, como o método de Sheather (1923), no qual os oocistos flutuam numa solução saturada de sacarose com densidade de 1.200 g/L.

Os esfregaços fecais são confeccionados com o sedimento obtido mediante métodos de concentração e, posteriormente, submetido a técnicas de coloração específicas. A técnica da fucsina-carbol, ou seja, a coloração por fucsina fenicada, base das colorações derivadas do Ziehl-Neelsen, é de ampla utilização no diagnóstico das enterococcidioses. Também muito utilizada é a técnica da safranina-azul de metileno. Os oocistos apresentam a característica de ser álcool-ácido resistentes; portanto, fixam bem a fucsina fenicada.

Existem hoje, disponíveis comercialmente, *kits* para a pesquisa de coproantígenos que detectam, por ELISA, a presença de antígenos dissolvidos nas fezes. São bastante sensíveis e específicos, porém o alto custo ainda limita a sua utilização na rotina laboratorial.

Os oocistos de *Cryptosporidium* são idênticos para todas as espécies consideradas válidas, e o diagnóstico por técnicas moleculares tem sido utilizado para diferenciar os diferentes subtipos do protozoário. As técnicas mais utilizadas são a PCR e suas variações.³⁶

Os métodos sorológicos não são muito utilizados, mas, quando empregados, ocorre, pelo menos na técnica de Rifi, a presença de títulos sorológicos elevados até um ano após a infecção.

³⁶ Ver o capítulo “Biologia molecular”, no volume 3 desta coleção.

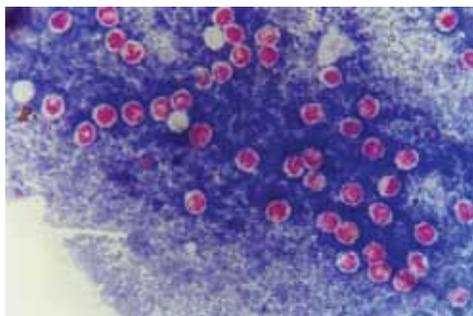


Figura 48. Oocistos de *Cryptosporidium* sp corados por safranina-azul de metileno, 1000X.

Foto cedida pelo professor Sidnei Silva (Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/IOC–Fiocruz).

d) Epidemiologia

A criptosporidiose é uma zoonose de animais domésticos e do gado encontrada em todos os continentes, sendo considerada cosmopolita. Sua prevalência varia de região para região. Em países desenvolvidos, ocorre em 0,6 a 20% de diferentes populações; entre indivíduos HIV-positivos com diarreia, a ocorrência dessa doença está em torno de 14%. Já em relação aos países em desenvolvimento, a frequência de infectados é bem maior, de 4 a 32%, sendo de 24% a prevalência entre os imunossuprimidos pelo vírus HIV.

Os bovinos, por eliminarem grandes quantidades de oocistos, são muito importantes na cadeia epidemiológica da infecção.

OBS.: A prevalência da criptosporidiose é mais elevada entre os homossexuais aidéticos. Os indivíduos com Aids são muito importantes na transmissão da infecção, por serem grandes eliminadores de oocistos. Vale ressaltar que, após a introdução da terapia antirretroviral de alta potência HAART (do inglês *Highly Active Antiretroviral Therapy*), e como resultado da melhora na imunidade celular desses indivíduos, houve uma queda no número de pacientes que apresentavam diarreia por esses agentes.

Os oocistos de *Cryptosporidium* sp são bastante resistentes no meio exterior; são resistentes também à maioria dos desinfetantes e à cloração até 4,9% ou mais. Os oocistos são destruídos apenas pelo formol a 10% e pelo aquecimento a 65°C durante 30 minutos.

Muitos surtos estão relacionados com a poluição hídrica, e a ingestão de água contendo oocistos de *Cryptosporidium* sp é um problema de saúde pública que não deve ser negligenciado. Melhorias no saneamento básico já ajudariam nesse tipo de transmissão da protozoose.

A transmissão de homem a homem é muito importante, e os casos de autoinfecção devem ser levados em conta quando se tomem medidas profiláticas para o controle da protozoose. Os hábitos higiênicos inadequados são um dos fatores que contribuem para esse tipo de infecção.

No Brasil, os surtos de criptosporidiose têm aumentado entre crianças que frequentam creches, provavelmente por esses serem ambientes que favorecem a doença, por causa do contato direto criança—criança, criança—funcionário.

e) Controle

Os pacientes HIV positivo devem ser assistidos com cuidados especiais para não haver contaminação do ambiente e das outras pessoas em torno, inclusive do cuidador, que deve usar luvas, lavar (para remoção mecânica) e desinfetar as mãos, esterilizar materiais utilizados no paciente e descontaminar todas as superfícies que, direta ou indiretamente, entraram em contato com o mesmo.

Quadro 1
Principais diferenças morfológicas e biológicas entre os gêneros

Protozoários	<i>Isopora belli</i>	<i>Sarcocystis hominis</i>	<i>Sarcocystis suihominis</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp	<i>Toxoplasma gondii</i>
Oocistos	Presentes imaturos nas fezes humanas (com um blastômero apenas); desenvolvem-se no meio externo	Ausentes nas fezes humanas	Ausentes nas fezes humanas	Presente nas fezes humanas ou de outros animais parasitados. São eliminados totalmente maduros (forma infectante), com quatro esporozoítas medindo de 4 a 5 μm	Presente nas fezes de felinos, são eliminados imaturos e evoluem no meio ambiente
Esporocistos	Dois dentro do oocisto, cada um com quatro esporozoítas	Saem juntos com as fezes humanas, isolados ou acoplados em pares, cada um com quatro esporozoítas	Saem juntos com as fezes humanas, isolados ou acoplados em pares, cada um com quatro esporozoítas	Ausentes	Dois dentro do oocisto, cada um com quatro esporozoítas
Ciclo	Monoxênico	Heteroxênico obrigatório	Heteroxênico obrigatório	Monoxênico	Heteroxênico facultativo
Hospedeiro definitivo	Homem	Homem	Homem	Homem	Felinos (gato)
Hospedeiro intermediário	Não é conhecido	Bovinos	Suínos	Ausente	Mamíferos, inclusive o homem, e aves

5.5 Protozoários do filo Apicomplexa, ordem Hemosporidiida, gênero Plasmodium

A malária é considerada a doença tropical mais importante pela Organização Mundial da Saúde, sendo um problema de saúde pública em mais de cem países. Em 2009, foram detectados cerca de 225 milhões de casos da infecção no mundo. É causada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, sendo que quatro espécies são parasitos de humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. Apenas as três primeiras ocorrem naturalmente no Brasil, onde 97% dos casos estão relacionados a *P. falciparum* ou *P. vivax*.

a) Morfologia e biologia

O plasmódio tem como hospedeiros definitivos as fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* – nas quais ocorre sua reprodução sexuada –, sendo os humanos hospedeiros intermediários, apresentando apenas a multiplicação assexuada do parasito em suas hemácias e células hepáticas.

Principais formas do protozoário encontradas no homem

- esquizontes pré-eritrocíticos (em hepatócitos);
- merozoítas (produzidos nas fases pré e eritrocítica);
- trofozoítas sanguíneos (hemácias);
- esquizontes (hemácias);
- gametócitos (hemácias).

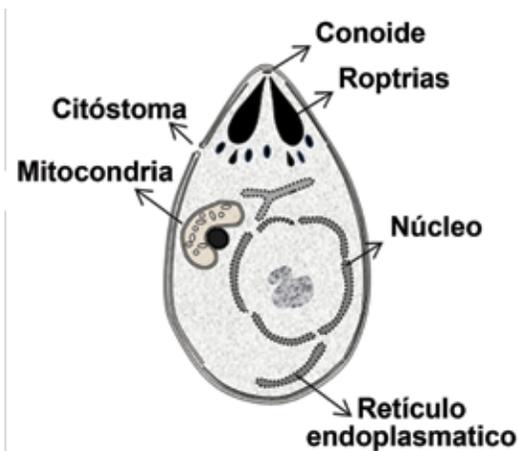


Figura 49. Desenho esquemático de um merozoíta de plasmódio.

Ilustração: adaptada de Rey, 2008, por JCA Carreira e AVM Silva

(Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

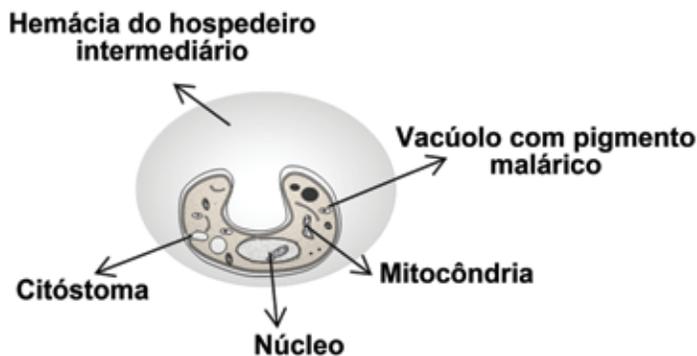


Figura 50. Desenho esquemático de um trofozoíta de plasmódio.

Ilustração: adaptada de Rey, 2008, JCA Carreira e AVM Silva

(Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

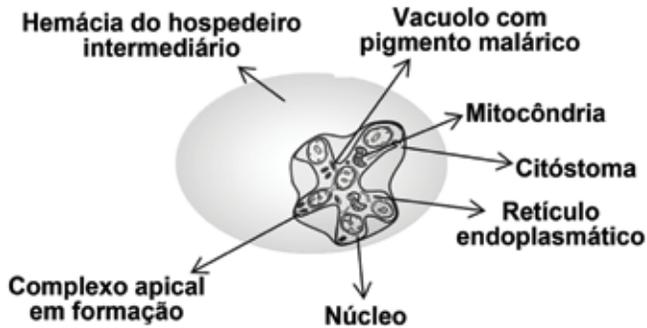


Figura 51. Desenho esquemático de um esquizonte de plasmódio.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

Formas encontradas nos mosquitos:

- microgametas e macrogametas (no estômago);
- zigoto ou oocineto (entre epitélio e membrana basal do basal do estômago);
- oocisto (entre epitélio e membrana basal do estômago);
- esporozoítas (na hemolinfa e nas glândulas salivares).

b) Ciclo biológico dos plasmódios

O ciclo de vida dos plasmódios é heteroxênico obrigatório. No hospedeiro intermediário (homem), ocorre apenas a reprodução assexuada do parasito; no hospedeiro definitivo (anofelino), ocorre sua reprodução sexual.



Figura 52. Ciclo biológico do *Plasmodium* sp no hospedeiro intermediário (homem).

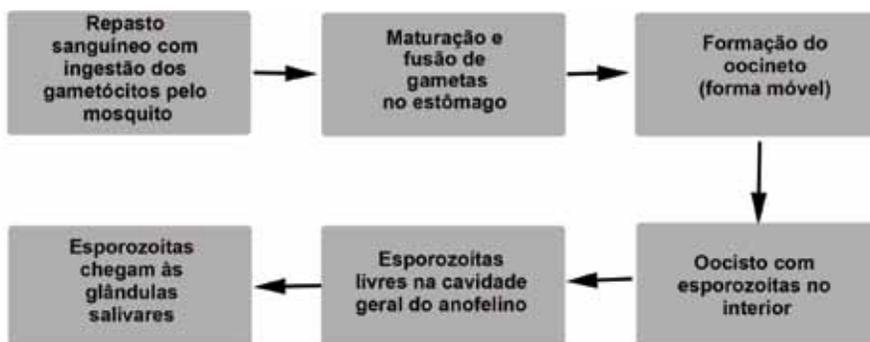


Figura 53. Ciclo biológico do *Plasmodium* sp no hospedeiro definitivo (anofelino).

c) Malária

Os indivíduos parasitados apresentam um quadro de infecção sistêmica que se manifesta em geral com febre em intervalos relativamente regulares (período entre esquizogonias), anemia, icterícia, alterações circulatórias e

aumento do baço, e, nos casos de malária cerebral, dores de cabeça, convulsões e coma.

A multiplicação do *Plasmodium* leva à lise de hemácias e à liberação de metabólitos parasitários. Há prejuízo na oxigenação dos tecidos e danos decorrentes de tal hipóxia. Hemácias parasitadas pelo *Plasmodium falciparum* tornam-se mais aderentes às paredes dos capilares, reduzindo a perfusão tecidual.³⁷

A hemozoína, ou pigmento malárico, liberada com o rompimento celular, pode formar depósitos em vários órgãos — fígado, baço, cérebro e medula óssea —, dando aos mesmos uma coloração enegrecida.

A periodicidade no aparecimento do quadro febril varia conforme a espécie do parasito. Esse intervalo é de 36 a 48 horas em infecções por *P. falciparum*; de 48 horas em infecções por *P. vivax*; e de 72 horas nas infecções por *P. malariae*, sendo a malária referida popularmente, nesses casos, respectivamente, como febre terçã maligna, febre terçã benigna e febre quartã.

d) Diagnóstico laboratorial

• Parasitológico

○ diagnóstico parasitológico consiste em pesquisa das formas sanguíneas do protozoário no interior de hemácias, avaliando sua morfologia, em distensão delgada ou espessa. ○ sangue deve ser coletado preferencialmente próximo ao momento de um acesso malárico e por punção capilar.

Distensão delgada (esfregaço) e gota espessa: são os métodos mais utilizados pelas vantagens que apresentam — tempo reduzido para a liberação do resultado, baixo custo — e por permitirem a diferenciação entre as espécies de *Plasmodium*. Porém têm alguns inconvenientes, como a exigência de profissionais experientes para a realização de uma boa coloração e para a leitura das lâminas, podendo ainda apresentar resultado falso negativo em casos de parasitemia baixa.

³⁷ Fluxo constante de sangue que assegura a oxigenação e a nutrição dos tecidos, assim como a remoção dos resíduos metabólicos e do excesso de CO₂.

Método da centrifugação do micro-hematócrito QBC (do inglês *Quantitative Buff Coat*): até oito vezes mais sensível que as técnicas anteriores, esse método permite o diagnóstico parasitológico mesmo em casos de baixa parasitemia. Exige maiores recursos no laboratório, o que eleva o seu custo. Além disso, a identificação da espécie parasitária é mais difícil.

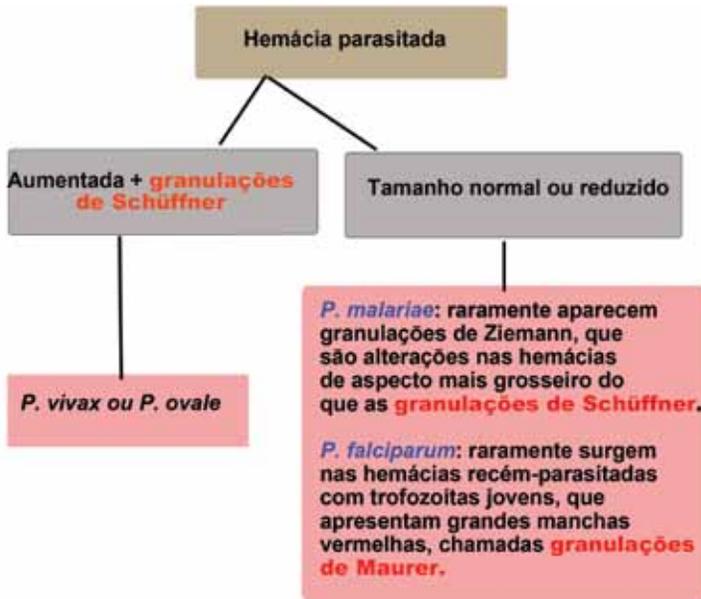
- **Sorológico**

Rifi: considerado o teste de referência para o diagnóstico da malária, apresenta boa sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Pode fornecer resultado falso positivo, quando da presença de fator reumatoide, de conjugados mal titulados e de anticorpos autoimunes. Exige equipamentos especiais e pessoal com treinamento específico.

ELISA: entre as suas vantagens, estão o seu baixo custo em relação aos outros métodos, a automação e a possibilidade de pesquisa de antígenos circulantes.

- **Molecular**

PCR e hibridização de DNA são técnicas de altas sensibilidade e especificidade que permitem a realização de grande número de amostras. Entretanto, seu custo operacional é ainda muito elevado.

Esquema 1. Diagnóstico diferencial das espécies de *Plasmodium*.

A distribuição das formas evolutivas do protozoário na fase eritrocitária varia conforme a espécie de *Plasmodium*, assim como o seu tropismo por hemácias mais jovens ou maduras. As formas listadas a seguir são as encontradas usualmente no sangue periférico dos pacientes:

- *Plasmodium vivax*

Trofozoíta jovem: apresenta aspecto de anel, com o citoplasma espesso e arqueado, e cromatina nuclear geralmente única, condensada e situada próximo à borda do trofozoíta (como se fosse a “pedra” do anel). Encontrado principalmente em hemácias jovens, deixa-as com aspecto maior e mais pálido do que o normal.

Trofozoíta ameboide: seu citoplasma é irregular, vacuolizado, e seu núcleo, nessa fase, não se encontra em divisão.

Esquizonte: citoplasma irregular, muito vacuolizado e com cromatina em divisão (início da esquizogonia).

Rosácea ou merócito: cada fragmento do núcleo, acompanhado de uma porção de citoplasma, forma tantos merozoítas quantas forem as fragmentações nucleares. Formam-se de 12 a 14 merozoítas, os quais, dispostos de forma irregular em uma massa de pigmentos, ocupam completamente a hemácia.

Macrogametócito: precursor do gameta feminino, de formato arredondado ou oval, citoplasma abundante, núcleo grande, com cromatina grande e periférica. Ocupa quase todo o volume da hemácia hipertrofiada.

Microgametócito: precursor do gameta masculino, semelhante ao macrogametócito, porém com cromatina menos condensada e usualmente central.

- *Plasmodium falciparum*

Trofozoíta jovem: citoplasma delicado, grão de cromatina saliente (“anel de bacharel”) ou duplo, e presença de hemácias poliparasitadas.³⁸

Macrogametócito: alongado e curvo, em forma de crescente (forma de banana), com núcleo denso cercado de pigmento malárico.

Microgametócito: mais curto e menos curvado que o macrogametócito, seu citoplasma cora-se de forma menos intensa, sua cromatina é mais difusa e o pigmento malárico disseminado.

OBS.: Em casos de infecções graves, é possível encontrar, em sangue periférico, trofozoítas maduros, esquizontes e merócitos, esses com de 8 a 36 merozoítas, dispostos ao redor de uma massa de pigmentos. Usualmente tais formas se encontram apenas na circulação sanguínea visceral.

³⁸ Dois ou mais trofozoítas parasitando a mesma hemácia.

- *Plasmodium malariae*

Trofozoíta jovem: tem aspecto de anel, citoplasma espesso e cromatina saliente e se posiciona em faixa na hemácia.

Trofozoíta maduro: assume o aspecto de faixa em quase todo o diâmetro da hemácia, apresenta citoplasma compacto e cromatina pouco visível.

Esquizonte: citoplasma disforme, cromatina em divisão e presença de pigmentos grosseiros ao longo do corpo do parasito; apresenta-se em posição de faixa equatorial na hemácia.

Rosácea ou merócito: cada fragmento do núcleo, acompanhado de uma porção de citoplasma, forma tantos merozoítas quantas forem as fragmentações nucleares – geralmente de 8 a 10 merozoítas, dispostos como as pétalas de uma flor, com citoplasma residual no centro.

Macrogametócito: tem formato redondo, com poucos pigmentos grosseiros, e cromatina periférica semelhante ao *P. vivax*, porém de tamanho mais reduzido.

Microgametócito: com formato redondo, tem poucos pigmentos grosseiros e cromatina central única e menos evidente, mais difusa do que a do macrogameta.

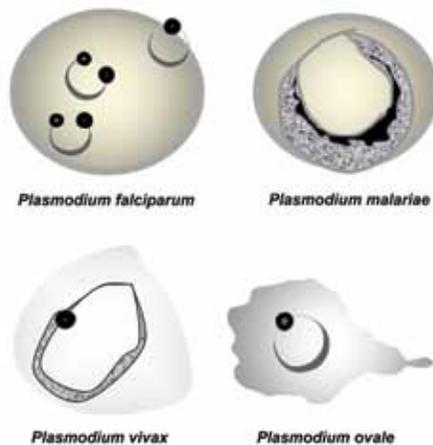


Figura 54. Desenho esquemático de trofozoítas de plasmódios no interior da hemácia do hospedeiro intermediário.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz).

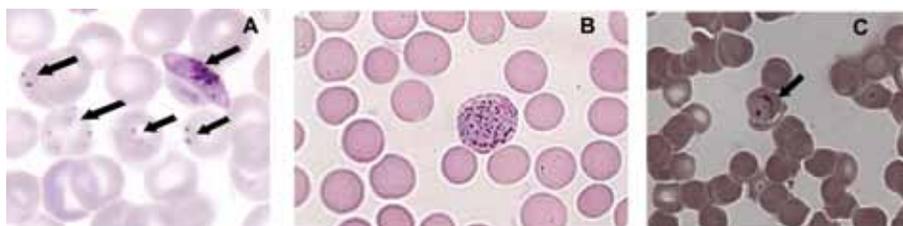


Figura 55. Fotos de distensões delgadas sanguíneas, coradas pelo Giemsa, 1000X: A) trofozoítas e macrogametócito de *Plasmodium falciparum* (setas); B) macrogametócito de *Plasmodium vivax* (seta); C) trofozoíta de *Plasmodium vivax* (seta).

Fotos: Laboratório de Toxoplasmose/IOC–Fiocruz.

e) Epidemiologia

Cerca de cem países, principalmente da África, Ásia e América Latina, ainda apresentam áreas endêmicas para a malária. O sudeste asiático, a China e algumas áreas da América do Sul apresentam transmissão focal limitada ao interior de florestas, de forma sazonal (com picos depois do início e seguindo-se ao fim das chuvas). Nesses locais, a população de risco consiste em trabalhadores que entram em contato com as florestas.

A transmissão da malária é mais comum no interior das habitações, em áreas rurais e semirurais. Pode ocorrer em áreas urbanas, principalmente nas zonas de periferia. Em altitudes superiores a 2.000 metros, o risco de aquisição de malária é menor, pois o ambiente é desfavorável ao mosquito. O principal transmissor na região amazônica é o *Anopheles darlingi*. Ele utiliza grandes coleções de água como criadouro e atualmente mais relacionado à transmissão extradomiciliária. A espécie *Anopheles aquasalis* predomina na faixa litorânea, inclusive no Rio de Janeiro. Essa espécie apresenta maior atividade durante a noite, do crepúsculo ao amanhecer, e pica tanto no interior quanto no exterior das habitações.

A transmissão do *Plasmodium* pode ocorrer também, de forma menos frequente, por meio de transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos, utilização compartilhada de seringas e agulhas, e da gestante para o filho (malária congênita), antes ou durante o parto.

A espécie *P. falciparum* causa a malária em sua forma mais grave, podendo ser fatal. Segundo a OMS, em 2009 ocorreram cerca de 780 mil óbitos por malária no mundo. O risco de aquisição não é uniforme dentro de um mesmo país; dessa maneira, atualmente a transmissão da malária no Brasil está basicamente restrita à Amazônia Legal. Nas capitais dessa região, em geral o risco é pequeno (em Belém, é quase inexistente), porém pode haver transmissão significativa nos arredores das cidades (periferia de Manaus e de Porto Velho, por exemplo). Nos estados fora da região amazônica, o risco de transmissão local (autóctone) é pequeno ou inexistente. Entretanto, como ainda existe *Anopheles* em áreas atualmente livres da malária, há risco de ocorrer a reintrodução da mesma.

f) Profilaxia

- eliminação de criadouros de anofelinos (uso de larvicidas e predadores);
- uso de inseticidas de ação residual;
- uso de telas nas casas;
- uso de roupas protetoras, principalmente ao entardecer e ao amanhecer;
- controle dos bancos de sangue;
- tratamento dos indivíduos parasitados (principalmente aqueles com gametócitos circulantes);
- quimioprofilaxia para viajantes e grupos de risco.

5.6 Protozoários do filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida, gênero Babesia

A) *Babesia* sp

a) Morfologia e biologia

A babesiose constitui importante enfermidade parasitária dos animais domésticos, podendo ocasionar grandes perdas econômicas no rebanho. Esse

parasitismo desencadeia um quadro clássico de anemia, com complicações decorrentes da multiplicação intraeritrocitária intensa.

Mais de 70 espécies conhecidas de *Babesia* apresentam como hospedeiros definitivos carrapatos ixodídeos. Grosseiramente, as espécies podem ser divididas em dois grupos: grandes babésias (quando seu tamanho excede $2,5 \mu\text{m}$ ou o raio da hemácia parasitada) e pequenas babésias (menores do que $2,5 \mu\text{m}$).

Algumas características do ciclo evolutivo das diferentes espécies de babésia lembram o ciclo dos plasmódios humanos. A multiplicação assexuada por esquizogonia ocorre no interior dos eritrócitos de mamíferos, assim como o início da gametogonia, seguindo até a formação dos gametócitos. Os gametócitos, quando ingeridos pelos carrapatos, dão continuidade ao ciclo evolutivo, amadurecendo em gametas no intestino do artrópode.

A fusão do microgameta ao macrogameta origina o zigoto, que evolui para oocineto, onde os esporozoítas serão formados. O rompimento do oocineto libera os esporozoítas, que migram para diversos tecidos (muscular, glandular, cutâneo), sendo de especial relevância quando infectam os ovários, pois, então, são transmitidos de forma transovariana para a próxima geração de carrapatos. Nesse caso, os artrópodes nascem parasitados.

De acordo com a espécie, as babésias podem ser transmitidas tão logo se inicie a alimentação do hospedeiro, sendo inoculadas com a saliva do artrópode no mamífero. Ao alcançarem os eritrócitos, os esporozoítas utilizam suas estruturas apicais para penetrar na célula hospedeira, onde iniciam a multiplicação assexuada (esquizogonia). Alguns relatos indicam ainda a possibilidade de transmissão por via placentária e de forma mecânica, por meio de punção sanguínea de animal infectado posteriormente inoculada em animal suscetível.

A babesiose animal tem curso diferente segundo as espécies de parasito e do hospedeiro em questão. Algumas alterações são idênticas às apresentadas por outros parasitos intraeritrocitários, como os plasmódios.

b) Patogenia e manifestações clínicas

Certas espécies podem levar à aderência de glóbulos parasitados às paredes dos vasos, prejudicando bastante a oxigenação local e reduzindo a taxa de espécimes detectáveis nos exames parasitológicos sanguíneos. O quadro clínico envolve, dentre outros sintomas, anemia hemolítica,³⁹ hemoglobinúria,⁴⁰ icterícia⁴¹ e dispneia,⁴² e leva à progressiva debilitação da condição física do animal, podendo ser fatal.

Casos de babesiose humana têm sido relatados em diversos países, inclusive no Brasil. As espécies envolvidas até o momento são *Babesia microti* (que possui murinos, e as espécies de carrapatos que os parasitam, como hospedeiros naturais), *Babesia bovis* e *Babesia divergens* (que têm bovinos, bubalinos e cervídeos como hospedeiros naturais). O quadro clínico humano é semelhante ao da malária; entretanto, o exame das formas sanguíneas, quando analisadas por profissionais capacitados, permite a distinção morfológica entre os agentes. Seu formato pode variar de acordo com a etapa de evolução no hospedeiro, apresentando forma de vírgula, anel, ovoide ou mesmo ameboide e irregular, e sempre com carioteca distinta. Casos de parasitismo humano encontrados no Rio de Janeiro e em São Paulo trazem à tona a discussão sobre a maneira como a aquisição do parasitismo está ocorrendo na espécie. Atualmente, a possibilidade de veiculação por transfusões sanguíneas tem sido apontada como uma das causas.

O diagnóstico parasitológico pode fornecer resultado falso negativo, dependendo da espécie de babésia e da parasitemia apresentada. Por isso, recomenda-se a realização de várias coletas em dias diferentes e a associação com outras técnicas, como as de imunodiagnóstico (Rifi, ELISA). As técnicas moleculares são empregadas como forma rápida e segura de diagnóstico da babesiose humana em alguns países. O isolamento em animais de laboratório

³⁹ Anemia decorrente da destruição excessiva de hemácias.

⁴⁰ Presença de hemoglobina na urina.

⁴¹ Deposição de pigmentos biliares no tegumento, ocasionando coloração amarelada na pele e nas mucosas.

⁴² Dificuldade respiratória.

permite boa avaliação do parasito e sua identificação; entretanto, requer tempo maior para a obtenção do resultado.

A babesiose ocorre em todos os continentes, estando a distribuição das espécies do protozoário diretamente relacionada à distribuição das espécies de ixodídeos transmissores.

c) Profilaxia e controle

○ controle da enfermidade no rebanho deve ser feito em conjunto com o combate ao carrapato, sem o seu completo extermínio, a fim de manter uma imunidade regular nos animais. ○ contato de humanos com os artrópodes deve ser evitado por meio do uso de roupas protetoras; após exposição a locais ou animais potencialmente infestados, também deve ser efetuada inspeção corporal.

6. Protozoários do filo Ciliophora, ordem Trichostomatida, família Balantidiidae, gênero *Balantidium*

A) *Balantidium coli*

○ *Balantidium coli* é o único ciliado patogênico para o ser humano.

a) Morfologia e biologia

Morfologia

Trofozoíta: tem de 40 a 90 μm de altura por 30 a 60 μm de largura; seu formato é ovoide ou elíptico e apresenta dois núcleos: um em forma de rim, nitidamente de dimensão maior (macronúcleo), e outro, próximo ao macronúcleo, de difícil visualização (micronúcleo). No citoplasma, há grandes vacúolos contráteis em número variável. Nos polos celulares, encontram-se, opostamente, o citóstoma e o citopígio. Sua membrana plasmática apresenta externamente numerosas fileiras de cílios (raramente visualizados nas preparações permanentes, pois são destruídos pelo processo de fixação e/ou coloração).

Cisto: com 40 a 60 μm de diâmetro, tem formato esférico ou ovoide, com dois núcleos semelhantes aos do trofozoíta. Seu citoplasma possui aspecto hialino, com presença de vacúolos. A membrana cística é relativamente grossa.

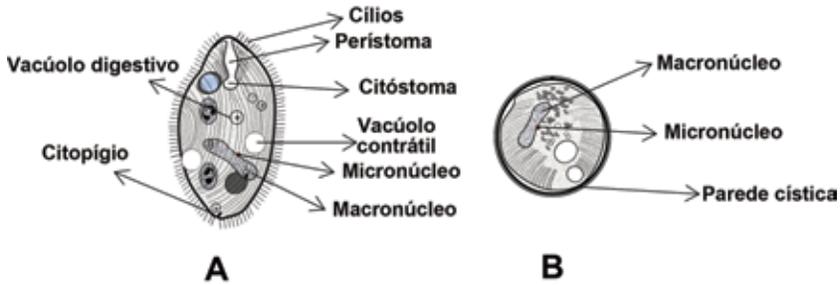


Figura 56. *Balantidium coli*: A) trofozoíta; B) cisto.

Ilustração: JCA Carreira e AVM Silva (Laboratório de Toxoplasmosse/IOC–Fiocruz).

Ciclo biológico do *Balantidium coli*

○ *B. coli* se multiplica na luz do intestino grosso, geralmente sem causar danos locais; ocasionalmente, porém, invade a mucosa e outros tecidos, possivelmente por meio da liberação de enzimas histolíticas. A reprodução ocorre por divisão binária (reprodução assexuada) e, algumas vezes, por conjugação (reprodução sexuada). Periodicamente, formam-se cistos que são eliminados nas fezes. Os cistos raramente são encontrados nas fezes humanas; entretanto, são frequentes na evacuação de porcos parasitados. A infecção de um novo hospedeiro ocorre por ocasião da ingestão dos cistos.

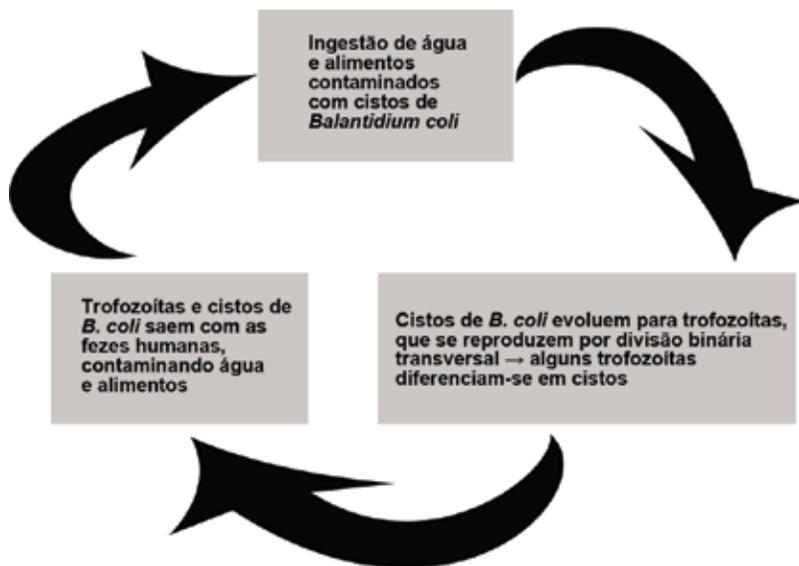


Figura 57. Ciclo biológico do *Balantidium coli*.

b) Patogenia e manifestações clínicas

A balantidíase, infecção por *B. coli*, pode ter curso semelhante à amebíase; pode ser muitas vezes assintomática ou levar a úlceras, em forma de “gargalo de garrafa”, na mucosa do intestino grosso, principalmente no ceco, apêndice e sigmoide. As manifestações clínicas da balantidíase podem ser a presença de fezes diarreicas com sangue e/ou muco, febre e cólica abdominal. Em alguns casos, normalmente crônicos, os mesmo sintomas podem ser encontrados, porém de forma mais branda e acompanhados de tenesmo,⁴³ perda do apetite e anemia, normalmente alternando com períodos assintomáticos. As localizações extraintestinais são pouco frequentes, podendo, nesse caso, acometer pulmões, sistema urogenital ou fígado.

⁴³ Sensação dolorosa na bexiga ou na região anal, com desejo contínuo de urinar ou de evacuar, sem êxito.

c) Diagnóstico laboratorial

Fezes diarreicas: por meio do exame direto é possível visualizar os trofozoítas.

Fezes moldadas: são utilizadas técnicas de concentração, como as de Faust e cols. (1938) e de Ritchie (1948).

OBS.: A fim de aumentar a sensibilidade diagnóstica, a pesquisa de formas parasitárias deve ser realizada em mais de uma amostra fecal (de 3 a 5), sendo que, exceto para a última coletada, utilizam-se conservantes (MIF ou similares).

Outros materiais biológicos: em casos específicos, pode-se utilizar ainda para a pesquisa material aspirado, por meio de retossigmoidoscopia,⁴⁴ de lesões ulceradas, com posterior coloração por hematoxilina eosina ou hematoxilina férrica.

d) Epidemiologia

A infecção por *B. coli*, apesar de ser amplamente distribuída no mundo, é pouco frequente em humanos, sendo mais encontrada em regiões de clima tropical e subtropical onde predominem a falta de educação sanitária das populações. O papel dos suínos como reservatórios e fontes de infecção para humanos é controverso. A dificuldade de encistamento do *B. coli* em humanos, possivelmente fruto de resistência natural, é fator redutor da disseminação da parasitose. Os símios são reservatórios naturais do parasito.

e) Profilaxia e controle

- destino adequado às fezes de suínos, homens e símios parasitados;
- saneamento básico e educação sanitária;
- tratamento dos indivíduos infectados.

⁴⁴ Endoscopia realizada por via retal, para observação da região do reto e sigmoide.

7. Protozoários parasitos de animais domésticos

O número de protozoários parasitos de animais domésticos é muito grande. Tal como nos humanos, algumas protozooses podem ocasionar manifestações clínicas de grau variável, acarretando no animal desde infecções assintomáticas até o óbito, trazendo prejuízos econômicos (no caso de animais de produção) e afetivos (no caso de animais de companhia). Além disso, esses animais podem servir como importantes fontes de transmissão de protozooses para humanos e para outras espécies de animais, ocasionando inclusive surtos zoonóticos que, eventualmente, podem dar origem a infecções humanas. Alguns exemplos de protozoários parasitos estão relacionados no quadro 2.

Quadro 2. Principais protozoários parasitos de animais domésticos.

Gênero/ espécie	Principais hospedeiros	Habitat	Formas diagnosticadas nos animais
<i>Entamoeba histolytica</i>	Humanos e outros primatas, caninos, felinos e suínos	Intestino grosso e, eventualmente, fígado, pulmão, cérebro	Trofozoíta de formato irregular, núcleo apresentando cariossomo puntiforme central e cromatina periférica. Cisto arredondado (10 μm a 15 μm), com um a quatro núcleos
<i>Tritrichomonas foetus</i>	Bovinos	Trato genital	Trofozoíta piriforme com cerca de 20 μm por 10 μm , apenas um núcleo e quatro flagelos – três anteriores livres e um recorrente, formando a membrana ondulante e se exteriorizando posteriormente
<i>Trypanosoma brucei evansi</i>	Hospedeiros vertebrados: equinos, ruminantes, suínos e felinos Hospedeiros invertebrados: tabanídeos	Sangue e linfa	Tripomastigota fusiforme, alongada e fina (19 a 39 μm), com flagelo de origem posterior formando a membrana ondulante, cinetoplasto pequeno e subterminal

<i>Trypanosoma brucei equiperdum</i>	Equino	Trato urogenital	Morfológicamente semelhante ao <i>T. b. evansi</i>
<i>Leishmania</i> spp	Hospedeiros vertebrados: humanos, caninos, equinos, felinos e animais silvestres Hospedeiros invertebrados: flebotomíneos	Células do sistema fagocítico mononuclear	Amastigotas ovalados, com cinetoplasto em forma de bastão, associado a um flagelo rudimentar (não exteriorizado)
<i>Giardia lamblia</i>	Caninos, felinos, pequenos e grandes ruminantes	Intestino delgado	Cistos pequenos, elípticos e tetranucleados; trofozoíta piriforme, com oito flagelos, dois núcleos e disco suctorial
<i>Babesia</i> spp	Hospedeiro definitivo: carrapatos ixodídeos Hospedeiros intermediários: mamíferos domésticos	Hemácias	Merozoítas de formato variável (piriformes, arredondados, ovalados ou irregulares), geralmente aos pares, unidos pela extremidade mais afilada
<i>Eimeria</i> spp	Mamíferos, aves, répteis e peixes	Intestino grosso ou delgado (de acordo com a espécie)	Oocistos identificados de acordo com forma esférica, oval ou elipsoide e tamanho mais comumente de 15 a 50 μm . Quando esporulados, apresentam quatro esporocistos, com dois esporozoítas cada
<i>Isoospora</i> spp (<i>Cystisospora</i> spp)	Hospedeiros definitivos: caninos e felinos Hospedeiros paratênicos: ratos e camundongos	Intestino delgado	Oocistos semelhantes aos de <i>Eimeria</i> spp, porém apresentando, quando esporulados, dois esporocistos com quatro esporozoítas cada

<i>Cryptosporidium parvum</i> e <i>C. muris</i>	Humanos, roedores e gado	Células do intestino delgado e grosso	Oocistos esféricos (5 μm por 4,5 μm), com quatro esporozoítas alongados no interior
<i>Sarcocystis</i> spp	Hospedeiros definitivos: carnívoros (principalmente caninos e felinos) Hospedeiros intermediários: mamíferos, aves, marsupiais e animais pecilotérmicos (presas)	Hospedeiros definitivos: células do intestino delgado Hospedeiros intermediários: tecido muscular	Hospedeiros definitivos: oocistos de parede frágil, que geralmente se rompem ainda no intestino do hospedeiro definitivo; esporocisto pequeno (12 a 16 μm por 8 a 11 μm), contendo quatro esporozoítas Hospedeiros intermediários: cistos (com bradizoítas) apresentando características de parede e septos variáveis conforme a espécie, podendo chegar a dimensões macroscópicas
<i>Toxoplasma gondii</i>	Hospedeiros definitivos: felídeos Hospedeiros intermediários: mamíferos e aves	Hospedeiros definitivos: células do intestino delgado Hospedeiros intermediários: diversos tipos celulares – fibroblastos, hepatócitos, entre outros – e cistos em fibras musculares e células nervosas	Hospedeiros definitivos: oocistos medindo cerca de 12 μm por 10 μm ; quando esporulados, possuem dois esporocistos com quatro esporozoítas cada Hospedeiro intermediários: cistos contendo bradizoítas, podendo chegar a 100 μm ; taquizoítas em forma de arco, medindo de 6 a 8 μm
<i>Neospora caninum</i>	Hospedeiros definitivos: canídeos Hospedeiros intermediários: bovinos, ovinos, caprinos, equinos e caninos	Hospedeiros definitivos: células do intestino delgado Hospedeiros intermediários: taquizoítas em diversos tipos celulares e cistos em tecido nervoso (cérebro, medula e retina)	Hospedeiros definitivos: oocistos semelhantes aos de <i>T. gondii</i> com, em média, 11,7 μm por 11,3 μm Hospedeiros intermediários: cistos teciduais com parede espessa (mais de 4 μm)

<i>Hammondia</i> spp	<p>Hospedeiros definitivos: felídeos e canídeos</p> <p>Hospedeiros intermediários: caprinos, suínos e roedores</p>	<p>Hospedeiros definitivos: células do intestino delgado</p> <p>Hospedeiros intermediários: principalmente em tecido muscular</p>	<p>Hospedeiros definitivos: oocistos morfologicamente semelhantes aos de <i>T. gondii</i></p> <p>Hospedeiros intermediários: cistos não septados, semelhantes aos de <i>T. gondii</i></p>
<i>Besnoitia</i> spp	<p>Hospedeiros definitivos: felídeos</p> <p>Hospedeiros intermediários: bovinos, caprinos, equídeos, cervídeos, roedores, coelhos, gambás e lagartos</p>	<p>Hospedeiros definitivos: células do intestino delgado</p> <p>Hospedeiros intermediários: principalmente tecido conjuntivo, subcutâneo e musculatura</p>	<p>Hospedeiros definitivos: oocistos semelhantes aos de <i>T. gondii</i>, com aproximadamente 12 μm por 17 μm</p> <p>Hospedeiros intermediários: cistos de parede espessa com bradizoítas no interior</p>

8. Sinopse diagnóstica dos protozoários parasitos

- **Métodos parasitológicos**

Permitem identificar os parasitos vivos ou mortos por sua morfologia na microscopia. Podem ser diretos ou indiretos.

a) Diretos: são realizados diretamente do material coletado do hospedeiro (sangue, secreções, fezes, material de punção ou escarificação, tecidos provenientes de biópsia ou necropsia). Exemplos:

- **exame a fresco, entre lâmina e lamínula:** organismos vivos não corados ou mortos corados (microscopia);
- **material corado em lâmina, sem ou com fixação prévia:** gotas espessas, distensões, estirados, impressões (*imprint*);

- material “enriquecido” por centrifugação, sedimentação, flutuação ou passagem por gradiente;
- material fixado para cortes histológicos: cortes corados.⁴⁵

b) Indiretos: são realizados após procedimentos que objetivam enriquecer o material a ser examinado, utilizando-se metodologias que obrigatoriamente possibilitem a multiplicação dos parasitos, aumentando assim a especificidade dos exames. Exemplos:

- cultivo em meios específicos;
- cultivo em células;⁴⁶
- xenodiagnóstico natural ou artificial;
- inoculação em animais de laboratório.

• Técnicas imunológicas

Podem evidenciar, de forma indireta, os parasitos, mediante pesquisa de anticorpos específicos em seus hospedeiros (realização de técnicas sorológicas). Podem identificar o próprio parasito (ou seus antígenos) por meio da utilização de anticorpos monoclonais, entre outras técnicas.⁴⁷

• Técnicas moleculares

Podem detectar partes do genoma dos parasitos por meio da utilização de sondas moleculares específicas. Exemplo: PCR, entre outras técnicas.⁴⁸

⁴⁵ Ver o capítulo “Técnicas histológicas”, no volume 2 desta coleção.

⁴⁶ Ver o capítulo “Cultivo celular”, no volume 2 desta coleção.

⁴⁷ Ver o capítulo “Imunologia”, no volume 4 desta coleção.

⁴⁸ Ver o capítulo “Biologia molecular”, no volume 3 desta coleção (no prelo).

Outras técnicas utilizadas em protozoologia

a) Investigação epidemiológica ou estudos de populações de parasitos (geralmente em culturas) que identifiquem variações intraespecíficas:⁴⁹

- eletroforese para isoenzimas (zimodema);
- eletroforese para caracterização de DNA após tratamento por enzimas de restrição (esquizodema);
- eletroforese em gradiente de pulso (cromossomos).

b) Pesquisa de protozoários (cistos ou trofozoítas) em água e solo:

- flutuação;
- filtração.

8.1 Técnicas utilizadas em protozoologia

8.1.1 Técnicas para exames parasitológicos – sangue e outros tecidos

Do ponto de vista da parasitologia, existem algumas técnicas amplamente utilizadas no exame do sangue e de tecidos com o intuito de detectar a presença de protozoários parasitos. Essas técnicas, descritas na literatura, apresentam valores de sensibilidade e especificidade variáveis no que tange à detecção de formas parasitárias em diferentes tecidos, e a detecção pode ser realizada de maneira direta ou indireta. Descrevemos a seguir alguns dos métodos e soluções utilizados rotineiramente em laboratórios com o objetivo da detecção de parasitos no sangue (como o *Trypanosoma cruzi* e o *Plasmodium* spp) ou em outros tecidos (como a *Leishmania* spp).

⁴⁹ Ver o capítulo “Cultivo celular”, no volume 2 desta coleção.

8.1.1.1 Exame parasitológico no sangue

a) Métodos diretos

- **Exame a fresco ou direto**

Fundamento: demonstrar, de forma rápida, os parasitos vivos no sangue.

Material necessário:

- 1) Material para punção digital ou coleta de sangue venoso;
- 2) Lâminas e lamínulas;
- 3) Solução salina a 0,85% (opcional);
- 4) Microscópio.

Técnica: para a realização dessa técnica, utiliza-se uma gota de sangue obtida por punção capilar digital ou de sangue venoso coletado com anticoagulante. O material deve ser colocado entre lâmina e lamínula e examinado no microscópio, em objetiva de 40X. Diante do pequeno volume de sangue examinado a cada vez, é preciso repetir o método várias vezes ao dia ou mesmo em dias consecutivos até que o parasito possa ser detectado. Pode-se diluir a gota de sangue em uma gota de solução salina a 0,85%.

- **Exame a fresco ou direto utilizando-se animais de laboratório**

O sangue também pode ser proveniente de animais de laboratório; no caso de camundongos ou ratos, o método deve ser realizado da seguinte forma:

Material necessário (utilizando-se animais de laboratório):

- 1) Álcool a 70%;
- 2) Tesoura estéril;
- 3) Lâminas e lamínulas;
- 4) Solução salina a 0,85% (opcional);
- 5) Microscópio.

Procedimento (utilizando-se animais de laboratório):

- a) Conter o animal e fazer assepsia de sua cauda com álcool a 70%;
- b) Fazer um pequeno corte na cauda, com tesoura estéril;
- c) Coletar uma gota de sangue no centro da lâmina, adicionar uma gota de solução salina (opcional) e cobrir com lamínula;
- d) Observar no microscópio.

- **Material corado em lâminas de distensão de sangue**

Fundamento: fixação e coloração de material sanguíneo para identificação de formas evolutivas de parasitos.

A distensão do material pode ser realizada por meio de camada delgada ou gota espessa; o material deve ser preparado e corado pelo método de Giemsa ou de Leishman. O exame do material corado permite, além da detecção dos tripanossomatídeos, a identificação específica de *Plasmodium* spp, entre outros parasitos. A desvantagem dos esfregaços corados é que normalmente requerem parasitemias elevadas para evidenciação do parasito. No entanto, a utilização de diferentes métodos parasitológicos isolados ou combinados pode permitir a detecção rápida e precoce da infecção. A identificação dos parasitos é realizada por um ou dois tipos de esfregaço sanguíneo.

- **Esfregaços estirados de sangue (camada delgada)**

Vantagem: por formarem uma camada delgada de sangue, os esfregaços permitem melhor visualização do parasito: as células sanguíneas e os parasitos ficam mais espaçados, podendo ser mais bem observadas as suas características morfológicas.

Material necessário:

- 1) Material para punção digital ou coleta de sangue venoso com anticoagulante;
- 2) Lâminas e lamínulas;

3) Microscópio.

Material necessário (utilizando-se animais de laboratório):

- 1) Álcool a 70%;
- 2) Tesoura estéril;
- 3) Lâminas e lamínulas;
- 4) Microscópio.

Procedimento:

- a) Colocar uma pequena gota de sangue obtido por punção da polpa digital ou de sangue venoso coletado com anticoagulante, na extremidade de uma lâmina. No caso de animais de laboratório (camundongos ou ratos), retirar o sangue da cauda do animal infectado, fazendo um pequeno corte com tesoura estéril, após a assepsia do local com álcool a 70%, desprezando as primeiras duas ou três gotas de sangue;
- b) Com outra lâmina apoiada sobre a primeira em ângulo de 45°, fazer o sangue se espalhar por capilaridade, de forma que o ângulo entre as duas lâminas seja preenchido por sangue;
- c) Distender a gota deslocando a segunda lâmina sobre a primeira, de forma que todo o sangue seja distendido. No caso de coletas sem anticoagulantes (polpa digital, cauda de animais de laboratório), o esfregão deve ser feito rapidamente, em uma única direção, antes que o sangue comece a coagular;
- d) Secar a preparação rapidamente, para não deformar os parasitos, agitando-a ao ar. Fixar e corar.

OBS. 1: Esfregaços devidamente secos e protegidos apresentam boas condições por algumas semanas.

OBS. 2: Uma boa preparação em camada delgada deve ter:

- no mínimo 2 cm de comprimento;
- as margens livres em ambos os lados;

- após a coloração, os glóbulos vermelhos devem estar em camada única, uns ao lado dos outros, com as hemácias levemente coradas, o núcleo dos leucócitos corado em roxo-azulado e a imagem nítida e uniforme.

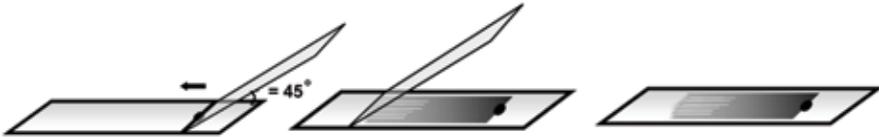


Figura 58. Esquema do procedimento de distensão delgada sanguínea (incorretamente conhecido como esfregão sanguíneo).

- **Distensão espessa (gota espessa)**

Vantagem: por utilizar maior quantidade de sangue em pequena área, a gota espessa propicia uma concentração vinte vezes maior do que a distensão delgada, sendo um método de boa sensibilidade nos casos de baixa parasitemia.

Material necessário:

- 1) Material para punção digital ou coleta de sangue venoso com anticoagulante;
- 2) Lâminas e lamínulas;
- 3) Palito ou ponteira;
- 4) Estufa (opcional);
- 5) Microscópio.

Material necessário (utilizando-se animais de laboratório):

- 1) Álcool a 70%;
- 2) Tesoura estéril;

- 3) Lâminas e lamínulas;
- 4) Microscópio.

Procedimento:

- a) Colocar quatro gotas pequenas de sangue obtido por punção da polpa digital ou de sangue venoso coletado com anticoagulante no centro de uma lâmina; as gotas devem estar posicionadas como se formassem as extremidades de um quadrilátero. No caso de animais de laboratório (camundongos ou ratos), retirar o sangue da cauda do animal infectado, fazendo um pequeno corte com tesoura estéril após a assepsia do local com álcool a 70%, desprezando as primeiras duas ou três gotas de sangue;
- b) Com o auxílio de um palito, ponteira ou outra lâmina, juntar as gotas com movimentos circulares em uma gota única. No caso das coletas sem anticoagulantes (polpa digital, cauda de animais de laboratório), a junção deve ser feita rapidamente, antes que o sangue comece a coagular;
- c) Secar a preparação rapidamente, para não deformar os parasitos, agitando-a ao ar. Nesse caso, pode-se utilizar também a estufa a 37°C;
- d) Mergulhar a lâmina em água destilada tamponada;
- e) Deixar em repouso para desemoglobinizar, por aproximadamente 10 minutos;
- f) Retirar, deixar secar e corar.

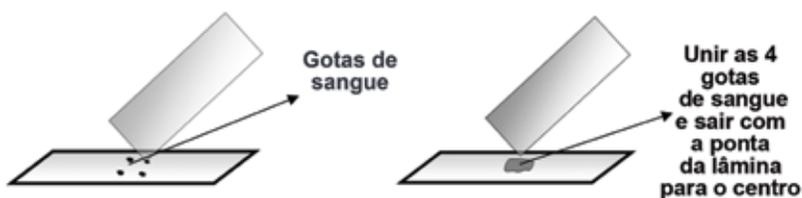


Figura 59. Esquema do procedimento de gota espessa de sangue.

8.1.2 Técnicas de concentração para recuperação de protozoários encontrados no sangue

8.1.2.1 Principais métodos de coloração empregados na pesquisa de parasitos sanguíneos ou teciduais

Geralmente são utilizados corantes derivados do Romanowsky, sendo o método de Giemsa o mais empregado.

- **Método de Giemsa comum**

Fundamento: coloração rápida que promove fixação do esfregaço sanguíneo pelo metanol e sua coloração pela solução de Giemsa.

Material necessário:

- 1) Preparado sanguíneo (esfregaço e/ou gota espessa);
- 2) Béquer 100 mL e proveta de 50-100 mL para diluição do Giemsa;
- 3) Água comum;
- 4) Pipeta Pasteur;
- 5) Suportes para lâminas;
- 6) Metanol (álcool metílico absoluto) ou May-Grünwald;
- 7) Solução aquosa de Giemsa;
- 8) Microscópio.

Procedimento:

- a) Fixar o preparado de sangue com álcool metílico por 5 a 10 minutos;
- b) Escorrer o álcool metílico e, sem lavar, deixar secar;
- c) Cobrir o esfregaço com solução diluída do Giemsa (3 gotas do corante para cada 2 mL de água da torneira), deixando agir durante 30 a 40 minutos;
- d) Lavar em água corrente e deixar secar ao ar;
- e) Observar no microscópio em objetiva de imersão.

- **Método de Giemsa (lento)**

Fundamento: coloração lenta que atinge os mesmos objetivos do método de Giemsa comum.

Material necessário:

- 1) Preparado sanguíneo (esfregaço e/ou gota espessa);
- 2) Béquer 100 mL e proveta de 50-100 mL para o preparo do Giemsa lento;
- 3) Água comum;
- 4) Pipeta Pasteur;
- 5) Suportes para lâminas;
- 6) Metanol (álcool metílico);
- 7) Solução de HCl a 5 N (opcional);
- 8) Solução de Giemsa lento;
- 9) Cuba de coloração;
- 10) Microscópio.

Procedimento:

- a) Fixar o preparado de sangue com metanol por 5 a 10 minutos;
- b) Escorrer o álcool metílico e deixar secar;
- c) Imergir as lâminas, por 15 minutos, em uma solução HCl a 5 N (opcional);
- d) Lavar com água corrente (fluxo delicado) e deixar secar;
- e) Corar o preparado com a solução de Giemsa lento (quantidade suficiente para uma cuba de coloração), deixando agir por 12 a 24 horas;
- f) Lavar rapidamente em água corrente e deixar secar ao ar;
- g) Observar no microscópio, em objetiva de imersão.

OBS.: A passagem pelo HCl é opcional, sendo particularmente indicada nas situações em que se deseje visualizar com clareza a posição relativa do núcleo e cinetoplasto. Não se aconselha aplicar essa etapa do protocolo quando a técnica for utilizada para corar esfregaços sanguíneos. Esse protocolo pode ser aplicado com essa etapa para a coloração de materiais provenientes de culturas de tripanossomatídeos.

- **Método de Giemsa (tamponado)**

Fundamento: coloração que promove uma fixação do esfregaço sanguíneo pelo formol tamponado a 5% (ou metanol) e a sua coloração pela solução tamponada de Giemsa.

Material necessário:

- 1) Preparado sanguíneo (esfregaço e/ou gota espessa);
- 2) Béquer 100 mL e proveta de 50-100 mL para diluição do Giemsa no tampão;
- 4) Água comum;
- 5) Pipeta Pasteur;
- 5) Suportes para lâminas;
- 6) Formol tamponado a 5% ou metanol (álcool metílico);
- 7) Solução de HCl a 5 N (opcional);
- 8) Solução tamponada de Giemsa;
- 9) Cuba de coloração;
- 10) Microscópio.

Procedimento:

- a) Fixar o preparado de sangue com formol tamponado a 5% por 5 minutos (ou metanol por 5 a 10 minutos);
- b) Escorrer o formol tamponado (ou o metanol) e deixar secar;
- c) Imergir as lâminas, por 10 minutos, em uma solução HCl a 5 N (opcional);

- d) Lavar bem com água corrente (fluxo delicado) (não deve ficar resíduo de HCl) e deixar secar;
- e) Corar o preparado com a solução tamponada de Giemsa, deixando agir por 45 minutos (em média);
- f) Lavar rapidamente em água corrente (fluxo delicado) e deixar secar ao ar;
- g) Observar no microscópio em objetiva de imersão.

OBS.: A passagem pelo HCl é opcional, sendo particularmente indicada nas situações em que se deseje visualizar com clareza a posição relativa do núcleo e cinetoplasto. Não se aconselha aplicar essa etapa do protocolo quando a técnica for utilizada para corar esfregaços sanguíneos. Esse protocolo pode ser aplicado com essa etapa para a coloração de materiais provenientes de culturas de tripanossomatídeos.

• Método de May-Grünwald–Giemsa

Fundamento: coloração que permite alcançar os mesmos objetivos do método de Giemsa, não necessitando de outro reagente fixador além do que já faz parte da solução corante (May-Grünwald).

Material necessário:

- 1) Preparado sanguíneo (esfregaço e/ou gota espessa);
- 2) Béquer 100 mL e proveta de 50-100 mL para diluição do Giemsa;
- 3) Água comum;
- 4) Pipeta Pasteur;
- 5) Suportes para lâminas;
- 6) Corante May-Grünwald;
- 7) Solução aquosa de Giemsa (3 gotas do corante para cada 2 mL de água);
- 8) Microscópio.

Procedimento:

- a) Cobrir o preparado de sangue com 20 gotas de May-Grünwald (o fixador faz parte do corante) por 3 minutos;
- b) Sem rejeitar o May-Grünwald, acrescentar 20 gotas de água destilada, deixando por 3 minutos;
- c) Desprezar a mistura e, sem lavar a lâmina, cobri-la com a solução de Giemsa diluída (3 gotas do corante para cada 2 mL de água), deixando agir por 20 a 30 minutos;
- d) Lavar rapidamente em água corrente e deixar secar ao ar;
- e) Observar no microscópio em objetiva de imersão.

b) Métodos indiretos

- **Hemocultura**

Fundamento: processo para multiplicação de protozoários parasitos do sangue em meio acelular; muito utilizado para cultivo de tripanossomatídeos em meio acelular.

Material necessário:

- 1) Material para coleta de sangue venoso com anticoagulante;
- 2) Tubos de ensaio;
- 3) Estante para tubos;
- 4) Pipetas de 1, 2 e 5 mL e pipetador;
- 5) Meio de cultura LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*);
- 6) Pipeta Pasteur;
- 7) Estufa;
- 8) Lâminas e lamínulas;
- 9) Microscópio.

Procedimento:

- a) Coletar cerca de 10 mL de sangue venoso do paciente suspeito com anticoagulante.
- b) Colocar alíquotas de 1 a 2 mL de sangue total em tubos contendo 5 mL de meio LIT
- c) Incubar a 28°C e examinar em microscópio a cada 15 dias durante 4 meses.

- **Xenodiagnóstico**

Xenodiagnóstico natural

Fundamento: processo biológico de diagnóstico baseado na suscetibilidade dos triatomíneos à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Esse método, introduzido por Brumpt em 1914, tem por base a multiplicação do *T. cruzi* no trato digestivo do triatomíneo e permite a sua detecção nas fezes ou na urina dos insetos alimentados com sangue do paciente ou de animais com suspeita de infecção, após um período que varia de 1 a 3 meses.

OBS.: O xenodiagnóstico é uma técnica perfeitamente aplicável para a pesquisa de campo e/ou o isolamento de amostras de *T. cruzi* de pacientes e/ou animais. Entretanto, sua utilização em pacientes pode ocasionar com certa frequência reações alérgicas, decorrentes da saliva dos triatomíneos, levando à rejeição do exame pelo paciente.

Material necessário:

- 1) Aproximadamente 5 a 6 ninfas “limpas” (criadas em laboratório com sangue de aves) de quarto ou quinto estágio de desenvolvimento; as ninfas devem estar em jejum alimentar de 20 a 30 dias;
- 2) Caixa de cartão tampada com pedaço de filó (ou tela);
- 3) Elástico;
- 4) Pinça de secção;

- 5) Lâminas e lamínulas;
- 6) Pipeta Pasteur;
- 7) Solução fisiológica;
- 8) Microscópio;
- 9) Homogeneizador;
- 10) Gaze;
- 11) Centrífuga;
- 12) Microscópio de fase;
- 13) Seringas e agulhas;
- 14) Álcool a 70%;
- 15) Animais de laboratório (camundongos ou ratos);
- 16) Material para a coloração pelo método de Giemsa tamponado.

Procedimento:

- a) Colocar as ninfas na caixa de cartão;
- b) Cobrir com filó e prender com elástico;
- c) Colocar em contato com a pele do paciente através do filó (em humanos, a caixa é aplicada no antebraço; em animais, deve-se escolher um local onde os pelos não dificultem a alimentação dos triatomíneos);
- d) Deixar de 30 a 60 minutos ou até que os barbeiros se desprendam depois de cheios;
- e) Após 30 dias do repasto sanguíneo, fazer exames periódicos das fezes do barbeiro, colhendo-as com o auxílio de pinça de secção do abdômen do inseto no sentido crânio caudal. As fezes expelidas, às que se adiciona uma gota de solução fisiológica, são examinadas em lâmina e lamínula, buscando-se formas flageladas móveis;
- f) Após seis semanas, caso os exames anteriores sejam negativos, trituram-se os triatomíneos em um homogeneizador, e o líquido obtido é filtrado em gaze, centrifugado durante 10 minutos a 2.500 rpm e seu sedimento examinado, entre lâmina e lamínula, em microscopia de fases. O restante cora-se pelo Giemsa e inocula-se em camundongos.

Xenodiagnóstico artificial

Fundamento: processo biológico de diagnóstico baseado na suscetibilidade dos triatomíneos à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Utilizado quando não se pode praticar o xenodiagnóstico natural e se objetiva pesquisar o *T. cruzi* em outros líquidos, como o cefalorraquidiano, que, misturado com o sangue, é sugado pelos triatomíneos.

Material necessário:

- 1) Frasco borrel contendo 10 mL de sangue citratado suspeito, com a boca recoberta por intestino de boi umedecido ou luva de látex presa com elástico;
- 2) Cuba de vidro para suporte;
- 3) Caixa de cartão tampada com pedaço de filó.

Procedimento:

- a) Colocar o frasco de borrel com o sangue em banho-maria a 37°C por 10 minutos;
- b) Colocar a caixa de cartão com as ninfas na cuba;
- c) Colocar o tubo de borrel invertido sobre a gaze, ficando a membrana em contato com a mesma;
- d) Colocar o conjunto em estufa a 37°C por 1 hora;
- e) Seguir os passos anteriores para o exame dos triatomíneos.

8.1.1.2 Exame de outros tecidos

Biópsia

Fundamento: remoção de amostra tecidual de determinado organismo vivo para o diagnóstico laboratorial.

A biópsia de tecido humano deve ser feita por médicos; o material biológico em animais pode ser retirado por técnicos especializados. O material

para biópsia de pele pode ser obtido, com o auxílio de lâmina de bisturi ou *punch* de 4 a 6 mm de diâmetro, após anestesia e assepsia do local. No caso das leishmanioses que apresentem múltiplas lesões, recomenda-se fortemente retirar o material de lesões mais recentes, uma vez que são mais ricas em parasitos. O fragmento de tecido obtido pode ser subdividido para procedimentos diversos – como histopatologia, preparação de esfregaços por aposição, semeadura em meio de cultura, inoculação em hamster. Vale salientar que amostras visando ao diagnóstico molecular devem ser fixadas em etanol a 70%, pois outras substâncias – por exemplo, o formol – podem inibir a reação da PCR.

Material necessário (utilizando-se animais de laboratório):

- 1) Animal de laboratório (camundongo, hamster ou rato) infectado e apresentando lesão;
- 2) Gaze;
- 3) Álcool iodado;
- 4) Lâmina de bisturi estéril;
- 5) Pinça dente de rato;
- 6) Xilocaína a 2%;
- 7) Solução fisiológica.

Procedimento utilizando-se animais de laboratório:

- a) Retirar todo o pelo que estiver em redor da lesão com auxílio de uma tesoura;
- b) Fazer assepsia da lesão e do seu entorno com gaze embebida em álcool 70%;
- c) Anestésiar o botão em torno da lesão com xilocaína a 2%;
- d) Escarificar a borda da lesão com auxílio de bisturi;
- e) Fixar a parte da região escarificada com a pinça e, com o bisturi, retirar um fragmento da borda da lesão, sem tocar na pele exposta para evitar contaminação;

- **Técnica do *imprint* e coloração**

Fundamento (coloração): evidenciação do parasito em tecido. A pesquisa do parasito requer experiência e paciência do microscopista devido à baixa parasitemia observada em infecções por *Leishmania spp.*

Material necessário (*imprint*):

- 1) Fragmento da lesão;
- 2) Pinça dente de rato;
- 3) Placas de Petri contendo solução salina estéril (NaCl 0,85%);
- 4) Papel-filtro;
- 5) Lâminas limpas e desengorduradas.

Material necessário (coloração de *imprint*):

- 1) Lâminas com *imprint* já secas;
- 2) Material para coloração pelo método de Giemsa tamponado ou método de Leishman;
- 3) Microscópio.

Procedimento:

- a) Com auxílio da pinça dente de rato, segurar um fragmento da lesão ou do órgão;
- b) Absorver o excesso de sangue em papel-filtro – recomenda-se a lavagem do fragmento de tecido em solução salina estéril (NaCl 0,85%) para remoção do excesso de sangue;
- c) Comprimir delicadamente o fragmento de três a quatro vezes em uma lâmina;
- d) Deixar secar em temperatura ambiente;
- e) Fixar por 3 minutos com metanol;
- f) Corar pelo método de Giemsa tamponado ou método de Leishman;
- g) Observar no microscópio em objetiva de imersão.

8.1.1.3 Histopatologia

Consiste na coleta de fragmento de tecido para processamento por meio de técnicas histológicas convencionais e coloração por hematoxilina eosina, Giemsa ou Grocott. A análise do material pode evidenciar, além dos amastigotas de *Leishmania*, outros patógenos, tais como certos fungos e bactérias, permitindo também um diagnóstico diferencial de outras patologias inflamatórias e/ou neoplasias.⁵⁰

- **Cultura para o isolamento de protozoários: *Leishmania* sp:**

Fundamento: processo de diagnóstico baseado na multiplicação *in vitro* de *Leishmania* sp. A cultura para o isolamento de *Leishmania* sp pode ser realizada a partir de fragmento de tecido retirado na biópsia do bordo da lesão, semeado em meio LIT, NNN (ágar-sangue)+LIT ou Schneider. A coleta do material pode ser feita por meio da aspiração de material da lesão utilizando-se uma seringa de 5 mL com agulha de 25 mm x 8 mm, introduzindo-se, após assepsia e anestesia local, a agulha no bordo da lesão e injetando-se de 1 a 3 mL de solução salina estéril; é possível aspirar o material, que pode ser semeado em meio de cultura, por meio de movimentos rotacionais.

- **Leishmaniose visceral**

Na leishmaniose visceral o agente etiológico é a *Leishmania chagasi*, demonstrada em amostras de tecido obtidas por punção de vísceras (baço, fígado e medula óssea). A biópsia de baço e fígado é procedimento de elevado risco e só deve ser realizada em condições especiais. Por causa da maior simplicidade e do menor risco para o paciente, utiliza-se preferentemente material de medula óssea coletado por punção do esterno, tíbia ou da crista ilíaca, sendo o material dessa última preferencial em adultos. Com o material coletado, devem ser feitos esfregaços corados pelo Giemsa, semeadura em meio de cultura NNN+LIT, inoculação em hamster e, se possível, esfregaços

⁵⁰ Ver o capítulo “Técnicas histológicas”, no volume 2 desta coleção.

sobre papel Whatman nº 1 esterilizado ou papel de nitrocelulose, visando-se ao diagnóstico por PCR. A cultura deve apresentar positividade após um período de 4 a 5 semanas; os repiques das culturas devem ser feitos semanalmente. A inoculação de animais, embora não tenha aplicação prática para fins de diagnóstico imediato, pode ser útil para o isolamento do parasito visando à sua caracterização e aos estudos epidemiológicos.

- **Repicagem de culturas**

Fundamento: permite fornecer as condições ideais para o metabolismo dos parasitos por meio da passagem dos protozoários para um meio de cultura novo. A frequência de repique irá variar de acordo com o parasito em questão.

Material necessário:

- 1) Pipetas estéreis de 1 mL ou pipeta Pasteur;
- 2) Tubos com meio de cultura (NNN, LIT, NNN+LIT, entre outras.);
- 3) Tubos de cultura contendo parasitos.

Procedimento:

Com uma pipeta estéril, transferir parte do material do meio de cultura “velho” contendo parasitos para novos tubos, com meio de cultura novo (o ideal é que cada cultura “velha” forneça material para 2 a 4 novos tubos com cultura “nova”).

OBS.: Para culturas que aparentem parasitos mortos, deve-se fazer a observação de uma gota das mesmas (entre lâmina e lamínula) em microscópio. A presença de alguma forma parasitária em movimento indicará a possibilidade de se fazer um repique para um meio de cultura novo.

- **Exame direto a fresco de meio de cultura**

Material necessário:

- 1) Tubo contendo cultura de parasitos;
- 2) Lâminas e lamínulas;
- 3) Pipetas Pasteur;
- 4) Pera de borracha;
- 5) Microscópio.

Procedimento:

- a) Com uma pipeta Pasteur, retirar o material do caldo de condensação do meio de cultura (NNN, NNN+LIT, entre outros);
- b) Aplicar duas pequenas gotas do material sobre a lâmina;
- c) Cobrir com lamínula;
- d) Observar em microscópio óptico.

- **Coloração de material retirado de meio de cultura**

Pode-se realizar o método de May-Grünwald–Giemsa ou o método de Giemsa (comum).

Material necessário:

- 1) Tubo contendo cultura de parasitos;
- 2) Lâminas e lamínulas;
- 3) Pipetas Pasteur;
- 4) Pera de borracha;
- 5) Soro humano;
- 6) Microscópio.

Procedimento:

- a) Com uma pipeta Pasteur, retirar o sedimento do meio de cultura e aplicar duas pequenas gotas do material sobre uma lâmina;
- b) Acrescentar uma gota de soro humano;
- c) Misturar;

- d) Deixar secar ao ar;
- e) Corar pelo método de May-Grünwald–Giemsa ou método de Giemsa (comum);
- f) Observar no microscópio em objetiva de imersão.

- **Exame direto a fresco de exsudatos**

Material necessário:

- 1) Lâminas e lamínulas;
- 2) Seringa contendo exsudato;
- 3) Microscópio.

Procedimento:

- a) Colocar o material retirado por punção intraperitoneal diretamente da seringa na lâmina (uma gota);
- b) Cobrir com lamínula;
- c) Observar em microscópio.

- **Coloração de material retirado de exsudato**

Material necessário:

- 1) Seringa contendo exsudato;
- 2) Lâminas e lamínulas;
- 3) Pipetas Pasteur;
- 4) Pera de borracha;
- 5) Soro humano;
- 6) Microscópio.

Procedimento:

- a) Colocar duas pequenas gotas do material de exsudato sobre a lâmina;
- b) Acrescentar uma gota de soro humano;
- c) Misturar, fazendo um esfregaço denso;
- d) Deixar secar ao ar;

- e) Corar pelo método de May-Grünwald–Giemsa ou pelo método de Giemsa (comum);
- f) Observar no microscópio em objetiva de imersão.

- **Criopreservação de tripanossomatídeos**

Fundamento: técnica que permite a manutenção e a preservação de tripanossomatídeos em baixas temperaturas, retardando-se o metabolismo celular, porém mantendo-se a viabilidade das células por anos.

Material necessário:

- 1) Tubos de criopreservação;
- 2) Glicerol estéril;
- 3) Cultura de parasitos ou sangue infectado;
- 4) Gelo picado;
- 5) Gelo seco ou freezer -70°C ;
- 6) Botijão de nitrogênio líquido;
- 7) Meio de cultura novo;
- 8) Animais de laboratório (geralmente usam-se camundongos).

Procedimento para o congelamento:

- a) Obter uma cultura em fase exponencial de crescimento ou sangue infectado;
- b) Acrescentar 10% de glicerol e homogeneizar;
- c) Aliquotar 1 mL para cada tubo de criopreservação;
- d) Colocar os tubos de criopreservação em banho de gelo por 30 minutos;
- e) Colocar os tubos de criopreservação no congelador por 1 hora ou o tempo suficiente para congelar;
- f) Colocar os tubos de criopreservação a -70°C por 45 minutos ou por uma noite;
- g) Colocar os tubos de criopreservação diretamente no interior do botijão contendo nitrogênio líquido (N_2).

Procedimento para o descongelamento:

- a) Retirar os tubos de criopreservação contendo os parasitos congelados do interior do botijão de nitrogênio líquido, deixando-os em temperatura ambiente para descongelamento total da amostra;
- b) Transferir os parasitos para os meios de cultura (no caso de sangue, inocular em animal susceptível).

• Quantificação celular – avaliação quantitativa de tripomastigotas sanguícolas de *Trypanosoma* sp em câmara de Neubauer

Fundamento: técnica que possibilita a quantificação celular (parasitos), necessária para a realização de inóculos precisos de protozoários em animais de laboratório ou para cultura de células.

• Método de Hoff (1974)

Material necessário:

- 1) Câmara de Neubauer (ou hemocitômetro de Neubauer);
- 2) Cloreto de amônio a 0,87%;
- 3) Tubos de ensaio pequenos;
- 4) Tesoura;
- 5) Caixa de contenção para o animal a ser sangrado;
- 6) Contador de células;
- 7) Câmaras úmidas;
- 8) Pipetadores, ponteiras e pipeta de hemoglobina previamente marcada em 5 μL .

Procedimento:

- a) Colher 5 μL de sangue do animal e diluir a 1:10 ou 1:20 em cloreto de amônio a 0,87%;
- b) Deixar hemolisar por 2 minutos;
- c) Homogeneizar e colher uma amostra para preencher uma das lacunas da câmara de Neubauer;

d) Após cerca de 2 minutos em câmara úmida, levar ao microscópio (objetiva de 40X) e contar os parasitos presentes nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer (os mesmos quadrantes utilizados para a contagem de glóbulos brancos);

e) Dividir por 4 o resultado obtido na contagem de parasitos somando-se os quatro quadrantes contados. Obtém-se com isso uma média do número de parasitos encontrados em $0,1 \mu\text{L}$; multiplica-se essa média pelo resultado da divisão por 10, obtendo-se o valor por μL , e, em seguida, multiplica-se o resultado pelo fator de diluição e depois por 1.000, para só assim obter-se o valor de parasitos por mL.

Fórmula do processo resumido

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de parasitos encontrados}}{4} \times \text{diluição realizada} \times 10^4 = \text{n}^\circ \text{ parasitos por mL}$$

OBS.: Ao contar os protozoários, deve-se levar em conta as células que estão nas quatro grades laterais sobre as linhas à esquerda e no lado superior (inclusive as que estão sobre a linha de fronteira) e desconsiderar as que estão sobre as linhas à direita e inferior.

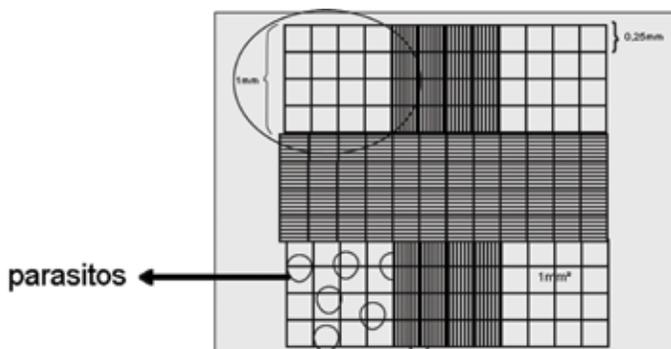


Figura 58. Desenho esquemático de um hemocitômetro, ou câmara de Neubauer.

- **Preparo de *Toxoplasma gondii* para infecção de células**

Fundamento: permite a obtenção de parasitos por meio de lavado peritoneal de camundongos (*Mus musculus*), previamente inoculados com taquizoítas de *T. gondii*, para a posterior infecção de células em cultura.

Material necessário:

- 1) Camundongos previamente infectados com taquizoítas de *T. gondii*;
- 2) Câmara de sacrifício (CO_2);
- 3) Prancha de dissecação;
- 4) Pinças dente de rato;
- 5) Alfinetes;
- 6) Seringas de 3, 5 e 10 mL estéreis;
- 7) Agulhas 25x10 ou 25x6 estéreis;
- 8) Tubo Falcon de 15 mL;
- 9) Centrífuga;
- 10) Meio de cultura RPMI estéril, contendo 200 U de penicilina e 200 μg de estreptomicina por mL;
- 11) Formol a 2% em PBS;
- 12) Tubos tipo Eppendorf;

- 13) Câmara de Neubauer;
- 14) Pipetadores, pipetas e ponteiras;
- 15) Meio RPMI estéril contendo 2% de soro fetal bovino;
- 16) Microscópio.

Procedimento:

- a) Realizar o lavado peritoneal dos camundongos infectados;
- b) Centrifugar o exsudato proveniente do lavado peritoneal a 500 rpm durante 5 minutos para retirar as células do hospedeiro;
- c) Retirar o sobrenadante rico em taquizoítas de *T. gondii* e centrifugar a 2.000 rpm por 10 minutos;
- d) Ressuspender o sedimento em volume conhecido de meio RPMI estéril contendo 200 U de penicilina e 200 μ g de estreptomicina por mL;
- e) Diluir a suspensão 1:10 em formol a 2% em PBS e contar em câmara de Neubauer (colocar 90 μ L de formol a 2% em um tubo tipo Eppendorf e adicionar 10 μ L da suspensão de taquizoítas, como descrito anteriormente);
- f) Ajustar o número de macrófagos para cinco vezes em meio RPMI estéril contendo 2% de soro fetal bovino;
- g) Infectar a cultura de macrófagos com os taquizoítas, deixando interagir por 2 horas;
- h) Retirar as lamínulas e corá-las pelo método de Giemsa (comum);
- i) Observar ao microscópio em objetiva de imersão.

- **Método de Giemsa para coloração de células infectadas**

Material necessário:

- 1) Lamínulas contendo macrófagos infectados;
- 2) Água destilada;
- 3) Glutaraldeído a 2% em PBS;
- 4) Geladeira;

- 5) Corante Giemsa Merck a 5% em água bidestilada;
- 6) PBS;
- 7) Acetona;
- 8) Acetona-xilol;
- 9) Xilol;
- 10) Bálsamo do Canadá;
- 11) Microscópio.

Procedimento:

- a) Rinsar a lamínula com PBS;
- b) Fixar 2 minutos ou mais em glutaraldeído a 2% em PBS;
- c) Remover o glutaraldeído de volta para o frasco e colocar na geladeira;
- d) Rinsar duas vezes a lamínula com água destilada;
- e) Corar por 40 minutos com o corante Giemsa a 5%, em água bidestilada;
- f) Descorar duas vezes durante 5 minutos cada com PBS;
- g) Rinsar com água destilada;
- h) Desidratar com acetona;
- i) Desidratar com acetona-xilol em partes iguais;
- j) Desidratar duas vezes em xilol;
- l) Montar em bálsamo do Canadá;
- m) Observar no microscópio em objetiva de imersão.

• **Método de Giemsa rápido para coloração de células infectadas**

Material necessário:

- 1) Lamínulas contendo macrófagos infectados;
- 2) Água destilada;
- 3) PBS;
- 4) Metanol;
- 5) Solução aquosa de Giemsa (1:10 em água destilada);
- 6) Bálsamo neutro;
- 7) Microscópio.

Procedimento:

- a) Rinsar as lamínulas em PBS a 37°C;
- b) Fixar em metanol por 3 minutos;
- c) Corar o material com o corante Giemsa (1:10 em água destilada) por 12 minutos;
- d) Lavar rapidamente em água corrente e deixar secar ao ar;
- e) Montar em bálsamo neutro;
- f) Observar no microscópio em objetiva de imersão.

- **Reação de imunofluorescência indireta (Rifi) para a infecção por *Toxoplasma gondii***

Fundamento: método imunológico bastante aplicado no diagnóstico de infecções parasitárias, sobretudo para infecções por *T. gondii*, e que se baseia na detecção da reação antígeno–anticorpo, revelada pelo emprego de um conjugado – antianticorpo marcado com um fluorocromo que emite fluorescência mediante a excitação com raios ultravioleta –, observada em microscópio de fluorescência (vide volume 4).

- **Manutenção de cepas “não cistogênicas” de *Toxoplasma gondii* em camundongos (*Mus Musculus*) da linhagem Swiss Webster**

Fundamento: procedimento que permite a manutenção *in vivo* de cepas de *T. gondii* em animais (camundongos) de laboratórios de pesquisa.

Material necessário:

- 1) Três a quatro camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem Swiss Webster;
- 2) Seringa de 1 mL;
- 3) Agulha de insulina;
- 4) PBS pH 7,2;
- 5) Álcool a 70%;

- 6) Gaze;
- 7) Prancha de dissecação;
- 8) Tubo tipo Falcon 15 mL;
- 9) Câmara de Neubauer (ou hemocitômetro de Neubauer);
- 10) Contador de células;
- 11) Pipetadores de 10, 100 e 1.000 μL e ponteiras;
- 12) Tubos tipo Eppendorf.

Procedimento:

- a) Inocular três a quatro camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem Swiss Webster com $1,5 \times 10^6$ taquizoítas cada;
- b) Após 72 horas, realizar a lavagem peritoneal de cada um dos camundongos para a retirada dos taquizoítas de *T. gondii*;
- c) Transferir o lavado peritoneal em tubo cônico de 15 mL;
- d) Colocar 90 μL de PBS em dois tubos cônicos de 1,5 mL;
- e) Colocar 10 μL do exsudato no primeiro cônico de 1,5 mL e homogeneizar;
- f) Colocar 10 μL da diluição do primeiro cônico de 1,5 mL no segundo cônico de 1,5 mL e homogeneizar;
- g) Utilizar a diluição do segundo cônico de 1,5 mL para realizar a contagem dos parasitos na câmara de Neubauer;
- h) Após cerca de 2 minutos em câmara úmida, levar ao microscópio (objetiva de 40X) e contar os parasitos presentes nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer (os mesmos quadrantes utilizados para a contagem de glóbulos brancos);
- i) Dividir por 4 o resultado obtido na contagem de parasitos somados nos quatro quadrantes contados. Obtém-se, assim, uma média do número de parasitos encontrados em 0,1 μL . Segue-se multiplicando o resultado da divisão por 10 (obtém-se o valor por μL), multiplicando-se, em seguida, tanto pelo fator de diluição quanto por 1.000, para só assim obter o valor de parasitos por mL.

- j) Ajustar para $1,5 \times 10^6$ parasitos por $200 \mu\text{L}$ de PBS.
- k) Realizar o inóculo de $1,5 \times 10^6$ parasitos por camundongo normal (não infectado);
- l) Após 72 horas, realizar a lavagem peritoneal de cada camundongo para a retirada dos taquizoítas de *T. gondii*.

• **Criopreservação de taquizoítas de *Toxoplasma gondii* por meio do congelamento de macrófagos infectados**

Material necessário:

- 1) Sete a nove camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem Swiss Webster;
- 2) Seringa de 1 mL;
- 3) Agulha de insulina;
- 4) PBS pH 7,2;
- 6) Álcool a 70%;
- 7) Gaze;
- 8) Prancha de dissecação;
- 9) Tubo cônico de 15 mL;
- 10) Centrífuga;
- 11) Câmara de Neubauer (ou hemocítômetro de Neubauer);
- 12) Contador de células;
- 13) Pipetadores de 10, 100 e $1.000 \mu\text{L}$ e ponteiras;
- 14) Tubos cônicos de 1,5 mL;
- 15) Meio Eagle ou RPMI simples;
- 16) Meio de congelamento (meio Eagle ou RPMI com 10% de DMSO e 20% de soro fetal bovino);
- 17) Tubos de criopreservação;
- 18) Geladeira;
- 19) Freezer -70°C ;
- 19) Botijão de nitrogênio líquido;
- 20) Banho-maria.

Procedimento para o congelamento:

- a) Inocular três a quatro camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem Swiss Webster com $1,5 \times 10^6$ taquizoítas cada;
- b) Após 48 horas, realizar três lavagens peritoneais de cada animal para a remoção de macrófagos infectados com taquizoítas de *T. gondii*;
- c) Realizar contagem dos macrófagos em câmara de Neubauer;
- d) Colocar os exsudatos em tubos cônicos de 15 mL e centrifugar a 1.200 rpm por 10 minutos;
- e) Descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em meio de congelamento – meio Eagle com 10% de DMSO e 20% de soro fetal bovino –, de forma a obter $1,0 \times 10^6$ células para cada mL de meio;
- f) Distribuir 1,5 mL da suspensão celular em tubos de criopreservação estéreis e já identificados;
- g) Colocar os tubos em geladeira a 4°C por 20 minutos;
- h) Deixar durante a noite em freezer a -70°C;
- i) Colocar os tubos de criopreservação diretamente no interior do botijão contendo nitrogênio líquido.

Procedimento para o descongelamento:

- a) Retirar os tubos de criopreservação contendo as células infectadas congeladas do interior do botijão de nitrogênio líquido, colocando-os em banho-maria a 37°C para descongelamento total;
- b) Transferir os conteúdos descongelados para tubos cônicos de 15 mL, adicionando um volume cinco vezes maior do que o volume do material descongelado de meio Eagle simples;
- c) centrifugar a 1.200 rpm por 10 minutos;
- d) Descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em meio Eagle simples;
- e) Inocular quatro a cinco camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem Swiss Webster não infectados com inóculo variado;
- f) Acompanhar a evolução da infecção, observando o aparecimento de manifestações clínicas nos animais;

- g) Realizar a eutanásia dos animais de 48 a 72 horas após o inóculo, promovendo a lavagem da cavidade peritoneal, recuperando-se o exsudato com taquizoítas (confirmação da viabilidade dos taquizoítas de *T. gondii* após a criopreservação);
- h) Realizar a contagem em câmara de Neubauer e seguir promovendo nova passagem dos parasitos em animais de laboratório (camundongos) susceptíveis.

9. Técnicas parasitológicas para as fezes

9.1 Coleta de fezes para exame parasitológico

A coleta de fezes tem recomendações especiais, segundo as finalidades do exame a que se destinam. Alguns cuidados gerais devem ser observados:

- deve-se dar preferência a frasco de plástico ou de vidro, limpo, de boca larga, com tampa de fácil manuseio e que vede bem;
- as fezes não devem ser coletadas junto com urina, água ou outro elemento. A presença de urina acelera a fermentação bacteriana, prejudicando a conservação do material;
- as fezes não devem permanecer muito tempo em temperatura ambiente, sendo conveniente enviá-las ao laboratório o mais breve possível, ou conservar em geladeira a 4°C por 24 horas no máximo;
- pacientes submetidos a exame radiológico de trânsito intestinal só devem coletar material para o exame de fezes após a eliminação total do contraste – o que ocorre, em geral, 48 horas após a sua ingestão;
- fezes pastosas são utilizadas na pesquisa de ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários pelos métodos de rotina em parasitologia; fezes líquidas (diarreicas) devem ser coletadas em soluções conservadoras para possibilitar a pesquisa de trofozoítas de protozoários intestinais ou de

oocistos de coccídeos intestinais por métodos especiais, como a coloração por hematoxilina férrica ou safranina-azul de metileno, entre outros. Os conservadores mais utilizados são o formol a 10% e a solução SAF (ácido acético, acetato de sódio e formol).

9.2 Principais técnicas coproparasitológicas

- **Exame direto a fresco**

Fundamento: exame direto das fezes líquidas (diarreicas), obtidas naturalmente ou pelo emprego de purgativos salinos. É muito valioso para a pesquisa de trofozoítas de protozoários. A estrutura e, particularmente, a mobilidade dos trofozoítas possibilitam o diagnóstico específico.

- **Exame direto de fezes com coloração pelo lugol**

Material necessário:

- 1) Amostras de fezes;
- 2) Solução salina (NaCl 0,85%);
- 3) Lugol;
- 4) Frasco de borrel;
- 5) Bastão de vidro (ou palito);
- 6) Pipeta Pasteur;
- 7) Lâminas e lamínulas;
- 8) Microscópio óptico.

Procedimento:

- a) Desmanchar uma porção das fezes em uma parte de solução salina (NaCl 0,85%), utilizando um frasco de borrel e um bastão de vidro ou palito;
- b) Retirar uma parte da mistura com auxílio de uma pipeta Pasteur e depositar de 1 a 2 gotas do material sobre uma lâmina;

- c) Adicionar de 1 a 2 gotas de lugol sobre o material da lâmina, misturando com o auxílio de uma lamínula;
- d) Cobrir com lamínula e examinar no microscópio óptico (objetivas de 10X e 40X).

• **Técnica de hematoxilina férrica para coloração de protozoários (Heidenhain, 1908)**

Fundamento: método de coloração que permite a observação de estruturas nucleares (a hematoxilina cora com grande especificidade a cromatina nuclear), sendo de grande valia para o diagnóstico diferencial das espécies de protozoários enteroparasitos, notadamente das formas vegetativas (trofozoítas). Indicada no exame de material diarreico, pode ser utilizada também para a pesquisa de cistos em fezes pastosas ou moldadas.

Material necessário (fixação):

- 1) Amostras de fezes conservadas no fixador de Schaudinn;
- 2) Conservador-fixador de Schaudinn novo com 5% de ácido acético (ou conservador-fixador SAF);
- 3) Soro inativado;
- 4) Banho-maria;
- 5) Suporte (rolha) de borracha;
- 6) Pinça;
- 7) Gaze;
- 8) Funil pequeno;
- 9) Lugol;
- 10) Bastão de vidro (ou palito);
- 11) Pipeta Pasteur;
- 12) Lâminas e lamínulas;
- 13) Placas de Petri contendo as seguintes soluções: fixador de Schaudinn com 5% de ácido acético, álcool a 50%, álcool a 70%, álcool a 70% iodado, álcool a 90%, álcool a 95%, hematoxilina a 0,5%, creosoto e xilol;

- 14) Duas placas de Petri com solução de alumínio férrico a 2%;
- 15) Centrífuga;
- 16) Bálsamo do Canadá;
- 17) Microscópio óptico.

Procedimento (fixação):

- a) Homogeneizar por agitação as amostras de fezes fixadas e conservadas em fixador de Schaudinn;
- b) Filtrar, através de gaze dobrada quatro vezes, para tubo de centrifugação de 15 mL, com auxílio de um pequeno funil, cerca de 4 mL da mistura de fezes;
- c) Centrifugar durante 2 minutos a 2.000 rpm;
- d) Desprezar o sobrenadante;
- e) Colocar uma lamínula (22 mm x 22 mm), presa por uma das bordas, em um suporte de borracha (com forma circular de 15 mm de diâmetro e 3 mm de espessura). Prendê-la, encaixando-a num entalhe que se faz, com auxílio de um bisturi, na face plana do suporte;
- f) Colocar uma gota de sedimento sobre a lamínula, aderindo-a por meio da mistura do sedimento com três gotas de soro sanguíneo, inativado em banho-maria a 56°C por 30 minutos;
- g) Emulsionar o material fazendo um esfregaço (camada fina) com o auxílio de outra lamínula;
- h) Sem deixar o esfregaço secar, colocar a lamínula, com a face que o contém virada para baixo, no interior de uma placa de Petri contendo novo líquido fixador de Schaudinn com 5% de ácido acético. Manter na placa por 2 a 5 minutos;
- i) Colocar a lamínula com o esfregaço em uma placa contendo álcool a 50%. Nessa etapa, inverter a posição da lamínula, colocando-a com a face contendo o esfregaço voltada para cima. Manter na placa por 2 a 5 minutos;
- j) Imergir o esfregaço em álcool a 70% iodado, deixando por 3 minutos.

Procedimento (coloração):

- a) Imergir o esfregaço em álcool a 95% para hidratação, deixando por 2 minutos;
- b) Imergir o esfregaço em álcool a 70% para hidratação, deixando por 2 minutos;
- c) Imergir o esfregaço em álcool a 50% para hidratação, deixando por 2 minutos;
- d) Lavar em água corrente (filete delicado) por 2 a 3 minutos;
- e) Imergir o esfregaço em solução de alúmen férrico (mordente) a 2%, deixando por 5 minutos;
- f) Lavar em água corrente (filete delicado) por 1 a 2 minutos;
- g) Imergir o esfregaço em solução aquosa do corante hematoxilina a 0,5%, deixando por 5 minutos;
- h) Lavar em água corrente (filete delicado) por 1 a 2 minutos;
- i) Imergir o esfregaço em solução aquosa de ácido acético a 7%, deixando por 5 minutos;
- j) Lavar em água corrente (filete delicado) por 2 minutos;
- k) Imergir o esfregaço em solução diferenciadora de alúmen férrico a 2%, deixando pelo tempo necessário (curto espaço de tempo) até que o esfregaço obtenha uma cor cinzento-azulada claro;
- l) Realizar duas lavagens em água corrente (filete delicado) por 3 minutos;
- m) Imergir o esfregaço em álcool a 50% para iniciar a desidratação, deixando por 2 minutos;
- n) Imergir o esfregaço em álcool a 70% para desidratação, deixando por 2 minutos;
- o) Imergir o esfregaço em álcool a 90% para desidratação, deixando por 2 minutos;
- p) Imergir o esfregaço em álcool a 95% (absoluto) para desidratação, deixando por 2 minutos;
- q) Imergir o esfregaço em creosoto (pode ser ligeiramente aquecido) iniciando a clarificação do material, deixando por 2 minutos;

- r) Imergir o esfregaço em xilol para clarificação, deixando por 2 minutos;
- s) Realizar a montagem em bálsamo do Canadá, sobre lâminas, deixando secar por 24 a 48 horas, para que a lamínula não corra o risco de soltar da lâmina, obtendo-se assim preparações permanentes;
- t) Observar no microscópio em objetiva de imersão.

Obs 1: O suporte de borracha tem a finalidade de facilitar a manipulação do material durante as diferentes etapas de fixação e coloração, além de permitir a identificação do mesmo mediante a gravação de um número em uma das faces da borracha. Deve-se evitar a troca de material quando amostras de diferentes procedências estão sendo processadas.

Obs 2: Utilizar uma pequena pinça para movimentação do suporte de borracha entre as placas.

Obs 3: A solução aquosa de hematoxilina a 0,5% deve ser preparada para uso, no mínimo, com 48 horas de antecedência.

Obs 4: Quando for necessária a observação dos esfregaços, eles devem estar úmidos durante todas as etapas de fixação, coloração e montagem final. Os esfregaços secos ou intensamente hidratados devem ser desprezados.

- **Técnica de Blagg e cols. (1955), ou centrifugo-sedimentação em éter**

Fundamento: fixação e preservação da matéria fecal pela solução de Sapero e Lawless (1953) (solução de MIF), modificada por Coutinho (1956). Concentração, por centrifugo-sedimentação, dos ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários em um sistema formol-éter.

Material necessário:

- 1) Amostras de fezes;
- 2) Bastão de vidro;

- 3) Palito com algodão na ponta;
- 4) Rolha de borracha;
- 5) Gaze;
- 6) Funil pequeno;
- 7) Tubos de centrifugação de 15 mL;
- 8) Éter comercial;
- 9) Lugol;
- 10) Lâminas e lamínulas;
- 11) Pipeta Pasteur;
- 12) Centrífuga;
- 13) Microscópio óptico.

Procedimento:

- a) Homogeneizar as amostras de fezes em MIF por agitação;
- b) Filtrar, através de gaze dobrada em quatro, com auxílio de um pequeno funil, para tubo de centrifugação de 15 mL (o volume não deve ultrapassar 1/3 da capacidade);
- c) Dobrar o volume do filtrado, adicionando éter;
- d) Fechar o tubo com rolha de borracha e agitar vigorosamente;
- e) Retirar cuidadosamente a rolha e centrifugar a 2.500 rpm durante 1 minuto;
- f) Desprezar o sobrenadante;
- g) Adicionar duas gotas de lugol ao sedimento e agitar;
- h) Transferir uma pequena parte do material, com o auxílio de pipeta Pasteur, para a lâmina e cobrir com lamínula;
- i) Observar no microscópio em objetiva de 10X e de 40X

Obs 1.: É preciso ressaltar que o uso de conservantes MIF (mercurocroc ou mertiolate + iodo + formol) apresenta duas grandes vantagens: a obtenção de amostra média do material eliminado por um mesmo indivíduo durante certo período; e a possibilidade de aplicação em inquéritos parasitológicos, sobretudo quando há acúmulo de material a ser processado.

OBS 2.: Os cuidados exigidos para a execução da técnica são os mesmos aplicados no método de Ritchie

• **Técnica de Ritchie, ou centrifugo-sedimentação em formol-éter**

Fundamento: método de diagnóstico parasitológico das fezes; excelente para a pesquisa de cistos de protozoários baseando-se na concentração das fezes por centrifugo-sedimentação em um sistema formol-éter.

Material necessário:

- 1) Amostras de fezes;
- 2) Bastão de vidro;
- 3) Palito com algodão na ponta;
- 4) Béquer ou borrel;
- 5) Rolha de borracha;
- 6) Gaze;
- 7) Pequeno funil;
- 8) Tubos de centrifugação de 15 mL;
- 9) Éter comercial;
- 10) Lugol;
- 11) Formol comercial a 10%;
- 12) Lâminas e lamínulas;
- 13) Pipeta Pasteur;
- 14) Centrífuga;
- 15) Microscópio óptico.

Procedimento:

- a) Misturar, em um béquer ou borrel, uma porção das fezes em 10 partes de água;
- b) Filtrar, através de uma gaze dobrada quatro vezes, com auxílio de um pequeno funil, para tubo de centrifugação de 15 mL;

- c) Centrifugar por 1 minuto a 2.500 rpm;
- d) Decantar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em água;
- e) Centrifugar por 1 minuto a 2.500 rpm;
- f) Decantar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 10 mL da solução de formol comercial a 10%;
- g) Agitar vigorosamente e deixar em repouso por 5 minutos;
- h) Juntar 3 mL de éter comercial a esse preparo;
- i) Fechar o tubo com rolha de borracha e agitar vigorosamente para emulsionar as gorduras fecais;
- j) Centrifugar por 1 minuto a 2.500 rpm;
- k) Retirar cuidadosamente a rolha e desprezar a mistura sobrenadante;
- l) Limpar os detritos superficiais da parede do tubo com um palito contendo algodão na ponta;
- m) Adicionar duas gotas de lugol ao sedimento e agitar;
- n) Transferir uma pequena parte do material, com o auxílio de pipeta Pasteur, para a lâmina e cobrir com lamínula;
- o) Observar no microscópio em objetiva de 10X e de 40X.

Obs: Como resultado da última centrifugação, formam-se no tubo quatro camadas: a superior, de éter; a segunda de gordura; a terceira, de solução de formol; e a última, inferior, constituída pelo sedimento a ser examinado. Por vezes, a camada gordurosa é tão compacta que, para se efetuar a decantação, é necessário desprendê-la com um pequeno bastão. Caso após a decantação a parede do tubo apresente resíduos, é conveniente limpá-la com um palitito de algodão para que o sedimento, ressuspenso em lugol possa ser transferido livremente para a lâmina.

- **Técnica de Hoffmann, Pons & Janer (1934) ou de Lutz, ou sedimentação espontânea**

Fundamento: método muito eficiente de diagnóstico parasitológico das fezes, sendo método de eleição para ovos de *Schistosoma mansoni*, *Ascaris*

lumbricoides e *Taenia* sp, baseando-se na sedimentação espontânea de ovos e larvas de helmintos e de cistos de protozoários em água potável, associada à ação da gravidade.

Material necessário:

- 1) Amostras de fezes;
- 2) Bastão de vidro;
- 3) Cálice cônico de 100 mL;
- 4) Béquer ou borrel;
- 5) Gaze;
- 6) Funil pequeno;
- 7) Água;
- 8) Lugol;
- 9) Lâminas e lamínulas;
- 10) Pipeta Pasteur;
- 11) Microscópio óptico.

Procedimento:

- a) Adicionar cerca de 2 g de fezes em um béquer ou borrel contendo água e homogeneizar o material com o auxílio de um bastão de vidro;
- b) Filtrar, através de uma gaze dobrada quatro vezes, com auxílio de um pequeno funil, para o cálice cônico de 100 mL;
- c) Deixar a suspensão de fezes em repouso durante 1 a 24 horas;
- d) Após esse período, decantar o sobrenadante cuidadosamente, para não ressuspender o sedimento; caso o líquido sobrenadante ainda esteja turvo, fazer nova lavagem, com mais 1 hora de repouso;
- e) Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, recolher pequena parte do sedimento, transferindo-a para uma lâmina;
- f) Adicionar uma gota de lugol sobre o material, cobrindo-o com lamínula;
- g) Observar no microscópio em objetiva de 10X e de 40X.

• **Técnica de Faust e cols. (1938) ou centrifugo-flutuação em sulfato de zinco a 33% – densidade de 1.180 g/L**

Fundamento: método de diagnóstico parasitológico das fezes, utilizado para pesquisa de protozooses intestinais especialmente em suas fases crônicas, baseando-se na concentração dos cistos de protozoários por centrifugo-flutuação, em uma solução de sulfato de zinco a 33%, com densidade de 1.180 g/L.

Material necessário:

- a) Amostras de fezes;
- b) Bastão de vidro;
- c) Béquer ou borrel;
- d) Rolha de borracha;
- e) Gaze;
- f) Pequeno funil;
- g) Tubos de centrifugação de 15 mL;
- h) Água;
- i) Solução de sulfato de zinco a 33% – densidade de 1.180 g/L;
- j) Lugol;
- k) Alça de platina;
- l) Lâminas e lamínulas;
- m) Centrífuga;
- n) Microscópio óptico.

Procedimento:

- 1) Adicionar cerca de 2 g de fezes em um béquer ou borrel contendo água e homogeneizar o material, com auxílio de um bastão de vidro;
- 2) Filtrar através de uma gaze dobrada quatro vezes, com auxílio de um pequeno funil, para um tubo de centrifugação de 15 mL;
- 3) Centrifugar por 1 minuto a 2.500 rpm;
- 4) Decantar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em água;

- 5) Centrifugar por 1 minuto a 2.500 rpm;
- 6) Decantar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 10 mL da solução de sulfato de zinco a 33%, densidade de = 1.180 g/L;
- 7) Fechar o tubo com rolha de borracha, agitar vigorosamente e centrifugar por 1 minuto a 2.500 rpm;
- 8) Abrir cuidadosamente o tubo e, com o auxílio de uma alça de platina, retirar uma gota da superfície do líquido, colocando-a sobre uma lâmina;
- 9) Adicionar uma gota de lugol sobre o material e cobri-lo com lamínula;
- 10) Observar no microscópio em objetiva de 10X e de 40X.

9.3 Soluções utilizadas em protozoologia

- **Álcool a 70%**

Álcool etílico absoluto _____ 70 mL

Água (comum) q.s.p. _____ 100 mL

Para o **preparo de álcool a 70% a partir de álcool etílico comercial ou etanol a 96%**, realizar cálculo de correção de acordo com a concentração inicial do álcool que se quer usar, conforme o exemplo abaixo:

Para cada 100 mL de álcool a 96%, tem-se 96 mL de álcool e 4 mL de água. Assim sendo:

$$\frac{\% \text{ da solução desejada} \times \text{volume desejado}}{\% \text{ solução-mãe}} = \text{quantidade da solução-mãe a ser utilizada}$$

Por exemplo: $\frac{70\% \times 1000 \text{ mL}}{96\%} = 729,2 \text{ mL}$ (álcool 96% + 270,8 mL (- q.s.p. 100mL) de água destilada)

Dessa forma, prepara-se a solução de álcool a 70% utilizando 73 mL de álcool e adicionando-se água (comum ou destilada) até o volume final de 100 mL.

• **PBS pH 7,2 (20X)**

NaCl (cloreto de sódio)	_____	170 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sódio dibásico)	_____	42,283 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sódio monobásico)	_____	4,423 g
Água destilada q.s.p.	_____	1.000 mL

Procedimento:

- Misturar todos os reagentes;
- Homogeneizar bem;
- Medir o pH; caso necessário, ajustar com hidróxido de sódio até chegar ao pH de 7,2.

Com essa fórmula, obtém-se PBS 20 vezes concentrado. Para a sua utilização, deve-se retirar 50 mL da solução obtida e completar até o volume final de 1.000 mL com água destilada.

• **May-Grünwald–Giemsa**

May-Grünwald em pó	_____	0,2 g
Álcool metílico	_____	100 mL

Dissolver todo o pó em álcool metílico, filtrar em papel-filtro e acondicionar em frasco escuro.

• **Solução Giemsa para o método Giemsa lento**

Carbonato de potássio a 1%	_____	25 gotas
Giemsa	_____	125 gotas
Água destilada q.s.q.	_____	100 mL

- **Solução tamponada de Giemsa**

Giemsa _____ 1 a 2 gotas

Solução tampão de coloração _____ 1 mL

- **Solução tampão de coloração pH 7.2**

Solução A: Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,2 M

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 M

PM – 137,99

1 M – 137,99 g

0,2 M – 27,598 g – completar com H_2O até 1.000 mL.

Para fazer 300 mL, deve-se pesar 8,2794 g.

Solução B: Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 0,2 M

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 M

PM – 358,14

1 M – 358,14

0,2 M – 71,628 g – completar com H_2O até 1.000 mL.

Para fazer 800 mL, deve-se pesar 57,3024 g.

Preparo da solução estoque:

28 partes da solução A _____ 280 mL

72 partes da solução B _____ 720 mL

Preparo da solução de coloração:

Diluir a solução estoque em 1:10.

- **Preparo da solução HCl a 5 N**

HCl (mL) _____ 41,97

H_2O _____ 58,03

Total _____ 100 mL

- **Lugol (solução iodo-iodurada, segundo Nicolle)**

Iodo _____ 5 g
 Iodeto de potássio _____ 10 g
 Água destilada _____ 100 mL

Para preparar a solução de lugol, dissolve-se primeiramente na água destilada o iodeto de potássio. Logo em seguida, dissolver o iodo. Manter em frasco escuro e bem fechado.

- **Solução de MIF**

Solução estoque:

Água destilada _____ 50 partes
 Solução de mercurocromo a 0,2% _____ 40 partes
 Formol comercial (formalina) _____ 5 partes
 Glicerina _____ 1 parte

Misturar os reagentes e homogeneizar bem.

OBS.: Coutinho (1956), nas modificações propostas, sugere o uso de mercurocromo.

- **Solução de glicerina para montagem de lâminas**

Glicerina P.A. _____ 90 partes
 PBS _____ 11 partes

- **Solução estoque de azul de Evans**

Azul de Evans _____ 10 mL
 PBS pH 7,2 _____ 100 mL

- **Solução estoque de Giemsa**

Pode ser adquirida já pronta no comércio ou ser preparada no laboratório, de acordo com as seguintes fórmulas:

Giemsa em pó _____ 3,8 g
 Glicerol (puro) _____ 125 mL
 Álcool metílico P.A. _____ 375 mL

Azur II eosina _____ 3 g
 Azur II _____ 0,8 g
 Glicerol (puro) _____ 250 mL
 Álcool metílico P.A. _____ 250 mL

Misturar o álcool e o glicerol; adicioná-los, pouco a pouco, ao pó contido em um grau, enquanto se tritura os grãos com um pistilo; quando tudo estiver bem dissolvido, guardar a mistura em local escuro por uma semana (tempo de maturação ideal); decorrido esse tempo, filtrar a solução em papel-filtro e guardar em vidro escuro.

- **Solução salina a 0,85%**

NaCl _____ 8,5 g
 Água destilada q.s.p. _____ 1 L

Dissolver o cloreto de sódio em 800 mL de água destilada; completar o volume até 1.000 mL.

- **Líquido fixador de Schaudinn**

Solução saturada de bicloreto de mercúrio __ 2 partes – 126,5 mL (sublimado corrosivo)

Álcool etílico absoluto ou 96% _____ 1 parte – 63,5 mL
 Ácido acético puro _____ 5 % – 12 mL

Para cada 95 mL da mistura de bicloreto de mercúrio e álcool absoluto, adicionam-se 5 mL de ácido acético glacial no momento da utilização do líquido fixador.

- **Alúmen férrico**

Sulfato de ferro III amoniacal _____ 2 g

Água destilada q.s.p. _____ 100 mL

Dissolver o sulfato de ferro III amoniacal em água destilada a 40°C e armazenar em frasco de vidro escuro.

- **Solução aquosa de hematoxilina a 0,5%**

Água destilada _____ 90 mL

Álcool a 95% _____ 10 mL

Cristais de hematoxilina _____ 0,5 g

Dissolver a hematoxilina no álcool e completar com água destilada até 100 mL. Essa solução deve ser preparada, no mínimo, 48 horas antes do uso e armazenada em recipiente âmbar (não transparente).

- **Fixador SAF**

Acetato de sódio _____ 15 g

Ácido acético _____ 20 mL

Formaldeído _____ 40 mL

Água destilada q.s.p. _____ 1.000 mL

Misturar os reagentes e homogeneizar bem.

- **Meio RPMI 1640**

RPMI (pó) _____ 1,04 g

NaHCO₃ _____ 0,2 g

Água bidestilada q.s.p. _____ 100 mL

Agitar por aproximadamente 40 minutos em béquer, com auxílio de agitador automático e magneto, para que ocorra a dissolução completa.

- **Meio NNN (Novy, McNeal e Nicolle) – meio difásico**

Cloreto de sódio (NaCl)	_____	6 g
Ágar	_____	14 g
Água destilada	_____	900 g
Sangue de coelho desfibrinado	_____	135 mL (15%)

Procedimento

- Misturar a quente cloreto de sódio, ágar e água destilada. Esterilizar por 20 minutos em autoclave a 120°C e 1 atmosfera. Deixar atingir a temperatura entre 40°C e 50°C para acrescentar, nesse momento, o sangue desfibrinado, agitando suavemente. Distribuir o meio ainda líquido em tubos de ensaio ou frascos de cultura. Deixar solidificar, mantendo os tubos com inclinação conveniente. Fazer a prova de esterilidade (deixar por 48 horas em estufa a 37°C). Guardar em geladeira até o momento do uso. Esse meio apresenta uma base sólida inclinada e caldo de condensação.
- A colheita do sangue de coelho deve ser asséptica, por meio de punção cardíaca, e o sangue deve ser desfibrinado com o auxílio de pérolas de cristal em frasco estéril.
- Esse meio é indicado para o cultivo de flagelados do gênero *Leishmania* e para a espécie *Trypanosoma cruzi*.
- A partir da cultura, podem ser feitas preparações coradas. O líquido de condensação é passado para o tubo de centrifugação, onde é lavado com solução fisiológica (NaCl a 0,9%) por meio de duas a três centrifugações a 2.000 rpm. O sedimento pós-lavagem deve ser misturado com duas a três gotas de soro humano ou de animal de laboratório para só após seguir com o preparo de esfregaços delgados ou espessos, deixando secar e corando pelos métodos de Giemsa ou May-Grünwald–Giemsa. Para que as colorações sejam mais satisfatórias, deve ser utilizado o corante Giemsa adicionado de uma gota de

solução de bicarbonato de sódio a 1% para cada 10 mL da solução corante. O tempo de coloração deve ser ampliado para 40 minutos.

- e) Para o isolamento de espécies e subespécies do gênero *Leishmania*, o material a ser semeado deve ser obtido de acordo com os preceitos estabelecidos no estudo específico dos assuntos. A semeadura deve ser imediata à coleta, emulsionando-se o material no líquido de condensação do meio. O material deve ser semeado em mais de um tubo, e os tubos armazenados em estufa a 25°C até a realização dos exames, que devem ser feitos a partir do quarto dia.

• Meio de cultura LIT

Solução 1:

NaCl _____ 4,0 g

KCl _____ 0,4 g

Solução 2:

Triptose _____ 5,0 g

Infuso de fígado _____ 5,0 g

Água destilada q.s.p. ____ 880 mL

Etapas para o preparo:

- Dissolver o infuso de fígado em 200 mL de água destilada, em banho-maria ou chama de gás;
- Filtrar ainda quente em algodão;
- Recolher o filtrado e juntar com os ingredientes das soluções 1 e 2;
- Ajustar o pH entre 7,4 e 7,6;
- Acrescentar 100 mL de soro bovino;
- Inativar a 68°C durante 1 hora, agitando o meio de 5 em 5 minutos;
- Acrescentar 20 mL (0,2%) de hemoglobina e antibióticos (penicilina 250 µL/mL – estreptomicina 50-100 mg/mL);
- Filtrar em Zeitz e distribuir em quantidades desejadas.

Referências bibliográficas

BLAGG, W. et al. A New Concentration Technique for the Demonstration of Protozoa and Helminth Egg in Feces. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, n. 4, p. 23-28, 1955.

COUTINHO, J. O. Notas sobre modificações do "MIFC" na conservação de fezes para pesquisa de cistos de protozoários. *Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo*, n. 10, p. 65-70, 1956.

FAUST, E. C. et al. A Critical Study of Clinical Laboratory Technics for the Diagnosis of Protozoan Cysts and Helminth Eggs in Feces. I. Preliminary Communication. *American Journal of Tropical Medicine*, n. 18, p. 169-183, 1938.

_____. et al. Comparative Efficiency of Various Technics for Diagnosis of Protozoa and Helminths in Feces. *Journal of Parasitology*, n. 25, p. 241-262, 1939.

HEIDENHAIN, M. Uber Vanadiumhaematoxylin, Pikroblauschwarz und Kongokorinth. *Z. wiss. Mikr.*, n. 25, p. 401-410, 1908.

HOOFF, R. A Method for Counting and Concentrating Living *Trypanosoma cruzi* in Blood Lysed with Ammonium Chloride. *Journal of Parasitology*, v. 60, n. 3, p. 527-528, 1974.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. Sedimentation Concentration Method in *Schistosomiasis mansoni*. *Journal of Public Health, Puerto Rico*, n. 9, p. 238-291, 1934.

LEVINE, N. D. *Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man*. 2. ed. Minneapolis: Burgess, 1973

_____. et al. A newly revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology*, v. 27, p. 37-58, 1980.

NICOLLE, M. C.; MANCEAUX, L. On a New Protozoan in Gundis (*Toxoplasma* N. Gen). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104, n. 2, p. 1-3, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Chagas Disease (American trypanosomiasis). *Fact sheets*, World's Health Organization, n. 340, June 2010. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 14 jun. 2011.

_____. Chagas: One Hundred Years Later. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 87, n. 7, p. 485-564, July 2009. Disponível em: <http://www.who.int/bulletin/volumes/87/7/09-030709/en/>. Acesso em: 14 jun. 2011.

RITCHIE, L. S. An Ether Sedimentation Technique for Routine Stool Examination. *Bulletin of the United States Army Medical Department*, n. 8, p. 326, 1948.

SAPERO, J. J.; LAWLESS, D. K. The "MIF" Stain-preservation Technique for the Identification of Intestinal Protozoa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, n. 2, p. 613-619, 1953.

SCHAUDINN, F. Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. *Arbeiten der Kaiserlichen Gesundheitsamte*, n. 19, p. 547, 1903.

SHEATHER, A. L. The Detection of Intestinal Protozoa and Mange Parasites by a Flotation Technic. *Journal of Comparative Pathology*, n. 36, p. 266-275, 1923.

SPLENDRE, A. A new protozoan parasite of rabbit found in histological lesions similar to human Kala-Azar. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104, n. 2, p. 1-3, 2009.

Bibliografia consultada

AMATO NETO, V.; CORREA, L. L. *Exame parasitológico das fezes*. 4. ed. São Paulo: Savier, 1980.

AMENDOEIRA, M. R. R.; CAMILLO-COURA, L. F. Uma breve revisão sobre toxoplasmose na gestação. *Scientia Medica*, v. 20, n. 1, jan.-mar. 2010.

_____; COSTA, T.; SPALDING, S. M. *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a toxoplasmose. *Revista Souza Marques*, v. 1, n. 1, p. 15-35, 1999.

BAERMANN, G. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) – Larven in Erdproben. *Mededeel mit. H. Geneesk, Lab. Weltever Feestbundeel*, Batávia, p. 41-47, 1917.

BROOKE, M. M. PVA-fixative Technique in the Laboratory Confirmation of Amoebiasis. *Triangle*, n. 4, p. 26-35, 1960.

_____; DONALDSON, A. W.; MITCHELL, R. B. A Method of Supplying Cellulose Tape to Physicians for Diagnosis of Enterobiasis. *Public Health Reports*, v. 64, n. 28, p. 897-901, 1949.

_____; GOLDMAN, M. Polyvinyl Alcohol-fixative as a Preservative and Adhesive for Protozoa in Dysenteric Stools and Other Liquid Materials. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, n. 34, p. 1.554-1.560, 1949.

BURROWS, R. B. *Microscopic Diagnosis of the Parasites of Man*. Nova York: Yale University Press, 1965.

D'ANTONI, J. S. Standardization of the Iodine Stain for Wet Preparations of Intestinal Protozoa. *American Journal of Tropical Medicine*, v. 17, p. 79-84, 1937.

DE CARLI, G. A. *Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico das parasitoses humanas*. São Paulo: Atheneu, 2001.

DOBEL, C.; O'CONNOR, F. W. *The Intestinal Protozoa of Man*. Londres: John Bale, Sons & Danielsson, 1921.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis and Other Tissue Cyst-forming Coccidia of Man and Animals*. In: KRIER, J. P. (org.). *Parasitic Protozoa*. Nova York: Academic Press, 1997. V. 3, p. 101-237.

_____; SREEKUMAR, C. Redescription of *Hammondia hammondia* and its Differentiation from *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, n. 33, p. 1.437-1.453, 2003.

FAYER, R. *Sarcocystis* spp in Human Infections. *Clinical Microbiology Review*, v. 17, n. 4, p. 894-902, 2004.

FERREIRA, W. A.; ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GARCIA, L. S.; BRÜCKNER, D. *Diagnostic Medical Parasitology*. 2. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1993.

GRAHAM, C. F. A Device for the Diagnosis of *Enterobius vermicularis*. *American Journal of Tropical Medicine*, n. 21, p. 159-161, 1941.

HARADA, U.; MORI, O. A. A New Method for Culturing Hookworm. *Yonago Acta Medica*, n. 1, p. 177-179, 1955.

- JUNOD, C. Technique coprologique nouvelle essentiellement destinée à la concentration des trophozoites d'amibes. *Bulletin Société Pathologiste Exotique*, n. 65, p. 390-398, 1972.
- KATO, K.; MIURA, M. Comparative examinations. *Japanese Journal of Parasitology*, n. 3, p. 35, 1954.
- KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A Simple Device Quantitative Stool Tick-Smear Technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo*, n. 14, p. 397-400, 1972.
- LIMA, A. O. *Métodos laboratoriais aplicados à clínica*. Técnica e interpretação. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.
- MELVIN, D. M.; BROOKE, M. M. *Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites*. Atlanta: Centers for Diseases Control and Prevention, 1982.
- MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. *Revista do Serviço de Saúde Pública, Rio de Janeiro*, n. 1, p. 507-624, 1948.
- PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. *Parasitologia médica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
- REY, L. *Parasitologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematoides das fezes – modificação do método de Baermann. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, n. 14, p. 5-8, 1954.
- SAPERO, J. J.; LAWLESS, D.; STRONE, C. P. A. An Improved Iodine-staining Technique for Routine Laboratory Diagnosis of Intestinal Protozoa. *Science*, n. 114, p. 550-551, 1951.
- TENTER, A. M. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *International Journal for Parasitology*, v. 25, n. 11, p. 1.311-1.330, 1995.
- TOMPKINS, V. N.; MILLER, J. K. Staining Intestinal Protozoa with Iron-hematoxylin-phosphotungstic Acid. *American Journal of Clinical Pathology*, n. 17, p. 755-765, 1947.
- TSUCHIYA, H. Survival Time of Trophozoites of *Endamoeba histolytica* and its Practical Significance in Diagnosis. *American Journal of Tropical Medicine*, n. 25,

p. 277-279, 1945.

WHEATLEY, W. B. A Rapid Staining Procedure for Intestinal Amoebae and Flagellates. *American Journal of Clinical Pathology*, n. 21, p. 990-991, 1951.

WILLIS, H. H. A Simple Levitation Method for the Detection of Hookworm Ova. *Medical Journal of Australia*, n. 29, p. 375-376, 1921.

YANG, J.; SCHOLTEN, T. A Fixative for Intestinal Parasites Permitting the Use of Concentration and Permanent Staining Procedures. *American Journal of Clinical Pathology*, n. 67, p. 300-304, 1977.

YOUNG, H. K. et al. Ethyl Acetate as a Substitute for Diethyl Ether in the Formalin-ether Sedimentation Technique. *Journal of Clinical Microbiology*, n. 10, p. 852-853, 1979.

Capítulo 2

Introdução à helmintologia

José Roberto Machado-Silva

Rosângela RodrigueS-Silva

Lucas de andrade barros

Fernanda Barbosa de Almeida

1. Considerações gerais

Helmintologia é a área do conhecimento que se dedica ao estudo dos helmintos, ou, em seu termo vulgar, dos vermes. Helmintose ou helmintíase é a nomenclatura utilizada no caso de o hospedeiro estar infectado por helmintos. Devido ao número de hospedeiros infectados e aos agravos à saúde, os helmintos são considerados problemas de saúde pública na medicina humana e veterinária. De acordo com o tipo de corpo, os helmintos podem ser organizados em dois grupos: os nematelmintos, que apresentam o corpo cilíndrico e são representados pela classe Nematoda, e os platelmintos, que, em geral, apresentam o corpo achatado dorso-ventralmente. Nesse grupo, estão incluídas as classes Trematoda, com helmintos de corpo foliáceo, exceto o gênero *Schistosoma*, e a classe Cestoda, também conhecida por Cestoidea, que possui

helmintos de corpo segmentado. Essas duas classes também se diferenciam pelo número de ventosas: duas na classe Trematoda e quatro, na Cestoda.

No ciclo biológico dos helmintos, há diferentes estágios evolutivos: vermes adultos, ovos e larvas. Nos nematelmintos, a fase adulta apresenta diferenciação sexual evidente, na qual os espécimes machos são menores do que as fêmeas, ao passo que a quase totalidade dos platelmintos é representada por helmintos hermafroditas, isto é, a presença, no mesmo indivíduo, dos sistemas reprodutores masculino e feminino.

Além das diferenças no aspecto externo do corpo e no sistema reprodutor, a organização do sistema digestório também permite a distinção entre as classes, posto que nos Nematoda o sistema digestório é completo, sendo composto de boca, faringe, esôfago e ânus (nos machos) ou cloaca (nas fêmeas). Os platelmintos não apresentam sistema digestório completo. Os trematódeos têm boca, no fundo da ventosa oral, faringe e intestino – que termina em saco fechado –, determinando que as excretas sejam eliminadas pela boca. Os cestoides não apresentam sistema digestório, efetuando a nutrição por osmose através do tegumento, a parte externa do corpo dos platelmintos.

Os ovos de nematoides têm três camadas: uma externa lipídica, uma quitinosa intermediária e uma vitelínica interna, mais ou menos espessas, que asseguram maior ou menor barreira ao desenvolvimento das larvas no interior do ovo.

De acordo com o ciclo biológico, os helmintos podem ser classificados como geo-helmintos, quando ocorre uma mudança de fase evolutiva no solo, tal como de estágios no interior do ovo ou de ovo para larva ou, ainda, de uma fase larvar (rabditoide) para outra (filarioide), como nos nematoides. Já nos bio-helmintos, as fases larvárias se desenvolvem em hospedeiros intermediários no ciclo biológico: esporocisto para cercárias em trematódeos e embrião hexacanto para larva cisticercoide em cestoides.

No corpo humano são encontrados helmintos nos intestinos delgado e grosso, e em vários outros locais: fígado, sistemaas nervoso, circulatório e linfático e tecido subcutâneo.

2. Helmintos intestinais humanos

No intestino são encontrados com muita frequência helmintos adultos de várias espécies de nematoides e cestoides. Para alguns nematoides, a transmissão ocorre por via oral, mediante a ingestão de alimentos contaminados com ovos embrionados (com uma larva infectante); é o caso de *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*. Para outras espécies, como *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*, a transmissão ocorre por larvas infectantes que penetram na pele dos indivíduos ao andarem descalços.

Algumas espécies de nematoides intestinais – *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* – têm um ciclo pulmonar característico, denominado ciclo de Loss. Nesse ciclo, as larvas sofrem amadurecimento no pulmão, mudam de estágio evolutivo, rompem os capilares, caem nos alvéolos, sobem pela árvore brônquica, alcançam a traqueia e, ao serem deglutidas, atingem seu destino final: o intestino. O habitat dos vermes adultos de *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* é o intestino delgado; já o habitat de *Trichuris trichiura* e *Enterobius vermicularis* é o intestino grosso. O diagnóstico laboratorial dos nematoides intestinais é feito pelo encontro de ovos ou larvas nas fezes dos indivíduos, geralmente por meio de métodos de rotina parasitológica.

Em relação aos cestoides, a transmissão se dá apenas por via oral, quando os indivíduos ingerem carnes contaminadas por formas larvárias de *Taenia solium* ou de *Taenia saginata*. Em outras espécies, a transmissão é feita apenas pela ingestão de ovos de *Hymenolepis nana* (*Rodentolepis nana*) encontrados no ambiente; já no caso de *Hymenolepis diminuta*, a transmissão acontece pela ingestão de pequenos coleópteros. Todas essas espécies habitam o intestino delgado. O diagnóstico laboratorial é feito pelo encontro de proglotes (ou proglótides) nas fezes dos indivíduos. Os detalhes sobre o parasitismo por helmintos intestinais mais comuns em nosso país são apresentados a seguir.

2.1 Cestoides com habitat em intestino delgado humano

A) *Taenia solium* e *Taenia saginata* (teníase)

a) Morfologia

Os vermes adultos são grandes: *T. solium* mede de 1,5 a 4 metros de comprimento; e *T. saginata*, de 4 a 12 metros. O nome vulgar (popular) mais utilizado para o gênero é solitária. O corpo é achatado, em forma de fita, e dividido em três regiões, a saber: escólex (região anterior de fixação no intestino), com quatro ventosas e dupla coroa de ganchos (acúleos) – cora presente em *T. solium* e ausente em *T. saginata*; colo, região de crescimento do helminto; e estróbilo, composto por segmentos denominados proglotes. Dependendo da sua organização interna, as proglotes são classificadas como imaturas (sem maturação sexual), maduras (sistemas genitais masculino e feminino desenvolvidos) e grávidas (ramificações uterinas repletas de ovos). As proglotes grávidas se diferenciam entre as espécies: na *T. solium*, apresentam aspecto dendrítico e menor número de ramificações uterinas, com maior espaço entre elas; na *T. saginata*, apresentam aspecto dicotômico e maior número de ramificações uterinas, com menor espaço entre elas. Os ovos – pequenos, esféricos, marrons, medindo cerca de 20 a 40 μm^1 de diâmetro –, são morfológicamente indistinguíveis e constituídos por uma casca externa e uma interna que protegem o embrião, conhecido como hexacanto ou oncosfera. O cisticerco (forma larvar) apresenta formato elíptico ou semiesférico, com diâmetro de maior eixo medindo de 8 a 10 mm. A larva de *T. saginata* apresenta quatro ventosas no protoescólex; a de *T. solium* tem uma coroa de acúleos no centro das quatro ventosas.

¹ μm = micrômetros.

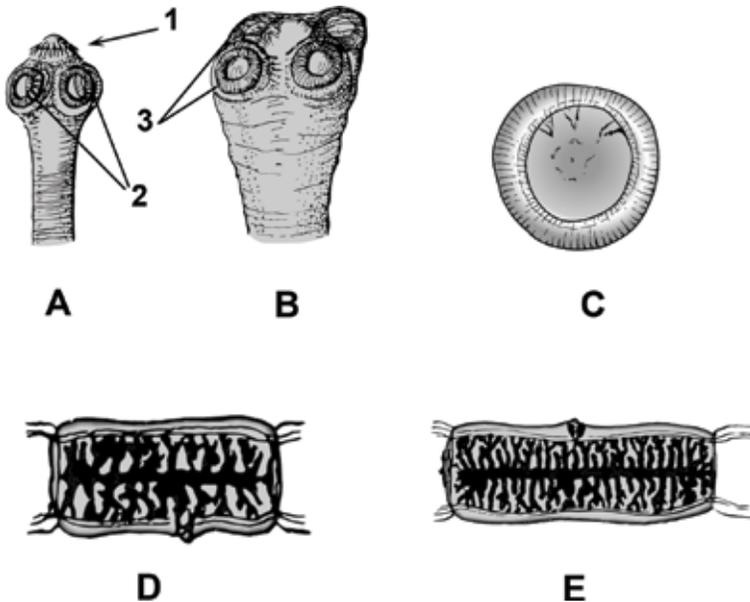


Figura 1. Formas evolutivas de *Taenia solium* e *Taenia saginata*: A) Escólex de *T. solium*, com coroa de ganchos (acúleos) (1) e ventosas (2); B) Escólex de *T. saginata*, com ventosas (3); C) Ovo; D) Proglote de *T. solium*, com ramificações dendríticas; E) Proglote de *T. saginata*, com ramificações dicotômicas.

b) Ciclo biológico

A infecção humana ocorre pela ingestão de carne bovina, crua ou mal cozida, contaminada pelas larvas de *T. saginata*, ou de carne suína, contaminada com *T. solium*. No intestino delgado, ocorre a desinvaginação da larva, quando essa se fixa na mucosa intestinal e se transforma em verme adulto. A tênia adulta começa a eliminar proglotes grávidas com 80 mil a 100 mil ovos, de 60 a 70 dias após a ingestão da carne. Os ovos eliminados pelo hospedeiro definitivo contaminam o solo, sendo ingeridos por suínos ou bovinos. No intestino delgado do hospedeiro intermediário, ocorre a liberação da oncosfera, que atravessa a mucosa intestinal e alcança a circulação, podendo se desenvolver no cérebro, língua e coração. O ciclo recomeça quando o homem ingere esses tecidos contaminados. Durante episódios de vômitos nos indivíduos com *T.*

solium, as proglotes grávidas podem chegar ao estômago e ativar o embrião (oncosfera), que volta ao intestino delgado e se desenvolve em cisticerco, caracterizando a autoinfecção interna.

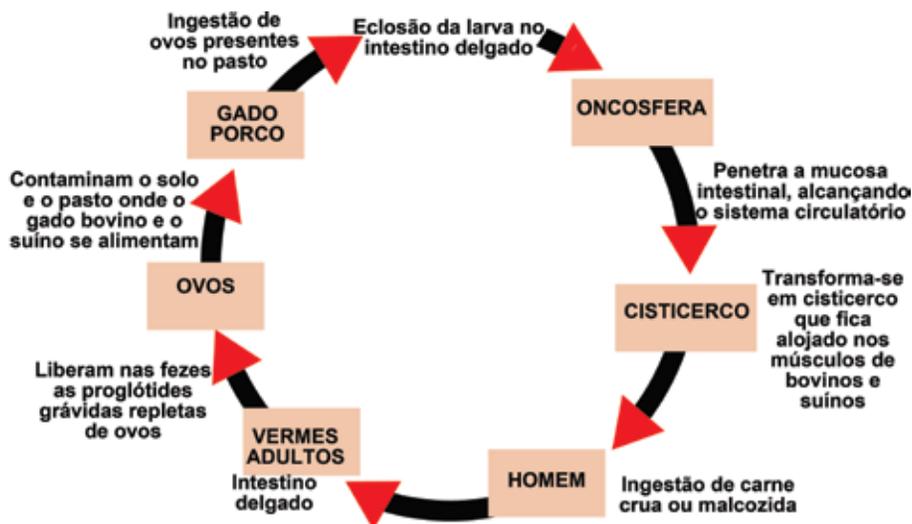


Figura 2. Ciclo biológico da *Taenia sp.*

c) Relação parasito–hospedeiro

A doença causada pela presença dos vermes adultos no intestino, que não provoca alterações importantes no local de fixação, é conhecida como teníase. Com muita frequência se observam indivíduos assintomáticos. Os principais sintomas são dor abdominal, náuseas, falta de apetite ou apetite exagerado e perda de peso. As principais complicações são apendicite (penetração de uma proglote e obstrução do apêndice ileocecal) e obstrução intestinal pela massa do estróbilo (extremamente rara).

d) Diagnóstico laboratorial

Realizado pela pesquisa de proglotes ou de ovos eliminados nas fezes. A obtenção de proglotes pode ser conseguida, principalmente, por tamisação,

que consiste em desfazer o bolo fecal com água corrente em uma peneira de malhas finas (tamis), para reter as proglotes. As proglotes retidas devem ser comprimidas entre duas lâminas de vidro e clarificadas com ácido acético, a fim de se identificarem as espécies pela morfologia das ramificações uterinas. Esse procedimento é importante pela possibilidade de autoinfecção por *T. solium*.

É importante lembrar que as proglotes de *T. solium* costumam ser expulsas passivamente, misturadas a material fecal, ou ao fim da defecação. Já as de *T. saginata* saem normalmente de forma isolada, podendo estar envolvidas pela massa fecal. Por possuírem musculatura mais potente que as proglotes da *T. solium*, o que determina uma atividade motora, as proglotes de *T. saginata* conseguem locomover-se, forçando a passagem pelo orifício anal a qualquer momento do dia ou da noite, e suas proglotes podem ser vistas com frequência na roupa de cama ou em peças íntimas de vestuário. Esse pode ser um meio de obtenção do proglote sem uso da tamisação.

Normalmente, o encontro de ovos nas fezes é acidental, pois as proglotes saem íntegras nas fezes. A pesquisa de ovos com fita adesiva é a melhor técnica para encontrar os ovos de *Taenia*, tendo em vista que, ao passar pelo orifício anal, as proglotes são comprimidas e tendem a extravasar parte do seu conteúdo (ovos). Porém, em razão da semelhança morfológica entre os ovos das mesmas, não é possível estabelecer o diagnóstico da espécie parasitária.

e) Epidemiologia

O parasitismo pelo gênero *Taenia* é encontrado em praticamente todas as partes do mundo, apresentando maior prevalência nas regiões onde inexistente ou é precária a inspeção sanitária das carcaças de bovinos e/ou suínos. No Brasil, país no qual a maioria da carne consumida não é fiscalizada, a prevalência da teníase/cisticercose é alta, e tais patologias estão largamente dispersas no território nacional, principalmente nas cidades do interior. Hábitos de determinados segmentos populacionais podem fomentar ou inibir tal transmissão, como é o caso da proibição da ingestão de carne suína por

judeus ortodoxos e da carne de origem bovina por grupos indianos, como os hindus. Como o único hospedeiro definitivo é o homem, o destino inadequado de suas fezes é o elemento fundamental na manutenção da transmissão dos ovos de *Taenia* para seus respectivos hospedeiros intermediários. A utilização de fezes humanas como adubo e o frequente hábito coprofágico de suínos criados soltos por seus donos ajudam a disseminar a doença. Outro fator determinante para a propagação dessa helmintose é a elevada capacidade do ovo de *Taenia* resistir ao tratamento dos esgotos e às inundações. Em casos mais raros, a ordenha manual de bovinos por mãos contaminadas por ovos do parasito podem ser uma fonte de transmissão. Porém, o mau hábito do homem de defecar no solo é, sem dúvida, o elo mais significativo dessa transmissão.

f) Profilaxia e controle

Inspecionar rigorosamente da carne de consumo humano, fiscalizar os matadouros, evitar comer carne crua ou malcozida e tratar os indivíduos infectados são medidas importantes para a profilaxia da teníase. O destino adequado dos dejetos, por meio da construção de sistema eficiente de saneamento básico, evita que suínos, bovinos, alimentos e água sejam contaminados com ovos de *Taenia*. Os indivíduos com sintomatologia ou suspeita de teníase devem realizar o diagnóstico laboratorial e ser tratados. Medidas de higiene pessoal, tais como sempre lavar as mãos após a ida ao banheiro, antes de manipular alimentos e antes de fazer as refeições, são práticas fundamentais. Lavar bem os alimentos contribui para a profilaxia e o controle da cisticercose.

B) *Rodentolepis (Hymenolepis) nana* e *Hymenolepis diminuta*
(himenolepíase)

a) Morfologia

○ verme adulto de *R. nana* mede cerca de 2 a 4 cm de comprimento por 1 cm de largura e o de *H. diminuta* mede cerca de 30 cm de comprimento. ○

escólex de *R. nana* tem coroa simples de ganchos, o que permite diferenciá-lo de *H. diminuta*, que não tem coroa de ganchos. Os ovos de *R. nana* medem 40 μm de diâmetro e apresentam um embrião completamente formado. *H. diminuta* mede 70 a 80 μm de diâmetro. A larva denominada cisticercoide tem o escólex invaginado com coroa de ganchos, mas sem vesícula.

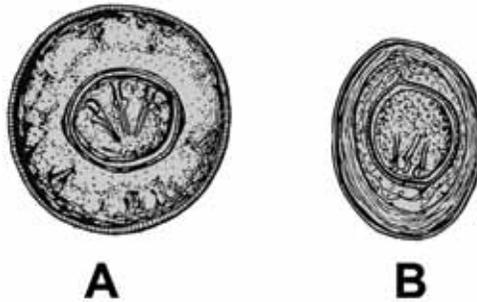


Figura 3. A) Ovo de *Hymenolepis diminuta*; B) Ovo de *Rodentolepis (Hymenolepis) nana*.

b) Ciclo biológico

O ciclo evolutivo de *H. nana* é do tipo monoxeno. O verme adulto produz no intestino delgado numerosos ovos, que são liberados nas fezes. Novos indivíduos poderão se infectar com esses ovos, os quais, no intestino delgado, liberam os embriões, que se fixam e dão origem ao verme adulto. O ciclo total desde a ingestão de ovos até o desenvolvimento do verme adulto e o aparecimento de ovos nas fezes dura um mês.

Já o ciclo de *H. diminuta* é do tipo heteroxeno. Os ovos podem ser ingeridos por insetos (hospedeiro intermediário), e a larva cisticercoide forma-se nos tecidos desses artrópodes, que são ingeridos acidentalmente. No intestino delgado do hospedeiro definitivo, o escólex desinvagina, fixa-se na mucosa e cresce até formar o verme adulto. A infecção humana por *H. diminuta* é pouco frequente. Os roedores são os hospedeiros naturais desse helminto.

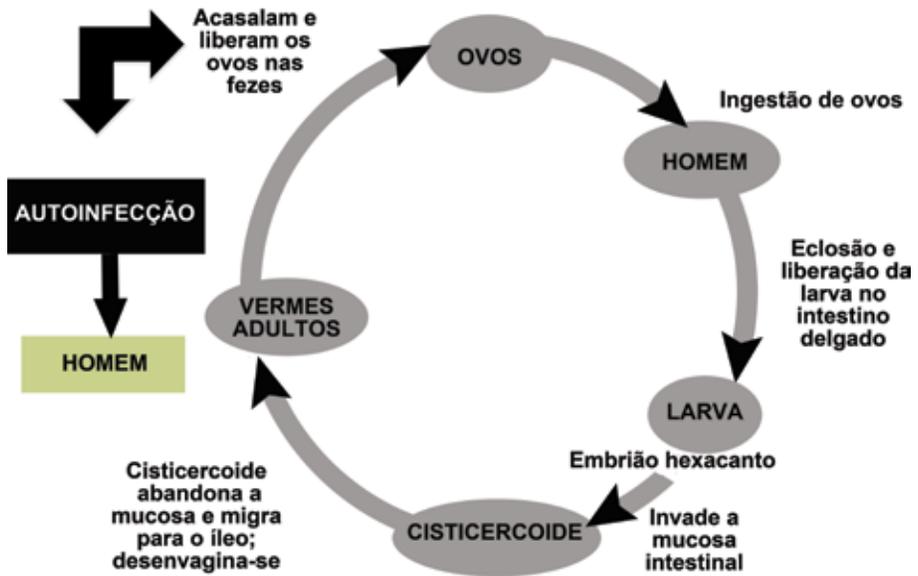


Figura 4. Ciclo biológico do *Rodentolepis nana*.

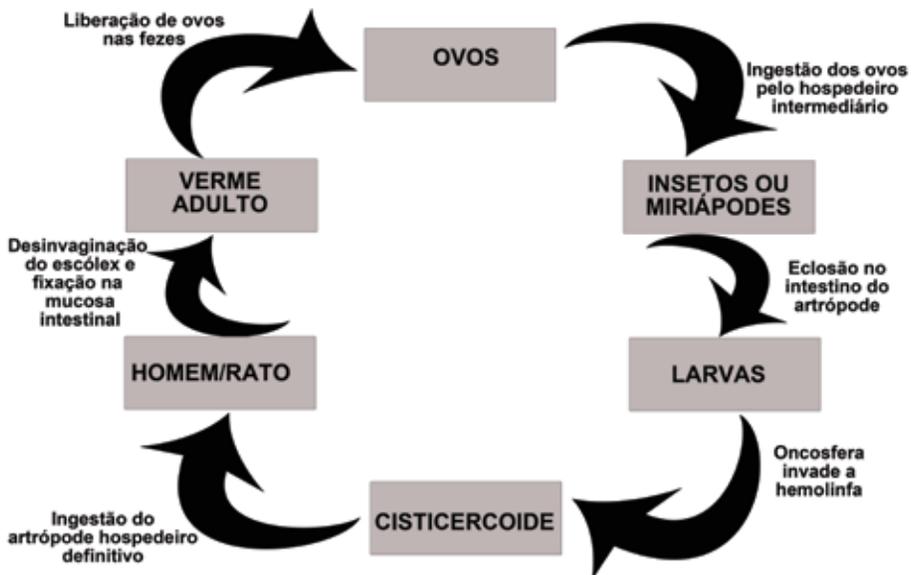


Figura 5. Ciclo biológico do *Hymenolepis diminuta*.

c) Relação parasito–hospedeiro

De maneira geral, a presença de poucos vermes adultos no intestino não provoca alterações importantes no local de fixação. Com muita frequência, observam-se indivíduos assintomáticos. Os principais sintomas são dor abdominal, náuseas, falta de apetite, irritabilidade, dor de cabeça e perda de peso.

d) Diagnóstico laboratorial

○ exame coproparasitológico é feito para pesquisar os ovos típicos de *Rodentolepis* e *Hymenolepis*, e as técnicas mais utilizadas são as de Faust e colaboradores (1938), a de Sheather (1923) e Ritchie (1948) modificada.

e) Epidemiologia

A himenolepíase é encontrada em todas as partes do mundo, principalmente nos países ou regiões mais frias. Dois fatores são importantes para a ocorrência dessa parasitose: densidade populacional e hábito de viver em ambientes fechados. Crianças na faixa escolar são as mais frequentemente infectadas.

f) Profilaxia e controle

Higiene pessoal com lavagem constante das mãos, destino adequado dos dejetos, uso de aspirador de pó e tratamento dos infectados. ○ combate aos insetos de cereais e às pulgas no ambiente e o exame de fezes nos demais membros da comunidade (família e creche) evitam a manutenção das fontes de infecção.

2.2 *Nematoídes de habitat intestinal humano*

A) *Ascaris lumbricoides* (ascariose, ascaríase)

a) Morfologia

Os vermes adultos machos são longos, medem cerca de 15 a 30 cm de comprimento, apresentam extremidades afiladas e cor leitosa. A extremidade

posterior é facilmente reconhecida pelo enrolamento ventral em forma de espiral, o que os diferencia das fêmeas adultas, que apresentam a extremidade afilada e retilínea. As fêmeas medem de 30 a 40 cm, e têm cor semelhante aos machos. O nome vulgar mais conhecido da *Ascaris* é lombriga.

Podem ser eliminados três tipos de ovos pela fêmea. Caso o ovo tenha sido gerado por fecundação do espermatozoide do macho, ele é considerado fértil; é esse o ovo de *A. lumbricoides* mais frequentemente eliminado. Os ovos férteis são elípticos ou esféricos, medem cerca de 50 a 70 μm de comprimento por 45 a 60 μm de largura. Por causa da membrana externa mamilonada, apresentam cápsula espessa que se cora de marrom pelos pigmentos fecais, em torno de uma massa embrionária de única célula. Com menor frequência, alguns ovos não apresentam membrana mamilonada externa, sendo considerados descorticados, o que determina uma superfície de casca lisa e transparente, que envolve massa embrionária de única célula. Caso o ovo não tenha sido fecundado, conseqüentemente é infértil e mede cerca de 80 a 90 μm de comprimento por 40 a 55 μm de largura, apresentando-se com os mamilos da membrana externa maiores e irregulares.

Os indivíduos infectados podem eliminar nas fezes ovos férteis apenas, ovos férteis e inférteis ou apenas ovos inférteis. Os ovos férteis podem contaminar o ambiente em locais com condições sanitárias deficientes.

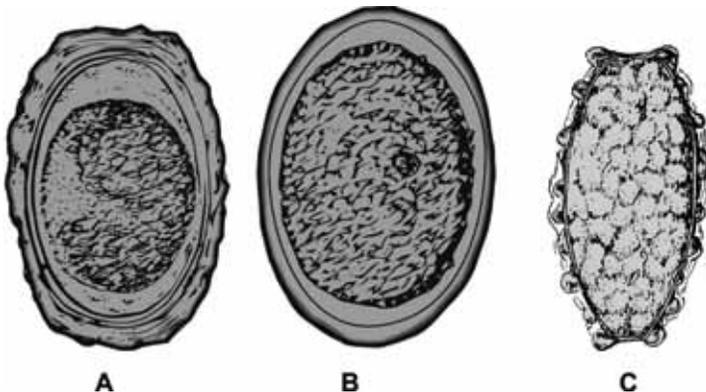


Figura 6. A) Ovo fértil de *Ascaris lumbricoides* com presença da membrana mamilonada; B) Ovo fértil descorticado; C) Ovo infértil.

b) Ciclo biológico

Os ovos férteis ou inférteis são afetados de maneira diferente pelo ambiente. Para os férteis, temperaturas em torno de 25°C a 30°C, umidade mínima de 70% e oxigênio são fatores que permitem o desenvolvimento de uma larva de primeiro estágio (L_1) que evolui para larva de segundo estágio (L_2) e, posteriormente, para larva infectante de terceiro estágio (L_3) dentro do ovo, com movimento observado entre lâmina e lamínula ao microscópio. Nos inférteis, não há a formação da larva porque o ovo não foi fecundado.

Dentro do hospedeiro, ocorre uma migração muito acentuada. Após a ingestão, os ovos larvados passam pelo estômago, as larvas saem do ovo no intestino delgado migram para o ceco, onde atravessam a parede intestinal e penetram na circulação sanguínea ou linfática, a fim de atingir o coração e os pulmões – quando ocorre o ciclo de Loss –, evoluindo para larva de quarto estágio (L_4). A migração continua, e as L_4 atingem a faringe, onde podem ser expelidas com a expectoração ou ingeridas, passando pelo estômago e transformando-se em adultos jovens no intestino delgado. Em aproximadamente 60 dias, realizam a cópula e as fêmeas produzem ovos que saem nas fezes.

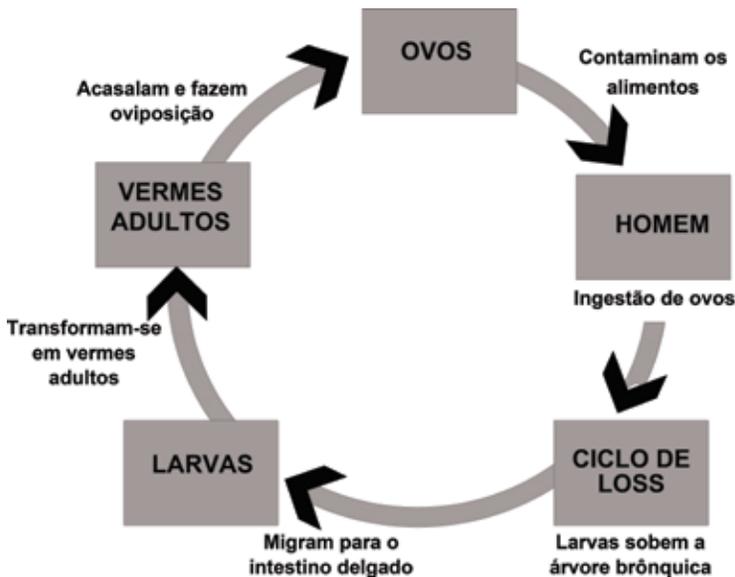


Figura 7. Ciclo biológico do *Ascaris lumbricoides*.

c) Relação parasito–hospedeiro

A patogenicidade é caracterizada pelo processo migratório das larvas no pulmão, que determina um quadro de pneumonite, no qual há febre, tosse e eosinofilia. Caso o indivíduo seja hipersensível, pode ocorrer a denominada síndrome de Loeffler. Na infecção intestinal, os vermes adultos ocasionam ação espoliadora, tóxica, mecânica e, com menor frequência, localizações não habituais (ectópicas). As manifestações clínicas envolvem desconforto abdominal, náuseas e perda de apetite. Esses quadros são mais graves em crianças desnutridas e que apresentem grande número de vermes. A ação irritativa mais grave desenvolvida pelos adultos diretamente sobre a parede intestinal é a formação de volumosas massas que lembram novelos, conduzindo algumas vezes à produção de espasmos e de obstrução intestinal e à peritonite, com ou sem perfuração do intestino.

d) Diagnóstico laboratorial

É feito com base no exame de fezes de rotina. Em razão do grande número de ovos eliminados normalmente nas fezes – em torno de 200 mil ovos por fêmea/dia – e de sua densidade de valor intermediário, praticamente todas as técnicas de concentração, sedimentação e flutuação apresentam boa sensibilidade para a ascariose. As principais técnicas utilizadas são as de Lutz (1919) ou Hoffman, Pons e Janer (1934), Ritchie (1948), Faust e colaboradores (1938), Sheather (1923) e Willis (1921). O emprego de métodos quantitativos como os de Kato-Katz (Katz, Chaves e Pellegrino, 1972) e Stoll (1923) permitem a quantificação do número de ovos e, conseqüentemente, a estimativa da carga parasitária do indivíduo.

Obs: Cuidado com a morfologia dos ovos inférteis ou férteis descortados nas fezes, pois a mesma pode determinar falsos negativos ou identificação errônea, uma vez que se assemelham a ovos de ancilostomídeos, apresentando, porém, casca mais grossa.

e) Epidemiologia

A infecção por *A. lumbricoides* está amplamente distribuída nas regiões tropicais e temperadas do planeta. Em todos os estados do Brasil, há relatos de infecção por esse helminto. Entretanto, há áreas de alta transmissão o Nordeste, áreas de média transmissão, o Norte, o Centro-Oeste e o Sudeste, e de baixa transmissão, o Sul. Alguns fatores interferem nessa distribuição: grande número de ovos produzidos pelas fêmeas, condições deficientes de saneamento, concentração de indivíduos e características climáticas, havendo maior prevalência da infecção em regiões úmidas e quentes.

f) Profilaxia e controle

Recomenda-se o tratamento dos indivíduos infectados, instalação de saneamento básico e educação em saúde.

B) *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* (ancilostomose, ancilostomíase).

a) Morfologia

São helmintos com região anterior diferenciada (cápsula bucal com dentes ou lâminas cortantes); a região posterior dos machos não apresenta a extremidade recurvada, possuindo uma bolsa copuladora bem característica dessas espécies. Os machos de *A. duodenale* medem de 9 a 11 mm e as fêmeas, de 10 a 13 mm. Em *N. americanus*, os machos medem de 5 a 9 mm e as fêmeas, de 9 a 11 mm

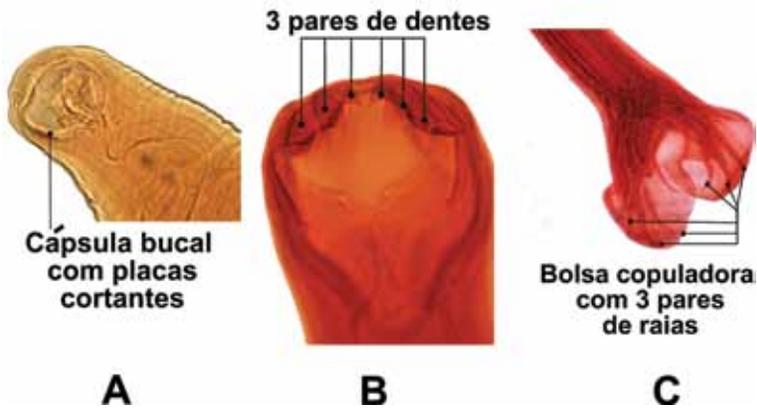


Figura 8. A) Extremidade anterior de *Necator americanus*, que mostra o par de placas cortantes no interior da cápsula bucal; B) Extremidade anterior de *Ancylostoma caninum*, mostrando a cápsula bucal e os três pares de dentes ventrais; C) Extremidade posterior de um exemplar macho de *Ancylostoma*, com a bolsa copuladora sustentada por raios musculares.

Os ovos das duas espécies são muito parecidos, ovóides e casca: eles têm forma: fina e transparente. No interior do ovo, desenvolve-se uma larva com o tubo digestivo diferenciado em corpo, istmo e bulbo (L_2 , larva rabditoide). No ambiente, ocorre a maturação para um estágio posterior, com esôfago cilíndrico e sem bulbo (L_3 , larva filarioide).

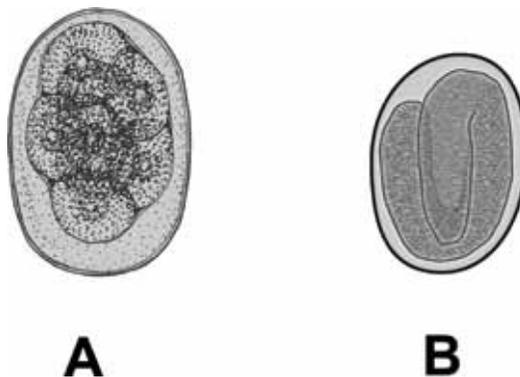


Figura 9. A) Ovo de ancilostomídeo no início da segmentação, como se apresenta nos exames de fezes; B) Ovo embrionado, depois de permanecer alguns dias no ambiente.

b) Ciclo biológico

A infecção por *N. americanus* se dá pela penetração cutânea das larvas filarioides infectantes (L_3). No *A. duodenale*, além desse tipo de transmissão, constata-se também a infecção por via oral, quando as larvas filarioides são ingeridas com o alimento. No entanto, os autores divergem se a transmissão se dá exclusivamente pela penetração cutânea, ou se também ocorre por via oral. Alcançada a circulação cutânea, as larvas L_3 são levadas ao coração e aos pulmões. De forma semelhante ao *A. lumbricoide*s, as larvas realizam o ciclo de Loss, atingindo a fase adulta no intestino delgado. Acredita-se que na transmissão por via oral o ciclo de Loss não ocorra. Da invasão das larvas infectantes até o aparecimento de ovos nas fezes são necessários de 35 a 60 dias.

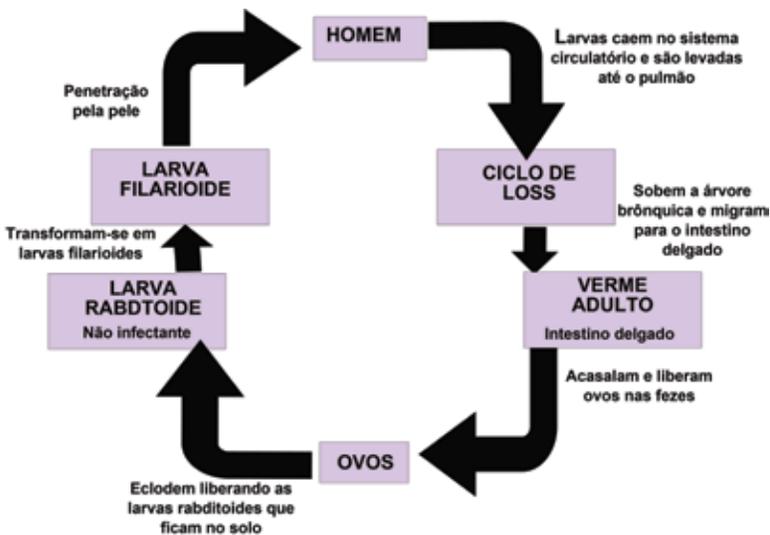


Figura 10. Ciclo biológico de *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*.

c) Relação parasito–hospedeiro

A gravidade dessa helmintose depende do local de migração das larvas, do número de vermes adultos localizados no intestino e do estado nutricional do indivíduo. No intestino, o helminto se fixa pela cápsula bucal, causando

intensa anemia. Os sintomas dessa fase incluem palidez e conjuntivas e mucosas descoradas.

d) Diagnóstico laboratorial

○ exame de fezes por métodos qualitativos – sedimentação espontânea, sedimentação por centrifugação e flutuação – indica apenas a presença ou não de ovos, porém com esses métodos não é possível a identificação da presença de ovos de ancilostomídeos. Com esses métodos não é possível a identificação de ovos, por causa da semelhança morfológica entre os ovos de diferentes parasitos. Como o número de vermes é importante na patogenia, sua estimativa pode ser realizada por métodos quantitativos, cujo resultado expressa o número de ovos por grama de fezes.

e) Epidemiologia

A transmissão dos ancilostomídeos depende dos seguintes fatores: indivíduos infectados que contaminam os solos com as suas fezes; tipo de solo; e condições climáticas favoráveis ao ciclo biológico dos helmintos: umidade, presença de oxigênio e temperatura adequada. A infecção ocorre preferencialmente em crianças maiores de 6 anos, adolescentes e indivíduos mais velhos.

f) Profilaxia e controle

Inclui o tratamento dos infectados e o planejamento de educação sanitária, nos quais se destacam a aplicação de medidas higiênicas gerais, como destino adequado dos dejetos, evitar andar descalço em ambientes contaminados com as larvas do helminto e cuidados na manipulação e no armazenamento dos alimentos.

C) *Strongyloides stercoralis* (estrongiloidose ou estrongiloidíase)

a) Morfologia

Diferentemente de outras espécies de nematoides, *S. stercoralis* apresenta seis estágios evolutivos. A forma parasitária é uma fêmea partenogenética, que mede de 1,7 a 2,5 mm de comprimento por 0,03 a 0,04 mm de largura, não apresentando receptáculo seminal. Os ovos elípticos, de casca fina, medindo de 50 a 58 μm de comprimento por 30 a 34 μm de largura, apresentam uma larva rabditoide e raramente são encontrados nas fezes. A larva rabditoide de *S. stercoralis* tem as mesmas características gerais dos ancilostomídeos, porém o primórdio genital é bem desenvolvido em *S. stercoralis*. No ambiente, as larvas evoluem para os estágios filarioide, adultos de vida livre ou estercorais. A principal característica da larva filarioide de *S. stercoralis* é sua extremidade posterior, que termina em ponta entalhada. Os machos medem 0,7 mm de comprimento por 40 μm de largura e extremidade posterior característica de outros machos de nematoides. As fêmeas estercorais medem de 0,8 a 1,2 mm de comprimento por 50 a 75 μm de largura e apresentam receptáculo seminal.



Figura 11. Formas evolutivas de *Strongyloides stercoralis*: A) Ovo embrionado, com larva no interior; B) Larva rabditoide encontrada nas fezes, que apresenta esôfago rabditoide com região anterior cilíndrica e alongada (corpo) (1), região intermediária estreitada (istmo) (2) e região posterior globulosa (bulbo) (3); C) Macho de vida livre encontrado no solo – a seta indica dois pequenos espículos que auxiliam na cópula; D) Fêmea de vida livre; E) fêmea partenogenética.

b) Ciclo biológico

As fêmeas partenogenéticas habitam o intestino delgado. Os ovos são depositados na mucosa intestinal e as larvas alcançam à luz intestinal. As larvas rabditoides eliminadas nas fezes dos indivíduos parasitados podem seguir dois ciclos: no ciclo direto, elas sofrem progressivas mudas e evoluem para larvas filarioides infectantes; já no ciclo indireto, as larvas rabditoides sofrem mudas e se transformam em machos e fêmeas de vida livre. Após a cópula, as fêmeas põem os ovos, liberando larvas rabditoides que evoluem para larvas filarioides infectantes. Os dois ciclos se completam com a penetração das larvas infectantes pela pele. Após atravessarem o tegumento, as larvas invadem a corrente sanguínea e realizam o ciclo pulmonar descrito para *Ascaris* e ancilostomídeos.

Pessoas que andam descalças em ambientes contaminados por fezes humanas se infectam de forma semelhante à infecção por ancilostomídeos. Outras formas de infecção são observadas na estrogiloidíase: autoinfecção externa ou exógena, quando larvas rabditoides se transformam em filarioides na região perianal e penetram no hospedeiro; e autoinfecção interna ou endógena, quando as larvas rabditoides se transformam em filarioides ainda na luz intestinal e penetram na mucosa intestinal (íleo ou cólon). Essa situação não só leva à manutenção prolongada do parasitismo, como também ao desenvolvimento da superinfecção, que pode ocorrer em indivíduos com estrogiloidíase e constipação intestinal, por causa do retardamento na eliminação das fezes. Nos indivíduos com baixa imunidade (sob o uso de drogas imunossupressoras, radioterapia, síndrome da imunodeficiência adquirida, uso de corticoides e alcoolismo crônico), pode ocorrer a autoinfecção interna, com larvas de diferentes estágios (L_1 , L_2 e L_3) em diferentes órgãos.



Figura 12. Ciclo biológico do *Strongyloides stercoralis*.

c) Relação parasito–hospedeiro

Depende do local de migração das larvas (pele e pulmões) e, principalmente, das lesões no duodeno e jejuno provocadas por fêmeas e larvas. Geralmente, a penetração cutânea é assintomática, seguida de manifestações pulmonares semelhantes a uma pneumonia atípica. Os principais sintomas envolvem a localização intestinal e de formas disseminadas em indivíduos com imunocomprometimento.

d) Diagnóstico laboratorial

○ exame de fezes é feito para pesquisar larvas em fezes sem utilizar conservantes, como os métodos de Baermann–Morales (Baermann, 1917; Morales, 1948) e Rugai, Mattos e Brisola (1954). Esses métodos se baseiam no hidro e no termotropismo das larvas. ○ exame de uma única amostra de fezes falha em detectar larvas em até 70% dos casos. Para se atingir 100% de sensibilidade do exame de fezes, é necessário o exame de, pelo menos, três amostras fecais, coletadas em dias consecutivos.

Os métodos indiretos, como o hemograma, auxiliam o diagnóstico laboratorial, pois na fase aguda da infecção a taxa de eosinófilos pode ser de até 82%, reduzindo-se para 8 a 15% na fase crônica. Os métodos imunológicos e o diagnóstico por biologia molecular têm sido empregados com sucesso na infecção por *S. stercoralis*.

e) Epidemiologia

A semelhança de transmissão com os ancilostomídeos indica que os mesmos fatores influenciam no aparecimento, manutenção e dispersão do *S. stercoralis*. A presença de fezes de animais domésticos, como os cães, contaminando o solo é mais um fator que influencia a distribuição geográfica de *S. stercoralis*.

f) Profilaxia e controle

O tratamento dos infectados é uma das medidas indicadas, porém *S. stercoralis* é o mais difícil de ser tratado. As medidas indicadas em ancilostomídeos também podem ser citadas para *S. stercoralis*.

D) *Trichuris trichiura* (tricocefalose, tricuriase)

a) Morfologia

A região anterior afilada e a posterior alargada, lembrando um chicote, são as principais características da morfologia externa dos vermes adultos de *T. trichiura*. Os vermes machos medem cerca de 3 a 5 cm de comprimento, sendo um pouco menores que as fêmeas. Os ovos medem de 50 a 55 μm de comprimento por 22 a 23 μm de largura e apresentam a forma de um barril alongado, com poros salientes e transparentes em ambas as extremidades.

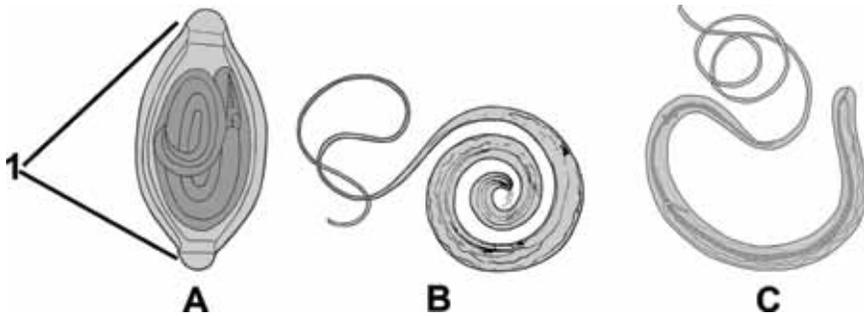


Figura 13. A) Ovo de *Trichuris trichiura*, com poros (1) nas extremidades; B) Macho de *T. trichiura* com região posterior curvada ventralmente; C) Fêmea de *T. trichiura* – note-se a região posterior retilínea.

b) Ciclo biológico

Da mesma maneira que *A. lumbricoides*, as condições ambientais favorecem o desenvolvimento de larvas infectantes no interior do ovo de *T. trichiura*. Quando ingeridos, os ovos embrionados liberam as larvas, que saem pelas suas extremidades. Diferentemente de *A. lumbricoides*, as larvas de *T. trichiura* não realizam o ciclo de Loss, permanecendo por alguns dias na mucosa duodenal e migrando, posteriormente, para a região cecal, onde completam o ciclo. Por volta de 70 a 90 dias da ingestão dos ovos embrionados, começam a aparecer ovos nas fezes.

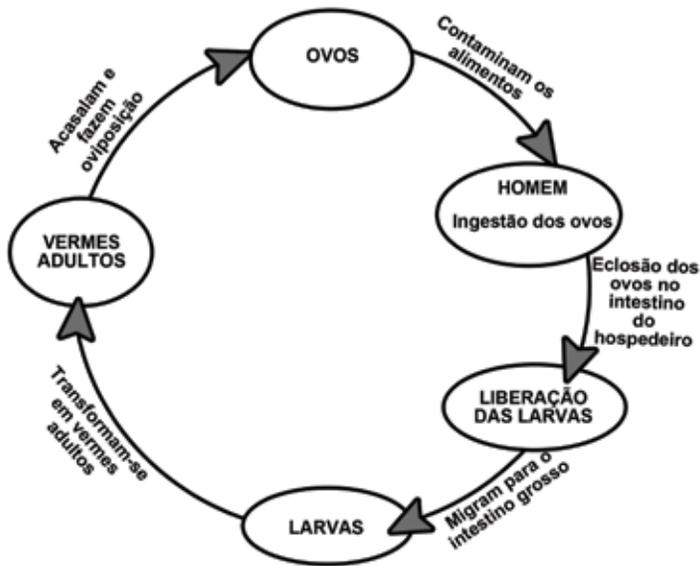


Figura 14. Ciclo biológico do *Trichuris trichiura*.

c) Relação parasito–hospedeiro

A gravidade da infecção depende da carga parasitária, da idade e do estado nutricional dos hospedeiros – em geral, crianças. Em infecções maciças, há intensa irritação intestinal que pode levar à exteriorização do reto (prolapso retal). A grande maioria dos indivíduos é assintomática. O quadro clínico dos sintomáticos é representado por dores abdominais, perda de apetite, desnutrição, insônia, nervosismo e retardamento no desenvolvimento físico.

d) Diagnóstico laboratorial

Da mesma maneira que *A. lumbricoides*, devido à grande fecundidade das fêmeas, e também por ser intermediária a densidade de seus ovos, sua pesquisa nas fezes não oferece dificuldades para a maioria dos métodos de concentração para pesquisa de ovos (técnica de Kato-Katz), nos métodos de flutuação (técnica de Faust, 1938 e técnica de Willis, 1921), sedimentação (técnica de Ritchie, 1948 e técnica de Lutz, 1919).

e) Epidemiologia

As condições ambientais interferem diretamente na distribuição geográfica de *A. lumbricoides* e *T. trichiura*. Apesar da semelhança no mecanismo de transmissão, a infecção por *T. trichiura* é menos frequente. Crianças em idade pré-escolar têm grande importância na transmissão por meio da contaminação do peridomicílio ou na maior suscetibilidade à infecção. A distribuição geográfica é cosmopolita, com maior ocorrência em lugares de clima quente e úmido onde falte o saneamento básico. O grande número de ovos produzidos pelas fêmeas, as condições de saneamento e a concentração de indivíduos são fatores que interferem na distribuição geográfica.

f) Profilaxia e controle

Recomenda-se o tratamento dos indivíduos infectados, instalação de saneamento básico e educação em saúde.

E) *Enterobius (Oxyurus) vermicularis* (enterobiose ou enterobíase)

a) Morfologia

E. vermicularis é um pequeno nematoide, mais conhecido como *Oxyurus vermicularis*, com expansões na extremidade (asas cefálicas) e uma cauda afilada como marcante característica das fêmeas. A fêmea mede cerca de 10 mm, ao passo que o macho mede cerca de 3 a 5 mm de comprimento, com a região posterior curvada ventralmente. Os ovos medem de 50 a 60 μm de comprimento por 20 a 30 μm de largura, com um dos lados ligeiramente achatado e o outro, convexo, o que lhes dá um aspecto de um D grosseiro.

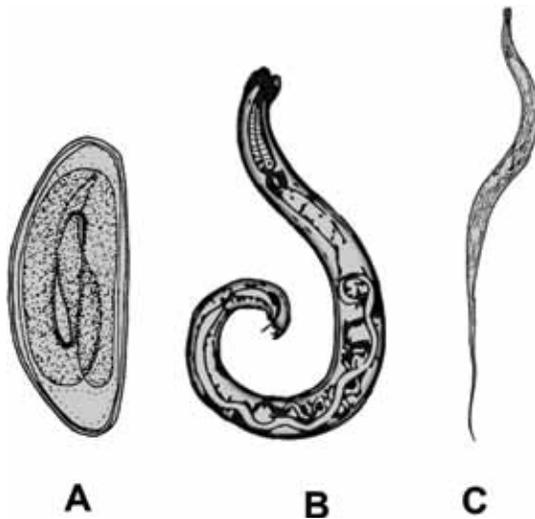


Figura 15. A) Ovo de *Enterobius (Oxyurus) vermicularis*; B) Macho de *E. vermicularis* com região posterior curvada ventralmente; C) Fêmea de *E. vermicularis*.

b) Ciclo biológico

Completamente diferente de outros nematoides intestinais, os ovos dependem pouco de condições ambientais para se tornarem infectantes, pois, quando o ovo sai do hospedeiro, no interior do mesmo encontra-se uma larva já formada. Quando ingeridos, os ovos embrionados liberam as larvas no intestino delgado, as quais se alimentam e migram para o ceco, habitat dos vermes adultos. Um a dois meses depois, as fêmeas, contendo de 10 mil a 16 mil ovos no útero, migram para a região perianal, o que ocorre principalmente à noite, devido à diminuição da temperatura nessa região. Os ovos podem ser eliminados pela ruptura do corpo da fêmea, devido ao ressecamento, ou pela oviposição através do orifício vulvar.



Figura 16. Ciclo biológico do *Enterobius vermicularis*.

c) Relação parasito–hospedeiro

Os vermes adultos provocam uma ação mecânica e irritativa no intestino. O sintoma mais frequente é coceira na região anal, causada pela presença de fêmeas na pele da região.

d) Diagnóstico laboratorial

Sintomas como prurido anal noturno e presença de vermes adultos no períneo caracterizam a infecção por *E. vermicularis*. O exame de fezes é pouco eficiente, pois os ovos não são eliminados com as fezes. O diagnóstico laboratorial é mais eficiente quando, pela manhã, sem higiene prévia, se aplica na pele da região perianal uma fita adesiva transparente (método de Graham, 1941). Os ovos aderem à superfície gomada da fita que, depois de removida da pele, é colada sobre uma lâmina de microscopia e examinada ao microscópio.

e) Epidemiologia

Diferentemente de outras parasitoses intestinais, a infecção por *E. vermicularis* é mais comum nos países de clima frio e temperado, em razão da menor frequência dos banhos e do maior confinamento em ambientes fechados. A transmissão do *E. vermicularis* também é comum em creches, orfanatos e no ambiente doméstico. A transmissão pode ser de um indivíduo para outro (heteroinfecção) ou no mesmo indivíduo (autoinfecção).

f) Profilaxia e controle

Inclui o tratamento dos infectados e, nos contactantes, a aplicação de medidas higiênicas gerais e pessoais, como banhos matinais diários, evitar sacudir as roupas de cama e de dormir dos indivíduos infectados, ferver essas roupas, cortar as unhas rente, evitar superlotação de quartos e educação sanitária doméstica e nas instituições que abrigam crianças.

3. Helintos habitat tecidual humano

A) *Schistosoma mansoni* (esquistossomose mansônica)

a) Morfologia

O verme adulto macho mede cerca de 1 cm de comprimento e apresenta, na região anterior, duas ventosas: uma oral e outra ventral. O corpo do verme é achatado dorsoventralmente, formando um tubo longitudinal, conhecido como canal ginecóforo. Nesse canal fica alojada uma fêmea, que mede 1,5 cm e que também apresenta duas ventosas, porém bem menos desenvolvidas do que as dos machos. Os ovos recém-eliminados pelas fêmeas na parede dos vasos que irrigam o intestino são imaturos. O ovo maduro mede cerca de 150 μm de comprimento por 65 μm de largura. A cercária (fase larvária) mede cerca de 500 μm de comprimento e tem cauda bifurcada.

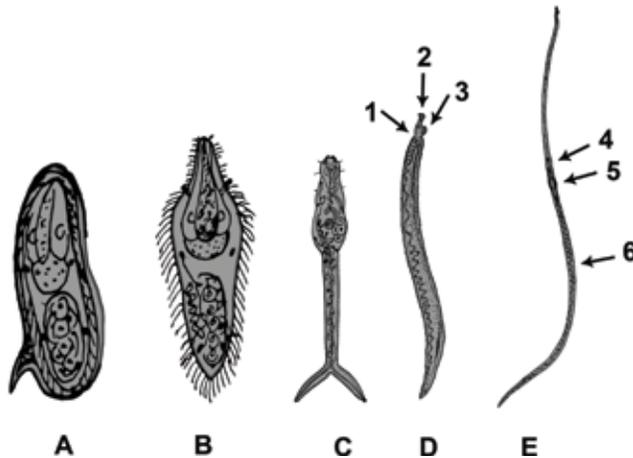


Figura 17. Formas evolutivas de *Schistosoma mansoni*: A) Ovo embrionado; B) Miracídio; C) Cercária; D) Verme adulto macho: lobos testiculares (1), ventosa oral (2), ventosa ventral ou acetábulo (3); E) Verme adulto fêmea: oótipo (4), ovário (5) e glândulas vitelínicas (6).

b) Ciclo biológico

Embora os ovos do trematódeo de *S. mansoni* sejam eliminados nas fezes, a luz intestinal não é o habitat dos vermes adultos, e sim o sistema vascular sanguíneo. Os ovos maduros são eliminados nas fezes dos hospedeiros infectados e alcançam uma coleção d'água. Sob a ação da luminosidade e da temperatura, o miracídio sai do ovo e nada no ambiente, até encontrar um molusco de água doce de certas espécies do gênero *Biomphalaria*, no Brasil, e *Bulinus*, na África. O miracídio penetra nesses moluscos, modifica a sua forma e origina milhares de cercárias que sairão do molusco sob a ação dos mesmos fatores citados para o miracídio. As cercárias nadam na água e penetram em indivíduos que entram em contato com as águas contaminadas. A penetração na pele faz que as cercárias modifiquem a sua morfologia, invadam alguns vasos sanguíneos, passem pelo coração e pelo pulmão, até atingirem o fígado. Aí ocorre a maturação sexual, e os vermes acasalados migram para os vasos que irrigam o intestino para a postura dos ovos, ainda imaturos. Depois de

cerca de uma semana, o desenvolvimento embrionário se completa, com a formação do miracídio.

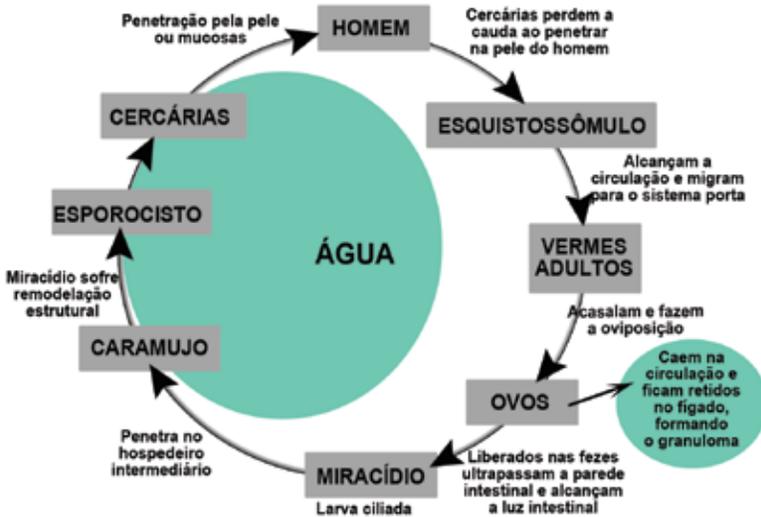


Figura 18. Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*.

c) Relação parasito-hospedeiro

A penetração da cercária provoca reação local (dermatite cercariana), acompanhada de intensa coceira. A presença dos vermes adultos vivos não provoca alterações importantes no local de fixação. Diferentemente de outros helmintos, os ovos que não saíram junto com as fezes provocarão uma resposta inflamatória – principalmente no fígado e no intestino – que, com o passar do tempo, comprometerá a fisiologia do órgão. Os sintomas podem ser pouco elucidativos, como perda de apetite e pequenos surtos diarreicos, ou mais importantes, como o aumento do fígado e do baço e insuficiência hepática.

d) Diagnóstico laboratorial

Pode ser realizado por meio de métodos qualitativos de rotina parasitológica, que detectam os ovos do helminto nas fezes. Por sua simplicidade e baixo

custo, o método da sedimentação espontânea (Lutz, 1919; ou Hoffman, e Pons e Janer, 1934) é bastante utilizado. Para se estabelecer a viabilidade ou não dos ovos, deve-se avaliar a atividade do miracídio no interior do ovo – por exemplo, na lâmina preparada pelo método da sedimentação. Outra opção é utilizar a eclosão miracidiana, colocando as fezes do paciente suspeito em um frasco de gargalo fino e expondo a parte superior do recipiente à luz. Os miracídios eclodidos aí concentrados poderão ser vistos a olho nu ou com lupa.

○ conhecimento sobre a carga parasitária é útil na determinação da intensidade da infecção, que é um fator que interfere na morbidade da esquistossomose. O método de Kato-Katz é amplamente utilizado para a estimativa da carga parasitária, a partir da determinação do número de ovos por grama de fezes (opg) de *S. mansoni*.

○ exame parasitológico de fezes tem pouca sensibilidade em indivíduos com baixas cargas parasitárias. Durante a fase crônica, há eliminação irregular de ovos nas fezes, e nas infecções unissexuadas (por um único sexo) não há produção de ovos. Dessa forma, os ensaios imunológicos são úteis para o diagnóstico. Os antígenos utilizados são vermes adultos, antígenos recombinantes e extratos de ovos. Os métodos mais significativos detectam anticorpos na fase aguda (IgM) ou crônica (IgG), destacando-se a imunofluorescência e a técnica ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*). Há também técnicas desenvolvidas para a pesquisa de antígenos circulantes no soro e técnicas de biologia molecular, baseada na pesquisa de DNA de *S. mansoni* nas fezes e no soro dos pacientes. Porém, as técnicas de diagnóstico não parasitológico não estão disponíveis para uso na rotina.

e) Epidemiologia

A instalação ou manutenção da esquistossomose depende de fontes de infecção (humanas, principalmente) que contaminem o ambiente aquático com fezes contendo ovos viáveis, coleções de água doce com moluscos suscetíveis liberando cercárias e indivíduos que tenham contato com tais coleções de

água. Trabalhadores rurais, escolares e turistas são grupos que apresentam risco na esquistossomose. A poluição do ambiente aquático do peridomicílio, dos locais de trabalho ou de recreação, é importante fonte de infecção na esquistossomose.

f) Profilaxia e controle

Consiste em instalar uma rede de saneamento básico que evite a contaminação ambiental com fezes, além do combate aos moluscos, com modificações ambientais que dificultem a sobrevivência dos mesmos, e a aplicação de drogas moluscidas. Outras ações específicas são programas de educação destinados à mudança de hábitos que possam facilitar a transmissão na população; identificação das fontes de infecção, por meio de diagnóstico laboratorial; e tratamento com esquistossomicidas.

B) *Fasciola hepatica* (fasciolose ou fasciolíase)

a) Morfologia

Como a maioria dos helmintos trematódeos, *Fasciola hepatica* é hermafrodita. O verme adulto mede cerca de 2 a 4 cm de comprimento por 1 ou 2 cm de largura. O corpo é achatado dorsoventralmente e tem o formato de uma folha vegetal oblonga. Sua cor é pardo-acinzentada. Na região anterior, possui duas ventosas, uma oral, com a abertura bucal no fundo de sua cavidade, e uma ventral.

Os ovos têm forma elíptica e casca fina, apresentando um opérculo em uma das extremidades. Medem de 130 a 150 μm de comprimento por 60 a 100 μm de largura.

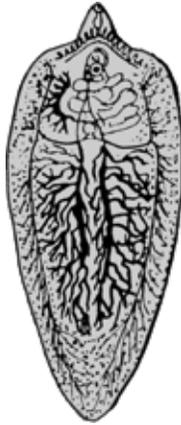


Figura 19. Verme adulto de *Fasciola hepatica*.

b) Ciclo biológico

O ciclo biológico é heteroxeno. Os vermes adultos habitam o interior da vesícula e dos canais biliares mais calibrosos do hospedeiro vertebrado. Os ovos são arrastados pela bile, misturam-se às fezes e alcançam o ambiente externo. O desenvolvimento embrionário e a formação do miracídio ocorrem quando os ovos entram em contato com a água em temperatura adequada. Após a eclosão do ovo, o miracídio começa a nadar e penetra no hospedeiro intermediário (moluscos do gênero *Lymnaea*). No interior dos moluscos, o miracídio transforma-se em esporocisto e, dentro deste, formam-se as rédias. Essas últimas podem resultar em rédias de segundo estágio ou em cercárias. As cercárias liberadas aderem com suas ventosas à vegetação aquática e com a descarga do conteúdo das glândulas cistógenas dorsais e ventrais, há formação de uma camada cística. As cercárias envoltas pelas camadas císticas se transformam em metacercárias. O hospedeiro vertebrado se infecta ao ingerir água ou vegetais aquáticos (agrião) contaminados com metacercárias. O desencistamento ocorre no intestino delgado. Liberadas dos cistos, as larvas perfuram a parede intestinal e invadem a cavidade peritoneal. A migração para o fígado continua, havendo perfuração da cápsula de Gilson, que reveste o órgão.

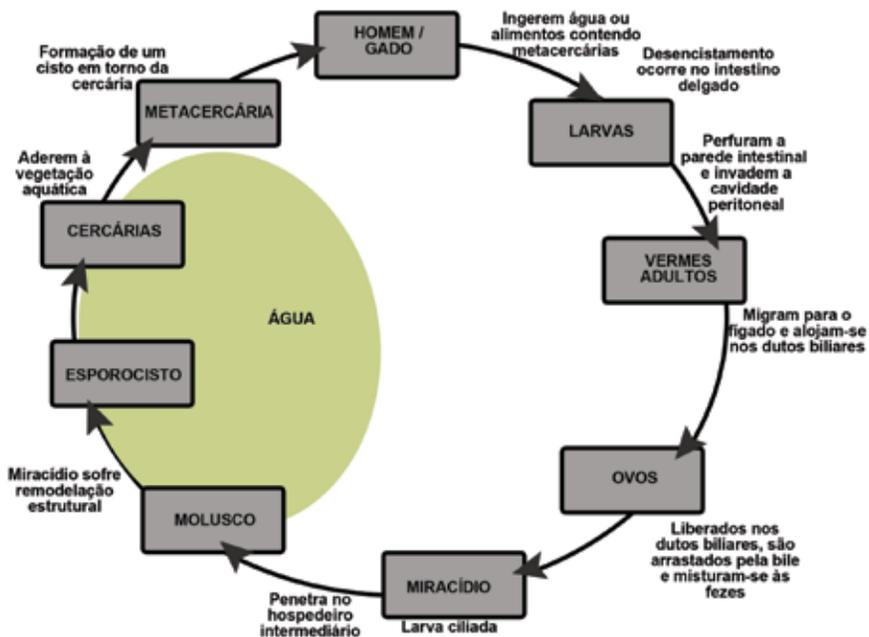


Figura 20. Ciclo biológico da *Fasciola hepatica*.

c) Relação parasito–hospedeiro

São observadas numerosas lesões na superfície do fígado, podendo produzir pequenas hemorragias, hematomas e inflamação. Há hipertrofia dos canais biliares. A sintomatologia mais característica compreende aumento doloroso do fígado, febre e acentuada eosinofilia – de 60 a 80% de eosinófilos no sangue. Dores abdominais e diarreia podem acompanhar a febre. Após algumas semanas são observadas ulcerações na parede dos canais biliares, além da destruição do epitélio, com submucosa espessada e infiltrada de elementos inflamatórios. O fígado e a vesícula biliar podem apresentar aumento de tamanho. Fenômenos obstrutivos, fibrose e calcificação das vias biliares são geralmente observados. A fasciolose em suas formas mais graves conduz à cirrose biliar, com compressão e atrofia do parênquima adjacente e insuficiência hepática.

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico clínico é caracterizado pela eosinofilia acompanhada de febre, dor e aumento do fígado. O diagnóstico seguro se dá pelo encontro de ovos nas fezes do hospedeiro definitivo. Métodos de diagnóstico imunológico, particularmente a técnica ELISA, mas também a imunofluorescência indireta, a hemaglutinação passiva e a precipitação em gel dão resultados confiáveis.

e) Epidemiologia

A fasciolose é uma zoonose cosmopolita, muito frequente em países dedicados à pecuária. No Brasil, a fasciolose ocupa extensas áreas da região Sul e Sudeste. No Rio Grande do Sul estão os maiores focos dessa parasitose.

f) Profilaxia e controle

Consumir agrião somente de hortas cercadas e irrigadas, de modo a impedir a contaminação das valas com fezes de gado. Nunca consumir agrião silvestre. Ferver ou filtrar a água em zonas endêmicas. Combate aos moluscos transmissores dessa parasitose.

C) *Wuchereria bancrofti* (filariose)

Entre os filarídeos que infectam o homem – *Wuchereria bancrofti*, *Onchocerca volvulus* e *Mansonella ozzardi* –, *W. bancrofti* é a espécie mais frequente e com maior distribuição geográfica.

a) Morfologia

Os vermes adultos são alongados e delgados. Os machos medem de 3 a 4 cm de comprimento por 0,1 mm de largura; as fêmeas medem de 7 a 10 cm de comprimento por 0,3 mm de largura. A forma larvária denominada microfilaria mede de 250 a 300 μm de comprimento e é coberta por uma de-

licada membrana externa, denominada bainha. A presença dessa estrutura, a forma e a disposição de células subcuticulares e células somáticas, permitem a distinção de outras espécies. No inseto vetor, também são encontradas microfilárias com cerca de 2 mm de comprimento.

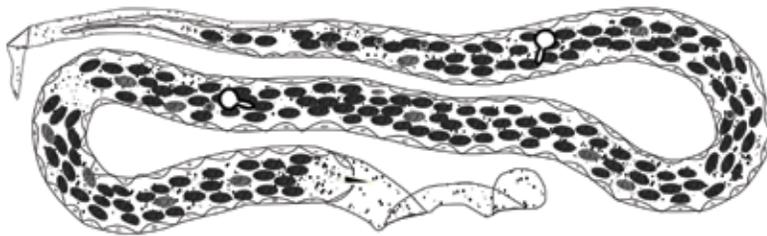


Figura 21. Desenho esquemático de microfilária de *Wuchereria bancrofti*.

b) Ciclo biológico

W. bancrofti desenvolve parte do ciclo no homem e parte em mosquitos hematófagos do gênero *Culex*, que apresentam a microfilária infectante (larva do tipo L_3) na bainha de sua tromba. Quando o mosquito pica o indivíduo, as microfilárias saem da tromba e penetram no orifício feito na pele pela picada. Da pele, as microfilárias penetram nos vasos linfáticos e sofrem duas mudanças de estágio evolutivo (L_4 e adultos jovens), antes de chegarem ao estágio adulto. Da penetração das microfilárias infectantes até o surgimento de microfilárias (produzidas e eliminadas pelas fêmeas) no sangue transcorrem cerca de 9 a 12 meses. Quando os mosquitos picam indivíduos infectados, as microfilárias circulantes são ingeridas e sofrem mudanças morfológicas até o surgimento da microfilária infectante. Uma característica importante nesse ciclo é que as microfilárias sanguíneas apresentam periodicidade: durante o dia estão localizadas nos capilares pulmonares e aumentam progressivamente em número na corrente sanguínea ao anoitecer, até atingirem o pico nas primeiras horas da manhã.

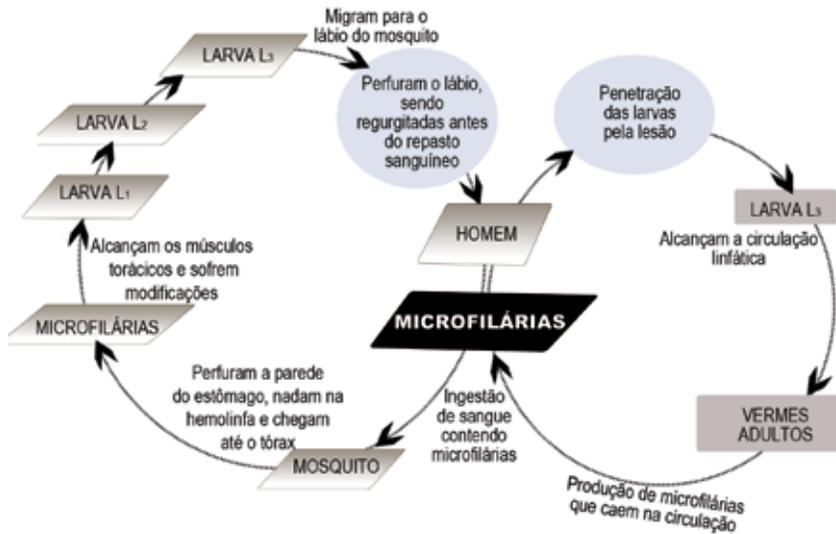


Figura 22. Ciclo evolutivo da *Wuchereria bancrofti*.

c) Relação parasito–hospedeiro

O desenvolvimento da doença clínica depende da resposta imune do hospedeiro e da infecção bacteriana secundária geradora de erisipela. Alguns pacientes permanecem assintomáticos por anos, ao passo que os sintomáticos apresentam um processo de inflamação dos vasos linfáticos, acompanhado de febre, dor de cabeça, dor local e vermelhidão na região atingida. Na fase crônica da doença, predominam os fenômenos obstrutivos, agravados pelas reações inflamatórias nos pontos de distúrbio da circulação linfática, como o edema linfático (linfoedema), no qual são encontrados, além da linfa, microfíliarias, o que estimula ainda mais a resposta inflamatória local. Esse substrato possibilita o surgimento da fibrose local, comprimindo o tegumento cutâneo, o qual, para não se romper por causa da alta pressão exercida, se hipertrofia lentamente, iniciando-se a paquidermia, em geral conhecida como elefantíase. A elefantíase pode ocorrer em várias regiões do corpo, porém predomina nos membros inferiores, na genitália e, em menor grau, nos membros superiores, escroto e mama. A estase sanguínea e o processo de

ruptura tegumentar propiciam a instalação de frequentes infecções bacterianas tegumentares secundárias, o que complica ainda mais o quadro clínico.

d) Diagnóstico laboratorial

○ diagnóstico parasitológico da filariose é feito pela pesquisa de microfírias no sangue periférico no período noturno. A técnica mais utilizada é a gota espessa de sangue colhido por punção capilar. Também se utilizam técnicas de concentração, como a filtração em membrana de policarbonato e a técnica de Knott (1939). Como a detecção de anticorpos não é indicada na filariose, a alternativa é realizar a pesquisa de antígenos solúveis pela técnica de ELISA ou por imunocromatografia rápida. Técnicas de biologia molecular para a pesquisa de DNA do helminto, como a da reação em cadeia da polimerase (PCR), são bastante sensíveis e específicas.

e) Epidemiologia

As principais áreas endêmicas estão na Ásia, África e Índia. No Brasil, a transmissão é urbana e focal, e concentra-se em Recife e seus arredores (Olinda, Paulista e Jaboatão dos Guararapes). Os principais fatores determinantes da transmissão são presença de fêmeas do mosquito *Culex quinquefasciatus*, pacientes com microfírias circulantes e longo tempo de moradia em área endêmica.

f) Profilaxia e controle

A implantação de sistema adequado de saneamento básico, a drenagem de canais e a recuperação de áreas degradadas, ao diminuírem os possíveis criadouros dos mosquitos, reduzem o risco de infecção. ○ combate às larvas do mosquito deve ser feito com larvicidas químicos. ○ tratamento da população humana visa interromper a transmissão e a evolução da doença. Preconiza-se a higiene diária, com água e sabão, do membro atingido, a fim de evitar infecções bacterianas secundárias, que agravam o quadro.

D) *Onchocerca volvulus* (oncocercose ou oncocercíase ou filariose subcutânea)

a) Morfologia

Os vermes adultos são longos, delgados e apresentam uma cutícula com estriação transversal, tendo a fêmea entre 30 e 80 cm de altura por 0,3 a 0,4 cm de diâmetro e o macho, de 3 a 5 cm de altura por 0,15 a 0,2 cm de diâmetro. As microfilárias, encontradas na pele do hospedeiro definitivo (homem) a qualquer hora, têm de 150 a 370 μm de comprimento. São desprovidas de bainha, o que as diferencia das microfilárias de *Wuchereria*, e apresentam núcleos somáticos, corados em preparações com Giemsa.



Figura 23. Desenho esquemático de microfilárias de *Onchocerca volvulus*.

b) Ciclo biológico

O ciclo biológico é heteroxeno. No Brasil, o único hospedeiro definitivo é o homem. Os vermes adultos habitam nódulos subcutâneos, geralmente encapsulados, chamados oncocercomas. Os hospedeiros intermediários são insetos do gênero *Simulium* (borrachudos). Durante o repasto sanguíneo, os insetos ingerem as microfilárias presentes na pele ou nos oncocercomas. As larvas infectantes (L_3) surgem depois de uma a três semanas de desenvolvimento na musculatura torácica e migram para a probóscide do inseto. Durante o novo repasto sanguíneo, as larvas presentes em sua probóscide penetram ativamente através da pele do hospedeiro definitivo, onde os adultos se desenvolvem de

6 a 12 meses depois. O ciclo se completa em 10 a 15 meses, quando já serão encontradas as microfílias na pele do hospedeiro.

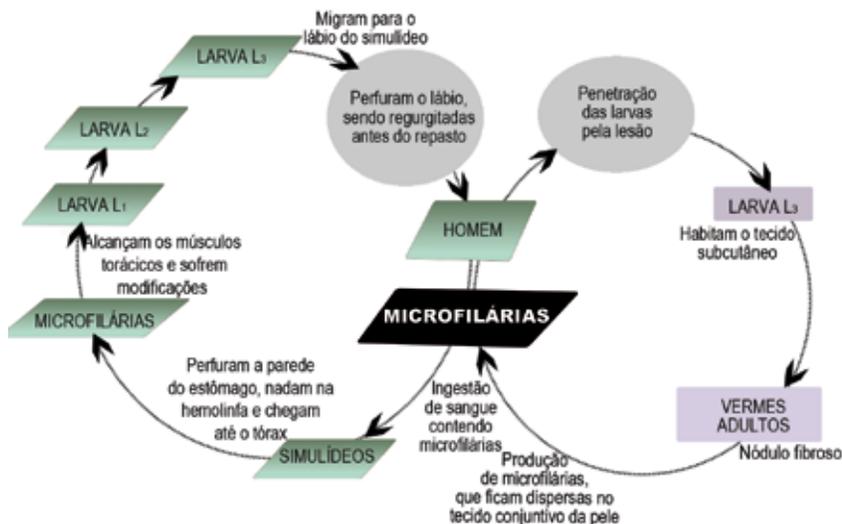


Figura 24. Ciclo biológico do *Onchocerca volvulus*.

c) Relação parasito–hospedeiro

A localização dos parasitos adultos encapsulados e normalmente envelados por longos períodos em tecido subcutâneo determina nódulos constituídos por camadas concêntricas que têm como substrato inflamatório crônico, contendo plasmócitos, eosinófilos, fibroblastos, células gigantes e granulomas. Tais lesões, denominadas oncocercomas, determinam necrose local, com espessamento nodular que se intensifica de forma proporcional à intensidade lesional e ao tempo de parasitismo, medindo inicialmente de 1 a 8 mm e alcançando pouco mais de 10 mm com o passar dos anos; após a morte dos adultos, entra em progressiva regressão, até confinar-se à massa fibrótica residual, que constitui a seqüela de tais lesões. A longevidade parasitária pode chegar a períodos de 12 a 15 anos, porém sua capacidade reprodutiva cai progressivamente com o tempo de infecção. Existe a possibilidade do encontro de adultos entre os espaços nodulares,

camadas musculares e em locais próximos a ossos e articulações. Quando machos e fêmeas estão presentes nos oncocercoma, ocorre a fecundação das últimas, em períodos que variam de um a quatro ciclos reprodutivos anuais, produzindo-se em cada um deles de 200 mil a 400 mil larvas microfilárias com grande mobilidade, o que lhes possibilita chegar ao tecido conjuntivo, com vida média de 6 a 30 meses.

As lesões cutâneas determinadas pela presença maciça de microfilárias acarretam distúrbios inflamatórios que, mesmo após a morte das mesmas, determinam aumento de fibroblastos e polissacarídeos entre as fibras colágenas. Isso possivelmente explica o edema epitelial, a despigmentação e a substituição progressiva do tecido dérmico normal por tecido fibroso. Na fase crônica, o edema epitelial diminui, mas a hiperqueratose e a despigmentação cutânea evoluem continuamente, ocorrendo simultaneamente atrofia de glândulas sebáceas e folículos pilosos, acarretando a flacidez cutânea denominada geriatrodermia. Podem ocorrer formas mais graves, com intenso prurido, erupção papular e despigmentação localizada.

Não é incomum a ocorrência de lesões linfáticas em decorrência da localização de microfilárias nesses locais, determinando fibrose em grau variável e possibilidade de obstruções linfáticas, com linfedema localizado. A localização ocular de microfilárias determina as mais graves lesões ocasionadas por essa parasitose; elas ocorrem principalmente após a morte larvar e são cercadas por eosinófilos e linfócitos. Essas lesões podem evoluir, em razão da reatividade do hospedeiro e do número de lesões, para uma resolução sem sequelas ou para lesões permanentes na córnea, íris, coróide, retina e nervo óptico. Na córnea, após lesões inflamatórias puntiformes, pode ocorrer cronicidade do processo de invasão fibroblástica e conseqüente perda de visão.

d) Diagnóstico laboratorial

A pesquisa de microfilárias por biópsia, seja cutânea, seja de nódulos subcutâneos, com a retirada de fragmento local e sua colocação em solução fisiológica em lâmina, é a forma mais sensível de pesquisa parasitária. O exame

oftalmológico nas formas oculares pode evidenciar as microfilárias na câmara anterior do globo ocular. A pesquisa de anticorpos pelos métodos ELISA e de hemaglutinação é normalmente utilizada para pesquisas epidemiológicas.

e) Epidemiologia

A oncocercose está dispersa pela maioria dos países da África, Ásia, América Central e América do Sul. Nesse último continente, já foi identificada na Colômbia, na Venezuela, nas Guianas e no Brasil. Em nosso país, Roraima e Amazonas são áreas endêmicas dessa filariose. O homem é o hospedeiro definitivo de maior importância, porém chimpanzés e gorilas já foram identificados como reservatórios não humanos da oncocercose na África. Os seus transmissores (hospedeiros intermediários) estão representados por simuliídeos, sendo que, no Brasil, as espécies mais relevantes são o *Simulium guianensis* e o *Simulium oyupocrene*. Os simuliídeos fazem sua oviposição exclusivamente em águas bem oxigenadas, e apresentam área de dispersão próxima dos rios que serão a sede de seu ciclo de reprodução. A maioria das transmissões ocorre na margem desses rios.

f) Profilaxia e controle

A profilaxia dessa parasitose é dificultada pelas peculiaridades do ciclo vital de seus transmissores, porém as linhas básicas de controle devem buscar o tratamento dos homens parasitados, a retirada de possíveis sedes de ovos, larvas e pupas dos rios (galhos, troncos e afins) e o combate aos espécimes adultos.

E) *Echinococcus granulosus* (hidatidose cística) e *Echinococcus vogeli* (hidatidose policística)

Apesar de constituir parasitose intestinal, por apresentar adulto em intestino delgado de canídeos, no homem a doença somente ocorre como resultado da infecção pelo estágio larvar de tenídeos (hidátide ou cisto hidático) do gênero *Echinococcus*. A hidatidose é uma das parasitoses humanas mais importantes do ponto de vista de saúde pública, existindo em todos os continentes.

a) Morfologia

O verme adulto mede de 4 a 8 mm em *E. granulosus* e cerca de 12 mm em *E. vogeli*. Ambos possuem o corpo dividido em escólex globoso, com quatro ventosas e um rostro armado de duas fileiras de ganchos; colo ou região proglotogênica, delgado e curto, e o estróbilo, formado por três ou quatro proglotes, das quais apenas a última é grávida. Os cistos hidáticos (forma larvar), vulgarmente chamados de vesícula aquosa ou bolha d'água, são tipicamente uniloculares em *E. granulosus* e policísticos em *E. vogeli*. Apresentam-se como uma esfera cheia de líquido transparente. Externamente, são compostos por membrana adventícia, que é uma reação tecidual do órgão parasitado à presença da larva; membrana anista, constituída de escleroproteínas; e membrana germinativa, de natureza celular, responsável por secretar o líquido hidático e em cuja parede interna brotam as vesículas prolíferas com os protoscóleces. Essas vesículas podem estar aderidas à parede por um pedículo, ou podem se soltar e ficar livres no líquido hidático, compondo a areia hidática. Os ovos são semelhantes aos do gênero *Taenia* sp., medindo de 32 a 38 μm de comprimento por 25 a 35 μm de largura. Apresentam membrana externa radiada (embrióforo) e uma larva (oncosfera ou embrião hexacanto) com seis ganchos.



Figura 25. Verme adulto de *Echinococcus* sp.

b) Ciclo biológico

○ *E. granulosus* possui um ciclo de vida heteroxeno. A forma adulta encontra-se fixada às vilosidades da mucosa do intestino delgado de canídeos domésticos e silvestres, como lobos e chacais (hospedeiros definitivos). As proglotes grávidas, com várias centenas de ovos, são eliminadas com as fezes do animal à medida que se desprendem do estróbilo. Esses ovos, contendo a oncosfera, são ingeridos pelo hospedeiro intermediário (bovinos, ovinos, suínos, equinos...) no solo contaminado. Quando a oncosfera é liberada no intestino delgado desses hospedeiros, atravessa as paredes do intestino e penetra nos vasos sanguíneos e linfáticos, através dos quais é levada aos tecidos do organismo. Nos hospedeiros intermediários, a larva do helminto (metacestóide) se desenvolve mais frequentemente no fígado (75%) e no pulmão (10%).

○ *E. vogeli* realiza seu ciclo biológico em hospedeiros definitivos, como o cão selvagem (*Speothos venaticus*) e o cão doméstico (*Canis familiaris*), nos quais se desenvolve o verme adulto, e em hospedeiros intermediários, tais como pacas (*Cuniculus paca*) e cutias (*Dasyprocta aguti*), nos quais se desenvolve a forma larvar (cisto hidático). Por ser um hospedeiro acidental no ciclo de ambas as espécies, o homem ingere ovos presentes no ambiente ou se contamina no contato íntimo com cães infectados. O ciclo no interior do homem é semelhante ao que ocorre nos hospedeiros intermediários naturais: a forma larvar de *E. granulosus* (fig. 26) se desenvolve no fígado e no pulmão e, no caso de *E. vogeli* (fig. 27), desenvolve-se quase que exclusivamente no fígado.

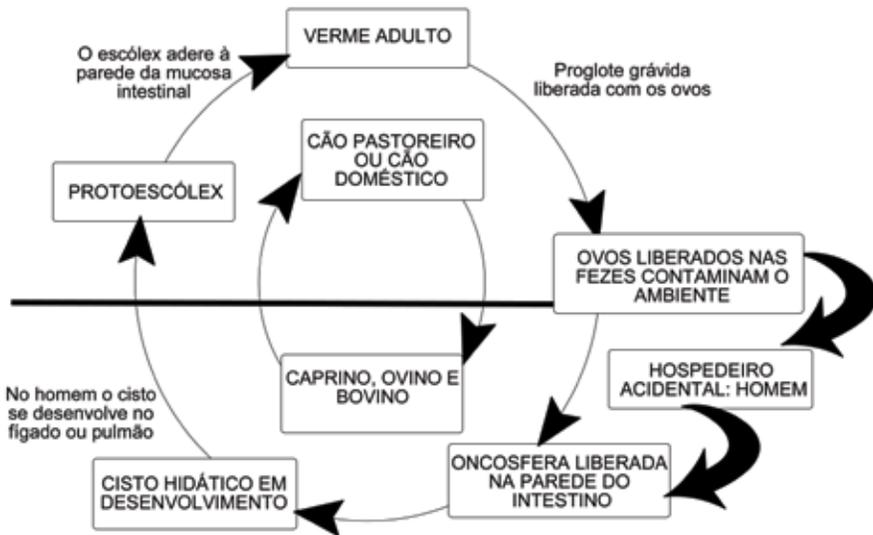


Figura 26. Ciclo biológico de *Echinococcus granulosus*.

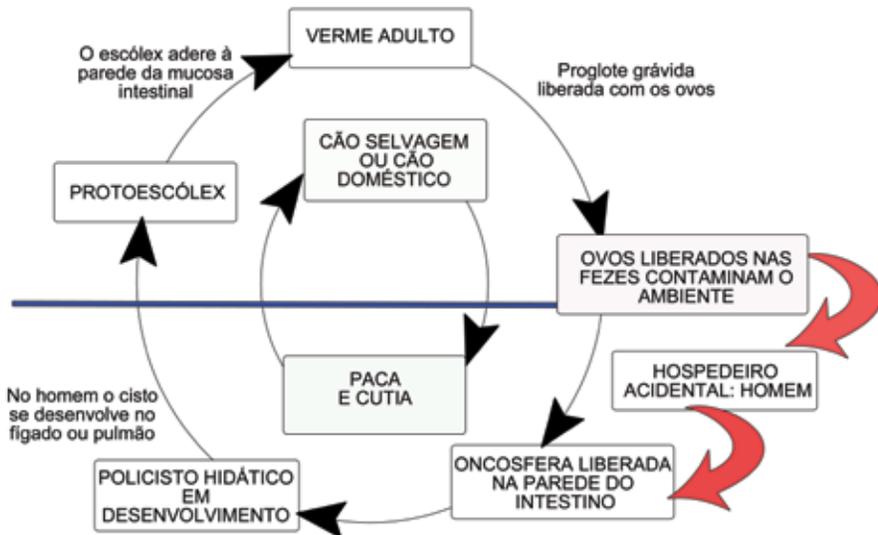


Figura 27. Ciclo biológico de *Echinococcus vogeli*.

c) Relação parasito–hospedeiro

Os indivíduos infectados permanecem assintomáticos até que os cistos comecem a produzir uma compressão nas estruturas dos órgãos afetados ou circunvizinhos, ou se tornem palpáveis. Os sinais e sintomas apresentados dependem da localização anatômica da larva. O fígado e o pulmão constituem os órgãos fortemente envolvidos na infecção em humanos e em animais. As hidátides encontradas no fígado têm estrutura similar às encontradas em outros órgãos, porém a reação do hospedeiro (pericisto) é particularmente intensa nesse órgão. Na forma larvar, a estrutura cística, na superfície e no interior do fígado, apresenta proliferação endógena e exógena de vesículas que, sucessivamente, terminam por envolver outros órgãos abdominais.

d) Diagnóstico laboratorial

A hidatidose humana é uma das poucas infecções parasitárias para as quais o diagnóstico laboratorial básico é principalmente imunológico. O imunodiagnóstico, baseado na detecção de anticorpos circulantes contra os antígenos do cisto hidático, é de grande importância no diagnóstico da hidatidose, complementando o diagnóstico clínico em pacientes que apresentam manifestações ou imagens de cistos hidáticos. Quando, clinicamente, o paciente é encaminhado para cirurgia de coleta do líquido hidático, o diagnóstico morfológico é realizado pelas medidas dos ganchos rostelares.

Existem métodos sorológicos para o diagnóstico complementar da hidatidose: ensaio imunoenzimático (ELISA), *Immunoblotting* e reação em cadeia de polimerase (PCR). Recentemente, está sendo utilizado o método de *Immunoblotting*, que permite observar a reação dos anticorpos presentes no soro de um paciente diante de proteínas antigênicas do líquido hidático.

e) Epidemiologia

A prevalência do *E. granulosus* é maior em regiões com criação de ovinos e bovinos. A hidatidose cística é considerada altamente endêmica. Atualmente é encontrada em regiões do hemisfério norte (Alasca e Canadá), em quase

todos os países da Europa, no continente africano (Marrocos, Argélia, Tunísia, Líbia, Sudão, Etiópia, Somália, Quênia, Uganda e Tanzânia), na Oceania (Austrália e Nova Zelândia) e na América Latina (áreas rurais do Chile, Argentina, Uruguai e extremo sul do Brasil). Os casos de hidatidose humana quase sempre ocorrem em locais de alta taxa de infecção de carneiros ou bovinos. O hábito de alimentar cães de pastoreio com vísceras de carneiros em abatedouros e também o fato de cães errantes se alimentarem de tais vísceras facilitam a transmissão da parasitose.

A hidatidose policística provocada por *E. vogeli*, também denominada hidatidose neotropical, ocorre quase que exclusivamente em regiões tropicais. Já foram relatados casos no Panamá, Colômbia, Equador e Venezuela. No Brasil, houve relato de casos nas regiões vizinhas ao estado do Amazonas, no Centro-Oeste e na região Sudeste. Os casos de hidatidose policística humana estão relacionados com o hábito de caçar pacas. O hábito de alimentar os cães com as vísceras das pacas facilita a transmissão da parasitose.

f) Profilaxia e controle

O elo mais frágil na cadeia epidemiológica é constituído pela infecção dos cães com vísceras contaminadas. Bastaria, portanto, impedir que os cães se alimentassem de vísceras cruas para que rapidamente se esgotassem as fontes de ovos de *Echinococcus*, visto que os helmintos não duram mais do que alguns meses na fase estrobilar. As medidas profiláticas são: programa adequado de esclarecimento e educação sanitária, interdição de abates clandestinos, controle sanitário do gado abatido, diagnóstico e tratamento anti-helmíntico de cães parasitados e aperfeiçoamento de técnicas agropecuárias. Medida importante na hidatidose humana é evitar o contato íntimo com cães que tenham se alimentado de vísceras cruas de bovinos ou ovinos.

F) *Cysticercus cellulosae* (cisticercose)

a) Morfologia

É uma vesícula translúcida que contém um líquido claro como água e pode atingir 15 mm de comprimento por 7 a 8 mm de largura. Em seu interior, a estrutura que mais se destaca é o escólex da futura tênia, com quatro ventosas e uma dupla coroa de ganchos.

b) Ciclo biológico

O homem, acidentalmente, pode contaminar-se com alimentos ou água contendo ovos de *T. solium*. Nesse caso, os embriões (oncosferas) saem do ovo no intestino delgado, fixam-se em determinados órgãos – tais como olhos, cérebro, coração e no tecido subcutâneo – e transformam-se em larvas denominadas cisticercos, ocasionando a cisticercose.

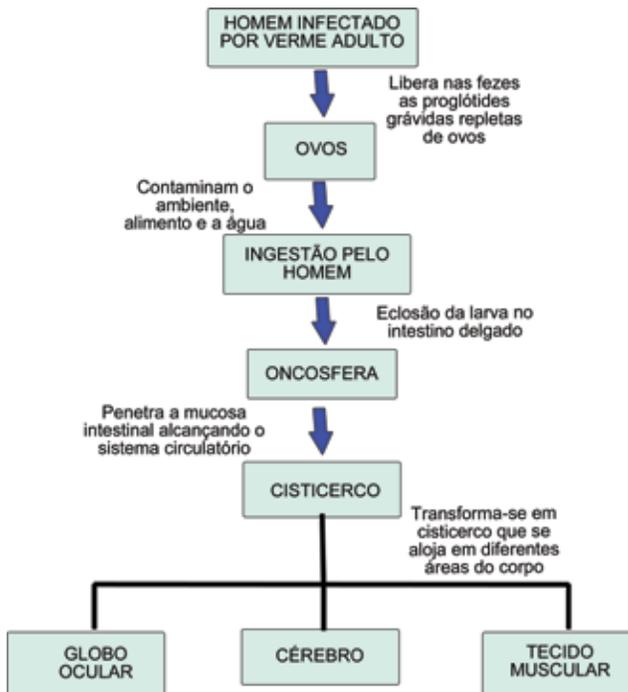


Figura 28. Ciclo biológico do *Cysticercus cellulosae*.

c) Relação parasito-hospedeiro

A presença de larvas causa a cisticercose; dependendo da localização das mesmas, a sintomatologia será diferenciada. O processo patogênico é atribuível a dois fatores principais: o primeiro é a compressão mecânica e o deslocamento de tecidos, ou estruturas, decorrentes da localização e do crescimento do cisticerco, podendo obstruir, por exemplo, o fluxo normal de líquidos orgânicos, como o líquido cefalorraquidiano; o segundo é o processo inflamatório que geralmente envolve o parasito e que pode, eventualmente, estender-se a estruturas vizinhas.

Os sintomas e as eventuais sequelas surgem meses ou até anos após o início da infecção. As manifestações clínicas causadas pelo cisticerco dependem não somente da localização, bem como do número de cisticercos, de seu estágio de desenvolvimento e das respostas orgânicas do hospedeiro humano.

O cisticerco é mais frequentemente encontrado no sistema nervoso central. As lesões presentes nos hemisférios, ventrículos e base do cérebro podem causar principalmente cefaleia, vômitos, convulsões, desordem mental com formas de delírio, prostração, alucinações, hipertensão intracraniana e demência. A neurocisticercose tem longa evolução que afeta a qualidade de vida do paciente, com importantes consequências socioeconômicas. Na cisticercose ocular, podem surgir reações inflamatórias exsudativas que promoverão diversos graus de agressão, podendo levar à cegueira. As cisticercoses muscular e subcutânea provocam poucas alterações clínicas.

d) Diagnóstico laboratorial

Para saber a localização do cisticerco ou conhecer o seu estágio evolutivo, podemos utilizar os seguintes exames diagnósticos: imagens – raios X, ressonância magnética, tomografia computadorizada etc. (nas imagens radiológicas são encontrados os cisticercos calcificados); biópsias; exames de fundo de olho; métodos de imunodiagnóstico – ELISA, *Western-blot*, imunofluorescência indireta etc. – para a detecção de anticorpos no líquido cefalorraquidiano e no soro; e pesquisa de DNA.

e) Epidemiologia

A cisticercose humana é um importante problema de saúde pública em áreas carentes de condições sanitárias. Curiosamente, a infecção também preocupa países desenvolvidos que recebem migrantes de áreas endêmicas. A cisticercose é frequente na Ásia, África e América do Sul em áreas onde as condições de saneamento básico sejam deficientes. O destino inadequado de fezes humanas também pode contaminar hortaliças, posteriormente consumidas pelos indivíduos.

f) Profilaxia e controle

Os indivíduos com sintomatologia ou suspeita de teníase devem realizar o procedimento para diagnóstico laboratorial e ser tratados. Medidas de higiene pessoal, como banhos e lavagem frequente das mãos, principalmente depois das evacuações, antes de manipular alimentos e antes das refeições, são práticas fundamentais para o controle da doença. Lavar bem os alimentos também contribui para a profilaxia e o controle da cisticercose.

4. Zoonoses provocadas por helmintos

São parasitoses ou doenças provocadas por cestoides e nematoides que normalmente infectam animais e que, eventualmente, são transmitidas para o homem. Sua ocorrência se deve ao contato com animais domésticos infectados, aos métodos de produção de alimentos e a hábitos culturais e higiênicos. Devido à sua localização tecidual, o diagnóstico laboratorial é feito por métodos imunológicos, moleculares ou por imagens.

A) *Toxocara canis* (toxocaríase, larva migrans visceral humana)

a) Morfologia

T. canis pertence à mesma família do *A. lumbricoides*. O verme adulto macho mede de 4 a 10 cm de comprimento e a fêmea, de 6 a 18 cm de

comprimento. Além dos três lábios que precedem a boca, possuem duas expansões cervicais, em forma de aleta. Os ovos são esféricos e medem de 75 a 90 μm .

b) Ciclo biológico

Os vermes adultos são encontrados no intestino delgado de cães. As fêmeas produzem grande quantidade de ovos, que são expelidos nas fezes dos cães. Assim como *A. lumbricoides*, os ovos eliminados são imaturos e dependem de condições favoráveis de umidade, temperatura e oxigenação para embrião dentro do ovo e formação da larva L_3 infectante. O embrião no solo dura em torno de 28 dias. Os animais jovens se infectam com os ovos embrionados que eclodem no intestino. As larvas realizam o ciclo de Loss, atravessam a parede intestinal e alcançam a circulação, passando pelo fígado, coração e pulmão. Ao chegarem ao intestino, crescem e se desenvolvem em vermes adultos, o que dura em torno de quatro semanas. Se uma cadela infectada engravida, as larvas que estão realizando o ciclo de Loss são ativadas e invadem a placenta, infectando o feto e transformando-se em vermes adultos. Depois do nascimento, o ciclo recomeça, e cãesinhos com três semanas de idade já eliminam ovos nas fezes.

O homem se infecta ingerindo ovos embrionados presentes no solo ou em alimentos e água contaminada. A eclosão e a liberação das larvas ocorrem no intestino delgado. Essas invadem a mucosa e atingem a circulação, sendo levadas para diversos órgãos e tecidos (fígado, pulmão, músculos, olhos, rins e coração).

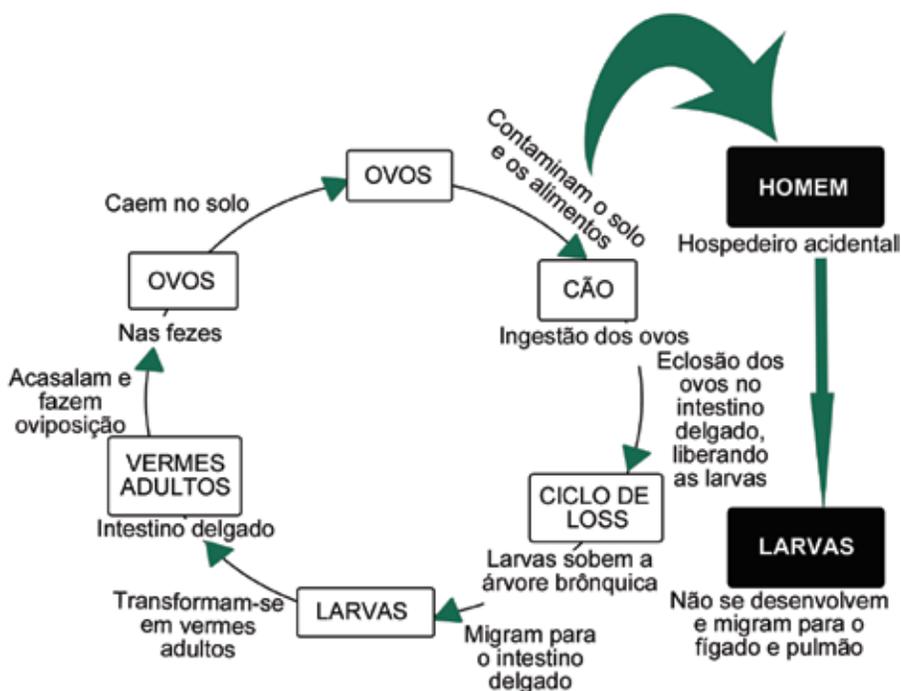


Figura 29. Ciclo biológico do *Toxocara canis*.

c) Relação parasito–hospedeiro

A migração das larvas é acompanhada por hemorragia e inflamação. Ao redor das larvas que ficam retidas nos órgãos há formação de granulomas. O período de sobrevivência das larvas pode variar de alguns dias a vários meses, na dependência de resposta tecidual eficiente. Após alguns dias, ocorre significativa redução do substrato inflamatório, com reparo local normalmente regenerativo. Qualquer tecido pode ser sede de lesões, porém fígado, pulmões, encéfalo, globo ocular e gânglios linfáticos são os locais mais afetados. Tais agressões frequentemente determinam inflamação e necrose de capilares e tecidos locais circunjacentes. As principais alterações sintomáticas são febre, palidez, hepatite, hepatomegalia (aumento do fígado), esplenomegalia (aumento do baço), pneumonia parasitária com tosse, dificuldade respiratória, miocardite, nefrose e lesões cerebrais, do globo ocular e ganglionares. As

queixas mais comuns no acometimento ocular são dor e diminuição da acuidade visual. Na maioria dos casos, os indivíduos não apresentam sintomas.

d) Diagnóstico laboratorial

Há leucocitose e eosinofilia. A pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara* em soro e líquido é feita pela técnica de ELISA. Mais recentemente, foi desenvolvida a técnica de *Immunoblotting*, que permite o diagnóstico e o controle de cura da infecção.

e) Epidemiologia

A síndrome da *larva migrans* visceral geralmente está associada à contaminação de praças públicas, parques e praias com ovos de *T. canis*. Caixas de areia em parques e creches também podem funcionar como fontes de infecção. Por causa do intenso contato com essas fontes de infecção, frequentemente são as crianças as mais acometidas pela síndrome. Ter cães adultos em casa não parece ser fator importante; entretanto, a presença de filhotes aumenta a probabilidade de ocorrer infecção humana. Não há certeza se a atividade profissional de veterinários, tratadores e capturadores de cães aumenta o risco de infecção por *T. canis*.

f) Profilaxia e controle

Medidas de controle sanitário que diminuam a contaminação ambiental pelos ovos do helminto devem ser estimuladas. Proprietários de cachorros devem recolher as fezes dos animais, evitando que fiquem abandonadas em locais públicos. Evitar que os animais defequem em praças públicas, parques, praias e caixas de areia. Para a redução da contaminação ambiental, recomenda-se o tratamento dos cães com anti-helmínticos.

B) *Larva migrans* cutânea (dermatite serpiginosa)

Essa denominação se refere exclusivamente à migração de larvas, em terceiro estágio, de *Ancylostoma braziliense*, *A. caninum*, *A. tubaeforme* e *Uncinaria*

stenocephala no extrato epitelial da pele humana. A *larva migrans* cutânea é conhecida também como “bicho geográfico” ou “bicho das praias”.

a) Morfologia

O verme adulto de *Ancylostoma braziliense* caracteriza-se por apresentar uma cápsula bucal com apenas um par de grandes dentes ventrais, além de outro par bem rudimentar. Os machos medem de 5 a 7,5 mm de comprimento e as fêmeas, de 6,5 a 9 mm.

b) Ciclo biológico

Os vermes adultos habitam o intestino delgado dos cães parasitados. Os ovos são eliminados nas fezes. No solo, as larvas rabditoides eclodem e contaminam o ambiente. Após duas mudas, as larvas rabditoides transformam-se em filarioides infectantes. Essas penetram na pele humana, mas não alcançam a circulação. As larvas vivem por longo período na camada epitelial, e sua atividade fica reduzida a caminhar ao acaso, abrindo um túnel.

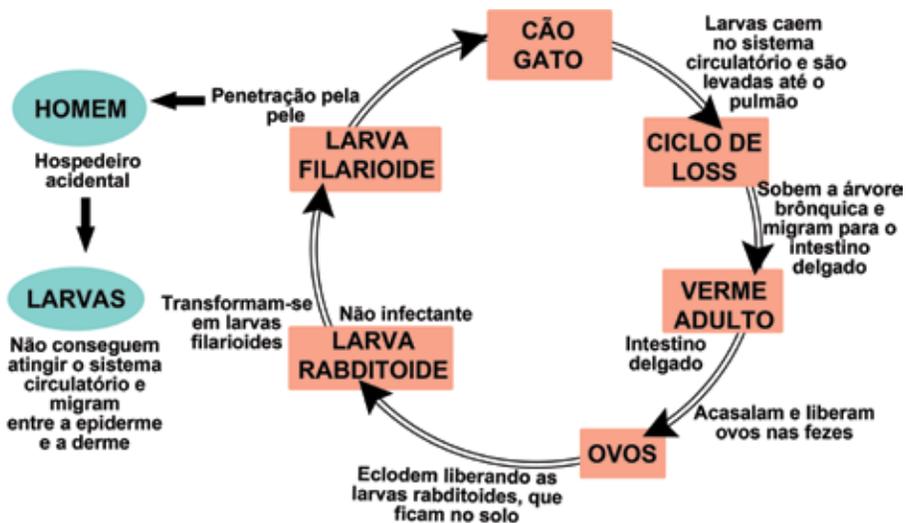


Figura 30. Ciclo biológico da *Larva migrans* cutânea.

c) Relação parasito–hospedeiro

O mecanismo de transmissão é exclusivamente ativo cutâneo, por larvas dos agentes acima mencionados. A movimentação das larvas é possibilitada pela liberação de enzimas e pela destruição mecânica da camada de Malpighi, determinada pelo movimento em direção ao estrato epitelial, normalmente não perfurando o tecido subcutâneo, determinando trajeto superficial que, em um dia, pode chegar a 15 cm, acarretando inicialmente aparecimento de pápulas e pequenos nódulos, que progridem para lesões serpentinais. Como reação a essas lesões, ocorre processo inflamatório, que, na fase inicial da primoinfecção, tem predominância de eosinófilos e macrófagos, porém em pequeno número, o que determina macroscopicamente pequenos pontos eritematosos. Na continuação do processo ou nas reinfecções, a resposta imunológica à migração larvar determina aumento significativo no número de eosinófilos, macrófagos e linfócitos e na intensidade de sua resposta, aumentando a necrose local, o que permite que o processo, sinuoso e irregular, com frequente presença de vesículas e queixa de prurido de intensidade variável, seja facilmente notado na ectoscopia. As lesões escoriativas são porta de entrada para agentes de infecções bacterianas secundárias. Caso essas últimas não ocorram, após alguns dias as lesões tendem a significativa redução de substrato inflamatório, com reparo local normalmente regenerativo.

d) Diagnóstico laboratorial

A biópsia de tegumento no ponto mais distal da lesão é a opção diagnóstica mais sensível para a detecção das larvas, porém, pela característica invasiva da técnica, utiliza-se a ectoscopia das lesões, baseada no aspecto macroscópico das mesmas, para a confirmação etiológica da síndrome.

e) Epidemiologia

Apesar de ser uma síndrome cosmopolita, o número de casos relatados é muito pequeno quando comparado com a prevalência esperada. Possivelmente isso se deve à subnotificação dos casos diagnosticados e às dificuldades

de confirmação diagnóstica, principalmente em casos de infecção bacteriana secundária ou por múltiplas larvas. As principais fontes de infecção são o parasitismo de cães e gatos – em nosso país, principalmente por *A. braziliense*. Os locais onde existe maior contaminação por larvas potencialmente determinantes de *larva migrans* cutânea são o solo arenoso, principalmente na orla das praias, jardins e caixas de areia. O local das praias atingido pela água do mar é inadequado para a sobrevivência da larva; além disso, pelas condições climáticas do nosso país, mesmo em locais livres da água marinha as larvas principalmente no verão são destruídas pela desidratação, ao contrário do que ocorre nos países de clima temperado ou frio da Europa e América do Norte, onde as praias são a principal fonte (reservatório ambiental) de infecção. No Brasil, os parques públicos e outros locais com solo arenoso constituem a principal fonte de contato com tais larvas. Em alguns locais onde a população de cães é satisfatoriamente controlada do ponto de vista sanitário, os gatos, por seus hábitos de enterrar suas excretas, constituem os mais importantes elos da cadeia infectiva. As faixas etárias de pré-escolares e escolares, por terem maior contato com os locais mencionados, são as mais atingidas. No entanto, por não existir proteção nas reinfecções, todos podem ter tal síndrome.

f) Profilaxia e controle

Em virtude das características epidemiológicas acima expostas, a profilaxia da *larva migrans* cutânea é de difícil execução, baseando-se somente em medidas gerais de controle: tratar sistematicamente as infecções de ancilostomídeos parasitos de cães e gatos, capturar e eliminar animais sem proprietários, impedir o contato de crianças com locais arenosos que possam sofrer contaminação de cães e gatos e cobrir caixas recreativas de areia após os horários de recreação.

Bibliografia consultada

- AMATO, J. F. R. *Manual de técnicas para a preparação de coleções zoológicas*. V. 8.: Platelintos (temnocefálicos, trematódeos, cestoides, cestodários) e acantocéfalos. São Paulo: Sociedade Brasileira de Zoologia, 1985.
- _____; BOEGER, W. A.; AMATO, S. B. *Protocolos para laboratório: coleta e processamento de parasitos de pescado*. Seropédica: Imprensa Universitária da UFRRJ, 1991.
- BUSH, A. O. et al. Parasitology Meets Ecology on its Own Terms: Margolis et al. Revisited. *Journal of Parasitology*, v. 83, n. 4, p. 575-583, 1997.
- CABLE, R. *An Illustrated Laboratory Manual of Parasitology*. Minneapolis: Burgess, 1969.
- EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. *Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes*. 2. ed. rev. ampl. Maringá: Eduem, 2006.
- HUMASON, G. L. *Animal tissue techniques*. 4. ed. San Francisco: Freeman and Company, 1979.
- RAUSCH, R. L.; MASER, C.; HOBERG, E. P. Gastrointestinal Helminths of the Cougar *Felis concolor* L., in Northeastern Oregon. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 19, n. 1, p. 14-19, 1983.
- REY, L. Parasitologia. *Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- ROBERTS, L. S.; JANOVY JR., J. Gerald D. *Schmidt and Larry S. Roberts's Foundations of Parasitology*. 7. ed. Nova York: McGraw-Hill, 2005.
- SOULSBY, E. J. L. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals*. Sixth Edition of Mönnig's Veterinary Helminthology & Entomology. Londres: Baillière, Tindall and Cassell, 1968.
- TRAVASSOS, L. *Introdução ao estudo da helmintologia*. Rio de Janeiro: Revista Brasileira de Biologia, 1950.

Referências bibliográficas

AMATO NETO, V.; CORRÊA, L. L. *Exame parasitológico das fezes*. São Paulo: Sarvier, 1980.

BAERMANN, G. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankvlostomum (nematoden) Larven in Erdproben. *Tijdschr. Ned.-Indie*, v. 57, p. 131-137, 1917.

COONS, A. H.; CREECH, H. J.; JONES, R. N. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, n. 47, p. 200-202, 1941.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.

FAUST, E. C. et al. A Critical Study of Clinical Laboratory Techniques for the Diagnosis of Protozoan Cysts and Helminth Eggs in Feces I. Preliminary Communication. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, n. 18, p. 169-183, 1938.

GIRAO, E. S.; UENO, H. Diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose de ruminantes no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 20, n. 4, p. 461-466, 1985.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, A. V. A New Technique for Counting Nematode Eggs in Sheep Feces. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research, Australia*, v. 12, p. 50-52, 1939.

GRAHAM, C. F. A device for the diagnosis of Enterobius infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, n. 21, p. 159-161, 1941.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. Sedimentation Concentration Method in Schistosomiasis mansoni. *Journal of Public Health, Puerto Rico*, n. 9, p. 238-291, 1934.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A Simple Device Quantitative Stool Tick-Smear Technique in Schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo*, n. 14, p. 397-400, 1972.

KNOTT, J. A Method for Making Microfilarial Surveys on Dog Blood. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 3, p. 191-196, 1939.

- LUTZ, A. O. *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 11, n. 1, p. 121-144, 1919.
- MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloidíase no Brasil. *Revista Serviço de Saúde Pública*, São Paulo, v. 1, p. 507-624, 1948.
- MULLIS, K. B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, v. 262, p. 56-65, 1990.
- OHISHI, I.; KOBAYASHI, S.; KUME, S. Diagnosis of canine filariasis. III Method for concentrating microfilariae in blood. *Journal of the Japanese Veterinary Medical Association*, n. 12, p. 149-153, 1959.
- RITCHIE, L. S. An Ether Sedimentation Technique for Routine Stool Examination. *Bulletin of the United States Army Medical Department*, v. 8, p. 326, 1948.
- RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. Nova técnica para isolar larvas de nematoides das fezes – modificação do método de Baermann. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 14, p. 5-8, 1954.
- SHEATHER, L. The Detection of Intestinal Protozoa and Mange Parasites by a Flotation Technique. *Journal of Comparative Pathology*, v. 36, p. 266-275, 1923.
- STOLL, N. R. Investigations on the Control of Hookworm Disease. XV – An Effective Method of Counting Hookworm Eggs in Feces. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 3, p. 59-70, 1923.
- STOLL, N. R.; HAUSHEER, W. C. Concerning Two Options in Dilution Egg Counting: Small Drop and Displacement. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 6 (Suppl.), p. 134-145, 1926.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and some Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 76, n. 9, p. 4.350-4.354, September 1979.
- UENO, K.; GONÇALVES, P. C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4. ed. Salvador: Japan International Cooperation Agency, 1998.
- WATANABE, S.; NAGAYAMA, F.; IWATA, K. Simple Detection Technique for *Fasciola hepatica* ova. *Journal of the Japanese Veterinary and Medical Association*, v. 6, p. 176-177, 1953.
- WILLIS, H. H. A Simple Levitation Method for the Detection of Hookworm Ova. *Medical Journal of Australia*, n. 29, p. 375-376, 1921.

Capítulo 3

Metodologia básica para coleta e processamento de helmintos parasitos

Marcelo Knoff
Delir Corrêa Gomes

O objetivo deste capítulo é oferecer aos alunos dos cursos técnicos da área de saúde uma ferramenta sintética das técnicas mais usuais para os procedimentos de coleta, fixação, coloração e preservação em meio líquido ou em montagem definitiva de helmintos coletados dos mais variados grupos de vertebrados. Com o estudo dos helmintos parasitos, esperam-se alcançar diversos objetivos, como os estudos sistemáticos, ecológicos, profiláticos, histopatológicos, dos ciclos de vida e, ainda, a análise das relações parasito-hospedeiro. No decorrer desse estudo, são utilizadas técnicas nas quais o conhecimento e a aplicação correta são fundamentais para atingir os objetivos. Essas técnicas envolvem desde métodos para a coleta do hospedeiro e dos parasitos, em infecções naturais e experimentais, até procedimentos de fixação, coloração e diferentes meios de preservação e de apropriados aos distintos grupos de helmintos. Muitas são as publicações que discorrem sobre os diferentes métodos utilizados para tais objetivos.

1. Amostragem e necropsia dos hospedeiros

Ao se efetuar uma amostragem de um hospedeiro com o objetivo de proceder à análise helmintológica, adota-se algumas vezes a realização de uma análise pela coleta de suas fezes ou do muco presente em membranas de partes do corpo, quando do animal vivo, ou pela necropsia. Para isso, é imprescindível que a amostra seja a mais representativa possível.

1.1 Coleta e exame de fezes

Técnicas qualitativas têm sido utilizadas para detectar a presença de ovos ou larvas de helmintos nas fezes, independentemente da avaliação dos níveis de infecção, sendo um importante processo diagnóstico. Para a pesquisa de ovos de nematoides, utilizam-se os métodos de Willis (1921), Hoffman, Pons e Janer (1934) e direto. Na pesquisa de larvas de nematoides, utilizam-se, para *Strongyloides*, o método de Baermann (1917) e, para microfilárias sanguíneas, o de Ohishi (Ohishi, Kobayashi e Kume, 1959).

Técnicas quantitativas têm sido utilizadas não só para detectar a presença de helmintos parasitos de animais, por meio da pesquisa de ovos ou larvas, como também para avaliar o seu número e o grau de infecção, permitindo, mas, estabelecer os casos em que é recomendável o tratamento das helmintoses. Para a contagem de ovos de nematoides, utiliza-se a técnica de McMaster (Gordon e Whitlock, 1939); para a contagem de ovos de trematódeos, o método Watanabe (Watanabe, Nagayama e Iwata, 1953). Há outras técnicas que são, ao mesmo tempo, qualitativas e quantitativas, como a técnica de Verster de contagem de ovos por grama (opg) para *Fasciola hepatica* (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, s.d.), e a técnica de Ueno (Ueno e Gonçalves, 1998), para larvas de *Dictyocaulus*.

- **Método de Willis (enriquecimento):** coloca-se em um pequeno tubo de ensaio 1g de fezes diluídas em solução saturada de NaCl. O líquido

deve atingir o bordo do tubo. Colocar sobre o tubo uma lamínula, de modo que toque toda a superfície do líquido, e deixar repousar durante 1 minuto. Retirar rapidamente a lamínula, colocando-a sobre uma lâmina. Examinar com pequeno aumento. Os ovos dos helmintos, por sua menor densidade, tendem a subir, aderindo-se à parte inferior da lamínula colocada na superfície do líquido. Essa técnica é indicada para pesquisa de ovos dos nematoides: *Ancylostoma* spp., *Necator* sp. etc.

- **Técnica de Hoffman:** preparar uma suspensão fecal com água de torneira (± 2 g para 10 ml) em um cálice, misturar bem e, se necessário, esperar algum tempo para amolecer as fezes. Acrescentar 200 a 300 ml de água de torneira. Filtrar através de gaze dobrada, com auxílio de um funil, para o cálice de Hoffman. Completar o volume do cálice com água e aguardar de 1 a 2 horas. Com pipeta, coletar, do fundo, uma amostra do sedimento, colocando-a entre a lâmina e a lamínula. Examinar ao microscópio. Essa técnica é indicada para ovos provenientes de humanos, como *Schistosoma mansoni*, cestoides e Ascaridoidea.

- **Técnica de Ueno:** pesar 3 g de fezes frescas; colocar as fezes em uma gaze com 10 a 12 cm de lado dobrada, depois, colocando-a dentro de um tubo de centrífuga de 10 cm de altura por 3,5 cm de diâmetro. Suspender a preparação por um grampo. Encher o tubo até cobrir as fezes, para que a água escorra pelas paredes do tubo. Deixar em repouso absoluto por 24 horas. Pipetar 0,5 ml do depósito acumulado no fundo do tubo, sem agitá-lo. Levar ao microscópio em lâmina (sem lamínula). Contar as larvas existentes no líquido e dividir por 3 o total de larvas contadas. Essa técnica é utilizada para herbívoros.

- **Cultura de larvas de strongilídeos (técnica utilizada para a obtenção de larvas infectantes em grande número):** das fezes utilizadas para ovoscopia, depois de misturadas e tornadas bem soltas, são colocadas 40 gramas em béquero de 250 ml. Quando as fezes são pastosas, torna-se necessário adicionar serragem ou fezes esterilizadas até que a mistura fique

mais densa. As fezes assim acondicionadas nos frascos são cobertas por uma placa de Petri emborcada. Diariamente, faz-se a aeração das culturas por alguns minutos, umedecendo-se as que estiverem muito secas. O crescimento de fungos não prejudica o desenvolvimento das larvas. As culturas são assim mantidas durante oito dias em meio ambiente, com temperatura entre 22°C e 33°C. Para a coleta de larvas, enche-se o frasco com água de bica até a borda, coloca-se a placa de Petri sobre o frasco e, em seguida, emborca-se o conjunto. O líquido permanece no frasco e, pouco a pouco, torna-se turvo. Ao redor do frasco, coloca-se água de torneira – que em geral se mantém limpa –, até a altura de 0,5 cm. As larvas passam para o lado de fora. Depois de 8 horas, as larvas são retiradas com uma pipeta, e a suspensão é colocada em um tubo de ensaio, onde as larvas se concentram.

- **Técnica de opg para *Fasciola hepatica* de Verster:** emulsificar 10 g de fezes em 100 ml de água em um liquidificador. Passar através de peneira com malha de 250 μm para um béquer. Desprezar o sedimento que fique na peneira. Passar o conteúdo do béquer em uma peneira de 37 μm . Os ovos dos trematódeos *Fasciola*, *Paramphistomum* etc. ficarão retidos na peneira. Lavar a peneira, passando o material para um béquer. Decantar por 10 minutos. Adicionar água no resíduo. Decantar a cada 2 minutos, repetidamente, até o sobrenadante ficar claro. Analisar o sedimento ao microscópio. Contar o número de ovos e dividir por 10. Usar solução de verde de metila a 3% para evidenciação.

- **Técnica de centrifugação e concentração de ovos de helmintos:** colocar 1g de fezes frescas em 100 ml de água no frasco Erlenmayer de 125 ml. Misturar bem para obtenção de uma suspensão. Colocar num tubo de centrífuga de 10 ml e centrifugar por 3 minutos, a 1.500 rpm. Decantar o sobrenadante e juntar a solução saturada de NaCl (ou ZnSO_4 , ou açúcar). O sedimento deve entrar em suspensão. Centrifugar novamente durante 3 minutos, a 1.500 rpm. Colocar uma lamínula em cima do

tubo (o líquido deve atingir a borda do tubo) e esperar por 2 minutos. Retirar a lamínula, colocando-se sobre uma lâmina. Contar os ovos (de nematoides e trematódeos) e dividir por 10 para obtenção de opg.

- **Técnica de Baermann:** coletar 10 g de fezes e colocar sobre uma tela de malha de 250 μm , apoiada nos bordos de um funil. Fechar o funil com um tubo de borracha e um grampo, na sua parte inferior. Colocar água levemente aquecida no funil, até cobrir parcialmente as fezes. Após 12 horas, escoar 5 ml em uma placa de Petri. Examinar o sedimento ao microscópio, entre lâmina e lamínula. As larvas presentes nas fezes, em contato com a água levemente aquecida, migrarão para o fundo.

1.2 Necropsia

Para a coleta de helmintos, é extremamente importante fazer corretamente a necropsia dos hospedeiros, que deverá considerar os resultados a serem almejados, ou seja, coleta de ecto-helmintos ou de endo-helmintos, ou de ambos, ou, ainda, de determinados grupos ou sítios de infecção. As características de cada micro-habitat também devem ser consideradas, sendo necessário estabelecer um procedimento sequencial para otimizar a coleta e preservar os espécimes. Sempre que possível, os hospedeiros devem ser examinados logo após sua coleta e morte.

Com as dificuldades geralmente encontradas quando estamos em trabalho de campo para realizar adequadamente a necropsia logo após a captura, é preciso transportar os hospedeiros para o laboratório, em baixa temperatura, etiquetados e individualizados em sacos plásticos, o mais rápido possível.

Muitas vezes o uso de anestésicos é aconselhável, mas em outras pode ser prejudicial, como é o caso de certos ectoparasitas que podem deixar de ter movimentos ativos e prejudicar a sua visualização e coleta. O procedimento de morte do hospedeiro deve ser simples e eficaz, a fim de minimizar o sofrimento.

Antes da necropsia, os hospedeiros devem ser medidos e pesados, e sua espécie determinada corretamente. Na impossibilidade, deve-se fixar em formalina 10% ou etanol 70°GL ou congelar os hospedeiros no momento da necropsia para que sejam determinados posteriormente por um especialista. Deve-se registrar o sexo e o estágio de maturação, a data e o local da coleta e outras informações que se julguem necessárias. Recomenda-se o preenchimento de um formulário de necropsia, devidamente numerado, no qual constem o os dados dos helmintos; também é preciso anotar os helmintos identificados e coletados em cada sítio de infecção/infestação.

A necropsia deve ser iniciada pelo tegumento, fazendo-se uma inspeção macroscópica, se possível com o auxílio de uma lente de aumento, uma vez que muitos parasitos que aí se localizam são visíveis a olho nu. No caso de estarem aderidos, será necessário realizar uma incisão próxima ao local da adesão para removê-los. Pequenos pontos de coloração diferente daquela do tegumento e formações nodulares mais ou menos volumosas podem ser causados por algum tipo de parasito, localizado no seu interior, e devem ser retirados e seu conteúdo examinado. Alguns vertebrados – peixes e répteis, por exemplo – devem ter suas escamas examinadas. Olhos e superfícies de mucosas devem ser analisados. Retira-se o muco para uma placa de Petri com o auxílio de um pincel fino ou com uma pisseta, aplicando-se jatos de solução NaCl na concentração correta (0,65%-0,85%).

As narinas devem ser abertas com o auxílio de uma tesoura. Em seguida, os parasitos devem ser lavados com solução de NaCl a 0,65%, para animais de “sangue frio” (pecilotérmicos), ou a 0,85%, para animais de “sangue quente” (homeotérmicos), ou, ainda, com formalina 1:4.000. O conteúdo dessa lavagem deve ser recolhido em placas de Petri para análise ao estereomicroscópio.

No caso de peixes, devem ser examinadas as suas brânquias. Para a retirada delas, é necessário primeiro levantar e remover os opérculos. Após uma análise macroscópica, removem-se os arcos branquiais individualmente, que devem ser retirados fazendo-se uma incisão junto de suas bordas com

o auxílio de uma tesoura e uma pinça, removendo-os para uma placa de Petri com água. Isso permitirá visualizar parasitos visíveis apenas microscopicamente e observar a sua distribuição pela superfície branquial. As artérias branquiais devem ser expostas e examinadas para se observar a presença de trematódeos digenéticos no aparelho circulatório. Para isso, a membrana que as recobre deve ser retirada com o auxílio de uma tesoura pequena e uma pinça de ponta fina.

Prosseguindo-se, faz-se a abertura da cavidade visceral e a exposição dos órgãos. Devido às particularidades dos diversos grupos de vertebrados, há procedimentos diferentes para cada um deles. Pequenos répteis, anfíbios e mamíferos são fixados em uma bandeja, em decúbito dorsal, fazendo-se uma incisão na pele do mento ao púbis. A pele deve ser retirada cuidadosamente, pois pode conter filarídeos (nematoides), geralmente presentes nas regiões abdominal, axilar e inguinal no tecido subcutâneo.

Nos peixes, deve-se fazer uma incisão ao longo da linha média ventral, começando logo acima do ânus e se estendendo até a região anterior, evitando-se com isso que se corte o intestino, o que permitiria a saída de conteúdo intestinal para a cavidade visceral e, até mesmo, a destruição de alguns helmintos aí presentes. Nos mamíferos, é necessário que a cavidade torácica seja aberta; para isso, seccionam-se as costelas. Em seguida, abrem-se as paredes laterais da cavidade visceral a fim de expor os órgãos internos para o exame. Esse exame preliminar permite detectar helmintos localizados ou aderidos à superfície dos órgãos ou na própria cavidade visceral (estágios larvais de cestoides, trematódeos digenéticos, nematoides e acantocéfalos). Logo após, todos os órgãos devem ser retirados individualmente e colocados em placas de Petri, com solução de NaCl (0,65%-0,85%).

Cada órgão deve passar por um exame macroscópico preliminar, atentando-se para diferenças de coloração e textura e para a existência de nódulos. Nesse caso, as áreas afetadas devem ser isoladas e observadas em separado, com o auxílio de estereomicroscópio e/ou microscópio. Em seguida, a superfície dos órgãos deve ser examinada ao estereomicroscópio. Aqueles que não

forem ocos devem ser dissecados para a análise dos tecidos – recomenda-se a análise de pequenos pedaços de tecido, esmagando-os entre lâmina e lamínula, ou entre duas lâminas.

Quanto ao sistema digestório, é fundamental a realização do exame do seu conteúdo. O órgão deve ser aberto com cuidado, por meio de um corte longitudinal, com o auxílio de uma tesoura de ponta fina e uma pinça. O conteúdo intestinal deve ser retirado com o auxílio de um pincel, e não raro com jatos d'água, para a remoção do excesso de muco, e analisado ao estereomicroscópio e ao microscópio óptico. Frequentemente encontramos aderidos, à luz intestinal, cestoides e acantocéfalos e é preciso removê-los com cuidado, a fim de manter a sua integridade. O exame da parede do intestino requer que essa seja cortada em porções pequenas para facilitar a observação ao estereomicroscópio e ao microscópio óptico.

As vísceras devem ser analisadas meticulosamente – pulmões, rins, vesícula biliar, vesícula gasosa (em peixes), bexiga urinária e coração devem ser abertos e seu conteúdo analisado separadamente –, pois talvez se encontrem formas adultas e larvas de trematódeos digenéticos, de cestoides e de nematóides.

O cérebro e os olhos devem ser expostos e analisados macro e microscopicamente. Nessa região, frequentemente são encontradas larvas de trematódeos digenéticos, de cestoides e de nematóides. Não raro devemos proceder à dissecação dos olhos, onde podem ser encontradas no humor vítreo, ou mesmo ao esmagamento do cristalino, para facilitar a retirada de diferentes estágios ontogenéticos, dependendo do grupo do helminto.

O músculo deve ser analisado de forma macro e microscópica; nesse último caso, a análise deve ser feita mediante cortes de amostras pequenas e pouco espessas. No caso do músculo de peixes especificamente, que em geral é claro e hialino, a amostra pode ser colocada contra um fundo iluminado (negatoscópio) a fim de facilitar o encontro de helmintos macroscópicos. É necessária, às vezes, a utilização da digestão do tecido por pepsina e tripsina, de modo a permitir o isolamento de helmintos que se alojam no músculo.

2. Monogenoides

A maioria dos monogenoides são ectoparasitas na superfície do corpo, narinas, brânquias e cavidade opercular de peixes. Poucas espécies localizam-se no estômago, cavidade visceral, ovidutos ou canais urinários de vertebrados. Também são encontrados sobre o corpo de anfíbios, ou como hiperparasitas sobre o exoesqueleto de crustáceos parasitos de peixes. Suas dimensões variam de menos de 1 mm a cerca de 3 cm de comprimento, são hermafroditas e de ciclo direto. A característica morfológica predominante desses helmintos é conter um aparelho de fixação ao hospedeiro – o haptor –, localizado na parte posterior do seu corpo. Na maioria das espécies, o haptor tem estruturas esclerotizadas, chamadas ganchos, barras ou âncoras; em outras, apresenta ventosas, formas como pinças ou um conjunto de ganchos.

Para a coleta dos monogenoides, deve-se reduzir ao máximo a manipulação do hospedeiro, visando-se evitar a perda desses helmintos. Hospedeiros de porte pequeno devem ser colocados vivos, durante cerca de 2 horas, em uma solução de formalina a 1:4.000. Essa técnica de coleta tem a vantagem de manter vivos os peixes, que podem ser devolvidos posteriormente ao seu ambiente natural. Em seguida, examina-se o líquido em placas de Petri ao estereomicroscópio para observar os parasitos que se destacaram da superfície pela ação do formol. Nos peixes de grande porte, faz-se a raspagem da superfície, removendo-se o muco com solução de formalina na mesma concentração dentro de um recipiente. Para a análise das brânquias, retiram-se os arcos branquiais, que são colocados em um recipiente com tampa de rosca, contendo formalina a 1:4.000; em seguida, fecha-se a tampa e agita-se o recipiente para que os parasitos se desprendam. Na coleta de espécimes das narinas, elas devem ser abertas com tesouras e/ou pinças, ambas de ponta fina, e lavadas cuidadosamente com jatos de formalina na mesma concentração referida, utilizando-se uma pisseta. Em trabalhos de campo, quando não há tempo para procedimentos mais detalhados, os hospedeiros devem ser fixados em formalina a 10% para depois serem analisados; nesse processo de fixação, apenas um pequeno número de helmintos se destaca do hospedeiro.

Alguns parasitos coletados, principalmente os maiores espécimes, podem estar enrolados; quando isso ocorre, é necessário fazer a distensão de ambas as extremidades dos parasitos com o auxílio de pincéis de poucas cerdas, pressionando-se, posteriormente, uma lamínula acima do espécime, para logo após colocar-se o fixador a frio.

A utilização dessas técnicas permite a coleta da maioria dos espécimes nos hospedeiros. É importante o exame ao estereomicroscópio da superfície do corpo e das brânquias, a fim de detectar o número de espécimes que não tenham se desprendido.

3. Trematódeos digenéticos

Os Digenea, ou trematódeos digenéticos, são platelmintos com um ciclo de vida complexo, que envolve, quase sempre, ao menos dois hospedeiros: um intermediário (que na maior parte dos casos é um molusco) e um definitivo (peixe, ave ou mamífero). Os vertebrados também podem servir como um segundo hospedeiro intermediário.

Os trematódeos digenéticos são endoparasitas e, apesar de serem descritos como helmintos achatados por pertencerem ao filo Platyhelminthes, algumas espécies podem ter forma cilíndrica, esférica ou piriforme. Normalmente, o corpo tem duas ventosas, uma oral e outra ventral, essa conhecida por acetábulo. O tamanho pode variar de menos de 1 mm a até alguns centímetros de comprimento.

A maioria das espécies é hermafrodita, com exceção dos esquistossomatídeos, que parasitam o sistema sanguíneo, e dos didimozoídeos, que parasitam peixes marinhos. O sistema digestório é normalmente incompleto, pois quase sempre os cecos terminam em fundo cego.

Vivem nos sistemas digestório, respiratório e circulatório, no aparelho urinário, nos ductos pancreáticos, na vesícula biliar e nos ductos biliares de vertebrados. Algumas espécies são encontradas no sistema digestório de hiru-

díneos. Outros habitats incomuns incluem o ducto nasolacrimal, a membrana nictitante, a bolsa de Fabricius e os oviductos das aves; podem também estar encistados no duodeno de anfíbios ou encistados aos pares nas nadadeiras na face interna dos opérculos; em tecidos dos arcos; e nos filamentos branquiais de peixes.

Para que os helmintos de um órgão não se misturem com os de outro, ou mesmo com sessões diferentes de um mesmo órgão, deve-se analisar cada órgão em placas de Petri diferentes, passando o conteúdo por uma peneira de 100 a 150 μm de malha e lavando-o na torneira sob jato d'água, ou deixar decantar o sobrenadante. Após essa lavagem, não só o conteúdo deve ser transferido para placas de Petri, mas também o respectivo órgão, que deve ser colocado em outra placa de Petri, contendo água de torneira. Os helmintos devem ser transferidos, por meio de pipeta ou pincel, para placas de Petri contendo solução de NaCl a 0,65%, para animais pecilotérmicos, e a 0,85%, para animais homeotérmicos.

Após a análise de todos os órgãos e a coleta de todos os helmintos, passa-se à etapa de compressão. Os helmintos grandes (de no mínimo 0,5 cm) devem ser comprimidos entre lâminas; os pequenos, entre lâmina e lamínula; já aqueles extremamente pequenos (menores que 1 mm) não devem ser comprimidos, uma vez que a compressão é feita para diminuir a altura do parênquima. Quando a compressão for feita com duas lâminas, elas devem ser amarradas com linha e deixadas de pé, em recipiente com fixador a frio.

O tempo de compressão para helmintos grandes é de 24 horas para helmintos pequenos, por volta de 30 minutos. Antes de comprimir os helmintos pequenos entre lâmina e lamínula, eles devem ser colocados sobre uma gota espessa de solução de NaCl; após isso, coloca-se sobre eles a lamínula com pequenos pesos em cima – os quais podem ser pequenos frascos de vidro preenchidos com água ou esferas de chumbo –, a fim de se regular o peso. Essa ação deve ser realizada dentro de uma placa de Petri, aplicando-se depois, cuidadosamente, o fixador frio, de maneira que o conjunto fique submerso.

Caso os helmintos fiquem aderidos ao vidro por causa da compressão por tempo excessivo, um pincel de ponta fina ajudará na sua remoção, que deve ser realizada ao estereomicroscópio. Helmintos muito pequenos devem ser mortos com o fixador a frio, sem compressão.

3.1 Formas larvais de trematódeos digenéticos

Os estágios larvais dos trematódeos digenéticos nem sempre habitam o mesmo hospedeiro, podendo ser de vida livre. Normalmente, os ovos passam ao ambiente e, em condições ideais, dão origem a miracídios. Esporocistos, rédias, rédias-filhas (quando há) e cercárias podem ser obtidos, em geral, diretamente dos moluscos hospedeiros intermediários, por simples dissecação em solução salina fisiológica a 0,65%. Muitas vezes, as cercárias são obtidas sem a necessidade do sacrifício dos moluscos, pelo isolamento dos mesmos em recipientes pequenos e sua estimulação mediante uma fonte luminosa e térmica. As metacercárias, fase encontrada em algumas espécies, podem estar encistadas e aderidas a substratos vegetais – caso, por exemplo, da *Fasciola hepatica*. Ou podem estar encistadas em outros moluscos ou invertebrados ou mesmo em vertebrados, como *Ascocotyle (Phagicola) longa*, em peixes. A dissecação de artrópodes resulta no excistamento mecânico e químico das metacercárias. Em outros gêneros, as metacercárias são coletadas na cavidade pericárdica dos moluscos.

Esporocistos, rédias, rédias-filhas não devem ser comprimidos quando da fixação, exceto as metacercárias, que, após o excistamento, podem ser comprimidas com as mesmas técnicas utilizadas para os trematódeos pequenos.

4. Temnocefalídeos

Conhecidos também como turbelários, os temnocefalídeos são platelmintos que se caracterizam por apresentar tentáculos cefálicos. São ectocomensais

que vivem na cavidade paleal de moluscos aquáticos, sobre o exoesqueleto de crustáceos dulceaquícolas e nas axilas de quelônios de água doce.

Sua coleta deve ser realizada com pincel e devem ser removidos depois para uma placa de Petri contendo água destilada. Devem ser comprimidos e fixados como os trematódeos digenéticos pequenos.

5. Aspidobótreos

Pertencem a outra subclasse de trematódeos, são endoparasitos e podem ser encontrados no tubo digestório de teleósteos e tartarugas, na vesícula biliar de peixes elasmobrânquios, ou na cavidade pericárdica, rim e brânquias de moluscos bivalvos de água doce. Caracterizam-se morfologicamente por possuírem ventosa posterior dividida dentro de compartimentos. Devem ser coletados e fixados da mesma forma que os trematódeos.

6. Cestoides

São platelmintos pertencentes à classe Cestoidea, subclasse Eucestoda. Caracterizam-se pela simetria bilateral, são achatados dorso-ventralmente, exclusivamente parasitos e não possuem sistema digestório. Geralmente, são constituídos por uma região anterior chamada escólex, que contém órgãos de fixação – ventosas, bótrios, botrídios, tentáculos –, e por uma região posterior com uma série de segmentos, chamados proglotes, contendo os órgãos sexuais – o estróbilo. A maioria das espécies é hermafrodita.

Os cestoides adultos podem ser encontrados em qualquer classe dos vertebrados, praticamente confinados sempre ao intestino, raramente na cavidade celomática e nos ductos biliares ou pancreáticos. Devem ser mortos sob a ação do frio, no refrigerador, e em água destilada, objetivando o relaxamento da musculatura. É fundamental para o diagnóstico que o escólex tenha sido coletado.

Todo o cestóide, partes dele contendo o escólex ou segmentos do estró-bilo com proglotes imaturas, maduras e grávidas devem ser comprimidos entre lâminas e colocados no fixador a frio.

Em alguns cestóides, por exemplo, nos da ordem Cyclophyllidae pertencentes à família Taenidae – é necessário o estudo do número e da morfologia dos ganchos do rostelo contido no escólex; sob o estereomicroscópio, faz-se a separação do rostelo do escólex, por meio de corte com uma lâmina de barbear, visualizando-se depois, em montagem *en face*, o que permite a contagem do número total de ganchos. Para o estudo da morfologia dos ganchos, deve-se esmagar o rostelo entre lâmina e lamínula, o que possibilita a visualização dos ganchos lateralmente. Dependendo da ordem de cestóides, é necessário o estudo de cortes histológicos transversais das proglotes maduras. Nesse caso, alguns exemplares devem ser fixados sem compressão, em solução de formol a 10%.

6.1 Formas larvais de cestóides

As larvas de cestóides podem ser encontradas encistadas, livres no celoma, na musculatura de vertebrados ou na hemocele de artrópodes. Helmintos encistados sempre devem ser removidos, com agulhas entomológicas ou de acupuntura das membranas císticas antes de serem submetidos ao fixador. Plerocercos da ordem Trypanorhyncha, após terem sido liberados dos cistos, devem ser colocadas em água destilada no refrigerador, para que os tentáculos desinvaginem e eles morram relaxados.

7. Girocotilídeos e anfilinídeos

São platelmintos pertencentes à classe Cestoidea, subclasse Cestodaria, encontrados na válvula espiral (intestino) de peixes elasmobrânquios, princi-

palmente da subclasse Holocephali – por exemplo, Gyrocotylidea – ou no intestino e na cavidade celomática de peixes teleósteos e tartarugas – por exemplo, Amphilinidea.

○ mesmo processo utilizado para coleta e morte dos grandes trematódeos digenéticos deve ser empregado para esses helmintos.

8. Acantocéfalos

Esse filo de helmintos se caracteriza por animais de simetria bilateral, com probóscide anterior guarnecida de ganchos e sistema digestório ausente. Os sexos são separados e apresentam dimorfismo sexual. Os adultos são encontrados exclusivamente no intestino dos hospedeiros definitivos, os quais são todas as classes de vertebrados.

Devem ser coletados do intestino do hospedeiro e levados para uma placa de Petri contendo solução de NaCl na concentração correta (0,65%-0,85%); logo após, devem ser transferidos para água destilada e colocados no refrigerador, a fim de que morram com a probóscide extrovertida. Antes da fixação, restos de tecido e muco do intestino do hospedeiro devem ser removidos da probóscide com o auxílio de um pincel ou de uma agulha de acupuntura.

8.1 Formas larvais de acantocéfalos

○ acântor é a larva embrionada capaz de infectar o artrópode hospedeiro invertebrado. É encontrado nas fezes do hospedeiro definitivo, ou em plantas submersas (geralmente em espécies aquáticas), fixo por filamentos polares. A acantela, estágio posterior ao acântor, pode ser encontrada na hemocele ou na serosa intestinal dos artrópodes. Seu desenvolvimento resulta no cistacanto ou juvenil, larva infectante envolvida em um envelope hialino, encontrado tanto em tecidos do artrópode quanto em hospedeiros paratênicos vertebrados.

As larvas encistadas em hospedeiros intermediários e/ou paratênicos (cistacantos) devem ser removidas do cisto e tratadas, assim como as formas não encistadas (acantelas), como os adultos.

9. Nematoides

Filo de helmintos caracterizado por apresentar corpo alongado, geralmente fusiforme, não segmentado. Os nematoides são envoltos por uma cutícula e possuem sistema digestório completo. Os sexos são separados, e algumas vezes apresentam grande dimorfismo sexual. Podem ser livres ou parasitos, ou, ainda, podem ter uma fase de vida livre e outra parasitária; às vezes, têm gerações alternadas de vida livre e de vida parasitária; em geral são ovíparos, mas algumas vezes vivíparos. Seu tamanho varia de fração de milímetros a próximo de um metro. Adultos podem ser encontrados parasitando o tubo digestório, suas cavidades e vários órgãos internos de todos os grupos de vertebrados.

Devem ser, preferencialmente, coletados vivos, com o auxílio de um pincel, e transferidos para uma solução de NaCl na concentração correta (0,65%-0,85%). A solução com os nematoides deve ser agitada fortemente, de modo a permitir a limpeza dos lábios, da abertura bucal e da superfície da cutícula. Os espécimes pequenos, como as larvas, devem ser coletados e mantidos em recipientes pequenos; os espécimes mortos devem ser diretamente fixados a frio.

9.1 Formas larvais de nematoides

Dependendo da ordem à qual o nematoide pertence, o estágio larval pode ser encontrado em invertebrados ou em vertebrados. Nos vertebrados, muitas vezes apresentando-se no interior de cistos, podem ser encontrados na musculatura, em todos os órgãos internos, nas serosas e cavidades do corpo, no intestino e em vasos sanguíneos.

Larvas vivas encistadas devem ser removidas dos tecidos do hospedeiro, dissecados com o auxílio de uma pinça pequena, agulhas de acupuntura ou um pincel pequeno de cerdas finas. Logo depois de colocadas em placas de Petri com solução NaCl na concentração correta (0,65%-0,85%), os envoltórios císticos devem ser removidos, e as larvas, tratadas como os nematoides adultos.

10. Fixação

A maioria dos platelmintos e os acantocéfalos mortos em água destilada no refrigerador ou aqueles que tenham sido comprimidos devem ser fixados em AFA (álcool etílico, formalina e ácido acético), onde devem permanecer por no máximo 48 horas, sendo depois transferidos para etanol 70°GL, onde podem ficar por tempo indeterminado.

Os monogenoides devem ser fixados em formalina a 5%.

Os nematoides vivos são transferidos da solução de NaCl para uma placa de Petri com pouco líquido. Aquece-se o fixador AFA a 65°C e derrama-se rapidamente sobre os nematoides, deixando-se o fixador esfriar nessa placa de Petri. Podem permanecer por 48 horas no fixador; depois devem ser transferidos e conservados em etanol 70°GL, com ou sem a adição 5% de glicerina (a glicerina evita que a cutícula se torne quebradiça).

11. Coloração

Existem dois processos para a coloração: o progressivo e o regressivo. No progressivo, usa-se o corante bem diluído, e os helmintos ficam imersos no corante até que cada órgão ou tecido, em sua cromofilia, adquira sua intensidade específica. No processo regressivo, usa-se o corante puro ou pouco diluído, corando-se em excesso; logo após, procede-se à diferenciação com

etanol 70°GL clorídrico a 0,5-1%. O processo regressivo é mais rápido e fácil de controlar.

Os monogenoides, trematódeos digenéticos, temnocefalídeos, aspidobótreos, cestoides adultos e acantocéfalos podem ser corados pela hematoxilina ou pelo carmim de Mayer ou de Langeron. Sendo um corante nuclear, a hematoxilina cora principalmente os núcleos e evidencia as estruturas internas mais delicadas. Já os carmins resultam em um colorido mais intenso, mas não evidenciam as estruturas mais delicadas. Os girocotilídeos e os anfilinídeos devem, preferencialmente, ser corados pelo carmim de Semichon. Acantocéfalos muitas vezes requerem que se façam pequenos furos no tegumento, com alfinetes bem finos ou agulhas de acupuntura, para que o corante penetre mais facilmente. Esse procedimento favorecerá, posteriormente, a penetração do clarificador e do bálsamo do Canadá, evitando o enrugamento do espécime no momento da montagem em lâmina definitiva.

Para a observação da morfologia da maioria das espécies de nematoides, não é necessária a coloração, mas deve ser feita a clarificação.

O processo de corar com a hematoxilina é mais demorado do que com o carmim, pois a hematoxilina é dissolvida em meio aquoso. Como o carmim é alcoólico e dissolvido sempre em etanol 70°GL, isso faz que os helmintos conservados em etanol 70°GL passem diretamente do meio onde se encontram conservados para o corante.

O tricrômico de Gomori produz resultados que facilitam a observação de estruturas esclerotizadas dos monogenoides.

Quadro 1. Sequência para a coloração de helmintos pelo método da hematoxilina com processo regressivo.

	Etapa	Duração	Processo
1	Etanol 70°GL	15 minutos	hidratação
2	Etanol 50°GL	15 minutos	
3	Etanol 30°GL	15 minutos	
4	Hematoxilina	tempo variável ^a	coloração
5	Água destilada	lavagem rápida	oxidação ^b
6	Água de torneira	15 minutos →	
7	Etanol 30°GL	15 minutos	desidratação
8	Etanol 50°GL	15 minutos	
9	Etanol 70°GL	15 minutos	
10	Etanol 70°GL clorídrico a 0,5%	tempo variável ^c →	diferenciação
11	Etanol 70°GL	15 minutos	
12	Etanol 80°GL	15 minutos	
13	Etanol 90°GL	15 minutos	desidratação
14	Etanol absoluto 1	15 minutos	
15	Etanol absoluto 2	15 minutos	
16	Creosoto de faia	tempo variável, até a montagem ^d	clarificação e montagem

^a O tempo nas hematoxilinas varia de acordo com o helminto, o seu tamanho e a diluição do corante. Pequenos helmintos e seus estágios larvais necessitam de 15 a 30 minutos, ao passo que os espécimes maiores exigem de 45 a 60 minutos.

^b A água de torneira oxida as hematoxilinas, mudando sua coloração de roxa para azul.

^c A diferenciação pelo etanol clorídrico deve ser controlada ao estereomicroscópio para clarificar o tegumento e o parênquima. O observador deve tirar o helminto não totalmente diferenciado, uma vez que o mesmo perderá um pouco mais de corante ao passar pela sequência de desidratação.

^d O creosoto de faia é usado como clarificador, inclusive completando a desidratação. Nunca usar o xilol. O tempo ideal para a clarificação de um helminto depende de seu tamanho e do grupo a que pertence. Helmintos no creosoto tendem a flutuar e a se aderir na borda da placa de Petri e é preciso controlar os helmintos individualmente, para impedir que isso ocorra, levando-os, delicadamente, com um estilete, uma agulha de acupuntura ou um pincel fino de poucas cerdas, para o fundo da placa.

Quadro 2. Sequência para a coloração de helmintos pelos métodos de carmim no processo regressivo.

	Etapa	Duração
1	Etanol 70°GL	15 minutos
2	Carmim	tempo variável
3	Etanol 30°GL	lavagem rápida
4	Etanol 70°GL clorídrico a 0,5%	tempo variável
5	Etanol 70°GL	15 minutos
6	Etanol 80°GL	15 minutos
7	Etanol 90°GL	15 minutos
8	Etanol absoluto 1	15 minutos
9	Etanol absoluto 2	15 minutos
10	Creosoto de faia	tempo variável

Quadro 3. Sequência para a coloração de monogenoides pelo método tricrômico de Gomori no processo regressivo.

1	Colocar os espécimes em água por 3-5 minutos
2	Transferir os espécimes para uma pequena gota de corante no centro de uma placa de Petri pequena
3	Corar por 1 a 3 minutos
4	Preencher a placa de Petri com etanol absoluto
5	Colocar gotas de água para diferenciar
6	Transferir os espécimes para outra placa de Petri contendo etanol absoluto
7	Desidratar os espécimes por 1 a 5 minutos
8	Transferir para creosoto de faia para clarificar

12. Clarificação

Os helmintos em geral são clarificados quando deixados no creosoto. Existem, porém, dois processos especiais para a clarificação de nematoides, um

para montagem em bálsamo do Canadá e outro para montagem em gelatina de glicerina.

Quadro 4. Processo de clarificação de nematoides para a montagem em bálsamo do Canadá.

1	Etanol 70°GL, para remoção da glicerina
2	Etanol 80°GL
3	Etanol 90°GL
4	Etanol absoluto 1
5	Etanol absoluto 2
6	Lactofenol de Amann
7	Creosoto de faia

OBS.: Os nematoides muito grandes devem passar por fenol 10% após o lactofenol. Também se utiliza a lavagem rápida, em ácido láctico glacial, antes da clarificação com fenol.

No estudo morfológico de nematoides, é importante a observação de estruturas bucais; a fim de se ter uma visão apical das mesmas, são feitas montagens especiais da região anterior, utilizando-se cortes da região anterior dos espécimes de nematoides, feitos com lâmina de barbear ou bisturi de lâmina bem fina. Esse procedimento é realizado sob o estereomicroscópio, e as partes cortadas são montadas na posição *en face*. Essa montagem é realizada com clarificação em glicerina.

Quadro 5. Sequência do processo de clarificação de nematoides para a montagem em gelatina de glicerina.

1	Adicionar poucas gotas de cada vez de glicerina pura na placa Petri onde os nematoides já se encontram em etanol 70°GL glicerinado a 5%
2	Transferir um nematoide de cada vez para a glicerina pura após a evaporação do etanol
3	Montar em gelatina de glicerina

13. Montagem

O procedimento de montagem em lâmina deve ser realizado sempre sob o estereomicroscópio. Todos os helmintos devem ser montados isoladamente, um espécime em cada lâmina. No caso de helmintos que apresentam dimorfismo sexual, macho e fêmea devem ser montados em lâminas separadas, a não ser que a finalidade da montagem seja, por exemplo, demonstrar didaticamente um casal de *Schistosoma mansoni* em cópula.

Em uma infrapopulação,¹ dê preferência a montar primeiro os melhores espécimes disponíveis e, depois, os piores. Dessa maneira o melhor espécime será sempre o número 1 do lote.

Girocotilídeos devem ser mantidos no clarificador, pois em geral são muito grandes.

Cestoides têm de ser cortados de acordo com o tamanho da lamínula utilizada para cobri-los. Montar, em uma mesma lâmina, a porção com o escólex, um conjunto com proglotes imaturas, um conjunto com proglotes maduras e um conjunto com proglotes grávidas. Para cestoides grandes ou mais largos, algumas vezes são necessárias duas ou mesmo três lâminas para o mesmo espécime. Todas as lâminas utilizadas devem ser etiquetadas com o mesmo número do lote da coleta, adicionando-se ao número, sequencialmente, letras.

Cada lâmina ou lamínula deve ser previamente limpa com um lenço de papel fino seco, a fim de remover a cera protetora que as recobre. Coloca-se o helminto no centro da lâmina, contendo uma gota de bálsamo do Canadá, que pode ser diluído, previamente, com um pouco de xilol. O helminto sempre deve ser posicionado com a face ventral para cima. Quando necessário, completar com um pouco mais de bálsamo, não diluído, para encobrir o helminto. Coloque delicadamente a lamínula acima do bálsamo.

Nematoides muitas vezes não são montados em lâminas definitivas; são, em geral, preservados em etanol glicerinado, e a observação de suas estruturas internas se dá quando estão sendo clarificados em lactofenol, entre lâmina e lamínula, depois devem ser colocados novamente em etanol.

¹ Número total de espécimes de uma espécie coletado em um hospedeiro.

Quadro 6. Procedimento para montagem de nematoides em gelatina de glicerina.

1	O recipiente com gelatina de glicerina deve ser aquecido em banho-maria
2	Colocar, com um bastão de vidro, uma gota de gelatina líquida, proporcional ao tamanho do espécime e da lamínula usada para cobri-la, sobre a lâmina
3	A gota não pode ir além da lamínula
4	Lutar com esmalte incolor para as unhas
5	Deixar as lâminas secarem. Pode-se levar as lâminas para uma estufa controlada a 37°C, por 24 a 48 horas, o que diminui o tempo de secagem
6	Depois de secas, as lâminas montadas devem ser etiquetadas

14. Etiquetagem do material montado em lâmina e do material preservado em meio líquido

Etiquetas podem ser escritas à mão, com lápis ou nanquim, ou digitadas no computador, impressas em um papel contendo algumas informações básicas, tais como:

- número do espécime;
- nome genérico e específico do helminto;
- sítio de infecção ou infestação;
- localidade de coleta do hospedeiro;
- data de coleta do hospedeiro;
- nome da pessoa que coletou/determinou o helminto;
- tipo de corante utilizado no helminto;
- meio de preservação;
- categoria do espécime: holótipo, parátipo, espécime representativo (*voucher*).

Etiquetas para lâminas devem ser coladas em uma das extremidades dessas; etiquetas para material preservado em meio líquido devem ter tamanho compatível com o do recipiente. Caso se tenha optado pelo nanquim, antes de as etiquetas serem colocadas dentro do meio líquido, deve-se remover o excesso de tinta das mesmas com um jato d'água (isto evita a absorção do nanquim pelo helminto).

Modelo de etiqueta para lâmina

MK-366-1- <i>Diphyllobothrium latum</i> <i>Homo sapiens</i> ♀ Fezes Rio de Janeiro, RJ, Brasil 21/04/2005 Col. Knoff Det. Knoff et al. Carmim de Langeron Bálsamo do Canadá Voucher

15. Utensílios

- **Bandejas para necropsia:** de dimensões variadas, segundo o tamanho do hospedeiro, de aço ou plástico. São muito úteis, pois possibilitam perda mínima de material.
- **Peneiras para coleta:** devem ser utilizadas peneiras de aço inoxidável, com telas de malha variando de 100 até 150 μm de abertura e diâmetros de 8 a 20 cm, disponíveis no mercado. Podem também ser confeccionadas de acordo com a necessidade, com malhas de 35 a 250 μm de abertura.
- **Peneiras para coloração:** servem no transporte dos helmintos através das etapas da sequência de coloração, sendo transferidas de solução para solução com o auxílio de uma pinça. A tela da peneira deve ser de museline de náilon, e quanto menor a abertura da malha, melhor – a abertura da malha está condicionada ao tamanho do helminto. Não são vendidas

no comércio e devem ser confeccionadas. A tela da peneira de coloração é colada, com adesivo para tubos de PVC, em pequenos tubos de PVC de diâmetro reduzido, com as bordas previamente lixadas. Depois de coladas, devem ser deixadas sob pressão por 24 horas. A altura das peneiras de coloração deve ser menor do que a altura das placas de Petri (1,5 a 2 cm), o que permite permanecerem tampadas durante o processo de coloração, evitando que os líquidos evaporem.

OBS.: Como o adesivo de PVC não resiste ao creosoto de faia, os helmintos devem ser retirados das peneiras na etapa do etanol absoluto 2. Os helmintos devem ser transferidos do etanol absoluto 2 para o creosoto de faia com o auxílio de um pincel pequeno e de poucas cerdas e finas.

- **Pinças de joalheiro:** as de ponta fina e sem serrilhado são as mais indicadas em helmintologia.
- **Pincéis pequenos, pincéis de tamanho 0:** cortar algumas cerdas, diminuindo seu número, para tarefas mais delicadas.
- **Placas de Petri:** de tamanhos variados.
- **Formulário de necropsia, lápis ou lapiseira, borracha.**
- **Tesouras:** pequenas, médias e grandes, de ponta fina.
- **Tesourão destrinchador.**
- **Béquers** de 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml e 1 l.
- **Gral.**
- **Pisseta.**
- **Tubos de ensaio.**
- **Centrífuga.**
- **Funil pequeno, papel-filtro, anteparo de funil.**

- **Cálice Hoffman.**
- **Tubo de borracha, grampos.**
- **Gaze.**
- **Bico de Bunsen ou placa aquecedora.**
- **Termômetro químico (-10 a 110°C).**
- **Microscópio óptico binocular.**
- **Estereomicroscópio.**
- **Lupa de mão:** com no mínimo 2 a 4 vezes de aumento; facilita no exame da superfície de hospedeiros.
- **Pipetas de Pasteur, bulbos de borracha para pipeta** – na falta desses, usar pipetas plásticas descartáveis.
- **Bisturi, lâminas de bisturi, lâmina de barbear.**
- **Trena de mão.**
- **Lanterna:** será útil, caso falte luz durante a necropsia.

16. Soluções e suas fórmulas

- **Fixador AFA:** etanol 70°GL (93 partes) + formalina comercial (37-40%; 5 partes) + ácido acético glacial (2 partes).
- **Formalina 10%:** formalina comercial (10 partes) + água destilada (90 partes).
- **Formalina 1:4.000:** água destilada (4.000 ml) + formalina comercial (1 ml).
- **Diferenciador etanol 70°GL clorídrico a 0,5%:** etanol 70°GL (200 ml) + ácido clorídrico (1 ml).
- **Hematoxilina de Delafield:** hematoxilina em pó (4 g) + etanol absoluto (25 ml) + metanol (100 ml) + alúmen de amônia $[\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ (400 ml) + glicerina (100 ml).

COMO FAZER: dissolver a hematoxilina no etanol absoluto. Misturar, gradualmente, a solução saturada aquosa de alúmen de amônia (aproximadamente 1 parte de alúmen para 11 partes de água destilada). Expor à luz por 3 a 5 dias em um balão volumétrico com tampa de algodão. Filtrar. Adicionar ao filtrado a glicerina e o metanol. Deixar amadurecer por seis semanas. Guardar em frasco escuro, se possível coberto com papel laminado. Filtrar sempre antes de usar.

- **Carmalúmen de Mayer:** carmim em pó (5 g) + alúmen de potássio $[\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ (6 g) + ácido acético glacial (25 ml) + água destilada (100ml).

COMO FAZER: dissolver o carmim e o alúmen na água destilada fervendo. Deixar esfriar. Adicionar o ácido acético. Deixar amadurecer por 10 dias. Filtrar e adicionar 0,5 ml de formalina a 37%, para impedir o aparecimento de fungos. Diluir de acordo com a necessidade. Guardar em um frasco escuro. Filtrar sempre antes de usar.

- **Carmim de Langeron:** carmim em pó (5 g) + ácido clorídrico (5 ml) + etanol 70°GL (250 ml) + água destilada (5 ml).

COMO FAZER: adicionar o ácido à água, **nunca ao contrário**. Colocar o líquido junto com o carmim em um gral, misturando bem. Levar ao fogo e deixar cozinhar por 1 hora, em um balão volumétrico com tampa de algodão. Filtrar. Guardar em frasco escuro. Filtrar sempre antes de usar.

- **Carmim de Semichon:** carmim em pó (até a saturação) + ácido acético glacial (100 ml) + água destilada (100 ml).

COMO FAZER: adicionar o ácido à água, **nunca ao contrário**. Adicionar o carmim até a saturação. Aquecer a 95-100°C por 15 minutos. Deixar esfriar e filtrar. Adicionar alguns cristais de timol, para evitar fungos (cristais inteiros, não macerar). Guardar em frasco escuro. Filtrar sempre antes de usar. Diluir na proporção de 1:1 com etanol 70°GL.

- **Tricrômico de Gomori:** cromotrope 2R (0,6 g) + azul de anilina (0,6 g) + ácido fosfomolibdênico (1 g) + ácido clorídrico (1 ml) + água destilada (100 ml).

COMO FAZER: juntar o cromotrope, o azul de anilina e o ácido fosfomolibdênico. Dissolver na água destilada. Não filtrar. Aguardar cerca de 24 horas antes de usar. Adicionar água para reduzir a rapidez da coloração. Guardar no refrigerador. Usar frio.

- **Gelatina de glicerina:** gelatina granulada (6 g) + fenol (1 g) + glicerina (50 ml) + água destilada (40 ml).

COMO FAZER: colocar a gelatina na água destilada; deixar descansar por 15 minutos. Derreter a gelatina em banho-maria, filtrando em várias camadas de musseline de náilon, molhadas em água quente. Em seguida, dissolver o fenol na glicerina e juntar à gelatina. Guardar em frascos escuros. Ao usar, aquecer a gelatina de glicerina em banho-maria.

Referências bibliográficas

BAERMANN, G. Eine einfache Methode zur Auffindung von An

GORDON, H. McL.; WHITLOCK, A. V. A New Technique for Counting Nematode Eggs in Sheep Feces. *Journal of Council Science Indian Research*, v. 12, p. 50-52, 1939.

HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. Sedimentation, Concentration Method in *Schistosomiasis mansoni*. *Journal of Public Health, Puerto Rico*, v. 9, p. 283-291, 1934.

UENO, K.; GONÇALVES, P. C. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*. 4. ed. Salvador: Japan International Cooperation Agency, 1998.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO (UFRRJ). INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA. *Técnicas Verster*. Seropédica (Rio de Janeiro): UFRRJ, [s.d.]. Disponível em: <http://r1.ufrrj.br/wp/iv/769/tecnica-verster/>. Acesso em: 21 jun. 2011.

WATANABE, S.; NAGAYAMA, F.; IWATA, K. Simple Detection Technique for *Fasciola hepatica* ova. *Journal of the Japanese Veterinary and Medical Association*, v. 6, p. 176-177, 1953.

WILLIS, H. H. A Simple Levitation Method for the Detection of Hookworm Ova. *Medical Journal of Australia*, n. 29, p. 375-376, 1921.

Bibliografia consultada

AMATO, J. F. R. *Manual de técnicas para a preparação de coleções zoológicas*. 8. Platelminos (temnocefálidos, trematódeos, cestoides, cestodários) e acantocéfalos. São Paulo: Sociedade Brasileira de Zoologia, 1985.

AMATO, J. F. R.; BOEGER, W. A.; AMATO, S. B. *Protocolos para laboratório: coleta e processamento de parasitos de pescado*. Seropédica: Imprensa Universitária da UFRRJ, 1991.

BUSH, A. O. et al. Parasitology Meets Ecology on its Own Terms: Margolis et al. Revisited. *Journal of Parasitology*, v. 83, n. 4, p. 575-583, 1997.

CABLE, R. *An Illustrated Laboratory Manual of Parasitology*. Minneapolis: Burgess, 1969.

- CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. *Parasitologia humana e seus fundamentos gerais*. São Paulo: Atheneu, 1999.
- EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. *Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes*. 2. ed. rev. ampl. Maringá: Eduem, 2006.
- GIRAO, E. S.; UENO, H. Diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose de ruminantes no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 20, n. 4, p. 461-466, 1985.
- HUMASON, G. L. *Animal Tissue Techniques*. 4. ed. San Francisco: Freeman and Company, 1979.
- KAMINSKY, R. G. *Manual de parasitología: técnicas para laboratorios de atención primaria de salud*. Tegucigalpa: Organización Panamericana de la Salud, 1996.
- OLIVEIRA-LIMA, A.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B. Exame de fezes. In: _____. et al. *Métodos de laboratório aplicados à clínica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.
- RAUSCH, R. L.; MASER, C.; HOBERG, E. P. Gastrointestinal Helminths of the Cougar *Felis concolor* L., in Northeastern Oregon. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 19, n. 1, p. 14-19, 1983.
- REY, L. *Parasitologia*. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- ROBERTS, L. S.; JANOVY JR., J. Gerald D. *Schmidt and Larry Roberts's Foundations of Parasitology*. 7. ed. Nova York: McGraw-Hill, 2005.
- ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, J. P. Methods for Egg Counts and Larval Cultures for Strongyles Infesting the Gastrointestinal Tract of Cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 1, p. 99-102, 1950.
- SOULSBY, E. J. L. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals*. Sixth Edition of Mönnig's Veterinary Helminthology & Entomology. Londres: Baillière, Tindall and Cassell, 1968.
- TRAVASSOS, L. *Introdução ao estudo da helmintologia*. Rio de Janeiro: Revista Brasileira de Biologia, 1950.

Capítulo 4

Entomologia Médica

Teresa Fernandes Silva do Nascimento

Maria Goreti Rosa-Freitas

Monique de Albuquerque Motta

André de Figueiredo Barbosa

Nataly Araújo de Souza

Maurício Luiz Vilella

Margareth M. C. Queiroz

Jacenir Reis dos Santos Mallet

Catarina Lopes de Macedo

Teresa Cristina Monte Gonçalves

1. Considerações gerais

1.1 Definição

A entomologia é a parte da ciência que estuda os insetos. Como a maioria das palavras científicas, entomologia é uma palavra grega, uma união de entomo = inseto e logos = ciência.

Entomologia: do grego

entomo = inseto + *logos* = ciência

Inseto: do latim *in sectu* = separado em seções

1.2 Campo de aplicação

A entomologia é uma especialidade científica importante. Os insetos têm muitas formas de interação com os seres humanos e outros seres vivos. Algumas espécies são benéficas, outras deletérias. Das espécies benéficas, as primeiras que nos vêm à mente são as abelhas, com seu adocicado produto, e o bicho-da-seda, com a produção de seu finíssimo fio. Dentre os efeitos benéficos, estão a ação dos insetos como polinizadores e como recicladores de matéria orgânica; no caso dos insetívoros e parasitoides, resalta-se a ação no controle de populações de outros insetos. Insetos também são utilizados como alimento em algumas partes do mundo. Além disso, o uso medicinal de moscas necrobiontó-fagas em feridas necrosadas ainda é uma alternativa terapêutica em alguns casos.

Um interessante ramo da entomologia é o estudo da biologia, ecologia e biogeografia dos insetos para aplicação na medicina legal, a entomologia forense, que engloba três tópicos: entomologia médico-criminal, entomologia urbana e entomologia de produtos armazenados. Como o próprio nome revela, a entomologia médico-criminal é aquela de interesse processual. Insetos hematófagos alimentam-se constantemente em seres humanos. O sangue ingerido por esses insetos pode ser recuperado e usado para identificar o indivíduo do qual proveio o repasto. As marcas de picadas e suas reações podem ser usadas para colocar um indivíduo na mesma área onde os insetos foram encontrados. Material genético, como o DNA contido no sangue do inseto, pode ser recuperado, analisado e usado como evidência em processos criminais, com baixa taxa de erro.

As pesquisas nessa área são feitas desde 1850 e vêm obtendo progresso nas últimas décadas, nas diversas instituições de pesquisa existentes. Os vestígios entomológicos podem ser coletados por peritos bem treinados; entretanto, é imprescindível que a identificação do espécime seja acurada, o que dependerá de um entomologista experiente. A entomologia forense pode ser utilizada em investigações sobre tráfico de entorpecentes, maus-tratos e morte violenta. Nesse último caso, a metodologia pode ajudar a esclarecer a identidade do morto, a causa da morte e o lugar onde ocorreu, mas, principalmente, pode definir a cronotanatognose – intervalo de tempo entre a morte e a localização do cadáver. Para a estimativa do intervalo pós-morte, são utilizados dados dos hábitos e da biologia das espécies necrófagas. Diversos autores recomendam que, em caso de suspeita de morte por envenenamento, os insetos coletados sempre sejam analisados quanto aos vestígios toxicológicos, havendo ou não amostras de tecido do cadáver para análise.

Várias espécies ainda destroem construções, são pragas agrícolas, pestes ou vetores de doenças humanas. É sobre as espécies de artrópodes pestes e vetores de doenças humanas que este capítulo tratará.

1.3 Vetores e parasitos

Várias espécies de artrópodes são parasitos e vetores de doenças para o homem, e delas se ocupa a entomologia médica. Os artrópodes podem ser deletérios pela picada venenosa, por exercerem o hematofagismo ou por transmitirem parasitos ao homem.

Hematófago: do grego *hemato* = sangue
+ *fago* = alimentar-se

Alguns hematófagos podem ter preferência pelo sangue humano ou pelo sangue de outros animais; há ainda aqueles que são ecléticos: sugam o sangue tanto de humanos quanto de animais. O hematofagismo em si é um hábito parasita que impõe perda de sangue ao hospedeiro. Além disso, ao sugar o sangue do hospedeiro, vários parasitos podem ser transmitidos, o que faz dos artrópodes vetores de diversas doenças. A entomologia médica abrange o estudo de artrópodes que não são insetos, estendendo-se ao estudo dos crustáceos, miriápodos e queliceratas.

2. Filo Arthropoda

2.1 Características gerais

Os artrópodes são o mais importante grupo de invertebrados em número de espécies, além de serem extremamente bem-sucedidos na exploração dos mais variados ambientes terrestres, aéreos, de água doce e marinhos. É um grupo muito diversificado. Entre os seus representantes, incluem-se caranguejos, camarões, lacraias, piolhos-de-cobra, aranhas, escorpiões e insetos. Os primeiros artrópodes, os trilobitas, surgiram há aproximadamente 600 milhões

de anos nos oceanos. Espécie já extinta, os trilobitas eram invertebrados que possuíam corpo segmentado, organizado em cefalotórax e abdome, e simetria bilateral, com um exoesqueleto de calcário e quitina, brânquias, um par de antenas e olhos compostos.

A característica que dá nome ao filo Arthropoda são os apêndices articulados formados por articulações móveis de vários tipos, de acordo com a sua função. As patas são usadas principalmente para locomoção; as peças bucais, para captura de presas, sucção e trituração de alimentos; as antenas, para sensoriamento e percepção de estímulos.

Artrópode: do grego
arthro = articulação + *poda* = pé

O filo Arthropoda possui simetria bilateral, apêndices articulados, exoesqueleto quitinoso e cavidade geral, ou hemocele, na qual circula a hemolinfa. A hemolinfa é um fluido aquoso, contendo íons, moléculas e células, com várias funções. Esse fluido circula em baixa pressão e com fluxo lento, passando por cavidades chamadas hemocele. Uma das suas principais funções é a troca química de alimentos e rejeitos metabólicos, hormônios, células e moléculas de defesa imune entre os tecidos dos insetos. A hemolinfa se movimenta pósterio-anteriormente e pode ter cor avermelhada, amarelada ou esverdeada.

Os artrópodes possuem sistema circulatório aberto e lacunar, sistema digestivo completo, sistema nervoso formado por gânglio cerebral e cadeia ganglionar ventral. Os artrópodes são dioicos, de reprodução sexuada e fecundação interna. Existem espécies que são hermafroditas.

Dióico: sexos separados em indivíduos machos e fêmeas.

Fecundação interna: o macho deposita as células sexuais masculinas dentro do corpo da fêmea, no qual se encontram as células sexuais femininas.

As estruturas sensoriais dos artrópodes são eficientes e diversificadas. Possuem sensores químicos capazes de reconhecer a presença de alimentos ou de inimigos naturais e também de identificar seus parceiros sexuais; receptores de paladar, como aqueles localizados nas patas das moscas; sensores posturais – os estatocistos – semelhantes aos encontrados nos demais invertebrados; e receptores olfativos, auditivos e luminosos.

A utilização de sensores visuais, olfativos, de temperatura e outros determina o comportamento dos artrópodes na procura da fonte alimentar, sua relação com o hospedeiro e a transmissão de patógenos. Insetos como mosquitos e borrachudos utilizam seus sensores visuais para escolher cores onde pousarão e farão seu repasto sanguíneo. Os tabanídeos podem detectar grandes contornos que contrastam com o céu, alimentando-se, preferencialmente, em grandes ungulados. Sensores olfativos para o dióxido de carbono, exalado na respiração de vertebrados, e para o ácido láctico, molécula comum no suor humano, podem indicar a existência de fontes de alimentação. O conhecimento desses mecanismos de atração pode ser utilizado na confecção de armadilhas para esses artrópodes.

O esqueleto rígido dos artrópodes, embora confira ao grupo proteção mecânica, também limita o seu crescimento: para crescer, o exoesqueleto é trocado num processo denominado muda ou ecdise; ocorrem de 4 a 7 mudas do exoesqueleto até o artrópode atingir o estágio adulto. O exoesqueleto vazio abandonado recebe o nome de exúvia.

Muda ou ecdise: mudança de exoesqueleto

Exúvia: exoesqueleto vazio abandonado

Apesar de sua grande diversidade, todos os artrópodes exibem, em comum, as seguintes características:

- exoesqueleto quitinoso dividido em placas ou escleritos, unidos por estruturas membranosas
- simetria bilateral
- corpo segmentado
- apêndices articulados
- aparelho circulatório aberto, com vaso dorsal
- cordão nervoso ventral
- musculatura predominantemente estriada

2.2 Metamorfose

Os artrópodes podem manter a mesma forma ou se transformar durante o seu ciclo de vida. Aqueles que não modificam a sua morfologia são denominados ametábolos. Entre os que se transformam, há os que sofrem metamorfose parcial – os **hemimetábolos** – ou total – os **holometábolos**. Os ametábolos e alguns hemimetábolos – como piolhos e hemípteros – vivem no mesmo ambiente em todas as fases de sua vida, competindo entre si. Os holometábolos – como borboletas, moscas e mosquitos – exploram ambientes distintos nas diferentes fases de seu ciclo de vida e não competem entre si. A não competição entre os estágios é uma grande vantagem para o grupo dos holometábolos.

2.3 Taxonomia

Taxonomia é a disciplina científica que cuida da ordenação das espécies em grupos com base em características comuns. Os grandes grupos taxonômicos

são divididos nos seguintes níveis: **reino, filo, classe, ordem, família, gênero e espécie**. Esses níveis ainda podem ser subdivididos pela adição de supergrupos e subgrupos.

As espécies têm dois nomes científicos em latim. Por exemplo, o mosquito vetor do vírus da dengue tem o nome científico *Aedes aegypti*: *Aedes* é o nome do gênero; *aegypti*, o nome da espécie. Essa é uma linguagem adotada por todos os especialistas. Assim, seja qual for o nome vulgar localmente dado ao mosquito *Aedes aegypti*, é possível uma comunicação correta entre os estudiosos sobre a espécie em questão, mencionando-se o seu nome científico. Até o nível da ordem, é esta a posição taxonômica dos artrópodes de interesse médico:

reino Animalia > sub-reino Bilateria > filo Arthropoda > subfilo Crustacea;

reino Animalia > sub-reino Bilateria > filo Arthropoda > subfilo Chelicerata
> classe Arachnida;

reino Animalia > sub-reino Bilateria > filo Arthropoda > subfilo Myriapoda
> classes Chilopoda e Diplopoda;

reino Animalia > sub-reino Bilateria > filo Arthropoda > subfilo Hexapoda
> classe Insecta.

2.4 Subfilos e classes de artrópodes mais comuns e de importância médica

Dentro do filo Arthropoda, destacam-se o subfilo Crustacea e as classes Chilopoda, Diplopoda, Arachnida e Insecta entre as espécies de importância médica e veterinária; as principais características dos subfilos e filios de artrópodes estão sumarizadas no quadro 1.

Quadro 1. Classes e subclasses do filo Arthropoda de interesse médico.

Subfilo	Classe	Características	Esquema*
Crustacea	Várias classes (caranguejos, camarões, copépodes)	<ul style="list-style-type: none"> • geralmente possuem apenas cefalotórax e abdome • pares de patas em número variado • dois pares de antenas 	
Myriapoda	Chilopoda (centopeias, lacrarias)	<ul style="list-style-type: none"> • apresentam cabeça e muitos segmentos corporais • um par de patas por segmento corporal • um par de antenas • primeiro par de patas modificado em pinças venenosas 	
	Diplopoda (piolho-de-cobra, gongolo)	<ul style="list-style-type: none"> • cabeça, tórax curto, abdome segmentado • dois pares de patas por segmento corporal • um par de antenas 	
Chelicerata	Arachnida (aranhas, escorpiões, carrapatos, ácaros)	<ul style="list-style-type: none"> • dois segmentos corporais: cefalotórax e abdome • quatro pares de patas • um par de quelíceras • não possuem antena 	
Hexapoda	Insecta (mosquitos, besouros, vespas, mariposas, borboletas, formigas, flebotomos)	<ul style="list-style-type: none"> • possuem cabeça, tórax e abdome • três pares de patas • um par de antenas • diversas modificações nos apêndices 	

Fonte: Adaptado de University of Sydney, 2004.

2.4.1 Subfilo Crustacea

Os crustáceos possuem dois pares de antenas, numerosos pares de patas, geralmente cinco ou mais, e o corpo dividido em cefalotórax e abdome. Os representantes dos crustáceos mais conhecidos são os camarões, os siris, os caranguejos e as lagostas. Nos crustáceos, o cefalotórax é dotado de uma extremidade serrilhada, chamada rostro. A boca é ventral, com mandíbulas, que são peças mastigadoras. Os principais apêndices articulados estão ligados ao cefalotórax. Muitas das patas apresentam apêndices birremes adaptados à natação. No sistema nervoso, existem gânglios supraesofágicos que formam o cérebro. A visão é dada por olhos compostos, pedunculados e móveis. Pelos distribuídos por todo o corpo são responsáveis pelo equilíbrio, tato, gosto e olfato. Há crustáceos sésseis, como as cracas, que vivem fixos a um substrato. Outros, como o paguro ou bernardo-eremita, apresentam a porção posterior do corpo desprovida de exoesqueleto e ocupam conchas deixadas por moluscos mortos. Os crustáceos habitam ecossistemas tanto marinhos quanto de água doce, havendo mesmo representantes que habitam ambiente terrestre úmido, como o tatuzinho-de-jardim. Uma grande população de microcrustáceos do ambiente aquático, como os copépodes e o krill, forma o zooplâncton. Algumas espécies de crustáceos copépodes são vetores de helmintos, como é o caso da difilobotríase.

Algumas espécies de **copépodes** são vetoras de helmintos.

2.4.2 Subfilo Myriapoda

No subfilo Myriapoda encontram-se as classes Chilopoda e Diplopoda.

- **Classe Chilopoda**

Os quilópodes, conhecidos vulgarmente por centopeias, lacraias ou escolopendras, apresentam corpo alongado e achatado dorsoventralmente, com um número variado de segmentos, que podem chegar a 170. Na cabeça,

possuem um par de longas antenas, um par de mandíbulas, dois pares de maxilas e um par de forcípulas ou aguilhão, estrutura inoculadora de veneno. São artrópodes de hábitos predatórios, e alguns gêneros – como *Scolopendra*, que alcança 30 cm – alimentam-se de pequenos lagartos, rãs, pássaros e até de morcegos. São encontrados principalmente em regiões quentes, escondendo-se durante o dia debaixo de pedras e troncos caídos, sendo ativos à noite, quando saem em busca de alimento. Algumas espécies desse gênero podem inocular potente veneno ou peçonha, em cuja composição entram proteases, histamina, acetilcolina e serotonina, capazes de causar acidentes peçonhentos sérios. Acidentes peçonhentos em humanos têm sido relatados, com quadro clínico de febre e reações alérgicas fortes. Apesar da dor intensa que podem causar, raramente são fatais. No Brasil, a lacraia mais comum é a *Scolopendra viridicornis*, que pode atingir 20 cm de comprimento.

- **Classe Diplopoda**

Os diplópodes são também chamados de piolhos-de-cobra, gongolos e embuás. Possuem corpo semicilíndrico, formado de 25 a 100 segmentos. Apresentam, na região cefálica, antenas curtas e olhos simples. De hábitos noturnos, habitam lugares escuros e úmidos. São herbívoros e detritívoros. Como mecanismo de defesa, esses artrópodes, ao serem tocados, enrodam-se em espiral, o que lhes confere uma superfície de maior resistência. Entretanto, apesar de não atacarem e não inocularem veneno, são capazes de liberar fluidos irritantes, como as benzoquinonas, que podem fluir dos poros ou serem ejetados à distância de até 1 metro. Em contato com a pele humana, esses líquidos podem causar sensação de ardência como de uma queimadura leve; caso o contato com o fluido seja mantido por longo tempo, pode ocasionar a formação de bolhas, vesículas e ulcerações. Os raros acidentes humanos ocorridos têm sido relatados com crianças ou profissionais que coletam esses artrópodes para fins de pesquisa, sem tomar as devidas precauções, como o uso de luvas e pinças, ou seja, uso de equipamentos de proteção individual

(EPIs) adequados. Um caso registrado nos arquivos médicos é de lesão da mucosa ocular que progrediu para conjuntivite e ulceração da córnea, levando o indivíduo à cegueira em 7 dias. A espécie de diplópode mais importante no Brasil é *Rhinocricus padbergi*.

2.4.3 Subfilo *Chelicerata*

• Classe **Arachnida**

A classe Arachnida engloba as aranhas, os escorpiões, os ácaros e os carrapatos. Assim como os crustáceos, os aracnídeos apresentam o corpo dividido em duas partes: cefalotórax e abdome. Quando adultos, possuem quatro pares de patas, podendo ter apenas três nas fases imaturas. Não possuem antenas. A grande maioria tem hábitos terrestres, sendo parasitos, predadores ou hematófagos. Dessa forma, estão relacionados com a transmissão de patógenos para o homem e os animais. O sistema circulatório é aberto, e o sangue contém hemocianina. A respiração é traqueal, único sistema presente em aracnídeos pequenos; nos escorpiões e em muitas aranhas, existe uma abertura ventral no abdome que se comunica com os pulmões foliáceos. A estrutura interna desses órgãos assemelha-se a um livro com as folhas entreabertas, cujas lâminas delgadas são vascularizadas e permitem a ocorrência de trocas gasosas entre o sangue e o ar. Esse tipo especial de respiração pulmonar é chamado de respiração filotraqueal. A excreção é realizada por meio dos túbulos de Malpighi e, em aracnídeos maiores, pelas glândulas coxais, localizadas no cefalotórax. O produto mais importante da excreção nitrogenada, nesses animais, é a guanina. As aranhas possuem sexos separados, e frequentemente os machos são menores do que as fêmeas. A importância médica dos aracnídeos está no fato de algumas espécies causarem acidentes sérios por picada venenosa, como é o caso das aranhas e escorpiões, serem vetores de doenças humanas e veterinárias, como é o caso dos carrapatos, e também por causarem alergia, como os ácaros do pó doméstico.

As **aranhas** possuem o cefalotórax unido ao abdome por um pedículo. Na região anterior do cefalotórax, encontram-se oito olhos simples e alguns apêndices articulados. As quelíceras são estruturas adaptadas para a captura do alimento, e sua extremidade tem forma de garra, dotada de um orifício no qual se abre a glândula do veneno. Os pedipalpos são apêndices úteis na trituração dos alimentos. Os machos usam os pedipalpos para a deposição dos espermatozoides. Muitas aranhas, ao inocularem o veneno na presa, inoculam também enzimas digestivas, que realizam digestão extracorporal, ou seja, os tecidos da presa são parcialmente digeridos por essas enzimas antes da sua ingestão pela aranha. Após certo tempo, essas aranhas simplesmente sugam os tecidos do animal morto, já liquefeitos e parcialmente digeridos. Na porção posterior do abdome, abrem-se as fiandeiras, estruturas responsáveis pela confecção das teias. As teias servem de abrigo, proteção, local de acasalamento e armadilha para a captura de insetos e de outros animais, que são a sua principal fonte alimentar. A seda da teia se solidifica em contato com o ar. Os acidentes decorrentes de picadas de espécies peçonhentas estão relacionados aos gêneros *Latrodectus*, ou viúva-negra, *Loxosceles*, ou aranha-marrom, *Lycosa* sp, ou aranha-de-grama, e *Phoneutria* sp, ou armadeira.

Os **escorpiões** são os mais primitivos de todos os artrópodes terrestres atuais. Habitam regiões quentes e secas, escondendo-se durante o dia em vários locais protegidos, saindo à noite para capturar suas presas, principalmente insetos e aranhas, capturados com seus pedipalpos e mortos com o ferrão. A fecundação dos escorpiões é interna e, em muitas espécies, o desenvolvimento dos ovos também é, ou seja, ocorre dentro do sistema reprodutor feminino. Apresentam o corpo alongado, dividido em cefalotórax e abdome. No cefalotórax, há um par de quelíceras, um par de pedipalpos bastante desenvolvidos que termina em forma de pinças, semelhantes às pinças dos caranguejos, e quatro pares de patas. O abdome é formado por duas regiões distintas: uma porção anterior larga e achatada, constituída por sete segmentos, denominado pré-abdome, e uma porção posterior, cilíndrica e estreita, formada por cinco segmentos, denominada pós-abdome. O último segmento

do pós-abdome recebe o nome de télson, e sua extremidade distal termina em um ferrão (acúleo, aguilhão), em cuja porção arredada estão localizadas as glândulas de veneno. O gênero *Tityus* abriga as espécies mais perigosas no Brasil, sendo o *Tityus serrulatus* a espécie responsável por acidentes de maior gravidade e considerada a espécie mais venenosa da América do Sul.

Télson: último segmento do abdome; em sua extremidade distal há um ferrão onde desemboca a glândula de veneno.

Os **ácaros** e **carrapatos** apresentam cefalotórax e abdome fundidos, o que lhes dá ao corpo o aspecto de um segmento único. Os carrapatos são hematófagos. Existem espécies zoofílicas, antropofílicas e ecléticas. Algumas espécies de carrapatos são importantes vetores de doenças para o homem e os animais, como encefalites e viroses, febres recorrentes, doença de Lyme, febre maculosa, babesiose e tularemia. A ação deletéria que os carrapatos exercem sobre seus hospedeiros pode ser de diferentes tipos. Quando extraem um grande volume de sangue, ou há um alto nível de infestação, pode-se dizer que é uma ação espoliativa. Caso desencadeiem uma reação alérgica ou irritante no hospedeiro, causada pelo contato com as substâncias contidas em sua saliva, dizemos que ocorreu uma ação tóxica. Caso estejam infectados com algum agente patogênico, como vírus, bactérias ou protozoários, que possam ser transmitidos ao hospedeiro durante o repasto sanguíneo, dizemos que houve uma ação patogênica.

Os **ácaros** podem ser predadores, fitófagos, detritípagos e importantes ectoparasitas humanos, como o *Demodex folliculorum*, que habita o folículo piloso humano e determina o aparecimento dos chamados cravos da face, ou aqueles causadores de alergias e encontrados no pó doméstico, como os ácaros do gênero *Dermatophagoides*. Outro ácaro, o *Sarcoptes scabiei*, é o agente causador da sarna humana. Suas fêmeas penetram na pele, por onde caminham, fazendo túneis epidérmicos nos quais deixam seus ovos. A infestação da pele causa intensa coceira e costuma ser acompanhada por in-

fecções bacterianas associadas. Essas espécies serão vistas com mais detalhes nas próximas seções.

2.4.4 Subfilo Hexapoda

- **Classe Insecta**

○ grande sucesso dos insetos deve-se em parte ao seu exoesqueleto, que lhes confere uma mistura de flexibilidade e força, permitindo que o inseto tenha liberdade de movimento e, ao mesmo tempo, não perca em defesa e proteção. ○ exoesqueleto é constituído de cutícula, a membrana mais externa, epiderme e membrana basal. A cutícula é uma camada relativamente fina de material não celular que delimita a superfície externa do corpo, de estrutura flexível e elástica. Imediatamente após ser formada, é branca, podendo permanecer dessa cor em muitas formas jovens. Na maioria dos adultos, a cutícula passa por um processo químico que resulta no seu endurecimento e escurecimento, processo denominado esclerotização. A cutícula possui uma camada de cera e é formada por quitina – um polissacarídeo nitrogenado insolúvel na água –, álcool, álcalis e ácidos diluídos, ou pelos sucos digestivos de outros animais. A função da cutícula é evitar a perda de água, prevenir a predação e prover camuflagem. ○ exoesqueleto é responsável pela cor, que provém de pigmentos oriundos de plantas e do metabolismo.

Exoesqueleto: cutícula de revestimento dos artrópodes formada por proteína e quitina.

Quitina: polissacarídeo nitrogenado ($C_8H_{18}O_5N$) insolúvel na água.

Os primeiros insetos viveram há mais de 300 milhões de anos. Os insetos estão presentes em todos os ecossistemas do planeta: nos oceanos e rios,

nas florestas e desertos, e até na neve. Atualmente existem mais de 1 milhão de espécies catalogadas. Novas espécies, desconhecidas para a ciência, são descritas diariamente. Os insetos são responsáveis pela polinização de mais de 70% de todas as plantas com flores. Sua importância médica está relacionada à transmissão de doenças como a malária, a dengue, a febre amarela e a doença de Chagas, entre outras. A estocagem de alimentos e a produtividade agrícola sofrem grandes perdas pela ação destruidora de muitas espécies de insetos, que podem devorar lavouras inteiras, como os gafanhotos, ou transmitir doenças para as plantações.

Os insetos são animais invertebrados, com exoesqueleto quitinoso e três pares de patas. O corpo é dividido em três partes: cabeça, tórax e abdome. Nessas duas últimas partes, pode-se notar uma segmentação mais evidente. Na cabeça, encontram-se um par de antenas e um par de olhos compostos, nos quais a imagem se forma em mosaico. Junto da boca, estão as peças, ou aparelhos bucais especializados. As antenas são apêndices móveis que podem funcionar como órgãos olfativo, auditivo, gustativo e tátil.

No tórax, estão as patas e asas (quando presentes). Em algumas espécies, existem halteres ou balancins, cuja função é o equilíbrio e a direção do voo. Os insetos desprovidos de asas, como a traça-dos-livros, são denominados ápteros; os que possuem um par de asas são os dípteros; os que dispõem de dois pares de asas são chamados tetrápteros. As asas podem ser agrupadas nos seguintes tipos: membranosas, tégminas, élitros e hemiélitros. As asas dos besouros têm o par anterior espesso, formando uma carapaça protetora, e são chamadas élitros. Alguns insetos, como as formigas e os cupins, têm asas apenas nos seus estágios sexualmente ativos, enquanto os demais membros da sociedade (soldados, operárias) não possuem asas.

Os insetos apresentam fecundação interna, e as fêmeas são ovíparas, depositando os ovos, para se desenvolverem, fora do corpo. Formas especiais de reprodução, como a partenogênese, a pedogênese, e a poliembrionia, também são observadas.

A excreção dos insetos, cujo principal resíduo metabólico é o ácido úrico, é feita pelos túbulos de Malpighi. O sistema nervoso é ganglionar, com um gânglio cerebroide bem desenvolvido e um cordão nervoso ventral. Órgãos auditivos estão presentes, como o órgão timpânico, localizado no tórax ou no abdome. Machos de mosquitos pertencentes à família Culicidae possuem receptores de som, chamados órgãos de Johnston, nas antenas.

Todo inseto tem:

- exoesqueleto quitinoso
- três pares de patas
- peças bucais externas, ou ectognatas
- de cinco a doze segmentos abdominais

a) Posição taxonômica

Os insetos pertencem à classe Insecta. As ordens Diptera, Hemiptera, Anoplura, Siphonaptera e Homoptera, que serão detalhadas nas próximas seções, são de interesse médico; as ordens Lepidoptera e Coleoptera têm certo interesse médico, pois podem causar envenenamento se ingeridas.

b) Morfologia externa dos insetos

O conhecimento da morfologia é importante, pois ela se relaciona com a função, ou seja, tipos de alimento, parceiros e habitat, que, por sua vez, guardam relação com a epidemiologia das doenças. As asas e a função do voo, por exemplo, dão aos mosquitos e às moscas capacidade de procurar hospedeiros de forma mais efetiva que os piolhos. A procura de abrigo dentro do domicílio humano também facilita a proximidade com o homem. A coevolução entre o tipo de aparelho bucal e o tipo de alimentação dos diferentes insetos hematófagos com ciclos de parasitos causadores de doenças no homem determina uma interação específica na qual, muitas vezes, apenas

uma espécie de inseto funciona como vetor de determinado parasito. Exemplos dessa interação são os ciclos da leishmaniose tegumentar e da malária. Os flebótomos têm a probóscide curta, cortam os tecidos, permitindo o extravasamento do sangue para uma pequena lesão sob a pele, da qual sugam diretamente o sangue. Como as formas infectantes da leishmaníase ficam situadas nas bordas da lesão, a leishmaníase é ingerida junto com o sangue e fragmentos do tecido dilacerado. Os mosquitos, por sua vez, têm probóscide longa que permite a eles ingerir sangue como através de uma agulha de seringa. O plasmódio da malária corre livre pelas veias do hospedeiro e é sugado pelo mosquito. Essas adaptações morfológicas ao longo da evolução propiciaram o desenvolvimento da relação parasito–hospedeiro e dos ciclos de transmissão nos estágios que atualmente observamos.

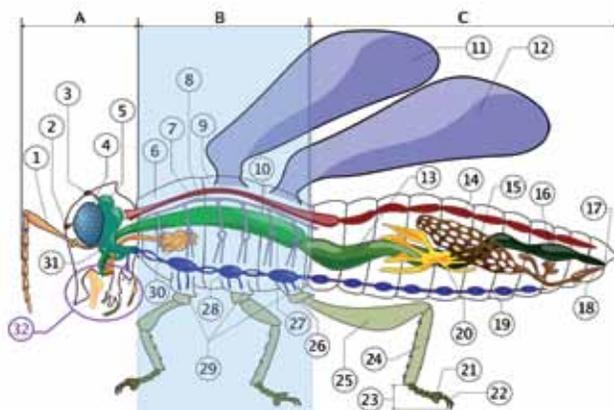


Figura 1. Esquema de um inseto apresentando a morfologia externa e a interna:
A) Cabeça: antena (1), ocelo inferior (2), ocelo superior (3), olho composto (4), cérebro e gânglios cerebrais (5), gânglio subesofágico (31) e peças bucais (32); **B) Tórax:** protórax (6), artéria dorsal (7), tubos traqueais e espiráculos (8), mesotórax (9), metatórax (10), primeiro par de asas (11), segundo par de asas (12), tarsômero (21), garras tarsais (22), tarso (23), tíbia (24), fêmur (25), trocânter (26), intestino anterior (estomodeo) (27), gânglios torácicos (28), coxa (29) e glândula salivar (30); **C) Abdome:** intestino médio (mesêntero) (13), coração (14), ovário (15), intestino posterior (proctodeo) (16), ânus (17), vagina (18), gânglios abdominais (19) e túbulos de Malpighi (20).

Ilustração: Adaptada de Jaworski, 2008.

As estruturas que fazem parte do aparato bucal dos insetos são o lábio, o labro, um par de palpos labiais, um par de palpos maxilares e o clipeo. As peças do aparato bucal são modificadas em cada grupo de insetos, dependendo dos hábitos alimentares. Assim, de acordo com esses hábitos, o aparelho bucal pode ser sugador, mastigador, triturador e lambedor.

Tipos de aparato bucal dos insetos

- sugador
- mastigador
- triturador
- lambedor

De acordo com o grupo de insetos, as antenas possuem diferentes formatos e têm funções variadas, como olfativas e acústicas. Com as antenas, os insetos podem encontrar alimentos, hospedeiros e parceiros sexuais, podem se comunicar e evitar a predação, através de feromônios, que são substâncias químicas liberadas e captadas pelos sensores contidos nas antenas.

O tórax é dividido em três segmentos: protórax, mesotórax e metatórax. Cada segmento tem um par de patas e, nos insetos alados, um ou dois pares de asas: um no mesotórax, outro no metatórax. Cada segmento torácico consiste em placas endurecidas, ou escleritos. Os escleritos dorsais são chamados notos, os laterais são chamados pleura e os ventrais, esternos. O 1º segmento do protórax é o pronoto. O pronoto é o esclerito dorsal do protórax, que pode estar modificado em várias ordens.

As patas anteriores estão inseridas no protórax, as patas médias, no mesotórax e as posteriores, no metatórax. Cada pata tem seis partes principais, listadas, do corpo à porção distal, como coxa, trocânter, fêmur, tíbia, tarso e garras. O fêmur e a tíbia podem ser modificados com espinhos. Como o aparelho bucal e as antenas, as patas dos insetos são modificadas para funções diferentes, dependendo do ambiente e do estilo de vida.

Tórax dos insetos

- as inserções de asas e pernas ocorrem no tórax
- as divisões do tórax são protórax, mesotórax e metatórax
- o tórax apresenta aberturas para trocas gasosas

Patas dos insetos

- anteriores
- médias
- posteriores

Os **tipos de pata** são importantes para caracterizar os hábitos do inseto:

- saltatórias – saltam
- raptoras – captura de presas
- cursoriais – correm
- natatórias – nadam
- gressoriais – andam
- fossoriais – escavam

As patas têm **seis segmentos**:

- coxa
- trocânter
- fêmur
- tíbia
- tarso
- garras

Os insetos têm muitos tipos de asas; num mesmo espécime pode até mesmo coexistir mais de um tipo de asa. As veias da asa são um caráter taxonômico importante na caracterização dos gêneros e espécies. Na maioria dos insetos, a presença de escleritos axilares permite que as asas se dobrem sobre o inseto. Isso possibilita aos insetos caberem em espaços menores.

c) Abdome

O abdome contém a maioria dos órgãos vitais e pode apresentar até doze segmentos. Os segmentos abdominais dorsais são denominados tergo; os ventrais, esterno. Aberturas chamadas espiráculos para trocas de gases podem ser encontradas no tecido conjuntivo entre o tergo e os esternos. As estruturas reprodutivas dos machos – incluindo o edeago, ou pênis, e frequentemente um par de claspets – estão situadas no 9º segmento; as estruturas reprodutivas das fêmeas estão localizadas nos 8º e 9º segmentos abdominais. O último segmento pode trazer apêndices, que são chamados cercos.



Figura 2. Alguns himenópteros possuem cercos modificados que permitem a eles perfurar certas superfícies para a oviposição.

Ilustração: Reproduzida de University of Minnesota, s.d.

d) Morfologia interna dos insetos

Como mencionado anteriormente, os insetos possuem simetria bilateral. O corpo, geralmente alongado, é segmentado e dividido em cabeça, tórax e abdome. A percepção sensorial, a integração neural e a ingestão de comida são funções localizadas na cabeça. Alguns órgãos com funções digestivas, respiratórias e circulatórias, incluindo o coração, estão localizados no tórax. No abdome, estão localizados outros órgãos dos sistemas digestivo, respiratório e circulatório, além dos sistemas excretor e reprodutor.

Todos os músculos dos insetos, inclusive os do tubo digestivo e do coração, são de tipo estriado esquelético. Para mover antenas, patas, asas e outros apêndices, geralmente há músculos flexores e pares antagônicos de músculos. A hemolinfa e a elasticidade da cutícula colaboram nos movimentos.

○ tamanho reduzido dos insetos combinado com a quantidade de músculos permitem movimentos como andar, saltar e voar grandes distâncias, carregar pesos, localizar parceiros e alimentos, e nadar. A agilidade conferida pelo sistema muscular dá aos insetos precisão de movimentos, o que lhes permite escapar de agressões do hospedeiro e de predadores.

○ sistema nervoso dos insetos consiste em um cérebro, localizado na cabeça, e em um cordão nervoso, localizado ventralmente, com gânglios em cada segmento, que podem estar fundidos ou não.

Muitos órgãos dos insetos produzem hormônios, a maioria com função de controle nos processos reprodutivos e de metamorfose e muda. As células neurosecretoras segregam um ou mais hormônios com papel no crescimento, metamorfose e reprodução. ○ *corpora allata* produz hormônio juvenil cuja função é a de inibir a metamorfose; esse hormônio está envolvido na vitelogênese, na função das glândulas reprodutivas acessórias, na produção de feromônio e no comportamento sexual. ○ *corpora cardíaca* produz um hormônio importante na diferenciação de ovários e glândulas reprodutivas acessórias, e também na oogênese. A glândula protorácica está envolvida na produção de ecdisona, que é o hormônio responsável pela muda na metamorfose.

Grande número de espécies de insetos vive parte ou a totalidade de sua vida na água – nas estratégias de controle da população desses insetos.

○ sistema circulatório dos insetos é formado por um único vaso, que se localiza na parte dorsal, da cabeça até a porção posterior do abdome, e por onde flui a hemolinfa. ○ coração pulsa de maneira peristáltica, empurrando o sangue da cabeça para o abdome.

Os crustáceos e os aracnídeos empregam a hemolinfa como veículo de distribuição de oxigênio e gás carbônico – gases respiratórios –, usando o pigmento respiratório hemocianina, semelhante à hemoglobina dos anelídeos e dos vertebrados. A distribuição dos gases respiratórios em insetos, quilópodes e diplópodes se dá por um sistema de canais, chamados traqueias, pois sua hemolinfa não possui pigmentos respiratórios.

A respiração do inseto é realizada sem pulmões, por meio de um sistema de tubos e de sacos internos que se difundem ou são bombeados ativamente, entregando o oxigênio diretamente aos tecidos. O oxigênio entra no corpo dos insetos através de espiráculos e, em seguida, passa pelas traqueias e traquéolas, até atingir os tecidos. O dióxido de carbono faz a rota contrária. A troca gasosa se dá por difusão simples. Os espiráculos – de um a dez pares de pequenas aberturas no exoesqueleto – localizam-se na parte lateral do corpo, indo do mesotórax, passando pelo metatórax, e alcançando os primeiros sete ou oito segmentos abdominais. Alguns insetos podem fechar seus espiráculos.

Os insetos têm um sistema digestivo completo, com um tubo que vai da boca ao ânus. O sistema excretor consiste nos túbulos de Malpighi, para a remoção dos dejetos nitrogenados, e no intestino posterior, para a regulação osmótica de água e sais. O canal alimentar está dividido em três regiões: estomodeu, mesêntero e proctodeu. Alguns insetos produzem fluidos digestivos, secretados pelas glândulas salivares, para começar a digestão. Mediante movimentos peristálticos, a faringe leva a comida para o papo, onde ela é estocada. O proventrículo pode ser provido de dentes que ajudam a reduzir as partículas de comida – é possível que ocorra absorção de comida nessa região. O mesêntero, que produz e secreta enzimas digestivas, absorvendo os produtos da digestão, possui células epiteliais com ou sem cutícula presente. Esses tecidos são delicados e protegidos pela membrana peritrófica, que evita o contato direto com a comida. A maioria das atividades enzimáticas e de absorção ocorre nessa região. Na região do proctodeu, situam-se os túbulos

de Malpighi, que diferem dos nefrídios por não lançarem resíduos metabólicos diretamente no exterior, e sim no interior do intestino.

Membrana peritrófica: composta de quitina e proteína, essa membrana reveste o epitélio do intestino médio. Ao separar o alimento do epitélio, ela o protege da ação de microrganismos ingeridos com o alimento e da abrasão, além de promover a compartimentalização das enzimas digestivas, aumentando a eficiência da digestão. É de grande importância no ciclo de vida de diversos parasitos.

Glândulas salivares: são de grande importância no ciclo de vida dos insetos e na transmissão de parasitos, como os da malária, as leishmânias e alguns tipos de tripanossomas.

A reprodução da maioria dos insetos é interna, sexuada e dioica, ou seja, indivíduos machos e fêmeas combinam material genético. Contudo, pode haver insetos que se reproduzem por partenogênese, quando há apenas fêmeas, e hermafroditas, com ambos os sexos no mesmo indivíduo. As gônadas geralmente estão localizadas na parte posterior do abdome. As fêmeas possuem uma estrutura acoplada ao ovário chamada espermateca, com função de estocagem de esperma. Nos machos, os vasos deferentes são dutos que se unem e desembocam no tubo ejaculatório. Os sistemas masculino e feminino possuem glândulas acessórias.

É grande a variação nos sistemas reprodutivos dos insetos. Essa variação determina a taxonomia das espécies. Espécies estreitamente relacionadas são muitas vezes isoladas geneticamente por pequenas variações na morfologia dos órgãos reprodutivos que proíbem o acasalamento interespecífico. A maioria dos insetos é ovípara, mas os insetos também podem ser ovovivíparos ou vivíparos. A chegada ao estágio adulto, ou imago, dá-se depois de uma ou mais metamorfoses. No imago, estão presentes todos os órgãos que caracterizam um adulto da espécie.

Quadro 2. Morfologia interna de um inseto.

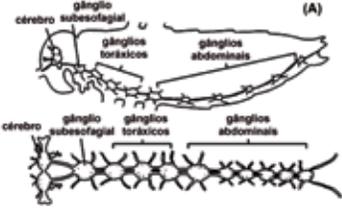
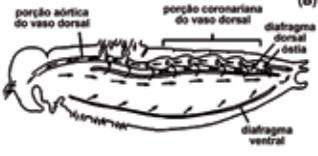
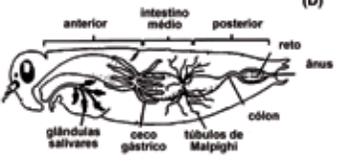
Sistema	Esquema
Nervoso	 <p>(A)</p>
Circulatório	 <p>(B)</p>
Respiratório	 <p>(C)</p>
Digestivo	 <p>(D)</p>
Reprodutor	 <p>(E)</p>

Ilustração: Adaptada de University of Minnesota, s.d.

3. Principais ordens de insetos de interesse médico

As ordens da classe Insecta de interesse médico relacionadas a doenças humanas, ou antroponoses, e a doenças humanas e de animais, ou antropozoonoses, são Diptera, Hemiptera e Anoplura. Na ordem Diptera, serão vistas as famílias Culicidae, Psychodidae, Simuliidae e Ceratopogonidae.

Antroponoses: doenças humanas

Antropozoonoses: doenças humanas e de animais

3.1 Ordem Diptera

A ordem Diptera se sobrepõe em importância médica e veterinária a todas as outras ordens de insetos, uma vez que grande número de espécies está implicado na veiculação de doenças. Os dípteros têm como característica um par de asas, de onde advém o nome Diptera, e o segundo par transformado em balancins (halteres), órgão que dá equilíbrio ao voo. Dentro dessa ordem existem também espécies sem asas. Os dípteros são holometábolos, ou seja, sofrem metamorfose completa durante o seu desenvolvimento. Na ordem Diptera, subordem Nematocera, encontram-se três famílias – Culicidae, Psychodidae e Ceratopogonidae – e a subordem Brachycera (Muscomorpha), que são de interesse médico e serão descritas a seguir. As espécies hematófagas são vetores biológicos de diversos parasitos. As moscas saprófagas e coprófagas são vetores mecânicos de diversos agentes etiológicos de doenças – bactérias, vírus, fungos, cistos e oocistos de protozoários, larvas e ovos de helmintos. Muitos dípteros frequentam habitações humanas, hospitais, restaurantes, feiras livres, lixões, dentre outros biótopos.

Diptera, do grego

di = dois + *ptera* = asas

3.1.1 Família Culicidae

Pertencem à família Culicidae insetos vulgarmente conhecidos como mosquitos, carapanãs, muriçocas ou pernilongos. São dípteros nematóceros, de corpo delgado e porte pequeno, possuindo, como os demais membros da ordem Diptera, um par de asas e um par de halteres. Os culicídeos diferem dos outros dípteros pela presença de escamas nas veias alares. Não possuem ocelos. São insetos holometábolos, cujas formas imaturas habitam diferentes coleções hídricas, dependendo da espécie. Apresentam acentuado dimorfismo sexual, sendo os machos menores do que as fêmeas e com as antenas plumosas. As fêmeas são, em sua maioria, hematófagas, alimentando-se do sangue de vertebrados para o desenvolvimento de seus ovos. Tal comportamento alimentar resulta na transmissão de diversas doenças ao homem e aos animais. Os patógenos que estiverem no sangue ingerido poderão se multiplicar e infectar os órgãos e as glândulas salivares das fêmeas, sendo transmitidos a outros vertebrados em um próximo repasto sanguíneo. Essa característica tem feito aumentar o número de pesquisas sobre a família. Encontrados em praticamente todos os continentes, com cerca de 3.500 espécies formalmente descritas, distribuídas em 44 gêneros e 145 subgêneros, os culicídeos possuem grande capacidade vetorial, veiculando diversos agentes patogênicos. A região neotropical detém 27% das espécies, sendo a região de maior endemidade dos culicídeos e de onde provavelmente se originou essa família de dípteros, no início do Cretáceo.

a) Taxonomia

Os culicídeos estão divididos em duas subfamílias: Culicinae e Anophelelinae; essas, por sua vez se subdividem em 11 tribos: Aedeomyiini, Aedini, Culicini, Culisetini, Ficalbiini, Hodgesiini, Mansoniini, Orthopodomyiini, Sabethini, Toxorhynchitini e Uranotaeniini. Até a década de 1990, a tribo Toxorhynchitini era considerada uma subfamília dentro dos culicídeos (subfa-

mília Taxorhynchitinae). Estudos sistemáticos e filogenéticos atuais situam esse táxon como tribo dentro da subfamília Culicinae. Nessa tribo, encontram-se as espécies sem interesse médico, pois as fêmeas não são hematófagas.

Para identificarmos certas espécies de culicídeos, as ferramentas da taxonomia morfológica clássica não satisfazem plenamente a correta classificação dos espécimes. Essa identificação muitas vezes exige o uso de métodos da sistemática integrada, que utiliza técnicas da citologia, da bioquímica e da biologia molecular – como a citotaxonomia, PCR e RAPD-PCR de regiões do DNA, a análise isoenzimática e de hidrocarbonetos de cutícula. A sistemática integrada usa, ainda, técnicas de estudos morfológicos tradicionais, empregando programas estatísticos e filogenéticos para separar e permitir um melhor conhecimento das espécies.

As técnicas da sistemática integrada são imprescindíveis no estudo de complexos de espécies crípticas, que são morfológicamente idênticas, porém não trocam material genético. Nesses complexos de espécies, as diferenças geralmente não estão restritas à morfologia, podendo haver variações em aspectos biológicos e/ou moleculares. Estudar o comportamento e a morfologia dessas espécies é essencial para entender as relações entre os vetores e seus patógenos. Espécies crípticas de anofelinos têm características comportamentais importantes, por exemplo, na epidemiologia da malária.

As espécies mais importantes, por serem vetores e pragas, pertencem aos gêneros *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, *Psorophora*, *Mansonia*, *Haemagogus* e *Sabethes*. Além de transmitirem a malária, algumas espécies de *Anopheles* são vetores de filaríoses – *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori* – e de algumas arboviroses. Determinadas espécies de *Culex* transmitem a filária *Wuchereria bancrofti* e uma variedade de arboviroses. As espécies de *Aedes* são vetores importantes de febre amarela, de dengue, do vírus do Nilo Ocidental e de muitas outras arboviroses. Em certas áreas, são igualmente vetores das filárias *Wuchereria bancrofti* e *Brugia malayi*. As espécies de *Mansonia* transmitem algumas arboviroses, *Brugia malayi* e, às vezes, *Wuchereria bancrofti*.

Os mosquitos *Haemagogus* e *Sabethes* são vetores da febre amarela e de outras arboviroses nas Américas do Sul e Central. O gênero *Psorophora* são pragas das Américas do Sul e do Norte, cujos indivíduos, ao atacarem em alta densidade, têm picada muito incômoda, além de transmitirem alguns arbovírus. Muitas espécies de mosquitos, mesmo não sendo vetores de doenças, podem ser incômodas pela picada.

b) Características gerais

Como a maioria dos insetos, os culicídeos apresentam o corpo dividido em cabeça, tórax e abdome, sendo essa divisão observada tanto nas formas adultas quanto nas formas larvais. Nas pupas, porém, podemos definir outro tipo de divisão, que consiste em cefalotórax (cabeça fundida ao tórax) e abdome. O tamanho dos adultos está em torno de 0,5 cm, sendo os machos geralmente menores que as fêmeas. Os culicídeos são insetos holometabólicos, ou seja, têm metamorfose completa desde o ovo até a fase adulta alada, passando por quatro estádios de larva e uma fase de pupa livre.

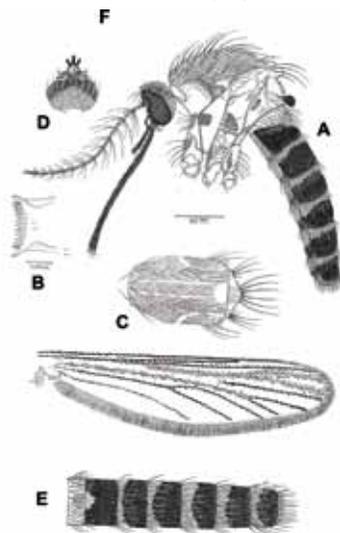


Figura 3. Aspecto da morfologia externa de um culicídeo adulto fêmea: A) cabeça, tórax e abdome, vista lateral; B) cibário; C) escudo e escutelo, vista dorsal; D) cabeça, vista dorsal; E) abdome, vista dorsal; F) asa, vista lateral.

Ilustração: Tereza Fernandes da Silva Nascimento, reproduzida de Consoli e Lourenço-de-Oliveira e Silva, 1987.

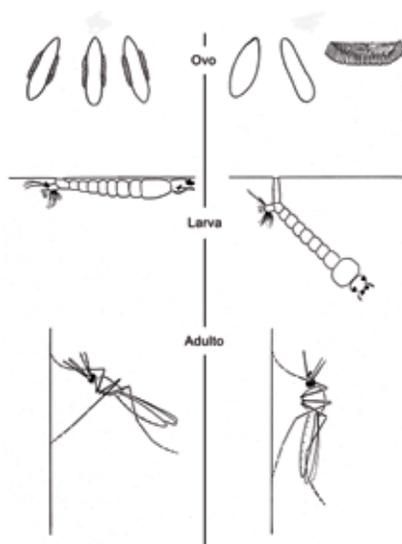


Figura 4. Ciclo biológico dos mosquitos.

Ilustração: Reproduzida de Forattini, 1973.

As fêmeas depositam seus ovos diretamente na água, nas bordas dos criadouros ou em substratos úmidos flutuando na água, em diferentes tipos de criadouros, dependendo da espécie. A escolha do local para a oviposição é responsável pela distribuição da espécie na natureza e nos diferentes tipos de locais de reprodução. Fatores físicos, biológicos e químicos influenciam a escolha dos criadouros. Dentre os fatores físicos, estão a luminosidade, o comprimento de onda da luz refletida no criadouro, a temperatura. Dentre os fatores biológicos, estão a presença ou ausência de vegetais e microrganismos. Já dentre os fatores químicos, estão a presença de subprodutos de vegetais e microrganismos, oxigênio dissolvido e a salinidade. As fases imaturas se desenvolvem no meio aquático. O aparelho reprodutor da fêmea é formado por um par de ovários situados na porção posterior do abdome, os quais estão repletos de ovariólos. Esses ovários se conectam, através de ovidutos laterais, a um oviduto principal, que desemboca na câmara genital ou vagina. As espermatecas, que variam de uma a três, são quitinizadas e se abrem na vagina. O aparelho genital feminino também pode apresentar uma glândula

acessória e uma bursa copulatória, ou vagina. O aparelho reprodutor do macho é composto por um par de testículos alongados, localizados dorsoventralmente na altura dos 5° e 6° segmentos abdominais. Cada testículo possui um vaso eferente, que desemboca em um ducto deferente, e duas vesículas seminais fundidas ao vaso deferente, podendo possuir ainda duas glândulas acessórias ladeando essas vesículas. A genitália masculina ou órgão copulador dos culicídeos sofre uma rotação de 180° no decorrer do primeiro dia ou mesmo nos dois primeiros dias de emergência do adulto, e as estruturas que eram ventrais passam a ser dorsais e vice-versa. Esse processo é chamado de inversão. O acasalamento só pode ser iniciado após a total rotação da genitália do macho. Curiosamente, os primeiros indivíduos a emergir das pupas em um criadouro são os machos. Isso dá a eles tempo para que sua genitália esteja apta a realizar o processo de cópula quando as fêmeas emergem.

Quanto ao acasalamento, os mosquitos podem ser divididos em dois grupos: espécies estenogâmicas e eurigâmicas. As espécies estenogâmicas se acasalam em pequenos espaços, durante o voo ou pousadas sobre uma superfície. As espécies eurigâmicas precisam formar enxames, os quais, por sua vez, são dependentes de maiores espaços e de condições físicas e biológicas especiais, como intensidade luminosa, presença de referenciais e correntes de ar. Existem espécies facultativas que, embora estenogâmicas, como *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, já foram encontradas participando de enxames na natureza. O acasalamento nos mosquitos geralmente ocorre antes do primeiro repasto sanguíneo da fêmea, mas também pode ocorrer depois. Após a cópula, os espermatozoides são armazenados na espermateca das fêmeas e vão gradativamente fecundando os ovos durante o processo de postura. Isso pode ocorrer várias vezes, com apenas uma cópula. Verificou-se, por exemplo, em *Aedes fluviatilis*, até quinze desovas fertilizadas por espermatozoides provenientes de uma única cópula. Entretanto, isso não significa que a fêmea só copule uma vez; ela pode mesmo ser inseminada por vários machos em um voo nupcial.

Tanto os machos quanto as fêmeas necessitam de uma fonte de alimentação rica em carboidratos, a qual, de maneira geral, provém de seivas de plantas,

frutos e flores. O acúmulo de glicogênio e triglicerídeos determina o potencial de atividade e longevidade desses insetos. Só as fêmeas são hematófagas, pois da alimentação sanguínea depende o desenvolvimento de seus ovos. No entanto, os mosquitos da tribo Toxorhynchytini constituem exceção a essa regra, uma vez que as fêmeas não são hematófagas. Da hematofagia decorre a importância médica e econômica dos culicídeos. Há necessidade de proteínas e de pelo menos dez aminoácidos, como arginina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina, histidina e metionina na dieta da fêmea para que ocorra uma produção normal de ovos.

Eurigâmicas: do grego

eurýs, eureía, eurý = largo + *gámos* = casamento

Estenogâmicas:, do grego

stenós = estreito + *gámos* = casamento

• **Subfamília Anophelinae**

Pertencem a essa subfamília os insetos transmissores da malária, conhecidos vulgarmente por fininho ou agulhinha.

a) Taxonomia

O gênero *Anopheles* compreende seis subgêneros: *Nyssorhynchus*, *Kerteszia*, *Stethomyia*, *Lophopodomomyia*, *Anopheles* e *Cellia*. O subgênero *Cellia* é de importância médica no Velho Mundo.

b) Características gerais

São mosquitos delgados, sem muitas cerdas, de coloração geral branca e preta. Os adultos são desprovidos de cobertura contínua escamosa nos

segmentos abdominais, sendo possível observar a existência de conjuntos localizados desses anexos. O escutelo apresenta a margem arredondada, exceto no gênero *Chagasia*. Os palpos femininos são de comprimento equivalente ao da probóscide, exceto no gênero *Bironella*. Os últimos segmentos palpais do macho são em forma de clave. Outra marca do dimorfismo sexual são as antenas com flagelos mais plumosos, nos machos, e o toro, ou 2º segmento antenal, maior do que o das fêmeas. A garra tarsal do tarso anterior é única e denteada. Os anofelíneos podem ser facilmente distinguidos dos demais culicídeos graças ao posicionamento do seu corpo em relação ao substrato. Ao pousarem, mantêm a probóscide e o corpo em linha reta, formando um ângulo reto ou quase reto com a superfície onde estão pousados. As larvas são desprovidas de sifão respiratório. Possuem cabeça mais longa do que larga, a cerda 1 do 1º ao 7º segmento abdominal é palmada. Por causa da ausência do sifão respiratório, as larvas de anofelíneos também podem ser facilmente reconhecidas entre os outros culicídeos, pois assumem postura horizontal em relação à superfície líquida do criadouro quando necessitam respirar. Na água, movimentam-se de forma brusca, flexionando o corpo muito rapidamente. As pupas possuem trompa ou tuba respiratória curta, de aspecto alargado, e com abertura em forma de fenda que percorre a trompa até a base. A cerda 9 do 3º ao 8º segmento abdominal apresenta frequentemente aspecto espiniforme. Os ovos são postos isoladamente e contam com flutuadores – expansões dispostas bilateralmente. Cada flutuador comporta uma série de compartimentos, chamados de gomos ou costeletas, contendo ar, e isso permite a flutuação dos ovos no meio líquido.

Os subgêneros *Stethomyia* e *Lophopodomyia* não possuem importância epidemiológica. Na região neotropical, os subgêneros que encerram espécies de interesse epidemiológico são *Anopheles*, *Kerteszia* e *Nyssorhynchus*.

c) Importância médica

A subfamília Anophelinae inclui os mosquitos vetores da malária. O subgênero *Nyssorhynchus* constitui o grupo de anofelíneos que encerra o maior

número de vetores, principais ou secundários, da malária humana. No Brasil, o principal vetor é o *Anopheles darlingi*. Outros importantes vetores em nosso país são *Anopheles albitarsis*, *Anopheles aquasalis* e, no subgênero *Kerteszia*, *Anopheles cruzii* e *Anopheles bellator*.

- Subfamília Culicinae

A subfamília Culicinae engloba vários vetores de doenças para o homem e animais, como dengue, febre amarela, arboviroses e filarioses. A subfamília Culicinae está subdividida em dez tribos; delas, as tribos *Aedini*, *Culicini*, *Mansoniini* e *Sabethini* são as de maior interesse médico.

Arbovírus: do inglês

arthropod borne vírus = vírus transmitido por artrópodes

A febre amarela é uma arbovirose, causada por um vírus da família Flaviviridae, com ciclos silvestre e urbano

A) Tribo Aedini

a) Taxonomia

A tribo Aedini está composta por doze gêneros; deles, três ocorrem no Brasil: *Aedes*, *Haemagogus* e *Psorophora*. As espécies de *Aedes* de importância médica encontram-se nos subgêneros *Stegomyia*, que inclui o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*, e no subgênero *Ochlerotatus*, que inclui o *Aedes scapularis* e o *Aedes taeniorhynchus*.

b) Características gerais

As espécies têm hábitos variáveis de hematofagia, mas geralmente são agressivas e picam durante o dia ou no crepúsculo vespertino. Os aedini depositam os ovos separadamente, em intervalos de um dia ou mais. A postura de ovos é feita, de preferência, na borda de uma coleção de água ou na superfície

da água, em águas limpas existentes em barris, potes de barro, vasos, cacos de garrafa, ou na borda de locais úmidos sujeitos à inundação. Os ovos resistem à dessecação por vários meses. Ao contato com a água, as larvas eclodem. Por essa característica, os aedini preferem criadouros transitórios, que se enchem com a água das chuvas, o que também determina o aumento da população desses mosquitos durante a época chuvosa. O ciclo de vida dura de 11 a 18 dias, em temperaturas de 26°C. Uma fêmea pode fazer doze ou mais repastos sanguíneos em um mês, fato que é de importância epidemiológica. À exceção do gênero *Haemagogus*, os aedini são mosquitos com escamas brancas e pretas no tórax e nas asas, e cuja morfologia é característica de cada espécie. Os *Haemagogus* são mosquitos com escamas coloridas e iridescentes.

c) Importância médica

Os aedini transmitem dengue, febre amarela, vírus Oropouche e Mayaro, encefalite Rocio e várias outras arboviroses e filarioses: *Aedes aegypti* é vetor da dengue e da febre amarela urbana; *Aedes albopictus* é vetor potencial de dengue; *Aedes scapularis* apresentou vários arbovírus isolados e foi incriminado como vetor do vírus da encefalite Rocio e como vetor potencial da filária *Wuchereria bancrofti*; *Aedes taeniorhynchus* foi encontrado infectado na natureza com vários arbovírus, e é considerado vetor potencial da filária *Dirofilaria immitis*.

As várias espécies do gênero *Psorophora* são mosquitos vorazes e que atacam em grande número, podendo se tornar pestes em si. *Psorophora ferox* foi encontrada naturalmente infectada com arbovírus causadores de encefalites e portando ovos da mosca *Dermatobia hominis*, causadora da miíase conhecida como berne.

Haemagogus janthinomys é vetor primário de febre amarela silvestre no Brasil; já *Haemagogus leucocelaenus* e *Haemagogus albomaculatus* têm sido incriminados como vetores secundários da febre amarela.

B) Tribo Culicini

a) Taxonomia

A tribo Culicini está composta de quatro gêneros, dos quais *Culex* e *Deinocerites* são encontrados no Brasil.

b) Características gerais

Os culicini são mosquitos que exercem a hematofagia à noite ou no crepúsculo vespertino. Gostam de picar aves e humanos. As coleções de água onde as fêmeas depositam os ovos variam de espécie para espécie. As fêmeas de culicini podem depositar seus ovos em coleções de água pura ou estagnada, no ambiente silvestre, semissilvestre ou nas imediações do domicílio humano. Os ovos são desprovidos de flutuadores e são postos aglutinados, na vertical, formando uma jangada. As larvas têm sifão respiratório e dispõem-se em ângulo perpendicular ou oblíquo à superfície da água. O ciclo de vida de ovo a adulto é de 10 a 11 dias. Quando em repouso, os espécimes adultos ficam com o corpo paralelo à superfície. Os culicini são mosquitos de aspecto cinza ou marrom e possuem escamas escuras nas asas.

c) Importância médica

Na tribo Culicini encontra-se o gênero *Culex*, de vetor da filariose bancroftiana e da malária aviária. A espécie *Culex quinquefasciatus* é o mosquito comum, espécie cosmopolita que ataca o homem à noite; *Culex quinquefasciatus* é transmissor da filária *Wuchereria bancrofti*, que causa elefantíase; *Culex quinquefasciatus*, *Culex nigripalpus*, *Culex coronator* e *Culex declarator* são espécies que já foram encontradas infectadas, na natureza, com arbovírus.

C) Tribo Mansoniini

a) Taxonomia

A tribo Mansoniini está composta de dois gêneros: *Mansonia* e *Coquillettidia*.

b) Características gerais

Os mansonini são mosquitos grandes e vorazes. Atacam em grande número, a qualquer hora do dia, podendo se constituir em pestes não só para o homem, mas também para os rebanhos. As fêmeas de mansonini depositam seus ovos juntos, em círculo, flutuantes ou submersos, perto de plantas flutuantes. As larvas e pupas desses mosquitos têm a característica especial de retirarem o oxigênio que respiram de sacos aeríferos de plantas flutuantes, não precisando ir até a superfície da água para respirar. As larvas se alimentam de matéria orgânica em suspensão. Os adultos são mosquitos grandes, com tórax de aspecto felpudo e escamas largas nas asas.

c) Importância médica

Na tribo Mansonini, o gênero *Mansonia* possui espécies importantes pela agressividade e ação espoliativa quando em grande número. Várias espécies de *Mansonia*, como *Mansonia humeralis*, *Mansonia indubitans* e *Mansonia amazonensis*, são espécies cuja agressividade e ação espoliativa as fazem ser consideradas pestes frequentemente associadas a lagos de hidrelétricas. *Mansonia titillans* foi encontrada naturalmente infectada com arbovírus causadores de encefalites e doenças febris, e portando ovos da mosca *Dermatobia hominis*, causadora da berne.

D) Tribo Sabethini

a) Taxonomia

A tribo Sabethini está composta por catorze gêneros, com cerca de 420 espécies. Nove gêneros estão na região neotropical – *Isostomyia*, *Johnbelkinia*, *Runchomyia*, *Shannoniana*, *Trichoprosopon*, *Sabethes*, *Limatus*, *Wyeomyia* e *Onirion* – com cerca de 225 espécies. Entretanto, por causa da dificuldade na identificação das espécies, acredita-se que o grupo deva ser maior.

b) Características gerais

Os mosquitos da tribo Sabethini são mosquitos silvestres que apresentam não só grande diversidade morfológica e biológica, mas também beleza incomum, graças às escamas coloridas, com reflexos metálicos, que lhes recobrem o corpo. A distribuição geográfica das espécies da tribo Sabethini se dá nas regiões Neotropical, Oriental e na Australásia. Apenas algumas espécies ocorrem na América do Norte. Os sabetíneos são mosquitos de hábito diurno, e suas formas imaturas se desenvolvem quase que exclusivamente em água acumulada em diferentes tipos de plantas fitotelmatas – bromélias, helicônias, buritis, bambus e aráceas, dentre outras –, mas também podem se desenvolver em certos recipientes naturais, como ocos de árvores e sementes, e em folhas caídas no chão.

Diversas espécies de sabetíneos apresentam comportamento diferenciado, nas diferentes fases de desenvolvimento, do comportamento das demais espécies de mosquitos. Os adultos, por exemplo, quando pousados, mantêm as pernas posteriores voltadas para cima, sobre o tórax. As fêmeas, principalmente aquelas de espécies dos gêneros *Sabethes* e *Wyeomyia*, antes de pousarem para realizar a hematofagia, aproximam-se e recuam, em vários círculos de voo em torno do hospedeiro. Esses mosquitos, portanto, são considerados mosquitos de índole tímida, em oposição ao comportamento agressivo de outras espécies de mosquitos. Em relação à postura dos ovos, também há, entre os sabetíneos, comportamentos peculiares, como a postura de ovos através de pequenos orifícios em bambus ou entre estreitas axilas de plantas, observada em algumas espécies de *Wyeomyia*. Um comportamento de oviposição muito especial e nunca observado em outros grupos é o descrito para *Trichoprosopon digitatum*: as fêmeas de *Trichoprosopon digitatum* permanecem pousadas sobre sua postura, protegendo-a, e ali continuam durante o desenvolvimento de seus ovos até a eclosão das larvas.

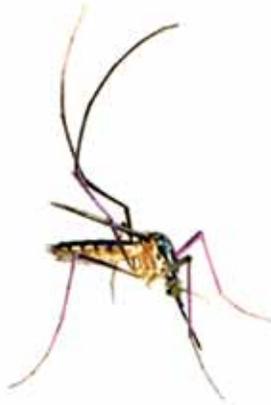


Figura 5. *Sabethes* sp.

Ilustração: Genilton Vieira (Laboratório de Produção e Tratamento de Imagem/IOC–Fiocruz).

As larvas de algumas espécies dos gêneros *Runchomyia* e *Wyeomyia*, que apresentam as maxilas do aparato bucal muito desenvolvidas, têm comportamento agressivo, predador e mesmo canibal, atacando formas imaturas de outras espécies, podendo ou não comê-las.

Para a cópula, os machos não fazem enxame, como a maioria dos mosquitos, pois são estenogâmicos. Os machos e as fêmeas possuem o corpo revestido por escamas de reflexos metálicos e aparentemente utilizam esses reflexos para a mútua atração. Já foram descritos elaborados comportamentos de corte, envolvendo a utilização de um substrato, durante a cópula de *Sabethes cyaneus* e *Sabethes chloropterus*. Os machos dessas duas espécies efetuam movimentos rítmicos com o corpo e, principalmente, com as pernas para atrair as fêmeas para o acasalamento.

c) Importância médica

Por se tratar de mosquitos silvestres, os sabetíneos estão constantemente em contato com diferentes tipos de animais que lhes servem de fonte de alimentação sanguínea, ambiente com grande diversidade de patógenos. Com exceção do gênero *Sabethes*, espécie vetora que participa do ciclo silvestre da febre

amarela, o papel dos sabetíneos na epidemiologia de ciclos silvestres de várias outras arbovirose e parasitoses não está esclarecido.

3.1.2 Família *Psychodidae*

Os psicodídeos são insetos cosmopolitas, ou seja, estão amplamente difundidos na superfície terrestre, vivendo preferencialmente em ambientes silvestres com muita umidade. Algumas espécies desenvolveram capacidade adaptativa para frequentar os ambientes próximos às habitações humanas. Alguns grupos vivem associados a ambientes modificados pela ação antrópica, como banheiros, bueiros, estações de tratamento de água e esgotos. Graças à sua abundância na natureza, suas formas imaturas desempenham um papel ecológico importante na decomposição de nutrientes. São holometábolos e as formas imaturas podem se desenvolver em meios aquáticos, semiaquáticos ou em habitats terrestres de muita umidade. Alguns psicodídeos criam-se com frequência em redes de encanamentos domiciliares. Algumas dessas espécies, como o *Telmatoscopus albipunctatus*, embora não hematófagas, já foram incriminadas como vetores mecânicos de patógenos humanos. As formas imaturas também podem ser importantes na sinalização da qualidade do ambiente e atuam como purificadores de sistemas de esgoto. Os adultos apresentam voo curto e geralmente saltitam na superfície de pouso; têm hábitos noturnos, mas em ambientes sombreados podem ser encontrados pousados nas horas claras do dia.

Algumas espécies de psicodídeos são consideradas como um dos mais primitivos grupos de dípteros. Registros fósseis indicam que são originários do Período Terciário (65 milhões de anos atrás) e há evidências fósseis de que possam ter existido desde o Jurássico, há 208 milhões de anos.



Figura 6. Aspecto geral da morfologia de um psicodídeo adulto.

Ilustração: Reproduzida de Forattini, 1973.

- **Subfamília Phlebotominae**

Os flebotomíneos tiveram sua origem possivelmente durante o período Cretáceo Inferior. No Brasil, de acordo com a região geográfica, são popularmente conhecidos como birigui, mosquito-palha, cangalhinha, anjinho, arrupiado e tatuquira.

a) Taxonomia

As subfamílias Sycoracinae e Phlebotominae são aquelas que apresentam interesse médico, por serem hematófagas. Apenas a subfamília Phlebotominae tem espécies vetores de doenças, como leishmanioses, bartonelose e várias arboviroses.

Em todo o mundo, são conhecidas mais de oitocentas espécies de flebotomíneos, sendo 65% delas da região neotropical. No Brasil, há mais de 250 espécies descritas, as quais representam 31% do total mundial e 48% das que ocorrem na região neotropical. Da subfamília *Phlebotominae*, existem três gêneros no Novo Mundo: *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*. No Velho Mundo, são igualmente três os gêneros existentes: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*.

b) Interesse médico

Os flebotomíneos participam da transmissão de doenças ao homem, cujos agentes etiológicos podem ser bactérias, arbovírus e protozoários, destacando-se, entre os últimos, as leishmânias. Algumas espécies são dotadas de notável grau de antropofilia, o que lhes confere importante papel na veiculação de patógenos humanos. Espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são incriminadas como vetores de leishmanioses. A hematofagia em flebotomíneos está restrita às fêmeas.

c) Características gerais

Os adultos apresentam tegumento cuticular de fina espessura, o que os torna sensíveis às flutuações de temperatura e umidade. Em geral, apresentam atividade noturna, que se inicia no crepúsculo vespertino e pode alcançar o crepúsculo matutino. Os flebotomíneos são de porte pequeno, têm em torno de 4 mm, e possuem corpo piloso, de tonalidade variando do amarelo-palha ao castanho e asas de formato lanceolado, alongadas e hialinas, densamente revestidas de cerdas que, na maioria das vezes, permanecem eretas, dando ao inseto um aspecto bem característico (fig. 7). São dióicos, de fecundação interna e holometabólica.



Figura 7. Adulto fêmea de flebotomíneo ingurgitado.

Foto: Elizabeth Rangel (Laboratório de Transmissores de Leishmaniose/IOC–Fiocruz).

Os ovos têm forma elipsoide ou ovoide. Logo após a postura, apresentam-se esbranquiçados ou amarelados, mas, em algumas horas, tornam-se castanho escuro. Cada fêmea coloca em média quarenta ovos. A postura é feita isoladamente ou em pequenos grupos. Os ovos aderem-se ao substrato por meio de uma substância viscosa, rica em ácidos graxos, produzida pelas glândulas acessórias. Essa substância recobre os ovos e é responsável pela impermeabilização à água, podendo atuar ainda como feromônio de oviposição, atraindo e estimulando a oviposição. A postura ocorre cerca de 5 dias após o repasto sanguíneo, e a eclosão dos ovos se dá em 5 a 7 dias. Tanto as fêmeas capturadas na natureza quanto as criadas no laboratório morrem durante ou logo após a postura. As fêmeas têm concordância gonotrófica, isso é, ovipõem a cada repasto sanguíneo.

As larvas são terrestres e criam-se embaixo das camadas foliculares que revestem o solo, em ocos de árvores, frestas de rochas, tocas de animais silvestres ou nos espaços entre as raízes tubulares, em condições de alta umidade e abundante matéria orgânica. São esbranquiçadas, de aspecto vermiforme e cobertas de cerdas. A peça bucal da larva é do tipo mastigador, e elas se alimentam de matéria orgânica em decomposição.

Na face ventral do 1° ao 7° segmento abdominal, observam-se falsas patas. Os dois últimos segmentos abdominais mostram morfologia modificada para se adaptar à função locomotora. Neles, estão implantadas as cerdas caudais, responsáveis pela fixação da larva por ocasião da muda.

As larvas passam por quatro estádios, que duram ao todo em torno de 20 dias, antes de se tornarem pupas. As pupas são esbranquiçadas e/ou amareladas, e sua cor vai escurecendo à medida que se aproxima a emergência do adulto. O processo de pupa até a emergência do adulto leva em torno de 10 dias (fig. 8). As pupas possuem comportamento característico: enrugam a última exúvia larval e prendem-se ao substrato – elas não se locomovem, executam apenas movimentos de flexão e extensão – e não se alimentam. Sua respiração é aérea e é feita por um sistema de traqueias que se abrem

em espiráculos dispostos simetricamente, aos pares, nas faces laterais do cefalotórax e no 8º segmento abdominal da pupa.

Considerando-se o comportamento tanto dos adultos quanto das formas imaturas, os flebotomos são denominados criptozoários. Os criptozoários são animais que vivem grande parte da vida escondidos em abrigos úmidos, com pouca ou nenhuma luminosidade e movimentação de ar, abandonando-os somente quando ocorre mudança das condições ambientais ou para se alimentarem. Sua atividade está muito correlacionada às mudanças na intensidade da luz. Portanto, é esperado que seu comportamento seja diretamente afetado por variações ocorridas nas diferentes fases lunares, quando as noites podem ter maior ou menor luminosidade. As fêmeas têm antropofilia mais intensa durante a lua cheia, quando as noites são mais claras.

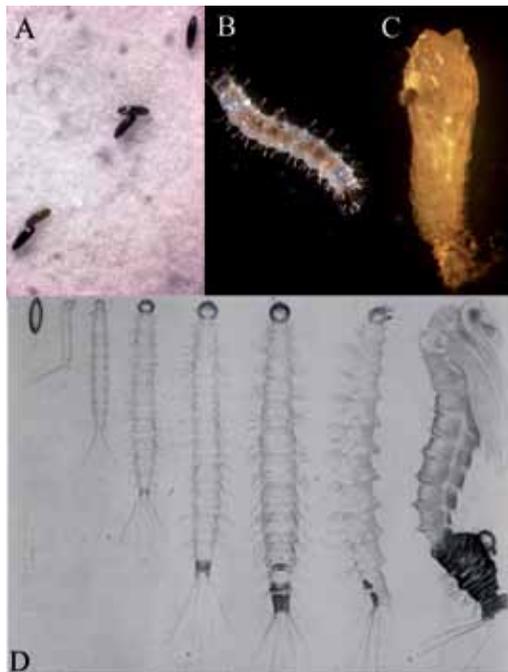


Figura 8. Ciclo evolutivo de flebotomíneo:
A) Ovo; B) Larva; C) Pupa; D) Diferentes fases do ciclo.

Fotos: Reproduzidas de Pessoa e Martins, 1982.

Os flebotomíneos de ambos os sexos alimentam-se de néctar, seiva de plantas, frutas maduras e de uma substância rica em carboidratos e aminoácidos excretada por insetos afídeos e coccídeos. Só as fêmeas são hematófagas. A probóscide das fêmeas é adaptada para punção e sucção, e apresenta uma extremidade serrilhada. Como nos mosquitos, o sangue rico em proteínas propicia a maturação dos ovos. Parece existir uma atividade antibacteriana e anti-fúngica no papo das fêmeas. Esse aspecto da fisiologia das fêmeas permite a transformação, diferenciação e multiplicação da leishmânia dentro do aparelho digestivo, favorecendo o estabelecimento da infecção e uma maior capacidade de transmissão dos parasitos para o hospedeiro vertebrado, uma vez que as leishmânias não crescem na presença de fungos e bactérias.

O abdome consta de dez segmentos, sendo os três últimos modificados para conformar a genitália. No macho, a genitália compõe-se de três pares de apêndices. A fêmea apresenta os três últimos segmentos abdominais arredondados, encaixados uns nos outros quando em repouso, o que torna a extremidade do seu corpo arredondada. A abertura anal encontra-se no 10° segmento abdominal, e a ela se ligam apêndices largos e arredondados, chamados cercas. Internamente, nessa região, encontra-se um par de espermatecas, de importância taxonômica.

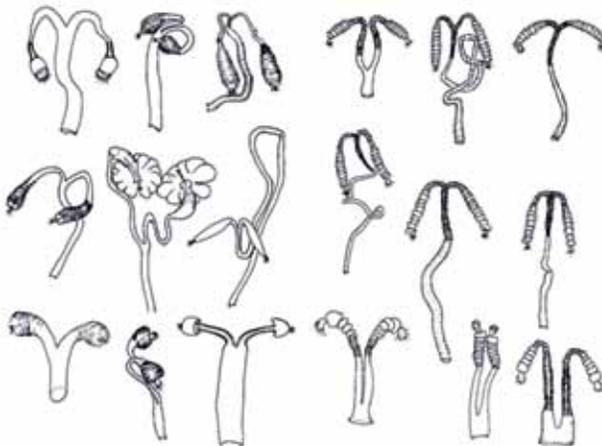


Figura 9. Tipos de espermateca de fêmeas de flebotomíneo.

Ilustração: Reproduzida de Galati, 2003.

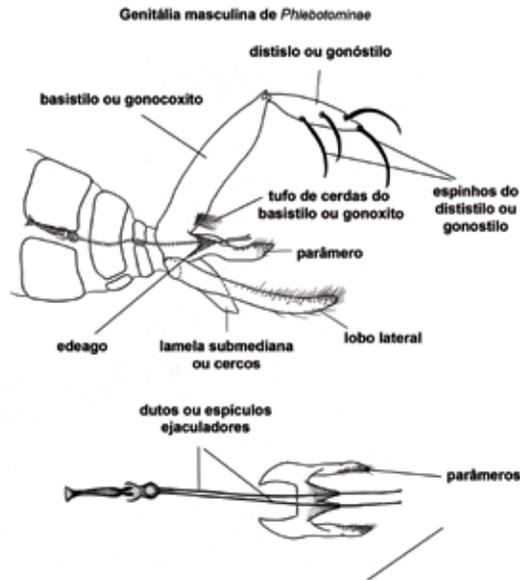


Figura 10. Genitália de macho de flebotomíneo.

Ilustração: Reproduzida de Forattini, 1973.

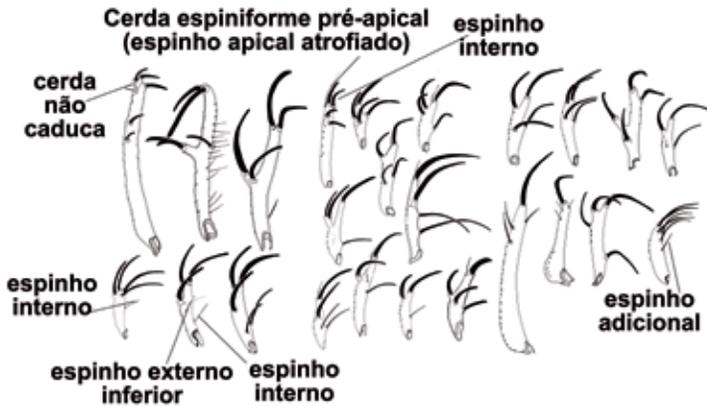


Figura 11. Variações específicas da genitália masculina dos flebotomíneos.

Ilustração: Reproduzida de Galati, 2003.

No órgão genital masculino, os canais deferentes vindos dos testículos terminam na bomba genital, onde está localizado o edeago. A genitália masculina tem valor taxonômico, pois nela existem espinhos e cerdas – que variam em número, tamanho e forma, de espécie para espécie – cuja função é a de apreensão da fêmea no momento da cópula.

3.1.3 Família Simuliidae

Os insetos do gênero *Simulium* são conhecidos popularmente como borrachudos ou piuns. Os simuliídeos são insetos holometábolos, de tamanho relativamente pequeno, de cor geralmente escura ou em tons castanhos.

a) Taxonomia

As espécies de interesse médico encontram-se no gênero *Simulium*.

b) Interesse médico

A importância médica dos simuliídeos deve-se ao fato de as espécies do gênero *Simulium*, como *Simulium guianenses*, *Simulium oyapockense* e *Simulium roraimense*, serem vetores da filária *Onchocerca volvulus*, que causa a oncocercose. No homem, as microfilárias permanecem na derme ou migram para tecidos conjuntivos – olhos, rins –, formando aglomerados de adultos. Na pele, ocorrem nódulos de oncocerca, despigmentação e perda da elasticidade. As microfilárias podem causar alterações oculares decorrentes de reações inflamatórias, envolvendo microfilárias mortas, no globo ocular, ocasionando cegueira.

Os borrachudos também representam um grave problema com sua picada. As picadas causam intenso prurido e edema, que duram, em geral, vários dias, podendo acarretar infecções secundárias. O quadro é mais sério em pessoas sensíveis, nas quais aparece eritema, febres, linfangite e complicações alérgicas.

c) Características gerais

As fêmeas e machos adultos podem viver de 3 a 4 semanas na natureza. As fêmeas depositam seus ovos sobre pedras, galhos e folhas ou em substratos encontrados em cachoeiras, rios ou córregos. Cada fêmea coloca em média, por postura, duzentos a trezentos ovos, que amadurecem em 5 a 6 dias, dependendo da temperatura da água e da espécie. Após esse período, as larvas eclodem e se fixam. As larvas se locomovem, aderidas aos substratos, por meio de uma teia produzida por substância salivar. A fase larval dura aproximadamente 15 dias, depois dos quais a larva se torna pupa, em um casulo. Os sítios de desenvolvimento ovo-larva-pupa-adulto são cachoeiras, rios ou córregos, com correnteza e águas cristalinas. Após 4 dias, o casulo se rompe e o adulto, dentro de uma bolha de ar, atinge a superfície da água.

Os adultos podem viver na natureza por mais ou menos 3 a 4 semanas. O raio de voo dos adultos é de aproximadamente 40 km de distância a partir do curso d'água. Os adultos usam como suporte de descanso árvores e plantas herbáceas. Apenas as fêmeas adultas são hematófagas. Os adultos machos alimentam-se de sucos vegetais. As fêmeas alimentam-se do sangue de mamíferos e aves; algumas espécies preferem o homem. O ato da picada é rápido e silencioso, e dura de 3 a 8 minutos. Por causa das propriedades anestésicas da saliva, no momento em que ocorrem, as picadas são indolores. A atividade de alimentação das fêmeas se realiza principalmente nos períodos da manhã e da tarde. O sangue ingerido é utilizado para o desenvolvimento dos ovos no interior das fêmeas. O desenvolvimento dos ovos varia conforme a temperatura ambiente.



Figura 12. Desenho de um simuliídeo.

Ilustração: Reproduzida de Hatlen, 2006.

3.1.4 Família *Ceratopogonidae*

O maruim ou mosquito-pólvora é um inseto díptero membro da família *Ceratopogonidae*.

a) Taxonomia

O gênero *Culicoides* engloba as espécies de interesse médico.

b) Interesse médico

O maruim é o responsável pela transmissão do vírus *Oropouche*, uma virose que provoca dores no corpo, febre e fotofobia. Insetos dessa família são também responsáveis pela virose da língua azul (*Bluetongue disease*) de ovinos e bovinos.

c) Características gerais

Os maruins são insetos de pequenas dimensões. Suas larvas vivem na água doce ou salgada, conforme a espécie. É hematófago e antropofílico, e penetra pelo meio dos cabelos e por dentro das roupas, causando urticária com suas doloridas picadas. O mosquito-pólvora é encontrado no interior de matas úmidas e brejos. É de pequeno tamanho, 1 a 2 mm, e de cor preta. Tem picada puntiforme que arde como um grão de pólvora. As espécies do litoral são conhecidas por maruim ou mosquitinho-do-mangue. Pode ser encontrado desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina. No Brasil, encontra-se comumente o *Culicoides paraensis*. O maruim se reproduz em lugares alagados, como banhados, nos quais exista matéria orgânica em decomposição.

3.1.5 Infraordem *Muscomorpha* (*Cyclorrhapha*)

Diversas espécies de moscas da infraordem *Muscomorpha* são vetores de doenças humanas e pragas de plantas cultivadas. As espécies da família *Tephritidae* atacam frutos, as moscas da família *Agromyzidae* são minado-

ras de folhas, as Pantophthalmidae cavam galerias em troncos ou galhos e as Cecidomyiidae são galhícolas. Contudo, muitas espécies são benéficas, pois atuam ou como agente polinizador, algumas com comportamento muito especializado, ou como predadoras ou parasitoides de outros insetos que são praga de lavouras.

a) Taxonomia

As famílias de dípteros de interesse médico e forense no Brasil são da subordem Brachycera, infraordem Stratiomyomorpha, família Stratiomyidae; na infraordem Muscomorpha, a série Aschiza, família Phoridae e Syrphidae; na série Schizophora, os Caliptrados das famílias Sepsidae, Sphaeroceridae, Piophilidae, Drosophilidae e Otitidae, e os Caliptrados das famílias Calliphoridae, Fanniidae, Muscidae e Sarcophagidae. De menor importância, estão as espécies das famílias Micropezidae, Richardiidae, Ropalomeridae, Lauxanidae, Tephritidae, Tipulidae, Tabanidae, Anthomyidae e Dolichopodidae. Para a identificação dos adultos e larvas de famílias de dípteros muscoides, sugerem-se as chaves propostas por McAlpine et al. (1981).

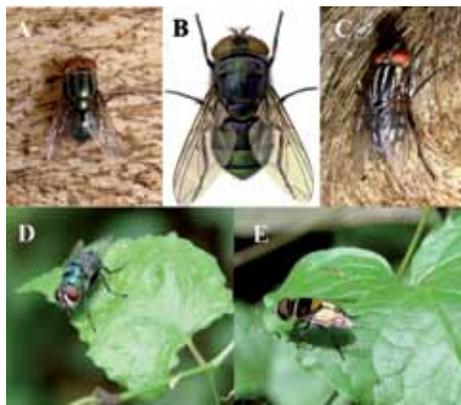


Figura 13. Diferentes espécies de dípteros: A) *Cochliomyia macellaria*; B) *Chrysomya megacephala*; C) *Peckia chrysostoma*; D) *Chrysomya albiceps*; E) *Eristalis tenax*.

Fotos: Margareth Queiroz (Laboratório de Transmissores de Leishmaniose, Setor de Dípteros de Importância Forense/IOC–Fiocruz) e Elliot Queiroz.

b) Interesse médico

Além das espécies sugadoras, moscas saprófagas e coprófagas são responsáveis por transportar mecanicamente diversos agentes etiológicos de doenças, tais como bactérias, vírus, fungos, cistos e oocistos de protozoários, larvas e ovos de helmintos, entre outros, pois muitos desses insetos frequentam residências, hospitais, aterros sanitários, bem como locais de alimentação coletiva, o que facilita a transmissão de doenças provocadas por esses agentes.

As larvas de várias espécies de Muscomorpha, principalmente da família Calliphoridae, merecem especial destaque em saúde pública, por produzirem miíases primárias, que são afecções causadas por larvas de moscas no homem, animais domésticos e silvestres. Essas larvas são parasitos obrigatórios de vertebrados. As miíases causadas por *Cochliomyia hominivorax* são as mais prevalentes nas regiões quentes e úmidas dos países tropicais e subtropicais. A enfermidade ocorre com mais frequência em indivíduos que moram em áreas de periferias e zonas rurais. Em geral, a miíase atinge áreas descobertas com lesões no corpo, pois a oviposição da mosca é mais fácil nesses locais. Nesse caso, as miíases são de tipo tecidual e podem invadir cavidades, vulgarmente chamadas bicheiras, a infestação é promovida por larvas biontófagas, que parasitam tecidos sadios. Indivíduos que vivem em locais com condições precárias de higiene são os mais afetados pela doença.



Figura 14. Miíase primária por *Cochliomyia hominivorax*.

Foto: Margareth Queiroz (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense/IOC–Fiocruz).

As miíases furunculoides, conhecidas por berne, são promovidas também por larvas biontófagas que parasitam tecidos sadios, e são causadas pela mosca da espécie *Dermatobia hominis*. Outro tipo de miíase, a miíase secundária é causado pela invasão dos tecidos por larvas necrobiontófagas, ou seja, aquelas que têm afinidade por tecidos necrosados. Os gêneros de moscas mais frequentes para esse tipo de miíase são *Sarcophaga* e *Fannia* e a espécie *Cochliomyia macellaria*. Nas Oestridae, as larvas são endoparasitas de mamíferos bovinos, equinos, ovinos, caprinos, roedores e marsupiais, dentre outros, e acidentalmente do homem. Esses insetos podem ser utilizados na entomologia forense.

3.2 Ordem Hemiptera

A ordem Hemiptera tem mais de 80 mil espécies e nela se incluem os percevejos e as cigarras. Os hemípteros são divididos, quanto aos hábitos, em fitófagos, predadores e hematófagos. Os fitófagos se alimentam da seiva de plantas e apresentam significativa importância para o setor agrícola. Os predadores se alimentam da hemolinfa de outros insetos, sendo importantes no controle de insetos que são pragas agrícolas. Os hematófagos se alimentam do sangue de vertebrados humanos e de outros animais e possuem interesse médico como vetores de patógenos.

3.2.1 Família Reduviidae

a) Taxonomia

Dentre as famílias que compõe a ordem, destaca-se a Reduviidae, constituída de aproximadamente 22 subfamílias, das quais apenas a subfamília Triatominae é hematófaga.

A subfamília Triatominae, formada por percevejos, é constituída de 15 gêneros, classificados em cinco tribos e 140 espécies. A maioria delas ocorre nos países do continente americano. Ao todo, 40 espécies são da América do Norte, 28 das quais encontradas exclusivamente no México. No Brasil,

ocorrem 58 espécies, dentre elas grande parte no ambiente silvestre, sem importância epidemiológica relevante.



Figura 15. Diferentes espécies de hemípteros: A) Hemíptero fitófago subfamília Metacanthinae; B) Hemíptero predador da subfamília Reduviinae; C) Hemíptero hematófago da subfamília Triatominae.

Fotos: Catarina Lopes de Macedo (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense/IOC–Fiocruz).

Os três principais gêneros de triatomíneos envolvidos na transmissão da doença de Chagas são *Rhodnius*, *Panstrongylus* e *Triatoma*. Esses gêneros se diferenciam facilmente pela largura da cabeça e pela posição do tubérculo antenífero em relação à distância antecular – aquele que vai da margem anterior do olho ao ápice do clipeo. O gênero *Rhodnius* apresenta a cabeça alongada e cilíndrica, com os tubérculos anteníferos inseridos próximo à extremidade anterior da cabeça. O gênero *Triatoma* tem cabeça de tamanho intermediário, com tubérculos anteníferos inseridos na metade da região antecular. O gênero *Panstrongylus* apresenta cabeça globosa, com os tubérculos anteníferos inseridos junto da margem anterior dos olhos compostos.

As principais espécies de interesse médico no Brasil são *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida* e o *Triatoma pseudomaculata*.



Figura 16. Os três principais gêneros envolvidos na transmissão da doença de Chagas: A) *Rhodnius*; B) *Panstrongylus*; C) *Triatoma*.

Fotos: Catarina Lopes de Macedo (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense/IOC–Fiocruz).

b) Interesse médico

Os triatomíneos hematófagos são conhecidos por diversos nomes nas diferentes regiões onde se relata a sua ocorrência; quase sempre, o significado desses nomes está relacionado com a cultura regional e com as adaptações do inseto ao ambiente domiciliar. No Brasil, é conhecido pelos seguintes nomes: barbeiro, chupão, chupança, fincão, bicudo, percevejão, bicho-de-parede, bicho-de-parede preto, chupa-pinto, percevejo-do-sertão, percevejo-francês, percevejo-gaudério, percevejo-grande, procotó, prorocotó, baratão, bruxa, piolho-de-piaçava, quiche do sertão, rondão, vuvun, cascudo.

Atualmente, técnicas bioquímicas, moleculares e citogenéticas, além da morfologia clássica, têm sido utilizadas para a identificação de muitas espécies de hemípteros.

○ *Triatoma infestans*, um hemíptero vetor da doença de Chagas, já foi o principal vetor do parasito *Trypanosoma cruzi* no Brasil. Desde 2006, no entanto, o Brasil recebeu o certificado emitido pela Organização Pan-Americana da Saúde (Opas) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) – de erradicação da transmissão vetorial da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*. Essa certificação foi fruto da intensificação das ações de controle impetradas pelo Ministério da Saúde, em articulação com as três esferas de governo – federal, estadual, municipal que conformam o Sistema Único de Saúde (SUS).

c) Características gerais

○ desenvolvimento dos triatomíneos é do tipo hemimetabólico. As formas jovens são muito parecidas com as formas adultas; entretanto, apenas os adultos possuem asas, podendo, portanto, voar. ○ ciclo de vida compreende uma fase de ovo, cinco estádios de ninfa e a fase adulta. Para que ocorra a muda de um estágio ninfal para o outro, inclusive do último estágio ninfal para a fase adulta, é necessário que os triatomíneos realizem repasto sanguíneo.

○ tempo de desenvolvimento desde a fase de ovo até a fase adulta varia em cada espécie, podendo oscilar de 6 meses a 2 anos. Logo após a muda, as ninfas e as formas adultas são rosadas; vão escurecendo posteriormente, com o endurecimento progressivo da cutícula. ○ tempo médio de vida de um triatomíneo é de 1 a 2 anos.

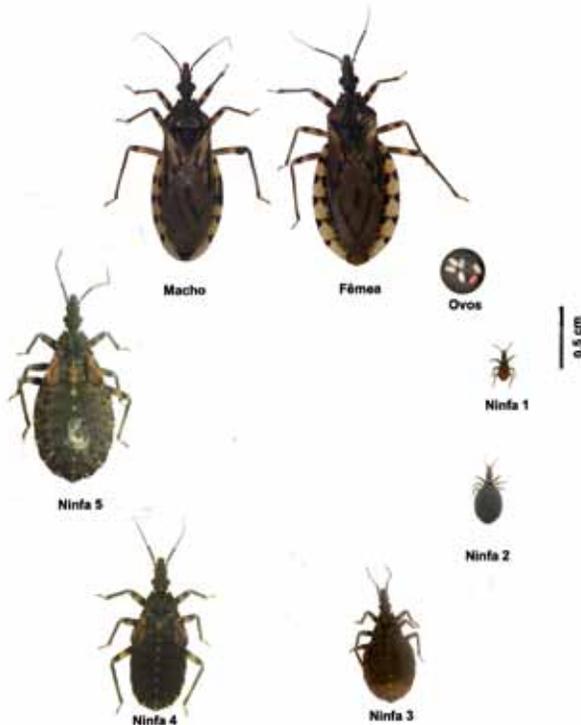


Figura 17. Ciclo de vida de um hemíptero.

Fotos: Catarina Lopes de Macedo (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense/IOC–Fiocruz).

No ambiente silvestre, os barbeiros vivem em diversos abrigos – rochas, palmeiras, tocas e ninhos – e se alimentam de mamíferos, aves e répteis. Entretanto, com as crescentes alterações no ambiente natural, esses insetos passaram a se instalar em construções que servem de moradia para humanos, bem como em anexos utilizados para abrigar os animais domésticos. Dessa forma, a infestação das habitações pelo inseto não está restrita somente às construções do tipo pau-a-pique, onde se escondem em frestas e rachaduras, mas também ocorre em casas de alvenaria, onde encontram abrigo atrás de móveis e de quadros nas paredes e embaixo de colchões.



Figura 18. A) *Triatoma wygodzinskyi*, espécie de triatomíneo que habita o ambiente silvestre e tem como abrigo as frestas de rochas; B) Coleta de ovos de triatomíneos embaixo de um colchão.

Fotos: Catarina Lopes de Macedo (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense/IOC–Fiocruz).

A capacidade vetorial dos triatomíneos é determinada pelo grau de associação do inseto com o homem e seu domicílio e pelo tempo entre o repasto sanguíneo e a defecação. Ninfas e adultos se alimentam de sangue e são capazes de se infectar e transmitir o parasito *Trypanosoma cruzi*, que é depositado junto com as fezes do barbeiro e entra no organismo do hospedeiro pela solução de continuidade dada pela picada quando o hospedeiro se coça.

Ninfas em qualquer fase e os adultos machos e fêmeas dos barbeiros se alimentam de sangue.

Algumas espécies depositam seus ovos soltos nos ecótopos que habitam; outras, entretanto, colocam seus ovos agrupados e aderidos aos seus hospedeiros ou ao substrato dos ecótopos onde habitam.

3.2.2 Família Cimicidae

Os cimicídeos são os percevejos-de-cama.

a) Taxonomia

A espécie antropofílica mais comum é o *Cimex lectularius*, encontrado em climas temperados; *Cimex hemipterus* é encontrado em regiões tropicais, infestando aves e morcegos; *Leptocimex boueti*, encontrado nos trópicos da África ocidental e da América do Sul, infesta morcegos e seres humanos. Existem, ainda, outras espécies de percevejos que preferem o sangue de outros animais, como pássaros ou morcegos.

b) Interesse médico

Cimex lectularius leva cerca de cinco minutos para ingurgitar-se. O hospedeiro geralmente não acorda enquanto está sendo picado, pois a saliva do percevejo contém anestésicos, além de anticoagulantes. Sua picada pode causar reações alérgicas; até o momento, porém, não há descrição de doenças transmitidas ao homem pelos percevejos. Uma característica compartilhada com a picada das pulgas é a tendência dos percevejos de exibirem um padrão de picadas sequenciais, em que as picadas são enfileiradas. Isso pode ser causado pela perturbação do percevejo durante o repasto, que se reposiciona antes de recomeçar a alimentação. Alternativamente, a explicação pode ser a de que o percevejo estaria procurando repetidamente uma veia.

As respostas individuais do hospedeiro variam de acordo com o tipo da pele, o ambiente e a espécie de percevejo. Em raros casos, as reações alérgicas às picadas podem se tornar sérias, surgindo infecções bacterianas secundárias.

Indivíduos infestados podem apresentar ansiedade, *stress* e insônia. A infestação de uma casa por percevejos pode ser adquirida durante uma viagem, quando eles podem se esconder nas bagagens. Móveis usados, ou a contiguidade com casas ou apartamentos infestados, também podem ser outro modo de infestação.

Percevejos adultos conseguem viver até um ano sem repasto sanguíneo. Os percevejos são pequenos e ágeis. Muitas vezes, apenas o uso de inseticidas não consegue eliminá-los. Deve se usar, para isso, uma combinação de tratamentos, que inclui lavagem dos tecidos atingidos em temperaturas acima de 49°C, aspiração de todos os carpetes, móveis estofados e rachaduras na madeira, eliminação do mofo e aspersão de inseticidas em pó, que costumam conter vidro moído ou pó de sílica e agem como abrasivos e dessecantes, entre outros.

c) Características gerais

Os percevejos são hemimetábolos, rápidos, ágeis, têm cor vermelho-alaranjada e são ápteros. Os adultos, que podem viver até quatro anos, têm aproximadamente 0,60 cm de comprimento, ou seja, são do tamanho de uma semente de maçã, e, como são achatados dorsoventralmente, podem se esconder em pequenas frestas. Camas e sofás são os locais preferidos por esses pequenos insetos, que podem ser encontrados ainda em poltronas, cadeiras estofadas, cabeceiras e estrados de cama, cortinas, tapeçarias, fendas e buracos nas paredes, molduras, armários, bolsas, roupa, gavetas, livros velhos, papéis e pilhas de roupa. Nesses locais, os percevejos se escondem e depositam até cinco ovos por dia.

As ninfas de percevejo são menores e translúcidas. Os percevejos-de-cama preferem exercer a hematofagia à noite, quando o seu hospedeiro está dormindo, mas também podem exercê-la a qualquer hora do dia se lhes for oferecida oportunidade. Os percevejos procuram por repasto sanguíneo a cada 5-10 dias aproximadamente.

As fêmeas são inseminadas através da perfuração da cavidade abdominal pelo aparato genital do macho, em um processo chamado inseminação traumática. As fêmeas põem, em média, 500 ovos durante suas vidas. As ninfas eclodem em uma a duas semanas, e passam por cinco estágios até se tornarem adultas, o que dura geralmente cinco semanas, à temperatura de 25°C.



Figura 19. Cimex lectularius, o percevejo-de-cama.

Foto: Reproduzida de Cuerden, 2007.

3.3 Ordem Anoplura

A ordem Anoplura agrupa insetos vulgarmente conhecidos como piolhos e chatos. Existem aproximadamente 15 famílias de Anoplura. Entretanto, apenas duas apresentam interesse médico: Pediculidae e Phtiridae.

3.3.1 Família Pediculidae

Nessa família se encontram os piolhos.

a) Taxonomia

Pediculus é o único gênero da família Pediculidae. Dentro deste gênero, apenas duas espécies são encontradas no homem: *Pediculus capitis*, parasito

cujo habitat são os cabelos da cabeça, e *Pediculus humanus*, o piolho-do-corpo ou muquirana. Os ovos são ovoides e apresentam opérculo na sua extremidade mais larga. *Pediculus humanus*, que tem comprimento maior, coloca seus ovos nas fibras das vestes, sendo também um vetor natural de moléstias como o tifo, febre recorrente e febre das trincheiras.

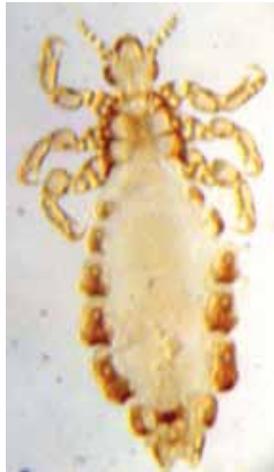


Figura 20. *Pediculus capitis*, o piolho-da-cabeça.

Foto: Luzia Caputo (Laboratório de Patologia, setor de Histotecnologia/IOC–Fiocruz.

3.3.2 Família Phtiridae

Nessa família encontram-se os chatos.

a) Taxonomia

A família *Phtiridae* tem um único gênero, *Phtirus*, o qual, por sua vez, tem duas espécies: *Phtirus pubis* ou chato, que parasita os pelos púbicos humanos; e *Phtirus gorillae*, um ectoparasita de gorilas. *Phtirus pubis* não possui divisão clara entre os tagmas, tendo a cabeça e o tórax fusionados.



Figura 21. *Phtirus pubis*, o chato, parasito dos pelos púbicos humanos.

Ilustração: Reproduzida de Rey, 2008.

b) Interesse médico

Muitas espécies de piolhos podem ser, além de ectoparasitas, pestes para os animais e vetores de doenças como o tifo, a febre recorrente e a febre das trincheiras. O tifo é causado pela bactéria *Rickettsia prowazekii*. A doença se estabelece quando as fezes do parasito entram em contato com feridas na pele do hospedeiro, permitindo que a bactéria entre na corrente sanguínea. Os principais sintomas são dores de cabeça, dores nas articulações, febre alta com delírios e erupção cutânea.

A febre recorrente é causada por espiroquetas do gênero *Borrelia*, e pode se apresentar de duas maneiras: forma epidêmica, causada exclusivamente por *Borrelia recurrentis* e transmitida de homem para homem pelo piolho *Pediculus humanus*; uma forma endêmica, causada por outras espécies de *Borrelia* e transmitida por carrapatos. A febre recorrente caracteriza-se por períodos de febre, intercalados por outros não febris, com os períodos febris terminando em crise.

A febre das trincheiras é uma doença infecciosa aguda causada por uma bactéria da família Rickettsiaceae, que também é transmitida pelo *Pediculus humanus*. O quadro clínico caracteriza-se por febre, cefaleia, mal-estar, dor e fraqueza nas pernas. Essa doença teve grande incidência no período das duas guerras mundiais, por causa das precárias condições de higiene nas regiões de combate, ou seja, nas trincheiras, surgindo daí o nome da doença.

c) Características gerais

Os piolhos apresentam uma morfologia altamente adaptada ao hábito ectoparasitário, tendo corpo achatado dorsoventralmente, ausência de asas, redução dos órgãos visuais e estruturas modificadas para se manterem presos ao corpo dos hospedeiros. Somente o abdome possui segmentação distinta. Os olhos são reduzidos a apenas um omatídeo ou estão ausentes, não apresentando ocelos. As peças bucais são do tipo picador-sugador, sendo constituídas por probós-cide curta (haustelo) com pequenos dentículos internos, eversíveis, e estrutura picadora, formada por três estiletos, que se acomodam em um saco trófico. Os ovos, conhecidos como lêndeas, são ovais e operculados e sempre aderidos ao hospedeiro. Após a eclosão, a ninfa passa por três mudas, formando o adulto.

Os piolhos mastigadores da ordem Mallophaga se alimentam de detritos de pele, penas e pelos de aves e mamíferos; os piolhos sugadores de sangue da ordem Anoplura são parasitos exclusivamente de mamíferos, inclusive do homem. Os insetos de ambas as ordens são hemimetabólicos e passam todo o seu ciclo vital sobre os seus hospedeiros. A relação parasito–hospedeiro tende a ser específica, e tem sido demonstrada estreita relação fisiológica entre os componentes do sangue de determinados hospedeiros e seus parasitos anopluros. Como os piolhos passam todo o ciclo sobre seus hospedeiros, sua reprodução também ocorre sobre o hospedeiro. De modo geral, as populações apresentam maior número de fêmeas do que de machos. Em algumas espécies, os machos são bastante raros.

3.4 Ordem Siphonaptera

Siphonaptera: do grego

siphon = tubo ou tubulação + *aptera* = sem asas

Os sifonápteros são insetos ectoparasitas, conhecidos como pulgas. As famílias Pulicidae, Tungidae e Rhopalopsyllidae são as de interesse médico. A denominação Siphonaptera é apropriada a esses insetos, cujo aparato bucal é

adaptado para perfurar a pele. Os sifonáperos não possuem asas. Na fase adulta, todas as pulgas são parasitos hematófagos. A maioria das espécies se alimenta em mamíferos – menos de 10% das espécies têm pássaros como hospedeiros. Uma grande diversidade de espécies ocorre nas zonas temperadas do planeta.

As pulgas são insetos holometabólicos, ativos, com pés traseiros fortes adaptados ao salto e um corpo achatado lateralmente, o que lhes permite moverem-se facilmente por entre os pelos ou as penas dos hospedeiros. O corpo da pulga é duro e lustrado; é coberto com muitas cerdas e espinhos curtos dirigidos para trás, que também ajudam os movimentos no hospedeiro. O corpo resistente da pulga pode suportar grande pressão, uma adaptação de sobrevivência às tentativas de eliminação pela coceira. Mesmo quando pressionada entre os dedos, a pulga sobrevive.

Ao contrário dos piolhos, a maioria das pulgas gasta um tempo considerável longe do hospedeiro. Os adultos, que vivem por um ano ou mais, podem sobreviver por semanas ou meses sem uma refeição de sangue. As pulgas adultas são resistentes e podem ficar sem repasto sanguíneo até por um período de um ano. As pulgas possuem cerdas genais, em forma de pente, na região frontal da cabeça e cerdas pronotais, chamadas ctenídios, no tórax. As pulgas põem pequenos ovos esbranquiçados, de forma oval, em lotes de vinte ou mais. Entre 2 e 14 dias as larvas eclodem dos ovos.

A larva da pulga é vermiforme, coberta por cerdas escassas, com aparato bucal mastigador; as pulgas não têm olhos. As larvas, que raramente vivem no corpo do hospedeiro, são encontradas geralmente livres, alimentando-se de restos orgânicos, inclusive de fezes das pulgas adultas. O período larval tem três estágios que duram de 7 a 14 dias, quando então ocorre a formação da pupa. As pupas são envoltas por um casulo de seda coberto de partículas de poeira. Após 14 dias, as pulgas emergem da pupa. Ao emergirem, as pulgas adultas devem encontrar um hospedeiro dentro de duas semanas, senão morrem.

Uma vez que a larva da pulga precisa amadurecer no ninho do hospedeiro, a pulga infesta somente animais que fazem ninho, como ratos, camundongos,

gatos e cães. Animais que não fazem ninho, como vacas, cavalos e cervos, não têm pulgas. Em algumas espécies de pulgas, o ciclo reprodutivo da fêmea é desencadeado por hormônios reprodutivos do hospedeiro-fêmea. Dessa forma, fica assegurado que uma geração nova de pulgas amadurecerá antes que a prole do hospedeiro deixe o ninho.

A importância médica das pulgas, além da picada irritante e das alergias que ocasiona, está na transmissão de micróbios patogênicos para os seres humanos e outros animais. Por exemplo, as pulgas do gato, *Ctenocephalides felis*, e do cão, *Ctenocephalides canis*, são hospedeiros intermediários dos helmintos *Dipylidium caninum* e *Hymenolepis* spp, que parasitam cães, gatos e seres humanos. A pulga do homem é a *Pulex irritans*. A pulga do rato, *Xenopsylla cheopis*, é o vetor primário de *Yersinia pestis*, bactéria causadora da peste bubônica.

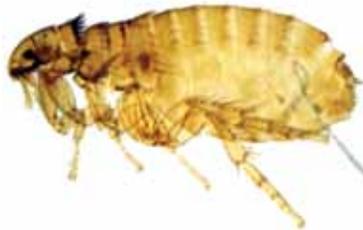


Figura 22. Imagem de uma pulga.

Foto: Luzia Caputo (Laboratório de Patologia, setor de Histotecnologia/IOC–Fiocruz).

As pulgas podem ser controladas por inseticidas. Terras de diatomáceas e bórax tem sido usados com sucesso no lugar de inseticidas, tóxicos para animais e para o homem. A terra de diatomácea e o bórax absorvem lipídeos cuticulares do exoesqueleto, causando desidratação.

A umidade é crítica para a sobrevivência da pulga. Os ovos precisam de umidade relativa de pelo menos 75% e as larvas precisam de pelo menos 50% para sobreviverem. Em áreas úmidas, aproximadamente 20% dos ovos sobrevivem até a idade adulta, enquanto em áreas áridas menos de 5% completam o ciclo vital. As pulgas adultas precisam de temperaturas que variem

de 21°C a 32°C para sobreviver. Baixas temperaturas retardam ou interrompem completamente o ciclo de vida da pulga. Uma combinação de umidade controlada, temperatura e limpeza a vácuo pode ser suficiente para reduzir, e mesmo eliminar, a infestação por pulgas.

3.4.1 Família *Tungidae*

Nessa família encontra-se o bicho-do-pé.

a) Taxonomia

A espécie de interesse médico é *Tunga penetrans*, conhecida como bicho-do-pé. O bicho-do-pé é relativamente comum nas zonas rurais.

b) Interesse médico

O bicho-do-pé tem esse nome por penetrar na pele, geralmente entre os dedos do pé, onde a pele é mais fina. A infestação se dá usualmente ao se andar descalço em currais, chiqueiros e praias infestadas. Recebe vários nomes: batata, bicho, bichô, bicho-de-cachorro, bicho-de-porco, bicho-do-pé, bicho-do-porco, bitacaia, chique, chitacaia, dengoso, espinho-de-bananeira, esporão, jatecuba, matacanha (em Angola e Moçambique), moranga, nígua, olho-branco, olho-de-pinto, piolho-de-faraó, pitxoca/pitxoka, pulga-da-areia, pulga-de-bicho, pulga-do-porco, pulga-penetrante, sico, taçura, taçuru, tatar-né, tuçuru, tunga, tunguaçu, vitacaia, xiquexique, xíquia, zunga, zunge, zunja.

A *Tunga penetrans*, que tem aproximadamente 1 mm de comprimento, entra na pele do hospedeiro para se alimentar do sangue necessário ao desenvolvimento dos ovos. No hospedeiro, o abdome da fêmea se expande enormemente, entre o 2° e o 3° segmento abdominal, e a pulga fica com a forma de um saco redondo, com o tamanho de uma ervilha e repleto de ovos. A permanência da fêmea fecundada do bicho-do-pé dentro da pele do

hospedeiro humano e de outros animais causa coceira, dor, edema e ulceração que pode servir como porta de entrada para infecções bacterianas secundárias. Infecções bacterianas graves são exemplificadas por úlceras, tétano e mesmo gangrena, que podem levar até mesmo à amputação da perna.

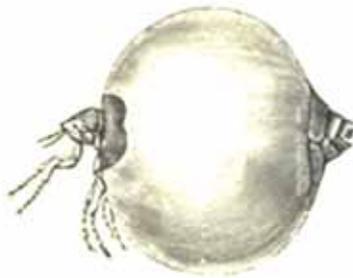


Figura 23. Um tungídeo, o bicho-do-pé.

Ilustração: Reproduzida de British Museum of Natural History, 1909.

3.5 Ordem Blattaria

Blattaria ou Blattodea é uma ordem de insetos cujos representantes são popularmente conhecidos como baratas. É um grupo cosmopolita, encontrado em todo o planeta. Apenas 1% das espécies é considerada sinantrópica.

a) Taxonomia

Dentre as espécies mais comuns estão *Blatta orientalis*, *Blattella germanica* e *Periplaneta americana*. O registro fóssil mais antigo de uma barata é datado do Período Siluriano, há aproximadamente 400 milhões de anos. No entanto, as baratas de hoje mudaram pouco, permanecendo insetos não especializados. As mudanças ocorreram na genitália da fêmea, na forma de pôr os ovos e nas asas. Na genitália feminina, houve redução do ovipositor, que não é mais visível externamente. Em torno de 60 milhões de anos atrás, os ovos passaram a ser colocados no interior de uma ooteca, em vez de individualmente, com o que se evita a dessecação. As asas deixaram de ter como função principal o voo, havendo redução das asas em alguns casos.

b) Interesse médico

Dentre os principais problemas de interesse médico que a barata pode ocasionar, está a sua atuação como vetor mecânico de patógenos diversos – como vírus, bactérias, fungos, protozoários e vermes; como vetor biológico de helmintos; e como vetor de reações alérgicas, causadas pelo contato com as fezes e exúvias. Além disso, a barata inutiliza alimentos, pois deixa um odor repugnante por onde passa; rói e suja utensílios, como roupas e livros; é praga agrícola de relativa importância, uma vez que rói raízes e se alimenta de produtos armazenados; e causa problemas psicológicos de nojo e medo.

c) Características gerais

As espécies *Periplaneta americana*, *Blatta orientalis* e *Blattella germanica* são ovíparas. As baratas são hemimetólicas e paurometabólicas, ou seja, os imaturos e adultos vivem no mesmo habitat. Dependendo da espécie, o tamanho das baratas varia de 3 mm a 10 cm de comprimento. As baratas têm corpo oval, achatado dorsoventralmente e, em geral, de coloração escura. A cabeça é curta, subtriangular, com peças bucais mastigadoras, antenas longas e filiformes, geralmente dois ocelos e olhos compostos. Os olhos compostos estão presentes na maioria das espécies, à exceção das espécies cavernícolas. O tórax possui três pares de pernas do tipo ambulatórias. Quando presentes, há dois pares de asas, que podem cobrir o abdome.

As baratas gostam de lugares quentes e úmidos, podendo ser encontradas sob pedras, cascas de árvores e no interior das edificações humanas, onde preferem a cozinha e a rede de esgotos. As espécies sinantrópicas são onívoras, têm hábitos gregários e são noturnas. As baratas preferem a noite para procurar alimento e parceiros para acasalamento e para realizar oviposição e dispersão. Durante o dia, permanecem escondidas, descansando. Na verdade, as baratas passam 75% de seu tempo imóveis. As baratas urbanas são capazes de viver três dias sem água e dois meses sem comida.

Na maioria das espécies, os ovos estão contidos em um estojo denominado ooteca. A ooteca varia em forma, tamanho e número de ovos de espécie para espécie. O número de ovos dentro da ooteca pode variar de 4 a 50 ovos. A ooteca geralmente é depositada em locais escondidos, e muitas vezes cobertos com detritos, para manter a umidade e servir de camuflagem contra predadores. A duração do estágio de ovo varia, dependendo da espécie e da temperatura. Por exemplo, na barata americana, a duração da fase a 29°C é de aproximadamente cinco semanas. A duração e o número de estágios ninfais variam também segundo a espécie, o sexo e as condições ambientais. Em geral, condições desfavoráveis levam a um maior número de estágios. Para a barata americana, a duração do estágio ninfal a 29°C é de aproximadamente oito meses; a espécie apresenta entre 11 e 12 estágios. A diferença entre as ninfas e os adultos está nas asas e nos órgãos sexuais. Assim, nas ninfas, as asas estão ausentes e os órgãos sexuais não estão desenvolvidos.

As baratas têm muitos inimigos naturais: bactérias, vermes, fungos, protozoários, artrópodes – como ácaros, aranhas, besouros, escorpiões –, hemípteros, himenópteros, vertebrados predadores e parasitos. Seis famílias de himenópteros, por exemplo, se desenvolvem nos ovos das baratas e algumas famílias de vespas alimentam suas larvas com ninfas de barata.

Curiosidades

Para muitos povos e regiões, as baratas têm um lugar de destaque no folclore, havendo menção a elas em modinhas, superstições, jogos infantis, medicina popular, provérbios, adivinhações, ditados e na alimentação.

Na medicina popular, existem relatos do uso de *Blatta orientalis* principalmente nas curas do alcoolismo, asma, bronquite, cólicas intestinais, dores de cabeça e ouvido, furúnculos e gripe. De fato, pesquisadores russos e alemães dos séculos XIX e XX conseguiram comprovar o efeito terapêutico das baratas.

Muitos povos orientais e indígenas usam baratas, ingeridas cruas ou cozidas, na sua alimentação.

As baratas também são utilizadas como material didático em aulas de anatomia na área de entomologia; como alimento na manutenção de criações de outros insetos; e como iscas por pescadores.

Em ecossistemas naturais, as baratas são importantes fontes de alimento de diversas espécies de animais. Além disso, as baratas atuam na reciclagem dos nutrientes, uma vez que são saprófagas.



Figura 24. *Periplaneta americana* ou *Blatta americana*, uma espécie de barata.

Foto: Reproduzida de Rafael, Silva e Dias, 2008.

3.6 Ordem Acari

Os ácaros compreendem um grupo de artrópodes (aracnídeos) de habitat e hábitos variados, e na sua maioria terrestres. Não possuem cefalotórax distinto, como nos outros aracnídeos: o próprio abdome se funde aos demais segmentos para constituir um único segmento, denominado idiossoma. As quelíceras e demais peças bucais estão reunidas em uma estrutura única, denominada capítulo ou gnatossoma. Os adultos e as ninfas possuem quatro pares de pernas; na fase larval, apresentam apenas três pares. Nessa ordem, estão os carrapatos, os ácaros do corpo, dos cílios e da poeira doméstica. Podem ser

parasitos de mamíferos, aves, répteis e de outros artrópodes. Os ácaros são achatados dorsoventralmente.

3.6.1 Subordem Ixodida, família Argasidae e Ixodidae

Um carrapato, ou carraça, é um artrópode da ordem Acari. As famílias de interesse médico são as famílias Argasidae e Ixodidae.

a) Taxonomia

Os carrapatos mais comuns no Brasil são *Boophilus microplus*, *Amblyomma cajennense*, *Argas miniatus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Ornithodoros rostratus*. Dentre os gêneros de importância, estão *Argas*; *Dermacentor*; *Haemaphysalis*, vetor da febre Q; *Hyalomma* e *Rhipicephalus*, vetores da babesiose e teileriose; *Ornithodoros*, que transmite rickettsiose; e *Ixodes*, cuja saliva pode causar prurido, eritema, febre e paralisia com contraturas, que pode ser fatal.

b) Interesse médico

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos, responsáveis pela transmissão de várias doenças humanas e animais. O interesse médico dos carrapatos está no parasitismo espoliativo, na ação tóxica da saliva e no seu papel como vetor. O parasitismo espoliativo é causado pela hematofagia, ainda mais quando a infestação se dá por grande número de espécimes. A ação tóxica é causada pela saliva dos carrapatos, que pode ser irritante, tóxica e alérgica. Alguns vírus causadores de encefalites também podem ser transmitidos por carrapatos. A espécie *Ixodes ricinus* e espécies do gênero *Dermacentor* causam, em vários animais, paralisia por carrapato como resultado de uma toxina presente na saliva do inseto. A toxina atinge o sistema nervoso, provoca falta de coordenação motora – dificulta o andar e causa tombos e incapacidade de permanecer em pé –, vômitos e pode levar à letalidade. Os carrapatos podem ser vetores de vírus, bactérias e protozoários. Dentre as doenças mais importantes causadas pela transmissão de patógenos aos humanos,

estão a febre maculosa, causada por *Rickettsia rickettsii* e também denominada rickettsiose; a borreliose, ou febre intermitente, incluindo a doença de Lyme, causada por várias espécies de *Borrelia* sp; a febre Q; as babesioses; as teilerioses; as ehrlichioses; e as meningoencefalites causadas por carrapato.

Boophilus microplus, o carrapato-de-boi, é vetor de doenças ao gado bovino. O carrapato-estrela, *Amblyomma cajennense*, é o parasito mais comum no homem e vetor da febre maculosa causada por *Rickettsia rickettsii* – a rickettsiose mais prevalente no Brasil. O carrapato-estrela, que tem o tamanho de um feijão verde, infesta o homem, mamíferos domésticos e silvestres e aves. A forma larval é o micuim: abundante nos pastos nos meses de março a julho, pode ficar até dois anos sem se alimentar, esperando um hospedeiro. O micuim causa coceira e inflamação sérias. O *Argas miniatus*, o carrapato-de-galinha, transmite aos galináceos a boubá, doença infecciosa semelhante à sífilis. O *Rhipicephalus sanguineus*, o carrapato-vermelho-do-cão, é típico de cães e gatos; os adultos de *Rhipicephalus sanguineus* preferem instalar-se nas patas e nas orelhas do cão e são de difícil controle.

c) Características gerais

Existem espécies microscópicas de carrapatos de até 0,25 mm de diâmetro. Os carrapatos vivem em touceiras, no capim, no chão, entre as madeiras, em climas úmidos ou secos, em todos os continentes do planeta. Eles geralmente têm forma oval e, quando em jejum, são achatados no sentido dorso-ventral, porém após o repasto sanguíneo ficam convexos e até esféricos. Os carrapatos argasídeos, chamados de carrapatos moles, não possuem escudo, seu corpo é duro e o aparato picador pode ser observado em vista dorsal. Os carrapatos ixodídeos, chamados carrapatos duros, possuem escudo, seu corpo é enrugado e o aparato picador é ventral. A principal diferença entre os carrapatos Argasidae e Ixodidae é a permanência no hospedeiro vertebrado.

Os argasídeos passam a maior parte do tempo livres no ambiente; normalmente não permanecem aderidos ao hospedeiro por períodos prolongados, pois passam a maior parte do tempo escondidos em frestas e em abrigos

de animais, procurando o hospedeiro apenas para se alimentar, normalmente quando os hospedeiros dormem. Os argasídeos são notáveis por poderem permanecer em jejum por períodos prolongados, de até mais de um ano, esperando pela oportunidade de se alimentar.

Já os carrapatos da família Ixodidae permanecem longos períodos sobre seus hospedeiros, com ciclos biológicos de um a três hospedeiros distintos. *Boophilus microplus*, o carrapato-do-boi, por exemplo, é um carrapato que parasita um único hospedeiro. Ele adere ao hospedeiro ainda na fase larval, alguns dias após a eclosão dos ovos. As larvas fazem o repasto sanguíneo, ingurgitam-se e realizam a muda, passando para ninfa e, posteriormente, chegando à fase adulta. As fêmeas caem no solo e procuram um local protegido para realizar a postura dos milhares de ovos que produzem, morrendo em seguida. Já o carrapato-de-cavalo, *Amblyomma cajennense*, é um carrapato que parasita três hospedeiros. As larvas e as ninfas caem ao solo para realizar as mudas e em cada uma das mudas passam para outro hospedeiro, a fim de fazer novo repasto sanguíneo.



Figura 25. Carrapato argasídeo.

Foto: Reproduzida de Occi, s.d.

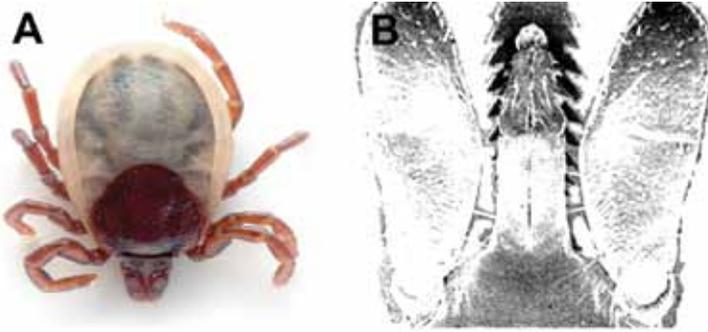


Figura 26. A) Carrapato ixodídeo; B) Rostro magnificado.

Fotos: Reproduzidas de Occi, s.d.



Figura 27. Sequência mostrando a dilatação do corpo de um carrapato após o repasto sanguíneo.

Foto: Reproduzida de Koch, 1986.

3.6.2 Subordem Acarididae, família Sarcoptidae

Nessa família estão os ácaros causadores da sarna.

a) Taxonomia

Os ácaros da família Sarcoptidae são muito pequenos, de difícil visualização a olho nu; possuem o corpo globoso e ligeiramente ovalado, com rostrum curto. As pernas são curtas e grossas, com ventosas tarsais ou pedicelos simples e longos. Dois pares de pernas se localizam anteriormente, próximas ao rostrum; os outros dois pares estão situados mais afastados, posteriormente.

Muitas espécies vivem como parasita da pele de mamíferos e podem parasitar o homem apenas acidentalmente. Dos ácaros da família Sarcoptidae, somente o *Sarcoptes scabiei* é encontrado parasitando o homem.

b) Interesse médico

Sarcoptes scabiei é um artrópode parasito da pele do homem, causador da sarna. Suas fêmeas cavam túneis em forma de S sob a pele do hospedeiro para deposição dos ovos. As larvas eclodem em três dias e movem-se sob a pele; depois de três ou quatro dias, transformam-se em ninfas octópodes e amadurecem como ácaros adultos. Os ácaros adultos vivem de 3 a 4 semanas. A movimentação dos artrópodes na pele do hospedeiro e a reação alérgica que a acompanha produzem intenso prurido, que se intensifica à noite. O ato de coçar danifica a pele e pode levar à infecção bacteriana secundária séria. O prurido e os caminhos avermelhados dos túneis em S na pele são os principais sintomas da sarna. Os ácaros sarcoptes são transmitidos pelo contato direto. São frequentes as infestações de suínos por *Sarcoptes scabiei*.

c) Características gerais

A escavação da pele é realizada pelo aparato bucal e por superfícies cortantes presentes nas patas dianteiras do *Sarcoptes scabiei*. Os ovos são postos pela fêmea à razão de 2 a 3 ovos/dia, durante aproximadamente dois meses. Quando as larvas, que têm três pares de patas, do ácaro sarcoptes eclodem, saem para a superfície da pele, à procura de folículos pilosos onde se alimentam e mudam para ninfas com quatro pares de patas. As fêmeas têm um estágio a mais de muda do que os machos. Assim, enquanto a fêmea leva 17 dias para se tornar adulta, o macho se torna adulto entre 9 e 11 dias. A fêmea é duas vezes maior em tamanho do que o macho.

Os ácaros sarcoptes adultos são esféricos, com dorso achatado e ventre convexo como o de uma tartaruga, sem olhos, com múltiplas cerdas e com quatro

pares de patas. As fêmeas têm de 0,3 a 0,4 mm de comprimento e de 0,25 a 0,35 mm de largura; o tamanho dos machos é metade do tamanho das fêmeas.



Figura 28. *Sarcoptes scabiei*, aracnídeo parasito da pele do homem que causa a sarna.

Ilustração: Reproduzida de Rey, 2008.

3.6.3 Subordem Actinedida, família Demodicidae

Na família Demodicidae está o gênero *Demodex* de ácaros, que parasitam a face do homem.

a) Taxonomia

Cerca de 65 espécies de *Demodex* já foram descritas. As espécies que parasitam o homem são *Demodex folliculorum hominis*, que habita os folículos pilosos, e *Demodex brevis*, que habita as glândulas sebáceas vinculadas aos folículos pilosos.

b) Interesse médico

Demodex folliculorum hominis e *Demodex brevis* são espécies antropofílicas cosmopolitas conhecidas como ácaros dos cílios, pois com frequência são

encontradas nos cílios. São também encontradas nas sobrancelhas, perto do nariz, ouvido externo, podendo parasitar outras regiões do corpo. *Demodex canis* é a espécie do cão doméstico que raramente causa infecção no homem. A infestação por *Demodex* é comum e geralmente sem sintomas, embora possam causar algumas doenças da pele.

c) Características gerais

As várias espécies de *Demodex* são pequenos artrópodes parasitos que vivem dentro ou no entorno de folículos pilosos e em glândulas sebáceas ligadas aos folículos pilosos de mamíferos. Os ácaros da face adultos medem entre 0,1 mm e 0,4 mm de comprimento. O corpo é alongado, semitransparente e consiste de dois segmentos fundidos, com quatro pares de patas no 1º segmento. O corpo é coberto de escamas que auxiliam no ancoramento dentro do folículo piloso. O ácaro *Demodex* vive com a cabeça dentro do folículo, alimentando-se de células da pele e da matéria sebácea que se acumula no folículo. O sistema digestivo é tão eficiente que não existe orifício excretor. A extremidade abdominal fica voltada para o interior do folículo. Os ácaros deste gênero não gostam de luz. Especialmente à noite, podem deixar o folículo piloso e andar vagarosamente sobre a pele, a uma velocidade de 8 a 16 cm/hora. A fêmea de *Demodex folliculorum* é mais curta e mais redonda do que o macho. Os machos e fêmeas de *Demodex* têm aberturas genitais, e a fecundação é interna.

A reprodução ocorre na abertura do folículo piloso, e os ovos são colocados dentro dos folículos pilosos ou das glândulas sebáceas. Larvas de três pares de patas eclodem dos ovos após 3-4 dias, e em 7 dias as larvas tornam-se adultos, apresentando então quatro pares de patas. Os ácaros crescidos deixam o folículo-ninho para procurarem outro folículo. Os adultos vivem durante várias semanas.

Estima-se que a infestação em indivíduos humanos idosos encontre-se entre 96 e 98% desses indivíduos, o que parece estar ligado à quantidade de matéria sebácea mais alta que produzem. Os ácaros *demodex* podem

ser observados, pelo microscópio, nos cílios e nas sobrancelhas. Os ácaros passam de hospedeiro pelo contato direto. Animais de diferentes espécies hospedam diferentes espécies de ácaro demodex. Geralmente os ácaros de uma espécie não são contagiosos para outra espécie. Na maioria dos casos, os ácaros passam despercebidos, sem ocasionarem sintomas adversos; em determinados casos, porém, relacionados com baixa do sistema imunitário, *stress* ou doença, as populações do ácaro podem aumentar, resultando em demodicose, patologia caracterizado por coceira, reações inflamatórias e granulomatosas, infecções secundárias e outras desordens da pele. A blefarite, inflamação das pálpebras, também pode ser causada por ácaros demodex.



Figura 29. *Demodex folliculorum* adulto.

Foto: Reproduzida de Rey, 2008.

3.6.4 Subordem Acaridida, família Pyroglyphidae

Nessa família estão os ácaros da poeira doméstica, frequentemente observados no domicílio humano.

a) Taxonomia

Nessa família estão os ácaros sinantropofílicos *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Euroglyphus maynei*, com frequência observados nas habitações humanas de todo o planeta, e conhecidos como ácaros da poeira doméstica.

b) Interesse médico

Os ácaros da poeira doméstica se alimentam de detritos orgânicos, como as descamações da pele humana, abundantes no ambiente doméstico. Os ácaros da poeira da casa são uma causa comum da asma e provocam sintomas alérgicos no mundo inteiro. As fezes dos ácaros da poeira doméstica são fortemente alergênicas.

c) Características gerais

Os ácaros da poeira doméstica adultos medem 0,5 mm de comprimento e de 0,25 mm a 0,3 mm de largura. Eles apresentam cor azul cremosa, cutícula estriada, forma retangular e quatro pares de patas, possuindo idiossomo ovoide e estriado. Como todo acari, os ácaros da poeira da casa têm oito pés (exceto no primeiro estágio, quando têm três pares). A vida média dos machos é de 10 a 19 dias. As fêmeas grávidas vivem em torno de 70 dias, colocando de 60 a 100 ovos. A exposição a temperaturas superiores a 60°C e inferiores a -20°C e umidade abaixo de 50% os destroem. Esse aracnídeo sobrevive em todos os climas, mesmo em altas altitudes.

Uma pessoa verte aproximadamente 1,5 g/dia de células epiteliais ou 0,3-0,45 kg/ano, o suficiente para alimentar aproximadamente 1 milhão de ácaros. O controle dos ácaros da poeira doméstica passa necessariamente pelo controle da umidade, que deve ser mantida baixa. Os ácaros são encontrados de preferência nos quartos e nas cozinhas, vivendo em colchões, tapetes, estofados. Os alérgenos produzidos por eles estão entre os mais comuns alérgenos desencadeadores de asma. Alguns sinais principais de alergias causadas por ácaros da poeira doméstica são coceiras, espirros, olhos lacrimejantes e vermelhos, coriza, febre do feno, obstrução pulmonar. A alergia pode ser crônica. O pó de boro é usado frequentemente para erradicar ácaros da poeira da casa pela desidratação que ocasiona aos ácaros.



Figura 30. *Dermatophagoides pteronyssinus*, um dos ácaros da poeira doméstica.

Foto: Reproduzida de University of Florida, s.d.

4. Técnicas de coleta de insetos de interesse médico

A coleta de espécimes de insetos é necessária para conhecermos a epidemiologia das doenças. Quais espécies vivem em quais lugares, quando e em que hospedeiro, são algumas das perguntas que se quer responder com as coletas.

Vários tipos de equipamentos são usados para coletar insetos de interesse médico, como tubo manual de sucção, armadilhas com iscas animais e luminosas, armadilhas a gás e com feromônios.

Antes de iniciar a coleta de qualquer grupo de insetos, é necessário ter em mente alguns parâmetros, para que se saiba onde procurar os espécimes, o que levar para campo, em que horário do dia é mais proveitosa a coleta, como transportar o material coletado e como receber, triar e guardar o material no retorno ao laboratório.

- **Conhecimento da biologia e ecologia do inseto que se pretende coletar:** deve-se ter um mínimo de conhecimento a respeito do ciclo de vida, dos principais criadouros, dos tipos de atrativos ou iscas e do horário de atividade do inseto em seu ambiente natural. De posse desses conhecimentos será mais fácil encontrar no campo espécimes do grupo que se quer estudar.

- **Finalidade da coleta:** é necessário definir qual o tipo de estudo que está sendo desenvolvido e o tipo de material a coletar: se insetos adultos ou formas imaturas, insetos mortos ou vivos. Definidos esses objetivos, é possível programar não só o local adequado para a coleta, mas também o material necessário para realizá-la e quantos coletores serão necessários para o desempenho da tarefa.
- **Organização do material:** no dia anterior à coleta deve ser preparado todo o material que se necessita levar para o campo. O material deve ser embalado adequadamente, para evitar danos ou extravio durante a viagem, e colocado em uma caixa de fácil transporte e manuseio para situações de dificuldade no campo, como locais de difícil acesso, íngremes ou alagados. Junto com o material de coleta, é importante que se observem as regras de segurança, levando todos os equipamentos de proteção individuais (EPIs) e equipamentos de proteção coletivos (EPCs), se for o caso, necessários para o tipo de coleta. Se a coleta for feita em períodos regulares, semanais ou mensais, é bom manter uma lista contendo todos os itens necessários junto da caixa de transporte dos insetos, de forma a poder conferir a relação de itens com facilidade antes do dia da coleta, repondo o material gasto ou inutilizado.
- **Programação do dia da coleta:** o dia da coleta deve ser programado com antecedência com base em boletins meteorológicos e na disponibilidade de transporte e de pessoal.

Com os parâmetros acima definidos, podemos reduzir o tempo gasto nas coletas e calcular a quantidade de material que está sendo levada para o campo, evitando-se desperdício e excesso de peso, e contribuindo, ainda, para manter não apenas a segurança das pessoas envolvidas nas coletas e no transporte, mas também a integridade do material coletado.

4.1 Coleta de formas adultas de insetos de interesse médico

As formas adultas podem ser coletadas com rede entomológica, capturadores de sucção, bandeja d'água e armadilha luminosa, entre outros métodos.

A **rede entomológica**, também conhecida como puçá, é própria para coletar insetos em voo. Consiste em um cabo de madeira com um aro de arame numa extremidade, contendo um saco feito de tecido filó preso por uma das pontas. A madeira deve ser leve para facilitar o manuseio. O cabo também pode ser de alumínio. O diâmetro do saco pode ser variado, levando-se em consideração o tamanho do inseto que se quer coletar – borboletas, mariposas, odonatas, vespas, cigarras, moscas. Porém, para insetos alados menores, embora também seja utilizada, pode ser substituída pelo capturador de Castro.

O **capturador de sucção** é utilizado para capturar insetos alados quando pousados sobre o hospedeiro para o repasto sanguíneo. É formado por um tubo de vidro ou acrílico, provido de uma tela fina em uma extremidade, à qual está acoplado um tubo de borracha ou uma mangueira de garrote, que servirá para sucção. Existem outros modelos de capturadores à base de sucção. A sucção pode ser com a própria boca ou por uma bomba que gere pressão negativa. Sua finalidade é aspirar o inseto para dentro do tubo de vidro. O inseto poderá ser transportado para uma gaiola, caso seja necessário manter o espécime vivo, ou para um frasco mortífero, contendo éter ou acetato de etila. O capturador de sucção é excelente para a captura de mosquitos, moscas, borrachudos, maruins e flebótomos, entre outros. A ideia desse tipo de capturador foi descrita em 1928 por Patrick Alfred Buxton, médico entomologista da London School of Hygiene and Tropical Medicine.

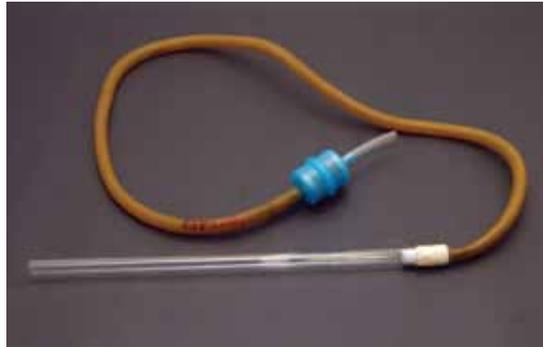


Figura 31. Capturador de sucção.

Foto: Nataly Souza (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses/IOC–Fiocruz).

A **bandeja d'água** é de fácil construção e emprego. Consiste numa fôrma assadeira de bolo, quadrada, cujo fundo esteja pintado com uma coloração atrativa, como o branco, o amarelo ou o verde. A tonalidade da cor pode fazer toda a diferença no sucesso da coleta. A fôrma deve ser colocada no solo e ficar cheia de água, à qual se acrescentam algumas poucas gotas de detergente, que servem para facilitar o afundamento dos insetos que nela caírem. Os insetos capturados não devem ser deixados na água por muito tempo para que não estraguem.

A **armadilha luminosa** é usada para a coleta de insetos noturnos. Existem vários modelos de armadilhas luminosas. A lâmpada pode ser de luz negra, incandescente ou fluorescente. Uma variação da armadilha luminosa é a coleta em um pano sob uma fonte de luz. Coletar insetos sob as lâmpadas da iluminação pública ou na iluminação externa das residências ou outros edifícios também é um método que acaba rendendo bons exemplares. De forma geral, as lâmpadas isoladas, situadas longe das grandes concentrações urbanas de luz, produzem os melhores resultados.



Figura 32. Um tipo de armadilha luminosa.

Foto: Laboratório de Transmissores de Leishmanioses/IOC–Fiocruz.

A **armadilha com isca**, usada para atrair insetos zoofílicos ou ecléticos, tem um animal como isca. Existem vários modelos de armadilhas com isca, que podem receber diferentes nomes de acordo com o seu inventor – por exemplo, **armadilha de Shannon**, de **Damasceno**, de **Noireau**, etc.



Figura 33. Tipos de armadilha com isca.

Foto: Nataly Souza, Maurício Villela, Gustavo Aguiar
(Laboratório de Transmissores de Leishmanioses e Laboratório de Díptera/IOC–Fiocruz).

Os insetos capturados podem ser mortos pelo uso de um frasco mortífero. O frasco mortífero é um vaso de vidro contendo substância venenosa volátil. É importante que esse frasco seja guardado em local seguro, longe do alcance de crianças e animais domésticos, e que tenha uma etiqueta de identificação contendo a palavra VENENO bem visível. Pode ser envolvido externamente por uma camada de fita adesiva, como medida de segurança, caso venha a cair e se quebrar. A colocação da fita adesiva facilita o seu descarte, sem extravasar o conteúdo venenoso. O frasco mortífero não pode ser confeccionado com vasilhames plásticos, pois éter e acetato de etila diluem o plástico.

Como construir um frasco mortífero

O frasco mortífero é um vaso de vidro contendo substância venenosa volátil, para sacrificar os espécimes coletados. Pode ser construído utilizando-se, por exemplo, um frasco de vidro de maionese de 500 g, vazio e com tampa. Faz-se uma solução de gesso e coloca-se uma camada de gesso de 2 ou 3 cm no fundo do vaso. Após a secagem do gesso, derrama-se dentro do frasco uma quantidade do líquido mortífero – éter ou acetato de etila – suficiente para umedecer o gesso sem encharcá-lo. Esse tipo de equipamento é útil, no campo, quando não se dispõe de um freezer, que é um método mais seguro para matar os espécimes.

Caso se tenha à disposição um *freezer*, pode-se recorrer ao método à base de resfriamento para sacrificar os espécimes. Eles devem ser colocados dentro de um saco plástico etiquetado, com informações sobre data da coleta, local, nome do coletor, tipo de coleta e outros dados que se julgue importantes, e postos no *freezer* por 5 a 10 minutos, até que morram.

É importante que insetos pequenos e delicados não sejam misturados no mesmo saco com insetos maiores e mais resistentes, pois, na ânsia de se libertar, os maiores destruiriam os menores. Certas vespas possuem grande quantidade de glicerol no corpo e não devem ser mortas por esse método, uma vez que

o glicerol funciona como anticongelante e facilita a sobrevivência do inseto mesmo após horas dentro do *freezer*.

4.2 Coleta de formas imaturas de insetos de interesse médico

Formas imaturas aquáticas podem ser coletadas com conchas e tubos sugadores. Elas podem ser mortas com água quente e depois fixadas, para não sofrerem melanização, que é o escurecimento da cutícula. A fixação é feita com uma mistura de 1 parte de querosene, 7 a 9 partes de álcool 96° GL, 1 parte de ácido acético glacial e 1 parte de detergente incolor.

A seguir descrevemos os tipos de coletas mais utilizados em diferentes grupos de insetos de importância médica.

4.3 Técnicas de coleta de alguns insetos hematófagos

4.3.1 Coleta de culicídeos, flebotomíneos, ceratopogonídeos e simuliídeos

Mosquitos, flebótomos, maruins e borrachudos podem ser capturados com armadilha luminosa, isca animal ou utilizando-se, quando pousem, nas horas de preferência de hematofagia para cada espécie, o capturador de Castro.

Para o transporte das fêmeas de flebotomíneos ao laboratório, utilizam-se gaiolas de tecido de náilon presas a armações de ferro, contendo uma flanela úmida na sua lateral e envolvidas em saco plástico (fig. 34). As gaiolas são semelhantes às sugeridas por Barraud para a criação em laboratório. Para o transporte de culicídeos, utilizamos gaiolas cilíndricas de papelão ou plástico, revestidas de papel-filtro.



Figura 34. Gaiolas para acomodação de flebotômíneos.

Fotos: Nataly Souza (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses e Laboratório de Díptera/IOC–Fiocruz).

4.3.2 Coleta de triatomíneos

A captura de triatomíneos pode ser realizada por dois métodos: busca ativa e busca passiva. Na busca ativa, os coletores pesquisam o domicílio, o peridomicílio e o ambiente silvestre em busca de marcas de fezes, exúvias e ovos eclodidos, como sinais importantes que indicam a presença de triatomíneos. Na busca passiva, a captura é realizada com diferentes tipos de armadilhas que atraem os insetos, sem a participação direta do coletor, daí a denominação passiva. As armadilhas podem ser luminosas ou com isca animal.

A armadilha luminosa do tipo Malaise consta de um tecido branco, medindo cerca de 1,5 m x 1,5 m, e de uma fonte luminosa, responsável pela atração dos insetos. Essa armadilha deve ser montada no período noturno, durante aproximadamente quatro horas, para que a luz atraia os insetos. A armadilha com isca animal, ou armadilha de Noireau, comumente utilizada para capturas no ambiente silvestre, consta de um pote plástico, com a tampa telada na parte central, envolto por uma fita adesiva de dupla face na parte superior. Em seu interior, é colocado um animal, que pode ser um pinto ou um camundongo, cuja temperatura corporal, liberação de CO_2 e dejeções nitrogenadas atraem o triatomíneo. Esse tipo de armadilha é usado em copas de palmeiras, buracos de pedra, tocas de animais e ocos de árvores, entre outros.

No domicílio, a pesquisa é feita em estrados de cama, objetos guardados, caixas, paredes, calendários e fotos presas em paredes, roupas e em tetos revestidos de folhas de palmeira. Por ser uma área onde existem muitos locais que podem servir de abrigo para os triatomíneos, a investigação no peridomicílio é mais abrangente. Por isso, é um trabalho mais demorado e que requer muita atenção. Muitas vezes existem no peridomicílio amontoados de telhas, lenhas e tijolos, cercas de curral, galinheiro e pocilgas, paióis, fornos, entre outros. As lenhas e cercas normalmente têm suas cascas soltas, e é sob elas que os triatomíneos se escondem. Assim, as cascas devem ser removidas com cuidado para a observação da presença de todas as formas do desenvolvimento – isto é, de ovo a adulto.

No ambiente silvestre, as buscas são realizadas em locais que podem abrigar possíveis hospedeiros, como roedores, tatus, gambás e aves, entre outros. Esses ambientes incluem pedras, ninhos de aves, áreas sob a casca de troncos de árvores ou arbustos, troncos de árvore, tocas de animais, bromélias, palmeiras e outros, variando de acordo com a região que está sendo pesquisada. Para as buscas em áreas de pedra, deve-se levantá-las e, após a observação, deve-se retorná-las para a posição anterior, de modo a não alterar o ambiente. No caso das palmeiras, é possível trabalhar com o uso de armadilha com isca animal ou, então, derrubando a palmeira. Nesse caso, é preciso autorização do órgão de fiscalização ambiental para a sua derrubada. O trabalho é realizado, retirando-se as folhas uma a uma até se chegar à parte central.

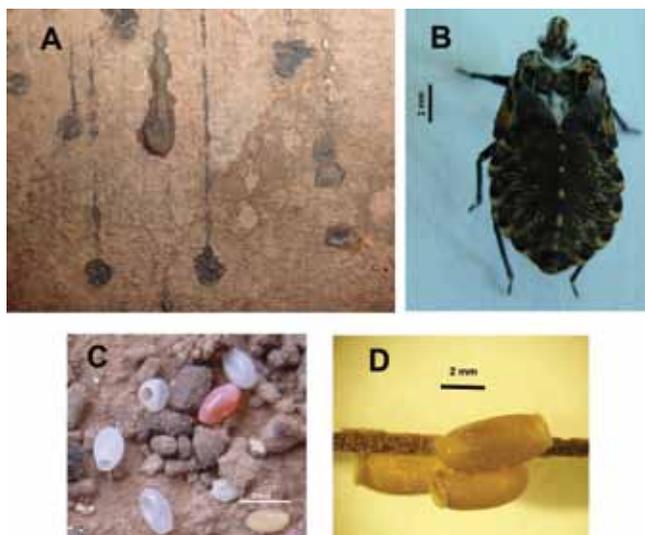


Figura 35. Na busca ativa, os coletores pesquisam o domicílio, o peridomicílio e o ambiente silvestre em busca de marcas de fezes (A), exúvias (B) e ovos eclodidos (C) e (D), como sinais importantes que indicam a presença de triatomíneos.

Fotos: Teresa Cristina Monte Gonçalves, Catarina Macedo (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense/IOC–Fiocruz).

Os insetos coletados devem ser acondicionados em recipientes, devidamente identificados quanto ao local de captura, nome do coletor e data. Esses dados são de extrema importância porque, havendo a necessidade de retornar ao local de coleta para capturar mais espécimes, isso só será possível mediante essas informações.

Etiqueta de identificação

- Número de acesso (registro de arquivo em ordem numérica crescente e outros códigos)
- Identificação da espécie
- Nome do coletor
- Data
- Endereço de coleta
- Coordenadas geográficas (graus, minutos, segundos)
- Local de coleta: () domicílio () peridomicílio () quarto () sala () galinheiro () chiqueiro () outros
- Outras informações

O recipiente para o transporte do inseto vivo deverá conter, em seu interior, papel dobrado em sanfona, para aumentar a superfície de contato. Pequenos orifícios devem ser feitos na tampa; no entanto, deve-se cuidar que não sejam muito grandes, para que os ovos e ninfas de 1º estágio não passem.

No caso de insetos mortos, devem ser contidos no recipiente por um papel fino (papel higiênico ou lenço de papel), a fim de evitar que se desloquem dentro do recipiente, e que estruturas delicadas, como antenas, tarsos e cerdas, se danifiquem, o que dificultará a sua identificação.

4.4 Técnicas de coleta de moscas

De acordo com o objetivo da coleta, os dípteros muscoides capturados serão sacrificados ou mantidos vivos, o que determinará a maneira que devem ser transportados ao laboratório.

4.4.1. Subordem Brachycera, infraordem Muscomorpha, ou moscas das miíases

Geralmente quem realiza a coleta de larvas das miíases é a equipe médica ou de enfermagem dos hospitais ou postos de saúde. As larvas são coletadas com o auxílio de pinça; muitas vezes, coloca-se éter ou óleo mineral para facilitar a saída das larvas. Após a retirada das larvas, as mesmas devem ser submetidas à solução de cloreto de sódio a 0,9%, com o objetivo de realizar uma lavagem por agitação. Após a lavagem, as mesmas devem ser preservadas em recipientes contendo formol a 10% ou etanol 70% para, em seguida, serem encaminhadas a um especialista. No laboratório, as larvas são clarificadas em hidróxido de potássio a 10% e em seguida transferidas para recipientes de vidro contendo lactofenol, com a finalidade de promover a clarificação e a diafanização do corpo da larva. As larvas então são montadas entre lâminas e lamínulas para serem analisadas e identificadas de acordo com a chave dicotômica específica. As análises devem ser realizadas em microscópio estereoscópico e microscópio

óptico. Todos os procedimentos utilizados devem ser realizados dentro das normas de biossegurança.

4.4.2 Técnicas de coleta e transporte de moscas de importância forense

Antes do início das coletas, é necessário observar o comportamento dos insetos, além de se determinar a sua posição ecológica (necrófago/predador). Insetos adultos mais ágeis, como as moscas, podem ser encontrados pousados no corpo e ao seu redor, bem como sobrevoando áreas circunvizinhas.



Figura 36. Espécimes de *Calliphoridae* pousados em galho de arbusto.

Foto: Margareth Queiroz (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense/IOC-Fiocruz).

Os dípteros muscoides necrófagos são os insetos de maior importância forense, pois utilizam a matéria orgânica em decomposição como fonte proteica, visando estimular a oviposição ou larviposição, ou para o desenvolvimento de suas fases imaturas. Suas atividades aceleram a putrefação e a desintegração do corpo. Além disso, cada fase da putrefação cadavérica oferece condições e características próprias que atraem um determinado grupo de insetos; conseqüentemente, eles se sucedem de acordo com um padrão.

A coleta de dípteros muscoides ao lado de cadáveres precisa ser feita de maneira cuidadosa, a fim de que se evitem lesões pós-morte no corpo. Os adultos das moscas podem ser coletados com o auxílio de rede entomológica

comum, passada por cima do cadáver; após terem sido anestesiados, são retirados e transferidos para recipientes devidamente identificados. Outro recurso é a utilização de armadilha confeccionada com papel adesivo, organizada em forma de tenda, com ângulo de 60°, montada à distância de 1 m do corpo. No laboratório, os espécimes que ficaram aderidos ao papel podem ser removidos da armadilha com o uso de xileno. Os inconvenientes desse método são os danos que possam ser provocados nos espécimes, dificultando a sua identificação, além do preço, pois o papel adesivo é importado.

No caso de espécimes imaturos, ovos, larvas e pupas, a coleta pode ser feita diretamente do cadáver. É necessário transportar ovos e larvas em recipientes fechados por tecido de malha fina escaline, para evitar a asfixia, a fuga de larvas pequenas e o ataque de dípteros predadores da família Phoridae. Para a coleta de ovos, uma parte deve ser acondicionada em papel-filtro umedecido para evitar a desidratação e, conseqüentemente, a morte.

Na rotina de trabalho de peritos criminais em laboratório de entomologia forense, faz-se necessária a adição de substrato de criação à base de carne moída, peixe e fígado ou dieta artificial para a criação das larvas que eclodirão dos ovos. Essa atividade permite a identificação das espécies presentes no cadáver, pois as chaves de identificação de ovos são inexistentes na literatura. No entanto, a identificação por meio da microscopia eletrônica pode fornecer resultado mais rápido, o que facilitaria bastante o trabalho dos peritos em situações nas quais não existem locais apropriados para a manutenção e/ou criação dos imaturos. Diversos autores utilizaram a microscopia óptica e de varredura para analisar a morfologia dos ovos e discutiram a importância de cada uma das estruturas como diagnóstico na identificação das espécies.

Já a coleta das larvas é feita com pinça, colheres e pincéis finos de pelo diretamente da massa que costuma ser encontrada nas bordas das lesões, nos orifícios naturais do corpo e em locais abrigados, como axilas, cabelos e atrás das orelhas. É necessário verificar também o interior do corpo, dentro das roupas e sob o cadáver, cavando-se o solo em busca de larvas e de pupas.

A observação do local onde o cadáver foi encontrado, principalmente em caso de ambientes fechados, também é necessária, pois a presença de insetos em outras partes do ambiente serve para auxiliar na determinação do intervalo pós-morte, evidenciando a presença de uma segunda geração de insetos criados naquele cadáver. Em ambientes abertos, os despejos sanitários, o lixo e outros fatores que sirvam como atrativo para os insetos adultos devem ser localizados. As larvas devem ser transportadas separadas em potes diferentes, para evitar o fenômeno de predação, e agrupadas de acordo com o tamanho e a semelhança entre si.

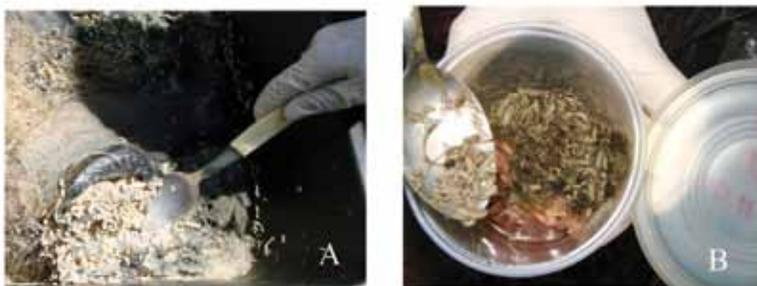


Figura 37. A) Coleta de larvas de moscas da carcaça de porco doméstico; B) Coleta de larvas de moscas acondicionadas em recipiente contendo dieta à base de carne bovina putrefata.

Fotos: Margareth Queiroz (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense/IOC–Fiocruz).

Os imaturos devem ser transportados em bolsas térmicas contendo gelo químico, que diminui o metabolismo do inseto durante o transporte, visando manter o estágio coletado até os exames laboratoriais. O transporte de pupas deve ser feito em potes contendo serragem umedecida, vermiculita ou um pouco de solo do local, o que evitará a desidratação. O transporte das amostras do solo é feito em sacos plásticos, tipo Ziploc®, para manter a umidade e alguma reserva de ar. Todos os recipientes devem ser etiquetados com os dados da coleta, ou seja, dia, horário, número da ocorrência, local da coleta e

outros dados. Tanto o especialista entomólogo quanto o perito que recebe o material para exame devem ter cuidado com a cadeia de custódia.

Os dípteros muscoides mortos podem ser transportados em recipientes contendo álcool etílico a 70%. Esses insetos também podem ser mantidos secos e transportados em potes contendo papel-filtro picado para diminuir o excesso de umidade e evitar *stress* físico, impedindo que se danifiquem as asas. Também podem ser transportados em envelopes triangulares de papel ou, ainda, em envelopes de carta. Algumas armadilhas de coleta possuem recipientes coletores ou sacos plásticos para o recolhimento dos insetos atraídos e coletados, que podem ser transportados diretamente ao laboratório.

Para o transporte do material vivo, as moscas podem ser coletadas com rede entomológica ou armadilhas, utilizando-se como atrativo animais domésticos com ferimentos, carne em decomposição, fezes humanas ou de animais, frutos maduros e carcaças de animais ou, no caso da entomologia forense, humanas, entre outros. Em seguida, esses insetos são levados em tubos coletores ao laboratório ou transferidos para gaiolas de madeira (30 cm x 30 cm x 30 cm), revestidas nos lados com tela de náilon e com uma abertura frontal constituída por uma manga de tecido de cor preta, a fim de permitir o manuseio das moscas.

Estudos sobre a distribuição temporal nas estações do ano dos insetos de importância forense estão sendo desenvolvidos no campus da Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro. As armadilhas são constituídas por uma estrutura metálica em forma de pirâmide de 1,5 m de altura, revestida por um tecido de cor preta contendo, em sua parte inferior, uma tira de tecido de náilon branco que permite a entrada de luz e ventilação. Na parte superior da pirâmide, encontra-se um tubo de PVC de 75 mm, que, em sua porção mediana, apresenta uma janela de 25 cm x 11 cm com tecido de náilon fino de cor branca, por onde também entra luz e ar para o interior do tubo. Os insetos que entram pela parte inferior da pirâmide tendem a voar para o alto, atraídos pela luminosidade, e ficam presos no interior. A entrada do tubo é afunilada a fim de evitar a fuga dos insetos para o ambiente. De forma a impedir que animais necrófagos de grande porte se alimentem das carcaças, confeccionou-se uma gaiola de tela metálica com as

laterais arrematadas com vergalhão, que, depois de fixada ao solo, protege a carcaça em decomposição no seu interior.



Figura 38. A) Armadilha utilizada em experimentos de entomologia forense (a seta aponta para o tubo coletor, ampliado na figura ao lado); B) Tubo coletor.

Fotos: Margareth Queiroz (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense/IOC–Fiocruz).

Para atração dos insetos, são utilizadas, a cada estação, três carcaças de porcos domésticos, com aproximadamente 10 Kg de massa, uma para cada armadilha. Os animais são comprados e abatidos no local em que são criados, para o abastecimento do consumo humano. Após o sacrifício, as carcaças são transportadas dentro de sacos plásticos para o local dos experimentos; cada uma delas é colocada em uma bandeja plástica contendo solo do mesmo local e introduzida na gaiola, abaixo da armadilha. As gaiolas são fotografadas e observadas nos horários de coleta, com a finalidade de acompanhar as transformações morfológicas para posteriores associações com a fauna colonizadora.



Figura 39. Carcaças de *Sus scrofa* com diversas moscas da família Calliphoridae realizando a postura de ovos sobre a carcaça.

Fotos: Margareth Queiroz (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense/IOC-Fiocruz).



Figura 40. A) Larvas de moscas colonizando carcaça de porcos domésticos; B) Larvas e ovos de moscas em carcaça; C) Larvas maduras de moscas no solo em busca de pupação; D) Adultos de *Calliphoridae* se alimentando do exudato liberado pela carcaça.

Fotos: Margareth Queiroz (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense/IOC-Fiocruz).

As coletas de insetos são feitas diariamente, às 12 horas. O tubo é desencaixado da armadilha e vedado na extremidade inferior, por onde os insetos entram, transformando-se numa gaiola de transporte. No laboratório, as gaiolas são introduzidas no *freezer* a -17°C de temperatura, permanecendo dentro dele por 40 minutos. Após o congelamento, os insetos são transferidos para tubos de ensaio, com informações sobre dia, horário e número da carcaça onde os insetos foram coletados. O material retorna ao *freezer* para que sejam feitas triagem, identificação e contagem dos espécimes posteriores.

4.4.3 *Técnicas de criação de insetos de interesse médico*

Os insetos podem ser mantidos em colônias em laboratório, servindo de base para pesquisas em biologia, morfologia, ultraestrutura, comportamento, estudos populacionais, estudos sobre a susceptibilidade a certos patógenos, modelos experimentais, resistência a inseticidas, genética, citoquímica, citogenética, entre outras.

Embora a manutenção das colônias seja feita em ambientes adaptados e de acordo com protocolos estabelecidos por normas de biossegurança, o material usado na manutenção de colônias de insetos é simples. Os materiais requeridos são facilmente encontrados, e as gaiolas podem ser manufaturadas.

Antes de iniciar a criação de uma espécie, deve-se ter um conhecimento básico sobre a biologia da espécie e procurar reproduzir as microcondições de seus habitats naturais, recorrendo à bibliografia específica.

O insetário deve ser montado em uma sala que possa ser vedada, para que se mantenham as condições climáticas ideais dentro dele, e telada, para evitar a fuga de insetos. Existem equipamentos eletrônicos que controlam a temperatura e a umidade de locais onde aparelhos de ar condicionado e aquecedores estejam ligados. As paredes e pisos devem ser pintados de branco e conter o mínimo de mobiliário necessário relativo à manutenção das colônias. As mesas ou estantes para a colocação de gaiolas dos insetos adultos e/ou bandejas contendo formas imaturas, larvas e pupas devem ser vazadas para favorecer a

aeração. Dentro do insetário, deve haver uma pia para lavar o material utilizado no manuseio diário e um reservatório contendo água ambientada. Água ambientada é a água de torneira que se deixou descansar em recipiente fechado por tecido filó por alguns dias para a evaporação do cloro dissolvido. Deve existir um termômetro e um hidrômetro permanentemente na gaiola para medir a temperatura e a umidade. Podem existir equipamentos que facultem a luminosidade controlada, com fotoperíodos estabelecidos, como um cronômetro ligado à rede elétrica.

A entrada do insetário deve conter uma dupla porta de segurança, com uma pequena saleta entre elas, para evitar a saída de insetos adultos do insetário ou, ainda, para evitar a entrada de insetos do ambiente externo que poderiam contaminar a colônia, seja desovando em recipientes onde as larvas se encontram, seja simplesmente danificando a colônia, ao invadirem as gaiolas dos insetos adultos. Deve haver uma antecâmara contígua ao insetário que servirá para o armazenamento de materiais utilizados no próprio insetário — como cubas, gaze, algodão, filó, pipetas, estiletes, pinças, entre outros. Essa antecâmara deverá conter também uma pia para lavagem de material e preparação de soluções e uma bancada que permita a instalação de microscópios ópticos e estereoscópios ou de lupas.

Para a criação de espécies vetores de patógenos — por exemplo, os da malária, dengue, febre amarela, encefalites e leishmanioses —, principalmente quando os insetos provêm da natureza e podem estar infectados, devem ser tomadas certas medidas extras de segurança. Entre as medidas de segurança, estão a utilização de equipamentos adequados, como telamento, antecâmara, pressão negativa, cortina de vento; pessoal treinado; uma única porta de acesso; duas pias, no mínimo, sendo uma ligada a um reservatório de água sem cloro; a água drenada pelas pias deve passar por um reservatório tratado regularmente.

Nos itens relacionados à biossegurança, podem-se citar: treinamento adequado do pessoal antes do início do trabalho; uso de avental ou jaleco, luvas e demais EPIs; não tocar em maçanetas, interruptores ou telefones com as luvas;

nunca sair do laboratório usando jaleco ou luvas; nunca pipetar com a boca; nunca fumar, comer ou beber no insetário; não tocar o próprio rosto ou o cabelo de luvas – por isso recomenda-se prender o cabelo; lavar as mãos após tirar as luvas; manter controle rotineiro dos insetos; seguir as normas básicas para trabalho em laboratório e para trabalho com animais que servirão como fonte de alimentação sanguínea para os insetos hematófagos; manter limpo e organizado todos os equipamentos e as áreas de trabalho; descartar do modo prescrito pelas normas de biossegurança vigentes os resíduos químicos e/ou biológicos do laboratório; e dedicar especial atenção ao material biológico infeccioso.

A alimentação sanguínea deve ser administrada segundo a preferência e o horário natural de alimentação de cada uma das espécies criadas, podendo ser utilizados animais devidamente imobilizados ou um alimentador artificial para insetos hematófagos.

As colônias devem oferecer um manejo com técnicas que assegurem simplicidade e obtenção do maior número possível de posturas férteis, evitando-se, além disso, a excessiva manipulação dos ovos. A temperatura e a umidade devem ser controladas. Assim, para a criação de espécimes da família Culicidae, as colônias devem ter acima de 70% de umidade relativa e temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; já para a criação de flebotomíneos, a umidade relativa deve ficar em $90\% \pm 10\%$ e a temperatura, em $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O monitoramento deve ser diário, inclusive nos finais de semana e feriados, visando assegurar o controle do desenvolvimento excessivo de fungos, formigas e ácaros nocivos ao bom desenvolvimento de larvas, pupas e adultos.

● Técnicas para obtenção de posturas de flebotomíneos

Dentro dos cuidados que devemos ter numa criação de insetos vetores, a oviposição é o momento mais delicado, e alguns pesquisadores desenvolveram técnicas para minimizar as perdas, que são muito grandes. A primeira tentativa de atenuar essa perda foi feita utilizando-se caixas de madeira com paredes

de vidro fechadas com um pano fino. Após as fêmeas estarem ingurgitadas, a grande maioria dos pesquisadores as coloca individualmente em tubos de polietileno, cilindros de vidro com papel-filtro e/ou algodão umedecidos ou gesso (fig. 41).



Figura 41. A) Tubo de polietileno; B) Cilindro de vidro com papel-filtro e/ou algodão; C) Cilindro de vidro com gesso umedecido.

Fotos: Nataly Souza (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses/IOC–Fiocruz).

● Criação individual

As fêmeas são individualizadas em tubinhos de polietileno forrados no fundo com gesso, para manter os ovos recém-postos bastante umedecidos. Essa técnica em geral é empregada quando os flebotomíneos são de áreas onde mais de uma espécie predomina. As posturas são individualizadas em placas de Petri forradas com gesso; quando nasce o primeiro adulto de cada placa, ele é então identificado e, assim, as posturas vão sendo separadas de acordo com cada espécie.

● Criação em massa

A criação em massa de flebotomíneos prevê que as fêmeas ingurgitadas, trazidas do campo ou nascidas em laboratório, sejam liberadas em recipientes apropriados – caixas maiores ou gaiolas. Tais recipientes podem ser de madeira, vidro

(fig. 42A), plástico ou acrílico (fig. 42B). Essa técnica é empregada quando existe frequência muito maior de uma única espécie, no caso de o pesquisador ter conhecimento prévio da espécie que atua na área ou, a partir da geração F₂, quando já há conhecimento sobre a espécie que está sendo criada.

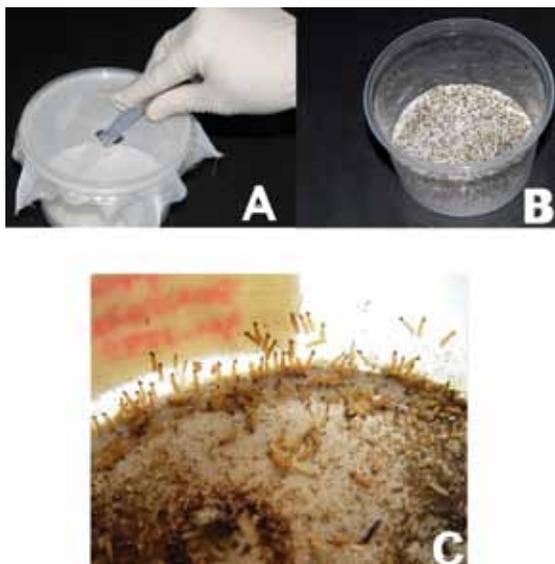


Figura 42. Criação de flebotomíneos: A) Criação em massa de flebotomíneos em cristalizadores; B) Pote plástico; C) Pupas de flebotomíneos.

Fotos: Sandra Oliveira e Nataly de Souza (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses; Laboratório de Produção e Tratamento de Imagem/IOC–Fiocruz).

● Técnicas para evolução das larvas

Para a evolução das larvas de 1^o a 4^o estádios, alguns investigadores utilizam placas de Petri forradas com papel-filtro, tubos forrados com gesso, que serve como substrato para as larvas, blocos de gesso ou papel-filtro com ovos, transportados para vasos de barro porosos revestidos ou não de gesso (fig. 43A). Outros autores transportam o papel-filtro com os ovos para um prato de barro, sobre uma placa de Petri com água. Outros, ainda, utilizam como substrato placas de Petri forradas com gesso ou tubos contendo

no fundo algodão umedecido, coberto com papel-filtro (fig. 43B), onde as fêmeas fazem posturas.

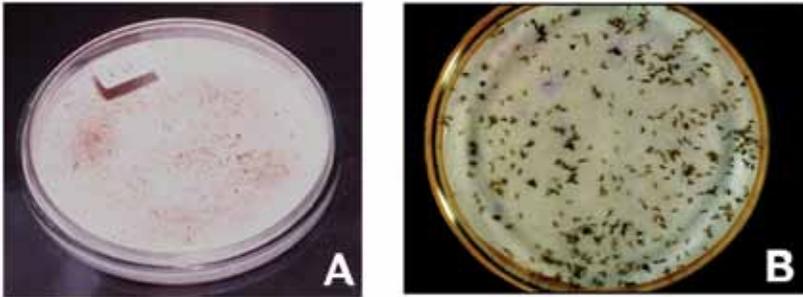


Figura 43. Substratos utilizados para desenvolvimento das larvas de flebotomíneos: A) Substrato de gesso; B) Substrato de papel-filtro.

Fotos: Nataly de Souza (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses/IOC–Fiocruz).

● Alimentação das larvas

Vários estudos foram realizados por diferentes autores a fim de verificar o meio de cultura mais adequado para ser utilizado como substrato na alimentação das larvas: terra colhida sob árvores, com folhas apodrecidas e limo de barreira, triturada, tamisada e aquecida a 65°C durante 48 horas; terra de curral de jumentos com esterco e tratada como descrito anteriormente; terra e vegetais em decomposição; terra com esterco de boi; e limo raspado de troncos de árvores. Eles concluíram que as terras ricas em matéria vegetal decomposta ou as que continham fezes secas de bovino eram as mais indicadas para a alimentação das larvas. Para as larvas de *Phlebotomus argentipes*, os investigadores verificaram que uma ração à base de pó de fígado era melhor do que a alimentação com fezes de coelho e terra. Podemos citar ainda outros alimentos, como alface cozida e dáfnia seca triturada (ração à base de crustáceos dessecados para peixes ornamentais). Mais recentemente, autores vêm introduzindo aminoácidos na ração das larvas, com bons resultados. Atualmente, os mesmos autores, vêm oferecendo uma mistura à base de ração de

coelho, húmus de minhoca, farinha de osso e pó de fígado (alimento rico em aminoácidos), com excelentes resultados.

- **Emergência dos adultos e seu condicionamento em laboratório**

Os flebotomíneos nascidos em laboratório têm sido mantidos em diferentes ambientes: frascos, caixotes de madeira e gaiolas de etamine, náilon, musseline ou gaze.

Em geral, a alimentação dos adultos é feita seguindo um padrão de três dias de repasto rico em carboidratos e no quarto dia é oferecido um hamster anestesiado como fonte de alimentação sanguínea. A partir desse momento, as fêmeas seguem uma das duas técnicas de criação descritas anteriormente: individual ou em massa.



Figura 44. Hamster oferecido como fonte de alimentação em gaiola de criação de flebotomíneos.

Foto: Nataly de Souza (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses/IOC–Fiocruz).

● Técnicas para obtenção de posturas de culicídeos

Como descrito para os flebotomíneos, as fêmeas adultas de culicídeos criadas em um insetário podem ser separadas individualmente, em frascos cilíndricos, contendo no fundo algodão umedecido recoberto por papel-filtro, para que desovem, ou podem ser mantidas em gaiolas apropriadas. O meio oferecido deve simular as condições do criadouro da espécie na natureza, pois algumas espécies colocam seus ovos diretamente na água, outras, em superfícies úmidas. Os ovos devem ser transferidos posteriormente para bandejas de criação, onde serão criadas as larvas recém-eclodidas. O método utilizado para a oviposição vai depender da espécie em questão e do tipo de estudo que se deseja realizar. No entanto, deve haver uma gaiola para cada espécie.

● Manutenção das larvas de culicídeos

Após a desova, os ovos são semeados em recipientes apropriados. Bandejas retangulares de 30 cm x 40 cm, de material plástico, vidro ou esmaltadas, com pouca profundidade, são ideais para a criação em massa, devendo ter fundo claro para melhor visualização e manejo dos espécimes. Para a evolução das larvas de 1° a 4° estágios, os tubos individuais com posturas, contendo tira de papel, algodão ou papel-filtro umedecidos, são colocados em bacias com água ambientada. Um número máximo de cem larvas deve ser colocado em cada bandeja, para evitar competição e prejuízo do desenvolvimento. Algumas espécies requerem recipientes menores. Para a alimentação das larvas, utiliza-se ração para peixes TetraMin, que essa ração pode ser oferecida de várias maneiras, dependendo da espécie de mosquito. Para larvas que se alimentam na superfície da água, como as da subfamília Anophelinae, a ração é triturada, peneirada e pulverizada seca sobre a superfície da água, ao passo que para as larvas da subfamília Culicinae, que se alimentam de detritos no fundo da bandeja, essa ração deve ser molhada, ainda em forma de flocos, e mergulhada no fundo do recipiente. A superfície e o fundo das bandejas devem ser limpos diariamente, com o auxílio de papel-toalha aderido à superfície, e de

uma pipeta, usada para recolher o excesso de alimento do fundo. A comida é oferecida às larvas sempre que necessário. As pupas não se alimentam. As pupas devem ser retiradas todos os dias manualmente, com pipetas ou pequenas peneiras, dos recipientes e colocadas em gaiolas previamente identificadas, onde serão mantidas até emergirem como adultos.

● **Manutenção e alimentação dos adultos de culicídeos**

As colônias de culicídeos são mantidas em gaiolas cúbicas de armação de ferro ou alumínio com paredes de náilon ou tela metálica de malha fina. Algumas gaiolas também podem ser confeccionadas em papel ou acrílico, com dimensões variáveis. O fundo dessas gaiolas deve ser forrado com papel-filtro trocado regularmente para retirar os espécimes mortos e evitar que a colônia seja contaminada por fungos.



Figura 45. Gaiolas para criação e manutenção de culicídeos.

Foto: Acervo do Laboratório de Transmissores de Hematozoários/IOC–Fiocruz.

Os adultos machos e fêmeas são alimentados com uma solução açucarada a 10%, colocada em frascos dentro da gaiola. Outras fontes alimentares podem ser glicose, frutose, sacarose, passas e frutas. A alimentação sanguínea é oferecida de acordo com a preferência da espécie e com o horário de hematofagia. No Insetário de Culicidae do Laboratório de Transmissores

de Hematozoários, do IOC/Fiocruz, utiliza-se atualmente um alimentador artificial acoplado a um frasco contendo sangue de carneiro desfibrinado, fornecido regularmente pelo próprio biotério da instituição.

- **Cuidados gerais com as colônias de diferentes insetos**

Seja qual for o tipo de inseto e de insetário, o manuseio dos espécimes deve ser feito criteriosamente a fim de evitar a mistura de espécies, garantindo a confiabilidade do material. Por isso, todo e qualquer manuseio dos espécimes deve ser feito separadamente, dentro de uma bandeja, para garantir a segurança. Gaiolas com identificação duvidosa devem ser descartadas.



Figura 46. Bandejas para manuseio de colônias.

Foto: Luzia Caputo (Laboratório de Patologia, setor de Histotecnologia/IOC–Fiocruz).

Os frascos de vidro onde são colocadas as fêmeas para oviposição e também as gaiolas devem ser identificados por uma etiqueta com número, nome da espécie, data da coleta e procedência. Se for o caso, identificar o tipo de experimento que está sendo realizado e o nome do responsável. Paralelamente, deve ser preenchida uma ficha com todas essas informações, acrescida do número de insetos que deram início à colônia.

As colônias de triatomíneos são mantidas em frascos de vidros de cerca de 10 a 15 cm de diâmetro, com um pedaço de papel-filtro forrando o fundo e outro pedaço, dobrado em forma de sanfona, disposto internamente. O papel-filtro tem como objetivo retirar a umidade em excesso oriunda das fezes e urina e aumentar a superfície de contato para o deslocamento. A parte superior é fechada com tela de náilon, presa por mais de um elástico e amarrada com barbante.

Os adultos das colônias podem ser alimentados semanalmente, de 15 em 15 dias ou mensalmente, dependendo do interesse de incrementar a prole e o crescimento da colônia. Quanto maior o número de repastos sanguíneos, tanto mais rápido e abundante será o desenvolvimento das colônias.

A limpeza das colônias de triatomíneos deve ser feita em intervalos de três meses aproximadamente. As colônias necessitam ter um número significativo de espécimes para garantir a transmissão de bactérias *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* e *Escherichia* e de fungos actinomicetos entre os espécimes. Essas bactérias, muito importantes para o desenvolvimento desses insetos, são transmitidas por meio do coprofagismo ou do canibalismo.

4.4.3 Técnicas de dissecação de insetos

As técnicas de dissecação são usadas para verificação de infecção natural e experimental, para experimentos de fisiologia experimental e, ainda, para identificação do táxon. As modernas técnicas bioquímicas e moleculares são ferramentas que possibilitam identificar a presença e a identidade de parasitos. No entanto, a dissecação permite estudar a localização do parasito em seu micro-habitat, facultando a prevenção de interações.

Nesta seção, veremos, como exemplo, as técnicas de dissecação de culicídeos e dos triatomíneos.

- Técnicas de dissecação de mosquitos

O trabalho pioneiro de Patrick Manson em 1878 é um exemplo da importância da técnica de dissecação. Após dissecar e examinar uma série de mosquitos, Manson comprovou o mecanismo de infecção de culicídeos por microfilárias que invadem a circulação periférica de humanos infectados. George Low, poucos anos mais tarde, confirmou o trabalho de Manson, ao descrever o encontro da microfilária de *Wuchereria bancrofti* na probóscide de mosquitos do gênero *Culex*. Em 1897, Ronald Ross identificou o *Plasmodium* parasito da malária, e mosquitos do gênero *Anopheles*, esclarecendo o mecanismo de transmissão (Jay, 2000).

As técnicas de dissecação podem ser aplicadas a mosquitos adultos visando a extração do tubo digestivo, isolamento das glândulas salivares, exame de ovários e ovariolos, ou mesmo ser aplicadas a formas imaturas de mosquitos. As técnicas de dissecação são úteis na incriminação de vetores. As técnicas têm como objetivo a procura de infecções naturais, sua prevalência, distribuição e flutuações, estudos de paridade das fêmeas, cálculo dos índices de infecção das populações de mosquitos, determinação do grau ou intensidade de parasitismo por espécime por região do trato digestivo e avaliação do número de ciclos reprodutivos das fêmeas.

Parâmetros ecológicos, como sazonalidade, índice pluviométrico e temperatura, são importantes na avaliação da prevalência do parasitismo. O laboratório onde as dissecações são efetuadas deve garantir condições suficientes de assepsia e de biossegurança para a realização do exame dos mosquitos e do isolamento parasitário, se for o caso. Os mosquitos podem ser transportados para o laboratório secos ou fixados em etanol a 70%, para extração de DNA, ou mesmo vivos, quando se almeja o exame a fresco.

Para a dissecação, devem aspirar-se, com o auxílio de um capturador de Castro, grupos de 10 a 20 exemplares vivos e submetê-los a -4°C por 10 minutos ou a -18°C por 3 minutos, tempo suficiente para que os espécimes fiquem adormecidos e viáveis à manipulação. O tempo de resfriamento deve

ser suficiente para permitir a evidenciação dos parasitos móveis e a sobrevivência dos parasitos em meio de cultura e para evitar o fácil arrebentamento do tubo digestivo, o congelamento e/ou hidratação do material e as possíveis alterações teciduais que prejudicariam os estudos de cunho histológico ou ultraestrutural. Deve-se evitar como método para matar os mosquitos a exposição aos vapores de éter ou de acetato de etila, por causa dos riscos ao trabalhador. Em seguida, deve-se transferir uma das fêmeas anestesiadas para uma lâmina devidamente limpa, na qual se colocou uma gotícula de solução salina a 0,9%. As restantes devem ser levadas no capturador para um refrigerador, com temperatura em torno de 8°C de preferência, ou ser mantidas numa caixa de isopor contendo gelo em escamas, desde que a temperatura seja de 16°C.

Asas e pernas devem ser removidas imediatamente, sob a lupa e com auxílio de pinças ou estiletos, a fim de se diminuir a quantidade de fontes de cerdas ou contaminantes. Deve-se proceder essa etapa rapidamente para evitar que a fêmea se restabeleça e escape. Se houver alguma demora ou constando-se a movimentação da fêmea, capturá-la com o aspirador de Castro e retorná-la ao freezer.

Para facilitar a evisceração, fazer um pequeno corte no tegumento do 7º segmento. Com uma das mãos, pinçar com cuidado o tórax; com a outra mão, destacar a extremidade do abdome e extrair o tubo digestivo, de modo que se visualize da porção retal até a cardíaca. Conservar a carcaça do inseto para os casos em que se necessite realizar a identificação taxonômica. Cobrir o material obtido com um fragmento de lamínula, acrescentando solução salina. Examinar o material ao microscópio.

Para a dissecação das glândulas salivares, deve-se firmar o tórax com a pinça ou estilete e puxar cuidadosamente a cabeça, até as glândulas salivares serem extraídas.

Para a dissecação dos ovários, o procedimento é semelhante à dissecação do tubo digestivo, exceto pelo fato de que não se deve fazer o corte no 7º segmento. Após a extração dos ovários, pode-se lavar o material em água destilada, gentilmente, para evitar a cristalização posterior do NaCl, quando

se guarde a lâmina. Para que as terminações das traquéolas sejam bem visualizadas, deixar os ovários secarem em temperatura ambiente – o que os fará inflar. Examinar ao microscópio. Nas fêmeas nulíparas, as extremidades das traquéolas se apresentam enoveladas. Nas fêmeas que já realizaram mais de uma postura, as traquéolas se mostram distendidas.

Para a dissecação de ovariolos, trabalhar com pinças ou estiletos finos, removendo a membrana que envolve o ovário, para que os ovariolos sejam separados. Segurando o ovário pelo oviduto interno, tracionar cuidadosamente um ovariolo com a outra mão, para que o pedículo seja esticado. Contar o número de dilatações encontradas. Examinar o maior número de ovariolos. O número de dilatações nos pedículos corresponde ao número de ovos produzido por cada ovariolo. A idade fisiológica da fêmea corresponde ao ovariolo com o maior número de dilatações. É preciso não confundir as porções do cálice ovarioles, que podem se desprender do oviduto, com os resquícios do cálice ou com dilatações verdadeiras.

Para a dissecação de larvas e pupas, transferir, com o auxílio de uma pipeta, as larvas individualmente do recipiente de manutenção para uma lâmina de vidro contendo pequena gota de solução salina. Subtrair o máximo possível do líquido para evitar a movimentação da larva e, assim, facilitar o exame dos caracteres morfológicos para confirmação da identidade taxonômica do espécime ao estereomicroscópio. Após a identificação, pinçar com uma mão a região torácica, sem exercer pressão demasiada, e com a outra mão destacar os três últimos segmentos abdominais, ao mesmo tempo em que o trato digestivo é extraído com movimentos firmes, tomando cuidado para que não se rompa. Como resultado de uma boa técnica de dissecação, o tubo digestivo se mostrará distendido e permitirá facilmente a distinção visual de suas partes, do intestino médio torácico até a ampola retal, incluindo os túbulos de Malpighi. Cobrir o material com lamínula e realizar o exame ao microscópio. O exame pode ser a fresco ou após a coloração.

- **Cálculo do índice de infecção**

Inicialmente, são consideradas positivas ou infectadas as fêmeas nas quais não foram evidenciados resíduos de alimento sanguíneo. Logo, o cálculo é feito dividindo-se o número de fêmeas positivas pelo total de exemplares dissecados e efetivamente examinados. Ou seja, descartar da contagem o material que não foi plenamente examinado devido aos erros no processo de dissecação. O cálculo pode ser feito por espécie, pelo total de exemplares examinados, por área de coleta, pelo tipo de técnica usada, entre outros. Futuras coletas devem ser concentradas na área onde foram encontrados os espécimes positivos.

- Material necessário
 - a) Pipeta sorológica;
 - b) Caixa de isopor pequena;
 - c) Cesto de descarte com saco plástico branco;
 - d) Dois capturadores de Castro;
 - e) Estereomicroscópio;
 - f) Estiletes ou pinças de dissecação N4 ou N5;
 - g) Etanol a 70%;
 - h) Gelo em escama;
 - i) Jaleco descartável;
 - j) Lâminas e lamínulas limpas e estéreis;
 - k) Lenço de papel;
 - l) Luvas descartáveis;
 - m) Microscópio de contraste de fase;
 - n) Óculos de proteção;
 - o) Papel absorvente para bancada;

- p) Pinças para as lamínulas;
- q) Recipiente com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% para descarte do material;
- r) Seringas de insulina;
- s) Solução salina a 0,9% ou solução salina tamponada.

• Técnicas de dissecação de triatomíneos

Para a dissecação do trato intestinal, retiram-se as asas e, com o auxílio de uma tesoura, cortam-se as laterais do abdome na altura do conexivo, no sentido póstero-anterior e, por último, transversalmente, para a remoção da região dorsal. Deve-se tomar cuidado nessa etapa, principalmente se o inseto estiver ingurgitado, para não romper o tubo digestivo. Macerar bem o material e observar entre lâmina e lamínula ao microscópio. Materiais da glândula salivar e dos intestinos anterior, médio e posterior devem ser identificados em separado, para verificação exata do local em que se desenvolvem os patógenos.

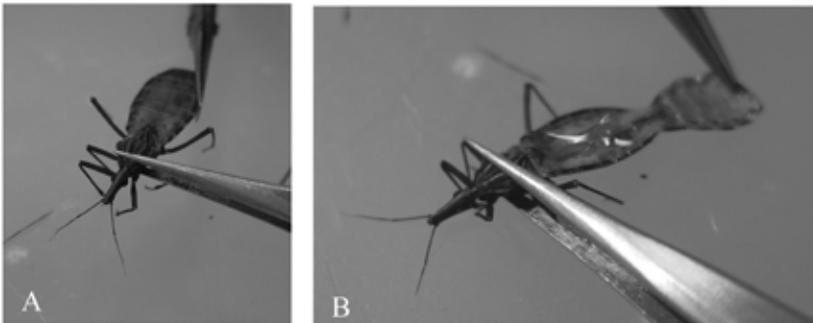


Figura 47. Técnica de dissecação para a retirada dos tergitos abdominais:
A) Corte lateral nos conexivos de ambos os lados; B) Visualização das estruturas internas e da hemolinfa (material brilhante).

Foto: Catarina Macedo (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense/IOC–Fiocruz).

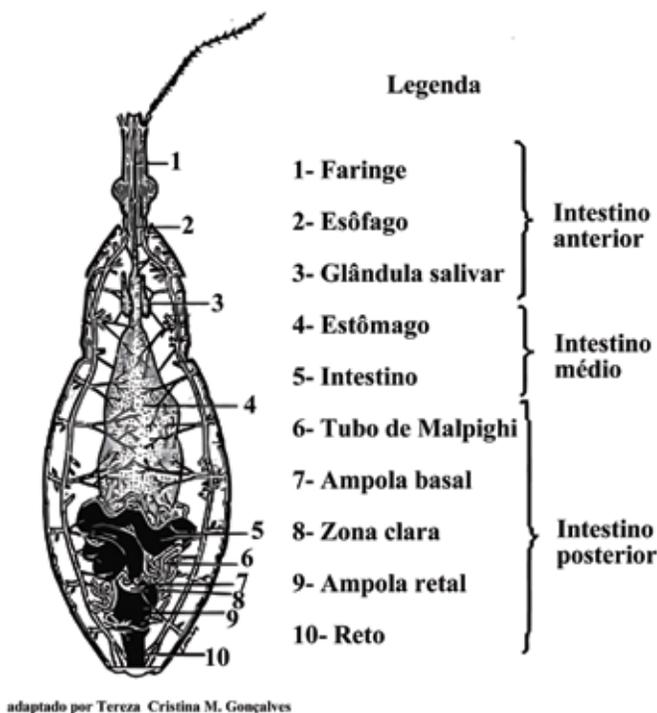


Figura 48. Sistema digestivo e respiratório de triatomíneo.

Ilustração: Adaptada de Ramirez-Perez (1985) por Tereza Cristina M. Gonçalves (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses/IOC–Fiocruz).

As glândulas salivares são muito diversificadas quanto ao número, tamanho, forma e localização nos diferentes triatomíneos. Em geral, localizam-se na cavidade torácica, junto da parte inicial do tubo digestivo, onde encontram espaço suficiente para o seu desenvolvimento. O deslocamento para a região abdominal resulta dos eventuais movimentos peristálticos dos órgãos vizinhos. As glândulas salivares são em número de três pares, utilizando-se a nomenclatura D1, D2 e D3 para cada um deles. O par D1 corresponde às glândulas principais, o D2, às glândulas suplementares e o par D3, às glândulas acessórias. Em todas as espécies de triatomíneos estudadas, sempre encontramos esses três pares de glândulas salivares que, na maioria

das vezes, são de aspecto translúcido ou levemente amarelado, como ocorre em *Panstrongylus megistus*. Entretanto, no gênero *Rhodnius*, que apresenta as glândulas D1 e D2, as glândulas salivares são alongadas e de cor avermelhada, por causa da presença de uma substância denominada nitroforina.

As formas infectantes de *Trypanosoma rangeli* podem ser encontradas em glândulas salivares de triatomíneos do gênero *Rhodnius*. As formas infectantes *Trypanosoma rangeli* são introduzidas no hospedeiro vertebrado durante a salivação, no início do repasto sanguíneo.

Para a taxonomia das espécies, os testículos dos triatomíneos são uma das estruturas da genitália interna dos machos que têm sido alvo de estudos com fins taxonômicos. Cada testículo é formado por sete folículos testiculares entrelaçados, envolvidos por uma membrana. Esses folículos apresentam diferente comprimento, que varia individualmente e de acordo com a idade. Existem ainda diferenças entre os folículos de um só testículo. Estudos com abordagem morfológica e morfométrica dessas estruturas demonstraram a possibilidade de sua utilização na diferenciação dos principais gêneros, *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, que participam na transmissão da doença de Chagas, bem como no estudo de complexos de espécies crípticas.

4.4.4 Diferentes técnicas de criação de moscas em laboratório

Os adultos de moscas coletados serão alocados em gaiolas de madeira de 30 cm x 30 cm x 30 cm, com laterais revestidas por tela de náilon, apresentando uma abertura frontal de 9 cm de diâmetro, com uma manga de tecido preto para facilitar o manuseio dos insetos. A dieta dos adultos deverá ser à base de proteína animal, que pode ser carne bovina, equina ou suína ou fígado, ainda, em decomposição. Para a alimentação dos adultos, deverá ser oferecida, sem interrupção, sacarose granulada ou solução de mel a 50% em placa de Petri de 45 mm x 12 mm; utilizar pedaços de tela de náilon na placa

de Petri para servir de substrato para o pouso; quando se utiliza sacarose, é obrigatório o fornecimento de água embebida em gaze de algodão (fig. 49).



Figuras 49. A) Gaiola para criação dos adultos de dípteros muscoides; B) Recipiente contendo substrato para oviposição e criação das larvas; C) Recipientes contendo dieta larval e vermiculita para pupação; D) Recipientes cobertos com tecido de náilon presos por elástico.

Fotos: Margareth Queiroz (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense/IOC–Fiocruz).

Como substrato para a oviposição, recomenda-se a utilização de carne bovina, equina ou suína ou fígado em decomposição. As massas de ovos, cerca de 30 mg por recipiente, são transferidas para uma dieta de carne ou fígado em início de decomposição, geralmente com uma semana de refrigerador a 12°C. Essa dieta deve ser colocada em recipientes de plástico com capacidade para 500 mL e introduzida dentro de outro recipiente, com capacidade para 1.000 mL, contendo vermiculita ou solo inerte, para maximizar a pupação. Esse último recipiente deve ser tampado com tecido de náilon de malha fina – por exemplo, escaline –, preso nas bordas com elástico. Os sarcófagídeos larvipositam no mesmo substrato citado acima e para cada larva são recomendadas 2 g de dieta/larva.

Após as larvas maduras abandonarem espontaneamente a dieta e passarem para o recipiente contendo vermiculita, devem ser coletadas, pesadas em lotes de 10 espécimes – um parâmetro utilizado como referência de controle da colônia –, e colocadas em tubo de ensaio contendo vermiculita, tampado com algodão hidrófobo, aguardando-se a emergência dos adultos.

* * *

O método acima é o mais simples para a criação desses insetos. No entanto, é um método que necessita de um local especial, pois o cheiro desagradável liberado principalmente pela ação das larvas no meio natural de criação importuna trabalhadores e visitantes, contaminando também o seu entorno, além de estarem presentes microrganismos que podem ser patogênicos para o homem. Para minimizar esse transtorno, há diversos estudos ainda incipientes sobre outros tipos de dietas artificiais.

Após a emergência dos adultos colonizados em laboratório, eles devem ser separados um a um, alocando-se um macho e uma fêmea em gaiolas de madeira, para acasalamento. A dieta dos adultos deve ser à base de proteína animal, que pode ser carne em decomposição oferecida até o 4º dia pós-emergência, a fim de estimular a oogênese. O fornecimento de carne deverá ser suspenso no 4º dia e reintroduzido no 11º dia pós-emergência, com o objetivo de padronizar o início da fase de oviposição. Sacarose granulada ou solução de mel a 50% devem ser oferecidas sem interrupção, como alimentação para os adultos, em placa de Petri 45 mm x 12 mm. Na placa de Petri, usam-se pedaços de tela de náilon para servir como substrato de pouso. Quando se utiliza sacarose, é importante que se forneça água embebida em gaze de algodão.

5. Coleções entomológicas

Denominamos coleção entomológica aquela formada por insetos e partes estruturais de insetos catalogados, ordenados, preservados e armazenados de maneira adequada, com o intuito de servir como fonte de consulta para dife-

rentes estudos – principalmente relativos à taxonomia dos grupos –, podendo ter ainda um caráter decorativo em exposições e museus.

As coleções entomológicas proveem rico material de estudo. A visão atual sobre as coleções entomológicas tem mudado muito, passando da ideia estática de espécimes guardados em gavetas, alheios à dinâmica da vida, para uma visão mais abrangente, onde são aplicadas novas tecnologias e abordagens próprias para o conhecimento da biodiversidade.

Finalidades do acervo de uma coleção entomológica

- Preservação e guarda do material biológico representativo da biodiversidade; registro do contexto histórico e cultural relacionado a esse material. Os diversos grupos biológicos, criteriosamente representados, identificados e catalogados, serão de suma importância para o conhecimento das espécies e suas relações com o ambiente em que vivem.
- Preservação e guarda de material biológico testemunho, ou seja, de coleções organizadas por especialista, durante expedições científicas e utilizadas para desenvolver projetos de pesquisa, artigos, teses e monografias.
- Preservação e guarda, como fiel depositária, de material-tipo, como parátipos, halótipos, sítipos, lectótipos e neótipos, depositados pelos autores das espécies.
- Treinamento de pessoal qualificado nas áreas de curadoria, técnicas de montagem, preservação e catalogação e manejo de banco de dados informatizados em coleções entomológicas.
- Divulgação científica do acervo e dos trabalhos desenvolvidos dentro da coleção entomológica, seja por meio de publicações em revistas científicas, simpósios e congressos destinados ao público especializado, seja mediante mostras científicas e exposições, destinadas a alunos, pesquisadores e ao público leigo.

COLEÇÕES ENTOMOLÓGICAS VIRTUAIS QUE VALE A PENA VISITAR

Fundação Oswaldo Cruz
 Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz
<http://www.ioc.fiocruz.br/ce/index.htm>

Museu de História Natural de Washington (National Museum of Natural History)

Ver os links para as coleções entomológicas em: <http://entomology.si.edu>

Museu de História Natural de Londres (Natural History Museum)

<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/collections/departmental-collections/entomology-collections/index.html>

5.1 Técnicas de conservação e montagem de culicídeos

A montagem dos insetos tem sua importância, pois, ao serem incorporados a uma coleção, passam a fazer parte de um acervo e estarão disponíveis para estudos da área. Por isso, foi estabelecida uma padronização na montagem, que varia para as diferentes ordens de inseto. Uma vez que existe a simetria bilateral, isto é, o lado direito é semelhante ao lado esquerdo, é importante que um dos lados seja preservado, para que todas as estruturas possam ser observadas.

- **Técnica de montagem de mosquitos adultos em alfinete entomológico**

Com a finalidade de conservação dos espécimes para coleção entomológica e estudos taxonômicos, utiliza-se a técnica de montagem de mosquitos adultos em alfinete entomológico.

Material necessário:

- a) Microscópio estereoscópico ou lupa;
- b) Cortador de triângulos de papel;

- c) Placa de Petri;
- d) Alfinete entomológico;
- e) Pinças de ponta fina;
- f) Estiletes;
- g) Triângulos de papel;
- h) Etiquetas de papel para identificação;
- i) Suporte de madeira ou cortiça para montagem, com altura padrão para o triângulo e as etiquetas;
- j) Esmalte cosmético incolor;
- k) Gavetas e armários entomológicos para armazenar os espécimes;
- l) Naftalina para conservação.

Obs.: Todo o material deve ficar guardado junto em uma caixa apropriada e que contenha uma etiqueta de identificação “Material para montagem de mosquitos adultos”, para facilitar a organização no momento da montagem.

Procedimento:

A montagem é feita com o auxílio de um triângulo de papel, produzido com um cortador de triângulos. A ponta livre do triângulo pode ou não ser dobrada para baixo, dependendo do tamanho do mosquito. O triângulo de papel é transpassado, próximo à sua base, por um alfinete entomológico, com o auxílio de um pódio-suporte feito de madeira, isopor, plástico ou cortiça, com diferentes alturas padronizadas. Cada altura corresponde a um procedimento: a parte mais alta do pódio destina-se ao triângulo de papel; a parte média do pódio, à primeira etiqueta; na parte baixa do pódio, coloca-se a segunda etiqueta.

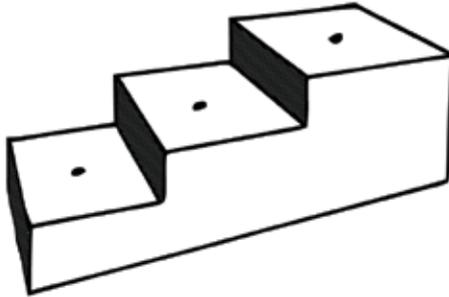


Figura 50. Dispositivo para padronização da altura de triângulos e etiquetas na montagem de mosquitos adultos.

Ilustração: Acervo do Laboratório de Transmissores de Hematozoários/IOC–Fiocruz.

Os mosquitos são colocados, com o auxílio de pinças de pontas finas, em uma placa de Petri e posicionados de lado, com as pernas voltadas para baixo ou para a base do triângulo (fig. 51). Essa etapa e a seguinte devem ser feitas sob a lupa, para que se possa observar bem a posição da ponta do triângulo na pleura mesotorácica do mosquito. Coloca-se uma pequena gota de esmalte cosmético incolor junto do ângulo livre do triângulo de papel e encosta-se cuidadosamente essa ponta na pleura mesotorácica do mosquito a ser montado, de forma que as pernas fiquem voltadas para baixo ou posicionadas em direção ao alfinete. Deve-se ter cuidado para não colocar esmalte em excesso, danificando partes importantes para a identificação do mosquito. Com o auxílio de um estilete fino, fazem-se as correções da posição do espécime sobre o triângulo, antes que o esmalte seque. Depois da secagem do esmalte e após a certificação de que o espécime está fixado firmemente, são colocadas as etiquetas de identificação.

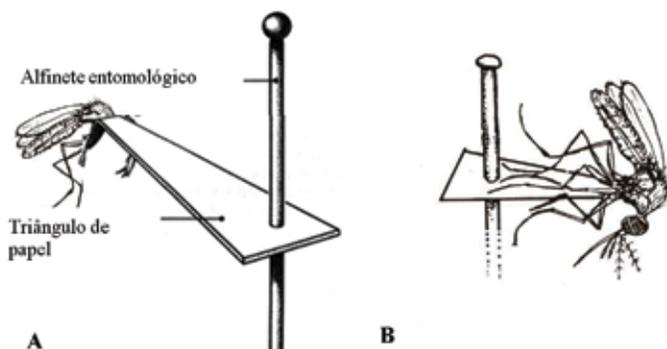


Figura 51. Posição do mosquito adulto sobre o triângulo.

Ilustração: Acervo do Laboratório de Transmissores de Hematozoários/IOC–Fiocruz.

As etiquetas servem para a identificação do espécime alfinetado, bem como para as informações sobre local de coleta e nome de quem classificou (fig. 52). A primeira etiqueta traz as informações do país, estado, município, local de coleta, data e nome do coletor. A segunda etiqueta tem o nome da espécie, do determinador e a data. Pode haver uma terceira etiqueta opcional, com informações sobre o substrato da coleta e outras informações consideradas importantes. Se o espécime fizer parte de uma coleção, deve ser atribuída a ele uma numeração de acesso. Na maioria das vezes, a segunda etiqueta não é colocada no momento da montagem, uma vez que geralmente a identificação é feita em momento distinto ao da montagem.

Os exemplares montados, devidamente identificados, devem ser guardados em caixas, gavetas ou armários entomológicos adequados, e mantidos em local seco e arejado (fig. 53). Para a manutenção do bom estado dos espécimes, pó de naftalina, que ajuda a impedir o ataque de pragas, deve ser colocado no fundo das caixas e/ou gavetas.

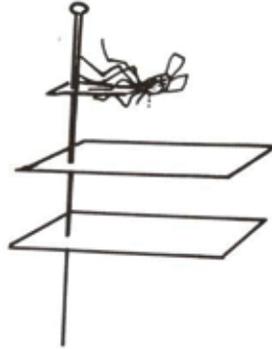


Figura 52. Adulto montado com as respectivas etiquetas de identificação.

Ilustração: Acervo do Laboratório de Transmissores de Hematozoários/IOC–Fiocruz.

Em caso de se tratar de material-tipo de espécies em descrição ou recentemente descritas, uma rodela ou pequeno retângulo de papel colorido deve ser transpassado pelo alfinete entomológico, entre o inseto e a etiqueta mais alta, de forma a facilitar a distinção dos espécimes mais importantes em meio à coleção.

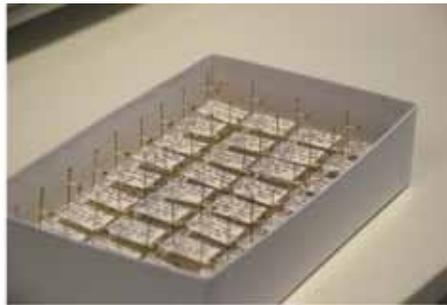


Figura 53. Mosquitos montados em alfinetes entomológicos e etiquetados.

Fotos: Acervo do Laboratório de Transmissores de Hematozoários/IOC–Fiocruz

- Técnica de montagem de formas imaturas e exúvias de culicídeos

Com a finalidade de conservação dos espécimes para coleção entomológica e estudos taxonômicos, utiliza-se a técnica de montagem de formas imaturas e exúvias larval e pupal de mosquitos entre lâmina e lamínula.

Material necessário:

- a) Microscópio estereoscópico ou lupa;
- b) Lâmina e lamínula;
- c) Álcool absoluto;
- d) Esmalte cosmético incolor;
- e) Cola plástica;
- f) Eugenol ou cellosolve;
- g) Pincéis finos;
- h) Estiletes;
- i) Etiquetas de papel para identificação;
- j) Gavetas e armários entomológicos para armazenar os espécimes.

Procedimento:

Na montagem de formas imaturas e exúvias de culicídeos, devem ser usadas larvas de 4º estágio na montagem, pois nelas a posição e a forma das cerdas estão definidas, e a quetotaxia – estudo de vários aspectos dessas cerdas, como tamanho, posição, forma e ramificações – é utilizada para a identificação das espécies. As larvas devem ser mortas por imersão em água quente com temperatura em torno de 60°C, e, logo após, transferidas para um recipiente contendo hidróxido de potássio (KOH) a 10%, por aproximadamente 12 a 24 horas, para clarificação e remoção da gordura. Esse tempo deve ser calculado pela maior ou menor quitinização da peça: quanto mais quitinizada, maior deve ser o tempo. As larvas devem ser mergulhadas em água destilada por 15 minutos, para que fiquem livres do hidróxido de potássio, antes da próxima etapa.

O próximo passo é a desidratação. As larvas devem ser transferidas para recipientes contendo álcool em diferentes concentrações, de 70%, 80%, 90% e absoluto, permanecendo em cada um deles por 10 minutos. As exúvias larvais e pupais devem ser processadas a partir dessa etapa. Nessa etapa, as larvas devem ser mergulhadas em um líquido, que pode ser o eugenol ou o cellosolve, para diafanização e nele permanecer por poucos minutos (5 a 10

minutos). Finalmente as larvas podem ser montadas entre lâmina e lamínula com bálsamo do Canadá, caso na fase anterior tenha sido usado o eugenol, ou com euparal, caso tenha sido usado o cellosolve.

As lâminas assim preparadas podem ficar arrumadas em bandejas de madeira, na temperatura ambiente, até que sequem completamente. Preferencialmente, também podem ser colocadas dentro de uma estufa com temperatura entre 40 e 45°C, para que sequem mais rápido e sejam eliminadas pequenas bolhas de ar que se formam durante a montagem. Após a secagem completa das lâminas, as bordas da lamínula devem ser seladas com esmalte cosmético incolor.

Em uma das extremidades da lâmina deve ser colada, com cola plástica, a etiqueta de identificação da coleta – com informações como coletor, local e data – e, na outra extremidade, a etiqueta de identificação do espécime – com informações como nome científico, nome do identificador e data.

Em cada etapa, a transferência das larvas e/ou exúvias deve ser feita com um pincel fino, para evitar a danificação de estruturas ou perda de cerdas. Outra opção seria deixar as larvas em um mesmo recipiente, sem transferi-las, e trocar as soluções com o auxílio de uma pipeta de ponta muito fina. Nesse caso, deve-se assegurar que todo o líquido seja retirado completamente antes que a solução da próxima etapa seja adicionada. Misturas de soluções podem danificar o processo.

- Técnicas de montagem e conservação de triatomíneos, flebotomíneos, ceratopogonídeos e simuliídeos

○ triatomíneo adulto ou ninfa deve ser alfinetado, de preferência, no lado direito do pronoto, nunca no meio do pronoto, para que um dos lados tenha a morfologia preservada, deixando na parte superior do alfinete espaço suficiente para segurar com a ponta dos dedos. ○ inseto deve ficar perpendicular ao alfinete, para ser observado ao microscópio estereoscópio.

Os flebotomíneos, ceratopogonídeos e simuliídeos são geralmente montados entre lâmina e lamínula ou imersos em solução alcoólica em vidros transparentes, devido ao seu pequeno tamanho. Algumas vezes, no entanto, é possível a montagem cuidadosa em alfinete entomológico.

Existem várias técnicas de montagem que, de modo geral, seguem os procedimentos usados para culicídeos imaturos. Os procedimentos de etiquetagem também são os mesmos usados para os culicídeos.

- Técnicas de conservação e montagens de moscas

Geralmente, o material entomológico é preservado a seco ou em meio líquido, embora possam ser preservadas partes de um exemplar de forma diferente – por exemplo, a genitália de Sarcophagidae, que pode ser montada e preservada montada em lâmina, assim como diversas espécies de larvas de muscoides.

A maioria das moscas é preservada a seco; dependendo de seu tamanho, da resistência do corpo e dos apêndices, as moscas são espetadas em alfinetes entomológicos, colados a triângulos de cartolina ou inseridos em envelopes ou invólucros de papel transparente. Esse material deve passar antes por uma secagem, usualmente em placa de Petri, sob luz quente.

Alguns muscoides frágeis ou com apêndices quebradiços são preservados em meio líquido, em geral álcool etílico 70%. Há casos especiais de preservação em líquido usando-se álcool 80%, álcool glicerinado ou outras combinações.

As etiquetas de procedência reproduzem os dados dos rótulos de campo e são afixadas individualmente no material a seco ou em lotes do material em meio líquido – nesse caso, utiliza-se papel vegetal escrito a nanquim ou a lápis. Em insetos secos, etiquetas, com dimensão e impressão uniformizadas, são usadas para economizar espaço. A etiqueta deve conter o local de procedência, data da coleta e nome do coletor; além de outros dados importantes para o estudo, como substrato da coleta, hora da coleta, entre outros.

Para as formas adultas, a alfinetagem deve levar em conta o grupo de insetos. Para cada grupo, há uma posição correta de alfinetagem que não danifica ou atrapalha o exame das partes importantes na identificação. Os insetos devem ser montados a uma altura uniforme do alfinete e, para isso, blocos de alfinetagem são utilizados. Durante a secagem, devem ser corrigidas as posições das asas, pernas e antenas, dependendo do caso. Insetos pequenos são colados na ponta de triângulos de cartolina, e esses são alfinetados pela base.

Alguns insetos pequenos não podem ser alfinetados ou colados, especialmente aqueles de corpo mole, exigindo montagem em lâminas para colecionamento e preservação. O procedimento de montagem de insetos em lâminas de vidro para microscopia varia de acordo com o inseto e o meio de montagem. Os ovos e as larvas são conservados e montados em via úmida ou em lâminas.

As moscas costumam depositar cerca de 300 ovos a cada postura, de acordo com a espécie. Essa postura, que pode se repetir de 3 a 4 vezes durante toda a vida do inseto, costuma ser feita sob a forma de aglomerado ou em massa, uma estratégia das fêmeas para garantir a maior sobrevivência da prole. A família Sarcophagidae, no entanto, deposita diretamente larvas de primeiro ínstar sobre o cadáver ou sobre o substrato de alimentação das larvas, sendo esse outro tipo de estratégia utilizada pelos insetos na competição por alimento.

Os ovos são estruturas alongadas de cor branca, com a superfície côncava, localizadas dorsalmente em relação ao corpo da fêmea. São revestidos pelo córion, que têm como função principal proteger o embrião da dessecação. Na parte dorsal do ovo, pode ser observada uma região diferenciada, denominada área mediana, responsável principalmente pelas trocas gasosas do embrião com o meio, servindo e que serve também como ponto de fissura para a eclosão da larva.

As larvas de dípteros muscoides apresentam formato vermiforme, são ápodas e possuem cabeça vestigial, chamada acéfala, formando um pseudoencéfalo. A porção anterior é afilada; a posterior termina de forma abrupta. Dessa forma, as larvas estão adaptadas para se enterrarem, tanto nos tecidos quanto no solo, e dar início à fase de pupa. O corpo é dividido em 12 segmentos

e revestido por uma cutícula torácica coberta por espinhos ao longo de áreas ou faixas transversais.

A região anterior é constituída por peças fortemente esclerotizadas, denominadas escleritos, que formam o esqueleto céfalo-faríngeo, onde se localizam os ganchos bucais ou orais em forma de garra, com as extremidades agudas localizadas na face ventral do pseudoencéfalo. Os ganchos bucais se articulam com o esclerito hipostomal intermediário, que se une a um grande esclerito faringiano, constituído de duas lamelas laterais, chamadas cornos, unidas ventralmente. Na extremidade anterior do 1º segmento ou pseudocéfalo, há um par de antenas reduzidas, um par de pequenos palpos maxilares e um par de tubérculos óticos. No 2º segmento, as larvas de segundo e terceiro ínstar apresentam um par de espiráculos laterais semelhante a tubérculos, com projeções que terminam em aberturas espiraculares. No último segmento da larva, há um par de espiráculos posteriores de grande importância na identificação das espécies de dípteros muscoides, bem como dos ínstarres larvais; cada espiráculo é geralmente rodeado por um peritrema fortemente esclerotizado e pigmentado, que pode ser completo ou incompleto na parte ventral, formando uma pequena estrutura circular que recebe o nome de botão espiracular, e que é de extrema importância na identificação da espécie.



Figura 54. A) Larvas de muscoides no meio de criação; B) Espiráculos posteriores de larvas de moscas mostrando um par de aberturas espiraculares e peritrema, elementos importantes para a taxonomia.

Fotos: Margareth Queiroz (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense/IOC–Fiocruz).

As larvas passam por três ínstares e duas mudas, e crescem bastante, principalmente no segundo e terceiro ínstares. O tamanho está relacionado com a espécie, mas também sofre influência da alimentação, da temperatura e da umidade. As larvas se alimentam vorazmente em todos os ínstares, pois é nessa fase que precisam acumular energia suficiente para todas as transformações que ocorrem na fase de pupa; por isso, as larvas dos dípteros muscoides competem com as diversas espécies que colonizam cadáveres ou feridas dos animais em busca da maior quantidade de alimento.

As pupas podem ser alfinetadas ou conservadas em pequenos recipientes, sem serem alfinetadas, e preservadas a seco.

As pupas são formadas a partir do endurecimento do exoesqueleto do último ínstar larval; nessa fase, a larva sofre modificações para dar origem ao adulto. O pupário, ou seja, a casca da pupa que fica vazia com a emergência do adulto, é imóvel e tem forma ovoide ou de barril e coloração castanho, que vai escurecendo com o passar dos dias. Nele ainda podem ser observados caracteres da larva, como os resquícios dos espiráculos, além de estruturas específicas dessa fase. Devem ser procurados no solo. Ao serem coletados, sua cor deve ser anotada – visto que pupários recentes são claros, escurecendo gradualmente, até alcançar a cor marrom escura após 24 horas. Pupários vazios precisam ser coletados, pois indicam a emergência recente de adultos, podendo ser investigados nas roupas da vítima ou sob a mesma.



Figura 55. Larvas de *Hermetia illuscens* grandes e castanhas; larvas de *Ophyra* sp, pequenas e claras, pupas novas claras e pupas velhas.

Foto: Margareth Queiroz (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense/IOC–Fiocruz).

Referências bibliográficas

- BRITISH MUSEUM OF NATURAL HISTORY. *Chigoe flea*. Londres: British Museum of Natural History, 1909. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Tunga_penetrans. Acesso em: 30 jun. 2011.
- CUERDEN, Adam. *Cimex lectularius* 3.jpg. Edimburgo: University of Edinburgh, 2007. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cimex_lectularius_3.jpg. Acesso em: 30 jun. 2011.
- FORATTINI, O. P. *Entomologia médica*. São Paulo: Blücher, 1973. V. 4.
- GALATI, E. A. B. Morfologia e taxonomia. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. p. 23-52.
- HATLEN, H. *Dip-nem-simuliidae-sp.gif*. 2006. Disponível em: <http://no.wikipedia.org/wiki/Fil:Dip-nem-simuliidae-sp.gif>. Acesso em: 29 de jun. 2011.
- JAY, V. Sir Patrick Manson: Father of Tropical Medicine. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, v. 124, n. 11, p. 1.594-1.595, 2000.
- JAWORSKI, P. *Anatomic Diagram of an Insect*. 2008. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Insect_anatomy_diagram.svg. Acesso em: 29 jun. 2011.
- KOCH, H. G. Development of the Lone Star Tick *Amblyomma americanum* (Acar: Ixodidae), from Immatures of Different Engorgement Weights. *Journal of The Kansas Entomology Society*, v. 59, n. 2, p. 309-313, 1986.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; SILVA, T. F. *Culex Siphantulatus*, a New Species of Mosquito from the Coast of Rio de Janeiro State, Brazil (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 82, n. 1, p. 101-110, 1987.

MCALPINE, J. E. et al. *Manual of Nearctic Diptera*. Ottawa: Research Branch Agriculture, Canada, 1981.

OCCI, J. Relapsing Fever Tick, *Ornithodoros turicata*. s.l.: Bug Pics, [s.d.]. Disponível em: <http://www.insectimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=7180>. Acesso em: 30 jun. 2011.

PESSOA, S.; MARTINS, A. V. *Parasitologia médica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

RAFAEL, J. A.; SILVA, N. M.; DIAS, R. M. N. S. Baratas (Insecta, Blattaria) sinantrópicas na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 38, n. 1, 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672008000100020. Acesso em: 30 jun. 2011.

RAMÍREZ-PÉREZ, J. *Chipos de Venezuela*. Caracas: Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental/Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, 1985.

REY, L. *Parasitologia: parasitas e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

UNIVERSITY OF FLORIDA. INSTITUTE OF FOOD AND AGRICULTURAL SCIENCES (IFAS). *Public-Health Pesticide Applicator Training Manual*. Mites and Ticks. Gainesville: IFAS, [s.d.]. Disponível em: http://entnemdept.ufl.edu/fasulo/vector/chapter_05.htm. Acesso em: 5 jul. 2011.

UNIVERSITY OF MINNESOTA. Ent 4015 Ornamentals and Turf Entomology. Insect Morphology. Twin Cities: University of Minnesota, [s.d.]. Disponível em: <http://www.entomology.umn.edu/cues/4015/morphology/>. Acesso em: 29 jun. 2011.

Bibliografia consultada

ALMEIDA, L. M.; RIBEIRO-COSTA, C. S.; MARINONI, L. *Manual de coleta, conservação e identificação de insetos*. Ribeirão Preto: Holos, 1998.

BARNES, R. S. K.; CALOW, P.; OLIVE, P. J. W. *Os invertebrados: uma nova síntese*. São Paulo: Atheneu, 1995.

BORROR, D. J.; DE LONG, D. M. *Introdução ao estudo dos insetos*. São Paulo: Edgard Blücher, 1988.

BORROR, D. J.; TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. *An Introduction to the Study of Insects*. Fort Worth (Texas): Saunders College, 1992.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. *Invertebrados*. Sunderland: Sinauer, 1990.

- CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994.
- CORSEUIL, E. *Apostila de entomologia*. Porto Alegre: Alphagraphics, 2003.
- COURA, J. R. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. V. 2.
- FORATTINI, O. P. *Culicidologia médica*. São Paulo: Edusp, 1996. V. 1.
- _____. *Culicidologia médica*. São Paulo: Edusp, 2002. V. 2.
- GONÇALVES, T. C. M.; LENT, H.; ALMEIDA, M. D. Estudo anatômico e morfométrico de algumas espécies de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 82, p. 543-550, 1987.
- LENKO, K.; PAPAVERO, N. *Insetos no folclore*. São Paulo: Conselho Estadual de Artes e Ciências Humanas, 1979. (Coleção Folclore).
- OLIVEIRA-COSTA, J. *Entomologia forense: quando os insetos são vestígios*. 2. ed. Campinas: Millenium, 2007.
- QUEIROZ, M. M. C.; AZEVEDO, E. M. V. M. Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), sob condições de laboratório. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 8, p. 75-84, 1991.
- _____; LAINSON, R. Ecologia das leishmanioses. In: _____. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003.
- _____; _____. LAINSON, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003.
- REY, L. *Dicionário de termos técnicos de medicina e saúde*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. *Zoologia dos invertebrados*. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996.
- SCHREIBER, G.; SILVA, F. P. Morfologia comparada dos folículos testiculares e sistemática dos Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Ciência e Cultura*, Campinas, v. 20, p. 640-641, 1968.
- SILVA, F. P.; SCHREIBER, G. Morfologia comparada nos canalículos testiculares da subfamília Triatominae como caráter taxonômico. *Arquivos do Museu Nacional*, Rio de Janeiro, v. 58, p. 275-276, 1971.

Capítulo 5

Malacologia

Silvana Carvalho Thiengo
Monica Ammon Fernandez
Aline Carvalho Mattos

Malacologia é o ramo da ciência que estuda os moluscos. Esse grupo, segundo maior em número de espécies descritas, possui incontestável relevância por sua utilização na alimentação desde os primórdios da humanidade, bem como do ponto de vista biológico e parasitológico, como será visto a seguir.

Entre as classes pertencentes ao filo Mollusca, Gastropoda e Bivalvia merecem destaque por sua importância médica, veterinária e econômica. **Gastropoda** engloba cerca de três quartos do número total de espécies do filo, incluindo os transmissores da esquistossomose e de outras helmintoses, além de espécies consideradas pragas de diferentes cultivos. **Bivalvia** abrange a maioria das espécies de moluscos utilizadas na alimentação humana (ostras, mexilhões, sernambi, entre outros) e também algumas que causam prejuízos econômicos – como os teredinídeos, que perfuram ancoradouros e cascos de embarcações de madeira.

1. Gastrópodes

As principais características dos gastrópodes são: 1) ocorrência de torção durante o desenvolvimento embrionário (giro de 180°) da massa visceral, havendo algumas exceções; 2) presença de rádula (dentes quitinosos móveis dispostos em séries, que variam em número e forma, de acordo com o tipo de alimentação); 3) presença de manto ou pálio (tecido que recobre a massa visceral, responsável pela síntese da concha); 4) cavidade palial ou cavidade do manto (onde ocorrem a circulação, a respiração, a excreção e a reprodução); 5) sistema circulatório aberto; 6) respiração branquial, pulmonar ou tegumentar; 7) tubo digestivo completo (com boca e ânus, além de glândulas anexas); 8) sistema nervoso ganglionar; 9) um ou dois pares de tentáculos; 10) massa cefalopodal (expansão musculosa de superfície ventral em forma de sola, fundida com a cabeça e que corresponde à região que se expande para fora da concha); 11) músculo columelar (que prende o corpo do animal à concha); 12) concha geralmente univalva e espiralada, porém pode ser reduzida e até mesmo estar ausente em algumas espécies (os principais termos utilizados no estudo da concha estão representados na fig. 1); 13) hermafroditas ou dióicos, com fecundação externa, fecundação interna, fecundação cruzada, autofecundação, partenogênese, alternância de gerações e neotenia; 14) desenvolvimento direto (viviparidade, ovoviviparidade ou oviparidade) ou indireto, por meio de larvas fixas ou planctônicas (trocófora e véliger); 15) habitat: marinho, límnic (água doce) e terrestre.

Tradicionalmente, a classe Gastropoda é dividida nas subclasses Prosobranchia, Opisthobranchia e Pulmonata.

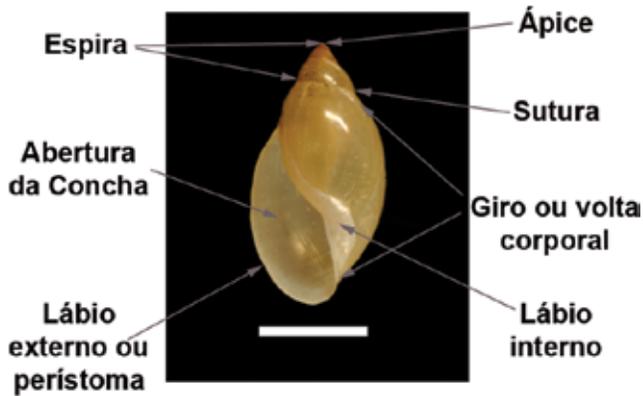


Figura 1. Vista ventral da concha de *Physa marmorata* Guilding, 1828, em posição anatômica, mostrando os principais termos utilizados em conchiliologia. (Escala: 5 mm.)

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

1.1 Subclasse Prosobranchia

Possuem brânquias localizadas anteriormente ao coração, concha sempre presente e opérculo; os sexos geralmente são separados (dióicos) e a maioria das espécies é marinha, porém há representantes límnicos e terrestres. As famílias e superfamília encontradas em ambientes límnicos no Brasil são Ampullariidae, Thiaridae e Rissoidae (Fig. 2).

1.1.1 Ampullariidae

São os maiores gastrópodes límnicos, podendo alcançar 17 cm de comprimento. Estão amplamente distribuídos no país, geralmente em águas lênticas.¹ Sua concha é globosa, com exceção do gênero *Marisa* (planispiral). As espécies americanas possuem opérculo córneo. São animais dióicos, mas, geralmente, sem dimorfismo sexual externo muito evidente. Efetuam respiração dupla: pulmão e brânquia. São bastante resistentes à dessecação. Os

¹ Águas lênticas são as águas paradas ou estacionárias, por exemplo, os lagos.

gêneros encontrados no Brasil são *Asolene*, *Felipponea*, *Marisa*, *Pomacea* e *Pomella*. Espécies de *Pomacea* e *Marisa cornuarietis* (Linnaeus, 1758) foram utilizadas em programas de controle biológico de *Biomphalaria* spp., transmissor da esquistossomose.

1.1.2 *Thiaridae*

Têm concha geralmente turriculada,² e seus primeiros giros³ frequentemente encontram-se danificados, ou mesmo ausentes, por causa do atrito com o substrato. Possuem opérculo córneo. Vivem preferencialmente em ambientes ricos em oxigênio. Sua reprodução é sexuada; na ausência de machos, porém, ocorre partenogênese.

A espécie afro-asiática *Melanoides tuberculatus* (Müller, 1774), embora exótica, é de ampla distribuição no território brasileiro. Na região do Caribe, foi utilizada, com sucesso, em programas de controle biológico das espécies transmissoras do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907.

Espécie exótica é toda espécie que não é nativa de uma determinada área.

1.1.3 *Rissoiidea*

Têm concha pequena oval-cônica, ou mesmo turriculada, e opérculo córneo às vezes calcificado; vivem em água doce, podendo habitar água salobra. Alguns gêneros encontrados no Brasil são *Littoridina*, *Heleobia* e *Idiopyrgus*.

² De forma helicoidal alongada.

³ Cada volta em torno do eixo columelar.

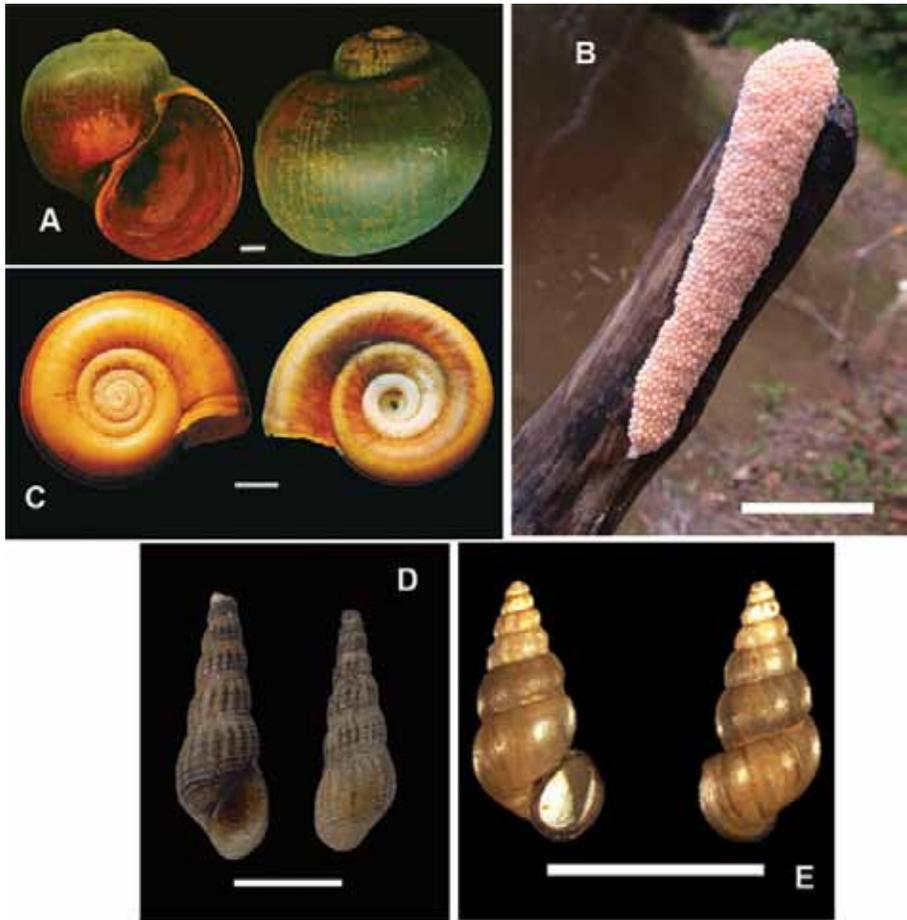


Figura 2. Exemplos de prosobrânquios: A) *Pomacea insularum* (dD'Orbigny, 1835); B) Desova de *Pomacea* sp; C) *Marisa planogyra* Pilsbry, 1933; D) *Melanoides tuberculatus*; E) *Idiopyrgus* sp. (Escala: 5 mm.)

Fotos: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC-Fiocruz.

1.2 Subclasse Opisthobranchia

Está limitada ao ambiente marinho. Exemplo: o grupo Nudibranchia, que engloba as lesmas do mar.

1.3 Subclasse Pulmonata

Apresentam tecido ricamente vascularizado que reveste o teto da cavidade palial e que, fundido com o colo, forma um saco pulmonar. Possuem concha externa ou interna, que pode estar reduzida ou mesmo ausente. A maioria das espécies é hermafrodita. A subclasse Pulmonata inclui três ordens: Stylommatophora, Systellommatophora e Basommatophora.

1.3.1 Ordem Stylommatophora

Abrange a maioria dos gastrópodes terrestres. Os estilomatóforos possuem dois pares de tentáculos invagináveis e olhos situados na extremidade dos tentáculos cefálicos (posteriores). São hermafroditas, geralmente com abertura genital única. Nessa ordem está incluído o molusco exótico *Achatina fulica* Bowdich, 1822, hospedeiro do *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935), nematoide responsável pela meningoencefalite eosinofílica.



Figura 3. Exemplar adulto e ovos de *Achatina fulica*.

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

1.3.2 Ordem Systellommatophora

Não possuem concha. Apresentam dois pares de tentáculos não invagináveis (retráteis). Ocorrem no ambiente terrestre exemplo, as lesmas, da família Veronicellidae – e marinho – exemplo, os integrantes da família Onchidiidae.

Algumas espécies de veronicelídeos (fig. 4) são as principais transmissoras do nematoide *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971, agente etiológico da angiostrongilose abdominal.



Figura 4. Vista dorsal e ventral do veronicelídeo *Sarasinula marginata* (Semper, 1885), hospedeiro natural de *Angiostrongylus costaricensis*. (Escala: 12 mm.)

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

1.3.3 Ordem Basommatophora

Possuem concha sem opérculo. São aquáticos – a maioria de água doce. Apresentam um par de tentáculos, não invaginável, com os olhos situados na base. São hermafroditas, com aberturas sexuais separadas.

2. Moluscos de importância epidemiológica

Os moluscos são hospedeiros de trematódeos digenéticos e de alguns nematoides parasitos do homem e dos animais. No Brasil, as principais doenças relacionadas aos moluscos são a esquistossomose, a fasciolose, a angiostrongilose abdominal e, recentemente, a meningoencefalite eosinofílica. Existem outros moluscos que, acidentalmente, podem injetar veneno em seres humanos, causando a morte – por exemplo, gastrópodes marinhos da família Conidae;

suas vítimas são, em geral, mergulhadores e catadores de conchas. Há ainda outras espécies que podem causar intoxicação alimentar e transmitir o cólera.

2.1 Ordem Basommatophora

A ordem Basommatophora possui cinco famílias: Ancyliidae, Chilinidae, Physidae, Lymnaeidae e Planorbidae, sendo as duas últimas de importância médica e veterinária, por compreenderem os transmissores dos trematódeos *Schistosoma mansoni* e *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758.

2.1.1 Família Ancyliidae

Possuem concha cônica, sem enrolamento; são animais pequenos, sem importância médico-veterinária (fig. 5). Os gêneros presentes na América do Sul são *Ancylus*, *Anisancylus*, *Burnupia*, *Ferrissia*, *Gundlachia*, *Hebetancylus* e *Uncancylus*.



Figura 5. Família Ancyliidae. (Escala: 5 mm)

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

2.1.2 Família Chilinidae

Têm concha dextrógira, globosa, com dentes na parede columelar da abertura (fig. 6). No Brasil, ocorrem apenas na região Sul. Não têm importância médica.



Figura 6. Família Chiliniidae. (Escala: 5 mm.)

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

2.1.3 Família Physidae

Apresentam concha com abertura para a esquerda (sinistrógira) e tentáculos longos e filiformes (fig. 7). Sem importância médica. Entre as espécies presentes no Brasil, estão *Physa acuta* Draparnaud, 1805 e *Physa marmorata* Guilding, 1828.



Figura 7. *Physa marmorata* Guilding, 1828. (Escala: 5 mm.)

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

2.1.4 Família Lymnaeidae

Possuem concha com abertura para a direita (dextrógira), ausência de dentes na parede columelar da abertura e tentáculos curtos e triangulares. Vivem preferencialmente em águas estagnadas ou de curso lento e possuem hábitos anfíbios (fig. 8). Entre as espécies presentes no Brasil, *Lymnaea columella* Say, 1817 e *Lymnaea viatrix* d'Orbigny, 1835 são responsáveis pela transmissão

da *Fasciola hepatica*, trematódeo que parasita principalmente o fígado de ruminantes. Vários casos de fasciolose humana já foram registrados no Brasil.



Figura 8. *Lymnaea columella* Say, 1817. (Escala: 5 mm.)

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

2.1.5 Família Planorbidae

Têm concha geralmente planispiral, tentáculos longos e filiformes e aberturas genitais à esquerda (fig. 9).

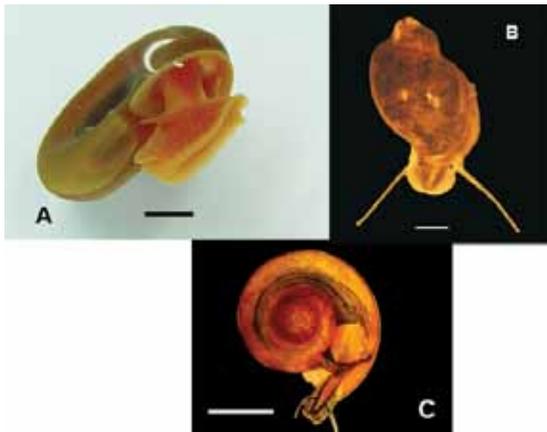


Figura 9. Representantes de três espécies de diferentes gêneros da família Planorbidae no Brasil: A) *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818); B) *Plesiophysa guadeloupensis* (“Fischer” Mazé, 1883); C) *Drepanotrema lucidum* (Pfeiffer, 1839). (Escala: A e B – 3 mm; C – 1,5mm.)

Fotos: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

Além do tamanho, tais espécies diferem em diversas características morfológicas e conquiliológicas. Por exemplo, somente nos exemplares do gênero *Drepanotrema* a abertura da concha é em forma de foice, e são observadas, na maioria de suas espécies, faixas pigmentadas nos tentáculos, nas faces dorsal e lateral da cabeça e nas margens da mufla e do pé.

2.1.5.1 Gênero *Biomphalaria*

Apresentam concha planispiral, com diâmetro variando nos indivíduos adultos de 7 mm a 40 mm. A cor natural da concha é amarelo-palha, mas modifica-se em contato com substâncias corantes dissolvidas na água dos criadouros, como o óxido de ferro, que confere às conchas coloração mais escura, passando por vários tons de marrom até o negro.

No Brasil existem onze espécies e uma subespécie descritas no gênero *Biomphalaria*, e apenas três são hospedeiras naturais do trematódeo *Schistosoma mansoni*. Três são hospedeiras potenciais, uma vez que se infectam quando expostas experimentalmente ao parasito.

- Hospedeiro natural: o parasitismo ocorre em condições naturais.
- Hospedeiro potencial: o parasitismo ocorre em condições de laboratório.

Além da identificação baseada nos caracteres conquiliológicos e anatômicos, existem estudos genéticos (cruzamentos entre indivíduos, utilizando o albinismo como marcador) e moleculares capazes de fornecer diagnóstico preciso.

Principais características:

Apresentam dois tentáculos longos e filiformes, e olhos na base dos tentáculos. A boca é contornada pela mandíbula, que, quando vista de frente, apresenta a forma de um T. No colo, encontram-se as aberturas genitais: a masculina, localizada atrás da base do tentáculo esquerdo, e a feminina, localizada um pouco mais atrás, sob a pseudobrânquia. O pé é oblongo. Na porção cefálica da massa visceral, o manto dobra-se para formar a cavidade pulmonar.

Quadro 1. Espécies e subespécies de *Biomphalaria* descritas para o Brasil, assinalando as hospedeiras naturais, as potenciais e as não hospedeiras de *Schistosoma mansoni*.

Hospedeiras naturais	<i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818)
	<i>Biomphalaria tenagophila</i> (d'Orbigny, 1835)
	<i>Biomphalaria straminea</i> (Dunker, 1848)
Hospedeiras potenciais	<i>Biomphalaria amazonica</i> Paraense, 1966
	<i>Biomphalaria peregrina</i> (d'Orbigny, 1835)
	<i>Biomphalaria peregrina cousini</i> Paraense, 1966
Não hospedeiras	<i>Biomphalaria intermedia</i> Paraense & Deslandes.
	<i>Biomphalaria kuhniana</i> (Clessin, 1883)
	<i>Biomphalaria schrammi</i> (Crosse, 1864)
	<i>Biomphalaria oligoza</i> Paraense, 1975
	<i>Biomphalaria occidentalis</i> Paraense, 1981
	<i>Biomphalaria tenagophila guaibensis</i> Paraense, 1984



Figura 10. Conchas de espécies e subespécies de *Biomphalaria* que ocorrem no Brasil: A) *Biomphalaria glabrata*; B) *Biomphalaria tenagophila*; C) *Biomphalaria straminea*; D) *Biomphalaria amazonica*; E) *Biomphalaria peregrina*; F) *Biomphalaria intermedia*; G) *Biomphalaria kuhniana*; H) *Biomphalaria schrammi*; I) *Biomphalaria oligoza*; J) *Biomphalaria occidentalis*; L) *Biomphalaria tenagophila guaibensis*. M) *Biomphalaria cousini*. (Escala: 5 mm.)

Fotos: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

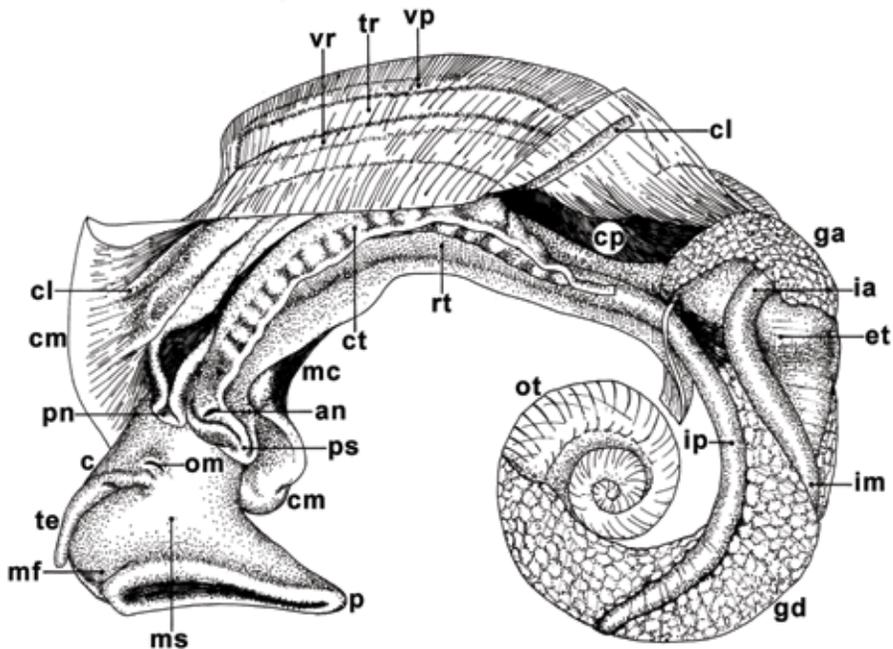


Figura 11. *Biomphalaria*, animal retirado da concha, com o manto levemente rebatido, para visualização dos órgãos internos.

Estruturas: massa cefalopodal (ms), cavidade pulmonar (cp), mufla (mf), tentáculo (te), colo (c), abertura genital masculina (om), colar ou borda do manto (cm), pseudobrânquia (ps), pneumóstoma (pn), abertura anal (an), músculo columelar (mc), crista lateral (cl), crista retal (ct), veia renal (vr), veia pulmonar (vp), tubo renal (tr), reto (rt), glândula de albúmen (ga), intestino anterior (ia), intestino médio (im), intestino posterior (ip), estômago (et), glândula digestiva (gd), pé (p), ovoteste (ot).

Ilustração: Extraída de Paraense, 1975.

- Manto

No manto podem ser observados:

- a) o coração, contido no pericárdio e constituído por uma aurícula e um ventrículo;
- b) parte da glândula de albúmen;

- c) as veias pulmonar e renal;
- d) o ureter e seu meato;
- e) o rim;
- f) o pneumóstoma;
- g) a crista lateral.

O rim é formado por uma porção sacular, justaposta à esquerda do pericárdio, que se continua por uma porção tubular (tubo renal) situada entre a veia renal e a veia pulmonar.

A observação do manto é extremamente importante para a identificação específica, uma vez que o principal caráter diagnóstico de *Biomphalaria glabrata*, a crista renal, encontra-se no manto.

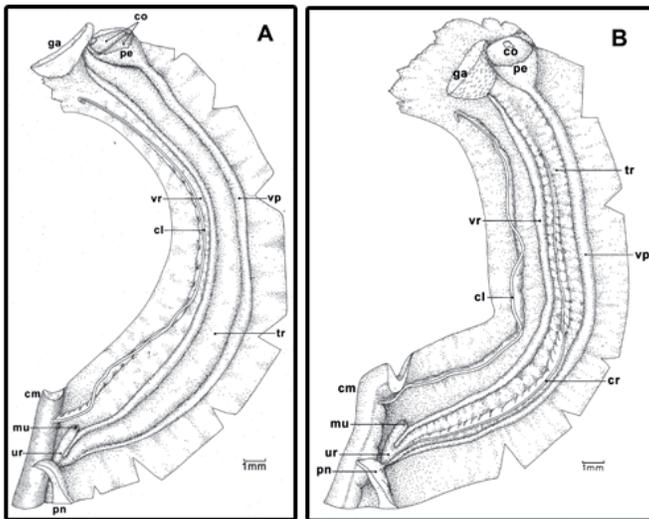


Figura 12. Estruturas do manto das bionfalárias: A) Manto de *Biomphalaria* sp; B) Manto de *Biomphalaria glabrata*, com crista renal.

Estruturas: coração (co), pericárdio (pe), glândula de albúmen (ga), veia pulmonar (vp), veia renal (vr), tubo renal (tr), crista lateral (cl), crista renal (cr), colar do manto (cm), ureter (ur), meato do ureter (mu) e pneumóstoma (pn).

Ilustração: Extraída de Paraense, 1975.

- Sistema respiratório

Predomina a respiração atmosférica – a hematose ocorre na rede vascular da parede pulmonar, de onde o sangue flui para o coração por meio da veia pulmonar. A respiração aquática ocorre pela pseudobrânquia (sede principal) e pelo tegumento em contato com o meio líquido.

- Sistema nervoso

O sistema nervoso está formado por onze gânglios, sendo cinco em pares – bucais, cerebrais, pleurais, pedais e parietais – e um isolado – visceral. Esses gânglios formam um anel – chamado anel periesofágico – ao redor do esôfago, logo atrás do saco bucal.

- Sistema digestivo

A rádula, presente no saco bucal, raspa o substrato, extraindo os alimentos: algas, bactérias, fragmentos de animais e vegetais, sais minerais e outros.

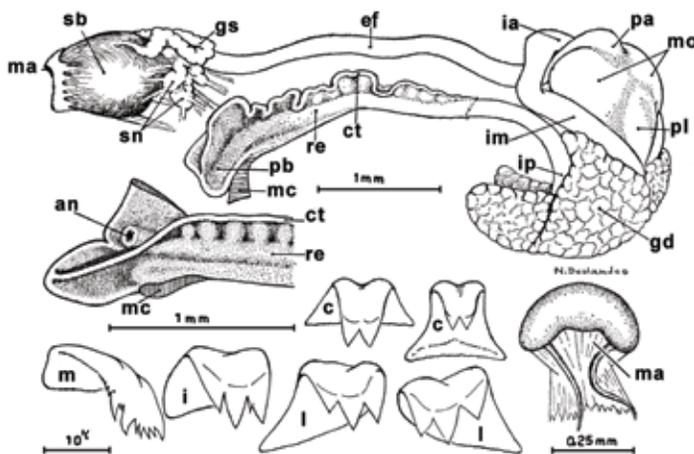


Figura 13. Sistema digestivo de *Biomphalaria* sp.

Estruturas: mandíbula (ma); saco bucal (sb); dentes da rádula: central (c), marginal (m), intermediário (i) e lateral (l); glândula salivar (gs); esôfago (ef); estômago: papo (pa), moela (mo), piloro (pl); glândula digestiva (gd); intestino anterior (ia), médio (im) e posterior (ip); reto (re); crista retal (ct); ânus (an). sistema nervoso: anel periesofágico (sn). sistema respiratório: pseudobrânquia (pb). músculo columelar (mc).

Ilustração: Extraída de Paraense, 1975.

- Sistema reprodutor

Embora os animais sejam hermafroditas, a fecundação cruzada predomina sobre a autofecundação. Se a fecundação cruzada propicia maior variabilidade genética, a autofecundação garante a formação de uma população a partir de um único indivíduo (estudos experimentais realizados por W. L. Paraense demonstraram que um único exemplar de *B. glabrata* pode produzir cumulativamente 10 milhões de descendentes em três meses).

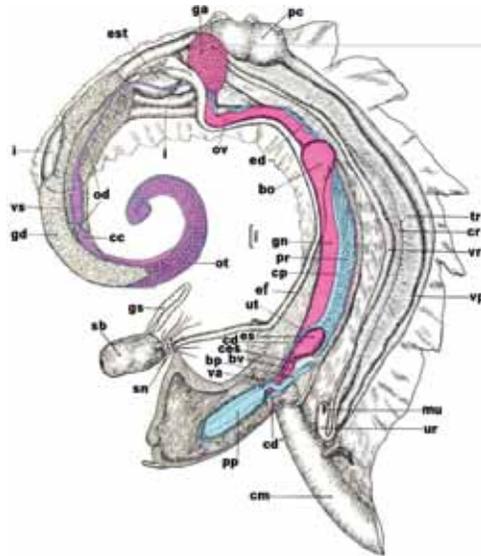


Figura 14. *Biomphalaria* parcialmente dissecada, mostrando a interação entre os órgãos.

Estruturas hermafroditas: canal coletor do ovoteste (cc), vesícula seminal (vs), ovispermiduto (od) e ovoteste (ot). Estruturas femininas: bolsa do oviduto (bo), espermateca (es), canal da espermateca (ces), glândula nidamental (gn), oviduto (ov), vagina (va), bolsa vaginal (bv), útero (ut) e glândula de albúmen (ga). Estruturas masculinas: bainha do pênis (bp), canal deferente (cd), próstata (pr), prepúcio (pp) e espermiduto (ed). Outras estruturas: Gânglios nervosos (sn), glândula salivar (gs), veia pulmonar (vp), veia renal (vr), tubo renal (tr), crista renal (cr), pericárdio (pc), colar ou borda do manto (cm), ureter (ur), meato do ureter (mu), cavidade pulmonar (cp), saco bucal (sb), esôfago (ef), estômago (est), intestino (i) e glândula digestiva (gd).

Ilustração: Extraída de Paraense e Deslandes, 1955.

A dissecação do sistema reprodutor permite a identificação específica dos planorbídeos, mediante a observação morfológica dos órgãos: presença e forma de determinadas estruturas, quantificações, proporções entre órgãos, mensurações, posicionamento, dentre outros. De um modo geral, as espécies vectoras podem ser identificadas com base nas características que se descrevem abaixo.

Biomphalaria glabrata: a concha de exemplares adultos tem de 20 mm a 40 mm de diâmetro, de 5 mm a 8 mm de largura e cerca de seis a sete giros – as paredes laterais dos giros são arredondadas.

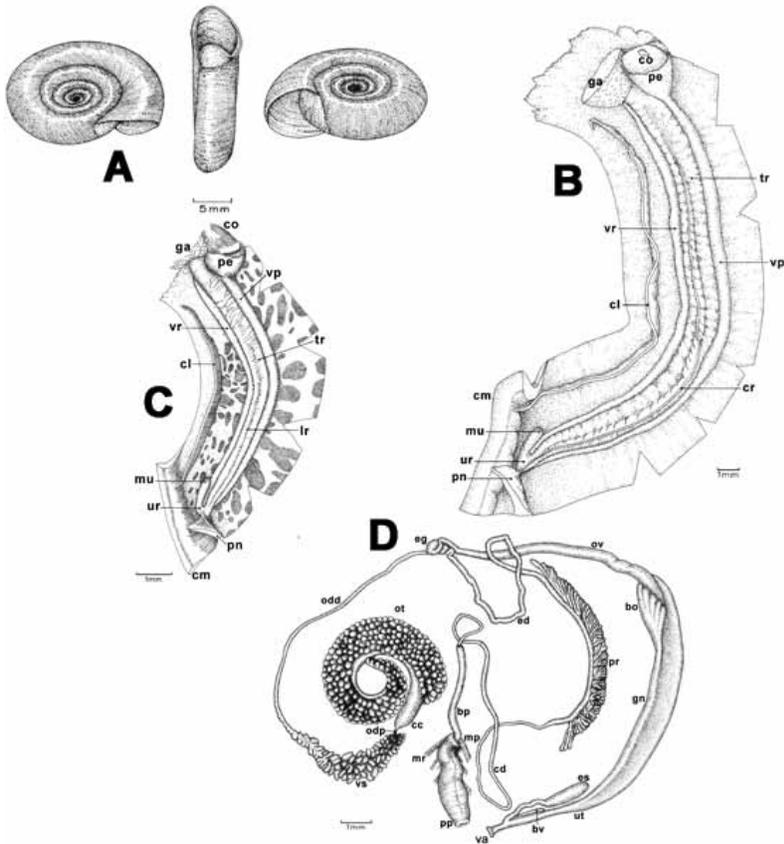


Figura 15. **Biomphalaria glabrata**: A) Vista do lado direito, vista frontal e vista do lado esquerdo, respectivamente; B) Manto de um exemplar adulto, onde se vê a crista renal; C) Manto de um exemplar jovem com linha renal pigmentada; D) Sistema reprodutor: canal coletor do ovoteste (cc), encruzilhada genital (eg), ovispermiduto proximal (odp), ovispermiduto distal (odd), ovoteste (ot) e vesícula seminal (vs); estruturas masculinas: bainha do pênis (bp), canal deferente (cd), espermiduto (ed), músculos do complexo peniano – retrator (mr) e protractor (mp) –, prepúcio (pp) e próstata (pr); estruturas femininas: bolsa do oviduto (bo), bolsa vaginal (bv), espermateca (es), glândula nidamental (gn), oviduto (ov), vagina (va) e útero (ut); coração (co), pericárdio (pe), glândula de albúmen (ga), veia pulmonar (vp), veia renal (vr), tubo renal (tr), crista lateral (cl), crista renal (cr), linha renal pigmentada (lr), colar do manto (cm), ureter (ur), meato do ureter (mu) e pneumóstoma (pn).

Ilustração: Extraída de Paraense, 1975.

Biomphalaria tenagophila: a concha de exemplares adultos tem de 15 mm a 35 mm de diâmetro, com cerca de sete a oito giros carenados, acentuadamente no lado esquerdo.

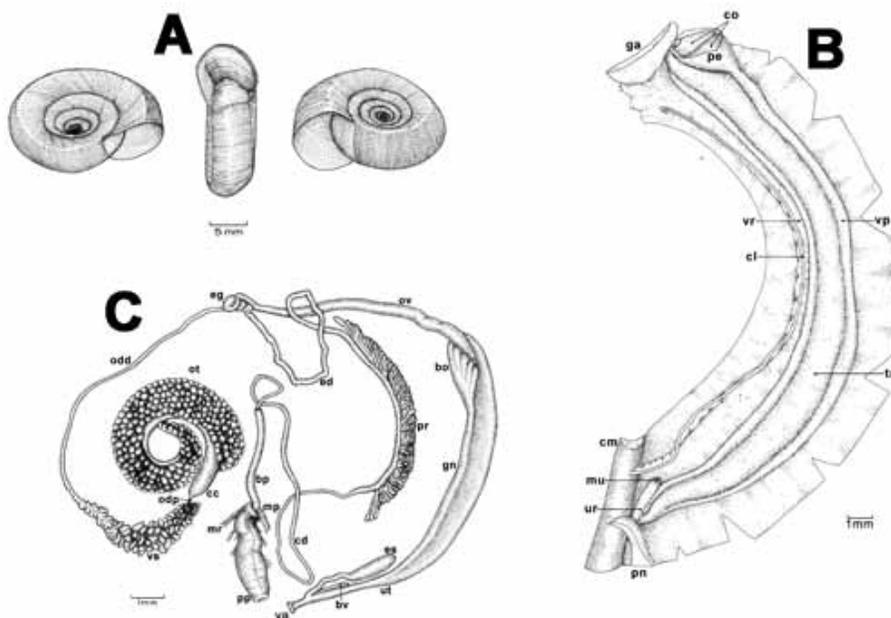


Figura 16. *Biomphalaria tenagophila*:

A) Concha: vista do lado direito, vista frontal e vista do lado esquerdo, respectivamente; B) Manto mostrando o tubo renal liso; C) Sistema reprodutor: canal coletor do ovoteste (cc), encruzilhada genital (eg), ovispermiduto proximal (odp), ovispermiduto distal (odd), ovoteste (ot) e vesícula seminal (vs); estruturas masculinas: bainha do pênis (bp), canal deferente (cd), espermiduto (ed), músculos do complexo peniano – retrator (mr) e protrator (mp) –, prepúcio (pp) e próstata (pr); estruturas femininas: bolsa do oviduto (bo), bolsa vaginal (bv), espermateca (es), glândula nidamental (gn), oviduto (ov), vagina (va) e útero (ut). Estruturas: coração (co), pericárdio (pe), glândula de albúmen (ga), veia pulmonar (vp), veia renal (vr), tubo renal (tr), crista lateral (cl), colar do manto (cm), ureter (ur), meato do ureter (mu) e pneumóstoma (pn).

Ilustração: Extraída de Paraense, 1975.

Caracteres diagnósticos de *Biomphalaria tenagophila*

- concha carenada;
- sistema reprodutor com bolsa vaginal bem definida;
- anatomia quase idêntica à de *B. glabrata*, diferindo pela ausência de crista renal pigmentada.

Biomphalaria straminea: a concha de exemplares adultos tem de 10 mm a 16 mm de diâmetro, com 3 mm a 4 mm de largura e cerca de cinco giros.

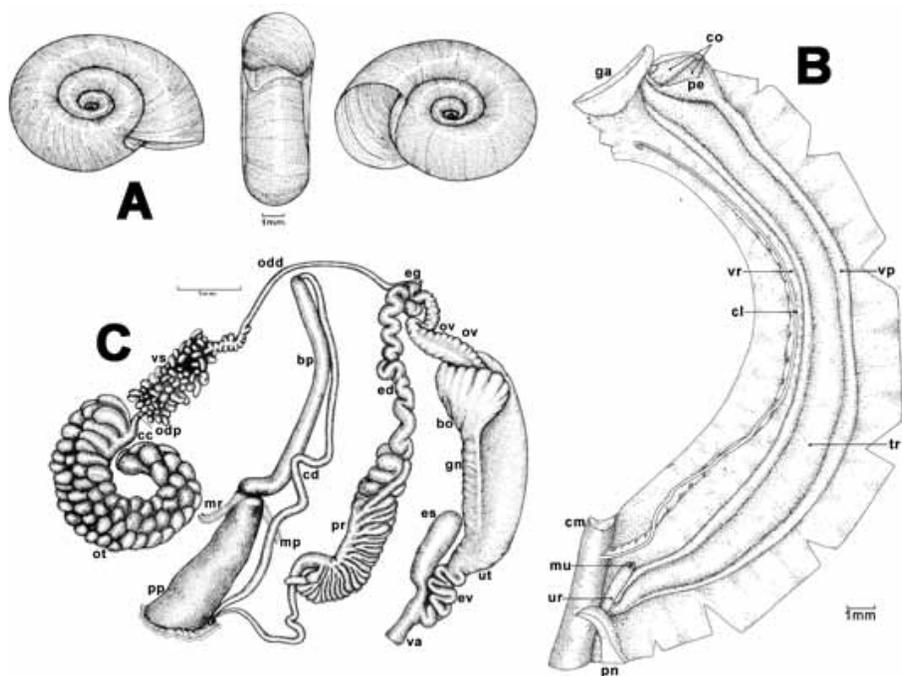


Figura 17. *Biomphalaria straminea*: A) Concha: vista do lado direito, vista frontal e vista do lado esquerdo, respectivamente; B) Manto, no qual se vê o tubo renal liso; C) Sistema reprodutor: canal coletor do ovoteste (cc), encruzilhada genital (eg), ovispermiduto proximal (odp), ovispermiduto distal (odd), ovoteste (ot) e vesícula seminal (vs); estruturas masculinas: bainha do pênis (bp), canal deferente (cd), espermiduto (ed), músculos do complexo peniano – retrator (mr) e protrator (mp) –, prepúcio (pp) e próstata (pr); estruturas femininas: bolsa do oviduto (bo), enrugamento vaginal (ev), espermateca (es), glândula nidamental (gn), oviduto (ov), vagina (va) e útero (ut). Estruturas: coração (co), pericárdio (pe), glândula de albúmen (ga), veia pulmonar (vp), veia renal (vr), tubo renal (tr), crista lateral (cl), colar do manto (cm), ureter (ur), meato do ureter (mu) e pneumóstoma (pn).

Ilustração: Extraída de Paraense, 1975.

Caracteres diagnósticos de *Biomphalaria straminea*

- parede dorsal da vagina enrugada devido à presença de uma série de ondulações transversais (enrugamento vaginal bem nítido).

Observação: embora os caracteres diagnósticos mais marcantes das espécies transmissoras presentes no Brasil tenham sido relacionados anteriormente, a identificação precisa requer análises criteriosas de vários exemplares (preferencialmente séries de indivíduos), uma vez que existem outras espécies com características similares.

3. Técnicas malacológicas

3.1 *Gastrópodes límnicos*

a) Coleta dos moluscos

Os moluscos límnicos podem ser encontrados em diferentes coleções hídricas, tais como açudes, alagados, brejos, córregos, lagoas, lagos, valas de esgoto ou drenagem, riachos e rios. A correnteza dos rios e dos córregos é um fator importante: as colônias geralmente são abundantes em águas estagnadas; em águas correntes, com velocidade superior a 30 cm por segundo, os moluscos não formam populações. Os representantes da classe Gastropoda são encontrados aderidos à vegetação, às rochas ou às margens do criadouro, podendo também estar enterrados no fundo do corpo d'água – esse último comportamento é mais frequente nos moluscos pertencentes à classe Bivalvia.

b) Equipamentos necessários

a) Concha de captura: consiste de um cabo de madeira ou aço, com aproximadamente 1 m de comprimento, acoplado a uma peneira ou a uma concha perfurada de metal, com furos em torno de 2 mm. Para facilitar o transporte da concha, o cabo pode ser confeccionado em duas partes unidas por uma rosca ou um parafuso. A largura da malha ou dos furos é importante, pois deve permitir somente a passagem da água do criadouro, retraindo pequenos espécimes como *Ancylidae*, *Antillorbis*,

Drepanotrema, *Biomphalaria* jovem e pequenos bivalves. Em alguns casos, a concha de captura pode ser substituída por uma draga e peneiras para triagem;

b) Pinças longas e pinças com pontas finas: em alguns ambientes, pinças com pontas finas são necessárias para retirar o molusco que se encontra preso às frestas de rochas ou dos troncos;

c) Recipientes plásticos e sacos de plástico ou de tecido, umedecido, em água: para acondicionar os moluscos maiores, como *Pomacea* spp;

d) Luvas e botas de borracha, para proteção individual.

e) Caderneta de campo, lápis e fita adesiva para a identificação do biótopo e da coleta: todas as anotações devem ser feitas no local, relacionando tipo de ambiente, vegetação, topografia, clima, temperatura e pH da água, umidade do ar, fauna acompanhante e coordenadas geográficas obtidas com um aparelho de sistema de posicionamento global (GPS). Outras análises da água, como turbidez, oxigênio dissolvido, ferro, cloretos, gás carbônico, cloro e manganês, podem ser feitas no local, com o uso de aparelhos específicos, ou após o transporte da amostra, no laboratório;

f) Bolsa térmica ou isopor para o transporte: o uso de um pouco de gelo é aconselhável nas regiões mais quentes, desde que não entre em contato direto com os recipientes contendo os moluscos;

g) Coletes com vários bolsos, para facilitar o transporte do equipamento de trabalho.

c) Métodos de coleta

Os métodos de coleta variam segundo o tipo de estudo: análises qualitativas requerem várias amostragens em épocas diferentes; análises quantitativas baseiam-se em técnicas que envolvem a delimitação da área amostral, o tempo de coleta ou o número de “conchadas” e a quantidade de coletores.



Figura 18. Conchas para a captura de moluscos límnicos.

A técnica de coleta consiste em raspar com a concha de captura a vegetação submersa, as margens e o fundo dos criadouros. Na superfície, o material recolhido deve ser cuidadosamente analisado para detectar a presença dos moluscos, observando-se folhas e pequenos gravetos onde espécimes jovens ou pequenos moluscos como os ancilídeos podem estar presos. À medida que os moluscos forem sendo encontrados, devem ser colocados no recipiente plástico, sem água, e o material da concha deve ser lavado até a confirmação da ausência de moluscos, para então ser desprezado. É aconselhável que se coloque no frasco um pequeno pedaço de vegetação (folha) retirado do criadouro, para manter a umidade; se forem coletados exemplares da família Ancyliidae, é necessário colocar um pouco da água. É imprescindível colocar uma etiqueta com o número de identificação referente às anotações da caderneta de campo. A busca dos moluscos deve ser realizada em diferentes pontos de cada criadouro, para se obter uma boa amostragem da malacofauna presente.

Os criadouros podem ser temporários, quando têm água apenas em alguns períodos, ou permanentes. Podem ser formados pela água que mina do solo

(por vertentes, fontes ou poços); pela água da chuva ou por drenagem de superfície; por águas acumuladas em recipientes artificiais, cisternas, sarjetas ou valetas, charcos, inundações, valas de irrigação e “caldeirões” (grandes coleções de água em cavidades de pedreiras). São de grande importância epidemiológica lagoas, represas, córregos e rios, pela presença de pescadores ou banhistas, e os açudes, por serem as únicas fontes de água em certas localidades.

Após o reconhecimento do local, as equipes de campo devem identificar e assinalar os criadouros atuais e potenciais dos planorbídeos, caracterizando aqueles de importância epidemiológica no que diz respeito à frequência da população ao local, à ocorrência de planorbídeos com formas infectantes de *Schistosoma mansoni*, à densidade populacional dos moluscos e à espécie transmissora. Sempre que possível, os dados pluviométricos devem ser incluídos.

Em coleções hídricas aparentemente secas, cobertas por camadas de barro (crostas), a pesquisa de planorbídeos torna-se mais trabalhosa: o sedimento deve ser removido com enxada (equipamento a ser inserido, conforme o ambiente a ser pesquisado) e cuidadosamente analisado quanto à presença dos moluscos, sendo importante o registro da profundidade.

Para o estudo quantitativo da malacofauna, existem diferentes métodos pelos quais é possível determinar a densidade das espécies presentes, conforme o interesse da pesquisa e o tipo de criadouro: tamanho, características da vegetação, das margens, do substrato, profundidade, dentre outros. Entre os métodos utilizados, há relatos de coletas pelo método de conchadas e pelo método de Olivier e Schneiderman (1956).

Para o método de conchadas, inicialmente deve ser demarcado o ponto exato onde será realizada a captura, utilizando-se para isso estacas previamente numeradas, que devem ser fixadas à margem do criadouro. Em cada estação são feitas dez “conchadas”, buscando-se coletar o maior número possível de moluscos; a fixação prévia do número de conchadas garante a comparabilidade dos resultados e, assim, uma estimativa confiável da densidade de planorbídeos em diferentes coleções hídricas. A quantidade de planorbídeos obtida em

cada estação deverá ser dividida por 10 (número de conchadas), e o valor encontrado corresponderá ao número de moluscos de cada estação de captura. Quanto maior a padronização do método, mais confiáveis e comparáveis serão as informações.

Já o método de Olivier e Schneiderman (1956) estipula que o número de exemplares coletados em cada estação de captura deve ser dividido pelo número de coletores (que devem ser experientes na realização de coletas de moluscos), e o valor encontrado deve ser dividido pelo tempo de coleta, independentemente do número de conchadas. A dinâmica populacional dos planorbídeos nas diferentes estações de coleta é um fator importante para caracterizar a potencialidade dos novos focos⁴ de esquistossomose.

Os moluscos coletados devem ser acondicionados em potes plásticos e encaminhados ao laboratório, conforme técnica de remessa descrita a seguir. No laboratório, a taxa percentual de moluscos infectados por *Schistosoma mansoni* será determinada com base nas técnicas de exposição à luz e de esmagamento, também descritas a seguir.

O monitoramento dos moluscos, uma das primeiras etapas em estudos epidemiológicos em áreas de esquistossomose, deve ser contínuo e sistemático. Outras ações, tais como a educação em saúde e ambiente e o saneamento hídrico, devem, se possível, ocorrer concomitantemente.

d) Embalagem e remessa dos moluscos límnicos

Para a remessa de moluscos vivos destinados à identificação e ao exame de infecção por *Schistosoma mansoni*, propõe-se que seja adotada a técnica que se segue, desenvolvida por W. Lobato Paraense:

- 1) É fundamental que se verifique se todos os moluscos estão vivos antes de serem embalados; para isso, devem ser colocados numa fina lâmina de água e observados quanto à sua movimentação;

⁴ Criadouros onde se encontra o molusco infectado por *Schistosoma mansoni*.

- 2) Molhe com água um pedaço de gaze de algodão de 30 a 50 cm de comprimento por 20 cm de largura, espremendo-o muito bem, de modo que fique levemente úmido. Esse detalhe é muito importante, pois o excesso de água mata os moluscos por asfixia, uma vez que eles são pulmonados;
- 3) Estender a gaze sobre uma superfície plana e colocar os moluscos transversalmente e enfileirados, de modo que fiquem distantes uns dos outros (fig. 19). Tal distância dependerá do tamanho do exemplar, sendo de 1 cm para os menores, por exemplo *Drepanotrema*, e de 2 cm para os maiores, por exemplo *Biomphalaria*. Nenhum exemplar deve ser colocado nas margens da gaze, as quais devem ter cerca de 3 cm livres, para facilitar o fechamento do cilindro;
- 4) Uma vez que a fileira esteja pronta, a gaze deve ser dobrada sobre os moluscos, e outros exemplares devem ser acondicionados sobre a gaze, e novas fileiras organizando-se. Dessa forma, gradativamente, os moluscos vão sendo organizados em fileiras, entre as dobras da gaze. Entre a última fileira de moluscos e a margem superior da gaze, sobrar um pedaço capaz de envolver todo o cilindro. Para se formar o cilindro, as margens direita e esquerda devem ser dobradas e, em seguida, a margem superior deve envolver todo o material, evitando-se que os exemplares saiam do cilindro;
- 5) Caso existam muitos exemplares em uma única amostra, vários cilindros devem ser formados, para garantir a sobrevivência dos moluscos. Cada amostra deve ser colocada em um saco plástico capaz de envolver todo o cilindro, a fim de evitar que a gaze perca a umidade. A identificação de cada amostra (com o nome da localidade, o tipo de criadouro, o nome do coletor, a data da coleta e outros) deve ser colocada dentro do saco plástico distante da gaze, usando-se dois sacos plásticos ou dobras no plástico para impedir o contato do papel com a água;
- 6) O material deve ser colocado em uma caixa resistente, envolta em pedaços de isopor, a fim de evitar qualquer colisão com as laterais da caixa e possíveis danos aos moluscos;

- 7) A caixa não deve ser perfurada ou submetida à refrigeração durante o transporte;
- 8) É preciso evitar a exposição do material a moscas durante todo o procedimento de embalagem, pois esses insetos depositam seus ovos nos tecidos dos moluscos, levando-os à morte.

A longevidade dos moluscos sob essas circunstâncias dependerá de vários fatores, tais como a espécie em questão – exemplares de *Pomacea* possuem maior resistência, podendo sobreviver por várias semanas ou meses, desde que bem embalados – e a presença de formas larvais de trematódeos – os exemplares parasitados morrem mais facilmente.

Esse método não é recomendado para exemplares de ancilídeos, os quais devem ser transportados com uma película de água do criadouro, em frascos hermeticamente fechados.

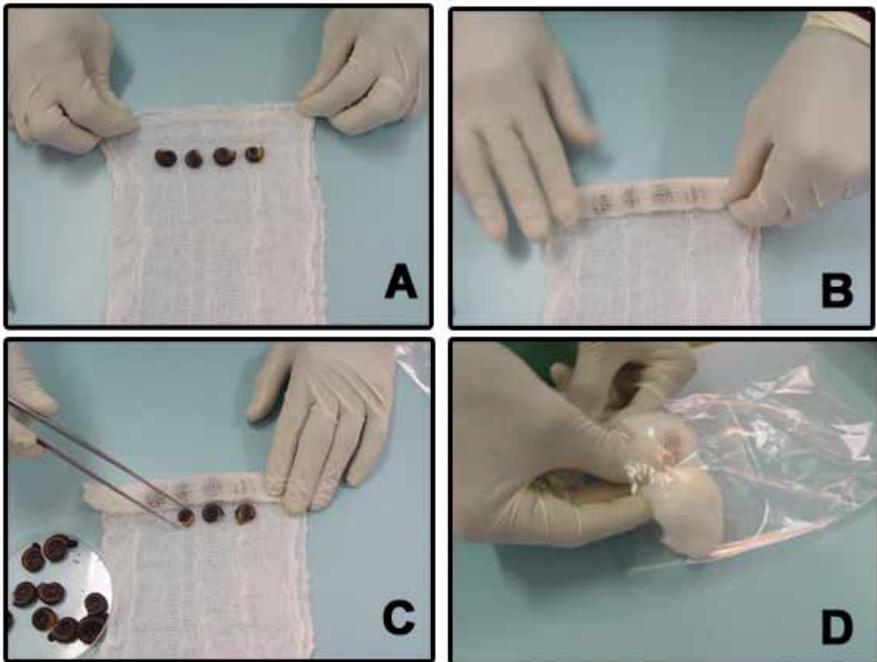


Figura 19. Etapas da embalagem de moluscos límnicos para remessa.

Fotos: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

e) Manutenção dos gastrópodes límnicos em laboratório

A manutenção dos gastrópodes límnicos em condições de laboratório requer a dedicação constante do técnico responsável. Com a experiência adquirida, o profissional poderá adaptar as técnicas descritas a seguir à colônia utilizada, aos objetivos específicos do trabalho e às peculiaridades de cada laboratório.

- **Água:** não deve conter traços de chumbo, cloro ou de qualquer outra substância química que a torne imprópria para o uso na criação. Antes de ser utilizada nos aquários, é recomendável manter a água fornecida pelas distribuidoras de abastecimento em recipientes durante alguns dias, para que o cloro evapore.

Outro procedimento visando ao mesmo objetivo foi construído no Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Ele consiste em uma parede de pedra, externa ao laboratório, por onde a água escorre e fica depositada num tanque concretado, antes de ser usada. É importante também que a água seja filtrada em papel-filtro, uma vez que a presença de larvas de insetos, oligoquetos, microcrustáceos e protozoários pode prejudicar a criação. O pH deve ser mantido entre 6 e 8.

O volume de água necessário dependerá da quantidade de espécimes em cada aquário, bem como do tamanho dos moluscos, da espécie em questão e da finalidade da criação. Assim, não existe uma proporção única entre o volume de água e o número de moluscos. Em criações que visem somente à manutenção da população em laboratório, aquários com capacidade de 2 L podem comportar satisfatoriamente 1,8 L de água e 25 espécimes de *Biomphalaria* adultas. Como a densidade de moluscos influencia diretamente o crescimento e o amadurecimento sexual dos espécimes, criações para a realização de experimentos com moluscos de tamanho semelhante ou para a obtenção de moluscos grandes num curto espaço de tempo requerem análises prévias do volume de água necessário.

A substituição da água dependerá das condições de criação, sendo influenciada pelos seguintes fatores: mortalidade dos moluscos, excesso de excrementos na água, ausência de substrato, presença excessiva de alimento ou alta turbidez. Normalmente, a troca de água ocorre entre 7 e 10 dias, podendo ser total ou parcialmente renovada, nesse caso, é aproveitada metade da água, após nova filtragem em papel-filtro. Para a troca, todo o conteúdo do aquário deve ser transferido para uma peneira com orifícios de pequeno diâmetro, a fim de se evitar a perda dos animais. Após a montagem do aquário, transfira o conteúdo da peneira, observando cuidadosamente se algum exemplar ficou preso às malhas.

- **Substrato:** os gastrópodes límnicos são raspadores e utilizam o substrato como complemento alimentar e para auxiliar na trituração dos alimentos. O substrato para os aquários é formado por argila peneirada (10 partes) enriquecida com carbonato de cálcio (1,5 partes) e farinha de ostra (2 partes). Em um aquário com 1,8 L de água e 25 moluscos adultos, 3 gramas de substrato aproximadamente são suficientes, devendo o mesmo ser renovado a cada troca de água. Nos aquários maiores, com 40 L de água e cerca de 100 exemplares de *Biomphalaria* adultas, devem ser adicionadas, em média, 75 g de substrato. Nos habitats naturais, nota-se a influência direta do substrato sobre a consistência e a cor da concha do molusco. A utilização de uma camada de areia de rio lavada e esterilizada no fundo do aquário também é recomendada por alguns autores.

- **Alimentação:** diferentes tipos de alimento foram utilizados em tentativas de se obter maior sucesso na criação de moluscos límnicos; entre eles, hortaliças e legumes, como alface, couve, agrião e cenoura; formulações contendo, por exemplo, alfafa, gérmen de trigo e leite em pó; e rações próprias para peixes, roedores ou aves. Atualmente, o alimento mais utilizado nas criações em condições de laboratório é a alface, que pode ser fresca ou desidratada. Esse alimento deve ser oferecido diaria-

mente aos moluscos, em quantidade proporcional ao consumo, para se evitar o apodrecimento do vegetal no aquário. A forma como a alface é oferecida varia conforme a idade do molusco e a espécie. Por exemplo, amostras de *Biomphalaria* recém-eclodidas preferem alface desidratada, enquanto *Physa* alimenta-se preferencialmente de alface semiapodrecida. Qualquer criação necessita observação constante, e as adaptações devem ser feitas diante das diversas situações encontradas.

- **Montagem e manipulação do aquário:** os aquários ideais devem ser de vidro, por causa de facilidade de limpeza e da melhor visualização de seu interior. Um fragmento de folha de isopor de 5 cm por 3,5 cm ou similar – papel celofane ou plástico – deve ser colocado no aquário, para facilitar a coleta das desovas, que serão feitas nele; caso contrário, as desovas geralmente são depositadas nas paredes.

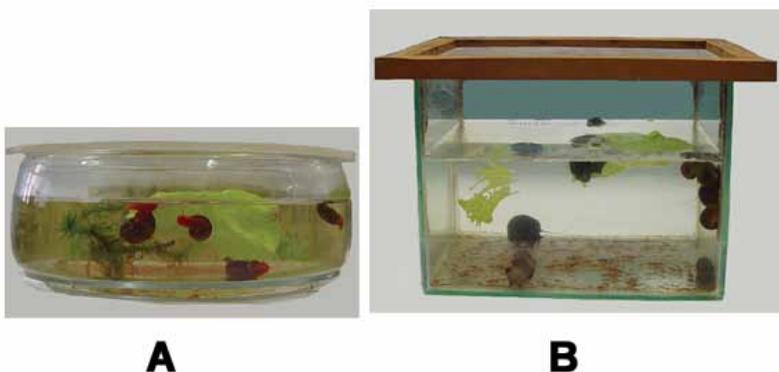


Figura 20. Aquários com exemplares de *Biomphalaria* (A) e *Pomacea* (B).

○ uso de tampa é imprescindível, para evitar a fuga dos moluscos e a exposição a insetos. A tampa de tela é indicada preferencialmente, por permitir melhor aeração. Em geral, não há necessidade de aeração artificial; em algumas criações, porém, é conveniente incluir plantas aquáticas no aquário – por exemplo, elódea (*Anacharis canadensis*),

samambaia-d'água (*Ceratopteris thalictroides*), higrófila anã (*Hygrophila polysperma*) e alface-d'água (*Pistia stratiotes*), que, além de oxigenarem a água facilitam a coleta das desovas. O uso de plantas deve ser cauteloso para impedir a dispersão indesejada dos moluscos no ambiente natural ou mesmo a mistura de populações e espécies no laboratório. Assim, antes de introduzidas no aquário, as plantas devem ser inspecionadas rigorosamente, sob microscópio estereoscópico, para verificação da presença de animais – moluscos, microcrustáceos, larvas de insetos, hirudíneos e outros – ou mesmo de desovas. Os aquários devem ser mantidos sob a luz de lâmpadas fluorescentes, com fotoperíodo de 12 horas de luz para 12 horas de escuro, e em temperatura entre 23 e 26°C.

A manipulação dos aquários dependerá do objetivo de cada criação, pois as colônias experimentais requerem maior controle do que aquelas que objetivam somente a manutenção das populações. Como o crescimento do molusco depende, além de suas características genéticas, das pressões ambientais – entre elas, características dos criadouros como: volume de água, tipo de substrato –, a densidade de moluscos, a quantidade e a qualidade de alimento são fatores muito importantes na criação.

Para manter uma criação com indivíduos de várias idades ou tamanhos, as desovas devem ser separadas do aquário onde estão os moluscos adultos e postas em outro aquário. As desovas podem ser retiradas semanalmente, visto que, no caso da *Biomphalaria*, o tempo necessário para a eclosão dos ovos ocorre em torno de 6 a 9 dias – em média em 7 dias e meio após a postura para *Biomphalaria glabrata* e em 7 dias para *Biomphalaria straminea*, mantidas sob as mesmas condições. Inicialmente, um pedaço desidratado de alface deve ser colocado no aquário; e, à medida que os moluscos crescem, a alimentação passa a ser gradativamente substituída por alface fresca. Caso haja muitos indivíduos em um único aquário, eles devem ser redistribuídos em novos aquários. É aconselhável, nesse caso, que se aproveite a água, completando os vo-

lumes com água previamente filtrada. Quanto ao ritmo de crescimento, os moluscos crescem mais rapidamente quando jovens. À medida que amadurecem sexualmente, o ritmo torna-se mais lento. Tal fato se reflete na manipulação da criação, ou seja, na redistribuição dos moluscos para outros aquários, na periodicidade das trocas de água e na distribuição de alimento. Caso exemplares de *Biomphalaria* sejam utilizados em cruzamentos experimentais, devem ser isolados em aquários pequenos, com capacidade para 200 mL, antes que atinjam a maturidade sexual, o que ocorre após o 20º dia.

Ao se iniciar uma criação a partir de indivíduos coletados no campo, deve-se atentar para alguns cuidados. A presença de formas larvais de trematódeos nos moluscos normalmente impede a oviposição, interferindo, portanto, na criação. No caso da existência de anelídeos oligoquetas *Chaetogaster*, encontrados no colo e na cavidade palial do molusco, observa-se maior mortalidade. Assim, para se iniciar a criação, é aconselhável que os moluscos trazidos do campo sejam colocados em frascos com um pouco de água e expostos individualmente ao calor de lâmpadas incandescentes de 60 W durante 2 a 4 horas. Após esse período, devem ser agrupados, sob microscópio estereoscópio, somente os indivíduos não parasitados para formar a geração parental.

Existem ainda variações interespecíficas que afetam a criação. É mais difícil manter determinadas espécies sob condições de laboratório; nesse caso, é necessário adaptar as metodologias existentes às peculiaridades de cada espécie. Por exemplo, alguns moluscos permanecem determinado período fora da água, aderidos à parede do aquário, podendo ou não apresentar lamelas ou epífragmas nas aberturas das conchas. Já outros moluscos preferem depositar suas desovas sobre as conchas de outros espécimes ou, mesmo, nas paredes do aquário.

f) Exame de formas larvais de trematódeos

Como os moluscos coletados nos biótopos naturais encontram-se frequentemente parasitados por formas larvais de trematódeos, são extremamente necessárias a pesquisa e a identificação dessas formas larvais, especialmente as de *Schistosoma mansoni*.

Para a pesquisa de cercárias, os moluscos devem ser isolados em frascos de vidro transparente com capacidade para 10 mL, contendo 4 mL de água desclorada e filtrada, e expostos à luz de lâmpadas incandescentes de 60 W a uma distância de 30 cm, durante 4 horas. Tal procedimento fornece uma temperatura entre 28 a 30°C que é capaz de estimular a emissão cercariana. A visualização das cercárias nos frascos é feita com o auxílio do microscópio estereoscópico, com aumento de oito vezes. Os moluscos parasitados devem ser reunidos em um aquário para, a partir deles, obter-se uma quantidade considerável de cercárias (*pool*). Os moluscos que não emitiram cercárias devem ser novamente expostos à luz, a cada cinco dias, até o 30º dia, quando devem ser examinados após o esmagamento de suas conchas, para a confirmação da ausência de estádios larvais, e devem ser posteriormente desprezados. O *pool* de cercárias será utilizado para infectar experimentalmente camundongos por via subcutânea, pela inoculação das cercárias, ou por via percutânea, pela exposição dos animais às cercárias, caso seja necessário confirmar se o trematódeo em questão é *Schistosoma mansoni* ou se deseje isolar a cepa.



Figura 21. Exemplos de Biomphalaria expostos à luz artificial.

A pesquisa de cercárias também deve ser realizada mediante a observação da eliminação noturna das formas larvais, uma vez que existem trematódeos com ciclos biológicos que envolvem roedores ou outros animais de hábitos noturnos. Para isso, os moluscos são postos nos frascos com água, como mencionado anteriormente, e deixados no escuro durante a noite, a fim de serem examinados na manhã seguinte.

Para o esmagamento das conchas, os moluscos devem ser colocados entre placas de Petri, de preferência com o lado esquerdo voltado para cima, e submetidos a uma leve pressão, de modo que a concha se quebre sem destruir o tecido do molusco. O profissional deve retirar, com pinças de pontas finas ou estilete, os pedaços da concha e examinar cuidadosamente o molusco sob microscópio estereoscópico, com aumento de oito vezes, à procura de esporocistos ou rédias em todos os órgãos.



Figura 22. Técnica de esmagamento da concha para procura de estádios larvais de trematódeos.

g) Fixação dos gastrópodes límnicos

Para o estudo morfológico e a identificação das amostras, é necessário que os moluscos sejam anestesiados e fixados adequadamente. Os anestésicos são utilizados para evitar que o molusco se contraia, o que dificulta a dissecação e a mensuração de suas estruturas. O anestésico ideal para gastrópodes límnicos, o pentobarbital sódico, é comercializado sob nome comercial de Nembutal ou Hypnol.



Figura 23. Material necessário para a fixação de moluscos: peneira, termômetro, aquecedor, pinça e recipiente com água.



Figura 24. Exemplares de *Biomphalaria* anestesiados, submersos em água a 70°C.

A concentração do anestésico e o tempo de imersão na água quente variam segundo o tamanho do animal. Para espécimes maiores, como os representantes da família Ampullariidae, a concentração deve ser de 0,1% e a imersão deve ser de 90 segundos. Nos exemplares menores – *Biomphalaria*, *Helisoma*, *Lymnaea* e *Physa* – a concentração deve ser de 0,05% e a imersão será feita durante 30 a 40 segundos, ou de 15 a 30 segundos, para *Drepanotrema* e representantes da família Ancyliidae. Também é possível fixar o espécime sem anestesia prévia, porém o animal se contrai.

Técnica de fixação de gastrópodes límnicos com o uso de anestésicos

- a) Colocar os espécimes na solução anestésica até que se observe o total relaxamento do molusco, verificando, com um pincel ou estilete, se o animal não se contrai ao ser tocado. O tempo necessário à ação do anestésico varia conforme a espécie ou o tamanho do animal. Os planorbídeos, em média, requerem entre 6 e 12 horas. Para exemplares muito pequenos, como os ancilídeos, duas horas são suficientes e, nos maiores, da família Ampullariidae, por exemplo, são necessárias 20 horas ou mais. A quantidade de solução anestésica será aquela que permita cobrir todos os exemplares a serem fixados e que permita que eles se movimentem livremente.
- b) Transferir os moluscos para um coador de plástico ou metal com 7 cm de diâmetro e mergulhá-los em água previamente aquecida a 70°C, durante período adequado ao tamanho do animal. A temperatura da água e o tempo de imersão devem ser rigorosamente seguidos, caso contrário, ocorrerá o cozimento da hemolinfa e dos tecidos, prejudicando a dissecação ou, ainda, o desprendimento do músculo columelar, dificultando a extração do corpo do molusco da concha (fig. 24).
- c) O coador com os moluscos deve ser mergulhado em água à temperatura ambiente, para que ocorra o resfriamento dos moluscos.
- d) Com duas pinças, segurar o exemplar pela concha, mergulhando-o em um recipiente com água fria, e puxar o pé do molusco, transversal-

mente, para fora, com uma suave tração. Com esse procedimento, o músculo se desprende e a parte mole pode ser extraída da concha, que vai sendo ocupada pela água, de forma a diluir os resíduos de hemolinfa, facilitando a extração (fig. 25).

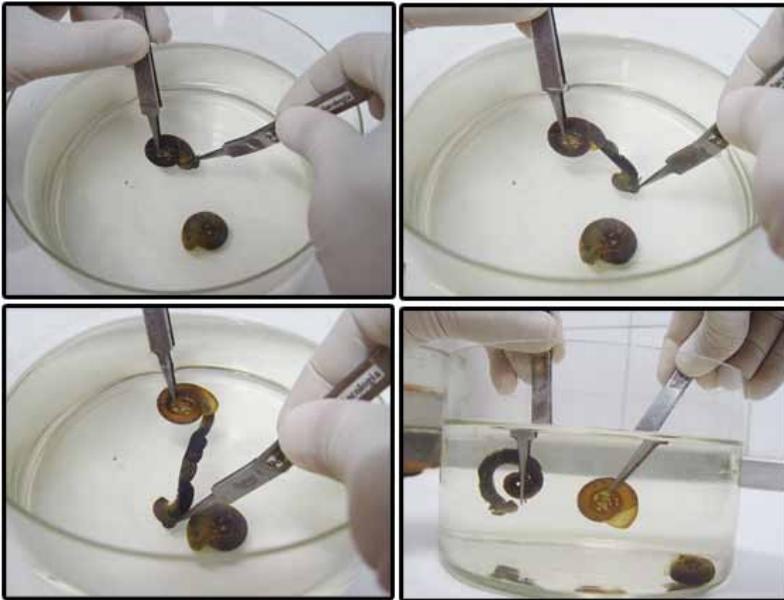


Figura 25. Processo de retirada do molusco da concha.

Fotos: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

e) Colocar a parte mole do molusco no fixador Railliet-Henry, modificado para animais de água doce; a concha deve ser posta para secar, após ter sido lavada e limpa com um pincel de pelo macio. A quantidade de fixador não deve ser menor do que dez vezes o volume do material a ser fixado.

- **Preparação de Railliet-Henry, adaptada para moluscos límnicos**

a) Água destilada: 930 mL;

b) Cloreto de sódio: 6 g;

- c) Ácido acético glacial: 20 mL;
- d) Formol neutralizado (um pedaço de giz é posto no frasco original): 50 mL;
- e) Após 24 horas, o líquido fixador deve ser trocado;
- f) Uma vez bem fixado o material, a quantidade de fixador pode ser reduzida, objetivando-se a conservação ou a remessa do material fixado. O material conserva-se indefinidamente no fixador, motivo pelo qual esse necessita periodicamente ser repostado, à medida que ocorre sua evaporação.
- g) O material deve ficar por pelo menos 24 horas no fixador antes de ser dissecado. Se houver necessidade de um diagnóstico urgente, o material pode ser colocado em estufa a 40-45°C, por 12 horas, o que acelera o processo de fixação.

Técnica de fixação de gastrópodes límnicos sem o uso de anestésicos

A técnica de fixação sem anestésico difere da anterior nos tópicos “a”, “b” e “c”. Os moluscos devem ser imersos individualmente e gradualmente em água a 70°C da seguinte forma:

- a) Pinçar o molusco cuidadosamente do aquário, evitando que o animal se retraia para dentro da concha.
- b) O molusco deve ser colocado na superfície da água, com a abertura da concha voltada para cima, durante 15 segundos.
- c) Em seguida, o animal deve ser imerso por mais 25 segundos, o que completa o tempo de imersão necessário.
- d) Colocado na água para resfriamento, o molusco deve ser extraído da concha, seguindo-se, a partir dessa etapa, a metodologia descrita para os moluscos que foram anestesiados.

No caso de espécimes com concha lamelada – por exemplo, *Biomphalaria schrammi* – e de exemplares de tamanho muito pequeno ou com muitos giros – por exemplo, *Drepanotrema* –, a parte mole não deve ser extraída da

concha, porque facilmente pode se romper. Assim, o lote a ser fixado deve ser separado em duas partes, metade guardada como parte mole e a outra, como concha. O material destinado à fixação e ao estudo morfológico deve ser colocado diretamente no fixador, após a anestesia e o aquecimento em água a 70°C.

O fixador Railliet-Henry deve ser trocado no mínimo duas vezes antes de iniciar a dissecação, para que o material fique bem fixado. Até a descalcificação da concha, o frasco deve ser observado frequentemente, pois, à medida que a concha é corroída pela reação entre o ácido acético e o carbonato de cálcio, ocorre produção de CO₂ e a tampa do frasco pode abrir-se pela liberação do gás formado. Nesse caso, o fixador deve ser trocado frequentemente.

Quanto ao material para conquiliologia, depois de aquecido, o molusco deve ser mantido em água, que deve ser trocada periodicamente, até o apodrecimento da parte mole; quando retirar a concha, deve ser limpa com um pincel de cerdas macias e posta para secar.

Para estudos de biologia molecular, os moluscos devem ser fixados em álcool a $\geq 90\%$.

Dissecação de planorbídeos para identificação específica

A técnica de dissecação descrita a seguir foi desenvolvida por Paraense e Deslandes na década de 1950 e é a utilizada no Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz. A técnica requer uma placa de Petri rasa, duas pinças de ponta fina e reta (ou dois estiletes), um pincel com cerdas finas e macias e um bom microscópio estereoscópico.

- a) Escolher um exemplar dentre os moluscos fixados e colocá-lo numa placa de Petri rasa, que contenha um pouco da solução fixadora. O molusco deve estar com o lado esquerdo, onde se localizam as aberturas genitais masculina e feminina, voltado para cima.

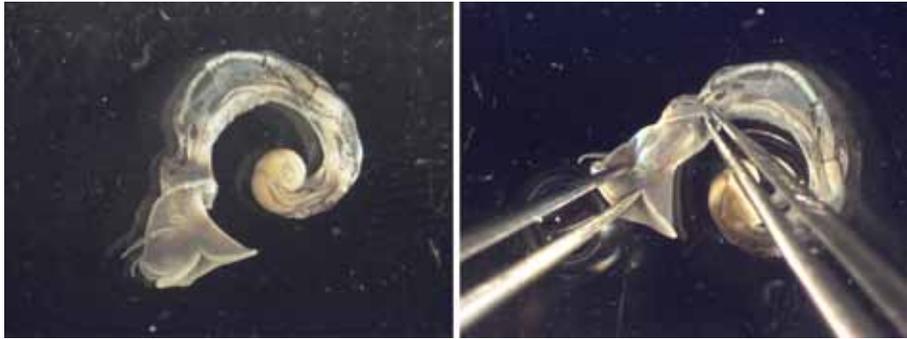


Figura 26. Exemplos de *Biomphalaria*, lado esquerdo, e mostrando as aberturas genitais masculina e feminina.

Fotos: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

b) Manter uma das pinças na região cefalopodal, para firmar o animal, enquanto a outra vai separando aos poucos a junção entre o manto e o músculo columelar, sempre pelo lado esquerdo, até a altura do estômago, onde o músculo termina. Repetir o procedimento com o lado direito do animal.



Figura 27. Exemplo de *Biomphalaria*, lado esquerdo, onde se vê o início da separação entre o manto e o músculo columelar.

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.



Figura 28. Exemplar de *Biomphalaria*, lado esquerdo, mostrando a separação do manto.

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

c) Feito isso, cuidadosamente desprega-se a parte anterior do manto, que se encontra presa ao colo. Obtêm-se, dessa forma, todo o manto destacado e os órgãos paliais – coração, pulmão e tubo renal – em condições de serem examinados.



Figura 29. Exemplar de *Biomphalaria*, lado esquerdo, mostrando a separação da parte anterior do manto, que se encontrava presa ao colo.

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

d) O gonoporo masculino encontra-se logo abaixo do tentáculo esquerdo, ao passo que o feminino localiza-se posteriormente, sob o colar do manto, próximo da abertura anal. Geralmente, é possível ver por transparência o prepúcio e o delicado canal deferente, próximo do gonoporo masculino. A dissecação do complexo peniano se inicia nessa região, retirando-se cuidadosamente o tegumento sobre o complexo e os músculos que o prendem, até que o prepúcio e parte do canal deferente fiquem bem expostos. O canal deferente é bem fino e de coloração esbranquiçada; o prepúcio é facilmente reconhecido por ser bem mais largo e apresentar coloração negra ou cinza escuro.



Figura 30. Exemplar de *Biomphalaria*, lado esquerdo, com o manto sendo rebatido, solto em ambos os lados.

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.



Figura 31. Exemplo de *Biomphalaria*, lado esquerdo, com o manto rebatido.

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.



Figura 32. Exemplo de *Biomphalaria*, lado esquerdo, com o manto retirado, mostrando o prepúcio e a abertura genital masculina (A) e o canal deferente (B), visto por transparência sob o tecido.

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.



Figura 33. Exemplo de *Biomphalaria*, lado esquerdo, mostrando a dissecção do complexo peniano.

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

e) Em seguida, com a pinça, puxar delicadamente o prepúcio e o canal deferente, até que fiquem completamente visíveis.

f) Para facilitar a dissecção do restante do sistema reprodutor, seccionar e separar a cabeça-pé, o esôfago, o reto e todo o músculo columelar, de forma que restem na placa apenas o sistema reprodutor e parte do sistema digestivo – estômago, intestino e glândula digestiva.



Figura 34. Exemplo dissecado de *Biomphalaria straminea*, evidenciando apenas o sistema reprodutor.

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

g) Com o auxílio da pinça e do pincel, retirar cuidadosamente o resto de manto, muco e hemolinfa que geralmente se encontram recobrendo o sistema reprodutor. Essa limpeza é necessária para a visualização das estruturas com importância taxonômica – como a bolsa vaginal, o enrugamento vaginal e os divertículos prostáticos.



Figura 35. Exemplar de *Biomphalaria straminea* mostrando o complexo peniano dissecado e o enrugamento vaginal (ev).

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

h) A glândula de albúmen, geralmente com coloração amarelada, encontra-se próxima ao *carrefour*, ou encruzilhada genital.

i) À encruzilhada genital segue-se o delicado ovispermiduto, que se dilata mais adiante, formando a vesícula seminal e o ovoteste, ou glândula hermafrodita, que ocupa os giros mais internos da concha. O ovispermiduto, apesar de muito fino, pode ser facilmente visto em todo seu trajeto até a vesícula seminal, passando pela face ventral do estômago e da glândula digestiva. Para dissecá-lo, basta que se vá retirando aos poucos a glândula digestiva e o estômago. A glândula digestiva e o ovoteste encontram-se recobertos por tegumento escuro (manto), que

deve ser retirado para facilitar a observação dos ácidos. Esses são geralmente menores no ovoteste do que na glândula digestiva e normalmente apresentam coloração branco-amarelada.



Figura 36. Exemplo de *Biomphalaria* com o sistema reprodutor dissecado.

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

j) Quando for necessário distinguir com maior clareza as ramificações e quantificar os ácidos do ovoteste ou dos divertículos prostáticos, utiliza-se o lugol como corante.

3.2 Gastrópodes terrestres

a) Manutenção dos moluscos em laboratório

- **Montagem e manutenção do terrário**

Utilizar um ou mais terrários de vidro com tampa, colocando-se um peso sobre a tampa para evitar que os moluscos fujam. A tampa de tela é a indicada, por permitir aeração e evitar exposição a insetos. Utilizar como substrato 5 cm de terra autoclavada e levemente umedecida com água.

A quantidade de animais por terrário varia de acordo com o tamanho, normalmente não excedendo 15 exemplares. O terrário deve ser identificado com uma etiqueta de papel vegetal contendo as informações da amostra: procedência, identificação específica, data da coleta e do recebimento dos moluscos e outros. O ideal é que essa etiqueta seja escrita a lápis.

Para a limpeza dos terrários, devem-se retirar os animais com o auxílio de uma pinça de metal e, caso haja exemplares mortos, eles devem ser descartados para evitar a morte dos demais. Lavar os moluscos em água corrente, somente para retirar algum possível excremento presente no corpo dos animais. Trocar a terra somente quando estiver muito encharcada, ou apenas homogeneizá-la com o auxílio de uma pinça de metal. Limpar as paredes do terrário com papel-toalha umedecido em água para remover o muco e os excrementos. Caso seja necessária a troca da terra, ela deve ser totalmente substituída, após a lavagem do terrário em água corrente, por terra estéril.



Figura 37. Terrários de vidro para a criação de moluscos terrestres no Laboratório de Referência Nacional em Malacologia Médica (LRNM), do Instituto Oswaldo Cruz.

Alimentação: diferentes tipos de hortaliças e legumes – como alface, agrião, pepino, agrião e cenoura – podem ser utilizados. Entretanto, os dois primeiros são mais utilizados nas criações em condições de laboratório. A quantidade varia de acordo com o tamanho e o número de animais dentro do terrário. Deve-se retirar o talo da alface e fatiar o pepino.

- **Pesquisa de formas larvais de helmintos – técnica de digestão artificial de moluscos modificada de Wallace e Rosen (1969)**

Essa técnica é utilizada para a pesquisa de larvas de *nematoides* *Angiostrongylus* spp.

Material necessário:

- a) Pinça dente de rato;
- b) Régua;
- c) Papel absorvente;
- d) Tesoura;
- e) Placas de Petri
- f) Frasco(s) de vidro;
- g) Caneta de retroprojeter;
- h) Microscópio estereoscópio;
- i) Centrífuga;
- j) Pipeta Pasteur;
- k) Solução de ácido clorídrico 0,7%;
- l) Luva de látex e jaleco descartável de manga comprida.

3) O molusco deve ser embrulhado em papel absorvente para evitar que muco e fragmentos de concha se espalhem quando ela for quebrada. Para separar o corpo do molusco (parte mole) da concha, ela deve ser quebrada com o auxílio de um martelo de ferro. O material é então desembulhado e, com o auxílio de uma pinça, retiram-se os fragmentos da concha.

4) Transferir a parte mole para a placa de Petri identificada e, com o auxílio de uma tesoura, cortá-la em pequenos pedaços. Transferir os pedaços para um frasco de vidro devidamente identificado, contendo a solução digestiva – ácido clorídrico a 0,7% – em temperatura ambiente. O material deve ser mantido por 6 horas sob essas condições para que a solução de ácido clorídrico atue, digerindo o tecido do animal.

5) Decorrido esse prazo, o material deve ser transferido para o aparelho de Baermann-Moraes (fig. 40). Antes de despejar a amostra, deve-se testar a vedação das borrachas, utilizando-se água, para evitar perda de material caso haja um vazamento. Os fragmentos de tecidos do molusco e o líquido devem ser transferidos para o aparelho, e os frascos que continham as amostras devem ser colocados sob o funil correspondente.



Figura 40. Amostras no aparelho de Baermann-Moraes.

- 6) Completar com água reagente tipo III; a água contida em cada funil deve cobrir os fragmentos contidos na gaze.
- 7) No dia seguinte, transferir uma alíquota do material (cerca de 10 mL) para um tubo Falcon, identificando-o com o número da amostra, e centrifugá-lo por 10 minutos numa rotação de 2.000 rpm. O material restante no funil deve ser mantido, caso seja necessário processá-lo posteriormente.
- 8) Após a centrifugação, desprezar o sobrenadante e, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, transferir uma alíquota do material para uma placa de Petri com fundo quadriculado, acrescentando água reagente tipo III, e examinar sob microscópio estereoscópio, com aumento maior ou igual a 25 vezes, à procura de larvas de nematoides.
- 9) Caso a amostra esteja muito escura, deve-se adicionar um pouco mais de água reagente tipo III, a fim de diluir o material e facilitar a visualização das larvas. A observação das larvas é feita, inicialmente, a fresco para observação de sua forma, estruturas, tamanho e movimento. Dependendo do interesse da pesquisa, as larvas podem ser fixadas em álcool 70% ou em fixador Railliet-Henry a quente ou podem ser separadas para sua inoculação em roedores. Após serem fixadas, as larvas de metastrongíldeos – como *Angiostrongylus* spp – geralmente assumem a forma de um “C”; já as de outros nematoides ficam retilíneas.
- 10) As larvas devem ser coletadas posteriormente com uma pipeta Pasteur e colocadas em tubos de criogênio etiquetados com a identificação da amostra.

Após o exame e o diagnóstico, os resíduos líquidos devem ser colocados em um frasco Erlenmeyer e aquecidos a 80°C por cerca de 15 minutos, antes do descarte. O material sólido contido na gaze deve ser autoclavado e descartado no lixo de risco biológico. Todo o material utilizado deve ser descontaminado em solução de hipoclorito de sódio a 10%.

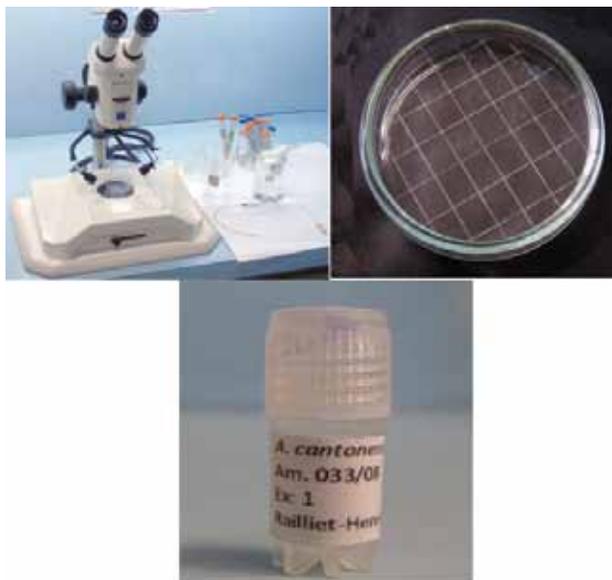


Figura 41. Observação da amostra sob o microscópio estereoscópio, detalhe da placa de Petri quadriculada para a pesquisa de larvas e tubo de criogênio contendo larvas fixadas.

3.3 Espécies exóticas continentais de importância médica e econômica

De acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), em todo o planeta, as espécies invasoras representam a segunda maior ameaça à biodiversidade, perdendo apenas para os desmatamentos. Além de prejudiciais do ponto de vista biológico, as espécies exóticas também podem causar perdas econômicas e danos à saúde humana. A seguir, apresentamos uma relação de alguns exemplos de moluscos introduzidos no Brasil.

- **Moluscos terrestres**

Helix aspersa Müller, 1774 e *Helix pomatia* Linnaeus, 1758: caracóis comestíveis europeus, conhecidos como *escargot*. *Helix aspersa* foi introduzido

no Brasil, provavelmente por imigrantes, no início do século XX. Na região Sul do país, ocorre em densas populações, em áreas urbanas e periurbanas, e tem causado destruição de hortas e jardins.

Achatina fulica Bowdich, 1822: caracol africano introduzido no Brasil na década de 1980 para ser utilizado na alimentação humana. Ocorre atualmente em quase todos os estados brasileiros, geralmente em densas populações, destruindo hortas, jardins e diversos tipos de cultivo, causando prejuízos e incômodo às comunidades afetadas. Além dos previsíveis impactos à fauna e à flora, essa espécie está envolvida na transmissão do *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935), nematoide responsável pela meningoencefalite eosinofílica, zoonose endêmica no sudeste asiático, porém com casos recentes no Brasil.

- **Moluscos límnicos**

Melanooides tuberculatus (Müller, 1774): molusco afro-asiático introduzido no Brasil provavelmente por meio do comércio de peixes e plantas aquáticas ornamentais. Atualmente é encontrado, tanto em tanques de piscicultura quanto em biótopos naturais, em vários estados brasileiros; forma populações extremamente densas e ocasiona, em alguns casos, o desaparecimento ou o deslocamento de espécies nativas. Estudos realizados no Brasil e no Caribe têm indicado a utilização de *Melanooides tuberculatus* em programas de controle biológico de espécies de *Biomphalaria* transmissoras da esquistossomose.

Limnoperna fortunei (Dunker, 1857) ou mexilhão-dourado: molusco bivalve asiático introduzido no sul do Brasil na década de 1990, junto com a água de lastro de navios. Além da ameaça à malacofauna nativa, o fato de ser encontrado em densas populações e fixo ao substrato tem causado prejuízos econômicos, principalmente ao setor de geração de energia.

Corbicula fluminea (Müller, 1774) e *Corbicula largillierti* (Philippi, 1844): moluscos bivalves, também de origem asiática, introduzidos na década de 1970 e atualmente encontrados em várias bacias hidrográficas brasileiras.

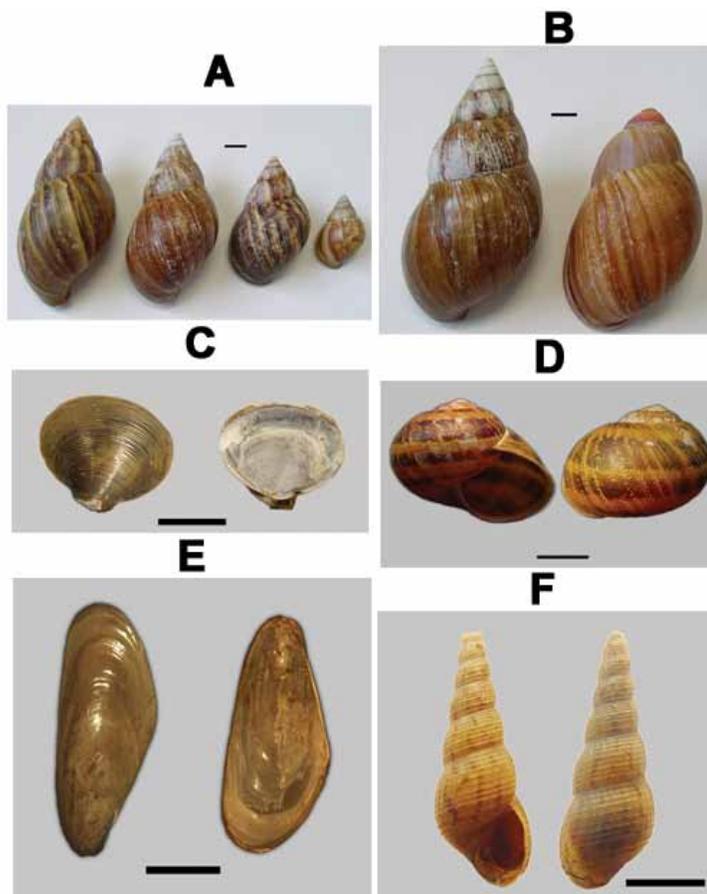


Figura 42. A) Exemplos de *Achatina fulica* com diferentes idades; B) Exemplos adultos de *Megalobulimus* sp (direita) e *Achatina fulica* (esquerda); C) *Corbicula largillierti*; D) *Helix pomatia*; E) *Limnoperna fortunei*; F) *Melanoides tuberculatus*. (Escala: 10 mm.)

Foto: Acervo do Laboratório de Malacologia/IOC–Fiocruz.

3.4 Procedimentos para o controle do molusco africano *Achatina fulica*

O controle do molusco africano, descrito a seguir, baseia-se nas instruções seguidas pelo LRNM, do IOC, e nas instruções normativas n° 73, de 18 de

agosto de 2005, e nº 109, de 3 de agosto de 2006, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama).

- **Identificação do molusco**

Ao perceber a presença de caracóis grandes, é muito importante certificar-se de que se trata do molusco africano, pois existem espécies nativas, ou seja, da nossa fauna, muito semelhantes. Nas figuras 42A e 42B podem ser observadas conchas de *Achatina fulica* de diferentes tamanhos e da espécie nativa *Megalobulimus* sp, frequentemente confundida com o molusco africano pelo seu grande tamanho. Em caso de dúvida sobre a identificação, o material deve ser enviado ao Ibama ou a universidades, centros de pesquisa e autoridades municipais – secretaria municipal de saúde, secretaria municipal de ambiente, defesa civil, entre outros –, observando-se o seguinte:

- os exemplares (pelo menos 5 ou 6) devem ser coletados protegendo-se as mãos com luvas ou sacos plásticos e colocados em álcool comercial; a concha vazia ou uma foto de boa qualidade também servem para a identificação;
- colocar uma etiqueta de papel escrita a lápis com a data da coleta, local e o nome do coletor no recipiente contendo os exemplares fixados no álcool.

Uma vez confirmada a identificação, entrar em contato com as autoridades acima citadas para comunicar a ocorrência do molusco africano e receber orientações sobre o procedimento de controle em sua cidade.

Importante: as espécies nativas que se assemelham a esse molusco raramente ocorrem em grandes populações, diferentemente dos moluscos africanos, o que constitui a principal fonte de problemas aos quais estão relacionados.

- **Controle do molusco africano em residências (jardins, hortas e quintais) ou bairros**

- Os moluscos devem ser coletados manualmente, utilizando-se luvas de borracha (ou similar) e, posteriormente, colocados em um recipiente, como balde ou saco plástico. Os melhores horários para o procedimento são pela manhã bem cedo ou no final da tarde, pois, como os demais moluscos terrestres, o molusco africano evita a exposição ao sol forte, que o desidrata. Para uma grande quantidade de exemplares, utilizar um martelo ou um instrumento similar a fim de quebrar bem as conchas dos moluscos coletados; em seguida, colocá-los num buraco no terreno; sempre que possível, jogar cal virgem por cima, para evitar a contaminação do lençol freático. Para quantidades menores, escolha uma dessas duas maneiras para matar e descartar:

- a) colocar os caramujos num recipiente com 6 colheres de sopa de sal em um litro de água, ou jogar apenas sal sobre eles. O sal causa danos ao ambiente, por isso não deve ser colocado diretamente no solo. Para o descarte, as conchas devem ser quebradas e colocadas em sacos de lixo.

- b) colocar os caramujos num recipiente com uma parte de cloro para três de água; manter os caramujos submersos por 24 horas. Quebrar as conchas, colocá-las em sacos plásticos bem fechados e jogá-las no lixo doméstico. É importante coletar também os ovos do molusco, que são encontrados semienterrados no solo. Os ovos são facilmente reconhecíveis: têm aproximadamente 5 mm de diâmetro, forma arredondada, casca calcária amarelada e geralmente são encontrados em grande número. Em seguida à busca e à coleta de ovos, esmagá-los bem e seguir o mesmo procedimento citado para os moluscos. Caso não seja possível enterrar os moluscos e os ovos coletados, depois de destruídos, todos devem ser colocados em sacos hermeticamente fechados, no lixo doméstico.

- O controle periódico dos moluscos é fundamental; para tanto, a operação deve ser repetida sempre que novos moluscos forem localizados. Um único molusco pode colocar até 400 ovos por desova, o que acarreta rápida reinfestação do ambiente.
- Recomenda-se que os procedimentos de controle sejam realizados em toda a área da infestação; isso requer coletas periódicas e, sempre que possível, a participação da comunidade (vizinhos, associações de moradores, ou do poder público).



Figura 43. Procedimentos para o controle de *Achatina fulica*: coleta adultos e ovos.

Importante:

- não utilize moluscidas ou venenos, pois são muito tóxicos e outros animais, ou mesmo pessoas, podem ser contaminados e até morrer;

- Também pode ser feita a incineração dos exemplares, desde que sejam tomados os devidos cuidados para evitar acidentes durante o procedimento ou mesmo para evitar que o fogo se espalhe. Mesmo quando os moluscos tenham sido incinerados, as conchas dos animais devem ser quebradas para que não se tornem criadouros de larvas de mosquitos, como os transmissores de dengue, malária e outros;
- não comer moluscos encontrados livres no ambiente crus ou malcozidos;
- o molusco africano não é um animal perigoso: ele não morde, não pica e não tem veneno. Como qualquer outro animal que vive livre em ambiente aberto, existe o risco de o molusco transmitir doenças para o homem, razão pela qual se recomenda o uso de luvas de borracha ao manuseá-los. Em caso de contato com o molusco ou de seu muco direto com a pele, basta lavar bem a área com água e sabão;
- para evitar a angiostrongilose abdominal e a meningoencefalite eosinofílica, o procedimento recomendado para a higienização de verduras, frutas e legumes consumidos crus são os que se seguem: lave bem esses alimentos em água corrente e deixe-os de molho por 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1% (1 colher de sopa de água sanitária diluída em 1 L de água filtrada). Também se deve evitar o consumo de moluscos, peixes ou crustáceos crus. Com esses procedimentos, é possível evitar, além de outros parasitos, a infecção por larvas de *Angiostrongylus* spp, eliminadas no muco deixado pelos moluscos, que podem contaminar os alimentos e causar as zoonoses acima citadas.

Referências bibliográficas

OLIVIER, L.; SCHNEIDERMAN, M. A Method for Estimating the Density of Aquatic Snail Populations. *Experimental Parasitology*, v. 5, n. 2, p. 109-117, 1956.

PARAENSE, Wladimir Lobato. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arquivos do Museu Nacional*, v. 55, p. 105-128, 1975.

WALLACE, G. D.; ROSEN, L. Techniques for Recovering and Identifying Larvae of *Angiostrongylus cantonensis* from Molluscs. *Malacologia*, v. 7, p. 427-438, 1969.

Bibliografia consultada

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). Instrução normativa n° 73, de 18 de agosto de 2005. Dispõe sobre a proibição, em todo o território brasileiro, da criação e comercialização de moluscos terrestres da espécie *Achatina fulica*, também conhecida como acatina, caracol-africano, caracol-gigante, caracol-gigante-africano, molusco-gigante, molusco-gigante-africano, falso-escargot ou rainha-da-África, bem como o de seus ovos. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, n. 161, seção 1, 22 ago. 2005.

_____. _____. _____. Instrução normativa n° 109, de 3 de agosto de 2006. Dispõe sobre o controle da fauna sinantrópica nociva e de seu manejo ambiental. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, 4 ago. 2006.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. *Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas* Programa de Controle da Esquistossomose (PCE). 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

CALDEIRA, Roberta L. et al. First Record of Molluscs Naturally Infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 887-889, 2007.

FERNANDEZ, Monica A.; THIENGO, Silvana C.; SIMONE, Luiz Ricardo L. Distribution of the Introduced Freshwater Snail *Melanooides tuberculatus* (Gastropoda: Thiaridae) in Brazil. *Nautilus*, v. 117, n. 3, p. 78-82, 2003.

GRAEFF-TEIXEIRA, Carlos; MORERA, Pedro. Método para a digestão de moluscos em ácido clorídrico para isolamento de larvas de metastrongilídeos. *Biociências*, v. 3, p. 85-89, 1995.

OLIVEIRA, Ana Paula M. et al. *Achatina fulica* como hospedeiro intermediário de nematódeos de interesse médico-veterinário em Goiás, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, v. 39, n. 3, p. 199-210, 2010.

PARAENSE, Wladimir Lobato. The Schistosome Vectors in the Americas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, supl., p. 7-16, 2001.

_____. *Biomphalaria occidentalis* sp n. from South America (Mollusca Basommatophora Pulmonata). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 76, n. 2, p. 199-211, 1981.

_____. A Genetic Approach to the Systematic of Planorbidae molluscs. *Evolution*, v. 10, n. 4, p. 403-407, 1956.

_____. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 53, n. 2-4, p. 277-284, 1955.

_____; DESLANDES, Newton. Observations on the Morphology of *Australorbis glabratus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 53, p. 87-103, 1955.

THIENGO, Silvana C. *Especialista comenta os riscos que os caramujos africanos podem representar para a população*. Rio de Janeiro: Fiocruz, [s.d.]. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?from_info_index=101&inford=770&sid=3. Acesso em: 10 jun. 2009.

_____. Helminthoses de interesse médico-veterinário transmitidas por moluscos no Brasil. In: SANTOS, Sonia B. et al. (org.) *Tópicos em malacologia*. Ecos do XVIII EBRAM. Rio de Janeiro: Corbã–Sociedade Brasileira de Malacologia, 2007.

_____. FERNANDES, Monica A. *Achatina fulica*: um problema de saúde pública? In: FISCHER, Marta Luciane; COSTA, Leny Cristina Milleo. *O caramujo gigante africano: Achatina fulica* no Brasil. Curitiba: Champagnat, 2010.

_____. et al. Rapid Spread of an Invasive Snail in South America: The Giant African Snail, *Achatina fulica*, in Brazil. *Biological Invasions*, v. 9, p. 693-702, 2007.

_____. et al. First Record of a Nemetode Metastrongyloidea (*Aelurostrongylus abstrusus* larvae) in *Achatina (Lissachatina) fulica* (Mollusca, Achatinidae) in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 98, p. 34-39, 2008.

_____. et al. The Giant African Snail *Achatina fulica* as Natural Intermediate Host of *Angisstrongylus cantonensis* in Pernambuco, Northeast Brazil. *Acta Tropica*, v. 115, p. 194-199, 2010.

ZANOL, Joana et al. O caramujo exótico invasor *Achatina fulica* (Stylommatophora, Mollusca) no estado do Rio de Janeiro (Brasil): situação atual. *Biota Neotropica*, v. 10, p. 447-451, 2010.

Elaboração das imagens

André Favaretto Barbosa, José Eduardo Prado e Pablo Menezes Coelho (Laboratório de Malacologia, IOC/Fiocruz); Genilton José Vieira e Rodrigo da Cunha Mexas (Laboratório de Produção e Tratamento de Imagem, IOC/Fiocruz).

