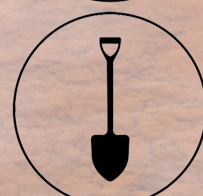




Especialização em Geomedicina



FUNDAMENTOS DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA

Janaina Massafra e Marly de Melo

Belém - Pará

2019



Universidade Federal do Pará
Assessoria de Educação a Distância



GEOMEDICINA
GEOLOGIA E SAÚDE

MÓDULO I

Disciplina: FUNDAMENTOS DE
MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA

Professores: Dra. Janaina Massafra
Dra. Marly de Melo

Coordenação Acadêmica do Curso:
Carolina Rosal Teixeira de Souza

Coordenação Geral do Programa de Pós-graduação Lato sensu:
Francisco de Assis Matos de Abreu

AEDI
2019



Apresentação da Disciplina

Prezado aluno (a),

Você está recebendo o material textual da disciplina de **Fundamentos de Microbiologia e Parasitologia**. Neste material você encontrará todo o conteúdo necessário para os estudos da disciplina. Temos a esperança que suas expectativas com relação a este curso estejam sendo, gradativamente, satisfeitas e que você venha adquirindo importantes fundamentos em Geomedicina.

A disciplina Fundamentos de Microbiologia e Parasitologia vem acrescentar mais uma parcela de conhecimentos ao seu acervo acadêmico. Trata-se de uma disciplina de um forte componente teórico que visa apresentar os principais agentes infecciosos relacionados ao ambiente, visto que a água, por exemplo, é considerado veículo hídrico responsável pela transmissão de um grande número de doenças. Este texto foi especialmente preparado para ajudá-lo (a) no entendimento dos principais fundamentos da disciplina e as atividades aqui propostas permitirão um maior relacionamento entre teoria e prática. A disciplina encontra-se dividida em quatro unidades didáticas.

Você terá oportunidade, nesta disciplina, de diferenciar os diferentes microorganismos e parasitas, identificar quais os mais relevantes no contexto da Geomedicina, assim como conhecer métodos de isolamento, detecção e cultivo da maioria destes agentes, deterá também potencial de argumentar e discutir estratégias de controle de contaminação no ambiente que interferem na saúde humana.

Bons estudos!

SUMÁRIO

		PÁGINA
1	INTRODUÇÃO À MICROBIOLOGIA (BACTÉRIAS E VÍRUS)	3
1.1	MICROBIOLOGIA, SAÚDE E MEIO AMBIENTE	3
1.2	MICROORGANISMOS: BACTÉRIAS E VÍRUS	5
2	PRINCIPAIS DOENÇAS INFECCIOSAS EM GEOMEDICINA	16
2.1	PRINCIPAIS AGENTES BACTERIANOS	16
2.2	PRINCIPAIS AGENTES VIRAIS	18
3	MICROORGANISMOS EM BIORREMEDIAÇÃO	20
4	DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO	25
4.1	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EM BACTERIOLOGIA	25
4.2	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EM VIROLOGIA	27
4.3	MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS AO DIAGNÓSTICO, DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS	29
5	GEOHELMINTOS	32
6	REFERENCIAS	49

1. INTRODUÇÃO À MICROBIOLOGIA (BACTÉRIAS E VÍRUS)

1.1. MICROBIOLOGIA, SAÚDE E MEIO AMBIENTE

A microbiologia é o estudo dos microorganismos (por vezes, coloquialmente chamados de micróbios), seres vivos muito pequenos para serem vistos a olho nu. Apesar do tamanho, minúsculo eles têm um enorme impacto em diversos âmbitos em termos de saúde e biotecnologia, pois podem auxiliar na manutenção do equilíbrio simbiótico dos seres vivos dando suporte a vida e podem também se comportar como ferramentas industriais. No entanto, se não controlados podem ser ameaças à saúde quando patogênicos, e, ainda, ameaçar o gado, as colheitas, deteriorar alimentos, nos fazer ficar doentes e até mesmo nos matar. Todavia, apenas uma pequena porcentagem de microorganismos são patogênicos, a fração de microorganismos causadores de doenças é muito menor que a fração de humanos que comete assassiantos, por exemplo, como assinalou o microbiologista norte-americano Otto Rahn. Então, a microbiologia descobriu maneiras de utilização desses outros microorganismos para melhorar a qualidade de nossas vidas.

No que diz respeito ao ambiente, estudos sobre como os microorganismos afetam o planeta e a atmosfera é chamado de microbiologia ambiental ou ecologia microbiana. Assim, ao longo dos anos fomos aprendendo a utilizar esses pequenos organismos para melhorar nossa vida. Por exemplo, umas das práticas mais antigas era fornecer água potável, palatável e segura. Mas é comum se perguntar: como isso pode ser possível? A resposta começa com um simples fato: as comunidades urbanas, as indústrias e atividades agrícolas produzem grandes quantidades de esgoto e resíduos químicos, poluindo o ambiente, inclusive a água. Os microorganismos entram neste contexto para purificar a água através de processos naturais de reciclagem da matéria orgânica, conseguindo degradar os compostos naturais.

Devido às pesquisas no âmbito da microbiologia agrícola, gado e plantas estão amplamente protegidos contra doenças microbianas. Microorganismos que matam insetos são utilizados como pesticidas naturais enquanto outros são utilizados para manter a fertilidade do solo. E, sem dúvidas, os maiores avanços em microbiologia industrial - assim como oportunidades econômicas, virão da aplicação de engenharia genética em problemas médicos, ambientais e agrícolas.

Os microorganismos são normalmente divididos em seis subgrupos: bactérias, arqueas, algas, fungos, protozoários e vírus. Estes subgrupos não estão relacionados de maneira próxima, apenas uma propriedade os conecta: seu tamanho pequeno.

Sabemos que a diversidade quanto à forma e função encontrada entre esses subgrupos é tão grande quanto a diversidade total dos seres vivos. Podemos destacar as bactérias, por exemplo, elas são menos semelhantes às arqueas, algas, fungos, protozoários e bactérias do que um tubarão é semelhante a uma girafa ou a uma orquídea é semelhante a uma água.

Mais uma vez, vem um questionamento em mente: então, qual o motivo destes seres tão diferentes serem agrupados em um contexto de estudo chamado microbiologia? Temos uma resposta prática: as técnicas para identificar, cultivar e estudá-los são de certo modo, semelhantes. A microbiologia como uma ciência, é coesa devido aos métodos e abordagens utilizadas em relação aos problemas, não em decorrência da relação direta entre os organismos em questão.

Ao se fazer a correlação entre microbiologia, meio ambiente e saúde, estão presentes as doenças infectoparasitárias (DIP) de veiculação hídrica. O consumo de água é vital ao seres humanos, portanto se configura como uma potencial forma de transmissão dos agentes causadores das DIP. A ingestão direta de água contaminada ocorre, principalmente, em locais onde não há sistema de abastecimento de água tratada, e os grupos populacionais fazem uso de minas, poços, bicas, ou então, utilizam água mineral de fontes contaminadas. Eventualmente, acidentes no sistema de abastecimento de água tratada, ou problemas em sua manutenção podem acarretar contaminações e causar doença na população que se serve do mesmo. Muitas dessas doenças causam diarreia aguda; segundo a OMS, 80% das diarreias agudas no mundo estão relacionadas ao uso de água imprópria para consumo, não tratada, a sistema de esgoto ausente ou inadequado ou a práticas de higiene insuficientes, especialmente em países ou áreas onde são precárias as condições de vida.

No Brasil, as condições de saneamento ambiental, apesar de apresentarem melhoras nos últimos anos, ainda são deficientes. Segundo dados da Pesquisa Nacional de Saneamento Básico, apenas 55% dos municípios brasileiros possuíam, em 2008, rede coletora de esgoto e, do total do esgoto coletado, apenas 68,8% passavam por algum tipo de tratamento antes de ser depositados nos corpos dos rios. Outros dados importantes da pesquisa indicam que até o referido ano o destino dos resíduos sólidos em 50,8% dos municípios eram os "lixões" e que em 12,8% dos municípios a água fornecida era apenas parcialmente tratada ou não passava por nenhum tipo de tratamento (6,6%). A falta de saneamento ambiental adequado é tida como uma das principais causas da poluição e da contaminação das águas para o abastecimento humano e está, portanto, contribuindo para os casos de doenças de veiculação hídrica (PAIVA, 2018)

As principais doenças relacionadas à ingestão de água contaminada podem ser classificadas quanto à sua etiologia: Bactérias - *Shigella* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Leptospira interrogans*; Vírus - Vírus da Hepatite A,

Rotavírus, Norovírus e Poliovírus (poliomielite – já erradicada no Brasil); Protozoários - *Cryptosporidium* spp, *Giardia* spp, *Entamoeba histolytica*. Algumas dessas doenças possuem alto potencial de disseminação, com transmissão de pessoa para pessoa (via fecal-oral), aumentando assim sua propagação na comunidade.

1.2. MICROORGANISMOS: BACTÉRIAS E VÍRUS

1.2.1 BACTÉRIAS

1.2.1.1 Morfologia e arranjo

Bactérias (do latim, *bacteria*, singular: *bacterium*) são organismos relativamente simples e de uma única célula (unicelulares). Como o material genético não é envolto por uma membrana nuclear, as células bactérias são chamadas de procariotos, palavra grega significando pré-núcleo. As células bacterianas apresentam uma entre as várias formas possíveis: os bacilos (em forma de bastão), ilustrado na Figura 1, os cocos (esféricos ou ovoides) e os espirilos (em forma de saca-rolha ou curvados) estão entre as formas mais comuns, mas algumas bactérias apresentam forma de estrela ou quadrada. As bactérias podem formar pares, cadeias, grupos ou outros agrupamentos; tais formações geralmente são características de um gênero particular ou uma espécie de bactérias. As bactérias são envolvidas por uma parede celular que é praticamente composta por um complexo de carboidrato e proteína chamado de peptidoglicano. (Por comparação, a celulose é a principal substância das paredes celulares de plantas e algas). As bactérias geralmente se reproduzem por divisão em duas células iguais; esse processo é chamado de fissão binária. Esta divisão é responsável pelos arranjos encontrados, de acordo com os planos de divisão as bactérias permanecem ligadas após a fissão binária, como duplas (dipococos, diplobacilos), cadeias (estreptococos, estreptobacilos), cachos (estafilococos, tétrades, sarcinas) ou até mesmo isolados.

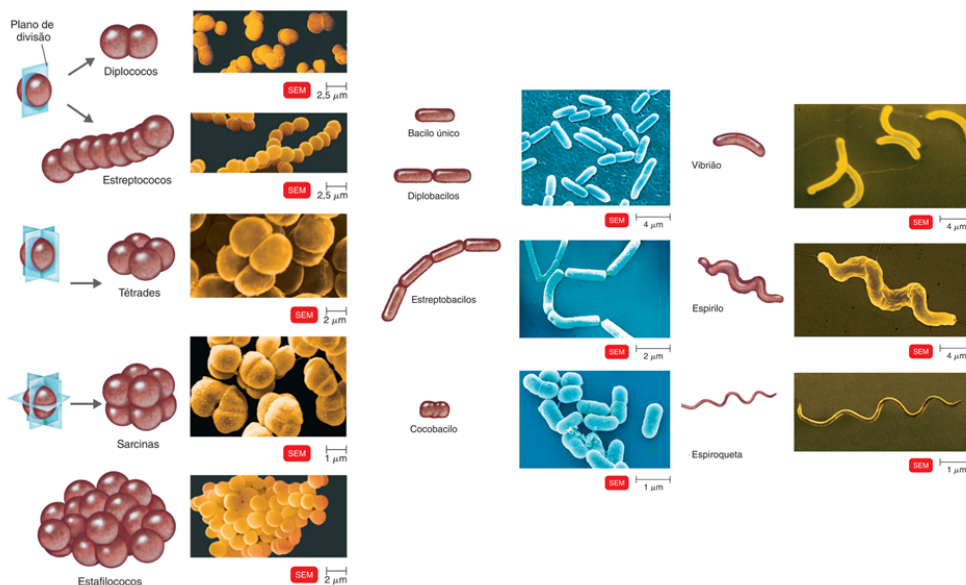


Figura 1: Morfologia e arranjo de cocos, bacilos e espirilos. Fonte: TORTORA, 2017.

1.2.1.2 Estrutura da célula bacteriana

Entre as estruturas externas da parede celular dos procariotos estão o glicocálice, os flagelos, as fimbrias e pili. Quanto às estruturas internas destacamos a membrana plasmática, ribossomos e o nucleóide, no qual está organizado o material genético bacteriano. Todas estas estruturas estão representadas na Figura 2.

O glicocálice bacteriano é um polímero viscoso e gelatinoso que está situado externamente à parede celular e é composto de polissacarídeo, polipeptídeo ou ambos. Em certas espécies, as cápsulas são importantes para a contribuição da virulência bacteriana (medida do grau com que um patógeno causa doença). As cápsulas frequentemente protegem as bactérias patogênicas da fagocitose pelas células do hospedeiro.

Algumas células procarióticas possuem flagelos, que são longos apêndices filamentosos que conferem motilidade às bactérias. Muitas bactérias gram-negativas contêm apêndices semelhantes a pelos que são mais curtos, retos e finos que os flagelos e que são usados mais para fixação e transferência de DNA entre bactérias que para mobilidade, são divididas em dois tipos, fimbrias e pili (no singular, pilus).

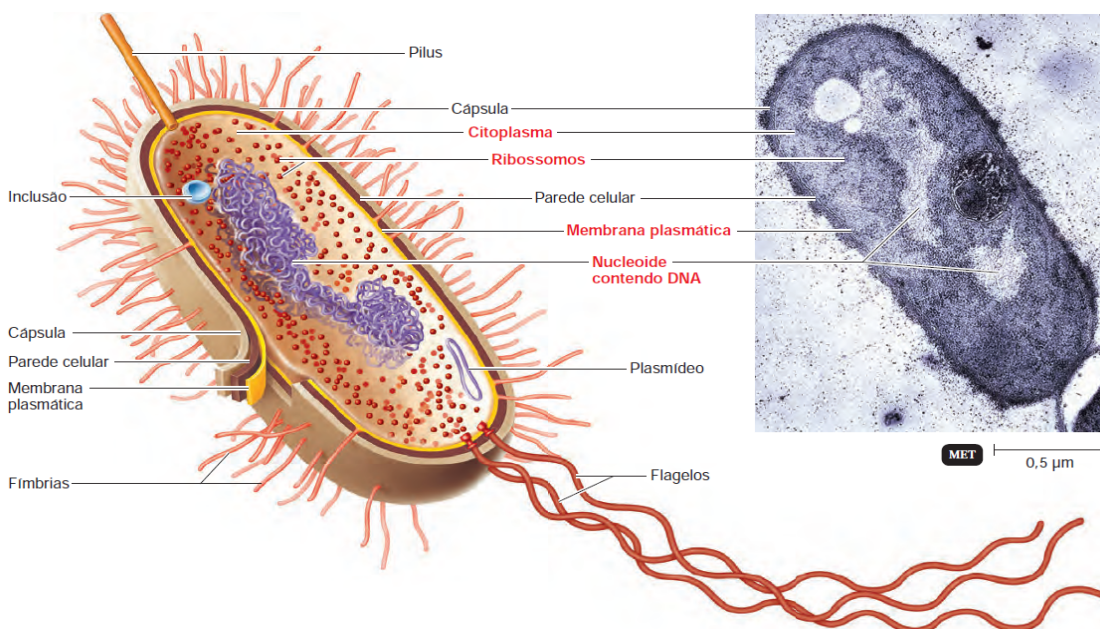


Figura 2: Estrutura da célula bacteriana. Fonte: TORTORA, 2017.

A parede celular merece destaque dentre as demais estruturas, pois ela é uma estrutura complexa, semirrígida, responsável pela forma da célula, A parede celular circunda a frágil membrana plasmática (membrana citoplasmática), protegendo-a e ao

interior da célula das alterações adversas no ambiente externo. A principal função da parede celular é prevenir a ruptura das células bacterianas quando a pressão da água dentro da célula é maior que fora dela. Ela também ajuda a manter a forma de uma bactéria e serve como ponto de ancoragem para os flagelos. À medida que o volume de uma célula bacteriana aumenta, sua membrana plasmática e parede celular se estendem conforme necessário. Clinicamente, a parede celular é importante, pois contribui para a capacidade de algumas espécies causarem doenças e também por ser o local de ação de alguns antibióticos. Além disso, a composição química da parede celular é usada para diferenciar os principais tipos de bactérias.

A parede celular bacteriana é composta de uma rede macromolecular denominada peptidoglicana, um esqueleto de açúcar com cadeias ligadas por polipeptídeos. A peptidoglicana consiste em um dissacarídeo repetitivo ligado por polipeptídeos para formar uma rede que circunda e protege toda a célula. A partir do conhecimento da composição da parede celular, podemos classificar as bactérias em dois grandes grupos: gram-positivas e gram-negativas, elas são assim definidas devido a uma técnica laboratorial chamada de Coloração de Gram, na qual as gram-positivas aparecem com coloração arroxeada, e as gram-negativas com coloração avermelhada (Figura 3).

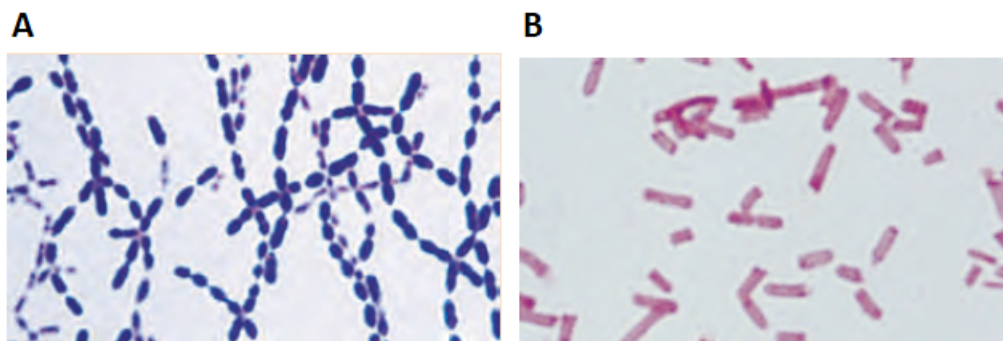


Figura 3: Características de coloração de bactérias gram-positivas (A) e gram-negativas (B). Fonte: TORTORA, 2017.

Na maioria das bactérias gram-positivas, a parede celular consiste em muitas camadas de peptidoglicana, formando uma estrutura espessa e rígida. Em contraste, as paredes celulares de gram-negativas contêm somente uma camada fina de peptidoglicana. Além disso, as paredes celulares das bactérias gram-positivas contêm ácidos lipoteicóicos e ácidos teicoicos, os quais por sua vez conferem parte da especificidade antigênica da parede e, portanto, tornam possível identificar bactérias gram-positivas utilizando determinados testes laboratoriais.

As paredes celulares das bactérias gram-negativas consistem em uma ou poucas camadas de peptidoglicana e uma membrana externa, As paredes celulares gram-

negativas não contêm ácidos teicoicos. Como as paredes celulares das bactérias gram-negativas contêm somente uma pequena quantidade de peptidoglicana, são mais suscetíveis ao rompimento mecânico. A membrana externa da célula gram-negativa consiste em lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e fosfolipídeos. A membrana externa tem várias funções especializadas. Sua forte carga negativa é um fator importante na evasão da fagocitose e nas ações do complemento fagocitose, dois componentes das defesas do hospedeiro. Tal membrana ainda representa uma barreira para certos antibióticos (por exemplo: penicilina), enzimas digestivas como a lisozima, detergentes, metais pesados, sais biliares e certos corantes. O LPS é de grande importância para este grupo de bactérias, pois é uma molécula grande e complexa que contém lipídeos e carboidratos que consiste em três componentes: (1) lipídeo A, (2) um cerne polissacarídico e (3) um polissacarídeo O. O lipídeo A é a porção lipídica do LPS e está embebido na parede superior da membrana externa. Quando bactérias gram-negativas morrem, elas liberam lipídeo A, que funciona como uma endotoxina. O lipídeo A é responsável pelos sintomas associados a bactérias gram-negativas, como febre, dilatação de vasos venosos, choque e formação de coágulos sanguíneos. O cerne polissacarídico é ligado ao lipídeo A e contém açúcares incomuns. Seu papel é estrutural- fornecer estabilidade. O polissacarídeo O se estende para fora do cerne polissacarídico e é composto por moléculas de açúcar. O polissacarídeo O funciona como um antígeno, sendo útil para diferenciar espécies de bactérias gram-negativas. Por exemplo, o patógeno alimentar *E. coli* O157:H7 é diferenciado dos outros sorovares por certos exames laboratoriais que procuram pelos antígenos específicos. Esse papel é comparável ao dos ácidos teicoicos nas células gram-positivas.

Exceção à classificação pela coloração de gram, temos as bactérias com paredes celulares atípicas. Entre os procariotos, certos tipos de células não possuem paredes ou têm pouco material de parede. Eles incluem os membros do gênero *Mycoplasma* e organismos relacionados. As bactérias do gênero *Mycobacterium* e espécies patogênicas de *Nocardia*, contêm alta concentração (60%) de um lipídeo céreo hidrofóbico (ácido micólico) em sua parede que previne a entrada dos corantes, incluindo os utilizados na coloração de Gram, são então conhecidas como álcool-ácidos resistentes e são corados por outro método.

A membrana plasmática (citoplasmática) (ou membrana interna) é uma estrutura fina, protéica e fosfolipídica, situada no interior da parede celular, revestindo o citoplasma da célula. A função mais importante da membrana plasmática é servir como uma barreira seletiva através da qual os materiais entram e saem da célula, ou seja, confere permeabilidade seletiva ou semipermeabilidade.

Para uma célula procariótica, o termo citoplasma refere-se a uma substância da célula no interior da membrana plasmática, cerca de 80% do citoplasma são compostos de água, contendo principalmente proteínas (enzimas), carboidratos, lipídeos, íons inorgânicos e compostos de peso molecular muito baixo. O citoplasma é

espesso, aquoso, semitransparente e elástico. As principais estruturas do citoplasma dos procariotos são: uma área nuclear, o nucleóide (contendo o DNA cromossomal e eventualmente, DNA plasmidial), as partículas denominadas ribossomos, responsáveis pela síntese protéica e os depósitos de reserva denominados inclusões.

1.2.1.3 *Metabolismo bacteriano e seus aspectos fisiológicos e ecológicos*

Para a sua nutrição, a maioria das bactérias usa compostos orgânicos encontrados na natureza derivados de organismos vivos ou mortos. Todas as formas de vida da terra necessitam de energia e carbono fixado (carbono incorporado em moléculas orgânicas) para sintetizar as macromoléculas que compõem suas células. Isso se aplica aos humanos, plantas, fungos, e também às bactérias. Os organismos vivos podem ser categorizados pelas formas de obtenção de energia e carbono.

Primeiro vamos categorizar os organismos pelo modo de obtenção do carbono fixado: Organismos que fixam carbono a partir do dióxido de carbono (CO₂) ou outro composto inorgânico são chamados de autotróficos; os organismos que obtêm carbono fixado a partir de compostos orgânicos sintetizados por outros organismos (alimentando-se deles ou de seus produtos) são chamados de heterotróficos.

Agora vamos categorizar organismos pelo modo de obtenção de energia: Organismos que usam a luz (principalmente do sol) como fonte de energia são chamados de fototróficos; já os organismos que utilizam compostos químicos como fonte de energia são chamados de quimiotróficos.

Este processo de obtenção de energia a partir de compostos orgânicos pode ocorrer a partir do catabolismo, ou seja a quebra de carboidratos, lipídeos e proteínas. No caso do catabolismo de carboidratos, tais como monossacarídeos ou polissacarídeos, pode ser realizado por dois processos na bactéria: respiração celular ou fermentação. Ambas as rotas metabólicas são antecidas por uma etapa de chamada glicólise, quebra da molécula de glicose. A glicose é o carboidrato fornecedor de energia mais comum utilizado pelas células, portanto os polissacarídeos devem sofrer hidrólise com suas respectivas enzimas, até a obtenção da glicose (Exemplo: lactose é dissacarídeo composto por glicose e galactose, a lactase realiza esta conversão e disponibiliza a glicose para as reações de catabolismo). Na respiração celular há a oxidação completa da glicose, tendo como resultado alto rendimento em liberação de energia e moléculas inorgânicas. Já na fermentação, ocorre a oxidação parcial da glicose, de forma que são gerados compostos orgânicos como álcool, ácidos e gases. Por este motivo o rendimento energético da fermentação é menor, as bactérias crescem mais lentamente, porém a indústria utiliza estes produtos em laticínios, fabricação de pães e bebidas alcoólicas. Esta energia é utilizada pelas bactérias em reações anabólicas, ou seja, reações de síntese de suas próprias macromoléculas, tais como proteínas, ácidos nucléicos, etc.

Outro aspecto metabólico em que os procariontes diferem dos humanos (além de serem muito mais diversificados que a gente) é a necessidade de oxigênio. O oxigênio é necessário para alguns, é tóxico para outros e ainda, facultativo para outros mais, dependendo da sua disponibilidade. Os procariontes que necessitam de O_2 para metabolizar são chamados de aeróbios obrigatórios. Os seres humanos também são aeróbios obrigatórios (quem já trancou a respiração por muito tempo sabe disso). Os procariontes que não toleram O_2 e só realizam metabolismo anaeróbio são chamados de anaeróbios obrigatórios. A *C. botulinum*, bactéria que causa o botulismo (um tipo de intoxicação alimentar) quando cresce em comida enlatada, é um anaeróbio obrigatório - e por isso ela se multiplica tão bem dentro de latas seladas. Os anaeróbios facultativos usam o metabolismo aeróbico quando

O O_2 está presente, mas mudam para o metabolismo anaeróbico se ele está ausente.

Alguns exemplos fascinantes de procariontes que metabolizam enxofre são encontrados em ecossistemas das profundezas do mar. Por exemplo, certas espécies de procariontes conseguem oxidar o sulfeto de hidrogênio H_2S de tubulações hidrotermais quentes. Elas usam a energia liberada nesse processo para fixar o carbono inorgânico da água em açúcares e outras moléculas orgânicas em um processo chamado quimiossíntese. Procariontes que metabolizam enxofre formam a base das cadeias alimentares dos habitats das profundezas do mar (onde nem o mais fino raio de luz consegue chegar para propiciar a fotossíntese). Os metabolizadores de enxofre mantêm comunidades inteiras de organismos, incluindo vermes, caranguejos e camarões, a milhares de metros abaixo da superfície do oceano.

A constante reciclagem dos elementos químicos é vital para o funcionamento dos ecossistemas. Nos ciclos biogeoquímicos da Terra, elementos químicos são convertidos em várias formas diferentes em um ciclo repetitivo. Em virtude de seus diversos metabolismos, procariontes desempenham papéis importantes em muitos ciclos globais. Aqui, examinaremos mais atentamente às suas funções em dois destes: os ciclos do nitrogênio e do carbono. Os procariontes fixadores de nitrogênio convertem ("fixam") nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3). Plantas e outros organismos podem usar a amônia para construir moléculas como aminoácidos e nucleotídeos. Outros procariontes no solo, as bactérias nitrificantes, convertem a amônia em outros tipos de compostos (nitratos e nitritos), que podem também ser absorvidos pelas plantas. Procariontes também são importantes no ciclo do carbono. Procariontes fotossintéticos, tais como cianobactérias, usam a energia da luz para remover CO_2 da atmosfera e fixá-lo em moléculas orgânicas, processo básico também realizado pelas plantas fotossintéticas. Decompositores procariontes, por outro lado, deslocam o carbono na direção oposta. Quando eles degradam matéria orgânica morta (de plantas e animais

anteriormente vivos), eles retornam CO₂ para a atmosfera via respiração celular. A decomposição também libera uma variedade de outros elementos e moléculas inorgânicas para reuso.

1.2.1.4 Crescimento bacteriano

Quando falamos em crescimento microbiano, estamos nos referindo ao número de células, não ao tamanho delas. Os micro-organismos que crescem estão aumentando em número e se acumulando em colônias (grupos de células que podem ser visualizados sem a utilização de um microscópio) de centenas ou milhares de células ou populações de bilhões de células. As populações microbianas podem ficar muito grandes em um espaço de tempo muito curto, então entendendo as condições necessárias para o crescimento microbiano, podemos determinar como controlar o crescimento dos micro-organismos que causam doenças ou deterioração de alimentos. Podemos também aprender como estimular o crescimento de micro-organismos benéficos e também utilizar tais técnicas para identificação e diagnóstico.

Iremos conhecer os fatores físicos e químicos para o crescimento microbiano, os vários tipos de meios de cultura, a divisão da célula bacteriana, as fases de crescimento e os métodos utilizados para determinar o crescimento microbiano.

Fatores Físicos

Dentre os fatores físicos destacam-se: temperatura, pH e pressão osmótica. Quanto à temperatura, a maioria dos micro-organismos cresce bem nas temperaturas ideais para os seres humanos. Contudo, certas bactérias são capazes de crescer em extremos de temperatura que certamente impediriam a sobrevivência de quase todos os organismos eucarióticos. Os micro-organismos são classificados em três grupos principais com base em sua faixa preferida de temperatura: em psicrófilos (crescem em baixas temperaturas), mesófilos (crescem em temperaturas moderadas) e termófilos (crescem em altas temperaturas). A maioria das bactérias cresce em uma faixa limitada de temperatura, sendo que há somente 30°C de diferença entre a temperatura máxima e a mínima de crescimento. Elas crescem pouco nas temperaturas extremas considerando sua faixa ideal. Cada espécie bacteriana cresce a uma temperatura mínima, ótima e máxima específica. A temperatura mínima de crescimento é a menor temperatura na qual a espécie pode crescer, a temperatura ótima de crescimento é a temperatura na qual a espécie cresce melhor, e a temperatura máxima de crescimento é a maior temperatura na qual o crescimento é possível. Este fator está diretamente relacionado à atividade enzimática nas bactérias, já que a temperatura tem influência sobre a ação destas moléculas na catálise de reações.

O pH (potencial hidrogeniônico) se refere à acidez ou alcalinidade de uma solução. A maioria das bactérias cresce melhor em uma faixa estreita de pH perto da

neutralidade, entre pH 6,5 e 7,5. Poucas bactérias crescem em um pH ácido abaixo de 4. Essa é a razão pela qual muitos alimentos como o chucrute, os pickles e muitos queijos são protegidos da deterioração pelos ácidos produzidos pela fermentação bacteriana. No entanto, algumas bactérias, chamadas de acidófilas, são resistentes à acidez. Um tipo de bactéria quimioautotrófica, encontrada na água de drenagem das minas de carvão e que oxida enxofre para formar ácido sulfúrico, pode sobreviver em pH 1. Os fungos e as leveduras crescem em uma faixa maior de pH que as bactérias, mas o pH ótimo dos fungos e das leveduras geralmente é menor que o bacteriano, entre pH 5 e 6. A alcalinidade também inibe o crescimento microbiano, mas raramente é utilizada para preservar os alimentos. Quando bactérias são cultivadas no laboratório, elas com frequência produzem ácidos que algumas vezes interferem com o seu próprio crescimento. Para neutralizar os ácidos e manter o pH apropriado, tampões químicos são incluídos no meio de cultura. As peptonas e os aminoácidos atuam como tampões em alguns meios, e muitos meios também contêm sais de fosfato. Os sais de fosfato têm a vantagem de exibir o seu efeito de tampão na faixa de pH de crescimento da maioria das bactérias. Eles também não são tóxicos; de fato, eles fornecem fósforo, um nutriente essencial.

O fator pressão osmótica está relacionado ao fato de que os micro-organismos obtêm a maioria dos seus nutrientes da água presente no seu meio ambiente. Portanto, eles requerem água para seu crescimento, sendo que sua composição é de 80 a 90% de água. Pressões osmóticas elevadas têm como efeito remover a água necessária para a célula. Quando uma célula microbiana está em uma solução cuja concentração de solutos é mais elevada que dentro da célula (o ambiente é hipertônico), a água atravessa a membrana celular para o meio com a concentração mais elevada de soluto. Concentrações elevadas destes solutos, que podem ser sal ou açúcar, por exemplo, removem a água de qualquer célula microbiana presente e conseqüentemente impedem seu crescimento. Esses efeitos da pressão osmótica estão em parte relacionados com o número de moléculas e íons dissolvidos em um volume de solução.

Fatores Químicos

Nesta categoria destacam-se: Carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, elementos traços, oxigênio e fatores de crescimento orgânicos.

O carbono é um dos fatores mais importantes para o crescimento microbiano, além da água. Ele constitui o esqueleto estrutural da matéria viva, é necessário para todos os compostos orgânicos. Metade do peso seco de uma célula bacteriana é composto por carbono. Além deste elemento, os microorganismos necessitam de nitrogênio, enxofre e fósforo em quantidades consideráveis, para sintetizar material celular, como aminoácidos, DNA e RNA e a molécula de ATP, importante carreadora de energia nas reações. Quando nos referimos a elementos traços, significa dizer que

estes são requeridos em pequenas quantidades, como molibdênio, cobre, ferro, zinco. Boa parte destes são utilizados nas reações enzimáticas como cofatores, portanto devem estar presentes para o crescimento bacteriano *in natura* e *in vitro*.

A relação entre as bactérias e o oxigênio já foi comentada, mas cabe ressaltar que para as bactérias que não crescem na presença deste gás, ele pode até mesmo ser um gás venenoso, são as anaeróbicas obrigatórias. Tais bactérias possuem seus sistemas metabólicos adaptados à ausência de O₂. Já para os aeróbicos obrigatórios requerem oxigênio para viver.

1.2.2 VÍRUS

Os vírus são os menores e mais simples microorganismos que existem, muito menores que células eucariotas e procariotas. Uma das, senão a principal característica destes microorganismos é que estes não possuem metabolismo próprio, ou seja, dependem da maquinaria celular para a sua replicação (parasitas intracelulares obrigatórios). Possuem DNA (ácido desoxiribonucléico) ou RNA (ácido ribonucléico) como genoma, mas não possuem ribossomos e outros fatores necessários para a produção de proteínas. Por isso necessitam das funções e do metabolismo celular do hospedeiro para produzir suas proteínas e se multiplicar, como por exemplo a enzima polimerase ou a transcriptase reversa (Figura 4). Deste modo, o genoma viral, codifica informações mínimas para garantir a sua replicação; empacotar o seu genoma e subverter funções celulares em seu benefício. Alguns vírus infectam células procariotas (bacteriófagos); outros infectam células eucariotas, sejam elas de vegetais, animais e até mesmo fungos (Exemplo: algumas espécies de micovírus). Certos agentes viais causam enfermidades pois destroem as células infectadas, outros, porém persistem em estado latente na célula, enquanto que outros podem causar transformação tumoral nas células infectadas.

1.2.2.1. Características gerais, estrutura e taxonomia viral

Os vírus são compostos por um genoma ou Núcleo (RNA ou DNA), um capsídeo (formado por capsômeros), este conjunto de núcleo mais capsídeo é denominado nucleocapsídeo. A função do capsídeo é empacotar e proteger o genoma viral durante a sua transferência entre células e hospedeiros. Após esta estrutura está o envelope viral (glicoproteínas). Os vírus envelopados contêm uma membrana externa que recobre o nucleocapsídeo (Fig.1.2), esta membrana externa (ou envelope) é derivada de membranas da célula hospedeira (nuclear, do aparelho de Golgi, do retículo endoplasmático ou membrana plasmática). Muitas vezes as glicoproteínas formam "espículas" (projeções a partir do envelope). Quanto à forma os vírus são muito diversos, , as estruturas completas estão ilustradas na Figura 4. Sobre a simetria, podemos classificá-los em: Icosaédrica ou cúbica (picornavírus, parvovírus,

adenovírus); Helicoidal (rhabdovírus, filovírus, bunyavírus); Complexa (somente os poxvírus).

O genoma dos vírus codifica dois tipos de produtos: as proteínas estruturais e as não-estruturais. As proteínas estruturais são aquelas que fazem parte da estrutura física da partícula vírica (capsídeo, envelope), enquanto as proteínas não-estruturais são produzidas dentro da célula infectada e desempenham diferentes funções na replicação viral. O número de proteínas codificadas pelos vírus varia amplamente, desde poucas até centenas.

Os vírus constituem um grupo numeroso e heterogêneo. São classificados em categorias hierárquicas baseadas em várias características. A classificação é dinâmica, já que novos vírus estão sendo continuamente descobertos; e novas informações se acumulam sobre os vírus já conhecidos. A classificação e nomenclatura quando sofrem alterações, podem se verificadas em informativos periódicos do Comitê Internacional para Taxonomia Viral (ICTV).

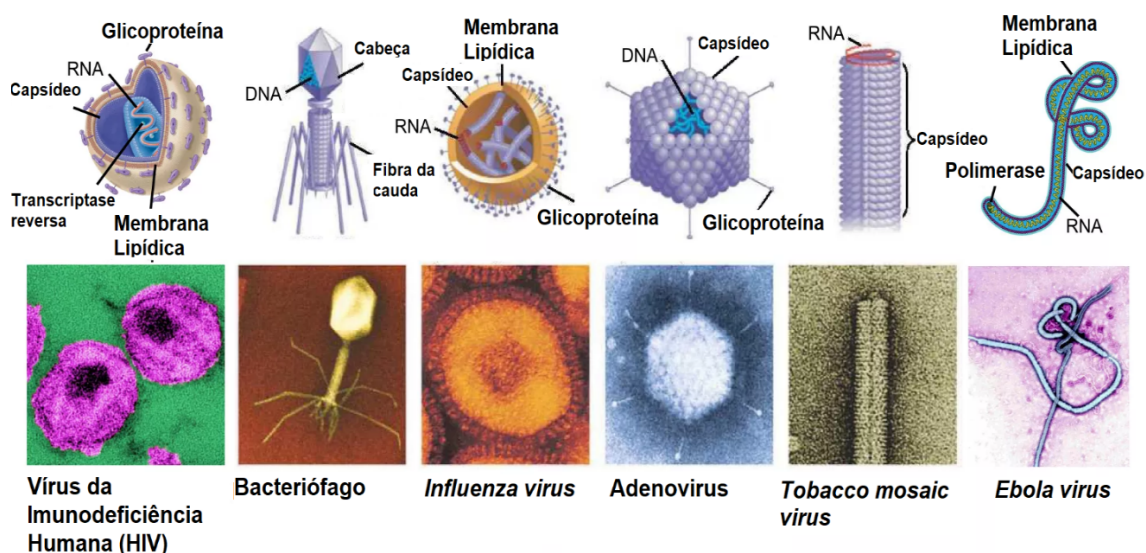


Figura 4: Diversidade estrutural dos vírus. Fonte: Site Orbitbiotech (2018).

O esquema básico de classificação hierárquica é: ordem, família, subfamília, espécie, cepa. Determinadas características virais definem cada uma dessas categorias taxonômicas. As Ordens possuem o sufixo: virales; as famílias possuem o sufixo: viridae; e os gêneros e espécies: virus. Uma espécie de vírus é representada por uma linhagem replicativa que ocupa um nicho ecológico, por exemplo, uma enfermidade particular. Os vírus são classificados em famílias com base em muitas características. Uma característica básica é o tipo de ácido nucléico (DNA ou RNA) e a morfologia, ou seja, o tamanho e forma do vírion, assim como a presença ou não do envelope. O espectro de hospedeiros e as propriedades imunológicas (sorotipos) também são utilizados. Propriedades físico-químicas como massa molecular, densidade, inativação

térmica, estabilidade ao pH e sensibilidade a solventes também são utilizados na classificação viral. Alguns aspectos importantes na taxonomia atual são o tipo de ácido nucléico, se o genoma possui cadeia dupla ou simples, a organização dos genes no genoma e a presença de determinados genes. Essas características são utilizadas para classificarem-se os vírus em ordens ou famílias.

1.2.2.2 Patogenia e resposta do hospedeiro

As barreiras físicas e químicas fazem parte da resposta inata ou natural (pele, pH ácido membranas mucosas, epitélio ciliado, dentre outros) sendo inerentes a cada hospedeiro ao nascer. Essas barreiras previnem ou limitam a infecção. Qualquer comprometimento na integridade de uma dessas barreiras permite ao vírus ter acesso às células do hospedeiro. Por outro lado, devido ao seu ciclo replicativo, alguns vírus são capazes de ultrapassar essas barreiras facilmente. O organismo responde através de mecanismos do sistema imune, e gera respostas inespecíficas, como febre e inflamação, que ocorrem em qualquer infecção viral. Essas respostas servem principalmente para limitar a disseminação do vírus a partir do sítio de infecção, impedir a replicação viral e auxiliar a resposta imunológica específica num ataque direcionado contra o vírus. A resposta imunológica específica é moldada e dirigida especificamente contra o respectivo patógeno. Leva vários dias a várias semanas para se desenvolver. Portanto, o organismo depende das respostas inespecíficas para limitar a infecção até que os mecanismos específicos tenham sido produzidos. A

resposta imunológica específica pode ser humoral (produção de anticorpos) ou mediada por células. Em algumas situações, a infecção viral resulta em imunopatologia característica ou induz imunossupressão.

Alguns vírus, pelo seu mecanismo de replicação utilizado são capazes de escapar do sistema imune do hospedeiro. Existem vários mecanismos através dos quais isto pode ocorrer durante a infecção, como por exemplo a variabilidade antigênica dos vírions e inibição do processamento de peptídeos, desta forma a infecção consegue se estabelecer.

2. PRINCIPAIS DOENÇAS INFECCIOSAS EM GEOMEDICINA

2.1 PRINCIPAIS AGENTES BACTERIANOS

2.1.1 Escherichia coli

A maioria das linhagens de *Escherichia coli* não é patogênica, sendo membros comuns da microbiota entérica do colo de seres humanos. Contudo, poucas linhagens são potenciais patógenos transmitidos por alimentos, e ocasionalmente pela água, e produzem potentes enterotoxinas. Estas linhagens patogênicas são agrupadas com base no tipo de toxina que produz em nas doenças específicas que acarretam. Embora não façam parte do grupo dos principais patógenos causadores de infecções de origem alimentar, as linhagens de *E. coli* patogênicas provocam sintomas de doença tão graves, que muitas vezes necessitam de hospitalização. Assim, as infecções por *E. coli* patogênicas podem ocasionar doenças diarreicas que oferecem risco a vida e problemas no trato urinário.

2.1.2 Shigella sp.

Análises genômicas sugerem que *Shigella* e *Escherichia* permutaram uma grande quantidade de genes por transferência horizontal de genes. No entanto, contrariamente a *Escherichia*, *Shigella* é geralmente patogênica para o homem, provocando uma gastroenterite grave, denominada disenteria bacilar. A *Shigella dysenteriae*, transmitida por água e alimentos, é um bom exemplo disso. Esta bactéria, que contém endotoxina, invade as células epiteliais intestinais, onde excreta uma neurotoxina que causa desarranjo gastrintestinal agudo.

2.1.3 Salmonella

A *Salmonella typhi* pode causar uma doença grave, chamada febre tifóide. Evolui, geralmente, num período de quatro semanas. Do momento em que a pessoa adquire a infecção até o aparecimento dos primeiros sintomas, decorrem de cinco a 23 dias (período de incubação). A fonte de infecção é o doente, desde o instante em que ingeriu os bacilos até muitos anos depois, já que os bacilos persistem em suas fezes. A febre paratifoide é mais rara que a tifoide. Produzida pela *Salmonella paratyphi* dos tipos "A", "B" ou "C", sua fonte de infecção é a mesma da febre tifoide: doentes e portadores. A doença se transmite pelas descargas do intestino (fezes), que contaminam as mãos, as roupas, os alimentos e a água. O bacilo tifoide é ingerido com os alimentos e a água contaminada.

2.1.4 Vibrio cholerae

Este microorganismo é causador da cólera, uma doença causada pelo micróbio *Vibrio cholerae*, que se localiza no intestino das pessoas, provocando, nos casos graves, diarreia e vômitos intensos. Em decorrência das diarreias e dos vômitos, o indivíduo perde grande parte dos líquidos de seu organismo, ficando desidratado rapidamente. Se não for tratada logo, essa desidratação pode levar o doente à morte em pouco tempo.

2.1.5 Leptospira interrogans

Leptospira interrogans é uma espécie de bactéria espiroqueta, gram-negativa aeróbica obrigatória, com flagelos periplásmicos. Quando vista através de um microscópio óptico se assemelha a um ponto de interrogação, e isso dá a espécie seu nome. São parecidos com os de outras doenças como gripe, febre amarela, dengue, malária, hantavirose e hepatites. Os principais são: febre, dor de cabeça, dores pelo corpo, principalmente nas panturrilhas (batata-da-perna). Em 10% dos casos, pode ocorrer a forma grave da doença, com o aparecimento de icterícia (coloração amarelada da pele e das mucosas) por insuficiência hepática, manifestações hemorrágicas (equimoses, sangramentos em nariz, gengivas e pulmões) e comprometimento dos rins. A evolução para o coma e a morte pode ocorrer em cerca de 10% das formas graves. Os primeiros sintomas aparecem de dois a 30 dias depois do contato com a contaminação. Na maior parte dos casos, aparece sete a 14 dias após o contato. A transmissão ocorre, principalmente, através do contato com a água ou lama de enchentes contaminadas com urina de animais portadores, sobretudo os ratos. A penetração da *Leptospira* no corpo, através da pele, é facilitada pela presença de algum ferimento ou arranhão. Também pode ser transmitida por ingestão de água ou alimentos contaminados. Evitar o contato com água ou lama que possam estar contaminados pela urina de rato. Pessoas que trabalham na limpeza de lama, entulhos e desentupimento de esgoto devem usar botas e luvas de borracha. Medidas ligadas ao meio ambiente, tais como o controle de roedores, obras de saneamento básico (abastecimento de água, lixo e esgoto) e melhorias nas habitações humanas também ajudam na prevenção.

2.2 PRINCIPAIS AGENTES VIRAIS

2.2.1 Vírus da Hepatite A e E

Os vírus da hepatite A e E, embora ocasionalmente sejam transmitidos por contato, são mais comumente transmitidos por alimentos (vírus da hepatite A) ou água (vírus da hepatite E). A hepatite A é uma doença contagiosa, e também conhecida como "hepatite infecciosa". Sua transmissão é fecal-oral, por contato entre indivíduos ou por meio de água ou alimentos contaminados pelo vírus. A doença é totalmente curável quando o portador segue corretamente todas as recomendações médicas. Na maioria dos casos, a hepatite A é uma doença de caráter benigno. Causa insuficiência hepática aguda grave e pode ser fulminante em menos de 1% dos casos. De ocorrência rara no Brasil e comum na Ásia e África, a hepatite do tipo E é uma doença infecciosa viral e sua transmissão é fecal-oral, por contato entre indivíduos ou por meio de água ou alimentos contaminados pelo vírus

2.2.2 Rotavírus

Rotavírus é um gênero de vírus de RNA da família Reoviridae. É uma das principais causas de diarreia grave em lactentes e crianças jovens, e é um dos diversos vírus que causam infecções comumente chamadas de gastroenterites. Os rotavírus, astrovírus e o vírus da hepatite A compõem a maior parte das infecções virais remanescentes transmitidas por alimentos. Esses vírus habitam o intestino, sendo frequentemente transmitidos por meio de alimentos ou água contaminados com matéria fecal.

2.2.3 Norovírus

Cerca de 70% das infecções anuais de origem alimentar nos Estados Unidos são causadas por norovírus. O vírus apresenta RNA fita-simples, sentido positivo, sendo relacionado com os poliovírus. Em um panorama geral, doenças transmissíveis por alimentos, causadas por norovírus, são caracterizadas por diarreia, frequentemente acompanhada de náuseas e vômitos. A recuperação das infecções por norovírus é geralmente rápida e espontânea, geralmente em 24 a 48 horas (portanto, a doença é muitas vezes chamada de "o bug de 24 horas").

2.2.4 Poliovírus

A poliomielite é uma doença infecto-contagiosa aguda, causada por um vírus que vive no intestino, denominado Poliovírus. Embora ocorra com maior frequência em

crianças menores de quatro anos, também pode ocorrer em adultos. Uma pessoa pode transmitir diretamente para a outra. A transmissão do vírus da poliomielite se dá através da boca, com material contaminado com fezes (contato fecal-oral), o que é crítico quando as condições sanitárias e de higiene são inadequadas. Crianças mais novas, que ainda não adquiriram completamente hábitos de higiene, correm maior risco de contrair a doença. O Poliovírus também pode ser disseminado por contaminação da água e de alimentos por fezes.

3. MICRORGANISMOS NA BIORREMEDIÇÃO

A discussão sobre combustíveis está em alta no Brasil. Em maio de 2018, caminhoneiros de todo o país iniciaram uma paralisação motivada, principalmente, pelo aumento do preço do diesel, o que afetou o abastecimento de produtos e causou prejuízos para alguns setores. Mas os impactos dos combustíveis vão muito além dos aspectos econômicos. Eles geram um custo ambiental elevado: segundo o último relatório da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb), há 5.942 áreas com algum grau de contaminação no estado, sendo 72% delas em decorrência da atividade de postos de combustíveis. A recuperação dessas áreas conta com aliados muito importantes, mas pouco lembrados: os microrganismos.

Bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter* e *Achromobacter* são exemplos de microrganismos capazes de degradar petróleo e seus derivados por um processo conhecido como biorremediação. Além das bactérias, fungos e plantas também são utilizados para remover ou degradar contaminantes ambientais (Figura 5).

A contaminação por petróleo, metais pesados, agrotóxicos, esgoto e outros resíduos também pode ser revertida com a aplicação dessa técnica versátil e, muitas vezes, mais barata e ecologicamente sustentável do que as técnicas tradicionais.

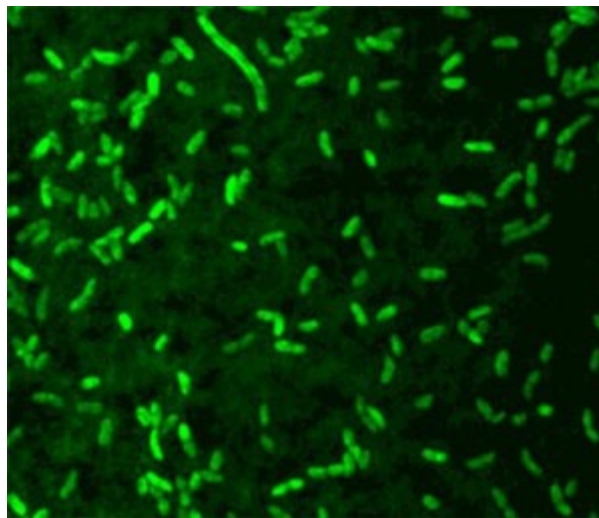


Figura 5: Microrganismos que estão naturalmente no ambiente são elementos importantes na degradação do petróleo, transformando-o em gás carbônico e água. Fonte: Fisheries and Oceans, Canada.

Comparada a outros métodos físicos e químicos, a biorremediação se destaca por otimizar processos que já ocorrem naturalmente. Os microrganismos presentes nas áreas contaminadas são resistentes às condições alteradas pelos poluentes, e muitas das espécies têm mecanismos para transformar ou incorporar o contaminante. Elen

Aquino, pesquisadora da Unifesp e do Centro de Pesquisa em Meio Ambiente da USP (Cepema), explica que, por essa razão, a busca por organismos biorremediadores é realizada em locais com contaminação comprovada, pois nessas áreas o conjunto de bactérias (microbiota) já está adaptado ao contaminante de interesse. *“Amostras do ambiente contaminado são coletadas, e os microrganismos são selecionados e criados em laboratório – etapa que pode variar de dias a meses, dependendo da toxicidade do poluente e da biodiversidade contida na amostra ambiental. Depois, os microrganismos passam para um reator industrial, para aumento de escala e geração de um produto biotecnológico, etapa geralmente realizada por empresas da área de saneamento”*, diz Aquino.

Depois que os microrganismos com potencial são encontrados, a aplicação da biorremediação se dá de duas formas. A primeira delas é baseada no princípio da bioestimulação, utilizando microrganismos do próprio local contaminado e estimulando sua atividade com a adição de nutrientes, oxigênio e outros compostos.

Em locais onde os microrganismos nativos são insuficientes para a degradação do contaminante, pode haver a aplicação de microrganismos externos, gerando uma atividade mais eficiente. Essa técnica é conhecida como bioaugmentação e tem risco ambiental reduzido, pois os microrganismos adicionados ao local precisam ser específicos para biodegradar o contaminante, e atuam sem interferência nos processos naturais típicos daquela área. A escolha da melhor técnica depende das características dos próprios poluentes e das condições ambientais da área contaminada, como temperatura, acidez ou alcalinidade e concentração de nutrientes. Segundo Aquino, *“áreas contaminadas com compostos orgânicos são as que apresentam melhores resultados, porque o próprio contaminante serve de fonte de alimento para os microrganismos, e pode ser completamente degradado a gás carbônico, água e sais minerais. Os compostos mais difíceis de se degradar são os orgânicos clorados [como muitos pesticidas] por serem altamente tóxicos, e os compostos inorgânicos, como os metais pesados. A mistura de substâncias também pode inibir a biodegradação de alguns contaminantes da amostra”*.

Quando a eficiência da biorremediação é baixa, são utilizados procedimentos complementares. Juliana Freitas, pesquisadora do Laboratório Multidisciplinar em Mineralogia, Águas e Solos (Lamas – Unifesp), diz que não existe solução única para todos os problemas e explica que, nos casos em que as condições naturais não são propícias para a biorremediação, geralmente se utiliza uma combinação dessa técnica com métodos físicos e químicos, como remoção, oxidação química e a extração de vapores. *“Às vezes já há condições naturais propícias para a biodegradação, e às vezes não. Então você precisa fazer alterações para que ela seja viável, combinar as técnicas para ter um resultado mais interessante”*, afirma.

Independente da técnica escolhida, algumas etapas são essenciais ao processo. A professora Aquino complementa com o passo a passo: primeiro, o local contaminado deve ser devidamente avaliado para que se escolha a melhor tecnologia de remediação naquele caso; depois, o produto biotecnológico deve ser liberado pelo órgão de controle ambiental competente, com testes de eficiência e de toxicidade para o ser humano e para outros organismos do meio ambiente.

Exemplos bem-sucedidos do uso de microrganismos no combate a esses poluentes são antigos. No caso dos postos de combustíveis, métodos físicos e químicos ainda predominam, mas a biorremediação de petróleo foi essencial em contaminações em escalas maiores.

Em 1989, um petroleiro norte-americano da Exxon Valdez se chocou contra um recife no Alasca e ocasionou o vazamento de 42 mil toneladas de petróleo no oceano, um dos mais graves vazamentos de óleo da história. Com a dificuldade de remoção física do poluente, a petrolífera adotou a técnica de biorremediação e utilizou cerca de 48 toneladas de fertilizantes, distribuídos em diferentes pontos da costa, para aumentar a população natural de bactérias capazes de degradar o petróleo. Os resultados foram positivos. Em três anos, a área contaminada foi reduzida para quase 1% da extensão original e a população bacteriana retornou aos níveis considerados normais antes do acidente.

Em 2010, as bactérias também foram responsáveis por grande parte da degradação de óleo no Golfo do México, após a explosão da plataforma de perfuração Deepwater Horizon, que operava para a petrolífera British Petroleum (BP). O acidente derramou milhões de litros de petróleo no mar e atingiu mais de dois mil quilômetros de costa (Figura 6).



Figura 6: Mancha de óleo resultante da explosão na plataforma Deepwater Horizon, no Golfo do México (2010). Fonte: EPA/Reuters/Nature.

Na mineração, a biorremediação tem sido mais voltada para o uso das plantas como transformadoras ou acumuladoras dos contaminantes. Porém, pesquisas mostraram a utilidade dos microrganismos como remediadores, com várias espécies de bactérias e fungos capazes de degradar cobre, chumbo, urânio e outros metais. Tanto é que as próprias mineradoras estão interessadas no desenvolvimento de técnicas que utilizam os microrganismos. É o caso da Vale, que em 2015 estabeleceu uma parceria com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para pesquisar microbiota capaz de degradar o creosoto, substância utilizada antigamente pela empresa para conservação de madeira em ferrovias. Parcerias como essa poderiam ser úteis no caso do desastre ambiental causado pelo rompimento da barragem de Fundão, no município de Mariana – MG, há dois anos e meio. No entanto, o uso da biorremediação não consta nos planos de remediação propostos pela Samarco após o acidente.

Apesar de ser menos registrada nos levantamentos de áreas contaminadas, a poluição decorrente de práticas agrícolas também tem preocupado os especialistas. No campo, por exemplo, com o uso de pesticidas. Segundo Jackson Marcondes, professor do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da Unesp, a agricultura sempre se depara com novas formas de antigos problemas. *“Até há pouco tempo, as plantas transgênicas eram vistas como uma forma importante de reduzir os pesticidas. Mas, hoje, as plantas que foram lançadas há algumas décadas não são mais resistentes às pragas, porque os insetos já evoluíram. Buscam-se novas ferramentas de transgenia e novos inseticidas para combater esses insetos. Mas se a indústria lança novos pesticidas tóxicos, que oferecem risco ao ambiente, ela tem que trabalhar paralelamente em métodos para controlar sua disseminação. E a biorremediação é uma boa medida”*, afirma Marcondes.

Outro problema apontado pelo pesquisador é o excesso de matéria orgânica nos plantios, como é o caso do reaproveitamento da vinhaça das indústrias sucroalcooleiras nas lavouras de cana-de-açúcar. A vinhaça é o resíduo que sobra após a destilação do caldo de cana fermentado para a obtenção de etanol e, para cada litro de etanol produzido, são gerados cerca de 13 litros de vinhaça. Como a vinhaça é rica em nutrientes, algumas usinas aplicam esse produto de volta na área de cultivo, como forma de aumentar a produtividade e reduzir o uso de fertilizantes químicos.

Contudo, é preciso cuidado. O poder poluidor da vinhaça é cerca de cem vezes maior do que o do esgoto doméstico, pois contém muita matéria orgânica, baixo pH, é muito corrosiva e sai dos destiladores a altas temperaturas (de 85 a 90°C). Com isso, os impactos negativos podem ser grandes no solo, rios, nascentes e lençóis freáticos – pois o escoamento de água carrega a vinhaça.

Uma solução é o uso de microrganismos. *“No tratamento de subprodutos da indústria sucroalcooleira, como a própria vinhaça, você pode ter microrganismos que*

atuem como biotransformadores dessa matéria que, de maneira geral, é tóxica in natura para a própria lavoura. Os microrganismos transformam [a vinhaça] em uma forma mais aproveitável, em termos de nutrientes, com papel mais efetivo na produção e crescimento das plantas”, complementa Marcondes.

A Biorremediação com microrganismos, portanto se configura como uma alternativa sustentável mas ainda pouco utilizada. A estimulação do uso da biorremediação pode ser favorecida com o desenvolvimento de pesquisas que acelerem o processo. Como em outras áreas do conhecimento, a maior parte da pesquisa no país é feita nas universidades, e não nas empresas. Por essa razão, aproximar os meios acadêmico e empresarial é importante para a difusão de novas tecnologias. Em fevereiro desse ano, o governo regulamentou a nova Lei de Inovação que pode ajudar na aproximação entre órgãos públicos, universidades e iniciativa privada. A divulgação sistematizada de informações facilita o conhecimento da sociedade e das empresas sobre o tamanho do problema e o potencial do uso de microrganismos como solução.

4. O DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

4.1 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EM BACTERIOLOGIA

O diagnóstico de doenças bacterianas pode ser realizado por diversos procedimentos. Pesquisa da presença de agentes causais de processos infecciosos em espécimes clínicos. O diagnóstico definitivo é realizado pelo isolamento e identificação do agente bacteriano a partir de materiais clínicos colhidos adequadamente do sítio de infecção, conhecido normalmente como exame bacteriológico ou cultura. A precisão e a validade dos resultados de exames laboratoriais são amplamente influenciados pelos cuidados na seleção, colheita e no envio das amostras para o laboratório.

As amostras devem, de preferência, ser obtidas do ambiente ou de organismos vivos antes da administração de antibioticoterapia. Quando houver locais onde provavelmente haja contaminação por mais de um patógenos, os espécimes devem ser colhidos mediante procedimentos que minimizem a contaminação e em dias quentes, se faz necessário a refrigeração (QUINN et al., 2005).

O diagnóstico bacteriano rápido e eficiente é necessário, já que as enfermidades infecciosas dos animais e as zoonoses, em particular as de natureza epizootica, estão adquirindo uma importância econômica e social cada vez maior nos sistemas agrícolas e comerciais dos países industrializados e em desenvolvimento. Algumas enfermidades infecciosas emergentes podem ultrapassar rapidamente a esfera local e passar dos animais às pessoas. A visualização de esfregaço e corados em lâminas e o cultivo são, em geral, as técnicas mais utilizadas para se realizar diagnóstico microbiológico direto, pois são técnicas mais simples, requerem menor infraestrutura e tem menor custo.

Alguns microrganismos não podem ser visualizados ao microscópio óptico e outros não crescem em meios de cultivo. Neste caso, devemos nos ater aos métodos moleculares de diagnóstico ou às técnicas de diagnóstico indireto. As técnicas moleculares oferecem uma capacidade de discriminação muito maior além de seus resultados representarem dados mais precisos, apesar da necessidade de técnicos especializados. Outra vertente de diagnóstico microbiológico é possível através da investigação do sistema imunológico do paciente pela pesquisa de anticorpos formados pela resposta imune específica, são os ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Nesta técnica pode ser feita a busca por anticorpos dirigidos a antígenos específicos de um dado microrganismo possibilita o diagnóstico de infecções crônicas ou agudas, ou buscar os antígenos presentes na amostra, através do uso de anticorpos específicos a eles. A seguir iremos destacar alguns dos principais métodos diagnósticos em bacteriologia.

4.1.2 Coloração de Gram

A coloração de gram é um importante teste, frequentemente realizado em laboratórios de microbiologia, para identificação de bactérias. Esse teste foi desenvolvido por Christian Gram, em 1884. Por meio dele, bactérias são coradas diferencialmente, de acordo com a constituição físico-química de suas paredes celulares, conforme estudamos anteriormente.

A técnica se baseia na preparação de um esfregaço em lâmina de vidro, esta etapa pode ser feita a partir de um cultivo bacteriano ou diretamente de amostras clínicas. Este esfregaço é coberto com um corante violeta-de-metila, neste momento todas as bactérias presentes no material serão coradas, após esta etapa adiciona-se o lugol que é um agente mordente, formará um complexo com a molécula do corante violeta. Ao lavar a lâmina com álcool, apenas as bactérias gram negativas irão ser descoradas, as gram positivas permanecerão com o complexo corante violeta-lugol, para finalizar o corante de fundo safranina (cor vermelha) irá corar as bactérias que foram descoradas na etapa do álcool, ou seja, as gram-negativas. A análise poderá ser feita em microscópio óptico em lente objetiva de 100x, utilizando óleo de imersão. As bactérias serão visualizadas conforme mostra a Figura 3.

4.1.3 Cultivo bacteriológico

O diagnóstico microbiológico por cultivo dos microrganismos permite a recuperação do agente etiológico e sua utilização futura para estudos científicos epidemiológicos e testes de susceptibilidade a drogas. Para cultivar microrganismos em sistemas artificiais, deve-se obedecer a requisitos básicos, como a utilização de um meio com aporte nutritivo adequado para aquele microrganismo, além de condições físico-químicas adequadas para seu desenvolvimento.

Meios de cultura

O Meio de Cultura é uma mistura de compostos nutrientes necessários ao crescimento microbiano. O meio de cultura deve atender as exigências nutricionais específicas do grupo, do gênero ou da espécie que se deseja cultivar. Algumas bactérias crescem em qualquer meio de cultura, outras necessitam de meios especiais e também existem bactérias que não são capazes de crescer em nenhum meio de cultura já desenvolvido.

Dentro dos componentes destes meios de cultura estão, principalmente: água, fonte de energia (Exemplo: açúcares como glicose, lactose, maltose), fonte de carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo, fonte de sais e íons, fatores de crescimento. As condições físico-químicas adequadas para o cultivo envolvem uma temperatura adequada ao microrganismo (termófilos, mesófilos e psicrófilos), pH adequado (2 a 9), pressão

osmótica adequada, atmosfera de incubação (aeróbios, anaeróbios, microaerófilos).

Os meios de cultura são classificados em: Meios de Enriquecimento, Meios Seletivos Diferenciais. Os Meios de enriquecimento são meios líquidos, que favorecem o crescimento de determinadas espécies aumentando a sua quantidade relativamente a outras, facilitando o isolamento de um microrganismo de interesse. Exemplo: o caldo de selenito de sódio permite enriquecimento de Salmonella e Shigella provenientes de amostras de fezes. Os meios seletivos permitem o crescimento de certos tipos de microrganismos e inibe o crescimento de outros microrganismos.

4.2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EM VIROLOGIA

Vários métodos para o armazenamento, visualização, quantificação (direta e indireta) e propagação de vírus foram desenvolvidos. Existem também métodos para a realização do diagnóstico de doenças produzidas pela infecções virais, muitos deles são baseados em testes sorológicos, os quais detectam a resposta do hospedeiro ao agente. Historicamente foi observado que alguns agente causadores de doenças poderiam passar através de filtros nos quais as bactérias eram retidas.

Os filtrados quando inoculados em meios seletivos para bactérias apresentavam resultado negativo para esse microrganismo, porém mantinham a capacidade infectante e eventualmente continham vírus. Normalmente não é possível observar os vírus com o uso de microscópio óptico, com exceção dos poxvírus. A visualização de partículas virais somente pode ser feita com o uso de microscópio eletrônico. Alguns métodos básicos aplicados para o estudo de vírus serão descritos a seguir.

4.2.1 Métodos de propagação viral

Para o isolamento, caracterização, identificação e produção de vacinas uma considerável quantidade de partículas virais é geralmente necessária. Isso pode ser obtido pela através de técnicas de propagação, ou também chamada de cultivo em linhagens de células específicas para cada cepa viral.

4.2.2 Inoculação em animais

Durante muito tempo a inoculação de susceptíveis foi única maneira de se obter grandes quantidades de vírus. Atualmente, o uso de animais para multiplicação de vírus é limitada devido a questões éticas. Somente utiliza-se animais para a amplificação viral para aqueles vírus que apresentam dificuldade de adaptação ao cultivo celular. Com o propósito de diagnóstico, a inoculação de animais pode ser utilizada, em amostras suspeitas de raiva, utiliza-se a inoculação de camundongos lactantes.

Posteriormente a estas ambas etapas, para fins de concentração e purificação viral, após a adaptação e propagação inicial, os vírus podem ser separados dos debris celulares e purificados. Isso é obtido após um número de processos que envolvem centrifugações (diferente velocidades), diálise, precipitação, cromatografia e gradientes de densidades.

Temperaturas abaixo da temperatura de congelamento são usadas para armazenamento de vírus durante prolongados períodos. Nesse caso é importante manter a formação de cristais de gelo à níveis mínimos. Deve ser considerado que a resistência e labilidade varia muito entre os vírus. Alguns são capazes de resistir por horas, dias, ou até meses em condições ambientais, enquanto outros são inativados em minutos sob condições semelhantes.

4.2.3 Visualização e Quantificação de partículas virais

Os dois métodos mais utilizados para visualizar a estrutura e morfologia dos vírus são a microscopia eletrônica e microscopia de força atômica. Outros tipos de microscopia são empregados para observar as alterações celulares induzidas pela replicação viral. Sem as técnicas de visualização dos vírus existe uma dificuldade muito grande em se estudar a estrutura ou a interação vírus-célula. A capacidade de visualização das partículas permitiu se estimar o número de partículas presentes em uma suspensão. Alguns métodos permitem estimar o número de partículas presente em uma solução de forma indireta. Em ambos os casos, direta ou indireta, a quantificação é sempre uma estimativa. A estimativa é importante na preparação de vacinas, na determinação do número mínimo para produção de doença ou em investigação viral.

Os vírus podem ser contados a partir de uma preparação ao microscópio eletrônico, se comparados com uma suspensão de partículas de látex de tamanho semelhante. O inconveniente desse tipo de contagem é que ela reflete o número de partículas fisicamente presentes na preparação, mas não esclarece quantas delas são viáveis ou infecciosas. A infecciosidade, entretanto, é avaliada por outros métodos, a serem apresentados a seguir. Alguns vírus contêm proteínas que lhes conferem propriedades relativamente fáceis de serem quantificadas, uma delas é a hemaglutinação, propriedade pela qual um determinado vírus é capaz de aglutinar hemácias. Isto fornece um método simples de determinar a quantidade do agente infeccioso presente na preparação. Igualmente, aqui não é possível determinar o número físico de partículas virais necessárias para causar a aglutinação de um determinado número de hemácias; não obstante, usualmente a hemaglutinação se correlaciona adequadamente com a quantidade de unidades infecciosas presentes na preparação de vírus.

Outros testes que envolvem reações do tipo antígeno-anticorpo, são freqüentemente utilizados para quantificar os vírus presentes em uma preparação.

Igualmente, é necessário estabelecer uma correlação entre testes e o número de partículas infecciosas, ou, melhor dizendo, unidades infecciosas, presentes na preparação. Exemplos desse tipo de teste são a imunofluorescência ou os testes imunoenzimáticos denominados “ELISAs”. Por fim, mas não menos importantes, temos os ensaios moleculares baseados na quantificação do genoma viral em determinada preparação (ou paciente). Estes testes têm sido muito utilizados para o acompanhamento da evolução de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e para o acompanhamento de outras enfermidades víricas onde o cultivo do agente é mais demorado ou difícil. Exemplo desse tipo é a reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa ou “real time PCR”, ou PCR em tempo real, onde a quantidade de produto amplificado está relacionada à quantidade de genoma viral presente na amostra. A PCR é uma técnica que merece destaque, pois ela pode ser utilizada tanto para os fins citados acima quanto para detecção de agentes microbianos em amostras, ou até mesmo para identificar qual o patógeno está presente. Por este motivo iremos explorar este tema no tópico a seguir.

4.3 MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS AO DIAGNÓSTICO, DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS

4.3.1 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica rotineira de laboratório usada para fazer muitas cópias (milhões ou bilhões) de uma região específica do DNA. Essa região do DNA pode ser qualquer objeto de interesse do pesquisador. Por exemplo, pode haver um gene cuja função o pesquisador queira compreender ou um marcador genético usado pelos cientistas forenses para correlacionar o DNA da cena do crime com os suspeitos, ou ainda, uma determinada região do genoma que seja capaz de identificar o patógeno quando esta for comparada a um banco de dados de sequências de microorganismos.

Tipicamente, o objetivo da PCR é fabricar quantidade suficiente da região de interesse do DNA, de modo que essa possa ser analisada e utilizada de alguma outra maneira. Por exemplo, DNA amplificado por PCR pode ser enviado para sequenciamento, visualizado por eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida, ou clonado em plasmídeo para futuros experimentos.

Os principais reagentes de uma reação PCR são a enzima de polimerização das novas cadeias (*Taq polimerase*), oligonucleotídeos (*primers*), DNA molde e nucleotídeos (blocos que compõem o DNA). Estes são reunidos em um tubo, juntamente com cofatores de que a enzima precisa, e passam por repetidos ciclos de aquecimento e resfriamento que permitem que o DNA seja sintetizado. As etapas básicas desta reação são: Desnaturação da dupla fita de DNA (~95°C), anelamento de

oligonucleotídeos específicos para as regiões gênicas de interesse (temperatura variável), e a última etapa de extensão da cadeia pela DNA polimerase (72°C).

Os resultados de uma reação PCR são geralmente visualizados (tornam-se visíveis) através do uso da eletroforese em gel. Eletroforese em gel é uma técnica na qual fragmentos de DNA são puxados por uma corrente elétrica através de uma matriz de gel, e que separa os fragmentos de DNA de acordo com o tamanho. Um padrão, ou escada de DNA, é tipicamente incluído para que o tamanho dos fragmentos nas amostras da PCR possa ser determinado.

Uma ramificação da técnica de PCR é conhecida como "PCR em tempo real", como a definição já indica, é uma reação na qual podemos observar os resultados a medida que a amplificação acontece, em um gráfico na tela do computador com o software do equipamento. O acompanhamento do acúmulo do produto amplificado em tempo real tornou-se possível pela utilização de iniciadores, sondas ou produtos amplificados marcados com moléculas fluorescentes. Este método dispensa a etapa de visualização em gel. Através desta técnica, dentre outras aplicações, é possível estudar a expressão gênica, ou seja, quanto daquela amostra está sendo expressa. Isto pode ser útil quando se busca saber qual a carga viral daquela amostra, por exemplo. Este ensaio tem elevada sensibilidade técnica e elevada precisão.

4.3.2 Sequenciamento

Você certamente já deve ter ouvido falar que muitos genomas de diversos organismos já foram ou estão sendo sequenciados. Por exemplo, o genoma humano foi concluído em 2003, depois de vários anos de esforços internacionais. Mas o que significa sequenciar um genoma ou mesmo pequenos fragmentos de DNA?

Sequenciamento de DNA é o processo de determinação da sequência de bases nucleotídicas (A-Adenina, T-Timina, C-Citosina, e G-Guanina) em um pedaço de DNA. Hoje em dia, com os materiais e equipamentos corretos, sequenciar um pequeno fragmento de DNA é relativamente simples. Sequenciar um genoma inteiro (todo o DNA de um organismo) permanece uma tarefa complexa. Isso requer quebrar o DNA do genoma em pequenos fragmentos, sequenciar esses pedaços e montar as sequências em uma única e longa sequência "consenso". Entretanto, graças a novos métodos que tem sido desenvolvidos nas duas últimas décadas, o sequenciamento genômico é agora muito mais rápido e mais barato do que era durante o Projeto Genoma Humano.

Hoje em dia, os métodos usados para sequenciamento de DNA são: Método de Sanger, já bem estabelecido; e métodos chamados de "Nova Geração" que tem reduzido custos e acelerado a velocidade de sequenciamentos em larga escala, e são métodos com alta tecnologia.

A partir do sequenciamento podemos saber a classificação taxonomica de um organismo (vírus, bactéria, fungo, parasita, humano, animal etc), se ele tem mutações que o diferenciam dos outros organismos, e inclusive estimar quais os seus ancestrais e relação com seu reino, através de uma análise filogenética.

5. GEOHELMINTOS

Geohelmintos são vermes cilíndricos (nematodas) que requerem condições ambientais favoráveis para que ocorra o amadurecimento da larva no solo e não necessitam de um hospedeiro intermediário: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*. O número de ovos infectantes, sua facilidade de acesso aos seres humanos, viabilidade no solo e as condições climáticas favoráveis são condições que garantem o sucesso da infecção. As zonas tropicais e subtropicais do planeta, especialmente nas áreas de maior atraso sócio-econômico são as que possuem uma maior incidência das geohelmintoses. Apesar de não causarem grande mortalidade, as geohelmintoses são doenças que estão associadas a desnutrição e anemia levando um grande prejuízo do desenvolvimento infantil.

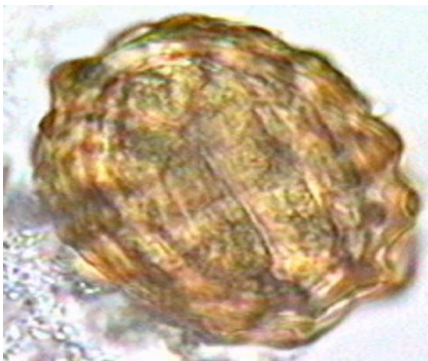
5.1 *Ascaris lumbricoides* – ASCARIDÍASE

5.1.2 Introdução

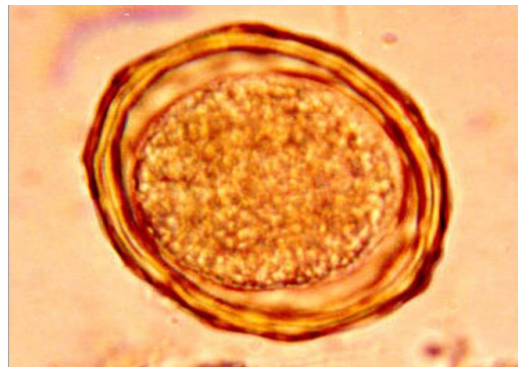
Ascaris lumbricoides é um parasito cosmopolita, uma das principais causas do subdesenvolvimento nas crianças de baixo nível socioeconômico. Responsável por casos de obstrução intestinal. Segundo a OMS aproximadamente 2 bilhões de pessoas infectadas, dentre os geohelmintos ele é o de maior prevalência em humanos.

5.1.2 Morfologia

Ovos: Cor castanha, ovalados e grandes (50 micrômetros). Possuem membrana mamilonada, apoiada sobre outras duas. Internamente possui uma massa de células germinativas.

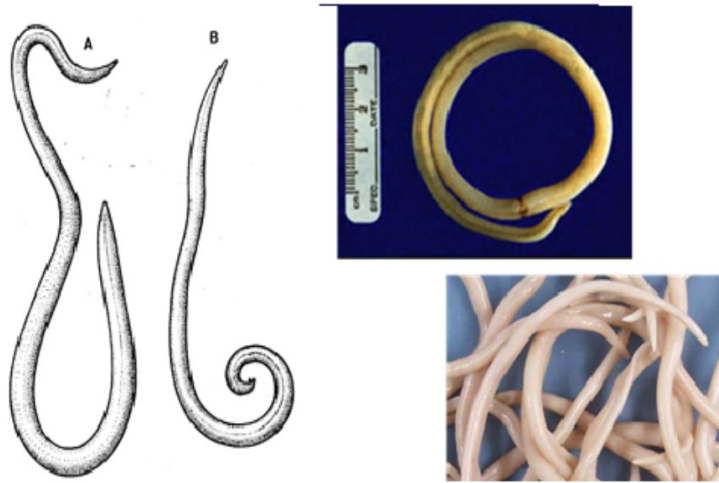


Ovo embrionado – Forma infectante



Ovo eliminado nas fezes (diagnosticado)

Verme Adulto: Corpo cilíndrico branco leitoso, podem atingir até 30 cm de tamanho, a fêmea maior do que o macho e podem ovipor até 200 mil ovos por dia. O macho possui a sua porção posterior enrolada ventralmente.



A - Fêmea B - Macho

5.1.3 Ciclo Biológico

Parasito monoxênico, isto é, possuem apenas uma hospedeiro. O homem se infecta após ingerir alimentos contaminado com os ovos contendo a L3 infectante, esse chegam ao intestino Delgado onde ocorrem a liberação da larva. Penetram na mucosa intestinal e através da corrente sanguínea chegam ao fígado, coração, pulmão, onde sofrem uma transformação para L4. Durante esse período ocorre no pulmão o chamado "ciclo de Loss". Após uma semana se encaminham para a árvore brônquica e vão até a faringe sendo expelidas ou deglutidas. Ao serem deglutidas vão até o intestino delgado originando as larvas L5 que darão origem aos vermes adultos (Figura 7).

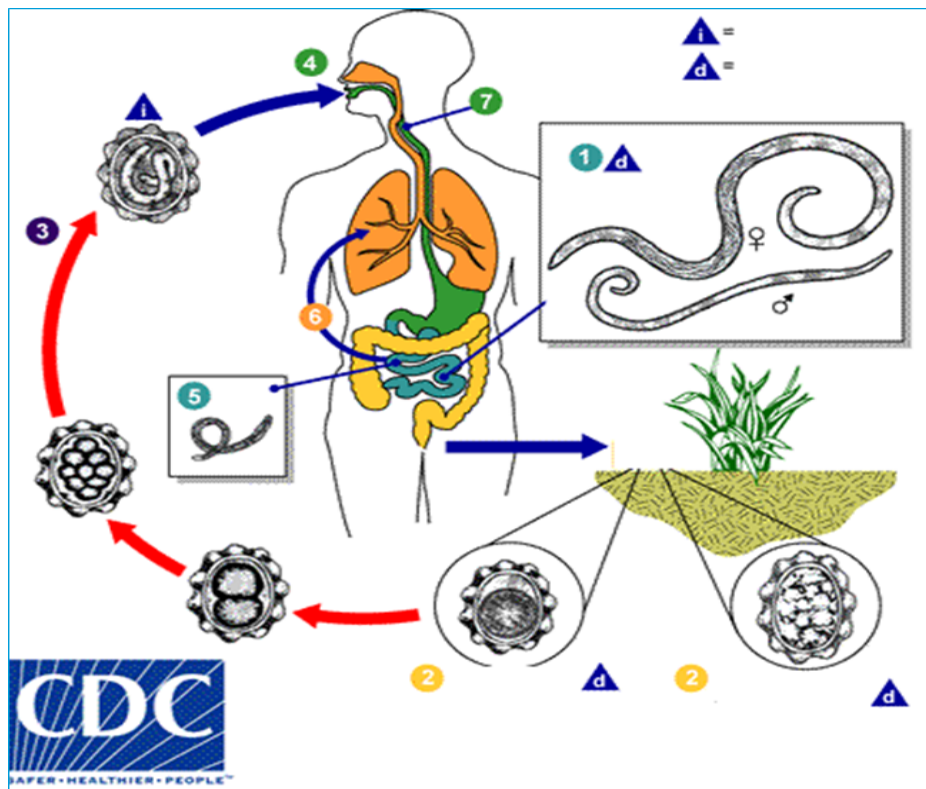


Figura 7: Ciclo de vida do *Ascaris lumbricoides*. A infecção ocorre pela ingestão de água ou alimentos contendo ovos viáveis do parasito.

5.1.4 Mecanismo de Transmissão

A transmissão se dá pela ingestão de alimentos e/ou água contaminada com ovos contendo a larva L3 infectante. Poeira e insetos podem transportar os ovos para os alimentos, contaminando-os. Podem, também, ser encontrados na região subungueal (sob as unhas), o que claramente se dá por higiene inexistente ou inadequada.

5.1.5 Patogenia

As infecções por *A. lumbricoides* geralmente passam despercebidas, porém sintomas podem ser observados em cargas parasitárias elevadas e estão relacionados com o estado nutricional e idade do hospedeiro. Quando há ingestão de um grande número de ovos, alterações pulmonares podem ser observadas devido à migração das larvas por esse órgão.

São os vermes adultos os responsáveis pelas mais importantes alterações observadas na ascaridíase. Em infecções de baixa intensidade, o hospedeiro não apresenta manifestações clínicas. Já nas infecções médias, 30 a 40 vermes, ou maciças, 100 ou mais vermes, alterações orgânicas podem ser detectadas. Transtornos funcionais como vômitos e perda do apetite podem estar presentes. Crianças com alta carga parasitária podem apresentar ainda atraso no desenvolvimento físico e mental, devido

à ação espoliadora exercida pelos helmintos, que consomem grandes quantidades de proteínas (cerca de quatro gramas diários), lipídeos e carboidratos. Obstrução intestinal devido ao enovelamento de vermes na luz do intestino (presente em 5 a 35% dos casos pediátricos em áreas tropicais e subtropicais) e localizações ectópicas, ocasionadas por “*áscaris errático*” também podem ser observadas em elevadas cargas parasitárias (Figura 8).

Larvas

- Em infecções maciças são encontrados focos hemorrágicos e necrose no fígado;
- Nos pulmões ocorrem pontos hemorrágicos com passagem de larvas para os alvéolos;

Verme adulto

- Ação tóxica (antígeno x anticorpo), causando edema e urticária;
- Ação espoliadora (consumo de muitas proteínas, carboidratos, lipídios e vitamina A e C;
- Ação mecânica (Obstrução da luz intestinal).



Eliminação espontânea ou por remoção cirúrgica



Figura 8: Larvas e verme adulto.

5.1.6 Diagnóstico Laboratorial

É feito através de um método de sedimentação espontânea (Lutz). Coloca-se aproximadamente 8g de solo diluído em água e após 6 horas de sedimentação analisar o sedimento formado para pesquisa de ovos.

5.2 Trichuris trichiura – TRICURÍASE

5.2.1 Introdução

Durante o período pré-histórico temos vários relatos da presença de ovos no solo, em coprólitos ou no intestinos de múmias. Dados arqueológicos sugerem que a associação do *Trichiuris-homem* representa uma relação bastante antiga, que provavelmente se adaptou ao parasitismo ainda no ancestral primata. A presença de coprólitos ou no intestinos de múmias sugerem que a trichuríase era endêmica por toda a Eurásia mesmo nas regiões de climas temperados (Neves, 2010). Na grande maioria dos casos o parasitismo decorre silenciosamente, mas dependendo do grau de infestação do paciente o parasito pode levar o indivíduo a morte (Rey, 2008).

5.5.2 Morfologia

Macho - medem de cerca de 3 a 4 cm, sendo menores do que as fêmeas. Apresentam 2 características marcantes: A parte anterior é mais delgada e longa que a posterior, sendo que no macho a porção posterior é enrolada ventralmente.

Fêmea - maior do que o macho com aproximadamente 4 a 5 cm. Porção anterior afilada e a porção posterior romba e reta.

Tanto macho como fêmea vivem com a porção anterior mergulhado na mucosa do intestino grosso, de onde conseguem retirar seus alimentos.

Ovos - possuem aspecto de um barril de cor marrom com dois tampões mucóides hialinos nas extremidades. Medem em torno de 50 micrometros de comprimento. Os ovos quando expelidos com as fezes possuem massa germinativa no seu interior. Quando em condições ambientais favoráveis, se tornam embrionados no solo e resistem as condições externas por vários meses (Figura 9).

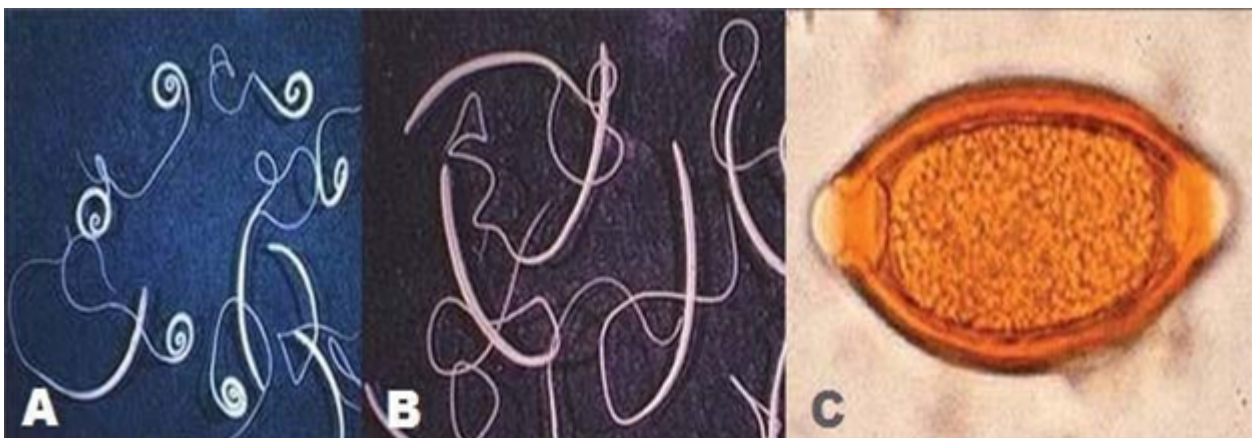


Figura 9: *Trichuris trichiura*. **A)** Machos, apresentando a extremidade posterior do corpo curvada ventralmente. **B)** Fêmeas, com a extremidade posterior do corpo retilínea. **C)** Ovo. Apresenta formado elíptico característico, com poros salientes e transparentes em ambas as extremidades.

5.2.3 Ciclo biológico

É do tipo monoxênico. Os ovos são ingeridos com água ou alimentos contaminados, ao chegarem a luz intestinal, ocorre a eclosão da L3 infectante (larva 3º estágio). Migram para o intestino grosso onde se transformam em vermes adultos (Figura 10).

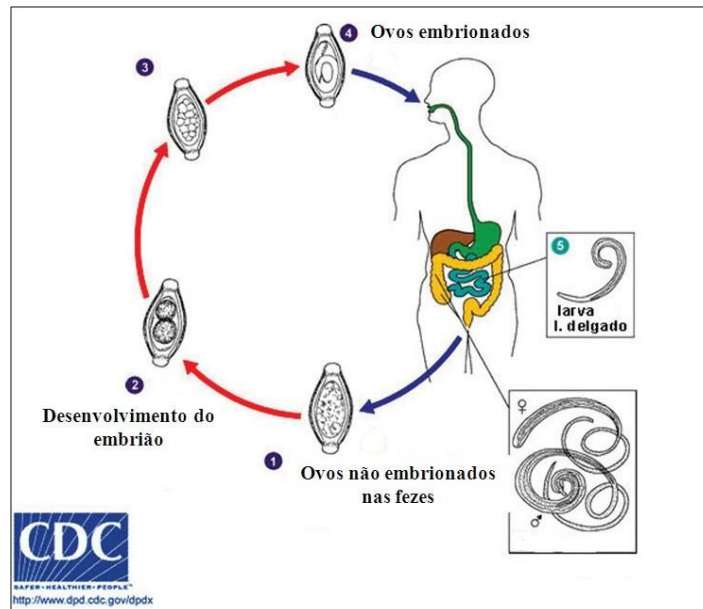


Figura 10: Ciclo biológico do *Trichuris trichiura*.

5.2.4 Patogenia

Apesar do grande número de pessoas infectadas por *T. trichiura*, os indivíduos são portadores assintomáticos. O quadro clínico quando ocorre pode ser discreto e indefinido, com nervosismo, insônia, perda de peso dentre outros sintomas. Quando a infecção é maciça, ocorre uma intensa irritação no reto podendo até levar a um prolapso retal (Figura 11).

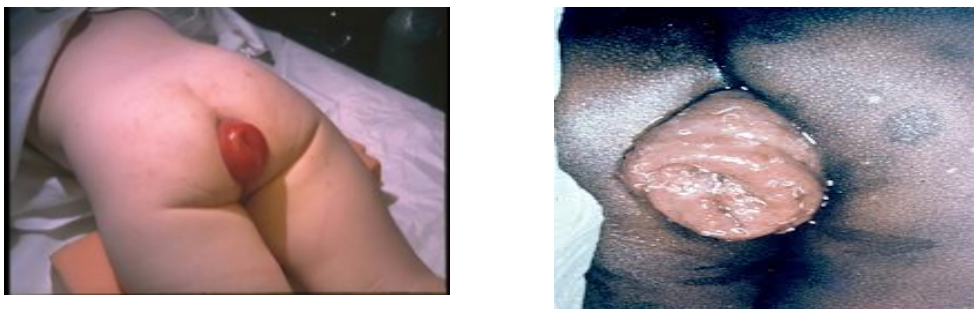


Figura 11: Pro-lapso retal.

5.2.5 Diagnóstico Laboratorial

Usar a mesma técnica utilizada para o diagnóstico do *A. lumbricoides*.

5.3 ANCILÓSTOMA E NECATOR

5.3.1 Introdução

Os ancilostomídeos (*Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*) são os agentes etiológicos da ancilostomíase (amarelão). Uma doença de curso crônico que pode levar o indivíduo a óbito.

5.3.2 Morfologia

Os ancilostomídeos possuem um cápsula bucal característica de cada espécie, sendo que o *Ancylostoma duodenale* possuem 2 pares de dentes e o *Necator Americanus* possuem lâminas cortantes na sua cápsula bucal. Existe um nítido dimorfismo sexual onde o macho possui bolsa copuladora na sua porção posterior. As fêmeas são maiores do que os machos e podem ovipor cerca de 10.000 a 20.000 ovos por dia. São cilíndricas, medindo em torno de 1cm, cor esbranquiçada ou rosada e a sua porção posterior termina com uma cauda pontiaguda (Figura 12 e Figura 13).

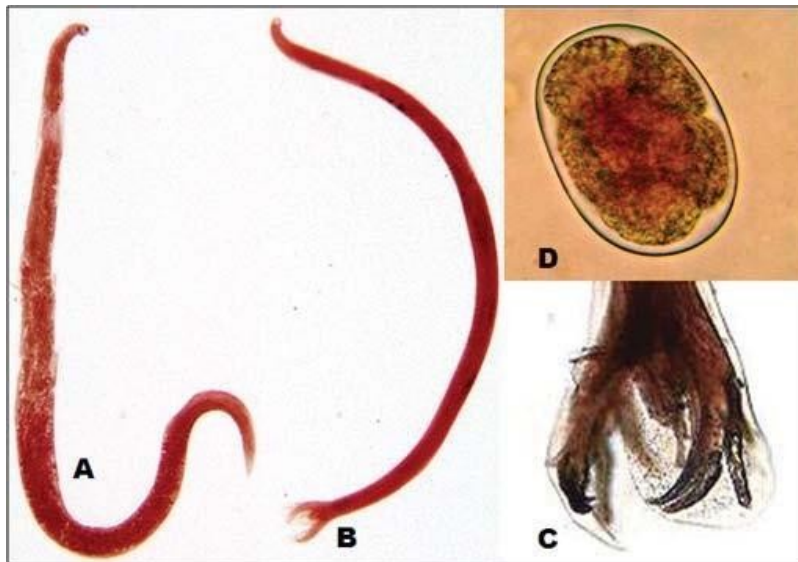


Figura 12: A) Fêmea de ancilostomídeo. Observar a cauda retilínea e extremidade cefálica bem re-curvada dorsalmente. B) Macho de ancilostomídeo. C) Detalhe da cauda do macho, apresentando bolsa copuladora bem desenvolvida. D) Ovo. Ovos de *A. duodenale* e *N. americanus* são morfologicamente semelhantes.



Figura 13: Vista frontal da cabeça de *Ancilostoma duodenale* (esquerda) e *Necator americanus* (direita)

5.3.3 Ciclo biológico

Ciclo Evolutivo, do tipo monoxênico.

Os ovos produzidos pelas fêmeas e depositados no intestino delgado os hospedeiros são eliminados para o meio exterior junto com as fezes. Esses ovos necessitam de boa oxigenação, alta umidade, temperatura elevada. São condições indispensáveis para que eles desenvolvam no interior uma larva (L1) e ocorra a sua eclosão. Se transformam em L2 e L3 infectante. A L3 infectante atinge um hospedeiro e penetra ativamente na pele ou mucosa, ainda passivamente por via oral. A penetração dura aproximadamente 30 minutos, cai na corrente sanguínea e/ou linfática, passam pelo coração, pulmão se transformando em L4, migram para traqueia, faringe e laringe. São deglutidas, chegando ao intestino delgado e se tornam vermes adultos, exercem o hematofagismo e iniciam a cópula e logo após a oviposição (Figura 14).

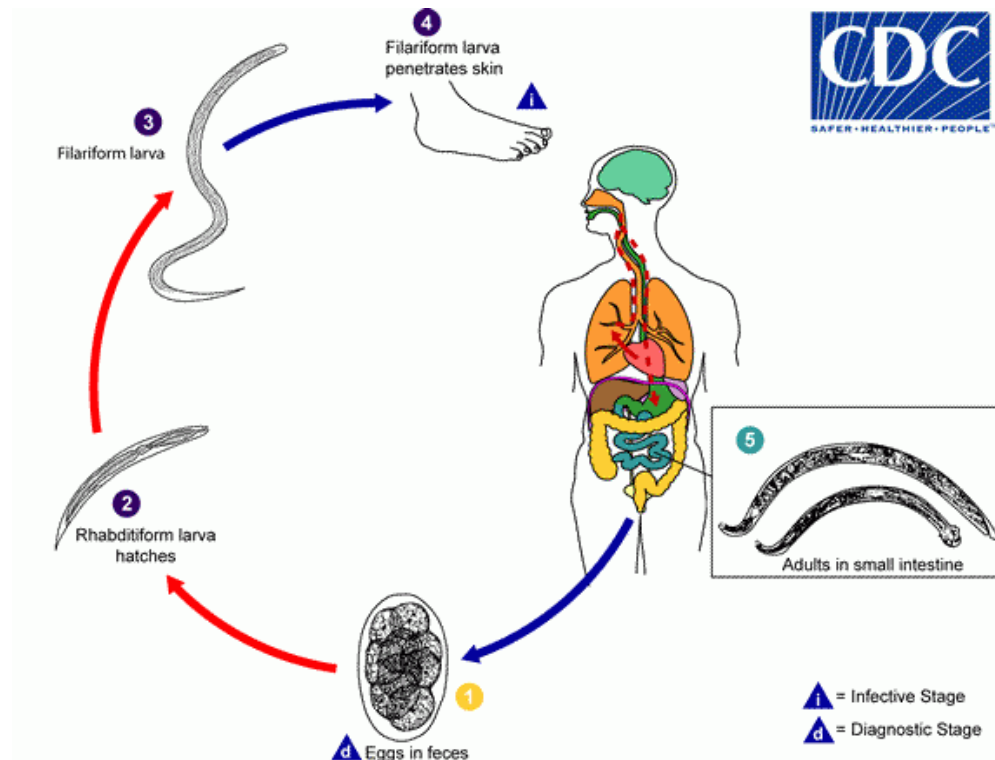


Figura 14: Ciclo biológico dos ancilostomídeos.

5.3.4 Mecanismo de transmissão

Penetração das larvas infectantes (L3) na pele ou mucosa ou por ingestão oral.

5.3.5 Patogenia

Temos por etiologia primária ou secundária:

Primária - está relacionada com a migração das larvas e a implantação dos parasitos adultos no intestino delgado do hospedeiro

Secundária - ocorre pela permanência do parasito no intestino delgado.

Os ancilostomídeos são parasitos hematófagos, por isso a gravidade da doença está ligada diretamente ao número de parasitos, isto é a carga parasitária.

A anemia causada pelo hematofagismo dos vermes adultos é um maiores males da ancilostomose. A anemia por deficiência de ferro, prejudica a capacidade cognitiva, levando as crianças ao baixo rendimento escolar. Em zonas endêmicas pela deficiência do ferro é comum as crianças comerem terra para suprirem essa necessidade. Em alguns lugares no nordeste brasileiro, chega-se a fabricar tijolos pequenos e são vendidos nas feiras livres para serem roídos aos poucos pelos portadores desta parasitose.

5.3.6 Diagnóstico Laboratorial

Como os ovos são leves, deve ser usado um método de flutuação espontânea (Willis) ou forçada (Faust) a fim de encontrar ovos de ancilostomídeos.

5.4 *Strongyloides stercoralis* – ESTRONGILOIDÍASE

5.4.1 Introdução

É o agente etiológico da estrongiloidíase. O *Strongyloides stercoralis* ainda guarda traços de suas características ancestrais, pois como as espécies de vida livre, possui em seu ciclo vital machos e fêmeas de vida livre, capazes de viver no solo. Outra parte do ciclo é obrigatoriamente parasitária e tem por habitat a parede do intestino humano (Rey, 2008).

5.4.2 Morfologia

Morfologicamente, há seis formas evolutivas de *S. stercoralis*:

- **fêmea partenogenética- parasita:** possui corpo cilíndrico com aspecto filiforme e longo, extremidade anterior arredondada e posterior afilada. Mede aproximadamente 2mm de comprimento por 0,04mm de diâmetro. Por ser partenogenética elimina ovos já embrionados, é considerada como “ovovivípara”
- ovos: são elípticos com a casca muito fina medindo cerca de 50 a 58 micrometros de comprimento por 30 a 34 de largura, contendo uma larva no seu interior.
- **larvas rabditóides:** também denominada larva de primeiro estágio. Tem essa denominação devido ao formato do esôfago. Essas larvas são encontradas nas fezes, mas nas formas disseminadas da doença podem ser encontradas no líquido cefalorraquidiano, escarro, urina, bile, etc
- **larvas filarióides:** é chamada de larva de terceiro estágio ou infectante. É mais longa que a primeira. É encontrada no solo, mas podem ser encontradas no intestino grosso de pacientes com prisão de ventre. Tem esse nome devido o formato do seu esôfago.
- **fêmea de vida livre:** medem aproximadamente 0,8 a 1,2mm de comprimento. Possui um aspecto fusiforme com a extremidade anterior alongada e posterior afilada, Também se encontram no solo.
- **macho de vida livre:** são menores que as fêmeas de vida livre. Vivem no solo. Extremidade posterior recurvada ventralmente (Figura 15).

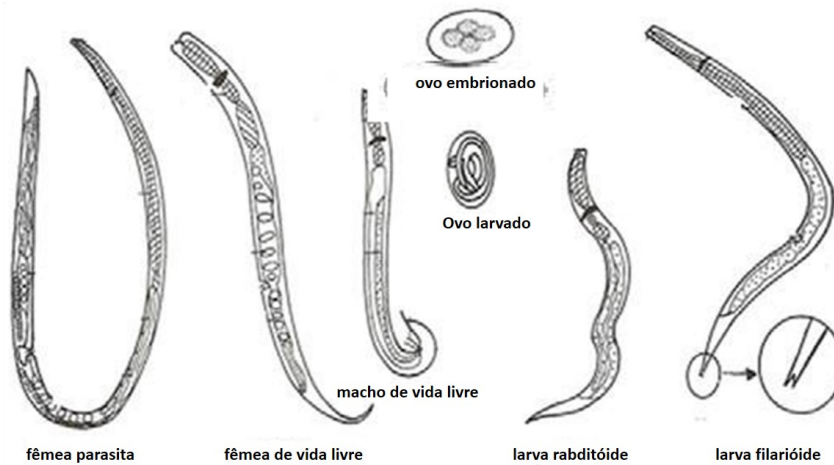


Figura 15: Representação esquemática das formas evolutivas de *Strongyloides stercoralis*.

5.4.3 Ciclo biológico

O ciclo inicia-se a partir das larvas rabditóides eliminadas com as fezes dos indivíduos parasitados podemos ter dois ciclos evolutivos: direto ou partenogenético e o indireto, sexuado ou de vida livre. Ambos são monoxênicos.

DIRETO OU PARTENOGENÉTICO

As larvas rabditóides eliminadas nas fezes alcançam o meio externo (solo), havendo condições favoráveis de temperatura (20 a 30 graus centígrados), umidade elevada, pouca luz direta (sombra) e de solo (arenoargiloso e rico em matéria orgânica), dão continuidade ao ciclo. Essas larvas se transformarão em larvas filarióides infectantes. Elas são muito ativas e podem permanecer vários dias no solo (1 a 3 semanas) aguardando na superfície o seu hospedeiro. A sua evolução só é completa quando se encontrarem o seu hospedeiro adequado e nele penetrarem através da pele. A invasão realiza-se habitualmente através da pele dos pés, quando um indivíduo caminha descalço em terrenos com poluição fecal infestada por larvas filarióides. Essas larvas após penetrarem ganha circulação sanguínea e chega aos pulmões onde se transforma em L4, migram pela árvore brônquica e chegam a faringe podendo ser expelidas ou deglutidas atingindo o intestino delgado onde se transformam em fêmeas partenogenéticas. Após 15 a 25 dias elas começam a eliminar os ovos larvados na luz intestinal. A larva rabditóide (L1) se transforma em larva rabditóide (L2) e são expelidas junto com as fezes.

INDIRETO, SEXUADO OU DE VIDA LIVRE

Neste ciclo as larvas rabditóides diplóides e haplóides encontrando condições favoráveis no solo irão sofrer 4 transformações dando fêmeas e machos de vida livre. Os mesmos se acasalam e as fêmeas fazem a postura dos ovos, que darão origem as

larvas rabditóides e filarióides infectantes. A partir dessa fase o ciclo ocorre igual ao ciclo direto (Figura 16).

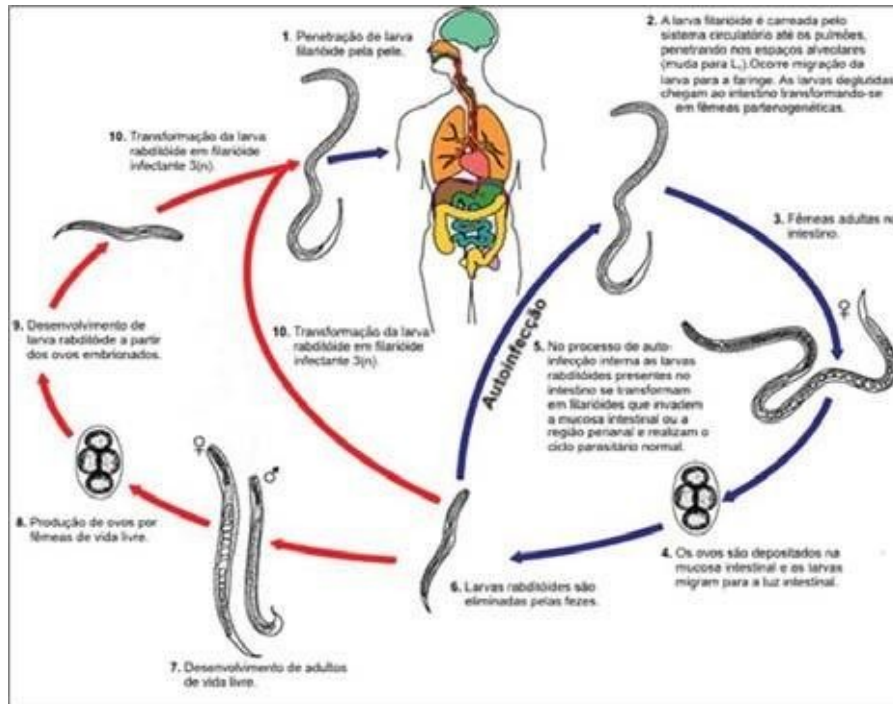


Figura 16: Ciclo biológico do *Strongyloides stercoralis*. O ciclo pode seguir dois caminhos: o direto ou partenogenético (à direita) e o indireto ou de vida livre.

5.4.4 Mecanismo de transmissão

Através da penetração das larvas filarióides infectante (L3) na pele, mucosa bucal ou esofagiana, A partir dessa primeira infecção (primoinfecção) o paciente pode se infectar de outras maneiras.

5.4.5 Patogenia

Os indivíduos que albergam um pequeno número de parasitos no intestino, geralmente são assintomáticos. As formas mais graves estão ligadas com a carga parasitária. As lesões devido o parasitismo humano, estão relacionados com:

- Penetração do parasita no hospedeiro;
- Migração durante o ciclo pulmonar;
- Permanência e multiplicação na mucosa intestinal

A sintomatologia mais frequente e mais importante costuma estar relacionada com o aparelho digestivo. Surto de diarreia intercalados por períodos de contusão intestinal. Pode haver um quadro de úlcera péptica, perda de apetite, náuseas e vômitos.

5.4.6 Diagnóstico Laboratorial

Por serem os ovos já larvados a pesquisa deve ser das larvas. Utilizar o método de Baerman e Moraes que se baseia no termo, geo e hidrotropismo das larvas.

5.5 LARVA MIGRANS CUTÂNEA E VISCERAL

5.5.1 Introdução

Entende-se por larva migrans a síndrome provocada por larvas de helmintos parasitos de animais que migram na pele ou nas vísceras de humanos. Assim temos 2 tipos de larva migrans: cutânea e visceral. A síndrome cutânea já é conhecida desde 1926, sendo denominada popularmente “bicho geográfico” ou “bicho de praia”. A síndrome visceral só foi descrita em 1952 quando se associou alterações hepáticas e pulmonares em crianças as larvas de *Toxocara canis*, que são parasitos de cães (Neves,2003).

5.5.2 Larva migrans cutânea

Tem como agente etiológico duas principais espécies: *Ancyclostoma caninum* e o *A. braziliense*, parasitos comuns do cão e gato.

5.5.2.1 Ciclo biológico

No hospedeiro definitivo:

Cães e gatos eliminam diariamente nas fezes milhares de ovos de *A.caninum* e *A. braziliense*. No meio externo, havendo solo úmido (acima de 70%), temperatura entre 20 a 30 graus centígrados se transformam em larva de primeiro estágio L1 dentro do ovo, que eclode, sofrem outra transformação e passam para estágio Segundo estágio L2 e depois para terceiro estágio ou L3 infectante, esta não se alimenta e pode sobreviver no solo por várias semanas. Os cães e gatos podem se contaminarem pelas vias oral, cutânea e transplacentária (Figura 15).

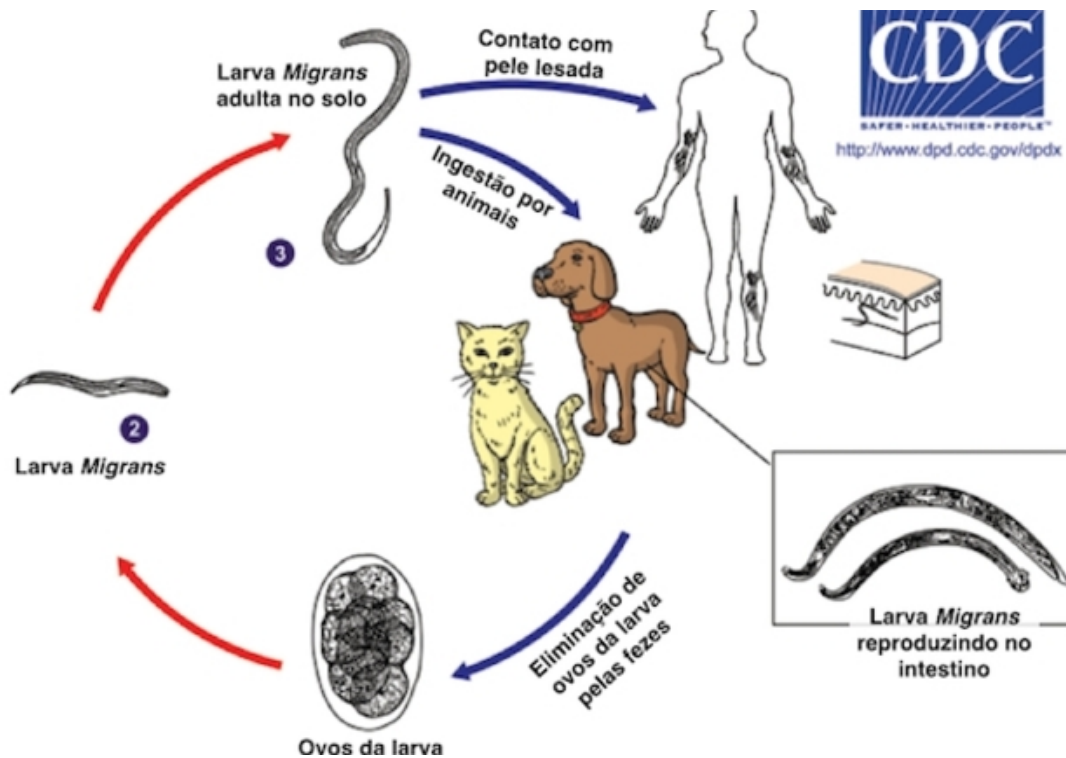


Figura 15: Ciclo biológico da larva migrans cutânea.

Infecção no Homem:

A larva L3 infectante desses ancilostomídeos penetram acidentalmente e ativamente na pele do homem e migram através do tecido subcutâneo durante semanas ou meses e depois morrem.

5.5.2.2 Manifestações clínicas

São basicamente o prurido local e a lesão dermatológica. O prurido migratório varia de moderado a intenso.

5.5.3 Larvas migrans visceral

A síndrome da larva migrans visceral ou toxocaríase, foi descrita em humanos em 1952, por Beaver. É uma síndrome determinada por migrações prolongadas de larvas de parasitos de cães e gatos ou suínos, no organismo humano. (Azevedo, 1999)

Agente etiológico:

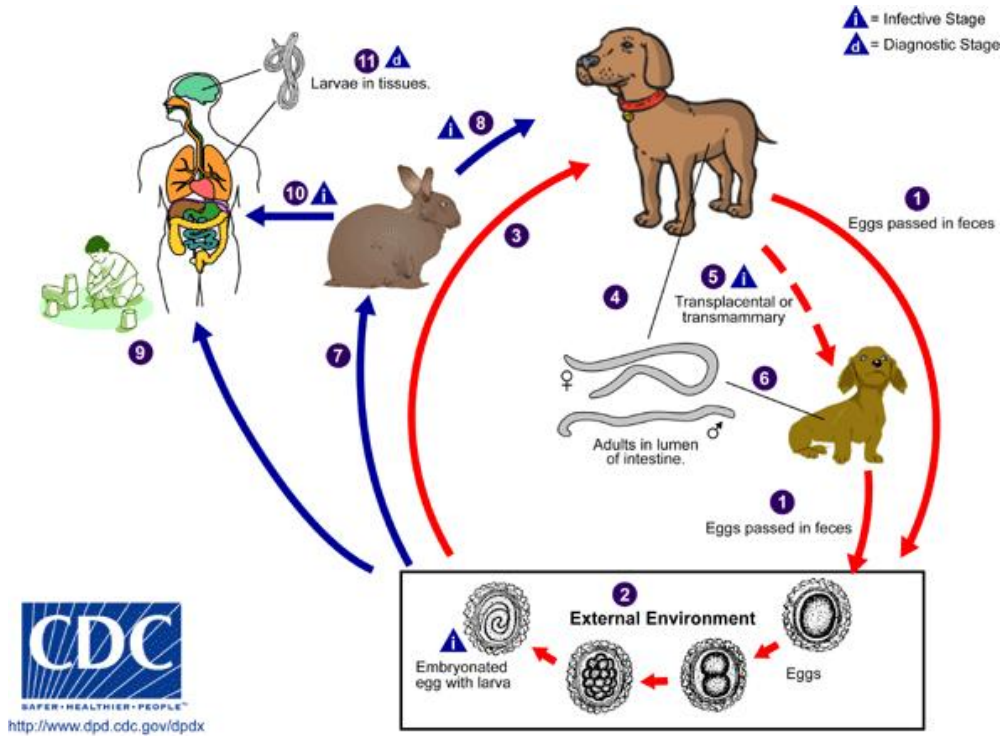
Toxocara canis (parasito de cão), *Toxocara cati* (parasito de gato) e *Toxocara sun* (parasito de suíno).

Infecção no Homem:

O homem geralmente se infecta ingerindo os ovos embrionados contendo a L3 infectante. Esses ovos são encontrados na água e alimentos contaminados e no solo. A

L3 infectante quando liberadas, penetram na parede intestinal chegando ao capilares sanguíneos e daí ao fígado podendo ir através da circulação sistêmica a vários outros órgãos.

A severidade do quadro clínico depende da quantidade de larvas presente no organismo do órgão invadido e da resposta imunológica do paciente.



Ciclo de vida

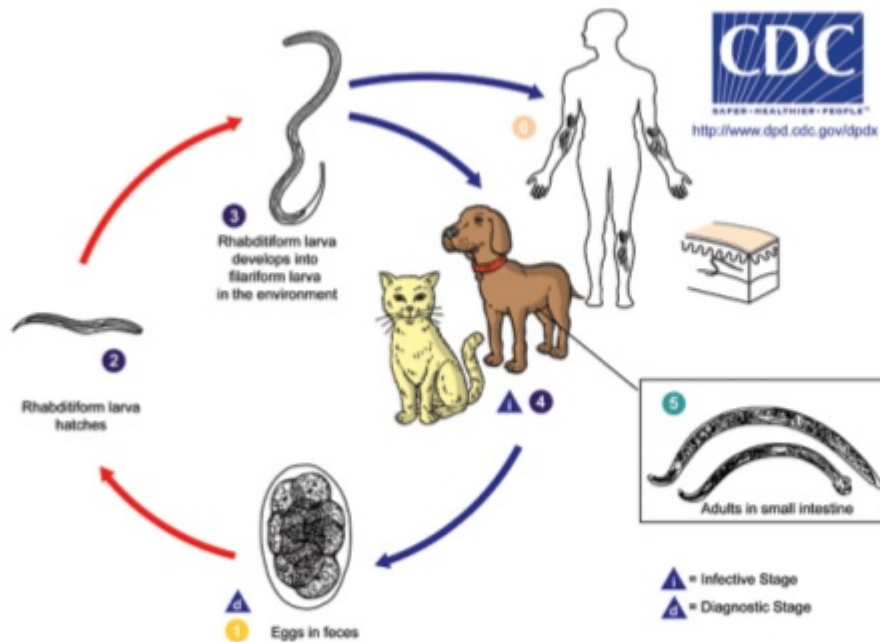


Figura 16: Ciclo biológico da larva migrans.

6. REFERÊNCIAS

- BRASIL, Ministério da Saúde. Estabelece as responsabilidades por parte de quem produz a água, a quem cabe o exercício do controle de qualidade da água e das autoridades sanitárias, a quem cabe a missão de “vigilância da qualidade da água” para consumo humano. Portaria MS n° 518, de 25 de Março de 2004. Legislação Federal.
- CAIRES, LUANNE. Microorganismos são alternativa sustentável para recuperação de áreas contaminadas. Disponível em: <http://www.comciencia.br/microorganismos-sao-alternativa-sustentavel-para-recuperacao-de-areas-contaminadas/>. Acesso em 22 de outubro de 2018.
- INGRAHAM, J.L. Introdução À Microbiologia - Uma Abordagem Baseada Em Estudos de Casos - 3ª Ed. Cengage Learning. 2010
- PACHECO, A. Cemitérios e o meio ambiente. Tese (livre Docência) São Paulo, p 102 - Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo.
- DE FREITAS, M.B; BRILHANTE,O.M.; DE ALMEIDA, L.M. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. *Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro*, mai-jun, 17(3):651-660.2001.
- PAIVA, RFPS & SOUZA, MFP (2018). Associação entre condições socioeconômicas, sanitárias e de atenção básica e a morbidade hospitalar por doenças de veiculação hídrica no Brasil. *Cad. Saúde Pública*; 34(1):e00017316. 2018.
- REBOUÇAS, A. da C., BRAGA, B., TUNDISI, J. G. Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação. 3ª ed. São Paulo: Escrituras, 720 p. 2006.
- ROCHA, S.F. Análises e Vulnerabilidade de Contaminação de Aquíferos Livres na Baixada Campista de Campos dos Goytacazes - RJ, UENF - *Dissertação de Mestrado - Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro*. 2004.
- TORTORA, GERARD J.; FUNKE, BERDELL R.; CASE, CHRISTINE L. *Microbiologia*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em 22/10/2018.
- REECE, J. B., URRY, L. A., CAIN, M. L., WASSERMAN, S. A., MINORSKY, P. V., AND JACKSON, R. B. *Amplifying DNA: The polymerase chain reaction (PCR) and its use in DNA cloning*. (10th ed., pp. 414-416). SAN FRANCISCO, CA: PEARSON. 2011.