SERGIO DE ALMEIDA BASANO

Estudo preliminar da redução da microfilaremia "*in vivo*" de *Mansonella ozzardi* (Manson, 1897) com uso de ivermectina, utilizando a técnica de filtração em membrana de policarbonato, Lábrea, Amazonas, Amazônia Ocidental, Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

SERGIO DE ALMEIDA BASANO

Estudo preliminar da redução da microfilaremia "*in vivo*" de *Mansonella ozzardi* (Manson, 1897) com uso de ivermectina, utilizando a técnica de filtração em membrana de policarbonato, Lábrea, Amazonas, Amazônia Ocidental, Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Profº Dr. Luís Marcelo Aranha Camargo

"Versão corrigida: A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)".

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Basano, Sergio de Almeida.
Estudo preliminar da redução da microfilaremia "*in vivo*" de *Mansonella ozzardi* (Manson, 1897) com uso de ivermectina, utilizando a técnica de filtração em membrana de policarbonato, Lábrea, Amazonas, Amazônia Ocidental, Brasil / Sergio de Almeida Basano. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Luis Marcelo Aranha Camargo.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Epidemiologia da Mansonelose.

Versão do título para o inglês: Preliminary study of the reduction of microfilaraemia "*in vivo*" of *Mansonella ozzardi* (Manson, 1897) with the use of ivermectin, using the blood filtration polycarbonate membrane technique, in Labrea, western Amazon, Brazil.

1. Filarioses 2. *Mansonella ozzardi* 3. Ivermectina 4. Tratamento 5. Amazônia Ocidental 6. Mansonelose I. Camargo, Prof. Dr. Luis Marcelo Aranha II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0173/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sergio de Almeida Basano.

Título da Tese: Estudo preliminar da redução da microfilaremia "*in vivo*" de *Mansonella ozzardi* (Manson, 1897) com uso de ivermectina, utilizando a técnica de filtração em membrana de policarbonato, Lábrea, Amazonas, Amazônia Ocidental, Brasil.

Orientador(a): Prof. Dr. Luis Marcelo Aranha Camargo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 38130900 - telefax: (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

Decl. CEPSH. 066/2013

DECLARAÇÃO

Declaro que o **relatório Final** apresentado pelo pesquisador Prof. Dr. Luiz Marcelo Aranha Camargo e aluno Sergio de Almeida Basano, referente ao projeto intitulado: "*Estudo preliminar da redução da microfilaremia in vivo de Mansonella ozzardi com uso de ivermectina*", foi analisado e considerado satisfatório por esta Comissão, conforme prevê a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

São Paulo, 18 de outubro de 2013.

Prof. Dr. Paolo M.A Zanotto
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

À minha primeira esposa

Dezoito anos de crescimento e a maioridade do amor, fazem parte da minha relação com a minha esposa, que sem dúvidas a dedicação deste trabalho fica aquém do que ela representa para mim. Sou e conquistei vários objetivos na minha vida, única e exclusivamente por causa dela. Dedico tudo aquilo que eu tenho de melhor como pessoa, profissional e cidadão a você, e o resto de meus defeitos e imperfeições, que não são poucos, só poderão melhorar com a sua participação. Te amo.

OBRIGADO!!!!!!!!!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço às escolas, onde estudei: Externato Galvão Pereira, Colégio Marista Nossa Senhora da Glória, Escola municipal Áurea Cantinho Rodrigues, Escola estadual Maria Luiza Guimarães, Escola Técnica Professor Everardo Passos, Colégio Objetivo, Anglo vestibulares, Pontifícia Universidade Católica (Faculdade de Medicina de Sorocaba). Também agradeço ao Instituto de Ciências Biomédicas da USP e ao seu núcleo avançado em Monte Negro Rondônia (ICB – V), onde direta ou indiretamente estou envolvido ora como aluno, ora como colaborador, ora como cidadão e amigo do Professor Luís Marcelo desde Abril de 1997. Estendendo a todos os professores que participaram desta jornada de formação de um garoto do Cambuci em médico, pesquisador e também professor universitário.

Agradeço aos meus pais por tudo, aos meus irmãos, aos meus amigos de infância, do colégio, da adolescência, da faculdade, e hoje aos amigos de Rondônia, pois estes são escolhidos. Agradeço a todos familiares em geral, e em especial ao meu padrinho José Basano Netto.

Agradeço à Silvia Camargo, pelas informações, dedicação e zelo e a toda equipe da secretaria de pós-graduação da parasitologia e do ICB5, a equipe da biblioteca do ICB Valéria Loro e Mônica da Silva Amaral pelas correções e ajuda a Suzana Peres Rodrigues por apoio nas formatações da tese, a Regiane da Silva Riojas pelo companheirismo, e a Rafael Pergoraro com a ajuda na biblioteca e a Adriany Duarte Pereira pela finalização da tese pós-defesa.

Agradeço aos colegas professores da faculdade de medicina São Lucas pelo trabalho em equipe. Agradeço ao Dr Luiz Augusto Paiva Cardoso por todo o incentivo e liberação nas horas necessárias. Agradeço especialmente a Dra Stella Ângela Tarallo Zimmerli pela irmandade de pensamentos, apoio e companheirismo nas áreas de assistência, ensino e na administração pública.

Agradeço ao grande amigo e companheiro inseparável do Purus Oscar de Brito, a toda a sua família, principalmente os irmãos David e Zé Nelson e a sua querida esposa Dona Elza. Agradeço aos secretários de saúde de Lábrea Sr Raimundinho Pequeno (antigo) e Michel Cruz (atual), e a todos os funcionários da unidade fluvial e equipes de saúde do município de Lábrea em nome do comandante Clodoaldo.

Agradeço especialmente a toda população de Lábrea, principalmente, à população ribeirinha que maciçamente e em uníssono foi voluntária deste estudo e com a sua hospitalidade, literalmente deram sangue para que esta pesquisa fosse realizada na tentativa de iniciar um caminho para o tratamento desta parasitose tão negligenciada.

Finalmente não poderia deixar de agradecer aos grandes mestres desta empreitada como o professor Gilberto Fontes, que mineiramente ocupou o meu coração pela dedicação, eficiência, zelo e desprendimento, além das inúmeras dicas, sacadas, opiniões e ajuda tanto intelectual como em muitos casos até braçal nas margens do Rio Purus.

Agradeço também ao Doutor Jansen Fernandes Medeiros, com seu jeito introspectivo da mais pura argila do nordeste, e com uma enorme experiência com a região e com o "nosso" parasita, sem falar em toda a ajuda de material científico e intelectual (Obrigado Ponta de Lança). Agradeço ao Doutor Ricardo de Godoi Mattos Ferreira, colega de pós, que brilhantemente ajudou a arredondar a tese e os artigos e que já esta incorporado a "equipe de bandeirantes", e a sua equipe da Fiocruz-RO, e ao colega Guilherme Ogawa pela ajuda e revisão da tese.

Agradeço a equipe de análises clínicas (laboratório) da USP-Monte Negro (ICB5), Biomédica Juliana de Souza Almeida Aranha Camargo pela amizade, irmandade em uma mistura perfeita de trabalho e companheirismo, agradeço a técnica Silvana Eugênio mais presente das 14 viagens ao rio Purus, além da Biomédica Luana Janaína Souza Vera por suas contribuições e bom humor.

Agradeço aos meus filhos Luísa Guimarães Basano e Lucca Basano que são a razão dos meus esforços e que sofrem com as minhas constantes ausências, amo muito vocês.

E finalmente agradeço também aos ardidos e inseparáveis piuns, que também se fizeram presentes nas cheias e nas vazantes do Purus, diuturnamente a nos lembrar de sua territoriedade e por estreitar os laços entre a medicina, entomologia, biologia, ecologia que juntas são agregadas a este ramo da ciência que muito amamos a PARASITOLOGIA MÉDICA.

AGRADECIMENTO AO MEU ORIENTADOR

“Nas minhas conversas com os homens de negócio de Rondônia, principalmente na cidade de Porto Velho, freqüentemente eles me perguntavam:
- Quando é que os paulistas se resolvem de aparecer?
.....Posso lhes garantir que eles virão em Jeeps, caminhões, pois esta terra é da que Paulista gosta para investir capitais, mas façam a rodovia .....

Texto: Jornalista Manoel Rodrigues Ferreira. A Gazeta de São Paulo – 12 janeiro de 1960
apud Leal, Paulo Nunes. O outro Braço da Cruz – 1ª edição setembro 1982, p. 44.

Ao professor Luís Marcelo Aranha Camargo, “Bandeirante da Ciência”.

Alguns **“Apareceram”** não pelo capital e sim pela ciência, pela aventura e atrás dos mistérios do Norte. Estes fixaram as bases de uma nova imigração NÃO agrícola-pecuarista e sim Médico-Tropicalista. Aqui faço a minha sincera homenagem ao meu orientador Professor Luís Marcelo Aranha Camargo, que chegou a estas paragens no final da década de 1980 como pós-graduando da USP e iniciou a formação e a aglutinação desta geração de Brasileiros vindos de todas as partes e que se transformaram em Rondonienses por opção e pesquisadores por sua iniciação. Somos destemidos pioneiros, que nestas paragens do poente tentamos, gritar que aqui também somos Brasileiros, como diz o sonoro Hino do Estado de Rondônia. Para muitos é o fim do Brasil, para nós o começo. Trabalhamos muito professor Luís Marcelo, conspiramos muito também, principalmente contra as interpéries político-burocrata-administrativa, sempre em prol do Amazônino, tanto o migrante como os nativos, na grande maioria das vezes os pequenos, os fracos e os desvalidos. Filosofamos outras tantas e enquanto construíamos nossos projetos, lembrávamos nossa terra, das eternas brigas e discussões do Choque-Rei, das saudades da urbanidade e da boemia paulistana, de nossas tradições, músicas e paladares, temperadas pelos trópicos que na verdade não são nem idílicos alencarianos e muito menos Aguirreanos de Herzog. Apenas uma terra de transições e de esperanças de um novo eldorado, este em vários sentidos, pois a ciência nada mais é do que um braço a sustentar e a mitigar a caminhada do **HOMEM.** Ao Pós doc...

ODE AO CAMBUCI.

Confidência de um Cambuciense.
Alguns anos vivi no Cambuci.
Principalmente nasci no Cambuci.
Por isso sou algo “Speranzoso”.
Cem por cento de Speranza na calçada.
Oitenta por cento de Speranza nas Almas.
Bairro antigo e operário.
Confluente de imigrantes e migrantes.
Italianos, Coreanos e Nordestinos.
Colégio Marista Nossa Senhora da Glória.
Cantina 1020 (mile e vinte).
A juriti e suas ostras frescas.
O largo, a Muniz de Sousa, o Judas linchado.
O medo de perder o All Star.
O Balneário e as peladas.
O Tróleibus aos domingos para o Palestra!!!!!!!!!
Hoje também sou funcionário Público – Carlos.....
O Cambuci é apenas uma memória.
Mas como dói também.

Sergio Basano em homenagem a Carlos Drumond de Andrade (Ode a Itabira).

RESUMO

BASANO, S. A. E**studo preliminar da redução da microfilaremia "in vivo" de *Mansonella ozzardi* (Manson, 1897) com uso de ivermectina, utilizando a técnica de filtração em membrana de policarbonato, Lábrea, Amazonas, Amazônia Ocidental, Brasil.** 2015. 135 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Mansonelose é uma parasitose negligenciada que ocorre ao longo de alguns rios Amazônicos. Não existe nenhuma padronização de seu tratamento, o que resulta em um problema de saúde para as autoridades pública locais de saúde. Estudou-se a eficácia do uso de dose única de ivermectina 0,15 mg/kg de peso no tratamento de 74 pacientes com infecção pela filária *Mansonella ozzardi* em área endêmica, no município de Lábrea, onde não existe a presença de outros filarídeos humanos. Inicialmente foi realizada a coleta de sangue para o diagnóstico parasitológico utilizando a filtração de sangue em membrana de policarbonato (FMP) e para análises bioquímicas e hematológicas. Foi realizado anamnese, exame clínico e as coletas de sangue para quantificação de microfilárias, comparando os resultados dos pacientes do primeiro dia e após 72 horas no mínimo e seguindo-os até 1 ano após o tratamento. Foi observado que houve uma redução estatisticamente significativa em relação à densidade de microfilárias ($\chi 2$ de Friedman = 159,00; valor-p < 0, 0001) após 1 ano do uso da medicação, e que não houve alterações laboratoriais (hemograma, metabólitos hepáticos e excretas nitrogenados), que comprometessem o uso da ivermectina em dose única de 0,15 mg/kg de peso. Entretanto 64,9% dos pacientes apresentaram sintomas e sinais clínicos após o tratamento com a ivermectina (hipertermia, cefaleia, artralgia e tontura). Concluiu-se que o uso da ivermectina nesta dose apresenta-se como um eficaz microfilaricida, mantém um efeito supressor de microfilárias, por pelo menos 1 ano e que as reações adversas, embora comuns, não são obstáculos para o tratamento com este fármaco.

Palavras-chave: Filarioses. *Mansonella ozzardi.* Mansonelose. Tratamento. Ivermectina. Amazônia Ocidental.

ABSTRACT

BASANO, S.A. **Preliminary study of the reduction of microfilaremia "in vivo" of *Mansonella ozzardi* (Manson, 1897) with use of ivermectin, using the blood filtration polycarbonate membrane technique, in Labrea, Brazilian Amazon, Western Amazon, Brazil**, 2015. 135 p. Ph. D. thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Mansonelliasis is a neglected parasitosis that occurs over a few Amazonian rivers. There is no standardization of treatment, resulting in a public health problem for the local authorities. The study focused in the efficacy and tolerability of a single-dose use of ivermectin 0.15 mg / kg body weight in the treatment of 74 patients infected by the filarial worm *Mansonella ozzardi* in an endemic area in the municipality of Labrea, where there is the no presence by other human filariae. Before and after the parasitological diagnosis by the blood filtration polycarbonate membrane technique and treatment, anamnesis, clinical examination and blood collection for quantification of microfilariae, biochemical and hematological analysis were done, comparing the outcomes of patients the in the first day and after 72 hours and at least following up the patients for 1 year. The study concluded that there was a statistically significant reduction in microfilariaemia density ($\chi 2$ Friedman = 159, 00; p-value <0, 0001) after 1 year of use of the medication, and that there were no laboratory abnormalities (hematological profiles, liver metabolites and nitrogen excreta) that compromised the use of ivermectin in a single dose of 0.15 mg / kg. However, 64.9% of patients showed clinical symptoms and signs after the treatment with ivermectin, but none of them were severe or health threatening. In conclusion, the use of ivermectin, in this dose is a effective microfilaricide and maintains a suppressive effect for at least 1 year and the adverse reactions, although common, are not an obstacle for the treatment with this drug.

Keywords: Filariasis. *Mansonella ozzardi*. Mansonelliasis. Treatment. Ivermectin. Western Amazon.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ribeirinho e Labrense típico e mansonelótico. 19
Figura 2 - Instituto de Ciências Biomédicas da USP em Monte Negro. 21
Figura 3 - Microfilárias de *M. ozzardi* em gota espessa de sangue com aumento de 400X, coradas com Giemsa. 23
Figura 4 - Ciclo biológico de *Mansonella ozzardi.* Fonte: Basano e Camargo, 2014. 29
Figura 5 - Vetor *Simulium sp.* Fonte: EPA, 2014. 30
Figura 6 - Amostras de material biológico (sangue) e gotas espessas preparadas. 33
Figura 7 - Características diferenciais das microfilárias. Detalhe da porção anterior e posterior das microfilárias, distribuição dos núcleos, presença e ausência da bainha (Dipetalonema=Mansonella). 34
Figura 8 - Técnica da gota espessa. 35
Figura 9 - Visualização da membrana de policarbonato para filtração de sangue (Giemsa 100x). Fonte: Luís Marcelo Aranha Camargo. 36
Figura 10 - Lâmina com membrana já corada. Fonte: Prof. Dr. Gilberto Fontes Profa. Eliana Rocha. 37
Figura 11 - Preparativos para a técnica de Knott. Fonte: Prof. Dr. Gilberto Fontes e Profa. Eliana M.M. da Rocha. 37
Figura 12 - Eleltroforese em gel de poliacrilamida a 8%. Fonte: Vera et al., 2011. 38
Figura 13 - Rio Purus e a embarcação usada no projeto em área estudada comunidade (Santa Rosa) Lábrea-AM. 44
Figura 14 - Mapa da área de estudo. Fonte: Basano et al., 2014. 45
Figura 15 - Atendimento a População da comunidade de Samaúma, Lábrea-AM. Fonte: Luís Marcelo Aranha Camargo. 46
Figura 16 - Lote de ivermectina, fornecido pelo Ministério da Saúde. Fonte: Luísa Guimarães Basano. 47
Figura 17 - (A) Coloração das membranas no laboratório, e (B) microscopia para detecção de mf na membrana de policarbonato, Rio Purus. Fonte: Luís Marcelo Aranha Camargo. 48
Figura 18 - Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Fonte: Luís Marcelo Aranha Camargo. 49
Figura 19 - Prevalência de *M. ozzardi* de acordo com o sexo e faixa etária, em comunidades ribeirinhas do Rio Purus, município de Lábrea, Amazonas. 52
Figura 20 - Quantidade de microfilárias transformada pela raiz quadrada e os dias após uso de Ivermetina (D180). 54
Figura 21 - Quantidade de microfilárias transformada pela raiz quadrada e os dias de tratamento após uso de Ivermertina (D360). 55
Figura 22 - Olho com lesões puntiformes em paciente mansonelótico. Fonte: Professor Rubens Belfort Jr. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sintomatologia comparativa em casos positivos e negativos de *M. ozzardi*..... 40
Tabela 2 - Sintomatologia comparativa em casos positivos e negativos de *M. ozzardi*..... 41
Tabela 3 - Sintomatologia comparativa em casos positivos e negativos de *M. ozzardi*..... 41
Tabela 4 - Sintomatologia comparativa em casos positivos e negativos de *M. ozzardi* (informação pessoal)..... 42
Tabela 5- Prevalência de microfilarêmicos por *M. ozzardi* em comunidades ribeirinhas do rio Purus, utilizando a filtração de sangue em membrana em policarbonato. Município de Lábrea, Amazonas. 51
Tabela 6 - Razão de prevalência entre portadores de *M. ozzardi* e variáveis perguntadas. 52
Tabela 7 - Razão de prevalência (RP) entre portadores de *M. ozzardi* e sintomas perguntados.53
Tabela 8 - Comparação dos parâmetros bioquímicos pré e pós-tratamento com Ivermectina... 55
Tabela 9 - Comparação dos exames hematológicos pré e pós-tratamento com Ivermectina.... 56
Tabela 10 - Perfis bioquímicos e hematológicos de todos os pacientes que iniciaram e permaneceram no estudo até o terceiro dia. 57
Tabela 11 - Sinais e sintomas agrupados dos pacientes do ensaio clínico, Lábrea. 58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
AM	Amazonas
An	Anel Nervoso
Anti-HbcIgG	Imunoglobulina G anti-core da hepatite B
B	Bainha
Cc	Corpo Central
Ce	Célula Excretora
CEVS	Centro Estadual de Vigilância em Saúde
Cm	Centímetro
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
Ec	Espaço Cefálico
EPA	*United States Environmental Protection Agency*
FMP	Filtração de Sangue em Membrana de Policarbonato
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GE	Gota Espessa
GGT	GamaGT
HbsAg	Antígeno de superfície da hepatite B
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
Km	Quilômetro
km^2	Quilômetro quadrado
L1	Larva 1
L2	Larva 2
L3	Larva 3
M.	*Mansonella*
MDA	*Mass Drug Administration*
mf	Microfilárias
mf/mL	Microfilária por mililitro
mf/mm^3	Microfilárias por milímetro cúbico
mg/kg	Miligrama por quilograma
mg/pessoa	Miligrama por pessoa
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
MO	*Mansonella ozzardi*
ONU	Organização das Nações Unidas
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
Pa	Poro Anal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Pe	Poro Excretor
S.	*Simulium*
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **21**

1.1 Filárias no mundo **21**

1.2 Morfologia específica da *Mansonella ozzardi* **22**

1.3 Histórico **24**

1.4 Atualidades **26**

1.5 Casuística geral e no Brasil **27**

1.6 Ciclo biológico de *Mansonella ozzardi* **29**

1.7 Vetores de Mansonella ozzardi **29**

1.8 Patogenicidade **31**

1.9 Métodos de Diagnóstico de Microfilárias **32**

1.9.1 Gota Espessa de Sangue (GE) **34**

1.9.2 Filtração de Sangue em Membrana de Policarbonato (FMP) **35**

1.9.3 Técnica de Knott **37**

1.9.4 Diagnóstico Molecular (Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) **38**

1.10 Tratamento **38**

1.11 Aspectos clínicos da mansonelose **40**

2 OBJETIVO GERAL **43**

2.1 Objetivos específicos **43**

3 MATERIAS E MÉTODOS **44**

3.1 Área de estudo **44**

3.2 Amostra **45**

3.3 Diagnóstico e quantificação de microfilárias (mf) sanguíneas **48**

3.4 Avaliação da eficácia e da segurança **49**

3.4.1 Reações Adversas (RA) **49**

3.5 Questões Éticas **49**

3.6 Análise estatística dos resultados 50

3.7 Logística do trabalho de Campo. 50

4 RESULTADOS 51

4.1 Geral 51

4.2 Ensaio Clínico 53

5 DISCUSSÃO 59

6 CONCLUSÕES 71

7 PERSPECTIVA DE CONTROLE 72

8 DIFICULDADES ENCONTRADAS 73

REFERÊNCIAS 74

OBRAS CONSULTADAS 86

APÊNDICES 90

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido 91

APÊNDICE B - Ficha clínica 93

APÊNDICE C - Ficha clínico-epidemiológica 95

APÊNDICE D - VERA, L. J. S.; BASANO, S. A.; CAMARGO, J. S. A. A.; FRANÇA, A. K.; FERREIRA, R. G. M.; CASSEB, A. A.; MEDEIROS, J. F.; FONTES, G.; CAMARGO, L. M. A. Improvement of a PCR test to diagnose infection by *Mansonella ozzardi.* Revista da Sociedade Barsileira de medicina Tropical, 44(3): 380-382, mai-jun, 2011. 101

APÊNDICE E - BASANO, S. A.; CAMARGO, J. S. A. A.; VERA, L. J. S.; VELASQUES, S. N.; OGAWA, G. M.; MEDEIROS, J. F.; CAMARGO, L. M. A. Investigation in the ocurrence of *Mansonella ozzardi* in the State of Rondônia, Western Amazonia, Brasil.Revista da Sociedade Barsileira de medicina Tropical, 44(5): 600-6003, set-out, 2011. 104

APÊNDICE F - BASANO, S. A.; FONTES, G.; MEDEIROS, J. F.; CAMARGO, J. S. A. A.; VERA, L. J. S.; ARAÚJO, M. P. P.; PARENTE, M. S. P.; FERREIRA, R. G. M.; CRISPIM, P. T. B.; CAMARGO, L. M. A. Sustained Clearance of *Mansonella ozzardi* Infection after Treatment with Ivermectin in the Brazilian Amazon. Am. J. Trop. Med. Hyg., 90(6): 1170-1175, 2014. 108

APÊNDICE G - Artigo aceito para publicação 114

BASANO, S. A.; FONTES, G.; MEDEIROS, J. F.; CAMARGO, J. S. A. A.; VERA, L. J. S.; FERREIRA, R. G. M.; CAMARGO, L. M. A. Occurrence of *Mansonella ozzardi* using polycarbonate membrane in riverside population of Lábrea, western Brazilian Amazon

***Mansonella ozzardi* (Manson, 1897) in Purus river. (No prelo-Revista da Sociedade Braileira de Medicina Tropical)** **114**

APÊNDICE H - Tabelas sintomas **122**

APÊNDICE I - Tabelas efeitos colaterais **126**

APÊNDICE J - Tabelas efeitos colaterais 2 ..... **128**

APÊNDICE K - Tabelas efeitos colaterais-tempo **130**

ANEXO A - Protocolo para cálculo de medicação **132**

(Ministério da Saúde do Brasil, lote: NF27660/0832210, registro: 343368-5) **132**

Estudo preliminar da redução da microfilaremia "*in vivo*" de *Mansonella ozzardi* (Manson, 1897) com uso da ivermectina, utilizando a técnica de filtração em membrana de policarbonato, Lábrea, Amazonas, Amazônia Ocidental, Brasil.

Figura 1 - Ribeirinho e Labrense típico e mansonelótico.
Original: Leandro Viana, DPZ.

CONTEXTUALIZAÇÃO

O ensaio clínico com o uso da ivermectina para tratamento da *Mansonella ozzardi* é parte de um projeto sobre filarioses amazônicas em população ribeirinha de Lábrea-AM, portadora da mansonelose, realizado pela Universidade de São Paulo em seu núcleo instalado no estado de Rondônia, denominado Instituto de Ciências Biomédicas 5 da USP – ICB5, (Figura 1). Este núcleo da USP teve sua concepção a partir da ideia dos parasitologistas e professores Erney Felício Plessmann de Camargo, Henrique Krieger, Luiz Hildebrando Pereira da Silva e Luís Marcelo Aranha Camargo. Esses professores/pesquisadores vislumbraram a necessidade de interiorizar massa crítica nas regiões a serem desbravadas pela ciência e abrir uma nova área de campo para jovens pesquisadores em parasitologia. A partir daí, jovens parasitologistas foram deslocados para Rondônia em 1989, dentre eles, meu orientador, o Prof. Luís Marcelo. Iniciaram-se então um conjunto de ações que culminaram com a construção do núcleo de pesquisa na cidade de Monte Negro em 2001 (Figura 2), dando oportunidade para a formação de pesquisadores no estado de Rondônia, e, já na primeira década de existência formal, alavancando em torno de 12 milhões de reais em projetos de pesquisa e originando mais de 120 artigos científicos entre os quais esta tese de doutorado está incluída.

O projeto sobre filarídeos da Amazônia foi idealizado a partir dos trabalhos dos professores Leônidas e Maria Deane, que realizaram inquéritos epidemiológicos na região no final da década de 1940 e início da década de 1950, quando houve ocorrência de casos de *Wuchereria bancrofti* e *M. ozzzardi* em algumas cidades da Amazônia. Apesar de outros autores terem continuado a pesquisar este assunto no Brasil, com maior ênfase na Bancroftose, o estado de Rondônia acabou ficando em silêncio científico por mais de cinco décadas, até, após a palestra do Prof. Gilberto Fontes, atual professor da Universidade Federal de São João Del Rei, que ao estudar os trabalhos do professor Deane e apesar de todas as opiniões em contrário conseguiu, junto com a Prof.ª Eliana M. Maurício da Rocha, redescobrir a ocorrência da filariose linfática em Alagoas. E, após anos de trabalho árduo de pesquisa, assistência e ensino culminaram com o selo verde da OPAS/OMS (eliminação desta doença em Alagoas). Esses fatos, somados a uma curiosidade médica (antiga) de alguns tropicalistas e médicos assistentes do Centro de Medicina Tropical de Rondônia e da Universidade de São Paulo, resultaram em um grande projeto de pesquisa de filarídeos no Estado de Rondônia.

A partir destes fatos foram elaborados três projetos financiados pela FAPESP, para estudar a ocorrência de três filarídeos específicos (*Wuchereria bancrofti*, *Dirofilaria immitis* e *Mansonella ozzardi*). Como no projeto inicial, sobre a *M. ozzardi* não foram encontrados

pacientes parasitados em Rondônia (BASANO et al., 2011), a equipe “migrou” para o município de Lábrea no estado do Amazonas (município vizinho a Porto Velho), que era a principal cidade que encaminhava portadores desta parasitose para Rondônia, iniciando assim este projeto de pesquisa. No estudo sobre *W. bancrofti* foi verificada a não ocorrência da filariose linfática em áreas dos municípios de Porto Velho e Guajará-Mirim em Rondônia e Humaitá no Amazonas (KORTE et al., 2013), e no estudo desenvolvido sobre *D. immitis* foram identificados 12% de cães de Porto Velho positivos para a dirofilariose (OGAWA et al., 2013).

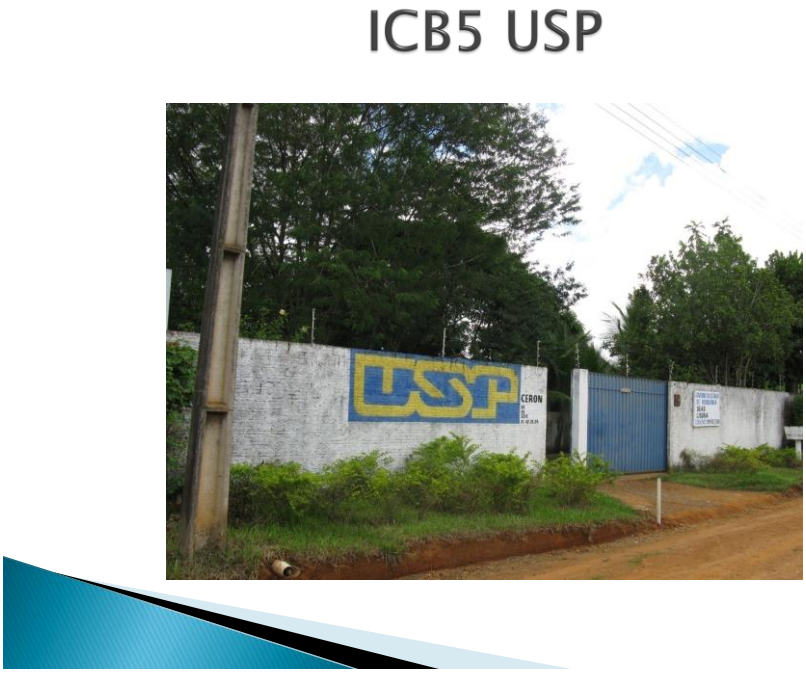

Figura 2 - Instituto de Ciências Biomédicas da USP em Monte Negro.

Original: Luís Marcelo Aranha Camargo.

1 INTRODUÇÃO

A parasitologia é a área da ciência que estuda a relação entre os seres vivos de espécies diferentes em seus vários aspectos (parasitismo), assim sendo, convencionou-se chamar uma parte desta ciência de parasitologia médica, pois de uma maneira específica, estuda as relações entre parasitas e hospedeiros, intermediada na maioria das vezes por seres invertebrados e tendo como foco principal o ser humano.

O filarídeo *M. ozzardi* (Nematoda, Onchocercidae) é um dos agentes etiológicos da mansonelose, doença causada por uma das três espécies de *Mansonella* que parasitam o ser humano (*M. ozzardi*, *M. perstans* e *M. streptocerca*). Esse helminto (*M. ozzardi*) possui distribuição geográfica limitada às Américas, sendo encontrado do México até a Argentina, excetuando-se Chile, Uruguai e Paraguai (TAVARES; FRAIHA NETO, 1997).

No Brasil a região Amazônica compreende todos os focos desta parasitose e na grande maioria dos trabalhos sobre esse parasito, foram enfatizado os aspectos epidemiológicos dessa parasitose e em outros os aspectos clínicos e terapêuticos da mesma.

A proposta deste estudo, apesar do impedimento (por parte do comitê) de ética do uso de um placebo, foi demonstrar em um modelo "*before and after intervention*" (DEEKS et al., 2003) o *clearence* da microfilaremia e o acompanhamento dos microfilarêmicos por *M. ozzardi* por um período de um ano após tratamento, utilizando a técnica de filtração em membrana de policarbonato e verificar *in loco* os efeitos adversos na tentativa de padronizar a ivermectina como uma opção para o tratamento da mansonelose.

1.1 Filárias no mundo

As filárias são seres do Reino Animalia, Sub-reino Metazoa, filo Nemathelminthes, classe Nematoda, Ordem Spirurida e superfamília Filarioidea. A superfamília Filarioidea é representada por nematoides, obrigatoriamente parasitos, que habitam o sistema circulatório, as cavidades celômicas, os músculos e o tecido conjuntivo dos vertebrados. São parasitos heterôxenos que necessitam de um inseto hematófago como hospedeiro invertebrado que pode servir de vetor para diferentes espécies patogênicas: *Wuchereria bancrofti*, *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi*, *M. perstans*, *M. streptocerca*, *Brugia malayi*, *B. timori* e *Loa loa* (ORIHEL; EBERHARD, 1982; REY, 2001).

As filárias são os nematóides que apresentam maior evolução na escala biológica dos nematodas humanos. As fêmeas adultas são vivíparas e produzem seus embriões (microfilárias)

que são infectantes para os insetos vetores responsáveis pela transmissão. As microfilárias (mf) podem ser encontradas no sangue periférico e na pele do hospedeiro vertebrado (HAWKING, 1979).

Dados da Organização Panamericana de Saúde e de trabalhos recentes apontam para uma alta prevalência dessas parasitoses, que do ponto de vista médico e social representam importante problema de saúde pública por ameaçarem a vida de grande parte da população mundial, causando perdas econômicas e incapacitação para o trabalho (OPAS, 2003; ZHANG et al., 2010).

1.2 Morfologia específica da *Mansonella ozzardi*

Os vermes adultos ou macrofilárias de *M. ozzardi* apresentam dimorfismo sexual e se localizam no tecido conectivo subcutâneo, tecido conjuntivo subperitoneal e nas membranas serosas da cavidade abdominal do hospedeiro humano (FONTES; ROCHA, 2005a; ORIHEL; EBERHARD, 1982). Existe também referência de sua presença nos linfonodos e nos vasos linfáticos adjacentes (NUTMAN, 2001).

As fêmeas apresentam corpo branco, transparente, com cutícula lisa e homogênea, medindo o dobro do tamanho dos machos, com 3,22 cm a 6,15 cm (média de 4,95 cm) de comprimento por 0,013 cm a 0,019 cm (média de 0,015 cm) de diâmetro (FONTES; ROCHA, 2005a; ORIHEL; EBERHARD, 1982). Os machos medem entre 2,4 cm a 2,8 cm (média de 2,63 cm) de comprimento por 0,007 cm a 0,008 cm (média de 0,007 cm) de diâmetro e tem sistema reprodutor em tubos simples e testículos dispostos na região esofágica (FONTES; ROCHA, 2005a; ORIHEL; EBERHARD, 1982). Apresentam dois espículos, sendo o esquerdo maior que o direito, 11 papilas pericloacais e outros dois pares mais salientes próximos à extremidade posterior, que é recurvada anteriormente (BAIN et al., 2015; LAURENCE; SIMPSON, 1968; ORIHEL; EBERHARD, 1982; TAVARES; FRAIHA NETO, 1997).

As mf de *M. ozzardi* (Figura 3) circulam no sangue, sem periodicidade regular (LACERDA; RACHOU, 1955; MORAES, 1959; TAVARES, 1981), medem de 207-232 μm (média de 220 μm) de comprimento por 3-4 μm de diâmetro e não apresentam bainha. Seus primeiros núcleos somáticos são tipicamente dispostos em fila única e os dois primeiros formam um par típico, um atrás do outro, e nas preparações coradas, os núcleos somáticos coram densamente. As mf possuem cauda fina e curta terminando em forma de gancho ou foice, os núcleos caudais são reduzidos a uma fileira de sete a nove elementos e a ponta da

cauda é desprovida de núcleos (LAURENCE; SIMPSON, 1968; ORIHEL; EBERHARD, 1982; TAVARES; FRAIHA NETO, 1997). As mf de *M. ozzardi*, estudadas por Tavares (1981), em pacientes do vale do rio Ituxi município de Lábrea-AM, mediam 162x4 µm, semelhantes às encontradas em Codajás-AM (BIAGI, 1956). A sobrevida da microfilária é estimada em 32 meses, com o seu ciclo biológico completado nos simulídeos em nove dias (CERQUEIRA, 1959; SHELLEY; SHELLEY, 1976; TIDWELL; MUÑOZ, 1980) e nos culicóides em 12 dias (NATHAN; BARTHOLOMEW; MUNROE, 1978).

As mf de *M. ozzardi* (Figura 3), também podem ser encontradas em capilares no tecido subcutâneo de parasitados e deve-se fazer o diagnóstico diferencial com *O. volvulus* (FONTES; ROCHA, 2005a; MORAES, 1959). A identificação das diferentes microfilárias é baseada na observação de uma série de estruturas morfológicas à microscopia óptica: anel nervoso, células germinativas, poro excretor, célula excretora, poro anal, espaço cefálico e caudal, assim como a presença ou não de bainha, o formato da cauda e o número de núcleos na parte caudal (MARKELL; VOGE, 1981; TAVARES, 1981; WHO, 2000).

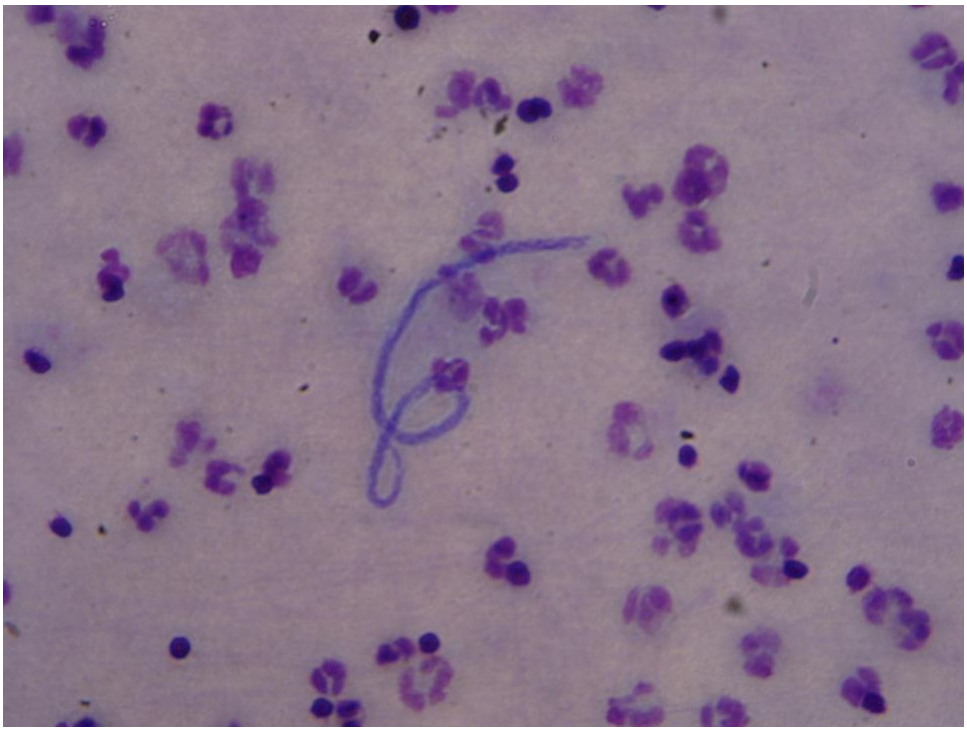

Figura 3 - Microfilárias de *M. ozzardi* em gota espessa de sangue com aumento de 400X, coradas com Giemsa. Original: Luís Marcelo Aranha Camargo.

1.3 Histórico

Das espécies de filárias encontradas em nosso meio parasitando humanos, apenas uma é autóctone das Américas a *M. ozzardi*. As demais são originárias da Ásia e da África e suspeita-se de que vieram para as Américas durante o tráfico de escravos e se adaptaram em vista da presença de um bom hospedeiro invertebrado (artrópode) semelhante aos de sua região de origem (DEANE et al.,1953; OLIVEIRA, 1963).

O primeiro relato da presença de microfilárias de *M. ozzardi* na corrente sanguínea periférica foi feito por Manson (1897), que as nomeou *Filaria ozzardi* (BAIN, 2002; ORIHEL; EBERHARD, 1982). Em 1929, Faust criou o gênero *Mansonella* baseado na descrição morfológica das microfilárias e nas descrições preliminares e incompletas dos vermes adultos fornecidos por alguns pesquisadores. Desde então, essa parasitose vem sendo assinalada em focos dispersos entre o México e o norte da Argentina, com prevalências que variaram de 0,4% a 96,2% (BARTOLONI, 1999; BIAGI, 1956; BRUMPT, 1949; DEANE et al., 1949; DEANE et al.,1953; FORMICA; BOTTO, 1990; KOZEK et al., 1982; MARINKELLE; GERMAN, 1970; MARTINS, 2010; MAZZOTI, 1942; McCOY, 1933; MEDEIROS et al., 2009, 2010, 2011, 2014; NATHAN; STROOM, 1991; NELSON; DAVIES, 1976; ORIHEL, 1967; SAUTET, 1949; STRONG, 1945; VOLCAN; MEDRANO; GONZALEZ, 1986).

Em 1935, na Amazônia Sul Americana, especificamente na antiga Guiana Inglesa, Cesare Romiti, em seu trabalho "Filariasis in British Guiana - A comparative study of *Filaria bancrofti* and *Filaria ozzardi* infections", fez comparações de vários aspectos entre as duas espécies em seus estudos durante mais de 10 anos de pesquisa em 7.000 pacientes (ROMITI, 1935). Romiti observou que *M. ozzardi* era mais frequente nas regiões altas dos rios, sem relação com gênero e idade, não era periódica e que os portadores apresentavam uma frequência maior de casos de hidrocele, adenomegalia, abscessos, miosites e infecções piogênicas. Entretanto, segundo o mesmo autor, não havia como provar a relação dos achados clínicos com filária *M. ozzardi*.

A distribuição geográfica de *M. ozzardi* é limitada ao continente americano, onde é tida como autóctone. Esta hipótese foi colocada em dúvida apenas uma vez por Manson-Bahr em 1943, que registrou seu encontro na Nova Guiné, Oceania. Mas, esse achado foi contestado por Faust em 1949, que acreditava que ela tivesse sido identificada incorretamente, confundida com *W. malayi*, espécie incidente nessa localidade (DEANE et al.,1953). Acredita-se que tenha sido

esse o caso, pois desde então focos de *M. ozzardi* tem sido encontrados somente no Novo Mundo.

No Brasil, a primeira descrição de *M. ozzardi* foi em 1949 na cidade de Manaus, quando a Prof.ª Maria P. Deane a revelou durante inquérito que determinou a frequência do parasitismo por filárias entre a população de Manaus (DEANE, 1949). Das 2.045 pessoas examinadas, 15 (0,6%) apresentaram microfilárias de *M. ozzardi* (DEANE, 1949). Destas, sete nunca haviam residido fora do município de Manaus, o que conferia o caráter autóctone da parasitose. Nesse estudo, a própria autora referiu que recebia lâminas de sangue de povoados do alto rio Amazonas para diagnóstico de malária com a presença de *M. ozzardi*, e em nota, a autora também fazia referência que as lâminas com *M. ozzardi* foram revisadas e confirmadas pelo Prof. Samuel Barnsley Pessoa do Departamento de Parasitologia da USP (DEANE, 1949).

Nestes registros e com o seguimento dos inquéritos de filariose do Serviço Nacional de Malária do Brasil, observaram-se nove localidades com casos de *M. ozzardi*, sendo oito sabidamente autóctones com freqüências que variavam de 4,6% a 28,6% e apresentavam como característica um aumento da positividade de casos com o incremento da faixa etária, entretanto sem poupar a população jovem, com um caso em criança de apenas cinco meses de vida (MORAES, 1958; RACHOU; LACERDA; SANTOS, 1953; RACHOU, 1960).

Até 1950, muito pouco se sabia sobre a distribuição das filarioses no Brasil, com exceção da existência de focos isolados em Salvador (BA) e Belém (PA) de *W. bancrofti*. A partir do final da década de 1940 e início da década de 1950, através do Serviço Nacional de Malária, foram iniciados os primeiros estudos para se conhecer a distribuição geográfica e prevalência da bancroftose em geral e de outros filarídeos em nosso país. Assim, durante o período de 1951 a 1958 foram realizados vários inquéritos hemoscópicos e entomológicos, identificando focos autóctones em várias cidades e estados do norte ao sul do Brasil (RACHOU, 1960).

Deane e colaboradores (1953) fazendo um levantamento hemoscópico em São Paulo de Olivença, Estado do Amazonas, entre 586 amostras de sangue colhidas encontraram 74 delas com a presença de microfilárias, o que correspondia a 12,6% do total. Rachou, Lacerda e Santos (1953) encontraram em Boa Vista (antigo território de Rio Branco), atual Estado de Roraima, dois casos de portadores de *M. ozzardi* entre 837 pessoas (0,24%), porém acreditaram não serem autóctones dessa cidade.

A partir da identificação do inseto vetor e do encontro das larvas infectantes do parasito (CERQUEIRA, 1956; MORAES, 1958), foram demonstrados os locais de autoctonia destas parasitoses e as respectivas prevalências. Através das leituras das lâminas, inquéritos

entomológicos e dos questionamentos sobre a permanência do portador no local examinado, pode-se fazer um mapeamento da mansonelose e da bancroftose. Neste contexto, pode-se afirmar que a história inicial da *M. ozzardi* sempre esteve atrelada ao interesse com outras filárias, principalmente com *W. bancrofti*, em uma tentativa de encontrar áreas de transmissão, características clínicas similares, vetores específicos e tratamentos eficazes, principalmente no século XX.

Pela maior distribuição e maior impacto clínico, as ações públicas se detiveram principalmente nas cidades elencadas para bancroftose, ficando as áreas de menores prevalências e as áreas de exclusividade de infecção da *M. ozzardi* relegadas a segundo plano. Neste caso, sem nenhuma ação de vigilância ou tratamento, se constituiu um equívoco para o controle da mansonelose, que em 1956 já apresentava 17 municípios com grandes taxas de prevalência dessa parasitose (MORAES, 1958; RACHOU, 1960).

1.4 Atualidades

O estudo das mansoneloses de uma maneira geral e da *M. ozzardi* especificamente, são extremamente necessários, pois muito pouco se sabe dos aspectos clínicos (DANTUR et al., 2013; VARGAS-HERRERA et al., 2013), tratamento (BASANO et al., 2014; NUTMAN; NASH; OTTESEN, 1987; KROLEWIECKI et al., 2011) e reais efeitos no organismo humano em suas diversas fases (BOUYOU-AKOTET et al., 2014; COBO et al., 2015; COOK, 2012; DOLO et al., 2012; FOKOM-DOMGUE et al., 2014; LECHNER et al., 2013; NAMPIJA et al., 2012; NDIBAZZA et al., 2013; SPENCER et al., 2013; UTTAH; IBEH, 2011; VARGAS-HERRERA et al., 2013), principalmente em regiões desassistidas da África e das Américas (DEGESE et al., 2012; DOLO et al., 2012; MARCOS et al., 2012; NAMPIJA et al., 2012), e mesmo das localizações anatômicas do parasito (BAMBA et al., 2012, 2013).

No caso específico do Brasil, a situação torna-se mais grave, uma vez que a população parasitada por *M. ozzardi* é ribeirinha e em sua maioria e vive principalmente ao longo dos rios Purus, Negro, Solimões e afluentes no estado do Amazonas, distantes das sedes municipais. O conhecimento desta entidade nosológica (mansonelose) é tão incipiente que ainda é registrada a presença do parasito em localizações anatômicas onde até então nunca havia sido encontrado (VIANNA et al., 2012), em novas regiões geográficas brasileiras (ADAMI et al., 2014), e com relato da possibilidade da descoberta de novas espécies na região Amazônica, tanto por características morfológicas como moleculares (GODOY et al., 1980; MARCOS et al., 2012).

Existem, atualmente, estudos com outras espécies de *Mansonella* que tentam avaliar a influência da presença desses parasitos nas respostas imunes quando associados à malária (NDIBAZZA et al., 2013), a sua influência no desenvolvimento motor e cognitivo em recém-nascidos de gestantes parasitadas (COBO et al., 2015; LECHNER et al., 2013; NDIBAZZA et al., 2013; SPENCER et al., 2013), e também as alterações na resposta imunológica vacinal passiva e ativa em gestantes, neonatos e adultos jovens na presença da *Mansonella sp.* (BOUYOU-AKOTET et al., 2014; DOLO et al., 2012; KIZITO et al., 2013; LECHNER et al., 2013; NDIBAZZA et al., 2013). Há também na literatura descrição de ensaios clínicos com uso de drogas antiparasitárias, em associações com drogas consagradas, ou mesmo correlação do tratamento de associações simbióticas que possam ocorrer principalmente com bactérias, especialmente *Wolbachia* sp. (COULIBALY et al., 2009; RAOULT, 2010).

1.5 Casuística geral e no Brasil

M. ozzardi apresenta uma ampla distribuição na América Latina em geral, com índices elevados, acima de 20%, de prevalência em quase todos os países (BARTOLONI et al., 1999; BOTTO; ARANGO; YARZÁBBAL, 1984; GODOY et al., 1980; NATHAN; TIKASINGH; MUNROE, 1982; ORIHEL, 1967). Entretanto, a maior prevalência de *M. ozzardi* até o momento, foi registrada na Comisaría Del Vaupés, Colômbia, onde foram examinados, através da gota espessa de sangue, 810 indígenas sendo diagnosticados 96,2% de microfilarêmicos (MARINKELLE; GERMAN, 1970). Vale salientar que os índices de prevalências de *M. ozzardi* em um mesmo país são extremamente variados. Como exemplo: Trinidad, onde já foi registrada uma variação de positividade para *M. ozzardi* de 4,0% a 16,0% (NATHAN; BARTHOLOMEW; MUNROE, 1978), Colômbia, de 3,4%, a 49,% (KOZEK et al., 1982, 1984; LIGHTNER et al., 1980) chegando a 96,2% em áreas indígenas (MARINKELLE; GERMAN, 1970), Haiti, de 30,3% a 53,3% (MAcNEELEY et al., 1988; RACCURT et al., 1980, 1982), Argentina, de 15% a 39% (JORG, 1983) e Guianas, de 25% a 69,3% (KOZEK et al., 1982, 1983).

No Brasil, as infecções por *M. ozzardi* são encontradas há algumas décadas nos estados do Mato Grosso (alto do rio Xingu), Roraima (entre os índios Macuxis) e no Amazonas (alto rio Negro e ao longo do rio Solimões, Purus e seus afluentes) (COSTA, 1956; D'ANDRETTA; PIO DA SILVA; KAMEYANA, 1969; DEANE et al., 1953; LACERDA; RACHOU, 1956; LAGE, 1964; LAWRENCE et al., 1980; MORAES et al., 1978,1985; OLIVEIRA, 1963;

TAVARES, 1981). Recentemente, foram encontrados casos no Acre (ADAMI et al., 2014). Contudo, no estado de Rondônia, um estudo com mais de 4.500 pessoas na região do município de Porto Velho e Guajará-Mirim, não detectou portadores de tal parasitose (BASANO et al., 2011). No período de 1952 a 1954 foram realizados 35 inquéritos epidemiológicos nos estados do Amazonas e Acre e alguns territórios da época (DEANE, 1953; LACERDA; RACHOU, 1955). Neste período, em inquérito realizado em Manaus-AM, a prevalência foi de 0,4% (LACERDA; RACHOU, 1955). No município de Codajás-AM a prevalência foi de 23,1% (MORAES, 1958) e de 41,4% (BATISTA; OLIVEIRA; RABELLO ,1960). Esses inquéritos continuaram sendo realizados até os dias atuais entre comunidades urbanas e indígenas com prevalências que variam de 12 a 63% (LAWRENCE et al., 1980; MARTINS et al., 2010; MEDEIROS et al., 2010, 2011, 2014; MORAES et al., 1978).

Batista, Oliveira e Rabello (1960) realizaram, na região de Codajás, um inquérito com 1.014 indivíduos que representavam 83% da população e através de gotas espessa de sangue e de repetição através da técnica de Knott nos negativos, sendo que se identificou 56,7% de parasitados principalmente nas pessoas que exerciam atividades extrativistas. Tavares (1981) realizou estudo epidemiológico de *M. ozzardi* nos habitantes do vale do rio Ituxi, município de Lábrea-AM, onde avaliou 938 indivíduos de um total de 952 dessas comunidades, onde encontrou 56 portadores de *M. ozzardi* (5,9%) pelas técnicas de gota espessa como triagem e método de concentração (Knott e FMP) nos casos inicialmente negativos, encontrando uma divisão quase equitativa em gênero, acúmulo de casos na terceira e quarta décadas de vida e parasitemia média de 141,1 mf/mL. Mais recentemente, nesse mesmo rio, Medeiros e colaboradores (2008) encontraram uma prevalência superior a 30,3%.

Medeiros e colaboradores (2007) mostraram que as prevalências de microfilarêmicos por *M. ozzardi* entre indígenas da etnia Apurinã, do município de Pauiní-AM, apresentavam índices elevados, variando de 18,6% a 43,5%. Nesse mesmo município e no rio Purus, Medeiros e colaboradores (2007, 2009b) encontraram prevalências de 24,8% e 24,1% em ribeirinhos dos rios Pauiní e Purus respectivamente. Em estudo epidemiológico realizado nas comunidades ribeirinhas do município de Coari–AM, foi encontrada prevalência de 18,9% (COHEN et al., 2007). Medeiros e colaboradores (2009a) em um trabalho realizado no município de Boca do Acre-AM, registraram prevalência de 27,3% em populações ribeirinhas do rio Purus.

1.6 Ciclo biológico de *Mansonella ozzardi*

O ciclo biológico da *M. ozzardi* é do tipo heteroxênico ver figura 4: a fêmea do inseto vetor, ao exercer o hematofagismo em pessoas parasitadas, ingere as microfilárias (5) e se transformam na larva L1, que após atravessar a parede do sistema digestório, caem na cavidade geral, migram para o tórax, onde se alojam nos músculos torácicos. A partir do quarto dia, a larva sofre a primeira muda, originando a L2 (7). Essa cresce muito, e a partir do sexto dia, sofre a segunda muda, transformando-se em larva infectante a L3 (8), medindo aproximadamente entre 550 µm e 700 µm. Essa larva infectante migra pela musculatura do inseto até alcançar a probóscida, concentrando-se no lábio. Quando o inseto vetor vai realizar o repasto sanguíneo, as larvas L3 escapam do lábio, penetram pela solução de continuidade da pele do hospedeiro (não são inoculadas pelo inseto) (1), migram pelos vasos linfáticos e sanguíneos até a mucosa abdominal, tornam-se vermes adultos (2), e, sete ou oito meses depois, as fêmeas grávidas produzem as primeiras mf (3, 4) (BASANO; CAMARGO, 2014). O ciclo no hospedeiro invertebrado é de aproximadamente vinte dias em temperatura de 20 a 25 ºC, mas, em temperaturas mais elevadas, pode ocorrer em menor período (CERQUEIRA, 1959).

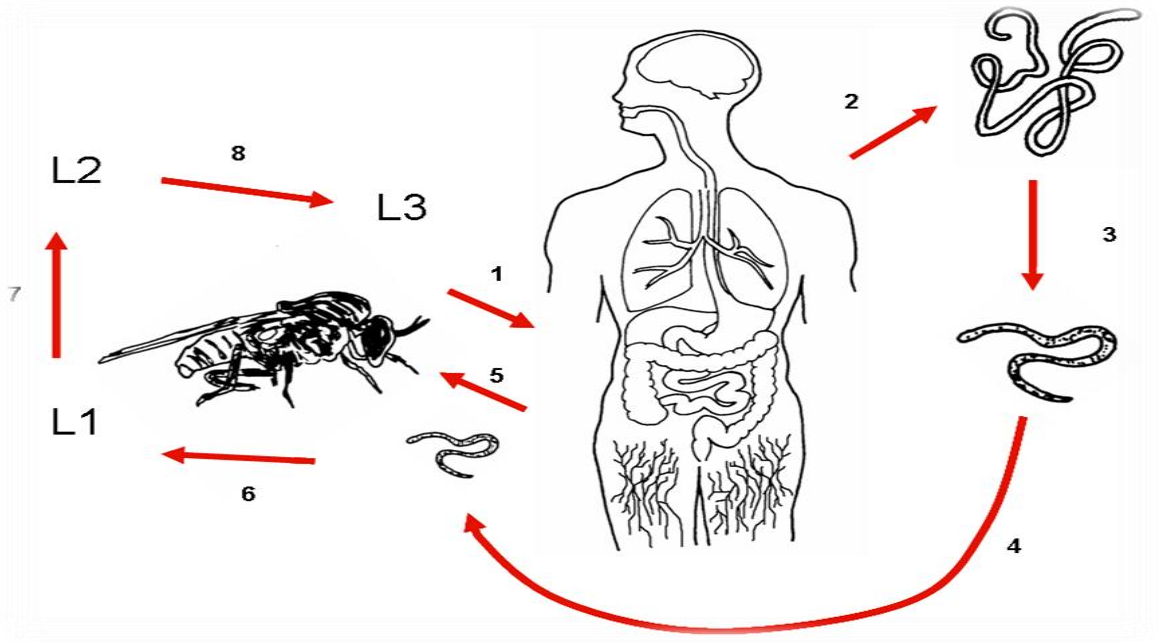

Figura 4 - Ciclo biológico de *Mansonella ozzardi.* Fonte: Basano e Camargo, 2014.

1.7 Vetores de Mansonella ozzardi

A transmissão da *M. ozzardi* é realizada por insetos de dois grupos distintos de Diptera: Ceratopogonidae, conhecidos como “maruins” ou “mosquito-pólvora” e Simuliidae,

conhecidos como “piuns” ou “borrachudos” (Figura 5) (MARCONDES, 2001). Os ceratopogonídeos possuem vinte e sete gêneros, dentre os quais o *Culicoides* é o mais expressivo hematófago (MONTEIRO, 2009). O gênero *Culicoides* apresenta em torno de 1.000 espécies com vasta distribuição mundial. Destas, 75 são encontradas no Brasil (MARCONDES, 2005), entretanto até o momento no Brasil nenhum culicóide foi incriminado como vetor.

Na América do Sul, os principais vetores são insetos do gênero *Simulium* (FONTES; ROCHA, 2005a). Cerca de mil e oitocentas espécies da família Simuliidae foram descritas no mundo (CROSSKEY; HOWARD, 2010). Por volta de noventa espécies já foram identificadas em solo brasileiro (PEPINELLI; TRIVINHO-STRIXINO; HAMADA, 2003).

No Brasil, somente os simulídeos são reconhecidos como vetores, e foram incriminados inicialmente por Cerqueira (1959) que encontrou *S. argentiscutum* infectado com larvas de *M. ozzardi*. Shelley e Shelley (1976) encontraram *S. amazonicum* infectados com *M. ozzardi* no rio Purus, Amazonas. Shelley, Luna e Moraes (1980) assinalaram *S. amazonicum* e *S. argentiscutum* como vetores no rio Solimões, e Moraes, Shelley e Dias (1985) encontraram *S. oyapockense* albergando *M. ozzardi* no estado de Roraima.

Em geral, os simulídeos são pequenos, têm coloração escura, asas largas, aspecto corcunda (tórax curvado) e pernas curtas (MARCONDES, 2001).

Figura 5 - Vetor *Simulium sp.* Fonte: EPA, 2014.
Disponível em: <http://www.epa.gov/bioindicators/html/blackflies.html>.
Acesso em: Jul, 2014.

Estes insetos apresentam ampla distribuição geográfica, não sendo encontrados somente em locais desprovidos de água corrente (onde se desenvolvem as formas imaturas) (CROSSKEY, 1990). São de hábitos diurnos, mas podem ser ativos no crepúsculo, dependendo muito do clima (CEVS, 2006). Aproximadamente 10% das espécies conhecidas picam o

homem e animais domésticos, e menos de 50 espécies são pragas ou vetores de filárias protozoários, bactérias e vírus (CROSSKEY, 1990).

Há a preocupação de que as áreas endêmicas da mansonelose nas Américas estejam se expandindo, uma vez que as aberturas de áreas florestais da bacia Amazônica e de bosques costeiros no Equador, na Colômbia e no México podem ocasionar a expansão da doença em regiões onde existem vetores competentes, e onde a doença ainda não foi introduzida (WHO, 1991).

1.8 Patogenicidade

Mansonelose é uma helmintose amplamente discutida em termos de patogenia, havendo autores que insistem em considerá-la apatogênica, apesar das conclusões de Montestruc, Blache e Laborde (1950), Deane e colaboradores (1953), Batista, Oliveira e Rabello (1960) e Tavares (1981) afirmarem existir uma relação entre determinados sinais e sintomas e o parasitismo pela *M. ozzardi.*

Segundo Tavares e Fraiha Neto (1997), a mansonelose, embora de sintomatologia benigna e comum a outras afecções, não deve ser subestimada ou ignorada em relação a sua patogenicidade. Montestruc, Blache e Laborde (1950), após avaliarem alguns pacientes infectados, admitiram patogenicidade, pois alguns indivíduos apresentavam vertigens, cefaleia, insônia e a presença de parasitos em serosidades de adenolinfoceles. Outros estudos em relação aos dados referentes à sintomatologia foram atribuídos a presença de eosinofilia, inchaço nos braços, nas mãos ou na face, de caráter recorrente e que não dura mais de três ou quatro dias, prurido cutâneo, dores nas articulações e na região hepática (hipocôndrio), manifestações neurológicas ou psíquicas e astenia. (BATISTA; OLIVEIRA; RABELLO, 1960; TAVARES, 1981; UNDIANO, 1971).

No Brasil, existem vários trabalhos que relatam os sintomas relacionados à *M. ozzardi*. Segundo Batista, Oliveira e Rabello (1960), as pessoas com mansonelose e com alta densidade de microfilárias apresentam: febre moderada, “frieza nas pernas”, dores articulares, adenite (inflamação dos gânglios linfáticos) e dor de cabeça. Além da sintomatologia já mencionada, em outros estudos há relatos de tonturas, placas eritematopruriginosas e adenite inguinocrural (COSTA, 1956; OLIVEIRA, 1963; TAVARES; FRAIHA NETO, 1997).

Em Lábrea–AM, foram observadas nos indivíduos infectados, apenas “frieza nas pernas” (referida e observada ao tato), dores articulares, febre sem causa aparente referida e

eosinofilia (TAVARES, 1981). Em populações do alto Solimões, nos municípios de Benjamin Constant e Atalaia do Norte, no Amazonas, os infectados com *M. ozzardi* apresentaram cefaleia, dores articulares, pápulas eritematopruriginosas, varizes, edema de membros inferiores e febre sem causa aparente (FRANÇA, 1985).

Recentemente, foram observados quadros clínicos mais exuberantes na presença de infecção pela *M. ozzardi*, com síndrome febril indiferenciada similar à crise malárica (TAVARES et al., 2002), e também uma nova sintomatologia atribuída a *M. ozzardi*, que é a presença de lesões oculares, com lesões numulares na córnea que podem levar à cegueira, entre habitantes de comunidades ribeirinhas e indígenas do Amazonas (BRANCO et al., 1998; GARRIDO; CAMPOS, 2000; VIANNA et al., 2012), havendo relatos da presença de enrijecimento conjuntival e apresentação de pequena tumoração, observadas em um paciente no norte da Argentina (MINOPRIO; JORG; MARRELLI, 1988). No município de Coari-AM, as lesões oculares encontradas entre os habitantes de comunidades que vivem ao longo do rio Solimões foram atribuídas a *M. ozzardi* (COHEN et al., 2007). Portanto, Tavares e Fraiha Neto (1997) afirmam que não há razões científicas para insistir na apatogenicidade da *Mansonella*, podendo a patogenia dos sintomas clínicos da mansonelose ser explicada pela irritação local que as filárias vivas ou mortas provocam, bem como pelos fenômenos alérgicos que acarretam similarmente ao que ocorre nas demais filarioses, segundo Batista, Oliveira e Rabello (1960).

1.9 Métodos de Diagnóstico de Microfilárias

O diagnóstico morfológico das mf no sangue periférico é realizado através da gota espessa de sangue (Figura 6), fixada com metanol e corada com Giemsa, no qual se realiza a diferenciação das espécies baseadas nas características morfológicas (ANDERSON, 2000; De CARLI, 2001; ORIHEL; EBERHARD, 1982; WHO, 2000). Os núcleos das células que constituem a mf tornam-se escuros quando corados e se mostram dispersos ou aglomerados. Além dessas estruturas, também é utilizado na identificação o formato da cauda (De CARLI, 2001; KOZEK et al., 1983; WHO, 2000).

Figura 6 - Amostras de material biológico (sangue) e gotas espessas preparadas.
Fonte: Luís Marcelo Aranha Camargo.

A diferenciação morfológica entre as espécies também é baseada nas características morfológicas das extremidades anterior e posterior das mf (figura 7), nas quais são observadas a distribuição dos núcleos e a ausência ou presença de bainha (MARKELL; VOGE, 1981). Esses critérios são utilizados para a caracterização de *Mansonella* (RACHOU, 1954; WHO, 2000), pois a mf de *M. ozzardi* é caracterizada por não apresentar bainha, diferença no tamanho e largura do espaço caudal e cefálico, cauda fina com núcleos regularmente dispostos que não atingem a extremidade. A diferenciação entre as mf de diferentes espécies, com base na morfologia das extremidades cefálica e caudal, com a distribuição dos núcleos e a presença ou ausência de bainha podem ser visualizada (Figura 7).

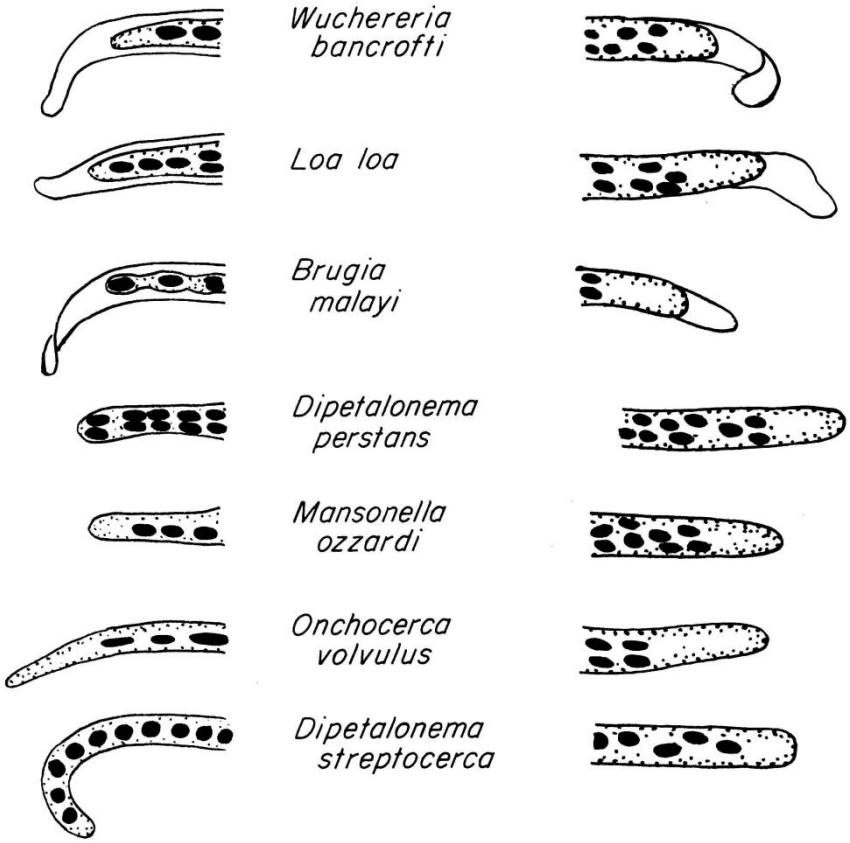

Figura 7 - Características diferenciais das microfilárias. Detalhe da porção anterior e posterior das microfilárias, distribuição dos núcleos, presença e ausência da bainha (Dipetalonema=Mansonella).
Fonte: Markell e Voge, 1981.

O diagnóstico parasitológico definitivo de *M. ozzardi* só pode ser feito através da identificação do parasito no sangue através de várias técnicas ou por biópsia da pele (NUTMAN, 2001). Via de regra, esse tipo de diagnóstico pode ser realizado por meio das seguintes técnicas: gota espessa de sangue, filtração de sangue em membrana de policarbonato, técnica de Knott (FONTES; ROCHA, 2005a) e PCR (MORALES-HOJAS et al., 2001; VERA et al., 2011).

1.9.1 Gota Espessa de Sangue (GE)

A GE é uma técnica bastante utilizada em inquéritos epidemiológicos, por ser de baixo custo e de grande facilidade na obtenção e processamento das amostras. Com essa técnica, é possível realizar a identificação do filarídeo mediante observação das características

morfológicas específicas das microfilárias (Figura 8), podendo ser utilizada em locais onde ocorrem infecções mistas com outros filarídeos (FONTES; ROCHA, 2005a).

Esse diagnóstico laboratorial se inicia com a coleta, fazendo-se uma punção na polpa digital do anular esquerdo ou lóbulo da orelha, onde a pele é fina e com excelente irrigação sanguínea. O procedimento inicia-se com a retirada de 60 a 100 µL de sangue, sem o uso de coagulante, porque esse produto pode levar a uma perda de até 69% das microfilárias (PARTONO; IDRIS, 1977). Em seguida, é feita a gota espessa de sangue. Transcorridas de 12 a 15 horas, faz-se a desemoglobinização, cora-se com Giemsa ou Panótico® (Renylab Química e Farmacêutica, MG-Brasil) e visualiza-se no microscópio com aumento de 100x e 400x (Figura 8) (FONTES; ROCHA, 2005a).

A gota espessa de sangue apresenta grande sensibilidade quando o indivíduo infectado tem uma microfilaremia superior a 10 mf/mL de sangue. Para aumentar a sensibilidade da técnica, recomenda-se confeccionar mais de uma lâmina para cada paciente examinado (FONTES, 1996). Embora a GE seja uma técnica de cunho qualitativo, é possível estimar a microfilaremia do indivíduo parasitado, ou seja, pode-se realizar um diagnóstico quantitativo com o uso da GE mensurada. Para tal, usam-se tubos capilares capazes de determinar o volume de sangue necessário para a confecção da lâmina (BRASIL, 2008).

Figura 8 - Técnica da gota espessa.
Original: Prof. Dr.Gilberto Fontes e Profa. Eliana Rocha

1.9.2 Filtração de Sangue em Membrana de Policarbonato (FMP)

A FMP (CHULARERK; DESOWITZ, 1970) é uma técnica que avalia a presença e a quantidade de mf. A técnica consiste em um processo de concentração, no qual um volume de

sangue é filtrado em uma membrana de policarbonato, com poros de 3 µm a 5 µm de diâmetro (Figura 9). Essa membrana retém as mf existentes, deixando os elementos figurados do sangue atravessar pelos poros (FONTES; ROCHA, 2005b). A fixação da membrana é feita com metanol, ou fixador da coloração Panótico® (Renylab Química e Farmacêutica, MG-Brasil). A coloração é feita com Giemsa e posteriormente, a membrana é analisada no microscópio com aumento de 100x e 400x (Figura 10).

Em virtude da FMP utilizar uma quantidade bem maior de sangue (1 a 10 mL), em relação à GE (60 a 100 µl), a técnica de FMP tem uma maior sensibilidade tanto para diagnóstico como para seguimento dos casos. Assim, a técnica é vantajosa no diagnóstico em pacientes com baixa densidade de mf, bem como em pacientes após tratamento específico (DREYER, 1994; FONTES; ROCHA, 2005b). Para alguns autores, a FMP é um método que requer um corpo técnico capacitado, de alto custo e execução demorada. Por esses motivos, não é uma técnica rotineiramente utilizada (WEIL; LAMMIE; WEISS, 1997).

Conforme Leite (2003), a FMP é muito mais eficiente do que a GE, visto que o grau de sensibilidade oferecido pelas técnicas são, respectivamente, 98% e 85%. Sendo assim, ao ser utilizada a técnica FMP, teremos uma maior probabilidade de identificar um indivíduo microfilarêmico (BASANO et al., 2014; LEITE et al., 2005).

Vale enfatizar que este estudo considerou que essa técnica é plenamente factível de ser realizada em trabalhos de campo, necessitando da mesma infra-estrutura da gota espessa comum e um custo ligeiramente superior (BASANO et al., 2014).

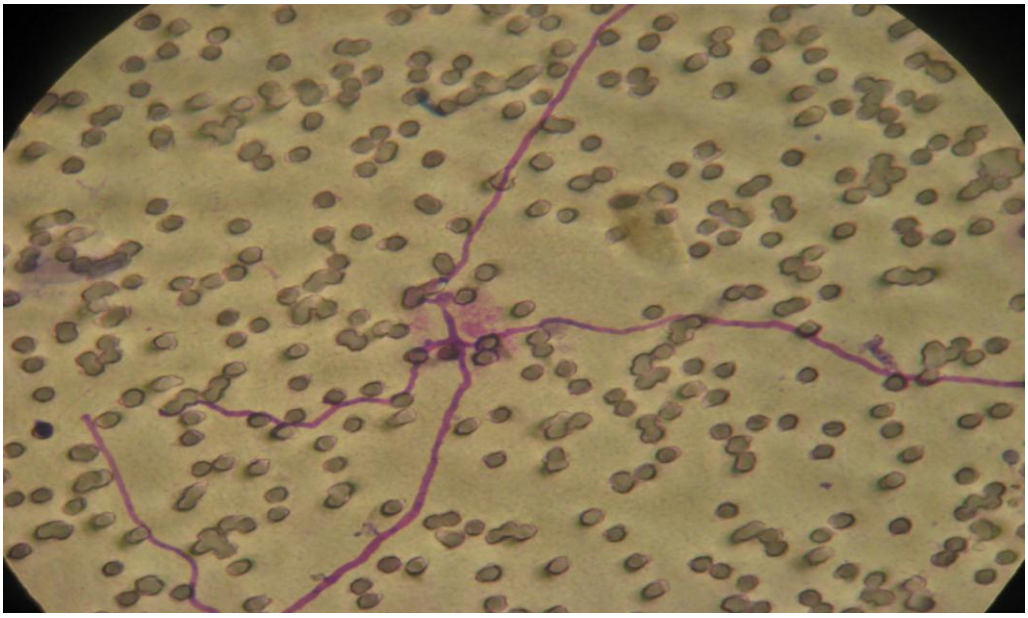

Figura 9 - Visualização da membrana de policarbonato para filtração de sangue (Giemsa 100x).
Fonte: Luís Marcelo Aranha Camargo.

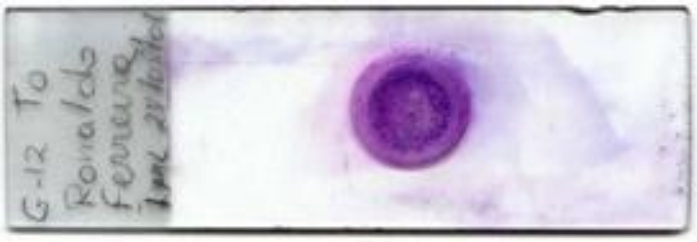

Figura 10 - Lâmina com membrana já corada. Fonte: Prof. Dr. Gilberto Fontes Profa. Eliana Rocha.

1.9.3 Técnica de Knott

A técnica de Knott foi assim denominada por ter sido descrita por James Knott no ano de 1939. Trata-se da diluição do sangue em formol a 2% em uma proporção de 1:10, em seguida a solução é centrifugada, e com o sedimento, produz-se a lâmina de gota espessa fixada em metanol e corada em Giemsa (FONTES; ROCHA, 2005b).

A sensibilidade da técnica de Knott em relação à gota espessa de sangue em alguns trabalhos é considerada mais sensível, porque as microfilárias são de difícil identificação e misturam-se ao sedimento, interferindo na visualização ao microscópio (Figura 11) (BATISTA; OLIVEIRA; RABELLO, 1960; TAVARES, 1981).

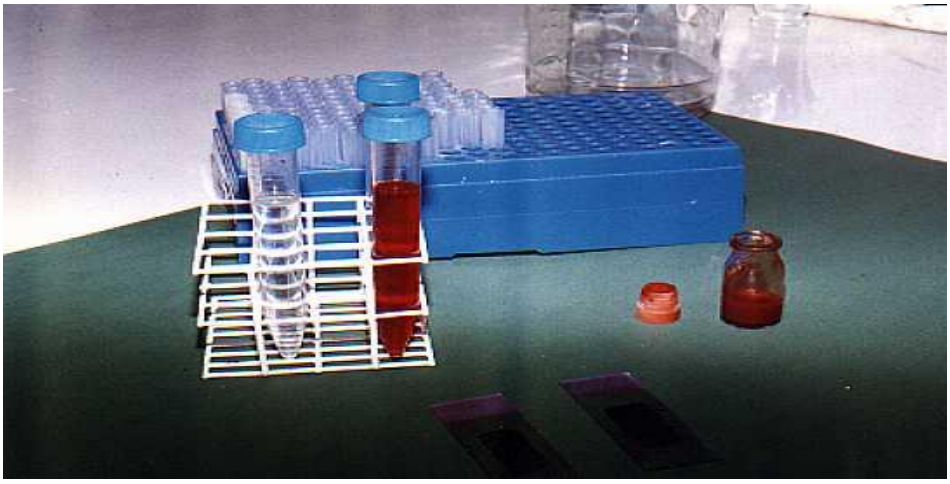

Figura 11 - Preparativos para a técnica de Knott. Fonte: Prof. Dr. Gilberto Fontes e Profa. Eliana M.M. da Rocha.

1.9.4 Diagnóstico Molecular (Reação em Cadeia da Polimerase – PCR)

A técnica de PCR baseia-se em uma metodologia *in vitro* de amplificar fragmentos específicos de DNA, através de uma reação enzimática. Para que a amplificação aconteça, é necessário um *primer* (iniciador), que é composto por 15-25 nucleotídeos. Esses são adicionados à fita de DNA molde, ligando-se às sequência de DNA complementar. A síntese de novas fitas se dá pela presença de uma DNA polimerase (Taq DNA Polimerase), termoestável, e dos desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP). Assim as novas fitas de DNA são produzidas, amplificando a quantidade do fragmento inicial (STRACHAN; READ, 1999).

Com o intuito de contribuir para o diagnóstico da Mansonelose e melhorar a identificação específica de *M. ozzardi*, Morales-Hojas e colaboradores (2001) realizaram os primeiros estudos sobre o método da PCR para a detecção de *M. ozzardi* e comprovaram em um reduzido número de pacientes a eficácia da técnica. Em Lábrea, Vera e colaboradores (2011) realizaram trabalho comparando a técnica de PCR (Figura 12), com outros métodos, comprovando, igualmente, a eficácia do método.

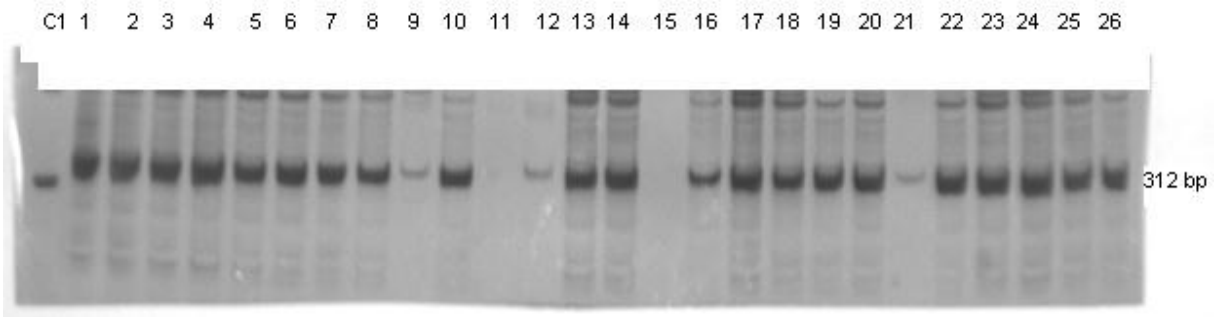

Figura 12 - Eleltroforese em gel de poliacrilamida a 8%. Fonte: Vera et al., 2011.

1.10 Tratamento

A ivermectina é um antibiótico e anti-helmíntico derivado da avermectina, produzido pelo fungo *Streptomyces avermetilis*, descoberto em 1979, que atua principalmente sobre formas imaturas e adultas de Nematoda, mas não é eficaz contra outros vermes (Platelmintos e Anelídeos), podendo exercer uma notável ação sobre artrópodes (TAVARES, 2009).

Inicialmente foi introduzido na medicina veterinária, onde se constituiu em grande progresso por ser um agente capaz de agir contra uma ampla variedade de nematodos e

artrópodes que parasitam diversos animais de interesse econômico (bovinos, eqüinos, suínos entre outros), inclusive com ação residual nos dejetos desses animais. A sua ação terapêutica consiste na inibição da atividade do ácido gama-aminobutírico, um importante mediador da neurotransmissão de artrópodes e nematoides, causando a sua paralisia e morte (TAVARES, 2009).

A introdução da ivermectina em medicina humana ocorreu em 1981, ao ser verificada a sua eficácia no tratamento da oncorcecose e posteriormente contra outras helmintíases com índices de cura extremamente satisfatórios, chegando a 100% na ascaridíase e 90% em enterobíase e tricuríase. Apresenta como características farmacodinâmicas o uso parenteral e oral, sendo o ultimo utilizado em humanos, pois a sua absorção é eficaz com níveis sanguíneos efetivos em quatro horas. Apresenta deposição em fígado e tecido adiposo, com eliminação pela urina e principalmente pelas fezes. A ação anti-helmíntica mais notável desta droga está relacionada ao uso em filarídeos (*O. volvulus, W. bancrofti, L. loa, M. perstans, M. streptocerca*), inclusive *M. ozzardi* (TAVARES, 2009). Antes desse estudo, nenhum ensaio clínico foi feito para verificar a eficácia deste fármaco especificamente em *M. ozzardi*.

Em alguns casos, como na oncocercose, esse fármaco é efetivo, pois provoca a rápida e intensa redução das mf da pele, chegando a níveis próximos de zero. Esse resultado tem um efeito residual de seis meses, contribuindo também para a redução da transmissão da parasitose. Atualmente é amplamente utilizada na África, nos chamados tratamentos em massa MDA (*Mass Drug Administration*) (EVANS et al., 2014; KOROMA et al., 2013). Outra característica em relação à oncocercose é um menor impacto ocular após a morte das mf. No caso da *L. loa* e *W. bancrofti*, a ação da droga também é eficaz na eliminação das microfilárias poucas horas após a administração em uma única dose oral. Nas infecções exclusivas de *M. perstans,* a redução da microfilaremia é menos eficaz atingindo cerca de 60 %. (TAVARES, 2009). Finalmente, no caso da *M. streptocerca* e *M. ozzardi,* o tratamento de uma dose única habitualmente é eficaz. Entretanto, no caso específico da *M. ozzardi*, poucos estudos e tratamentos empíricos, baseados na expertise e experiência pessoal de médicos e pesquisadores, é que chancelam esse argumento (BASANO et al., 2014; GONZALÉZ; CHADEE; RAWLINS , 1999; KROLEWIECKI et al., 2011; NUTMAN et al., 1981; TAVARES; FRAIHA NETO, 1997).

Em relação a parasitoses paratênicas e/ou emergentes como larva migrans, toxocaríase visceral e *Lagochilascaris minor*, o uso de doses repetidas é eficaz, apresentando indíces de até 97% de cura no tratamento de larva migrans. Na medicina humana, além destes empregos, a ivermectina também é efetiva em relação à escabiose e pediculose, assim como contra

carrapatos, triatomíneos e moscas. Esse fármaco é usado por via oral em doses que podem variar de 50 a 200 µg/kg de uma maneira geral, podendo chegar a até 400 µg/kg para a *L. minor*, com posologia que também pode variar de dose única com repetição a cada 7 dias até 10 semanas ou dosagens de 6 meses em 6 meses, que podem perdurar até duas décadas na oncocercose (TAVARES, 2009).

1.11 Aspectos clínicos da mansonelose

O Brasil, de uma maneira geral, contribuiu com alguns trabalhos importantes a respeito das características clínicas da mansonelose, e uma boa parte destes trabalhos foi realizada na região Amazônica.

O primeiro deles, concluído em 1960 por Batista e cols em Codajás, examinaram 1.014 pessoas de comunidades ribeirinhas desse município, que representavam 83% da população da área com uma positividade de 56,7%. Entretanto, esse alto índice está relacionado à utilização à época de método de concentração (Knott), o que duplicou o número de casos positivos (BATISTA; OLIVEIRA E RABELLO, 1960). O pesquisador baseou-se no questionário elaborado por Matsuda (COSTA, 1956), para guiar-se na caracterização clínica da doença, e refere em seus estudos uma correlação da sintomatologia com altas parasitemias e alta eosinofilia. Os portadores de mansonelose nesse estudo apresentavam como principais sintomas: cefaleia 47,7%, artralgia 34,9% e “frieza nas pernas” 34,4% (Tabela 1).

Tavares, em 1981, pesquisando população ribeirinha do rio Ituxi que desemboca no rio Purus-AM, examinou o total de 952 indivíduos, sendo que destes, 938 participaram da pesquisa. Com uma distribuição quase equitativa de gênero, com 49,6% de homens e encontraram após o uso da técnica de gota espessa e de concentração, 56 casos positivos que representaram 5,9% do total da amostra. Os casos apresentaram como sintomas: artralgia 71,7%, "frieza nas pernas" 69,5% e cefaleia 65,2% (Tabela 2).

Tabela 1 - Sintomatologia comparativa em casos positivos e negativos de *M. ozzardi* (BATISTA OLIVEIRA E RABELLO, 1960).

Sintomas	**Positivo**	**Negativo**
Artralgia	34,9%	18,3%
Cefaleia	47,7%	36,6%
Adenite	18,7%	9,9%
Dermatites	23,6%	13,0%

“Frieza nas pernas”	34,4%	22,4%

Tabela 2 - Sintomatologia comparativa em casos positivos e negativos de *M. ozzardi* (TAVARES, et al., 1981).

Sintomas	**Positivo**	**Negativo**
Artralgia	71,7%	50,0%
Cefaleia	65,2%	56,5%
Adenite	34,7%	21,7%
Dermatites	32,6%	17,3%
"Frieza nas pernas"	69,5%	21,7%

Em Coari-AM, Martins e colaboradores em 2010, colheram 1.733 amostras de sangue para a pesquisa de *M. ozzardi*, sendo 952 (54,9%) pertencentes ao gênero feminino. A sintomatologia clínica foi avaliada em 289 indivíduos do estudo. Desses 162 (56,1%) não apresentaram nenhum sintoma clínico e 94 (32,5%) apresentaram pelo menos um sintoma.

Em relação às características clínicas dessa parasitose, os sintomas mais prevalentes foram: dores articulares (24,7%), “frieza nas pernas” referida pelo paciente (23,8%) e a cefaleia (22,5%) nos casos positivos. Cefaleia (12,1%) e febre sem causa aparente (8,6%) apareceram como sintomas também em pacientes negativos à mansonelose (Tabela 3). Em relação ao testes hematológicos, foi encontrada uma grande proporção de pacientes com eosinofilia.

Tabela 3 - Sintomatologia comparativa em casos positivos e negativos de *M. ozzardi* (MARTINS et al., 2010).

Sintomas	**Positivo**	**Negativo**
Artralgia	24,7%	12,1%
Cefaleia	22,5%	20,7%
Adenite	4,3%	3,5%
Dermatites	5,6%	6,8%
"Frieza nas pernas"	23,8%	5,2%

No projeto piloto desta tese, ao examinar antes do diagnóstico e por conveniência uma população de comunidades ao redor do município de Lábrea (Bosque, Pirão, Boca do Ituxì, Maciari, Cassianã, Tauaruhã), foi encontrada uma positividade de 16,5% de microfilarêmicos num total de 36 indivíduos parasitados em uma população de 218 pessoas. Embora a amostra

tenha sido realizada por conveniência, os principais sintomas foram: cefaleia 42%, artralgia 29% e presença de dermatite 26% (Tabela 4).

Tabela 4 - Sintomatologia comparativa em casos positivos e negativos de *M. ozzardi* (informação pessoal).

Sintomas	**Positivo**	**Negativo**
Artralgia	29,0%	58,0%
Cefaleia	42,0%	53,0%
Adenite	0,0%	0,0%
Dermatites	26,0%	18,4%
"Frieza nas pernas"	13,0%	32,0%

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso de ivermectina, na dose habitualmente preconizada para o tratamento de oncocercose 0,15 mg/kg, no tratamento das infecções por *M. ozzardi*.

2.1 Objetivos específicos

- Verificar a razão de cura parasitológica (eliminação de parasitemia sem a ocorrência de recrudescência nos dias 3, 30, 90, 180 e 360 após o tratamento de microfilarêmicos com *M. ozzardi*);
- Testar tolerabilidade (efeitos adversos) ao medicamento ivermectina na dose utilizada;
- Avaliar aspectos epidemiológicos da população parasitada;
- Avaliar as manifestações clínicas da mansonelose.

3 MATERIAS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de intervenção "*before and after*" (DEEKS et al., 2003), não-randômico, não-cego, não-controlado, para verificar a eficácia e tolerabilidade do uso de ivermectina no tratamento de *M. ozzardi* em região ribeirinha de Lábrea (Figura 13).

Figura 13 - Rio Purus e a embarcação usada no projeto em área estudada comunidade (Santa Rosa) Lábrea-AM.
Fonte: Leandro Viana, DPZ.

3.1 Área de estudo

Este estudo foi desenvolvido no município de Lábrea (S: 07º 15’34” e W: 64º 47’59”), Amazonas, com população aproximada de 38 mil habitantes (IBGE, 2012), dos quais aproximadamente 5 mil são ribeirinhos dispersos em 112 comunidades (Figura 14). Destas 112 comunidades, sete (Cassianã, Bacural, Jucuri, Buraco, Santa Rosa, Jurucuá, Samaúma) foram selecionadas para o estudo, todas localizadas a até 200 km a montante da sede do município.

O município, fundado em 1881, representa 4,34% (68.300 km²) do estado do Amazonas, apresenta IDH de 0,60 e tem como principais atividades econômicas o extrativismo, a agricultura e a pesca (IBGE, 2012).

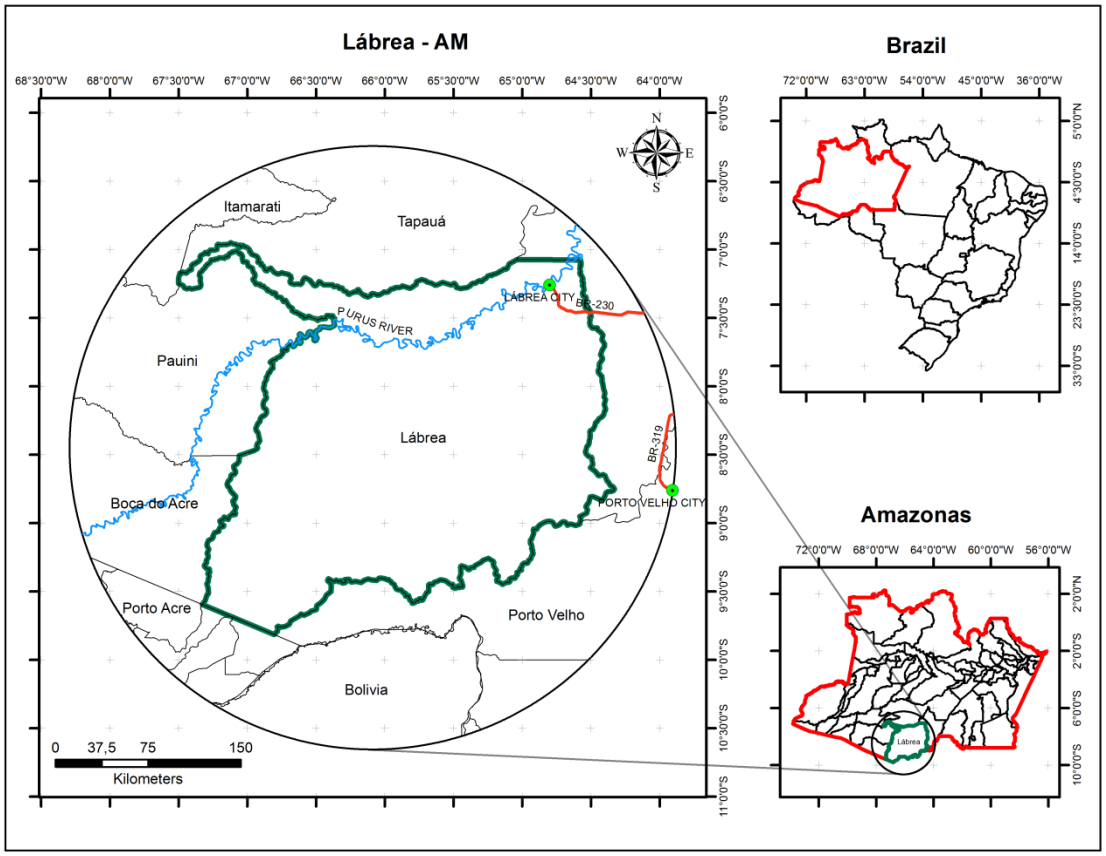

Figura 14 - Mapa da área de estudo. Fonte: Basano et al., 2014.

3.2 Amostra

A amostra incluiu homens, mulheres (não gestantes e não nutrizes) e crianças com mais de quatro anos e adultos com idade inferior a 61 anos com infecções por *M. ozzardi*, selecionadas por conveniência na área ribeirinha do rio Purus, que se estende da cidade de Lábrea até a localidade de Samaúma (Figura 15). Estimou-se a existência de 300 habitantes nas áreas avaliadas, dos quais 171 estavam presentes no momento do estudo, atendiam os critérios de inclusão e concordaram em participar. Destes, 74 encontravam-se infectados com *M.ozzardi* e foram voluntariamente incluídos no estudo. Para determinar o tamanho mínimo da amostra foram selecionadas aleatoriamente 30 pessoas deste município com infecção por *M. ozzardi* (estudo piloto), cujas microfilaremias foram devidamente quantificadas por filtração de sangue em membrana de policarbonato (mf/mm³ de sangue).

Figura 15 - Atendimento a População da comunidade de Samaúma, Lábrea-AM. Fonte: Luís Marcelo Aranha Camargo.

A partir do estudo piloto, estimou-se o comportamento da microfilaremia em termos de medida de tendência central e dispersão, possibilitando o cálculo do tamanho da amostra para o estudo, considerando-se com $\alpha = 0,05$ (erro tipo I) e $\beta = 0,20$ (erro tipo II).

Obedecendo a estes critérios, chegou-se a um número mínimo de 40 pessoas. No entanto, por medida de cautela e prevendo evasão na amostra em um ano, foram incluídos 74 casos positivos de mansonelose à filtração em membrana de policarbonato, desde que aceitassem participar do estudo e não apresentassem nenhum critério de exclusão, após o consentimento da pessoa ou de responsável, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). Destes foram escolhidos aleatoriamente 34 lâminas e realizado cegamente a técnica de gota espessa dos casos positivos a membrana para comparar as técnicas.

Como critério de exclusão, foram considerados gestantes (mulheres em idade gestacional com beta-hcg positivo ou nutrizes), indivíduos com idade abaixo de 5 anos e acima de 60 anos e presença clínica ou referida de patologias de base (cardíacas, renais, hepáticas, desnutrição e meningite), ou exames bioquímicos de função hepática ou renal alterados.

Também foram questionados quanto à história de alergia à droga em tratamentos anteriores (reação de Mazzotti), história de ingestão de qualquer fármaco, com efeito anti-helmíntico nos últimos 30 dias anteriores ao início do estudo (albendazol, mebendazol,

ivermectina, piperazina, pirantel, pirvíno, levamisole e dietilcarbamazina) e história de uso atual de drogas supressoras do sistema nervoso central, registrados em ficha clínica (Apêndice B), além de questionamentos sobre atividades da vida diária, histórico médico, estilo de vida, sinais vitais, exame clínico e registro dos atuais sinais e sintomas presentes.

Foram examinados posteriormente por equipe de oftalmologistas para verificação de lesões em região de córnea através de exame clínico (biomicroscopia de segmento anterior, fundoscopia, mapeamento da retina e documentação fotográfica com retinógrafo portátil (Kowa®).

O regime terapêutico adotado foi a ivermectina sob a apresentação de comprimidos de 3 mg, lote: NFN27660, fornecida pelo Ministério da Saúde do Brasil (Figuras 16). Foi utilizada a dose única de 0,15 mg/kg, conforme tabela de peso (Anexo A).

Figura 16 - Lote de ivermectina, fornecido pelo Ministério da Saúde. Fonte: Luísa Guimarães Basano.

O medicamento foi administrado sob supervisão direta e o uso de qualquer outra droga foi registrado na ficha clínico-epidemiológica (Apêndice D). Os pacientes submetidos ao tratamento foram acompanhados pela equipe de pesquisadores, equipados para tratamento de eventuais reações adversas durante sete dias após o uso do medicamento e nos meses subsequentes ao tratamento. A droga foi administrada por profissional médico e o paciente

acompanhado pelo médico e equipe de pesquisa em sua localidade nos dias 0, 1, 2, 3, 7, 30, 60, 90, 180 e 360 após o tratamento.

Exames laboratoriais complementares (hemograma, hematócrito, hemoglobina sérica, transaminases e gama-gltumil transferase (GGT) foram realizados no dia 0 (pré-tratamento) e dia 3 (pós-tratamento), sendo as contagens de microfilárias realizadas nos dias 0, 3, 30, 90, 180 e 360 (Figura 17-A).

3.3 Diagnóstico e quantificação de microfilárias (mf) sanguíneas

Foram colhidos 10 mL de sangue por punção venosa de cada paciente para busca e quantificação da mf pela técnica de filtração em membrana de policarbonato (CHULARERK; DESOWITZ, 1970). Para isso, 1 mL de sangue venoso foi diluído em 10 mL de solução fisiológica a 0,9% e filtrado em membrana de policarbonato (Nucleopore Corporation, Pleasanton®, CA, USA) com poros de 3 a 5 micrômetros de diâmetro nos dias 0, 3, 30, 90 e 2,0 mL nos dias 180 e 360. Posteriormente, as membranas eram dispostas sobre lâminas de microscopia, fixadas em metanol e coradas em Eosina-Giemsa examinando toda a superfície da lâmina. A contagem do número de mf nas membranas era feita em microscópio óptico e o resultado expresso em número de mf/mL de sangue. Essas contagens eram realizadas por dois microscopistas de maneira cega (Figura 17-B).

Figura 17 - (A) Coloração das membranas no laboratório, e (B) microscopia para detecção de mf na membrana de policarbonato, Rio Purus. Fonte: Luís Marcelo Aranha Camargo.

3.4 Avaliação da eficácia e da segurança

Foi considerado como "*endpoint*" primário a cura parasitológica no dia 360 e como "*endpoint*" secundários a ocorrência de reações adversas e alterações aos exames laboratoriais entre D0 e D3 e cura clínica em D30.

3.4.1 Reações Adversas (RA)

Foram aplicados questionários clínico-epidemológicos para a pesquisa de sinais/sintomas antes da medicação e em (D3) (Apêndice D). Foram consideradas RA sinais e sintomas não presentes antes do tratamento e que se apresentaram e/ou sinais e sintomas que se exacerbaram após a administração do medicamento. Considerando-se que a meia-vida da droga é de 27 horas, os pacientes foram monitorados por três dias após tratamento para avaliação do possível desenvolvimento de RA.

3.5 Questões Éticas

Os indivíduos microfilarêmicos foram convidados para participar voluntariamente, sendo informados por escrito e verbalmente a respeito dos riscos e dos procedimentos, assinando termo específico de consentimento (Figura 18). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade São Lucas (registro 344/09).

Figura 18 - Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Fonte: Luís Marcelo Aranha Camargo.

3.6 Análise estatística dos resultados

Para os resultados das variáveis quantitativas, foram realizadas as descrições dos dados através de médias, variâncias, desvios-padrão, medianas, quartis, mínimos e máximos. As descrições gráficas das variáveis foram obtidas através do diagrama de caixas (box-plot). Para os resultados da avaliação da razão de cura (eliminação de parasitemia sem a ocorrência de recrudescência nos dias 30, 60, 90, 180 e 360 após o tratamento), foram realizados teste de normalidade de Shapiro-Wilk e os não paramétricos, T de Wilcoxon e Friedman, para comparações entre grupos utilizando um nível de significância de 0,05, por meio do programa Statistica 8.0. Em relação aos resultados epidemiológicos gerais foi utilizada a técnica ANOVA construída a partir de um modelo de regressão com distribuição Binomial.

3.7 Logística do trabalho de Campo.

A equipe de pesquisadores em cada comunidade após explanação do projeto e da assinatura do apêndice A (TCLE), realizava o exame clínico e o preenchimento do Apêndice B (Ficha-clínica epidemiológica), seguida da coleta de sangue de todos voluntários, sem saber até aquele momento sobre a presença da parasitose. Na sequência eram realizados os exames laboratoriais e sua análise. Com a observação da positividade para *Mansonella ozzardi* e após exclusão dos voluntários pelos critérios elencados (clínico-laboratoriais), a equipe retornava a comunidade e examinava novamente os voluntários que preenchiam os critérios de inclusão, coletava nova amostra de sangue e preenchiam uma nova ficha o apêndice C. A seguir prescreviam o tratamento com a ivermectina na dose padronizada de acordo com o peso do paciente de maneira supervisionada e permaneciam *in loco* por três dias onde era anotado as alterações clínicas e realizado nova coleta de sangue e novo preenchimento do apêndice C após 72 horas do uso da medicação. A partir desta coleta a equipe retornaria em 30, 60, 90, 180 e 360 dias para realizar a coleta de sangue e verificar a presença do parasito.

4 RESULTADOS

4.1 Geral

As prevalências de microfilarêmicos entre as comunidades variaram de 38,9% a 66,7% (Tabela 5). Dos 171 indivíduos examinados, 86 (50,3%) tinham microfilárias, sendo a prevalência maior nos homens (78 examinados com 41 parasitados – 52,5%) do que nas mulheres (93 examinadas com 45 parasitadas – 48,4%). A diferença foi observada em números absolutos, porém não houve diferença estatística significativa (p = 0,644).

Tabela 5- Prevalência de microfilarêmicos por *M. ozzardi* em comunidades ribeirinhas do rio Purus, utilizando a filtração de sangue em membrana em policarbonato. Município de Lábrea, Amazonas, 2016.

Comunidades	Examinados	Parasitados	Prevalências %
Bacural/Jucuri	34	18	52,9
Buraco	32	16	50,0
Cassianã	19	10	52,6
Jurucuá	37	15	40,5
Samaúma	30	20	66,7
Santa Rosa	18	7	38,9
Não Informado	1	0	0
Total	171	86	50,3

Quanto à faixa etária, foi observado que o número de microfilarêmicos aumentou de acordo com a faixa etária (Figura 19), com tendência crescente tanto nos homens (A = 8,79, x^2 = 2,71, p = 0,099) como nas mulheres (A = 6,67, x^2 = 1,30 p = 0,253) porém não sendo observada significância estatística entre os gêneros.

Em relação às atividades do dia-dia, as maiores prevalências de microfilarêmicos foram observadas nos agricultores/pescadores (49 examinados com 34 parasitados, prevalência de 69,4%) e agricultoras/dona de casa (50 examinados com 30 parasitados, 60,0%) em relação a estudantes (67 examinados com 20 parasitados, 29,8%) e outros (5 examinados com 2 parasitados, 40%) apresentando diferença significativa (x^2= 19.14, p< 0,001).

Para 166 indivíduos foi assinalado o tempo de moradia nas comunidades e observou-se que a prevalência de microfilarêmicos aumentou de acordo com o tempo de residência, 1 a 5 anos, 24,0% (25 examinados com 6 microfilarêmicos), 5 a 10 anos: 39,5% (38/15) e ≥ 11 anos 60,2% (103 examinados com 62 parasitados), mostrando uma tendência positiva crescente

significativa (A = 11,33, x^2 = 4,66, p = 0,03) do número de casos de acordo com o tempo de moradia na área avaliada e com significância estatística.

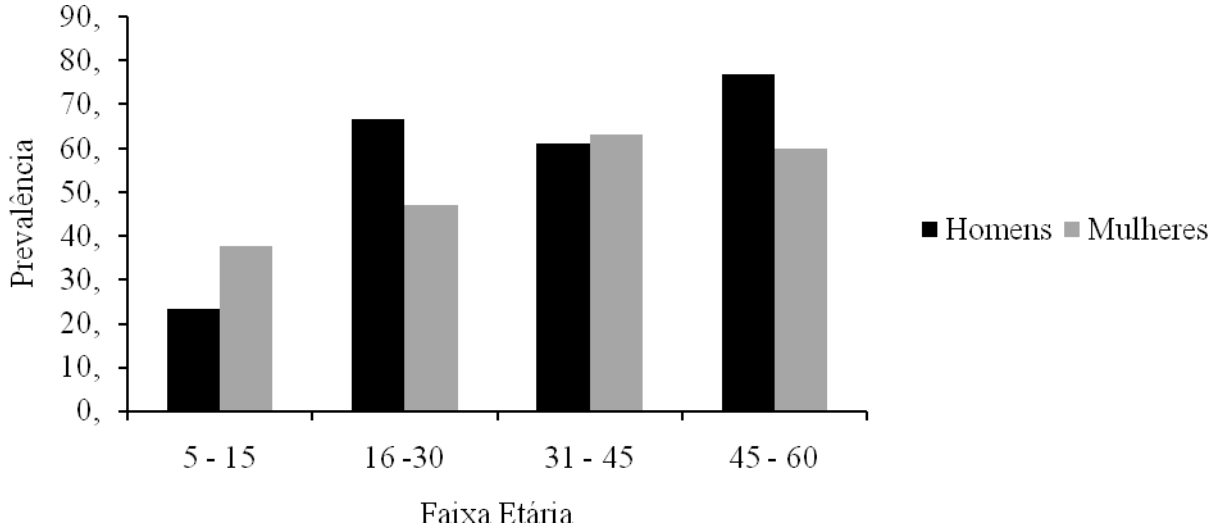

Figura 19 - Prevalência de *M. ozzardi* de acordo com o sexo e faixa etária, em comunidades ribeirinhas do Rio Purus, município de Lábrea, Amazonas.

Foram realizadas, através de questionários, perguntas relativas a antecedentes patológicos e a costumes dos habitantes (Apêndice B), sendo aplicada a razão de prevalência, que indicou diferenças significativas quando consideradas as exposições anteriores à malária, filariose e ao uso de álcool. Nesse caso, a proporção de pessoas com o desfecho (i.e., positivos para *Mansonella*) foi, respectivamente: 2,02, 2,3 e 2,96 nos grupos expostos (Tabela 6).

Tabela 6 - Razão de prevalência entre portadores de *M. ozzardi* e variáveis perguntadas.

Variável		**Prevalencia (%)**	**RP**	**IC 95%**
Malária	Sim	26,5	2,02	1,06 – 3,83
	Não	13,1		
Filária	Sim	25,6	2,30	1,13 – 4,70
	Não	11,1		
Álcool	Sim	43,5	2,96	1,61 – 5,45
	Não	14,7		

Dos sintomas clínicos analisados entre os infectados e não infectados, em apenas cinco deles foram verificados diferenças significativas nas razões de prevalência. Nesse caso, foi observado que quando considerados os sintomas: dor nas costas, artralgia, dor nos braços, dor no peito e cefaleia, na proporção de indivíduos positivos para *Mansonella* estes se mostraram estatisticamente significante, respectivamente com a RP de: 2,10, 2,45, 2,01, 2,22 e 2,91

(Tabela 7). E a dispneia embora com RP de 2,10 apresentou um intervalo de confiança de 0,89 a 4,93.

Tabela 7 - Razão de prevalência (RP) entre portadores de *M. ozzardi* e sintomas perguntados.

Variável		N	Prevalencia (%)	RP	IC 95%
Dor nas costas*	Sim	47	29,8	**2,10**	1,13 – 3,92
	Não	120	14,2		
Artralgia*	Sim	38	34,2	**2,45**	1,33 – 4,53
	Não	129	14,0		
Dor nos braços*	Sim	32	31,2	**2,01**	1,05 – 3,84
	Não	135	15,6		
Dor no peito*	Sim	26	34,6	**2,22**	1,15 – 4,26
	Não	141	15,6		
Dispneia	Sim	11	36,4	**2,10**	0,89 – 4,93
	Não	156	17,6		
Cefaleia*	Sim	83	27,1	**2,91**	1,38 – 6,13
	Não	84	9,52		

*Significância estatística (Tabela completa no Apêndice H - Tabela 6)

4.2 Ensaio Clínico

Em relação as 171 pessoas que participaram inicialmente do estudo 74 (43,3%), foram positivas e estavam incluídas nos critérios estipulados. Deste total, 74 indivíduos estavam com os exames positivos pela técnica da filtração de sangue em membrana para *M. ozzardi* com microfilaremia média de 7,2 mf/mL antes do tratamento (D0), 66 permaneceram no estudo até D180 e 53 indivíduos permaneceram até o D360. Foram encontradas inicialmente uma mediana de 1,0 mf/mL, mínimo de 1,0 mf/mL , Q1 = 1,0 mf/mL , Q3 = 3,25 mf/mL, máximo = 250,0 mf/mL, moda = 1,0 mf/mL e desvio-padrão = 29,6 mf/mL antes do tratamento (D0).

Todos os voluntários apresentaram exame negativo por filtração de sangue (100%) quando analisados três dias após o tratamento (D3). Desse total 66 indivíduos foram examinados em (D180) e permaneceram com microfilaremias negativas (x^2 de Friedman= 132,00 valor p= 0,00000) (Figura 20).

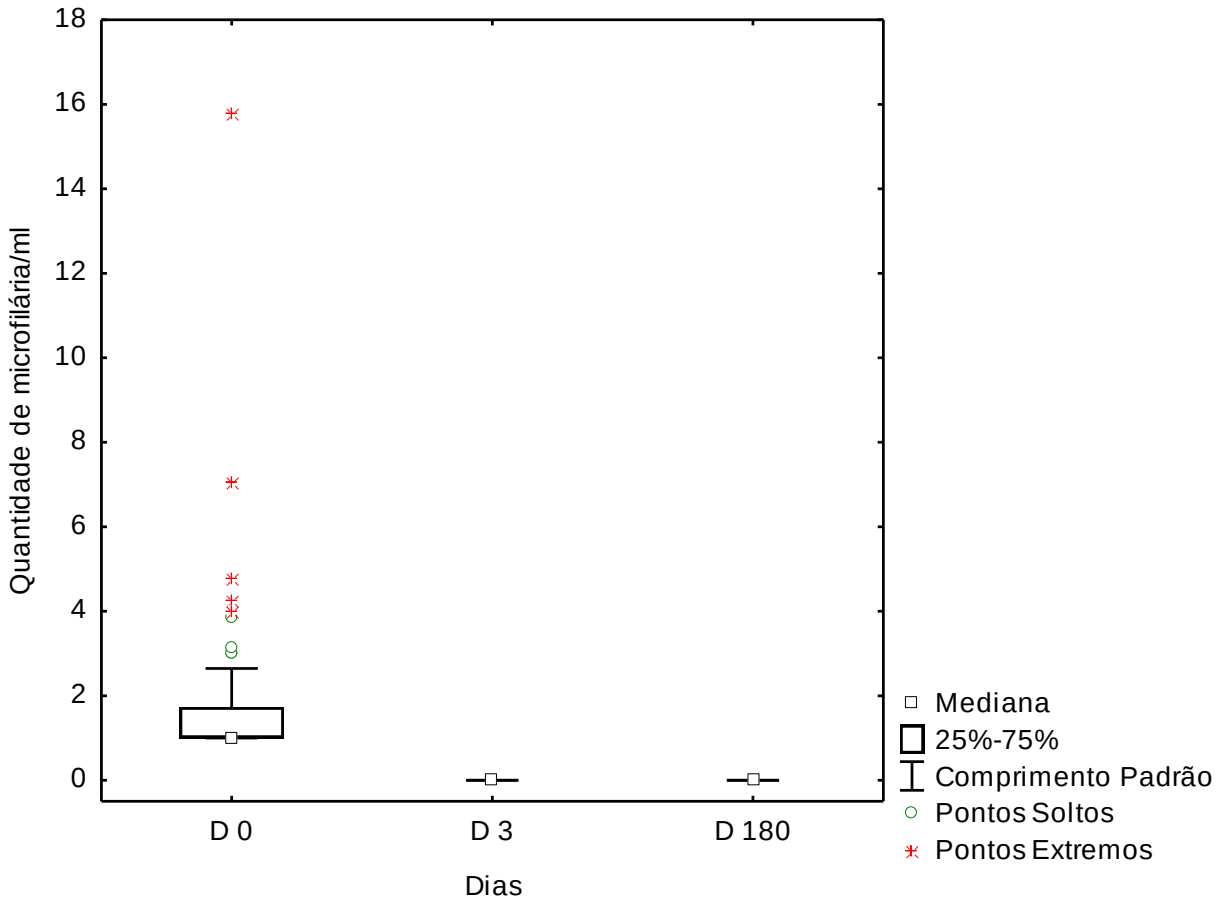

Figura 20 - Quantidade de microfilárias transformada pela raiz quadrada e os dias após uso de Ivermetina (D180).

Cinquenta e três indivíduos foram examinados em D360 e permaneceram com microfilaremias negativas (x^2 de Friedman= 159,00 valor-p< 0,0001) (Figura 21).

Quando se quantificaram os sintomas gerais do D0 ao D3 (tosse com sangue, dor abdominal, dor nas costas ou pescoço, artralgia, astenia, dor nas pernas, dor nos braços, dor no peito, dispneia, tontura, cefaleia, febre, coceiras no corpo, náuseas, vômitos, "frieza nas pernas", adenomegalia e visão embaçada), obteve-se uma diminuição de 75,7% dos sintomas em D3, corroborando com a impressão clínica-anmnéstica de melhora dos sintomas. Estes ratificados com a melhora clínica de 68 (91,9%) dos indivíduos em D 30, apresentando em cinco (6,7%) casos persistência de artralgias e um caso (1,4%) com melhora de apenas um sintoma de oito relatados.

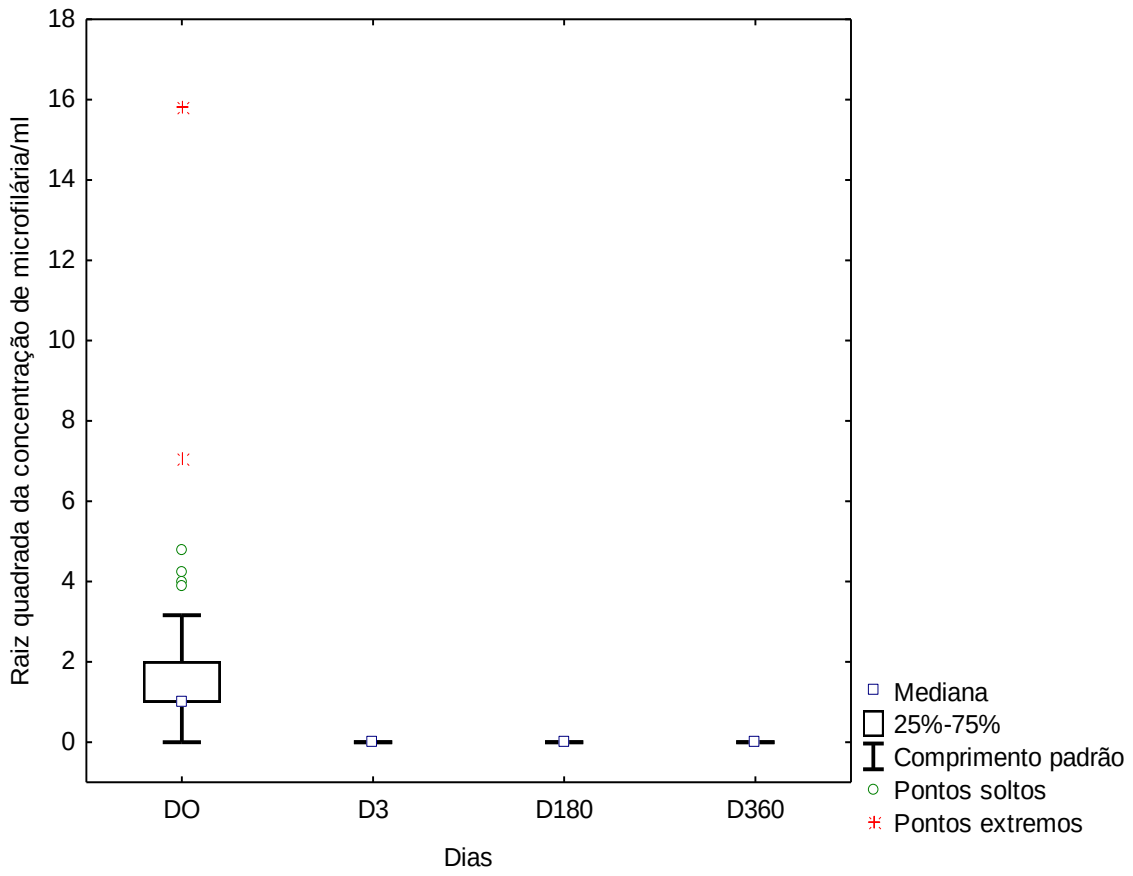

Figura 21 - Quantidade de microfilárias transformada pela raiz quadrada e os dias de tratamento após uso de Ivermertina (D360).

Em relação aos parâmetros comparados dos testes bioquímicos pré e pós-tratamento (GGT, TGO, TGP, bilirrubinas, ureia, creatinina), dos portadores de mansonelose, houve um aumento com significância estatística apenas da GGT (p< 0, 004) ao teste de Wilcoxon (Tabela 8).

Tabela 8 - Comparação dos parâmetros bioquímicos pré e pós-tratamento com Ivermectina.

Exame	D0		D3		Valor-p
	Mediana	(Q1; Q3)	Median a	(Q1; Q3)	
GGT	**19,00**	**15,00; 24,00**	**20,00**	**15,00; 30,00**	**0,004***
TGO	28,00	21,00; 33,00	29,00	22,00; 33,00	0,870
TGP	24,00	18,00; 32,00	22,00	18,00;	0,152

				28,00	
Bilirrubina	0,50	0,40; 0,60	0,50	0,40; 0,50	0,117
Ureia	26,00	20,00; 31,00	26,00	21,00; 29,00	0,736
Creatinina	0,80	0,70; 0,90	0,80	0,70; 1,00	0,868

*Significância estatística.

Em relação aos parâmetros comparados dos testes hematológicos pré e pós-tratamento (leucócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, hematócrito e hemoglobina), dos portadores de mansonelose houve uma diminuição com significância estatística dos monócitos (p<0, 001), e dos eosinófilos (p< 0,001 pelo teste de Wilcoxon (Tabela 9), em relação aos valores absolutos.

Tabela 9 - Comparação dos exames hematológicos pré e pós-tratamento com Ivermectina.

Exame	D0		D3		Valor-p
	Mediana	(Q1; Q3)	Mediana	(Q1; Q3)	
Leucócitos	7200,00	6600,00; 7980,00	7600,00	6700,00;8150,00	0,763
Neutrófilos	4345	4066; 4955	4964	4187; 5305	0,105
Linfócitos	1933	1761; 2175	1914	1789; 2185	0,443
Monócitos	**355**	**315; 410**	**316**	**277; 390**	**<0,001***
Eosinófilos	**390**	**276; 498**	**261**	**210; 343**	**<0,001***
Hematócrito	38,00	37,00; 40,00	39,00	37,50; 40,00	0,437
Hemoglobina	12,70	12,30; 13,30	13,10	12,45; 13,30	0,523

*Significância estatística.

Ao serem avaliados os parâmetros laboratoriais pelo teste de McNemar e feitas as respectivas quantificações, foi observada uma diminuição com significância estatística no número de eosinófilos com P < 0,013. E em relação aos valores absolutos e aos índices hematológicos, houve uma melhora de seis dos sete parâmetros avaliados e em relação aos índices bioquímicos houve uma melhora de quatro dos seis parâmetros (Tabela 10).

Tabela 10 - Perfis bioquímicos e hematológicos de todos os pacientes que iniciaram e permaneceram no estudo até o terceiro dia.

Exames (N[a])	Valores de referência		Resultados normais [b]		Teste de McNemar	Median a	(Q1; Q3)	Median a	(Q1; Q3)	Teste Wilcoxon Valor p
	Homens	Mulheres	D0	D3	Valor p	D0		D3		
Leucócitos (59)	4,000 - 10,000 mm³		58	59	1,000	7,200	6,600;7,980	7,600	6,700;8,150	0,763
Linfócitos (59)	800 - 4,000 mm³		59	59	n/a	1,933	1,761;2,175	1,914	1,789;2,185	0,443
Monócitos (59)	80 - 1,000 mm³		59	59	n/a	355	315;410	316	272;390	*<0,001*[c]
Neutrófilo (58)	1,800 - 7,400 mm³		57	58	1,000	4,345	4,066;4,955	4,964	4,187;5,305	0,105
Eosinófilo (59)	40 - 500 mm³		44	55	*0,013*[c]	390	276;498	261	210;343	*<0,001*[c]
Hematócrito (59)	42%-54%	36%-46%	31	30	1,000	38,0	37,0;40,0	39,0	37,5;40,0	0,437
Hemoglobina (59)	14-18 g/dL	12-16 d/dL	31	31	1,000	12,7	12.3;13,3	13,1	12,45;13,3	0,523
GGT (58)	7 - 45 U/L	5 - 27 U/L	51	46	0,063	19	15;24	20	15;30	*0,004*[c]
AST[d] (58)	11 - 39 U/L	6 - 27 U/L	39	41	0,804	28	21;33	27	22;33	0,870
ALT[d] (58)	11 - 33 U/L	7 - 27 U/L	42	44	0,791	24	18;32	22	18;28	0,152
Bilirrubina (58)	até 0,8 mg/dL		53	58	0,063	0,5	0,4;0,6	0,5	0,4;0,5	0,117
Ureia (58)	10 - 40 mg/dL		56	56	1,000	26	20;31	26	21;29	0,736
Creatinina (58)	0,5 a 1,4 mg/dL		56	54	0,625	0,8	0,7;0,9	0,8	0,7;1,0	0,868

Os valores de referência, mediana e quartis utilizados para a comparação de resultados entre os pré e pós-tratamento (D0 e D3) com ivermectina (0,15 mg / kg) são mostrados. O teste não paramétrico pareado Wilcoxon Signed Rank foi utilizado para comparar os resultados nominais do exame, e foi utilizado o teste de McNemar para comparar as freqüências normais e anormais resultantes do exame entre D0 e D3.

N[a] – Numero de indivíduos com resultados válidos tanto D0 e D3.
Número de resultados normais[b] – Indivíduos com resultados dentro do intervalo de valores de referência.
Os resultados anormais podem ser facilmente calculados como N menos o número de resultados normais.
[c]–Estatisticamente significante (p<0,05).
[d] – Aminotransferases.
n/a –Estatísticas que não puderam ser calculadas devido a falta de resultados anormais.

Em relação às reações adversas do tratamento (sintomas que se apresentaram ou se exacerbaram após o tratamento), 64,9% dos 74 pacientes apresentaram sintomas, com média de 1,3 sintomas por paciente, variando de 0 a 4 sintomas. Os sintomas mais comuns foram sensação de hipertemia 28,7%, cefaleia 26,6%, artralgia 10,6% e vertigem 7,4%.

Esses efeitos iniciaram em média 16,2 ± 8,4 horas após o uso da medicação e terminaram 13,9 ± 8,2 horas após o início dos sintomas, tendo 100% de resolução. Foi necessária apenas uma intervenção médica para hipertermia com o uso de sintomáticos via oral e houve relatos de dois episódios de vômitos e mialgias resolvidos sem a necessidade da presença do médico.

Em relação a possíveis lesões oculares, avaliou-se posteriormente ao ensaio clínico um grupo de pacientes com mansonelose e outro grupo sem mansonelose dentre os pacientes que previamente participaram do estudo. Ao comparar os dois grupos (61 mansonelóticos e 51 não-mansonelóticos), em relação à presença de lesões numulares de córnea, obteve-se 8,2% de associação no primeiro grupo e 11,7% no grupo negativo, entretanto não houve diferença com significância estatística entre os mesmos (Figura 22).

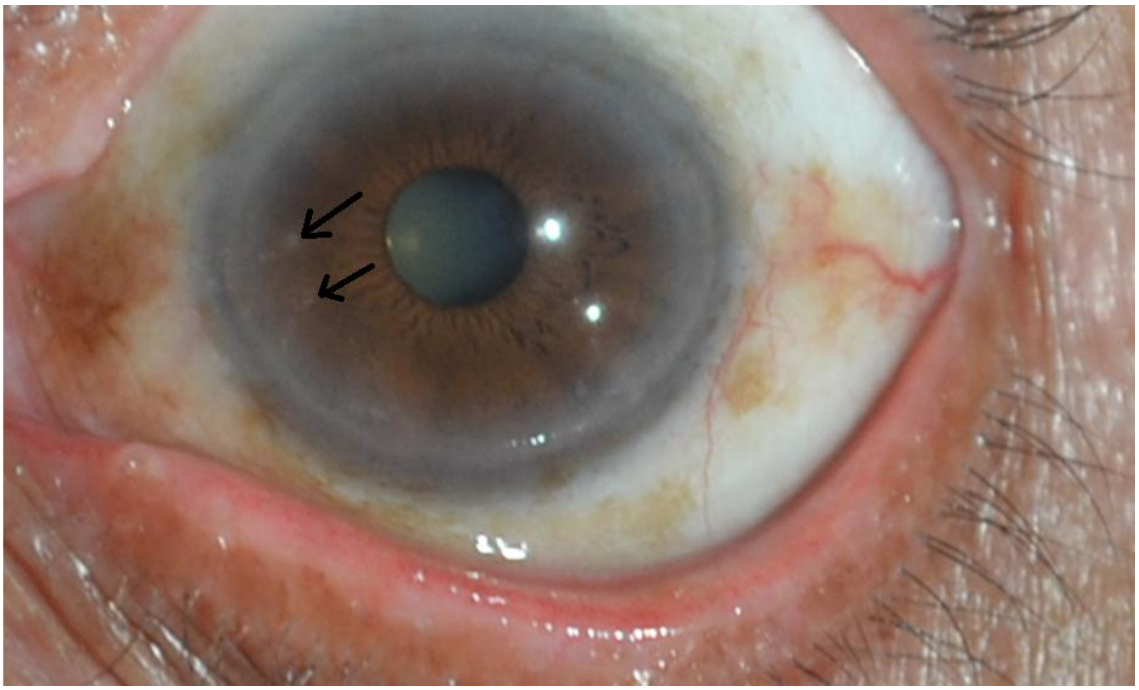

Figura 22 - Olho com lesões puntiformes em paciente mansonelótico. Fonte: Professor Rubens Belfort Jr.

Em relação aos aspectos clínicos agrupados dos portadores de *M. ozzardi* que foram avaliados no ensaio clínico com aqueles de membrana negativa (Tabela 11), que não observou-se significância estatística para nenhum sintoma.

Tabela 11 - Sinais e sintomas agrupados dos pacientes do ensaio clínico, Lábrea.

Sintomas	**Presentes**	**Ausentes**
Artralgia	24,0%	20,9%
Cefaleia	17,0%	22,9%
Dermatites	4,0%	22,9%
"Frieza nas pernas"	0,0%	0,0%
Mialgia	16,0%	21,7%

5 DISCUSSÃO

M. ozzardi é uma das oito espécies de filárias de interesse médico para o ser humano, sendo a única autóctone das Américas (OTTESEN et al., 1984) e uma das quatro filárias humanas presentes no Brasil (CAMPOS et al., 1997; DEANE, 1949). Apresenta uma alta prevalência na região Amazônica, com índices que variam de 0,4% a 70%, conforme localidades e métodos de diagnóstico (BASANO et al., 2014; BATISTA; OLIVEIRA; RABELLO , 1960; DEANE, 1949; FRANÇA et al., 1985; MEDEIROS et al., 2007, 2009a, 2009b, 2010, 2011, 2014). Nesse trabalho, realizado no município de Lábrea-AM, foi demonstrado a presença deste parasito com prevalências elevadas em todas as localidades, confirmando a grande distribuição dessa filária nas populações ribeirinhas do Amazonas (BATISTA; OLIVEIRA; RABELLO, 1960; DEANE, 1949; FRANÇA et al., 1985; LACERDA; RACHOU, 1956; MEDEIROS et al., 2007, 2009a, 2009b, 2010, 2011, 2014).

Em Lábrea, município deste estudo, o primeiro inquérito epidemiológico foi realizado por Lacerda e Rachou (1956) encontraram prevalência de 0,4% (gota espessa). Posteriormente, em comunidades do rio Purus, Shelley (1976) assinalou prevalência de 4,4% e Medeiros e colaboradores (2011) registraram prevalência de 20,7% de microfilarêmicos. No rio Ituxi (Lábrea), afluente do rio Purus, também utilizando o método de diagnóstico da gota espessa de sangue, foram encontradas prevalências de 5,9% (TAVARES, 1981) e 30,3% de microfilarêmicos (MEDEIROS et al., 2008). Nesses estudos, verificou-se o aumento das prevalências com o passar dos anos, fato constatado pelo levantamento realizado neste ensaio clínico, o que pode evidenciar a falta de políticas públicas para prevenção e tratamento desta parasitose.

Corroborando com os dados do município de Lábrea, Pauiní, no Amazonas, apresentou prevalências de 28,4% em população indígena e de 24,8% e 24,1% em população ribeirinha dos rios Pauiní e Purus, respectivamente (MEDEIROS et al., 2007, 2009a). Ainda no rio Purus, mais especificamente no município de Boca do Acre, Amazonas, através da gota espessa de sangue, foi encontrado uma prevalência de 27,3% de microfilarêmicos (MEDEIROS et al., 2009b). Este trabalho demonstrou inicialmente (estudo piloto) prevalências similares da gota espessa de 16,5% comparado a outros autores (MEDEIROS et al., 2007, 2008, 2009, 2009b) em trabalhos realizados na região do rio Purus, porém neste estudo foi observado um aumento substancial da sensibilidade quando foi utilizado método de filtro de membrana de policarbonato (50,3%).

Nas áreas de ocorrência dessa parasitose, a maioria dos inquéritos epidemiológicos tem utilizado para o diagnóstico de *M. ozzardi* a gota espessa de sangue, por ser um método de fácil execução e baixo custo. Entretanto, apresenta como viés uma baixa sensibilidade, principalmente em pacientes com baixa parasitemia (ROCHA; FONTES, 2000). Por outro lado, os métodos de concentração de microfilárias (técnicas de Knott e filtração de sangue em membrana de policarbonato), são pouco utilizados nas rotinas de diagnóstico devido a algumas restrições quanto à sua aplicação, como custo, relutância da população na coleta de sangue venoso, além de ser mais laborioso, na opinião de alguns especialistas (DREYER, 1994; ROCHA; FONTES, 2000), mas de maior sensibilidade

No presente estudo resultados contrários a essas opiniões a técnica aplicada de filtração de sangue em membrana de policarbonato foi de fácil realização, com custo acessível e com boa tolerância da população à punção venosa. A técnica provou ser bastante factível de ser aplicada nas condições precárias de campo, pois apesar da utilização da punção venosa, tanto a fixação quanto o uso dos corantes tradicionais podem ser feitos com o mínimo de condições técnicas, inclusive em casas de ribeirinhos com materiais em parte adaptados. Com isso o uso desses métodos de concentração contribui com uma sensibilidade maior, tanto para o diagnóstico, quanto para o acompanhamento do *clearence* da parasitemia, conforme demonstrado neste estudo.

Este trabalho foi o primeiro ensaio clínico que utilizou a filtração de sangue em membrana de policarbonato no diagnóstico de *M. ozzardi* na região do rio Purus, e um dos pioneiros em levantamento epidemiológico para essa parasitose. Apenas Martins e colaboradores (2010) utilizaram essa técnica para estimativa de cargas parasitárias em Coari-AM. Neste ensaio clínico, realizado em Lábrea, encontrou-se uma prevalência de 50,3% de microfilarêmicos na população geral antes das exclusões, desistências e absenteísmo, mostrando que a prevalência dessa parasitose é bem superior aos descritos anteriormente na região do rio Purus, quanto na calha de outros rios Amazônicos, pois naqueles estudos utilizaram a metodologia de gota espessa de sangue (MEDEIROS et al., 2007, 2008, 2009a, 2009b, 2010, 2011, 2014). A FMP aumentou a prevalência da mansonelose em comparação aos estudos realizados com gota espessa de sangue na mesma região em torno de100 a 112,5%, quando comparado a outros trabalhos na região (MEDEIROS et al., 2008, 2009a e 2011).

Outro importante dado demonstrado neste estudo é que a filtração de sangue em membrana de policarbonato conseguiu detectar um elevado número de crianças e adolescentes de 5 a 15 anos de idade parasitados (32,4%), diferentemente de outros trabalhos que utilizaram

a gota espessa de sangue na região do rio Purus. Medeiros e colaboradores (2008, 2009a, 2011) encontraram prevalências bem menores de microfilarêmicos nos indivíduos com idade entre 10 e 18 anos (prevalências de 20,7%, 9,7% e 10,2%). A FMP, devido a sua maior sensibilidade, consegue detectar mais precocemente essa parasitose evitando assim um longo e penoso convívio da população mais jovem com essa parasitose e as consequências que tal associação poderá causar. A precocidade do diagnóstico e um tratamento precoce, com prováveis implicações negativas no ciclo do parasito, pois o ser humano parece ser o único reservatório desse parasito (ORIEL; EBERHARD, 1982).

Em relação ao controle da mansonelose e sendo o ser humano considerado atualmente o único reservatório conhecido do agente etiológico (BATISTA; OLIVEIRA; RABELLO, 1960; TAVARES, 1981), mesmo levando-se em consideração os trabalhos de Orihel e Eberhard (1982), o uso da técnica de filtração de sangue em membrana de policarbonato para diagnóstico (melhor sensibilidade) e seguimento do *clearence* da parasitemia (verificação de cura parasitológica), apresenta-se como uma importante ferramenta para acompanhamento do controle da mansonelose. O que está de acordo com outros estudos que utilizaram métodos de concentração ou associação de métodos de diagnósticos e observaram uma tendência de aumento da prevalência devido a maior sensibilidade desse método (ADAMI et al., 2014; BATISTA; OLIVEIRA; RABELLO, 1960; VERA et al., 2011).

Batista, Oliveira e Rabello (1960) observaram uma prevalência de 30,3% de microfilarêmicos com *M. ozzardi* entre 421 indivíduos examinados por gota espessa de sangue, entretanto observaram que o percentual de positivos aumentou muito quando examinaram pelo método de Knott os casos negativos, encontrado mais 26,6% de positivos. Recentemente, Vera e colaboradores (2011) também assinalaram maior sensibilidade da reação em cadeia da polimerase (PCR) (100%) e filtração de membrana de policarbonato (88,9%) em relação à gota espessa de sangue no diagnóstico de *M. ozzardi*.

Adami e colaboradores (2014), em região fronteiriça entre os estados do Amazonas e Acre, examinaram um total de 355 voluntários e usando o método de concentração de Knott encontraram uma positividade de 18,3%. O aumento da sensibilidade com o uso de filtração de sangue em membrana de policarbonato também foi evidenciado em um estudo epidemiológico na Venezuela que mostrou maior sensibilidade da filtração de sangue em membrana (41,2%) em relação à gota espessa de sangue (12,2%), para outra filariose, *Onchocerca volvulus*, (BOTTO; ARANGO; YARZÁBAL, 1984), evidenciando uma melhora na sensibilidade do diagnóstico em filárias.

A prevalência em números absolutos ligeiramente maiores nos homens deste estudo é atribuída possivelmente ao maior contato destes, no seu dia-dia, com os insetos vetores, e está de acordo com a observação de outros trabalhos realizados no Amazonas (BATISTA; OLIVEIRA; RABELLO, 1960; MARTINS et al., 2010; MEDEIROS et al., 2009a, 2011; TAVARES, 1981), entretanto não houve estatisticamente diferenças entre os gêneros.

Quando foram realizados os cálculos com mais de uma variável, analisando a *Odds Ratio* para gênero, ocupação e grupo etário, os homens agricultores/pescadores na faixa de 45 a 60 anos, apresentaram uma proporção de maior risco do que as mulheres por exposição acumulativa. Esse grau de exposição aos simulídeos também explica as maiores prevalências nos indivíduos que trabalham no campo, como por exemplo, os agricultores, como também naqueles de maiores faixa etárias (MARTINS et al., 2010; MEDEIROS et al., 2009a, 2011). Analisando esses fatos a atividade vetorial cumulativa, a exposição ocupacional, o tempo de moradia, somado a uma maior negligência com a saúde da população do gênero masculino poderiam explicar esses achados.

Além disso, neste estudo observou-se que o maior tempo de moradia dos indivíduos nas comunidades ribeirinhas (≥ 11 anos de moradia) está associado às maiores prevalências. Essa observação mostra indícios que o tempo de moradia e consequentemente de exposição aos vetores são fatores determinantes para a manutenção da infecção por *M. ozzardi* ($A = 11,33$; $x^2 = 4,66$; $p = 0,03$). A exposição no decorrer do tempo causa um processo de acumulação do parasito nos indivíduos, mantendo vermes adultos de diferentes idades sustentando uma produção continua de microfilárias e, por consequência, a transmissão para os vetores, mantendo o ciclo da parasitose.

O uso da ivermectina neste estudo se deve a experiência com esse fármaco como anti-helmíntico em humanos, desde a década de 1980 e, em particular, nas filarioses de maior interesse médico, como as chamadas filarioses negligenciadas (oncocercose e filariose linfática) e outras mansoneloses na África (AZIZ et al., 1982; CANGA et al., 2008; FISCHER et al., 1998, 1999; KYELEM et al., 2003, 2005; MAS et al., 2006; WHO, 1995). Para *M. ozzardi*, particularmente, existem poucos estudos sobre tratamento específico com resultados favoráveis conduzidos com essa droga. (GONZÁLEZ; CHADEE; RAWLINS, 1999; KROLEWIECKI et al., 2011; NUTMAN; NASH; OTTESEN, 1987; TAVARES; FRAIHA NETO, 1997).

Este estudo, além de ratificar a eficácia do clareamento parasitológico em conformidade com Nutman, Nash e Ottesen (1987), González, Chadee e Rawlins (1999), Tavares e Fraiha

Neto (1997), verificou a sustentação desse clareamento por período de seis meses a um ano, o que não tinha sido demonstrado anteriormente por Tavares (1997), que observou esse clareamento até 30 dias e González, Chadee e Rawlins (1999), informaram uma diminuição de 82% na média da densidade parasitária após quatro anos do tratamento em 40 pacientes. Nutman, Nash e Ottesen (1987), apesar de terem demonstrado a sustentação por nove meses, a descrevem em uma única paciente. Portanto este estudo apresenta um número substancialmente maior de indivíduos analisados, inicialmente com 74, concluindo com 53, durante um período maior de um ano e realizando uma análise individual do clareamento da parasitemia.

Em relação aos exames bioquímicos apenas a gamaGT apresentou variação estatística significativa (Teste de Wilcoxon, $p< 0,004$), sem no entanto, ter significância clínica. Entretanto não foram observadas alterações significativas nos resultados dos parâmetros laboratoriais das bilirrubinas, transaminases e excretas nitrogenadas, tanto do ponto de vista estatístico como clínico, sendo esses parâmetros abordados pela primeira vez em um estudo no mundo, com isso deve-se observar esses dados em futuros ensaios clínicos, pois em algumas condições clínicas poderá significar algum impedimento em pacientes com alterações prévias a este indicador.

Em relação às alterações hematológicas na série branca nos exames pré-tratamento, ao contrário dos estudos anteriores, o leucograma apresentou-se 98,7% normal, em relação a 16,2% de leucocitose nos achados de Batista, Oliveira e Rabello (1960) e 6,5% nos achados de Tavares (1981) e 6,5% de leucopenia também em Tavares (1981). Outra diferença, em contraposição ao que foi encontrado por Batista, Oliveira e Rabello (1960), não houve ausência de monócitos em 30 % e sim 100% de presença com tendência a monocitose. Quando analisados alguns elementos figurados separadamente, o Teste de Wilcoxon mostrou significância estatística na diminuição dos monócitos ($p< 0,001$ e eosinófilos ($p<0,001$), após o tratamento medicamentoso. Na literatura poucos estudos abordaram a análise em relação a estes parâmetros pré e pós-tratamento (BATISTA, OLIVEIRA; RABELLO, 1960; TAVARES, 1981).

O único achado correlato entre os estudos anteriores em relação aos elementos figurados foi a presença de eosinofilia significativa percentualmente nos pacientes deste estudo, e nos estudos de Batista, Oliveira e Rabello (1960) e Tavares (1981), e valores individuais extremamente alto da porcentagem de eosinófilo (20%) no exame sanguíneo da paciente analisada no trabalho de Nutman, Nash e Ottesen (1987). Embora apenas a eosinofilia tenha apresentado uma variação estatística e clinicamente significante entre os dados pré e pós-

tratamento, esse fato é esperado em relação a indivíduos parasitados por nematelmintos de uma maneira geral (RIZZO et al., 1989; SURMONT et al., 1995) e filárias (VARGAS-HERRERA et al., 2013). Todavia houve normalização destes valores após o tratamento tanto em Nutman, Nash e Ottesen (1981), como neste trabalho (BASANO et al., 2014).

Em relação aos parâmetros laboratoriais que apresentaram apenas aumento dos valores da mediana e a respectiva tendência de aumento dos parâmetros iniciais individualmente, sem significância estatística, após o uso da ivermectina. Estes devem ser valorizados, pois mesmo que não tenham superado os limites superiores do teste, apresentaram uma tendência de aumento nos níveis sanguíneos, o que deve ser observado e relatado em relação às orientações aos médicos assistentes, para ficarem atentos nos pacientes com comorbidades de uma maneira geral, e nos pacientes com exames apresentando valores próximos aos limites superiores quando for prescrita a medicação.

Contudo e apesar dos achados laboratoriais citados anteriormente, esses não interferiram na monitorização clínica e no tratamento dos indivíduos parasitados pela *M. ozzardi*, tratados pela ivermectina nas doses preconizadas, pois apresentaram em sua totalidade a normalização dos dados laboratoriais.

Finalizando, a somatória das tendências laboratoriais, com a possibilidade de coinfecções, o médico ao prescrever o tratamento com ivermectina para a mansonelose levará em conta, os efeitos adversos, as prevalências das parasitoses e o uso concomitante de medicações que serão metabolizadas pelos indivíduos.

Neste estudo, assim como em outras localidades, essas observações se justificam também para auxiliar o médico na escolha do melhor tratamento de maneira individual e coletiva. Por se tratar de áreas onde várias entidades nosológicas se sobrepõem a este estudo encontrou paralelamente as seguintes prevalências: hepatites virais (Anti-HBc IgG 58,5% e 6,4% de Hbsag), malária 9 % de assintomáticos, verminoses 81,4% (*Giardia intestinalis* 55,7%, Complexo *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* 21,4%, *Ancilostomidae sp.* 5,7%, *Entamoeba coli* 8,5%, *Ascaris lumbricoides* e *Strongyloides stercoralis* 2,8%), toxoplasmose 55,7% com 12% de lesões oculares.

Outra questão explorada é a real eficácia do tratamento versus reações adversas com o uso da ivermectina. Para tal, o tratamento foi supervisionado e os pacientes foram seguidos *in loco* durante um período de no mínimo 72 horas, mas por até 10 dias, relatando sinais e sintomas clínicos devido ao uso da medicação.

As reações adversas (RA) não se mostraram limitantes, embora presentes em quantidade significativa. Do total estudado encontrou-se RA em 64,9 % dos pacientes, entretanto, apresentaram 100% de normalização até o D3 pós tratamento em acordo com a literatura (AZIZ et al., 1982; NUTMAN; NASH; OTTESEN , 1987), com apenas um caso considerado de intensidade média dentre os 74 pacientes tratados. Foi solicitado a intervenção médica pelos familiares, sendo um caso de hipertermia, resolvido com a prescrição de um sintomático via oral, e o relato de dois episódios de cefaleia intensa, acompanhados de artralgia e mialgia em outros dois pacientes sem necessidade de intervenção médica. Esses efeitos, em sua maioria, surgiram até 24 horas do uso da medicação e desapareceram em prazo semelhante. Naqueles que apresentaram reações adversas, em média, cada um apresentou cerca de 1,3 sintomas e os que tiveram maior quantidade de sintomas apresentaram 4 sintomas.

Todavia Krolewiecki e colaboradores (2011), em estudo na Argentina, demonstraram uma maior intensidade dessas reações em dois pacientes tratados com ivermectina (reações severas), em uma quantidade amostral de pacientes menor que este estudo.

Vale salientar que a sensação clínica e os relatos das pessoas que fizeram uso da medicação (impressão clínica-anmnéstica) foram extremamente positivos. No grupo de 74 indivíduos até 30 dias após o tratamento, referiram melhora 68 indivíduos (91,9%), isto em todos os sintomas referidos antes do tratamento (tosse com sangue, dor abdominal, dor nas costas ou pescoço, artralgia, astenia, dor nas pernas, dor nos braços, dor no peito, dispneia, tontura, cefaleia, febre, coceiras no corpo, náuseas, vômitos, “frieza nas pernas”, adenomegalia e visão embaçada). No grupo restante de seis indivíduos, cinco (6,7%) referiram à permanência da artralgia que sofriam desde antes do tratamento. Um indivíduo (1,3%) relatou melhora de apenas um sintoma (cefaleia) que sofria antes do tratamento, sendo que os outros sintomas permaneceram após o tratamento (dor abdominal, dor nas costas, artralgia, dor nas pernas, dor nos braços, coceiras pelo corpo).

Quando quantificamos os sintomas gerais em números absolutos, do D0 ao D3 obteve-se uma diminuição de 75,7% dos sintomas, e de 91,9% até o D30. Isto posto, mesmo que exista um viés em atender uma população desassistida que tende a supervalorizar os sintomas em uma consulta médica nas condições de campo, o resultado qualitativo final apresenta valores substanciais. Mesmo que seja resultado de um sinergismo do efeito real do medicamento e do psicológico, apesar da falta do uso do placebo, ausência de randomização e não ser duplo-cego (por conta do impedimento do comitê de ética e pesquisa local). Os resultados foram impactantes e fica evidente o real benefício do uso da medicação.

Essa observação é sustentada com a manutenção do bem estar após 30 dias e reafirmada aos seis meses por mais de 90% dos participantes do ensaio clínico. Mesmo levando em consideração que os sinais e sintomas clínicos relatados sobre essa parasitose são extremamente inespecíficos, existe uma convicção que ao menos a eliminação do parasito de alguma forma contribui para o bem estar do indivíduo infectado.

A controvérsia em relação à clínica da mansonelose (patogênica x não patogênica) é discutida há várias décadas. Poucos autores se debruçaram em estudos clínicos, principalmente até a metade do século XX, quando essa parasitose chegou a ser declarada de interesse apenas acadêmico por Biagi, em 1956. Batista, Oliveira e Rabello na década de 1960, em estudo da patogenicidade da mansonelose, citam vários autores que consideravam essa parasitose não patogênica (AUGUSTIN, 1951; BRUMPT, 1949; COSTA, 1956; ROMITI, 1935; STRONG, 1945). Entretanto, outros estudos também correlacionaram sinais e sintomas desta parasitose (BATISTA; OLIVEIRA; RABELLO, 1960; BRANCO et al., 1998; COHEN, 2007; MARTINS et al., 2010; MONTESTRUC; BLACHE, LABORDE, 1950; TAVARES, 1981; VIANNA et al., 2012).

Montestruc, Blache e Laborde (1950) foram dos primeiros autores estrangeiros a correlacionar cefaleia e tonturas com a mansonelose. Os trabalhos de Moraes e colaboradores (1958) e Batista, Oliveira e Rabello (1960) são indiscutivelmente os primeiros trabalhos dessa parasitose com amostra de casos clínicos significativos e abordagem médica. A fim de estudar a sintomatologia Batista, Oliveira e Rabello (1960) utilizaram de questionário modificado de Matsuda por Costa (1956), que selecionavam algumas características frequentes nestes pacientes e pareavam com os casos negativos.

Para minimizar o viés de falsos negativos, Batista, Oliveira e Rabello (1960) empregaram nos casos negativos à gota espessa, o método de concentração de Knott, que praticamente dobrou o número de casos positivos. Posteriormente, em suas conclusões os autores incriminam cinco grandes queixas características dessa parasitose, a saber: dores articulares 34,9%, “frieza nas pernas” 34,4%, placas eritemato-pruriginosas 23,2%, adenite inguino-crural 18,7% e dor de cabeça 47,7%. Em comparação com este estudo, apresentou-se associação semelhante para cefaleia 49,6% e dores em membros 40,7% ambos com significância estatística quando comparadas aos casos-controle negativos. Em relação à “frieza nas pernas” e adenomegalia os resultados são antagônicos. Em relação à “frieza”, mesmo com a queixa referida em 13,1% ao exame clínico, tal fenômeno não foi constatado em nenhum paciente neste estudo. Em relação à presença de adenomegalia 26,8% ao verificar sinais de

inflamação, ou supuração, ou associação com febre apenas 4% dos casos positivos neste estudo apresentaram aumento dos gânglios.

Nas décadas subseqüentes, pouco ou quase nada da clínica foi estudado no mundo e no Brasil. Apenas na década de 1980, Tavares (1981), voltou ao tema em trabalho de mestrado, no qual examinou 938 pessoas de uma população de 952 (Rio Ituxi, Lábrea), e encontrou 56 indivíduos parasitados (5,9%). Nesse estudo, os sintomas referidos apresentaram grande semelhança com os estudos de Batista, Oliveira e Rabello (1960), a saber: dores articulares 77%, "frieza nas pernas" 69,5%, cefaleia 65,2%, febre sem causa aparente 44,4%, adenite 34,7% e erisipela 32,6%.

Ao analisar os aspectos clínicos agrupados dos portadores de *M. ozzardi* que foram avaliados no ensaio clínico com aqueles de membrana negativa, chegou-se a valores muito próximos entre os portadores e os não portadores de mansonelose a técnica empregada sem apresentar significância estatística. Artralgia 24% e 20,9%, cefaleia 17% e 22,9%, mialgia 16% e 21,7% respectivamente, sem significância estatística, o que não ocorreu com os estudos anteriores que identificaram algumas associações (BATISTA; OLIVEIRA; RABELLO, 1960; BRANCO et al., 1998; COHEN, 2007; MARTINS et al., 2010; MONTESTRUC; BLACHE, LABORDE, 1950; TAVARES, 1981; VIANNA et al., 2012).

Entretanto algumas diferenças foram encontradas, como a falta de gânglios palpáveis anormais e a descrição de sensação de "frieza nas pernas" citadas em outros inquéritos, tanto subjetivamente (pacientes), como objetivamente (examinador) (BATISTA; OLIVEIRA; RABELLO, 1960; MARTINS et al., 2010; TAVARES, 1981). Esse fato pode ser explicado, pois neste estudo os pacientes foram examinados por equipe de médicos e esses sinais e sintomas não foram respondidos apenas através de questionários, pois concomitantemente foi realizado exame físico.

Todavia quando foi comparada a população do inquérito epidemiológico fazendo uma razão de prevalência entre os portadores de mansonelose e os não portadores à técnica de membrana de policarbonato, houve diferença dos casos positivos para alguns sintomas como: dor nas costas, artralgia, dor nas pernas, dor nos braços, dor no peito e cefaleia (2,10, 2,45, 2,01, 2,22 e 2,91 respectivamente).

Outro provável aspecto clínico levantado é a possível relação ou associação entre lesões de córnea e a mansonelose na Amazônia. Em estudo anterior conduzido em Pauiní-AM, em uma amostra de 524 indivíduos, observaram em 20 pacientes com opacificações puntiformes (3,8%) estas lesões eram circulares com 0,5 e 1,0 mm, com áreas translúcidas de córnea entre a

lesão e o limbo, sem neovascularização e sem afetar a visão, destes dois indivíduos apresentaram ao exame sanguíneo a presença da filária (BRANCO et al., 1998).

Outro estudo em Coari-AM, no qual 18,9% da população estava parasitada por *M. ozzardi*, 95 indivíduos foram examinados. Entre os 14 que apresentavam lesões de córnea, cinco realizaram biópsia para exames histopatológicos e de PCR e nada foi encontrado (COHEN et al., 2007). Neste estudo, conforme os resultados da avaliação oftalmológica inicial compararam-se dois grupos diferentes (mansonelóticos 61 e não-mansonelóticos 51), em relação à presença dessas lesões, obtendo-se 8,2% de associação no primeiro e 11,7% no controle, não houve associação estatística dessas lesões com os pacientes mansonelóticos. Entretanto deve-se ressaltar a inexistência de relatos de trauma nesses grupos, e que as localizações das lesões poderiam sugerir disseminação hematogênica.

Apesar de inevitável, a taxa de abandono do estudo foi alta, principalmente entre o sexto e décimo segundo mês da pesquisa, o que era previsto pelos pesquisadores, que antecipando este fato, aumentaram a amostra original calculada em 40 pacientes para 74 pacientes. A principal causa da alta taxa de abandono foi a emigração familiar ou a ausência sazonal/ocupacional do paciente na área de estudo durante visitas da equipe de pesquisa principalmente entre o D180 e D360. Entretanto, ao comparar os grupos do D180 e D360, apenas uma diferença de dados em relação à idade média foi observada entre o grupo que permaneceu e o de abandono, existindo um aumento na média da idade no grupo de abandono, por se tratar de homens em idade produtiva avançada.

O uso único da ivermectina sem um placebo neste estudo foi determinado pelo comitê de ética local, principalmente pelos escassos dados dessa medicação para parasitose estudada. Por se tratar de um estudo de braço único não-randomizado, esses resultados podem ser influenciados e têm uma limitação natural, como descrito por Deeks e colaboradores (2003). Portanto estamos conscientes das limitações dos estudos não randomizados e que os resultados da intervenção são difíceis em ser medidos. Apesar disto o desenho deste estudo contemplou de maneira irrefutável uma lacuna do conhecimento terapêutico dessa parasitose e foi realizado dessa forma pela impossibilidade ética impetrada ao randomizado, entretanto considerado necessário e um avanço em relação aos estudos anteriores. Pois, em razão da dimensão e a homogeneidade dos resultados (em todos os 53 pacientes acompanhados), *M. ozzardi* não foi observada após três dias da intervenção medicamentosa e foi sustentada até D360, fato similar a todos os 66 participantes acompanhados até D180. Pode-se concluir que não exista outra

causa possível para determinar outro fator que poderia estar relacionado com tal *clearance* sustentado.

Tendo em vista que não houve reações adversas graves e que nenhuma reação adversa permaneceu até o D3, corroborando os achados de estudos anteriores (NUTMAN; NASH; OTTESEN, 1987; KROLEWIECKI et al., 2011), pode-se afirmar que a ivermectina foi segura na condução do tratamento dessa parasitose. Com isto, os estudos e as atividades de controle das parasitoses estão em consonância com as opiniões de especialistas como Prichard e colaboradores (2012), que relataram a importância de estabelecer uma agenda de pesquisa para as doenças parasitárias humanas.

Considerando os resultados deste ensaio clínico principalmente em relação à alta prevalência dessa parasitose, sugerimos que a mansonelose deva ser incluída na agenda das doenças negligenciadas brasileiras. Além disso, sugerimos o uso da ivermectina para o tratamento dessa parasitose, nas dosagens preconizadas de 0,15 mg/kg/dia, para sanar essa lacuna terapêutica e contribuir com o tratamento individual. Pode-se a partir desses dados e, em conjunto com outras medidas sanitárias e educativas, seguir o modelo dos tratamentos em massa da oncocercose na África e nas Américas, que poderão apresentar um controle coletivo e eficaz desta parasitose.

A partir do estabelecimento desse tratamento individual, poderíamos chamar a atenção das autoridades sanitárias para a necessidade de se estruturar um modelo adequado de controle dessa endemia amazônica, atualmente negligenciada pela rede pública de saúde. O que de certa maneira também contemplaria o tratamento coletivo da mansonelose e das outras helmintíases endêmicas concomitantes nesta região, tratáveis por esse medicamento.

Levando-se em consideração que existem até o momento 22 municípios com a presença da mansonelose no estado do Amazonas e que a proporção da população ribeirinha está em torno de 10% do total, e a média das prevalências a gota espessa de sangue essa em torno de 20 a 25%, poderíamos extrapolar esses dados com a média em torno de 40% para a FMP como constatado neste estudo e inferir que atualmente uma população de aproximadamente 600 mil pessoas estão em área de transmissão da mansonelose, devendo pelo menos 160.000 mil pessoas estarem parasitadas, e sem nenhuma ação governamental de saúde (tradicionais e silvícolas), pois as autoridades sanitárias não conseguem justificar a compra deste medicamento por falta de dados científicos em relação a esta parasitose.

Concluo que esta parasitose é sem dúvida negligenciada pelas autoridades sanitárias e apresenta-se como um problema de saúde pública ainda sem solução e planejamento.

Do ponto de vista epidemiológico, as grandes endemias têm assolado populações ao longo da história, com grandes perdas sociais, localizadas principalmente no nível dos menos favorecidos. As doenças tropicais, verdadeiros desafios a conquista e colonização dos trópicos, não apenas confirmaram a regra e se dispersaram sobre milhões de pessoas, e mesmo no atual século, e de grandes avanços científicos, essas doenças concentram-se, via de regra, nos países subdesenvolvidos (BARROS, 2006).

Na região Amazônica, a problemática é acentuada por razões diversas, entre elas, o grande espaço físico a ser ocupado por uma população reduzida e que muitas vezes está disposta nas margens de rios. O fluxo migratório de pessoas, principalmente pela busca das fronteiras agrícolas, e a elevada depreciação do meio ambiente, acabam colocando o ser humano frente a frente com transmissores de algumas dessas enfermidades (CONFALONIERI, 2005).

Futuros ensaios clínicos controlados com base nesses achados devem avaliar o uso de ivermectina em relação a outros fármacos anti-helmínticos e / ou um placebo para entender melhor os sintomas clínicos em um *design* duplo cego e randomizado. Outra possibilidade seria testar o uso de fármacos que possam estar relacionados às relações de simbiose entre helmintos e bactérias.

Em julho de 2015, a equipe de pesquisadores participantes deste projeto já iniciou o levantamento censitário e a prevalência da mansonelose em área da divisa do município de Lábrea e Canutama em aproximadamente 380 pessoas, para realizar a continuação deste projeto em 2016, utilizando agora um placebo, e randomizando a amostra em um ensaio clínico duplo-cego fase III, para melhor explicar alguns aspectos da clínica desta parasitose, utilizando e comparando outras técnicas de diagnóstico como o PCR, FMP e gota espessa.

6 CONCLUSÕES

- O fármaco ivermectina mostrou-se eficaz para eliminação da microfilaremia na dose preconizada, mantendo o *clearence* da parasitemia por um (1) ano.
- O fármaco utilizado (ivermectina) mostrou-se seguro para uso em larga escala para a mansonelose por prescrição médica, pois os efeitos adversos não foram severos.
- O fármaco proporcionou diminuição importante dos sintomas dos pacientes após o tratamento.
- O método de diagnóstico utilizado (FMP) mostrou-se factível de ser empregado nas condições de campo tanto para diagnóstico como para seguimento.
- A prevalência da parasitose encontra-se com taxas altas, inclusive na população jovem e com tendência de aumento com o aumento da idade e do tempo de exposição.
- As características clínicas apresentadas neste estudo, embora necessitem de um estudo clínico-epidemiológico mais robusto, não demonstraram alguns sintomas clássicos dos estudos anteriores, como febre, adenomegalia e "frieza em membros".

7 PERSPECTIVA DE CONTROLE

Para um futuro controle da mansonelose, todos os eixos devem ser abordados de maneira equânime e abrangente, desde os seus aspectos em vigilância epidemiológica (notificação compulsória nos municípios afetados), abordagem clínica, avaliação e implementação de métodos diagnósticos/verificação de controle, pesquisa de prováveis reservatórios como os primatas, pesquisa de outras drogas ou associações para novos tratamentos, controle de vetores, verificação das taxas de infecção e infectividade nos simulídeos, medidas de tratamento em massa (MDA - *Mass Drug Administration*) e medidas educativas que vislumbrem todo o conhecimento e fluxo de conhecimento para melhor esclarecer essa patologia. Posto isto, será possível maior exatidão nos dados em relação à prevalência, confirmação de novos casos, registros individuais, terapêutica definida, fluxograma de atendimento e exames necessários. Finalizando com as análises de seus indicadores (epidemiológicos e operacionais), que contribuirão com melhor caracterização da distribuição e perfil nosológico da doença.

As medidas de atuação pelas características específicas dessa região devem ser flexíveis e baseadas nas características epidemiológicas locais, levando-se em consideração o acesso no sistema único de saúde. Em relação aos treinamentos dos agentes comunitários de saúde e das equipes do programa de saúde da família, que deverão estar ambientadas para as características peculiares amazônicas.

Em relação aos métodos diagnósticos, a implantação da técnica de membrana de policarbonato realizada neste trabalho, é extremamente factível, tanto pela técnica, quanto pela sua aplicação em campo e baixo custo. Aliado a uma melhora de pelo menos 100% na sensibilidade em relação à microscopia óptica (gota espessa ou esfregaço), corroborando para a sua aplicação o fato do homem até o momento ser o único reservatório de impacto epidemiológico dessa parasitose e nesse caso, quanto maior a sensibilidade do método, maior será o impacto na cadeia de transmissão da mansonelose, pois se trata o indivíduo/reservatório precocemente.

Incentivos à pesquisa de outros reservatórios e a ecologia dos vetores como taxa de infectividade ou taxa de infecção em conjunto com seus aspectos sazonais, assim como ensaios clínicos que avaliarão a ivermectina com outros anti-helminticos e placebos e / ou o aprimoramento de PCR e PCR *real time* poderão esclarecer melhor a sintomatologia clínica em desenhos cegos e randomizados.

8 DIFICULDADES ENCONTRADAS

- Descaso do sistema de saúde local, falta de uma política estadual e federal para a patologia;
- Longa distância percorrida via fluvial e acesso (deslocamento) ao município de Lábrea apenas por via aérea;
- Mobilidade populacional dificultando o acompanhamento da amostra e logística durante os cortes do estudo diminuindo a amostra inicial;
- Intensa atividade hematofágica dos simulídeos;
- Freqüentes problemas de mecânica no barco, lanchas e veículos.

REFERÊNCIAS[1]

ADAMI, Y. L.; RODRIGUES, G.; ALVES, M. C.; MORAES, M. A. New records of *Mansonella ozzardi*: a parasite that is spreading from the state of Amazonas to previously uninfected areas of the state of Acre in the Purus River region. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 87-92, 2014.

ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission.** 2nd ed. New York: CABI Publishing, 2000. 650 p.

AUGUSTIN, D. L. Filariasis. In: GRADWOHL, R. B. H**. Clinical tropical medicine**. Sant Louis: Mosby, 1951. p. 871-873.

AZIZ, M. A.; DIALLO, S.; DIOP, I. M.; LARIVIERE, M.; PORTA, M. Efficacy and tolerance of ivermectin in human onchocerciasis. **Lancet**, v. 2, p. 171-173, 1982.

BAIN, O. Evolutionary relationships among filarial nematodes. In: KLEI, T. R.; RAJAN, T. V. (Ed.). **World Class Parasites:** the filaria. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002. v. 5, p. 21–29.

BAIN, O.; MUTAFCHIEV, Y.; JUNKER, K.; GUERRERO, R.; MARTIN, C.; LEFOULON, E.; UNI, S. Review of the genus *Mansonella Faust*, 1929 sensu lato (Nematoda: Onchocercidae), with descriptions of a new subgenus and a new subspecies**. Zootaxa,** v. 3918, n. 2, p. 151–193, 2015.

BAMBA, S.; BARRO-TRAORÉ, F.; LIANCE, M.; CHEMLA, C.; SANOU, C. da O.; GUIGUEMDÉ, T. R. Vaginal localisation of *Mansonella perstans*: report of a case at the University Hospital of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. **Pan. Afr. Med. J.**, v. 12, n. 47, 2012.

BARROS, M. Tropical climate and endemisms. **Est. Av.**, v. 20, p. 297-306, 2006.

BARTOLONI, A.; CANCRINI, G.; BARTELESI, F.; MARCOLIN, D.; ROSELLI, M.; ARCE, C. C.; HALL, A. I. *Mansonella ozzardi* infection in Bolívia: prevalence and clinical association in the Chacon region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 61, p. 830-833, 1999.

BASANO, S. A.; CAMARGO, J. S. A. A.; VERA, L. J. S.; VELASQUES, S. N.; OGAWA, G. M.; MEDEIROS, J. F.; CAMARGO, L. M. A. Investigation of the occurrence of *Mansonella ozzardi* in the State of Rondônia, Western Amazonia, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasilia, v. 44, n. 5, p. 600-603, 2011.

BASANO, S. A.; FONTES, G.; MEDEIROS, J. F.; CAMARGO, J. S. A. A.; VERA, L. J. S.; ARAÚJO, M. P. P.; PARENTE, M. S. P.; FERREIRA, R. G. M.; CRISPIM, P. T. B.; CAMARGO, L. M. A. Sustained clearance of *Mansonella ozzardi* infection after treatment with Ivermectin in the Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 90, n. 6, p. 1170–1175, 2014.

[1] De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. *Mansonella ozzardi* (Mansonelíse ou Mansonelose). IN CAMARGO, L. M. A. (Ed.). **Guia de parasitologia médica**. TereArt, 2014. Cap. 27. p. 285-289.

BATISTA, D.; OLIVEIRA, W. R.; RABELLO, V. D. Estudo da Patogenicidade da *M. ozzardi* e da Sintomatologia da Mansonelose. **Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo**, v. 2, n. 5, p. 281-289, 1960.

BIAGI, F. F. Observaciones sobre mansonelosis em la província de Yucatan I. Frecuencia. **Medicine**, v. 36, p. 521-526, 1956.

BOTTO, C.; ARANGO, M.; YARZÁBAL, L. Onchocerciasis in Venezuela: prevalence of microfilaraemias in Amerindians and morphological characteristics of microfilariae from upper Orinico focus. **Tropenmed. Parasitol.**, v. 35, p. 167-173, 1984.

BOUYOU-AKOTET, A. M.; MOUSSAVOU BOUSSOUGOU, M. N.; OVONO-ABESSOLO, F.; OWONO-MEDANG, M.; KOMBILA, M. Influence of *Mansonella perstans* microfilaraemia on total IgE levels in Gabonese patients co-infected with *Loa loa***. Acta Trop.**, v. 131, p. 11-15, 2014.

BRANCO, B. C.; CHAMON, W.; BELFORT, R.; BELFORT JUNIOR, R.; COSTA, A. J. A. Achados Oculares Entre Habitantes do Município de Pauini e Possível Associação entre Lesões Corneanas e Mansonelose na Amazônia. **Arq. Bras. Oftalm.**, v. 6, n. 6, p. 674-682, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Filariose linfática**: manual de coleta de amostrasbiológicas para diagnóstico de Filariose linfática por *Wuchereria bancrofti*. Brasília, DF, 2008.

BRUMPT, E. **Précis de parasitologia**. Ed. Paris Masson, 6ª ed., v. 1, 1949, p. 930-993.

CASIRAGHI, M.; FAVIA, G.; CANCRINI, G.; BARTOLONI, A.; BANDI, C. Molecular identification of *Wolbachia* from the fillarial nematode *Mansonella ozzardi*. **Parasitol. Res.**, v. 87, p. 417-420, 2001.

CAMPOS, J. R. M.; BARBAS, C. S. V.; FILOMENO, L. T. B.; FERNANDEZ, A.; MINAMOTO, H.; BARBAS FILHO, J. V.; JATENE, F. B. Human pulmonary dirofilariosis, analysis of 24 cases from São Paulo, Brazil. **Chest J.,** v. 112, p. 729-733, 1997.

CANGA, A. G.; PRIETO, A. M. S.; LIÉBANA, M. J. D.; MARTÍNEZ, N. F.; VEGA, M. S.; VIEITEZ, J. J. G.; The Pharmacokinets and interactions of ivermectin in humans – A mini-review**. The AAPS J.**, v. 10, n. 1, 2008.

CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Simulídeos:** Programa Estadual - Rio Grande do Sul, Brasil:Guia para orientação aos municípios sobre manejo integrado, controle e gestão de insetos da família simuliidae (Díptera, Nematocera) no Rio Grande do Sul. Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul Porto Alegre, 2006.

CERQUEIRA, N. L. Sobre a transmissão da *M. ozzardi*. **J. Bras. Med.**, v. 1, p. 885-914, 1959.

CHULARERK, P.; DESOWITZ, R. S. A simplified menbrane filtration techinique for the diagnosis of mecrofilaremia. **J. Parasitol.**, v. 56, p. 623-624, 1970.

COBO, F.; CABEZAS-FERNÁNDEZ, M. T.; SALAS-CORONAS, J.; CABEZA-BARRERA, M. I.; VÁZQUEZ-VILLEGAS, J.; SORIANO-PÉREZ, M. J. Filariasis in Sub-Saharan Immigrants Attended in a Health Area of Southern Spain: Clinical and Epidemiological Findings. **J. Immigr. Minor Health**, v. 17, p. 306-309, 2015.

COHEN, J. M. Acometimento ocular em pacientes com mansonelose. **Arq. Bras. Oftalm.**, v. 61, n. 6, p. 674-682, 2007.

COULIBALY, Y. I.; BENOIT, D.; DIALLO, A. A.; LIPNER, E. M.; DOUMBIA , S. S.; COULIBALY, S. Y.; KONATE, S.; DIALLO, D. A.; YALCOUYE, D.; KUBOFCIK, J.; DOUMBO, O. K.; TRAORE, A. K.; KEITA, A. D.; FAY, M. P.; TRAORE, S. F.; NUTMAN, T. B.; KLION, A. D. A randomized trial of doxycycline for *Mansonella perstans* infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 361, n. 15, p. 1448-1458, 2009.

CONFALONIERI, U. E. C. Saúde na Amazônia: um modelo conceitual para a análise de paisagens e doenças. **Est. Av.**, v. 19, n. 53, p. 221-236, 2005.

COOK, G. C. Patrick Manson (1844-1922) FRS: Filaria (Mansonella) perstans and sleeping sickness (African trypanosomiasis). **J. Med. Biogr.**, v. 20, n. 2, p. 69, 2012.

COSTA, O. R. Contribuição ao conhecimento da filariose na Amazônia. **Rev. Fund. SESP,** v. 8, p. 329-422, 1956.

CROSSKEY, R. W. **The natural history of blackflies.** New York: Wiley, 1990.

CROSSKEY, R. W.; HOWARD, T. M. A revised taxonomic and geographical inventory of world blackflies (Diptera: Simuliidae). **The Natural History Museum**. London. p. 82. Disponível em: <http://www.nhm.ac.uk/entomology/projects/blackfl ies/Inventory.pdf> Acesso em: 25 set. 2010.

DANTUR JURI, M. J.; AYBAR1, C. A. V.; ORTEGA, E. S.; GALANTE, G. B.; ZAIDENBERG, M. O. *Plasmodium vivax* and *Mansonella ozzardi* co-infection in north-western Argentina. **Malar. J.,** v. 17, n. 12, p. 248, 2013.

D'ANDRETTA JR.; PIO DA SILVA, C.M.; KAMEYANA, F. Ocorrência da mansonelose entre índios do alto Xingu. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 3, n. 11, 1969.

DEANE, M. P. Sobre a incidência de filárias humanas em Manaus, Estado do Amazonas. **Rev. Fund. SESP**, v. 2, n. 3, p. 849-858, 1949.

DEANE, L. M.; RACHOU, R. G.; LACERDA, N. B.; MARTINS, J. B. Alguns dados relativos à prevalência da *Mansonella ozzardi* no Brasil. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.,** v. 6, p. 219–224, 1953.

DEEKS, J. J.; DINNES, J.; D'AMICO, R.; SOWDEN, A. J.; SAKAROVITCH, C.; SONG, F. Evaluating non-randomised intervention studies. **Health. Technol. Assess.**, v. 7, p. 1–173, 2003.

DEGESE, M. F.; CABRERA, M. G.; KRIVOKAPICH, S. J.; IRAZU, L. E.; RODRÍGUEZ, M. A.; GUARNERA, E. A. Contribution of the PCR assay to the diagnosis of *Mansonella ozzardi* in endemic areas of Argentina. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 97-100, 2012.

DE CARLI, G. A. **Parasitologia clínica - seleção de métodos e téccnicas de laboratório para o diagnóstico de parasitoses humanas.** São Paulo: Ed. Atheneu, 2001.

DOLO, H.; COULIBALY, Y. I.; DEMBELE, B.; KONATE, S.; COULIBALY, S. Y.; DOUMBIA, S. S.; DIALLO, A. A.; SOUMAORO, L.; COULIBALY, M. E.; DIAKITE, S. A.; GUINDO, A.; FAY, M. P.; METENOU, S.; NUTMAN, T. B.; KLION, A. D. Filariasis attenuates anemia and proinflammatory responses associated with clinical malaria: a matched prospective study in children and young adults. **PLoS Negl. Trop. Dis**., v. 6, n. 11, 2012.

DREYER, G. Diagnóstico parasitológico da filariose bancroftiana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. v. 27, p. 162-168, 1994. Suppl. 4.

DREYER,G; COELHO, G. FL: Doença potencialmente eliminável (nota). **Cad. Saúde Publ.**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 3, p. 537-543, 1997.

EVANS, D. S.; ALPHONSUS, K.; UMARU, J.; EIGEGE, A.; MIRI, E.; MAFUYAI, H.; GONZALES-PERALTA, C.; ADAMANI, W.; PEDE, E.; UMBUGADU, C.; SAKA, Y.; OKOEGUALE, B.; RICHARDS F. O. Status of Onchocerciasis transmission after more than a decade of mass drug administration for onchocerciasisand lymphatic filariasis elimination in central Nigeria: challenges in coordinating the stop MDA decision. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 18, n. 8, p. 311, 2014.

FISCHER, P. BUTTNER DW, BAMUHIIGA J, WILLIUANS SA. Detection of the filarial parasite *Mansonella streptocerca* in skin biopsies by nested polymerase chain reaction-based assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 58, p. 816-820, 1998.

FISCHER, P.; TUKESIGA, E.; BÜTTNER, D. W. Long term suppression of *Mansonella streptocerca* microfilariae after treatment with ivermectina.**The J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 1403-1405, 1999.

FOKOM-DOMGUE, J.; PION, S. D.; GOUNOUE, R.; AKAME, J.; NGUIPDOP-DJOMO, P.; TWUM-DANSO, N. A.; THYLEFORS, B.; BOUSSINESQ, M.; KAMGNO, J. Absence of an association between *Plasmodium falciparum* infection and post-ivermectin loa-related non-neurologic serious adverse events. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 90, n. 2, p. 335-338, 2014.

FONTES, G. **Aspectos epidemiológicos da filariose linfática causada pela *Wuchereria bancroft* no Estado do Alagoas.** Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.

FONTES, G.; ROCHA, E. M. M. *Onchocerca volvulus* e outros filarídeos humanos. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana**. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005a. cap. 36. p. 309-316.

FONTES, G.; ROCHA, E. M. M. Filariose linfática. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana**. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005b. cap. 35, p. 299-308.

FORMICA, S.; BOTTO, C. Filariasis focus due to *Mansonella ozzardi* and *Mansonella perstants* in the Amazon Federal Territory of Venezuela. **J. Trop. Med. Hyg.,** v. 93, p. 160-165, 1990.

FRANÇA, M. S. **Mansonelose no Estado do Amazonas:** contribuição ao estudo clínico e epidemiológico. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1985.

GARRIDO, C.; CAMPOS, M. First report of presumed parasititic keratitis in indians from the Brazilian Amazon. **Cornea.,** v. 19, n. 6, p. 817-819, 2000.

GODOY, G. A.; VOLCAN, G. S.; MEDRANO, C. E.; TEIXEIRA, A.; MATHEUS, L. *Mansonella ozzardi* infections in Indians of the southwestern part of the State of Bolívar, Venezuela. **Amer. J. trop. Med. Hyg.,** v. 29, p. 373-376, 1980.

GONZÁLEZ, A. A.; CHADEE, D. D.; RAWLINS, S. C. Ivermectin treatment of mansonellosis in Trinidad. West Indian. **Med. J.**, v. 48, p. 231–234, 1999.

HAWKING, F. Diethylcarbamazine and new copounds for the treatment of filariasis. **Adv. in Pharmacol.**, v. 16, p. 129-194, 1979.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.pphp?.cadnum=130240>. 2014.

JÖRG, M. E. Filariasis por *Mansonella ozzardi* (Manson 1897) Faust 1929 en la Argentina. **Pre. Méd. Arg.,** v. 70, n. 5, p. 181-192, 1983.

KIZITO, D.; TWEYONGYERE, R.; NAMATOVU, A.; WEBB, E. L.; MUHANGI, L.; LULE, S. A.; BUKENYA, H.; COSE, S.; ELLIOTT, A. M. Factors affecting the infant antibody response to measles immunisation in Entebbe-Uganda. **BMC Public Health.**, v. 1, n. 13, p. 619, 2013.

KOROMA, J. B.; SESAY, S.; SONNIE, M.; HODGES, M. H.; SAHR, F.; ZHANG, Y.; BOCKARIE, A. J. Impact of Three Rounds of Mass Drug Administration on Lymphatic Filariasis in Areas Previously Treated for Onchocerciasis in Sierra Leone. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 6, 2013.

KORTE, L. F. **Filariose bancroftiana na Amazônia Ocidental brasileira**: implicações para transmissão e controle. 2013. 107 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2013.

KOZEK, J.; D'ALESSANDRO, A.; SUVA, J.; NAVARRETE, S. Filariasis in Colombia: Prevalence of Mansonellosis in the Teenage and Adult Population of the Colombian Bank of the Amazon, Comisaría del Amazonas. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 31, n. 6, p. 1131-1136, 1982.

KOZEK, W. J.; PALMA, G.; HENAO, A.;GARCÍA, H.; HOYOS, M. Filariasis in Colombia: prevalence and distribuition of *Mansonella ozzardi* and *Mansonella* (= *Dipetalonema*) *pestans* infections in the Comisaría del Guainía. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, p. 379-384, 1983.

KOZEK, J.; PALMA, G.; VALENCIA, W.; MONTALVO, M. C.; SPAIN, J. Filariasis in Colombia: Prevalence of *Mansonella Ozzardi* in the Departamento de Meta, Intendencia Del Casanare, and Comisaría Del Vichada. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 33, n. 1, p. 70-72, 1984.

KROLEWIECKI, A. J.; CAJAL, S. P.; VILLALPANDO, C.; GIL, J. F. Invermectin-related adverse clinical events in patients treated for *Mansonella ozzardi* infections. **Rev. Arg. Microb.,** v. 43, p. 48–50, 2011.

KYELEM, D.; SANOU, S.; BOATIN, B.; MEDLOCK, J.; COULIBALY, S. Impact of long-term ivermectina (Mectizan) on *Wuchereria bancrofti* and *Mansonella perstans* infections in Burkina Faso strategic and policy implications. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 97, p. 827-838, 2003

KYELEM, D.; MEDLOCK, J.; SANOU, S.; BONKOUNGOU, M.; BOATIN, B.; MOLYNEUX, D. H. Impact of long-term (14 years) bi-annual ivermectina on *Wuchereria bancrofti* microfilaraemia**. Trop. Med. Inter. Health**, v. 10, n. 10, 2005.

LACERDA, N. B.; RACHOU, R. G. Filarioses humanas nas sedes municipais do Estado do Amazonas e territórios do Acre, Guaporé Rio Branco. **Rev. Bras. Malar. Doenças Trop.**, v. 8, p. 437-442, 1955.

LACERDA, N. B.; RACHOU, R. G. Filarioses humanas nas sedes municipais do Estado do Amazonas e territórios do Acre, Guaporé Rio Branco. **Rev. Bras. Malar. Doenças Trop.**, v. 6, p. 343-348, 1956.

LAGE, H. A. Mansenolose em índios do grupo Aruak, do rio Içana. **O Hospital,** v. 66, 1964. (557-64)

LAURENCE, B.; SIMPSON, M. Cephalic and pharyngeal structures in microfilariae revealed by staining. **J. Helminthol.,** v. 42, p. 309–330, 1968.

LAWRENCE, N. D.; ERDTMANN, B.; PEET, J. W.; NUNES DE MELLO, J. A.; HEARL, G. R.; JAMES, V.; NEEL, M. D.; SALSANO, F. M. Estudos epidemiológicos entre populações indígenas da Amazônia. II. Prevalência da microfilaremia de *M. ozzardi*: comparação de dois métodos de diagnótico. **Acta Amaz.**, v. 10, p. 763-769, 1980.

LECHNER, C. J.; KOMANDER, K.; HEGEWALD, J.; HUANG, X.; GANTIN, R. G.; SOBOSLAY, P. T.; AGOSSOU, A.; BANLA, M.; KÖHLER, C. Cytokine and chemokine responses to helminth and protozoan parasites and to fungus and mite allergens in neonates, children, adults, and the elderly. **Immun. Ageing.,** v. 10, n. 1, p. 29, Jul. 2013.

LEITE, A. B. **Comparação de diferentes técnicas para o diagnóstico laboratorial da filariose linfática bancroftiana.** Trabalho de Conclusão de Curso - Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Alagoas, Macéio, 2003.

LEITE, A. B.; FONTES, G.; BARROS, H. C. S.; LIMA, A. R. V.; ROCHA, A.; ALVES, S.; ROCHA, E. M. M. Comparação de técnicas laboratoriais para o diagnóstico de filariose linfática causada pela *Wuchereria bancroft* (cobbold, 1877). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**., v. 38, p. 471, 2005. Suppl. 1.

LIGHTNER, L. K.; EWERT, A.; CORREDOR, A.; SABOGAL, E. A Parasitologic Survey for *Mansonella Ozzardi* in the Comisaría Del Vaupés, Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 29, n. 1, p. 42-45, 1980.

MANSON, P. On certain new species of nematode haematozoa occurring in America. **Br. Med. J.,** v. 2, p. 1837-1838, 1897.

MARCONDES, C. B. Ceratopogonidae. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana.** 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. cap. 45. p. 373-375.

MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária.** São Paulo: Atheneu, 2001.

MARCOS, L. A.; ARROSPIDE, N.; RECUENCO, S.; CABEZAS, C.; WEIL, G. J.; FISCHER, P. U. Genetic characterization of atypical Mansonella (*Mansonella ozzardi*) microfilariae in human blood samples from Northeastern Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., v. 5, n. 87, 2012. 87(3): 491-4

MARINKELLE, C. J.; GERMAN, E. Mansonelliasis in the Comisaría del Vaupés of Colombia. **Trop. Geogr. Med.**, v. 22, p. 101-111, 1970.

MARKELL, E. K.; VOGE, M. **Medical parasitology**. 5. ed, Saunders Company, 1981.

MAS, J.; ASCASO, C.; ESCARAMIS, G.; ABELLANA, R.; DURAN, E.; SIMA, A.; SÁNCHEZ, M. J.; NKOGO, P. R.; NGUEMA, R.; UNTORIA, M. D.; ECHEVERRIA, M. A.; ARDEVOL, M. M.; DE JIMÉNEZ, A. M. T. Reduction in the prevalence and intensity of infection in *Onchorcerca volvulus* microfilariae according to ethnicity and community after 8 years of ivermectin treatment on the island of Bioko, Equatorial Guinea. **Trop. Med. and Inter. Health**, v. 2, n. 7, 2006.

MARTINS, M.; PESSOA, F. A. C.; MEDEIROS, M. B.; ANDRADE, E. V.; MEDEIROS, J. F. *Mansonella ozzardi* in Amazonas, Brazil: prevalence and distribution in the municipality of Coari, in the middle Solimões River. **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 246-253, 2010.

McMCOY, O. R. The Occurrence of *Microfilaria Ozzardi* in Panama. **Am. J. Trop. Med Hyg.**, 1933.

MEDEIROS, J. F.; PY-DANIEL, V.; BARBOSA, U. C.; FARIAS, E. S. Epidemiological studies of *Mansonella ozzardi* (Nematoda, Onchocercidae) in indigenous communities of Pauiní municipality, Amazonas, Brazil. **Acta Amaz.**, v. 37, p. 241-245, 2007.

MEDEIROS, J. F. et al. Current profile of Mansonella Ozzardi (Nematoda: Onchocercidae) in communities along the Ituxi River, Labrea municipality, Amazonas Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 409-411, 2008.

MEDEIROS, J. F.; PY-DANIEL, V.; BARBOSA, U. C.; IZZO, T. J. M. ozzardi in Brazil: prevalence of infection in riverine communities in the Purus region, in the state of Amazonas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 74-80, 2009a.

MEDEIROS, J. F.; PY-DANIEL, V.; BARBOSA, U. C.; ULYSSES, C.; OGAWA, G. M. Ocorrência da Mansonella ozzardi (Nematoda, Onchocercidae) em comunidades ribeirinhas do rio Purus, Município de Boca do Acre, Amazonas, Brasil. **Cad. Saúde Púb.**, ENSP, v. 25, p. 1421-1426, 2009b.

MEDEIROS, J. F.; PESSOA, F. A. C.; MARTINS, M. Importância do método de gota espessa de sangue no diagnóstico de filárias simpátricas no Amazonas, Brasil. **Acta Amaz.**, v. 40, p. 779-780, 2010.

MEDEIROS, J. F.; PY-DANIEL, V.; BARBOSA, U. C. Prevalence of Mansonella ozzardi among riverine communities in the municipality of Lábrea, State of Amazonas, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**., v. 44, p. 186-190, 2011.

MEDEIROS, J. F.; COSTA, C. A.; LIMA, A. M.; PESSOA, F.A.C. Mansonella ozzardi (Nematoda: Onchocercidae) in the riverine population of the Tefé River, State of Amazonia, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. (Impresso), v. 47, p. 113-115, 2014.

MINOPRIO, J. L.; JORG, M. E.; MARRELLI, V. R. *Mansonella ozzardi*, Faust 1929 (Paciente Infectado con madera procedente del norte argentino). **Boletin A. N. de Med.,** v. 66, p. 415-421, 1988.

MONTEIRO, H. A. O. **Avaliação da diversidade de insetos hematófagos da subordem nematocera e de vertebrados silvestres: transmissão de arbovírus na área de influência do projeto salobo, Carajás, Pará**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

MONTESTRUC, E.; BLACHE, R.; LABORDE, R. The Action of 1-Diethyl-carbamyl 4-methylpiperazine (Hetrazan or Notezine) on *Mansonella ozzardi*. **Bull. Soc. Pathol. Exot.,** v. 43, 1950.

MORAES, M. A. P. Contribuição ao Estudo da mansonelose no Estado do Amazonas. **O Hosp.**, v. 54, n. 6, p. 887-892, 1958.

MORAES, M. A. P. Estudo sobre a variação nictemeral da microfilaremia de *M. ozzardi*. **O Hosp.**, v. 56, n. 5, p. 869-873, 1959.

MORAES, M. A. P.; ALMEIDA, M. M. R.; LOVELACE, K. J.; CHAVES, G. M.*Mansonella ozzardi* entre índios Ticunas do estado do Amazonas, Brasil. **Bol. Ofic. Sanit. Panam.,** v. 85, p. 16-25, 1978.

MORAES, M. A. P.; SHELLEY, A. J.; DIAS, A. P. A. L. *Mansonella ozzardi* no Território Federal de Roraima,Brasil.Distribuição e achado de um novo vetor naárea do Rio Surumu. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 395-400, 1985.

MORALES-HOJAS, R.; POST, R. J.; SHELLEY, A. J.; MAIA-HERZOG, M.; COSCARÓN, S.; CHEKE, R. A. Characterisation of nuclear ribosomal DNA seqüences from *Oncocerca volvulus*and *Mansonella ozzardi* (Neumatoda: filariodea) and development of a PCR based method for their detection in skin biopsies. **Int. J. Parasitol,** v. 31, p. 169-177, 2001.

NAMPIJA, M.; APULE, B.; LULE, S.; AKURUT, H.; MUHANGI, L.; WEBB, E. L.; LEWIS, C.; ELLIOTT, A. M.; ALCOCK, K. J. Effects of Maternal Worm Infections and Anthelminthic Treatment during Pregnancy on Infant Motor and Neurocognitive Functioning. **J. Int. Neuropsychol Soc.**, v. 18, n. 6, p. 1019-1030, Nov. 2012.

NATHAN, M. B. *Culicoides phlebotomus*, a vector of *M. ozzardi* in costal north Trinidad, West Indies. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, n. 4, p. 436-437, 1978.

NATHAN, M. B.; TIKASINGH, E. S.; MUNROE, P. Filariasis in Amerindians of Western Guyana with observations on transmission of *Mansonella ozzardi* by a *Simulium* species of the *amazonicum* group. **Tropenmed. Parasitol.**, v. 33, 1982. 33(4):219-22

NATHAN, M.; STROOM, V. Prevalencia de *Wulchereria bancrofti* in Georgetown, Guyana. **Bol. Sanit. Panam.**, v. 110, n. 1, 1991. 24(3):301-6, 1990

NATHAN, M. B.; BARTHOLOMEW, C. F.; TIKASINGH, E. S. The detection of *Mansonella ozzardi* microfilariae in the skin and blood with a note on the absence of periodicity. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.,** v. 72, n. 4, p. 420-422, 1978.

NDIBAZZA, J.; WEBB, E. L.; LULE, S.; MPAIRWE, H.; AKELLO, M.; ODURU, G.; KIZZA, M.; AKURUT, H.; MUHANGI, L.; MAGNUSSEN, P.; VENNERVALD, B.; ELLIOTT, A. Associations between maternal helminth and malaria infections in pregnancy, and clinical malaria in the offspring: a birth cohort in Entebbe, Uganda. **J. Infect. Dis.**, Jul. 2013. 208(12):2007-16

NELSON, G. S.; DA VIES, J. B. Observations on *Mansonella ozzardi* in Trinidad. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.,** v. 70, p. 16-17, 1976.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana.** 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

NUTMAN, T. B.; NASH, T. E.; OTTESEN, E. A. Ivermectin in the successful treatment of a patient with *Mansonella ozzardi* infection. **J. Infect. Dis.**, v. 156, n. 4, p. 662-665, 1987.

NUTMAN, T. B. In: **Principles and pratice of clinical parasitology.** Gillespie, S. H.; Pearson, R. D. 2001.

OGAWA, G. M.; CRUZ, E. N.; CUNHA, P. N. A.; CAMARGO, L. M. A. Canine heartworm disease in Porto Velho: first record, distribution map and occurrence of positive mosquitoes. **Rev. Bras. Parasitol. Vet. (Online)**, v. 22, p. 559-564, 2013.

OLIVEIRA, W. R. Infestação por filárias em habitantes de Vila Pereira, território de Roraima, Brasil. **Rev. Inst. Med. J. Trop. de São Paulo**, v. 5, n. 6, p. 287-288, 1963.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE. **Quadro de referência de um programa regional para o controle das geohelmintoses e esquistossomíase na América.** Santo Domingo, República Dominicana: OPS/DPC/CD/318/04, 2003.

ORIHEL, T. C. Infections with Dipetalonema pertans and *Mansonella ozzardi* in the aboriginal Indians of Guyana. **Amer. J. trop. Med. Hyg.**, v. 16, p. 628-635, 1967.

ORIEL, T. C.; EBERHARD, M. L. *Mansonella ozzardi*: a redescription with comments on its taxonomic relationships. **Amer. J. trop. Med. Hyg.,** v. 31, n. 6, p. 1142-1147, 1982.

OTTESEN, E. A. Filariasis and tropical eosinophilia. In: WARREN, K. S.; MAHMOUD, A. A. F. **Tropical and geographical medicine.** New York: McGraw Hill, 1984. p. 390-412.

PARTONO, F.; IDRIS, K. N. Some factors influencing the lossof micrifilariae from stained thick blood films. **South. Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 8, n. 2, p. 158-164, 1977.

PEPINELLI, M.; TRIVINHO-STRIXINO, S.; HAMADA, N. Description of *Simulium* (*Chirostilbia*) Friedlanderi Py-Daniel, 1987 (INSECTA: DIPTERA: SIMULIIDAE) female**. Biota Neotropical**, v. 3, n. 2, p. 1-6, 2003.

PRICHARD, R. K.; BASÁÑEZ, M. G.; BOATIN, B. A.; McCARTHY, J. S.; GARCÍA, H. H.; YANG, G. J.; SRIPA, B.; LUSTIGMAN, S. A research agenda for helminth diseases of humans: intervention for control and elimination. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, e1549, 2012.

RACCURT, C.; LOWRIE, R. C.; McNEELEY, D. F. Observations on *Mansonella ozzardi* in Haiti I. Epidemiological survey. **Am. J. Trop. Med. Hyg,** v. 29, p. 803-808, 1980.

RACCURT, C.; LOWRIE, R. C.; BONCY, J.; KATZ, S. P. *Mansonella ozzardi* in Haiti III. A comparision of the sensitivity of four sampling methods in detecting infections. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 31, p. 275-279, 1982.

RACHOU, R. G.; LACERDA, N. B.; SANTOS, D. **Inquérito hemoscópico para pesquisa de microfilárias em Boa Vista, Capital do Território de Rio Branco.** Apresentado ao XI Congresso Brasil Higiene, Curitiba, 1953.

RACHOU, R. G.; LACERDA, N. B. Hourly variation of microfilaraemia of *Mansonella ozzardi*. **Rev. Bras. Malariol. Doenc. Trop.,** v. 6, p. 343-348, 1954.

RACHOU, R. G. Conceito e programa de profilaxia da filariose bancroftiana no Brasil. **Rev. Bras. Malariol. D. Trop.**, v. 12, p. 11-40, 1960.

RAOULT, D. Doxycycline for *Mansonella perstans* infection. **N. Engl. J. Med.,** v. 362, n. 3, p. 272-273, 2010.

REY, L. **Parasitologia.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIZZO, A.; RIZZO, J. A. Pulmäo, filárias e eosinófilos. **J. Pneumol.,** v. 15, n. 1, p. 27-46, mar. 1989.

ROCHA, E. M. M.; FONTES, G. Diagnóstico da filariose linfática bancroftiana. **Rev. Patol. Trop.**, v. 29, n. 2, p. 161-173, 2000.

ROMITI, C. Filariasis in British Guyana. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 28, p. 613-626, 1935.

SAUTET, J. Parasitisme par la Filária ozzardi Manson 1987 a l´ile de la Desirade ET plus especialement a la leprosérie. **Bull. Soc. Path. Exot.**, v. 42, 1949.

SHELLEY, A. J.; SHELLEY, A. Further evidence for the transmission of *Mansonella ozzardi* by Simulium amazonicum in Brazil. **Annals Trop. Med. Parasitol.**, v. 70, p. 213-217, 1976.

SHELLEY, A. J.; LUNA, D. A. P. A.; MORAES, M. A. P. Simulium species of amazonicum group as vectors of *M. ozzardi* in the Brazilian Amazon. **Trans. Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg.**, v. 74, n. 6, p. 784-788,1980.

SPENCER, P.; VANDEMAELE, K.; RICHER, M.; PALMER, V. S.; CHUNGONG, S.; ANKER, M.; AYANA, Y.; OPOKA, M. L.; KLAUCKE, B. N.; QUARELLO, A.; TUMWINE, J. K. Nodding syndrome in Mundri county, South Sudan: environmental, nutritional and infectious factors. **Afr. Health Sci.**, v. 13, n. 2, p. 183-204, Jun, 2013.

STRACHAN, T.; READ, A. **Human molecular genetics**. 2. ed. New York: Wiley-Liss, 1999.

STRONG, H. P. **Diagnosis prevention and treatment of tropical diseases.** 7th ed. Philadelphia: Blakiston, 1945. v. 2, p. 1339-1340.

SURMONT, I.; LIU, L. X. Enteritis, eosinophilia, and Enterobius vermicularis. **Lancet**, v. 346, n. 8983, p. 1167, Oct. 1995.

TAVARES, A. M. **Estudo da infecção por *M. ozzardi*.** Dissertação (Mestrado) - Depto. Medicina. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 1981.

TAVARES, A. M.; NETO, F. Mansonelose. In: QUEIROZ LEÃO, R. N. (Ed.). **Doenças infecciosas e parasitárias. Enf. Amaz.,** 1997. p. 733-737.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos**. 3. ed. São Paulo. Atheneu, 2009.

TAVARES, A. M.; CHAVES, F. C.; SOARES, A. R.; MOURA, M. A. S. Filariose em Codajás - AM. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 34, 2002.

TIDWELL, M. A.; MUÑOZ, H. P. Development of *Mansonella ozzardi* in blackflies of the Simulium sanguineum group from eastern Vaupés, Colombia. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 29, p. 1209-1214, 1980.

UNDIANO, C. Importancia y actualizacion del nuevo concepto de la patogenicidade de la mansonelliasis. **Segundas Jornadas Argentinas de Entomoepide-miológicas Argentinas**, v. 2, p. 467, 1971.

UTTAH, E.; IBEH, D. C. Multiple filarial species microfilaraemia: a comparative study of areas with endemic and sporadic onchocerciasi. **J. Vector Borne Dis.**, v. 48, n. 4, p. 197-204, Dec. 2011.

VARGAS-HERRERA, J.; ARRÓSPIDE-VELASCO, N.; GUTIERREZ-GONZÁLEZ, S.; CELIS-SALINAS, J. C.; HUAMANÍ-SOLANO, D.; LOZA-HERMENEGILDO, L.; ELGEGREN-LAO, J.; ARMAS-MONTES, J.; BACA-PÉREZ, J.; CABEZAS, C. Report of four clinical cases of filariasis in Alto Nanay, Loreto. **Rev. Peru Med. Exp. Salud Pub.,** v. 30, n. 3, p. 506-511, Set. 2013.

VERA, L. J. S.; BASANO, S. A.; CAMARGO, J. S.; FRANÇA, A. K.; FERREIRA, R. G.; CASSEB, A. A.; MEDEIROS, J. F.; FONTES, G.; CAMARGO, L. M. Improvement of a PCR test to diagnose infection by *Mansonella ozzardi***. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 44, n. 3, p. 380-382, maio-jun. 2011.

VIANNA, L. M.; MARTINS, M.; COHEN, M. J.; COHEN, J. M.; BELFORT, R. J. *Mansonella ozzardi* corneal lesions in the Amazon: a cross-sectional study. **BMJ Open**., v. 27, n. 2, Jul. 2012.

VOLCAN, G. S.; MEDRANO, C. E.; GONZALEZ, R. **Aspectos epidemiológicos de las filariasis y de las parasitosis intestinales, en la Cuenca del Río Caroní. Sociedad Parasitológica Venezolana.** In: ENCUENTRO SOBRE PARASITOLOGIA Y MEDICINA TROPICAL, 3., Ciudad Bolívar, Venezuela, 1986.

WEIL, G. J.; LAMMIE, P. J.; WEISS, N. The ICT filariais test: a rapid format antigen test for diagnosis of brancroftian filariasis. **Parasitol. Today**, v. 13, p. 401-404, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vector control series *simulium* training and information guide**. Division of Control of Tropical Diseases, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Onchorcerciasis and its control report of a WHO expert committee on Onchorcerciasis control. **WHO Technical Report Series,** 852. Geneva: World Health Organization, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Pranchas para o diagnóstico de infecções por filárias.** Livraria Santos Editora Ltda, 2000.

ZHANG, Y.; MAcARTHUR, C.; MUBILA, L.; BAKER, S. Control of neglected tropical diseases needs a long-term commitment. **BMC MED.**, v. 8, n. 67, 2010.

OBRAS CONSULTADAS

ABRAHIM, C. M. M. **Mansonelose em populações do interior do Amazonas.** Dissertação (Mestrado) - Amazonas, 2004.

BAMBA, S.; BARRO-TRAORÉ, F.; LIANCE, M.; DA, O.; SANOU, C.; GUIGUEMDÉ, T. R. Mansonelliasis identified by a cervicovaginal smear at the university hospital center of Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). **Med. Sante Trop.**, 2013.

BARBOSA, C. L.; ALVES, L. C. Dirofilariose canina: situação atual do Brasil**. Rev. CFMV**, v. 37, p. 57-62, 2006.

BHALLA, D.; DUMAS, M.; PREUX, P. M. Neurological manifestations of filarial infections. **Handb. Clin. Neurol.,** v. 114, p. 235-242, 2013.

BOURGUINAT C.; PION, S. D. S.; KAMGNO, J.; GARDON, J.; DUKE, B. O. L.; BOUSSINESQ, M.; PRICHARD, R. K. Genetic selection of low fertile O*nchorcerca volvulus* by ivermectina treatment**. Plos Negl. Trop. Dis.,** v. 1, n. 1, p. 72, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância e eliminação da filariose linfática**. Secretaria de vigilância em saúde/departamento de vigilância epidemiológica – Brasília, 2009. P 80.

BUCKLEY, J. J. C. On the development, in *Culicoides furens* Poey, of Filaria (=*Mansonella)ozzardi* Manson. **J. Helminth.**, v. 12, p. 99-118, 1934.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **DPDX**: laboratory identification of parasites of public health concern. US Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>. Acesso em: set. 2010.

COSTA, C. A.; LIMA, A. M.; PESSOA, F. A. C**.** *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in the riverine population from Tefé River, Amazonia, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**., v. 47, p. 1-3, 2014.

DE LEY, P.; BLAXTER, M. A new system for Nematoda: combining mophorlogical characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. **Nematology Monographs and Perspectives,** v. 2, 2004.

DOWNES, B.; JACOBSEN, K. A systematic review of the epidemiology of Mansonelliasis. **African Journal of Infectious Diseases (AJID),** NorthAmerica, 4, dec. 2009. Disponível em: <http://journals.sfu.ca/africanem/index.php/AJID/article/view/987>. Acesso em: set. 2010.

DPD (LABORATORY IDENTIFICATION OF PARASITES OF PUBLIC HEALTH CONCERN). Foto de Microfilárias de *M. ozzardi* em esfregaço de gota espessa, coradas com Giemsa.
Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/Filariasis_il.htm>. Acesso em: set. 2010.

FISCHER, P.; BÜTTNER, D. W.; BAMUHIIGA, J.; WILLIAMS, S. A. Detection of the filarial parasite *Mansonella streptocerca* in skin biopsies by a nested polymerase chain rection-based assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 6, p. 816-820, 1998.

GALLEGO BERENGUER, J. **Manual de parasitologia:** morfologia y biologia de los parasitos de interés sanitário. Universitat de Barcelona, 2006.

GOLDMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 3. ed. 2001.

GONZALEZ, A. D.; CHADDE, S.; RAWLINS, D. Ivermectin treatment of mansonellosis in Trinidad. **West Indian Med. J.,** v. 48, n. 4, p. 231-234, 1999.

HIDRON, A.; GÁLVEZ, K.; MADRID, C.; VÉLEZ, A.; ARCILA, L. M.; PEREZ, J. C.; VÉLEZ, A. An incidental finding from a blood smear. **Clin. Infect. Dis.**, v. 55, n. 1, p. 155-156, Jul. 2012.

HOERAUF, A.; SPECHT, S.; BÜTTNER, M.; PFARR, K.; MAND, S.; FIMMERS, R.; MARFO-DEBREKYEI, Y.; KONADU, P.; DEBRAH, A. Y.; BANDI, C.; BRATTIG, N.; ALBERS, A.; LARBI, J.; BATSA, L.; TAYLOR, M. J.; ADJEI, O.; BÜTTNER, D. W. *Wolbachia* endobacteria depletion by doxycycline as antifilarial therapy has macrofilaricidal activity in onchocerciasis: a randomized placebo-controlled study**. Med. Microbiol. Immunol.,** v. 197, p. 295-311, 2008.

HOJAS, R. M.; POST, R. J**.** Regional genetic variation in the major sperm protein genes of Onchocerca volvulus and *M. ozzardi* (Nematoda: Filarioidea). **Inter. J. for Parasitol.,** v. 30, p. 1459-1465, 2000.

HOJAS, R. M. et al. Characterisation of nucear ribosomal DNA sequences from *Onchocerca volvulus* and *M. ozzardi* (Nematoda: Filarioidea) and development of A PCR-Based Method for their detection in skin biopsies. **Inter. J. for Parasitol.**, v. 31, p. 169-177, 2001.

KUBOFCIK, J.; FINK, D. L.; NUTMAN, T. B. Identification of Wb123 as an Early and Specific Marker of *Wuchereria bancrofti* Infection. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 12, Dec. 2012.

MEDEIROS, J. F.; PY-DANIEL, V. Seasonality, parity rates and transmission indices of *M. ozzardi* (Manson) (Nematoda: Onchocercidae) by Cerqueirellum argentiscutum (Shelley & Luna Dias) (Diptera: Simuliidae) in a lower Solimões river community, Amazonas, Brazil. **Acta Amaz.**, v. 34, n. 2, p. 201-207,2004.

MEDRANO, C. E. ; VOLCÁN, G. S.; GODOY, G. A. Mansonelosis em el área sur-oriental de la orinoquia venezolana. **Ver. Inst. Med. Trop**., São Paulo, v. 34, n. 1, p. 63-71, 1992.

MONSTRESTRUC, E.; BLACHE, R.; LABORDE, R. Action du 1-diethyl-carbamyl-piperazine sun filaria ozzardi. **Bull. Soc. Pthol. Éxot,** v. 43, p. 275-278, 1958.

MORAES, M. A. P. *M. ozzardi* Microfilariae In Skin Snips. **Trans. of the Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg.**, v. 70, n. 1, p. 16, 1976.

OLIVEIRA, M. C. **Validação de Anticorpos Monoclonais OG4C3 e AD12 no Diagnóstico da Filariose Brancrofitiana em Inquérito Populacional.** Dissertação (Mestrado) - Recife, PE, 2003.

OLIVEIRA, W. R. Filarioses humanas na cidade de Manaus. **O Hospital**, v. 562, p. 301-303,1961.

PY-DANIEL, V**.** Caracterização de dois novos subgêneros em Simuliidae (Diptera: Culicomorpha). **Neotrop. Amaz.,** v. 7, n. 2, p. 159-223,1983.

MEDEIROS, J. F. **Atividade hematofílica e de infecção natural de *Cerqueirellum argentiscutum* (Shelley & Luna Dias) (Diptera: Simuliidae) por *M. ozzardi* (Manson) (Nematoda: Onchocercidae) na comuinidade Porto do Japurá, Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil.** Tese (Doutorado) - Manacapuru, AM, 2002.

MEDEIROS, J. F.; PY-DANIEL, V.; PESSOA, F. A. C. Uma filaria pouco estudada no Brasil. **Ciência Hoje,** v. 39, n. 231, p. 68-70, 2006.

RAMIREZ-PEREZ, J. **Estudo sobre la morfologia de *Simulium metallicum* vectors de la oncocercosis humana en Venezuela.** Organizacion Panamericana de la Salud/Organizacion Mundial de la Salud, Publicación Científica, n. 338, 1977.

RAMIREZ-PEREZ, J.; RASSI, E.; RAMIREZ, A. Cinco nuevas espécies de *Simulium latreille*, 1802 (Diptera: Simuliidae) de la region amazônica de Venezuela. **Bol. de la Derec. de Malar. y Saneam. Amb.**, v. 17, p. 162-174,1977.

ROMAÑA, C.; WYGODZINSKY, P. Acerca de la transmissión de *Mansonella ozzardi* (Filiaria Tucumana Biglieri y Aráoz). **An. Inst. Med. region. Tucumán**, v. 3, p. 29-34, 1950.

REMONDEGUI, C.; SAFAROV, G.; RIPOLL, C. M.; ARCE DE HAMITY, M. G.; NEDER DE ROMAN, L. E.; ESQUIVEL, O. *Mansonella ozzardi:* estudio clinico epidemiologico de un foco endemico en la provincia de Jujuy. **Acta Infectol.,** v. 4, p. 3-13, 1988.

SERRÃO, M. L.; LABARTHE, N.; LOURENÇO, R. O. Vectorial competence of *Aedes aegypti* (linnaeus 1762) Rio de janeiro strain, to *Dirofilaria immitis* (leydi 1856). **Mem Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 5, p. 593-598, July 2001.

SASA, M. **Human filariasis:** a global survey of epidemiology and control. Tokyo: University of Tokyo Press, 1976.

SHELLEY, A. J. Simuliid blackflies (Diptera: Simuliidae) and Ceratopogonidae midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of *M. ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in Northern Argentina**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, 4, p. 451-458, 2001.

SCHMIDIT, G. D.; ROBERTS', L. S. **Foundations of Parasitology.** 5. ed. WCB. Brown Ublishers, 1996.

TAWILL, S. A. et al. Imunodiagnostic studies on *Onchocerca volvulus* and *Mansonella perstans* infections using a recombinant 33kD. **Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg,** v. 95, p. 171-173, 2001.

TIDWELL, M. A.; TIDWELL, M. H. P. Development of *M. ozzardi* in *Simulium amazonicum*, *S. argentiscutum* and *Culicoides insinuatus* from Amazonas, Colombia**. Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 3, n. 6, p. 1137-1141, 1982.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,_____
_____,

C.I.:_____e/ou
CPF_____,

fui informado e estou ciente e esclarecido a respeito da pequisa:"Estudo preliminar da redução da microfilaremia “in vivo” da Mansonella ozzardi com uso de ivermectina, Lábrea, Amazonas, Amazônia Ocidental, Brasil" , desenvolvida pela USP, INPA, UFSJ e Secretaria Municipal de Saúde de Lábrea com o apoio do Ministério da Saúde do Brasil.

Venho através deste informar que participei de uma palestra explicativa, ministrada por acadêmicos da Faculdade são Lucas, onde fui informado: que esta doença conhecida popularmente como FILARIOSE e é transmitida em nossa cidade pela picada do mosquito pium contaminada; sobre seus riscos à saúde humana e como evitar a contaminação; que seu diagnóstico será realizado através da pesquisa de embriões do verme em meu sangue, colhido por punção digital, que a colheita do sangue será realizada com o uso de **lanceta descartável**, numa lâmina de vidro previamente identificada **e que este procedimento não me oferecerá riscos ou desconfortos**; e ainda, que o resultado do exame, assim que possível, estará disponível na Secretaria Municipal de Saúde de Lábrea para que eu possa recebê-lo.

Fui informado, ainda: que os resultados dos exames serão **mantidos em sigilo**; que caso seja detectada a doença, um maior volume de material (sangue) será colhido, com uso de seringas e agulhas descartáveis para ser analisado; e que será realizado exame médico a fim de que **o tratamento seja imediatamente realizado por clínicos da equipe de pesquisadores, sendo que a pesquisaserá desenvolvida, sem qualquer custo para o paciente**.

Com a assinatura deste Termo autorizo a USP a conservar, sob sua guarda, soros que possam ser coletados, com minha prévia autorização, para serem usados em exames de laboratório, com objetivo futuro de pesquisa médica ou educacional, e que minhas

informações obtidas durante a pesquisa, possam ser utilizadas em publicações científicas, desde que seja preservada minha identidade.

Declaro que estou ciente que terei **direito garantido** à melhor conduta médica diante de uma intercorrência indesejável, desde que seja provocada por algum procedimento adotado durante o acompanhamento ou desenvolvimento da pesquisa, de forma inteiramente gratuita, e que poderei retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer penalização para minha pessoa.

Estou consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica. Concordo em participar e DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço do responsável pela pesquisa: Professor Sergio de Almeida Basano Rua Francisco Prestes 1234 Monte Negro-RO CEP 76.888-000 Fone 69-35302053 e-mail sergio@icb5usp.med.br

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao: **Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade São Lucas:** Rua Alexandre Guimarães, 1930 Porto Velho-RO fone 69-32118046

Assinatura do pesquisador e carimbo

APÊNDICE B - Ficha clínica

FICHA CLÍNICA Data:_____

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Sexo: F M Data de nascimento:_____Idade:_____

Peso:_____Localidade:_____

SINAIS VITAIS

Pressão arterial: Freqüência cardíaca:

Freqüência respiratória: Temperatura:

Olhos

Cristalino:		Esclera:		Acuidade visual:	
Córneas:		Pálpebras:		Outro	

Gânglios

Cervicais:

Axilares:

Outros Preencher de 0 a ++++

Ictérico		Edema	
Artralgia		Deformidade	

Deformidade Localização: _____

5- Lesões de pele: _____

6- Fígado:

7- Baço:

8- MMII - Edema 0 + ++ +++ +++++

- Úlceras

ATIVIDADES DA VIDA DIÁRIA

Horas trabalhadas por semana: ( ) < 20 ( ) 20 a 40 ( ) 41 a 60 ( ) >60.

Qual a principal atividade que exerce?_____.

Atividades desempenhadas no trabalho:

( ) Sentar na cadeira ( ) Levantar ou carregar peso ( ) Ficar de pé

( ) Caminhar ( ) Dirigir ( ) Capinar

( ) Cortar lenha ( ) Outros

HISTÓRICO MÉDICO

Data do ultimo exame médico/ ou exame físico:_____

Marque aquele (s) que tenha (M) alguma cardiopatia antes dos 50 anos:

( ) Pai ( ) Mãe ( ) Irmão (ã) ( ) Avô/ Avó

Marque as intervenções cirúrgicas que você tenha feito:

( ) Coluna ( ) Coração ( ) Articulação ( ) Hérnia de disco

( )Rim ( ) Pulmão ( ) Olhos ( ) Pele

( )Outros_____

Marque os problemas que tenham sido diagnosticados ou tratados por um médico:

( ) Hepatite ( )Hanseníase ( ) HIV ( ) Tuberculose

( ) Alcoolismo ( )Problema renal ( ) Enfisema ( )Artrite

( ) Diabetes ( ) Problemas oculares ( )Úlcera digestiva ( ) Asma

( ) Pressão arterial alta ( ) AVC ( ) Obesidade ( ) Problemas musculares ( ) Uso de óculos ( ) Outros_____

Indique as queixas e sintomas dos últimos cinco (5) dias: Preencher S ou N

Tosse com sangue		Dor nas pernas	
Dor abdominal		Dor nos braços	
Dor nas costas ou pescoço		Dor no peito	
Dores articulares		Falta de ar com esforço leve	
Sentir-se fraco		Tontura	
Febre		Dor de cabeça	
Coceiras pelo corpo		Frieza nas pernas	
Náuseas e vômitos			

Você possui alguma alergia?

( ) sim ( ) não Qual(is):_____

Nos últimos tempos, você sofreu algum acidente ou lesão osteo-articular?

( ) sim ( ) não Qual(is):_____

COMPORTAMENTO RELACIONADO À SAÚDE

Você fuma atualmente?( ) sim ( ) não Quantos cigarros por dia?_____

Faz ingesta de álcool? Quantas vezes por semana? _____

Está tomando algum remédio? Qual? _____

Atualmente, você realiza alguma atividade física? ( ) sim ( ) não

Qual(is):_____

COMENTÁRIOS GERAIS - Verso

Assinatura:_____

APÊNDICE C - Ficha clínico-epidemiológica

1. ADMISSÃO: o paciente obedece aos critérios de inclusão? Responda as questões abaixo:	
Inclusão(S/N) [Todos devem ser Sim]	**Exclusão (S/N) [Todos devem ser Não]**
Idade de acordo c/ protocolo?	Sinais de perigo/malária grave?
Infecção por *Mansonellaozzardi*?	Doenças subjacentes referidas? (cardíaca, renal, hepática, desnutrição, meningite).
Sem ingesta de droga anti-helmíntica há 30 dias?	Alergia pregressa à droga? Uso de droga depressora SNC?
Consentimento por escrito?	Gestante/Nutriz?

Anexar termo de consentimento

Obedece aos critérios de Inclusão? S / N favor assinalar

2. REGISTRO: Se todos os critérios de inclusão foram "S" e todos o de exclusão forem "N", favor proceder ao registro do paciente:		
Forneça ao paciente um número e preencha os dados relativos à identificação abaixo		
2. IDENTIFICAÇÃO		**Peso (kg)**
Etnia **Branco,** **Negro,Índio,Amarelo,Mestiço**	**Idade (anos)**	**Meses**
Sexo (M/F)	**Data de Nascimento (d/m/a)**	
3. INSERÇÃO EM GRUPO TERAPÊUTICO DO ESTUDO: **Calcule o número de comprimidos** **Forneça e supervisione a ingestão da medicação**		
Número de comprimidos de Ivermectina fornecidos (de acordo com a tabela)		

Investigador Principal	**Sergio Almeida Basano**	Assinatura		**Data**	

Informação Confidencial: preencher e manter separado das demais fichas

Nome Completo do Paciente: Nome do Responsável:

Reg.Hospitalar: Registro no Estudo:

Endereço:

Local		*Registro no Serviço de Saúde*	
	Lábrea-AM	**Registro no Estudo**	

4. EVOLUÇÃO DO AO D180

Data						
Dia do Estudo	***D0***	***D3***	***D30***	***D60***	***D90***	***D180***
O paciente foi examinado? S/N						
PA mm Hg decúbito deitado						
Frequência Cardíacabpm						
Parasitologia mf/mm^3						
Fraqueza						
Cefaléia						
Vertigem						
Dor abdominal						
Anorexia						
Naúsea						
Vômito						

Diarréia						
Exantema						
Desmaio						
Artralgia						
Prurido						
Edema Facial						
Edema Palpebral						
Tremor						
Dor Gânglios Axilar/Cervical/Inguinal						
Mialgia						
Sonolência						
Vermelhidão Olhos						
Diminuição Acuidade Visual						
Outro1:						
Outro2:						
Leucócitos (/uL)						
Neutrófilos (%)						
Linfócitos (%)						
Monócitos (%)						
Eosinófilos (%)						
Basófilos (%)						
Hematócrito (%)						
Hemoglobina (g/dL)						
Gama GT						
TGO						
TGP						
Bilirubina						
Outros (especificar)						

Efeitos Adversos (S/N)*						
Coleta p/Bioquímica (S/N)						
Coleta p/ Hemoscopia (S/N)						

5. TRATAMENTO

	Agendamento do Tratamento					
Outros Medicamentos – Assinalar Follow-up	*D0*		*D1*		*D3*	
Tratamento Concomitante**S / N**						
Uso de Tramento de Emergência *S /N*						
Tratamento por EA*S / N*						

Nome Genércio do Medicamento Dose diária administrada *Dia de início/fim de tratamento*

Local		***Investigador Principal***	Sergio Almeida Basano	***Registro Serviço de Saúde***	
	Lábrea-AM	**Inicias do Paciente**		**Registro no Estudo**	

6. EFEITO ADVERSO: caso ocorra EA, mesmo não se relacionando ao estudo em questão, complete o formulário abaixo. Caso se institua terapêutica medicamentosa, incluir no formulário acima.						
Efeito Adverso	**1**		**2**		**3**	
Descrição						
Data início / fim						
Intensidade [Marque apenas 1]	Leve		Leve		Leve	
	Moderado		Moderado		Moderado	
	Severo		Severo		Severo	
	MuitoSevero		MuitoSevero		MuitoSevero	
	Ignorado		Ignorado		Ignorado	
Relação com o Esquema Terapêutico [Marque APenas 1]	Nenhuma		Nenhuma		Nenhuma	
	Improvável		Improvável		Improvável	
	Possível		Possível		Possível	
	Provável		Provável		Provável	
	Certeza		Certeza		Certeza	
	Ignorado		Ignorado		Ignorado	
Evolução [Marque apenas 1]	RecuperaçãoCompleta		RecuperaçãoCompleta		RecuperaçãoCompleta	
	AindaPresente		AindaPresente		AindaPresente	
	Sequela		Sequela		Sequela	
	Óbito		Óbito		Óbito	
	Ignorado		Ignorado		Ignorado	
Conduta	Nenhum		Nenhum		Nenhum	

[Marque todos os necessários]	InterrompeuTerapêutica		InterrompeuTerapêutica		InterrompeuTerapêutica	
	Hospitalização		Hospitalização		Hospitalização	

Local: Lábrea-AM	**Iniciais do Paciente:**	**Investigador Principal:** Sergio Almeida Basano		Registro no Serviço de Saúde:	**Registro no Estudo:**

APÊNDICE D - VERA, L. J. S.; BASANO, S. A.; CAMARGO, J. S. A. A.; FRANÇA, A. K.; FERREIRA, R. G. M.; CASSEB, A. A.; MEDEIROS, J. F.; FONTES, G.; CAMARGO, L. M. A. Improvement of a PCR test to diagnose infection by *Mansonella ozzardi*. Revista da Sociedade Barsileira de medicina Tropical, 44(3): 380-382, mai-jun, 2011.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 44(3):380-382, mai-jun, 2011

Communication/Comunicação

Improvement of a PCR test to diagnose infection by *Mansonella ozzardi*

Adequação da técnica da PCR para diagnóstico de infecção de *Mansonella ozzardi*

Luana Janaína Souza Vera[1], Sergio de Almeida Basano[1,2], Juliana de Souza Almeida Aranha Camargo[1], Andonai Krauze de França[3], Ricardo de Godoi Mattos Ferreira[4], Almeida Andrade Casseb[3], Jansen Fernandes Medeiros[5,6], Gilberto Fontes[7] and Luís Marcelo Aranha Camargo[1,8]

ABSTRACT

Introduction: Mansonelliasis is caused by *Mansonella ozzardi*. It is widespread in the Amazon region, with a high prevalence. The common exam of thick blood smears stained with Giemsa shows low efficacy levels and has been an obstacle to diagnosing individuals with low blood parasitemia. **Methods:** In order to increase diagnosis efficacy, the PCR technique was improved. **Results and Conclusions:** PCR demonstrated the best performance, with sensitivity and negative predictive values (NPV) of 100%, followed by blood filtration through membrane filters, which showed a sensitivity of 88.9% and a NPV of 84.6%, when compared to thick blood smears.

Keywords: *Mansonella ozzardi*. Diagnosis. PCR.

RESUMO

Introdução: A mansonelose é uma filariose causada pela *Mansonella ozzardi*, ocorrendo na Amazônia com prevalências de até 60%. A técnica de diagnóstico habitual (hemoscopia através da gota espessa) tem baixa eficácia o para o diagnóstico de pacientes com baixa parasitemia. **Métodos:** Neste contexto foi aperfeiçoada a técnica da PCR para seu diagnóstico. **Resultados e Conclusões:** Quando comparada à gota espessa, a PCR apresenta sensibilidade de 100%, e valor preditivo negativo (VPN) de 100% mostrando eficácia bastante superior à técnica da filtração em membrana que apresenta sensibilidade de 88,9% e VPN de 84,6%, quando também comparada à gota espessa de sangue.

Palavras-chaves: *Mansonella ozzardi*. Diagnóstico. PCR.

The microfilariae of *Mansonella ozzardi* (Nematode, Onchocercidae) is the etiological agent of the mansonelliasis. The parasite has a geographic distribution limited to the Americas and it is found from Mexico through Argentina, except Chile, Uruguay, and Paraguay[1]. This filariasis was first reported in Brazil in the City of Manaus in the State of Amazonas[2] and people infected by *M. ozzardi* were later identified along the Solimoes, Purus and Negro Rivers[3]. These findings reinforce many studies that have warned that *M. ozzardi* was widely distributed in the State of Amazonas[4], Brazil; however studies concerning this filariasis remain scarce[5-7].

1. Coordenação de Medicina, Faculdade São Lucas, Porto Velho, RO. 2. Setor de Isolamento, Centro de Medicina Tropical de Rondônia, Porto Velho, RO. 3. Laboratório de Genética, Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais, Porto Velho, RO. 4. Laboratório de Estudos em Bioinformática e Bioestatística, Fundação Oswaldo Cruz Noroeste, Porto Velho, RO. 5. Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM. 6. Escola Superior de Ciências da Saúde, Coordenação de Medicina, Universidade Estadual do Amazonas, Manaus, AM. 7. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de São João Del Rei, Divinópolis, MG. 8. Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas 5, Monte Negro, RO.

Address to: Dr. Luís Marcelo Aranha Camargo. Rua Francisco Prestes s/n, 76888-000 Monte Negro, RO, Brasil.
e-mail: spider@icb5usp.org

Received in 07/08/2010
Accepted in 16/11/2010

Mansonella ozzardi is transmitted by insects of the families Ceratopogonidae and Simuliidae (Diptera). Up to now, only the Simuliidaes have been identified as vectors in Brazil[8,9]. Infection symptomatology has been widely discussed and according to Batista et al[10], people suffering from mansonelliasis present moderate fever, leg coldness, joint aches, dizziness and headaches. Recently, new symptomatology has been attributed to this filariasis, which is characterized by ocular lesions and white rings on the cornea that may eventually cause blindness[11].

Typically, microscopic examination of a thick blood smear (TBS) stained with Giemsa, has been the main method used in epidemiological assays. Despite the low efficacy of TBS, particularly for patients with low microfilaremia, it is more economically feasible, promptly and easily obtained, and also permits identification of the parasite species even in locations where intermingled infections by other filariidaes occur[12]. More laborious and effective methods are feasible, such as Knott's concentration method (blood lysis by 2% formalin)[12,13], and by filtering the blood through a polycarbonate membrane filter (PMF)[12]. The PMF is considered the gold-standard. Morales-Rojas et al first suggested polymerase chain reaction (PCR) as an effective method to detect *M. ozzardi*[14].

This study aimed to standardize the PCR for diagnosing *M. ozzardi* and compare its effectiveness in relation to the PMF, which is considered the gold-standard for diagnosing the disease compared to the traditional TBS method.

Forty-seven patients infected by *M. ozzardi* were randomly selected from 232 individuals diagnosed by PMF (Poretics Corporation, Livermore, USA). These individuals lived alongside the rivers in the municipality of Labrea, State of Amazonas, Brazil (07°15'S 64°51'W), an area with high prevalence of mansonelliasis. The TBS method was used according to the following procedure: blood was collected from the digital pulp (equivalent to 0.06mL) using disposable lancets and then prepared on microscope slides and left to dry at room temperature. Next, the slides were washed with distilled water, fixed with methanol, stained with Giemsa and dried off. The slides were then subjected to microscopic examination using optical objectives of 10x and 40x by two professionals in a blind controlled trial. PMF was conducted by filtering 1mL of venous blood previously diluted with saline 0.9% through a polycarbonate membrane filter of 3-micrometer pore diameter size (Poretics Corporation - Livermore-USA)[12].

The PCR method was based on the detection of the GenBank AF228564 DNA fragment from *M. ozzardi* which comprises the partial sequence of the 18S ribosomal RNA gene, the internal transcribed spacer 1, the complete sequence of the 5.8S ribosomal

RNA gene and internal transcribed spacer 2 (ITS2) and the partial sequence of the 28S ribosomal RNA gene[13]. The forward primer used was 5'GAAAGAAGAAGGATTTTTACT3' on the ITS2 and the reverse primer used was 5'CTTTTCCTCCGCTTAATTATA3' on the 28S ribosomal DNA. These genes are commonly used for species identification on molecular bases since they comprise highly conserved sequences next to highly variable ones. The primers were verified using the NCBI primer design on-line tool based on the Primer3[15] software and showed no unintended DNA products.

Genomic DNA was extracted from the samples according to the instructions of the Quiamp DNA Blood Kit (Qiagen®). Blood samples of newborns from the city of Porto Velho were taken as negative control. The eluted DNA were maintained in microtubules and stored at -20ºC. The following procedure was used to amplify the DNA sequence: the samples were maintained A) at a temperature of 94°C for 4min (1 cycle); B) at 94°C for 45sec; at 55°C for 30sec; 72°C for 45sec (35 cycles); C) 72°C for 5min (1 cycle), and D) 4°C for 1min (final time). The amplification product up to 312bp was viewed on 10% polyacrylamide gel with bromide staining (**Figure 1**).

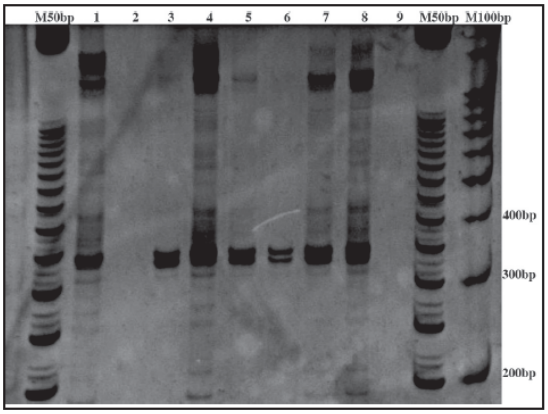

FIGURE 1 - Electrophoresis in 10% polyacrylamide gel showing the PCR results for DNA extracted from blood.

M50pb stands for the 50 base pairs size marker, M100bp for the 100 base pairs size marker and the numbered lanes are: 1: sample 709, positive control; 2: newborn 90, negative control; 3-8: samples 704, 708, 711, 712, 714 and 715; 9: sterile water negative control.

Both the PMF and PCR methods were compared to the common method for *M. ozzardi* diagnosis (TBS). In order to compare the effectiveness of the methods, the following parameters were considered: sensitivity, specificity, negative predictive value (NPV), and Cohen's kappa coefficient (**Tables 1** and **2**). The OpenEpi® software was used for statistical analysis, with a confidence interval (CI) of 95%. The project was submitted to the Research Ethics Committee of the São Lucas College, Porto Velho and was approved under the registry number 344/09.

Of the 29 individuals who presented negative by TBS, 62.1% were identified as positive by PMF, while among the 18 who were positive by the TBS method, 88.9% showed the same results by PMF. On the other hand, TBS diagnosed 2 cases that were not diagnosed by PMF (false-negatives), despite its greater sensitivity. Regarding the PCR technique, 89.6% of those who presented negative by TBS were positive by PCR, while 100% of the positive cases showed the same results by PCR. Thus, the PCR technique showed the greatest

TABLE 1 - Effectiveness parameters of the polycarbonate membrane filtering method and the thick blood smear exam.

Laboratory method	Positive TBS	Negative TBS	Total
Positive PMF	16	18	34
Negative PMF	2	11	13
Total	**18**	**29**	**47**
Sensitivity	88.9%	(67.2 - 96.9)*	
Specificity	37.9%	(22.69 - 56.0)*	
Negative predictive value	84.6%	(57.76 - 95.67)*	
Kappa coefficient	0.2	(0.004 - 0.40)*	

TBS: thick blood smear exam, PMF: polycarbonate membrane filtering method. *confidence interval.

TABLE 2 - Effectiveness parameters of the polymerase chain reaction and the thick blood smear exam.

Laboratory method	Positive TBS	Negative TBS	Total
Positive PCR	18	26	44
Negative PCR	0	3	3
Total	**18**	**29**	**47**
Sensitivity	100.0%	(82.41 - 100.0)*	
Specificity	10.3%	(3.6 - 26.4)*	
Negative predictive value	100.0%	(43.8 - 100.0)*	
Kappa coefficient	0.08	(-0.03 - 0.19)*	

TBS: thick blood smear exam, PCR: polymerase chain reaction, *confidence interval.

sensitivity and NPV, followed by PMF, when compared to TBS. However, both these methods showed low specificity and low kappa coefficient compared to TBS.

Despite the encouraging results, the cost of PCR is approximately US$8.60 per test, while PMF has a significantly lower cost, US$0.80 (author's personal information). The difficulties of performing PCR under field conditions must also be taken into account, since this is an important limiting factor in its application. Traditionally, studies concerning the prevalence of the *M. ozzardi* indicate its low prevalence rate in young individuals[6-8], which is probably due to their low microfilaria concentration. The advent of PCR for mansonelliasis diagnosis, which shows 100% sensitivity, may help correct this bias by providing new epidemiological information on parasitic infections and by promoting the determination of higher prevalence rates.

ACKNOWLEDGMENTS

To Prof. Marisis Camargo for the English review of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

FINANCIAL SUPPORT

Fapesp 2008/10817-6.

REFERENCES

1. Tavares AM, Fraia Neto H. Mansonelose. *In*: Queiroz-Leao RN, editor. Doenças infecciosas e parasitarias. Manaus: Enfoque Amazônico; 1997. p. 733-737.
2. Deane MP. Sobre a incidência de filárias humanas em Manaus, Estado do Amazonas. Rev Fundação SESP 1949; 2:849-858.

3. Lacerda NB, Rachou RG. Filarioses humanas nas sedes municipais do Estado do Amazonas e territórios do Acre, Guaporé e Rio Branco. Rev Bras Malariol Doencas Trop 1956; 8:437-442.
4. Moraes MAP, Almeida MMR, Lovelace KJ, Chaves GM. *Mansonella ozzardi* entre índios Ticunas do estado do Amazonas, Brasil. Bol Oficina Sanit Panam 1978; 85:16-25.
5. Medeiros JF, Py-Daniel V, Barbosa VE, Ogawa GM. Current profile of *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in communities along the Ituxi river, Labrea municipality, Amazonas Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103:409-411.
6. Medeiros JF, Py-Daniel V, Barbosa UC, Izzo TJ. *Mansonella ozzardi* in Brazil: prevalence of infection in riverine communities in the Purus region, in the state of Amazonas. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104:74-80.
7. Martins M, Pessoa FAC, Medeiros MB, Andrade EV, Medeiros JF. *Mansonella ozzardi* in Amazonas, Brazil: prevalence and distribution in the municipality of Coari, in the middle Solimões River. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105:246-253.
8. Cerqueira NL. Sobre a transmissão da *Mansonella ozzardi*. J Bras Med 1959; 1:885-914.
9. Shelley AJ, Luna Dias APA, Moraes MAP. Simulium species of amazonicum group as vectors of *Mansonella ozzardi* in the Brazilian Amazon. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980; 74:784-788.
10. Batista D, Oliveira WR, Rabello VD. Estudo da patogenicidade da *Mansonella ozzardi* e da sintomatologia da Mansonelose. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1960; 2:281-289.
11. Branco BC, Chamon W, Belfort Neto R, Belfort-Costa Jr AJA. Achados oculares entre habitantes do município de Pauini e possível associação entre lesões corneanas e mansonelose na Amazônia. Arq Bras Oftalmol 1998; 61:674-682.
12. Fontes G, Rocha EMM. *Wuchereria bancrofti* - Filariose Linfática. *In*: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA, editors. Parasitologia Humana. 11th ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2005. p.299-307.
13. Knott J. A Method for making microfilarial surveys on day blood. Trans R Soc Trop Med Hyg 1939; 33:191-196.
14. Morales-Hojas R, Port RJ, Shelley AJ, Maia-Herzog ER, Coscaron S, Sheke RA. Characterization of nuclear ribosomal DNA seqüences from *Onchocerca volvulus* and *Mansonella ozzardi* (Neumatoda: Filariodea) and development of a PCR based method for their detection in skin biopsies. Int J Parasitol 2001; 31:169-177.
15. Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *In*: Krawetz S, Misener S, editors. Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Totowa (NJ): Humana Press; 2000. p. 365-386.

APÊNDICE E - BASANO, S. A.; CAMARGO, J. S. A. A.; VERA, L. J. S.; VELASQUES, S. N.; OGAWA, G. M.; MEDEIROS, J. F.; CAMARGO, L. M. A. Investigation in the ocurrence of *Mansonella ozzardi* in the State of Rondônia, Western Amazonia, Brasil.Revista da Sociedade Barsileira de medicina Tropical, 44(5): 600-6003, set-out, 2011.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 44(5):600-603, set-out, 2011 DOI: 10.1590/S0037-86822011005000055

Article/Artigo

Investigation of the occurrence of *Mansonella ozzardi* in the State of *Rondônia*, Western Amazonia, Brazil

Investigação da ocorrência da *Mansonella ozzardi* no Estado de Rondônia, Amazônia Ocidental

Sergio de Almeida Basano[1,2], Juliana de Souza Almeida Aranha Camargo[1], Luana Janaína de Souza Vera[1], Suzane Neves Velasques[3], Guilherme Maerschner Ogawa[3], Jansen Fernandes Medeiros[4,5], Gilberto Fontes[6] and Luís Marcelo Aranha Camargo[1,3]

ABSTRACT

Introduction: *Mansonella ozzardi*, a human filarial nematode transmitted by Diptera Simuliidae flies (black flies), is widely spread in the Amazon, while the occurrence of mansonelliasis in the State of *Rondônia* (Western Amazonia) has not been reported thus far. The existence of this parasitic disease in this state is investigated in this study. **Methods:** A total of 4,452 people who lived alongside the Madeira, Mamore, Guapore, Machado and Preto Rivers, in the State of *Rondônia*, were examined using the thick blood smear method. Alongside the Machado and Guapore rivers, 2,112 adult simuliid specimens were captured. **Results:** Infected people were not reported, although simuliids with vector potential such as *Cerqueirellum pydanielli*, *C. argentiscutum* and *C. amazonicum* were found. **Conclusions:** This study registered no infected people. This finding may be explained by the individuals' low level of microfilaremia that is below the limit of detection of the diagnostic method used in the study or insufficient migration of people infected with *M. ozzardi* from endemic areas, making it impossible to introduce the disease into *Rondônia*. Further studies using more sensitive diagnostic techniques could shed light on this question.

Keywords: *Mansonella ozzardi*. Microfilariae. Simuliidae. State of *Rondônia*.

RESUMO

Introdução: *Mansonella ozzardi* é uma filária humana que tem como vetor dípteros simulídeos e é amplamente distribuída na Amazônia. Não há informações sobre a ocorrência de casos de mansonelose no Estado de Rondônia, e neste trabalho procurou-se investigar a situação epidemiológica desta parasitose em áreas urbanas e ribeirinhas na Amazônia Ocidental. **Métodos:** Foram examinados 4.452 moradores às margens dos rios Madeira, Mamoré, Guaporé, Machado e Preto em Rondônia, através da técnica da gota espessa de sangue. Capturou-se às margens do rio Machado e Guaporé 2.112 simulídeos adultos das espécies *Cerqueirellum pydanieli* e *Chirostilbia pertinax*. **Resultados:** Não foram encontradas pessoas infectadas com *M. ozzardi* e foram encontradas diferentes espécies de simulídeos com potencial de transmissão da mansonelose. **Conclusões:** Não foram encontrados indivíduos infectados com *M. ozzardi* neste estudo. Este fato pode ser explicado pela existência de pacientes com baixas microfilaremias, associado à técnica diagnóstica de baixa sensibilidade utilizada no estudo. Pode-se ainda aventar a possibilidade de ter ocorrido migração insuficiente de pacientes infectados de áreas endêmicas, impossibilitando a implantação da endemia. Estudos posteriores com técnicas diagnósticas mais sensíveis podem ajudar a esclarecer esta questão.

Palavras-chaves: *Mansonella ozzardi*. Microfilárias. Simuliidae. Rondônia.

1. Departamento de Medicina, Faculdade São Lucas, Porto Velho, RO. 2. Hospital Cemetron, Secretaria de Saúde de Rondônia, Porto Velho, RO. 3. Unidade de Pesquisa de Monte Negro, Instituto de Ciências Biomédicas, Monte Negro, RO. 4. Departamento de Entomologia, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, AM. 5. Departamento de Entomologia, Universidade Estadual do Amazonas, Manaus, AM. 6. Campus Centro Oeste (CCO), Universidade Federal de São João Del Rei, Divinópolis, MG.
Address to: Dr. Luis Marcelo Aranha Camargo. Rua Carlos Prestes 1234, 76888-000 Monte Negro, RO, Brasil. Phone: + 55 69 9219-8714.
e-mail: spider@icbusp.org
Received in 02/11/2010
Accepted in 21/02/2011

INTRODUCTION

Mansonella ozzardi microfilariae are found in the peripheral blood of human hosts and are one of the etiologic agents of mansonelliasis. In some countries, this parasite appears simultaneously with other filarial parasites, such as *Onchocerca volvulus* and/or *Mansonella perstans*[1,2]. In Brazil, this parasite was first observed in a nationwide survey of the occurrence of lymphatic filariasis in the City of Manaus in the Amazon region in 1949[3]. Three and a half percent (3.5%) of the population was examined by the thick blood smear method with positive results found in 0.6% (15 patients) for *M. ozzardi*. Among these patients, seven had never left the city of Manaus, which showed that M. *ozzardi* was autochthonous[3]. Later, some researchers observed individuals infected with *M. ozzardi* alongside the Solimoes, Purus and Negro Rivers in the State of Amazonas[4-6]. Recent data have indicated that this parasite is still found with high prevalence rates in the Amazonian territory[7-9].

Outside of the State of Amazonas, this parasite has already been found in the State of Mato Grosso and Roraima[10,11]. In Brazil, only insects of the Simuliidae family transmit *M. ozzardi*: *Cerqueirellum amazonicum*, *C. argentiscutum* and *C. oyapockense*[12-14] and more recently *C. pydanielli* are potential vectors for mansonelliasis in the State of Amazonas[15].

A survey on filariasis was conducted in the State of Rondônia in the 1950s as part of the national survey, and M *ozzardi* hosts were not found. Only lymphatic filariasis caused by *Wuchereria bancrofti* was detected in this State[16]. Since then, no other national survey has been performed in the region. However, a few local studies of *M. ozzardi* have been performed on the population in the Amazon region. No studies been have been conducted in the State of Rondônia despite the fact that some cases of mansonelliasis have been reported in the state, mainly in individuals that migrate from the State of Amazonas, especially from the municipalities of

Labrea and Humaita (LMA Camargo: personal information), which are endemic areas for mansonelliasis[8,17]. Thus, further studies to find possible foci of mansonelliasis in the region are necessary.

METHODS

This work included a parasite microscopic survey in the State of Rondônia Brazil, more specifically in the urban areas and alongside the rivers of the City: Guajara-Mirim (Mamore River, neighborhood City of Triangulo sectors at 10º 47' 35.01" S and 62º 20' 03.90" W), and the urban area City of Porto Velho (Madeira River, neighborhoods of Cai N'agua, Uniao, and City of Candelaria sectors at 08º 45' 42.57" S and 63º 54' 07.06" W), in the inhabitants living alongside the middle Madeira River, in the communities of São Carlos (08º 26' 16.90" S and 63º 29' 52.33" W), Nazare (08º 09' 51.88" S and 62º 19' 13.29" W), Calama (8º 02' 53.59" S and 62º 51' 46.40 W), Rio Preto (8º 26' 16.90" S and 62º 55' 03.10" W), middle Machado River (Tabajara 8º 10' 14.37" S and 62º 46' 47.53" W, *Dois de Novembro* 8º 55' 29.68" S and 62º 04' 48.15" W), and Guapore River, in the municipality of São Francisco do Guapore (12º 31' 43.53" S and 63º 32' 10.89" W) (**Figure 1**).

The sampling of the population was non-random, and individuals older than five years of age (population at risk) who are exposed daily to simuliids stings were invited to voluntarily participate in the study. These patients were not only informed orally but also informed in written form of the low risks and procedures of the study. The hematologic survey was conducted using the thick blood smear method. Two to three blood drops (60µL) were obtained by finger prick and were then placed on a slide for microscopy, dried at room temperature, and washed with distilled water (12h after being prepared). The slides were then stained with Giemsa and examined with an optical microscope (10x and 40x magnification) in a blind, controlled trial performed by two microscopists.

In addition to the hematologic study, adult and immature (larvae and pupas) simuliids were collected along the Machado River in the communities of Tabajara on the middle of Machado River (8º 55' 29,68" S and 62º 04' 48,15" W) and *Dois de Novembro* (8º 54' 54.90" S and 62º 07' 21.11" W) and Guaporé River at São Francisco do Guaporé (12º 31' 43.53" S and 63º 32' 10.89" W). The adult simuliids were captured by suction traps upon landing in the morning (8 to 10 am), and in the afternoon (2 to 4 pm). The immature simuliids (larvae and pupas) were captured on the leaves and branches that had fallen into the rivers and water channels of the region using tweezers and scissors. All the collected simuliids (2,112 specimens) were soaked in 70% alcohol and taken to the laboratory of the National Institute of Research of Amazonia in the City of Manaus (State of Amazonas) for identification, according to Coscarón & Coscarón-Arias[18]. Larvae and pupas were identified for species, while 90% (ninety percent) of the adult simuliids were dissected into three parts (head, thorax and abdomen) using a stylet under a light microscope to determine infection with *M. ozzardi* microfilariae and/or larval stages (L_1, L_2 and/or L_3).

Ethical considerations

The project was submitted to the Ethical Research Committee of the São Lucas College in Porto Velho (State of Rondônia), approved and recorded under the registry number 344/09.

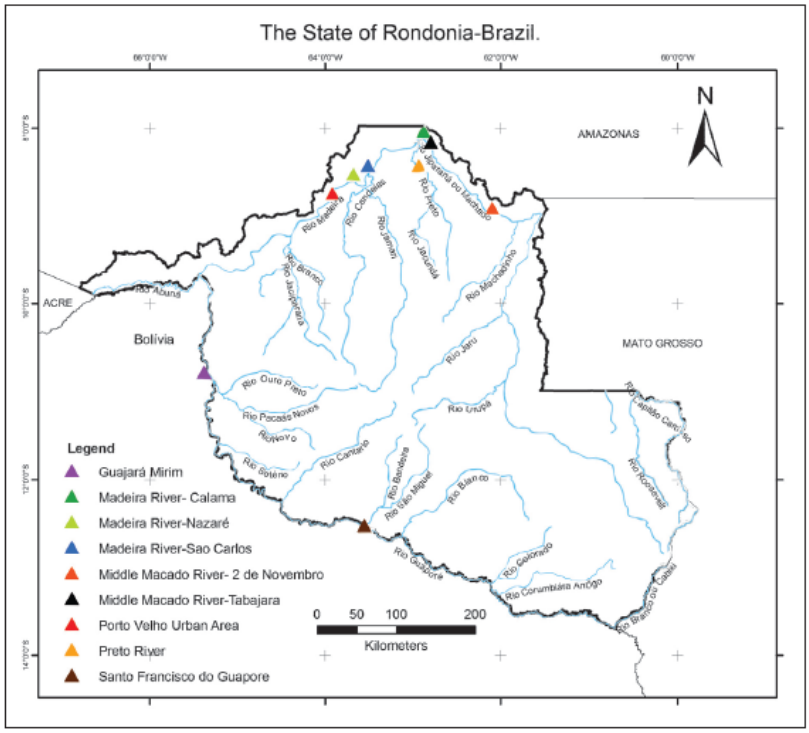

FIGURE 1 - Collection area of *Simuliidae* and blood samples.

Rev Soc Bras Med Trop 44(5):600-603, set-out, 2011

RESULTS

Altogether 4,452 individuals were examined alongside the major rivers of Rondônia, and all of these individuals were found to be negative for *M. ozzardi* microfilariae by hematologic examination (**Table 1**).

Only two simuliid species were found to have hematophagic activity, and *Cerqueirellum pydanieli* was more abundant in comparison to *Chirostilbia pertinax* (**Table 2**).

Ninety percent of the adult specimens were dissected, and none of them was found to be positive for *M. ozzardi*. The following species of larvae and pupas were collected: *Kempfsimulium simplicicolor, Inequalium subnigrum, Ectmnaspis rorotaense, E. perflava, Coscaroniellum cauchense, C. quadrifidum, C. ulyssesi, C. goeldii, Psaroniocompsa minuscula, Cerqueirellum argentiscutum, C. amazonicum, C. pydanielli, Chirostilbia pertinax, Notolepria exiguua, and Shelleyllum siolli.*

TABLE 1 - Hematologic survey employing the thick blood smear method assessing *Mansonella ozzardi* microfilariae in individuals older than 5 years of age, State of *Rondônia*, 2008 to 2010.

Place	River	People examined*	Total of the population older than 5 years of age who were submitted to the survey in relation to the local population (%)
Guajara Mirim	Mamore River	441	56.0
Porto Velho Urbano	Madeira River	2,352	76.0
Porto Velho	Middle Madeira River	1,052	52.0
Tabajara e Dois de Novembro	Middle Machado River	358	88.0
Rio Preto	Preto River	226	92.0
Sao Francisco do Guapore	Guapore River	23	72.0
Total		**4,452**	**67.6**

*All negative for *Mansonella ozzardi*.

TABLE 2 - Species of Simuliidae with hematophagic activity that were collected in the communities of Tabajara and Dois de Novembro, middle Machado River, State of Rondônia, 2008 to 2010.

		Number of insects collected					
		Chirostilbia pertinax		*Cerqueirellum pydanielli*		Total	
Local	Collecting period	n	%	n	%	n	%
Tabajara	morning	56	56.6	741	36.8	797	37.7
	afternoon	30	30.3	598	29.7	628	29.7
Dois de Novembro	morning	13	13.1	339	16.8	352	16.7
	afternoon	0	-	135	6.7	135	6.4
Santo Antonio do Guapore	morning	-	-	200	9.9	200	9.5
	afternoon	-	-	-	-	-	-
Total		**99**	**5.2**	**2,013**	**94.8**	**2,112**	**100.0**

DISCUSSION

The literature indicates that the Amazonian region is the only region in which *M. ozzardi* has been found in Brazil, and this region includes the States of Amazonas, Roraima, and Mato Grosso[10,11]. Rondônia is in the Amazonian region and was the subject of a study on the occurrence of mansonelliasis in the 1950s; however, there was no evidence of this parasitic disease[3,4]. In the present study, a large number of individuals were examined in several areas in the State of Rondônia and all of them tested negative for *M. ozzardi* microfilariae, confirming the results found in the previous decades. There is a question of whether the diagnosis method used in this study was not sensitive enough to detect low rates of microfilaremia. However, many studies carried out in the Amazon use the same method and show prevalence of up to 60% of microfilaremia[7-9]. Another hypothesis may be that there are not enough individuals infected with a high enough parasite load to disseminate this endemic disease in areas not affected by the infection. People with microfilaremia are a source of infection for insects that are vectors for the parasite and are responsible for perpetuating this endemic disease. Studies have shown that, in places with favorable conditions for other filarial diseases caused by *W. bancrofti*, the migration of individuals suffering from microfilaremia may be responsible for establishing new parasitic vector foci. In Sri Lanka, infected migrants introduced lymphatic filariasis into areas in which there were no previous parasitic diseases[19]. A similar situation was noted in areas previously free of filariasis such as the metropolitan area of the City of Recife (Brazil) that has since had cases of autochthonous lymphatic filariasis[20].

In this work, no focus of mansonelliasis was found despite the presence of potential parasite vectors and environmental conditions similar to those existing in mansonelliasis endemic areas in the Amazon region that borders Rondônia to the north. Among the factors that influence the capability of the vector to be infected and transmit the infection is the level of microfilaremia of the vertebrate host. The infection rate of mosquitoes is proportional to the density

of the microfilariae in the peripheral blood of the patients[21]. With regard to lymphatic filariasis caused by *W. bancrofti*, areas where the microfilariae density is kept under 5 microfilariae/60µl of blood are considered free of transmission risk[22]. Studies have shown that an individual with *W. bancrofti* microfilaremia who has migrated from an endemic area and lived for over 10 years in a non-endemic area was not able to induce the formation of a new focus of bancroftosis although the areas have similar environmental conditions[23]. One assumption was that the low level of the microfilaremia of the infected individual (4 microfilariae/mL of blood) was not sufficient to introduce parasitosis in a new area[23]. In the 1950s, individuals with *W. bancrofti* microfilaremia found in the Cities of Porto Velho and Guajara Mirim were allochthonous cases and had very mild microfilaremia (out of the seven individuals infected by parasites, five had less than 5 microfilariae per slide)[4,16]. It is probable that the small number of infected individuals and the mild microfilaremia was not enough to infect and sustain the transmission of the lymphatic filariasis caused by *W. bancrofti* in parasite-free areas. A similar phenomenon may have occurred with regard to current *M. ozzardi* infection in terms of the lack of occurrence of mansonelliasis foci in this region. The existence of competent vectors and the proximity of a hyper-endemic area with regard to the occurrence of *M. ozzardi* (Lábrea, AM)[8] as well as the absence of this parasitic disease in Rondônia has been noted.

The 2,112 simuliid samples captured in the area of *Rondônia* represented a diversified fauna that has not been extensively studied. This study reports new species occurring in Rondônia: *C. pydanielli, E. rorotaense*, *C. cauchense, C. ulyssesi*, and *N. exiguua* and also fauna with potential for *M. ozzardi* transmission *(C. pydanielli, C. argentiscutum, C. amazonicum)*[14,15]. Among these species, *C. pydanielli* was frequently captured and found to be exerting hematophagic activity.

We conclude that human infections caused by *M. ozzardi* are not been found in the evaluated areas. This finding could be explained by the fact that there are individuals with low-level microfilaremia not detected by the diagnostic method used in the study or there is insufficient migration of people infected with *M. ozzardi* from endemic areas, making it impossible to introduce the disease into Rondônia. Further studies using more sensitive diagnostic techniques may address this question.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Professor Ricardo de Godoi Mattos Ferreira from FIOCRUZ-Noroeste for the critical review of the manuscript, Professor Marisis Camargo for the English review and Marcelo Zagonel from *Instituto Nacional de Genética Médica Populacional* (INAGEMP) of *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for designing the map.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

FINANCIAL SUPPORT

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2007/000531-5.

REFERENCES

1. Formica S, Botto C. Filariasis focus due to *M. ozzardi* and *M. perstans* in the Amazon federal territory of Venezuela. J Trop Med Hyg 1990; 93:160-165.
2. Kozek WJ, Palma G, Henao A, García H, HoyosM. Filariasis in Colômbia: prevalence and distribution of *M. ozzardi* and *Mansonella (= Dipetalonema) perstans* infections in the comisaría del Guainía. Am J Trop Med Hyg 1983; 32:379-384.
3. Deane MP. Sobre a incidência de filárias humanas em Manaus; Estado do Amazonas. Revista Fundação SESP 1949; 2:849-858.
4. Lacerda NB, Rachou RG. Filarioses humanas nas sedes municipais do Estado do Amazonas e territórios do Acre, Guaporé Rio Branco. Rev Bras Malariol D Trop 1956; 8:437-442.
5. Moraes MAP. Estudo sobre a variação nictemeral da microfilaremia de *M. ozzardi*. O Hospital 1959; 56:869-873.
6. Moraes MAP. *M. ozzardi* microfilariae in skin snips. Trans R Soc Trop Med Hyg 1976; 70:16.
7. Martins M, Pessoa FAC, Medeiros MB, Andrade EV, Medeiros JF. *Mansonella ozzardi* in Amazon, Brazil: prevalence and distribution in the municipality of Coari, in the middle Solimões River. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105:246-253.
8. Medeiros JF, Py-Daniel V, Barbosa UC, Ogawa GM. Current profile of *M. ozzardi* (Nematoda: Onchorcercidae) in communites along the Ituxi river, Lábrea municipality, Amazon, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103:409-411.
9. Medeiros JF, Py-Daniel V, Barbosa UC, Izzo TJ. *M. ozzardi* in Brazil: prevalence of infection in riverine communities in the Purus region, in the state of Amazonas. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104:74-80.
10. D'Andretta Jr, Pio da Silva CM, Kameyana F. Ocorrência da mansonelose entre índios do alto Xingu. Rev Soc Bras Med Trop 1969; 3:11.
11. Oliveira WR. Infestação por filárias em habitantes de vila Pereira, território de Roraima, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo 1963; 5:287-288.
12. Cerqueira NL. Sobre a transmissão da *M. ozzardi*. J Bras Med 1959; 1:885-914.
13. Moraes MAP, Shelley AJ, Luna Dias AP. *Mansonella ozzardi* no território federal de Roraima, Brasil: distribuição e achado de um novo vetor na área do rio Surumu. Mem Inst Oswaldo Cruz 1985; 80:395-400.
14. Shelley AJ, Luna Dias APA, Moraes MAP. Simulium species of amazonicum group as vectors of *M. ozzardi* in the Brazilian Amazon. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980; 74:784-788.
15. Pessoa FAC, Barbosa UC, Medeiros JF. A new species of Cerqueirellum Py-Daniel, 1983 (Diptera: Simuliidae) and proven new vector of mansonelliasis from the Ituxi River, Amazon basin, Brazil. Acta Amaz 2008; 38:569-578.
16. Rachou RG. Distribuição geográfica das Filariose humanas no Brasil. Rev Bras Malariol D Trop 1957; 9:79-100.
17. Tavares AM. Estudo da infecção por *M. ozzardi*. [Dissertação Mestrado]. [Brasília]. Universidade de Brasília; 1981.122 p.
18. Coscarón S, Coscarón-Arias CL. Neotropical Simuliidae (Diptera: Simuliidae). Aquatic biodiversity in Latin America (ABLA). Vol. 3. Sofia-Moscow: Pensoft; 2007. p. 685.
19. World Health Organization. Filariasis linfatica: Cuarto informe del Comité de Expertos de la OMS en filariasis. Série de informes Técnicos n.º 702; 1984.
20. Medeiros Z, Alves A, Brito JA, Santos Z, Costa J. The present situation regarding lymphatic filariasis in Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Northeast Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 2006; 48:263-267.
21. Brito AC, Fontes G, Williams P, Rocha EMM. Bancroftian filariasis in Maceio, State of Alagoas, Brazil: observations on *Culex quinquefasciatus* after blood feeding on individuals with different densities of microfilariae in the peripheral blood stream. Am J Trop Med Hyg 1998; 58:489-494.
22. Das PK, Vanamail P. Probability risk transmission matrix as a decision tool for assessing methods of transmission interruption of *Wuchereria bancrofti* infection. Epidemiol Infec 2007; 20:1-5.
23. Leite AB, Lima ARV, Leite RB, Santos RV, Gonçalves JEL, Rocha EMM, et al. Assessment of family and neighbors of an individual infected with *Wuchereria bancrofti* from a non-endemic area in the city of Maceio, Brazil. Braz J Infect Dis 2010; 14:125-128.

APÊNDICE F - BASANO, S. A.; FONTES, G.; MEDEIROS, J. F.; CAMARGO, J. S. A. A.; VERA, L. J. S.; ARAÚJO, M. P. P.; PARENTE, M. S. P.; FERREIRA, R. G. M.; CRISPIM, P. T. B.; CAMARGO, L. M. A. Sustained Clearance of *Mansonella ozzardi* Infection after Treatment with Ivermectin in the Brazilian Amazon. Am. J. Trop. Med. Hyg., 90(6): 1170-1175, 2014.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 90(6), 2014, pp. 1170–1175
doi:10.4269/ajtmh.13-0410
Copyright © 2014 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Sustained Clearance of *Mansonella ozzardi* Infection after Treatment with Ivermectin in the Brazilian Amazon

Sergio de Almeida Basano, Gilberto Fontes, Jansen Fernandes Medeiros, Juliana Souza de Almeida Aranha Camargo, Luana Janaína Souza Vera, Marcos Paulo Parente Araújo, Maira Santiago Pires Parente, Ricardo de Godoi Mattos Ferreira, Pedro di Tárique Barreto Crispim, and Luís Marcelo Aranha Camargo*

Secretaria de Saúde do Estado de Rondônia (Hospital Cemetron), Porto Velho, Rondônia, Brazil; Faculdade São Lucas, Porto Velho, Rondônia, Brasil; Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Divinópolis, Minas Gerais, Brazil; Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz-Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil; Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil; Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas 5, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract. Therapy for mansonelliasis is challenging because there is no standard drug recommended for its treatment. This non-randomized study was conducted to evaluate the effectiveness of a single dose of 0.15 mg/kg of ivermectin to reduce *Mansonella ozzardi* microfilaraemia in infected persons. A total of 74 patients were studied within the municipality of Lábrea, which is located in Amazonas State, Brazil. The patients were treated with ivermectin after detection of the parasite by blood examination. Significant microfilaraemia reduction was observed and its residual effect was maintained for at least 12 months. There was no significant change in the laboratory blood count, hepatic metabolites, and nitrogen-bounding compound excreta dosage values that could compromise the use of this drug, demonstrating that ivermectin has a low toxicity level.

INTRODUCTION

The filarial worm *Mansonella ozzardi* is the etiologic agent of mansonelliasis. The geographic distribution of this helminth is limited to Central and South America and ranges from Mexico to Argentina, excluding Chile, Uruguay, and Paraguay.[1] This parasite is transmitted by two Diptera families (i.e., Ceratopogonidae and Simuliidae[2,3]) and was first described by Deane[4] in 1949 in the municipality of Manaus in the state of Amazonas, Brazil. Subsequently, Lacerda and Rachou[5] detected persons infected with *M. ozzardi* along the Solimões, Purus, and Negro Rivers in the Brazilian Amazon. These findings were confirmed by Moraes,[6,7] who reported that *M. ozzardi* was common in the Amazon region. Within the study area, there were no cases of onchocerciasis or bancroftiasis or any other *Mansonella* species.[8–11]

The symptoms of mansonelliasis in humans have been extensively studied and persons with mansonelliasis have moderate fever, cold legs, arthralgia, and adenitis with dizziness and headache.[8,12,13] Currently, researchers are trying to correlate the occurrence of ocular lesions on the cornea with mansonelliasis.[14–16] However, Bartoloni and others[17] described infections as asymptomatic.

There have been are few studies that focused on the treatment of *M. ozzardi* infection. Tavares and Fraiha Neto[1] treated the patients using a single dose of 0.2 mg/kg of ivermectin to eliminate the microfilariae from the peripheral blood within 24 hours, and persons remained parasite negative for a month. No adverse reaction was reported in response to the drug, although no patient was followed-up for more than 30 days. Gonzalez and others[18] found that the administration of a single dose of ivermectin (6 mg) reduced the parasitemia by 82% for a four-year period after treatment. Nutman and others[19] successfully treated one female patient by using 0.14 mg/kg ivermectin and reported that the patient showed symptoms compatible with an allergic reaction.

Because no controlled trials have been conducted to measure the effectiveness and/or the occurrence of adverse reactions of ivermectin,[18,19] studies conducted on the use of ivermectin have not been able to clarify how long it takes to eliminate parasitemia or the possibility of the microfilaraemia recrudescence. Ivermectin has already been demonstrated to be a safe and effective drug for the treatment of other helminthes[20–23] that occur in the studied area.[24,25]

This study characterized the efficacy of ivermectin to treat infections by *M. ozzardi* up to 360 days after treatment and subsequent side effects of the drug. These findings may contribute to the development of clinical assays to test other drugs and aid in the control of mansonelliasis.

MATERIALS AND METHODS

Study area. The study was conducted during 2009–2010 in the Lábrea Municipality (western Amazon, State of Amazonas, Brazil: 7°15′34″S, 64°47′59″W) (Figure 1), which has an estimated population of 38,000 inhabitants, of whom 5,0000 live along rivers in 112 small communities. Seven communities were chosen for the study: Cassiana, Bacural, Jucuri, Buraco, Santa Rosa, Jurucua, and Samauma, within a surrounding area located up to 200 km far from the municipal center of Lábrea. The main economic activities within the communities are the exploitation of natural resources, agriculture, and fishing.[26]

Sample size. To determine the minimum sampling size, 30 *M. ozzardi*-infected persons from Lábrea were randomly selected and had their microfilaraemia quantified by measuring the amount of microfilariae/milliliter of blood (filtered through a polycarbonate membrane). Based on the pilot sampling, the microfilaraemia was estimated by dispersion and a central measure trend that supported a sampling size calculation that considered a two-tailed alpha test = 0.05 (type I error), and β test = 0.20 (type II error). Based on these criteria, 40 persons were determined to be the minimum sample size for this study. However, as a preventive measure against the expected high drop-out rate during the 12-month

*Address correspondence to Luís Marcelo Aranha Camargo, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas 5, Rua Francisco Prestes 1234, Monte Negro, Rondônia CEP 76888-000, Brazil. E-mail: spider@icbusp.org

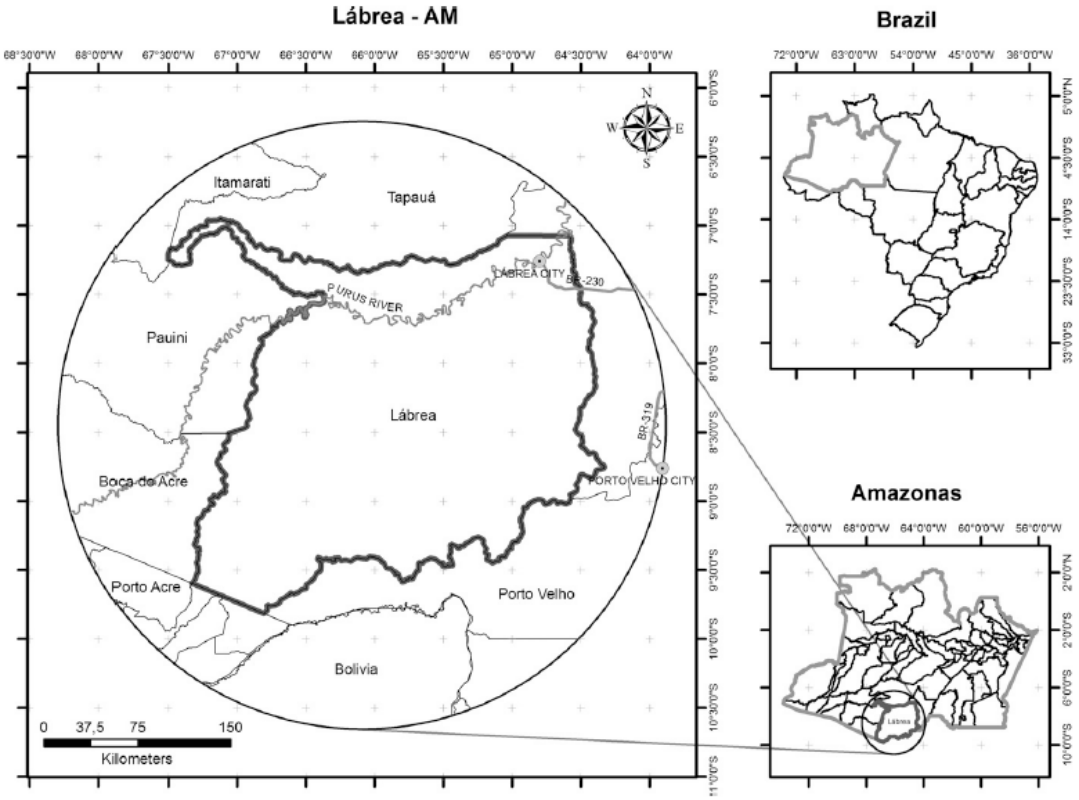

FIGURE 1. Location of the study area, municipality of Lábrea, Amazonas state, Brazil.

follow-up period, 74 microfilariae-positive cases were included in the study.

Population. Three hundred persons were estimated to live within the areas appraised, 171 of whom were present by the time of the study, met the inclusion criteria, and agreed to participate. Of these potential participants, 74 (43.3%) were infected with *M. ozzardi* microfilariae and were voluntarily engaged in the study. Of these persons, 53 remained in the study for one year after treatment.

Inclusion and exclusion criteria. Only *M. ozzardi*-infected persons 5–60 years of age and women who were not pregnant (women with a positive result for serum chorionic gonadotropin) or breastfeeding were included in this study. All persons had to consent to participate in the study, and persons less than 18 years of age needed the consent of a legal guardian. In addition, persons were excluded if they had cardiac, renal, neurologic, and/or hepatic pathologies; malnutrition and biochemical dosage alteration caused by hepatic or renal function impairments; a drug allergy history (Mazzotti's reaction); a record of any drug intake with anthelmintic effect over the past 30 days (albendazole, mebendazole, ivermectin, piperazine, pyrantel, pyrvinium, levamisole, and diethylcarbamazine); or were currently using central nervous system suppressing medications. Persons who did not consent to participate in the study were also excluded.

Ethics. The patients received written and oral communication about the risks and procedures involved and signed a specific consent agreement. The study was approved by the Ethical Committee of Sao Lucas College (registration no. 344/09), and has been registered at the Australian and New Zealand Clinical Trial Registry under the registry no. 12609000005257.

Intervention. The therapeutic regimen adopted was oral administration of 3-mg ivermectin tablets, registry no. NFN27660/0832210, supplied by the Ministry of Health of Brazil. A single 0.15-mg/kg dose was given to each of the 74 patients. Because this was a single-arm study, the treatment was not blinded. The medication was given under direct medical supervision and the use of all medications was recorded in the clinical epidemiologic file. For three days after ivermectin administration and a one-year period after treatment, treated patients were followed-up by the research team for possible adverse reactions. Complementary laboratory examinations, such as complete blood count, hematocrit, serum hemoglobin, aminotransferases, and γ-glutamyl transferase (GGT), were performed before treatment and on the third day after treatment by using commercial kits are widely used at the Brazilian Unified Public Health Service. The microfilariae count was assessed before treatment (D0) and on days 3 (D3), 30 (D30), 90 (D90), 180 (D180), and 360 (D360) after drug administration. Reference values obtained from manuals of commercial

TABLE 1

Biochemical and hematologic profiles of all patients who began and remained in the study until the third day, municipality of Lábrea, Amazonas state, Brazil*

Examination (no.)†	Reference values: Males	Reference values: Females	Normal results‡: D0	Normal results‡: D3	Paired McNemar test *P* value	Median (Q1; Q3) D0		Median (Q1; Q3) D3		Paired Wilcoxon test *P* value
Leukocytes (59)	4,000–10,000 mm^3		58	59	1.000	7,200	6,600; 7,980	7,600	6,700; 8,150	0.763
Lymphocytes (59)	800–4,000 mm^3		59	59	NA	1,933	1,761; 2,175	1,914	1,789; 2,185	0.443
Monocytes (59)	80–1,000 mm^3		59	59	NA	355	315; 410	316	272; 390	< 0.001§
Neutrophils (58)	1,800–7,400 mm^3		57	58	1.000	4,345	4,066; 4,955	4,964	4,187; 5,305	0.105
Eosinophils (59)	40–500 mm^3		44	55	0.013§	390	276; 498	261	210; 343	< 0.001§
Hematocrit (59)	42–54%	36–46%	31	30	1.000	38.0	37.0; 40.0	39.0	37.5; 40.0	0.437
Hemoglobin (59)	14–8 g/dL	12–16 g/dL	31	31	1.000	12.7	12.3; 13.3	13.1	12.45; 13.3	0.523
GGT (58)	7–45 U/L	5–27 U/L	51	46	0.063	19	15; 24	20	15; 30	0.004§
AST (58)	11–39 U/L	6–27 U/L	39	41	0.804	28	21; 33	27	22; 33	0.870
ALT (58)	11–33 U/L	7–27 U/L	42	44	0.791	24	18; 32	22	18; 28	0.152
Bilirubin (58)	≤ 0.8 mg/dL		53	58	0.063	0.5	0.4; 0.6	0.5	0.4; 0.5	0.117
Urea (58)	10–40 mg/dL		56	56	1.000	26	20; 31	26	21; 29	0.736
Creatinine (58)	0.5–1.4 mg/dL		56	54	0.625	0.8	0.7; 0.9	0.8	0.7; 1.0	0.868

* Reference values, median and quartiles used for the comparison of the results between pre- and post-treatment (D0 and D3) with ivermectin (0.15 mg/kg) are shown. The non-parametric paired Wilcoxon signed-rank test was used to compare the nominal exam results, and the McNemar test was used to compare the normal and abnormal examination result frequencies between D0 and D3. Because of technical issues, some examination data are missing,. Thus, only data from patients who had valid results at D0 and D3 were included in the analysis. NA = *P* values could not be calculated because there were no abnormal results; GCT = γ-glutamyl transferase; AST, aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase.

† No. persons who had valid examination results at D0 and D3.

‡ Persons with examination results within the range of reference values at each time point. Abnormal results can be calculated as N minus the number of normal results.

§ Statistically significant.

kits used for the biochemical and hematologic examinations are shown in Table 1.

The absence of a control group was justified by the ethical issues of not treating patients and that there is no report regarding any other drug that would be effective against this parasite. No other intervention was implemented during the defined study period.

Although it has known limitations,[27] the before-and-after non-randomized study design was chosen because of the recommendations of the ethical committee against leaving a group of patients untreated.

Diagnosis and blood microfilariae quantification. Ten milliliters of blood was collected by venous puncture from each patient to detect and quantify microfilariae using the polycarbonate membrane filtering method.[28] One milliliter of the collected venous blood was diluted in 0.9% physiological saline solution and then filtered through a 3-micra pore size polycarbonate membrane (Nucleopore Corporation (Pleasanton, CA). Membranes were placed on microscope slides, fixed in methanol, stained with Giemsa, and examined. The number of microfilariae (mf) per membrane was determined by two technicians who used an optical microscope and was calculated based on the median number of mf/mL of blood.

Outcomes. The primary outcome was parasitologic clearance on D360. The secondary outcome was adverse reactions and clinical cure (absence of symptoms) on D30.

Adverse events (AEs). Clinical epidemiologic questionnaires were used before giving the medication on D0 and after giving the medication on D3 to measure the signs and symptoms. Signs and symptoms that were absent before treatment and were present or increased after drug administration were considered AEs. Because the medication half-life was 22–28 hours,[29] patients were examined for three days after treatment for AEs.

Statistical methods. Statistical analysis was performed by using Statistica 8.0 software and SPSS 13.0 software (IBM, Armonk, NY). The square root of the number of microfilariae per membrane observed were depicted graphically by using a box plot (Figure 2). Square root transformation was applied because of the high range of values observed at D0. For non-parametric related samples (paired), Friedman test was performed to compare cure rate evaluation (i.e., parasitemia clearance with no recrudescence on the 30th, 60th, 90th, 180th, and 360th days after the treatment) at each time point by taking a significance level of 0.05. Because non-parametric statistics were used, the square root transformation of the data does not influence the tests results and further conclusions. The biochemical and hematologic profiles were described by their median and first and third quartiles. Nominal examination results for D0 and D3 were compared by using a non-parametric paired Wilcoxon signed-rank test. Normal examination result frequencies were also presented. The McNemar test, which is useful for related samples (paired), was applied to compare the frequency of normal and abnormal results of biochemical and hematologic tests.

RESULTS

Of the 171 persons invited to participate in the study, 74 (43.3%) were positive for *M. ozzardi* microfilariae and met the inclusion criteria. In this non-random sample, an average microfilaraemia concentration of 7.2 mf/mL of blood was found for 74 persons before the treatment (D0) (median value = 1.0 mf/mL, minimum value = 1.0 mf/mL, Q_1 = 1.0 mf/mL, Q_3 = 3.25 mf/mL, maximum value = 250.0 mf/mL, and SD = 29.6 mf/mL). All volunteers were negative by the polycarbonate membrane technique when examined and analyzed after the following time points: D3 (n = 74), D30 (n = 74), D90 (n = 74), D180 (n = 66), and up to D360 (n = 53) after the treatment (Friedman $\chi^2 = 159.00$, $P < 0.0001$) (Figure 2).

General symptoms were quantified during D0–D3 (hemoptysis, abdominal pain, back or neck pain, arthralgia, asthenia, leg pain, arm pain, chest pain, dyspnea, dizziness, headache, fever, itchiness, nausea, vomiting, cold legs, adenomegaly, and blurred vision) in the 74 patients. Symptoms decreased in 75.7% of patients at D3. The health condition of 68 persons (91.9%) was improved by D30; five patients (6.7%) still had

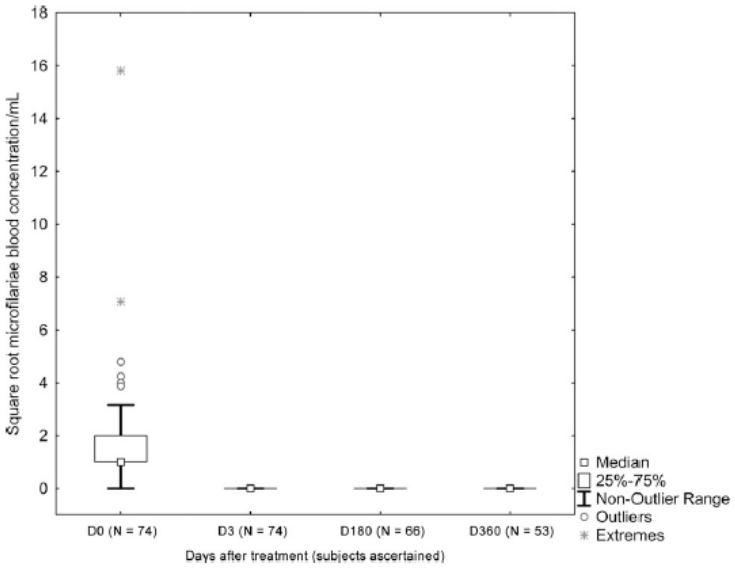

FIGURE 2. Square root of microfilariae density in patients studied up to 360 days after administration of a single dose (0.15 mg/kg) of ivermectin, municipality of Lábrea, Amazonas state, Brazil.

arthralgia and one person (1.4%) had one of the eight symptoms reported before treatment was alleviated.

The AEs (symptoms that occur or are aggravated after treatment) showed a significant occurrence in 64.9% of the 74 patients who were selected for the study. The average number of AEs reported per patient was 1.3 (range = 0–4 AEs). Of the patients investigated, 27.0% had one AE, 16.2% had two AEs, 18.9% had three AEs, and 2.7% had four AEs.

The most prevalent AEs were hyperthermia (28.7%), headache (26.6%), arthralgia (10.6%), and dizziness (7.4%). These AEs appeared after a mean ± SD of 16.2 ± 8.4 hours after medication intake and ended 13.9 ± 8.2 hours after symptom appearance; 100% relief was observed. Only one medical intervention was required for hyperthermia, vomiting, and myalgia, using symptomatic medications orally. No severe AEs occurred.

A significant increase in the level of GGT ($P = 0.004$) was observed in pre- and post-treatment biochemical parameters (Table 1). Normal and abnormal biochemical test results comparing D0 and D3 by using the McNemar related (matched) samples test are shown in Table 1. No significant changes were observed.

The following hematologic alterations were observed during D0–D3: a decrease in monocytes ($P < 0.001$) and eosinophilic granulocytes ($P < 0.001$) (Table 1). Normal and abnormal hematologic test results comparing D0 and D3 by using the McNemar related (matched) samples test are shown in Table 1. A significant improvement of eosinophilic granulocytes to normal levels was observed.

DISCUSSION

The Amazon region shows a high *M. ozzardi* prevalence with infection rates ranging from 0.4% to 70% depending on the locality studied and the diagnostic methods used.[4,9–12] In this study, the *M. ozzardi* prevalence was 43.3% (74/171) by using the polycarbonate membrane method, which was found to be more sensitive than the diagnostic methods used in a previous study.[30] Mansonelliasis can thus be considered a neglected disease mainly in the Brazilian Amazon and throughout the Americas and in the Caribbean.

Although inevitable, the study dropout rate was high. Anticipating this fact, we increased the original sample (40 patients) to 74 patients. The main cause of the high dropout rate was emigration or patient absence from the study area during visits by the research team.

The use of ivermectin in this study was determined by the extensive use of this medication in anthelmintic human treatments. Since 1987, this drug has been used in the treatment of filariae of medical significance such those of *Onchocerca volvulus*, *M. perstans*, and *M. streptocerca* in Africa.[31–37] However, there are few studies on the specific treatment of *M. ozzardi* with this drug.[1,18,19,38]

This study confirmed the effectiveness of ivermectin in parasitologic blood clearance of previous studies.[1,18,19] This study also showed that the microfilariae of *M. ozzardi* blood clearance persisted after a year, thus providing more detailed clearance information than obtained in other studies.[1,18,19]

Regarding the biochemical parameters, GGT levels showed a significant increase ($P = 0.004$, by Wilcoxon signed-rank test), although no statistically significant alterations were observed in for bilirubin, aminotransferases, urea, and serum creatinine levels. Few studies have focused on these parameters and this was the first such study conducted in Brazil. It is worth pointing out that the increase in GGT levels had no clinical repercussions. The Wilcoxon signed-rank test showed a significant decrease in monocytes ($P < 0.001$) and eosinophilic

granulocytes ($P < 0.0001$) between D0 (after treatment) and D3 (72 hours after treatment), as expected. In addition, the results suggested an improvement in normal levels of eosinophilic granulocytes. Unlike previous studies, this study showed leukocyte alterations in only 1.3% of the patients compared with leukocyte alterations in 16.2% of the patients reported by Batista and others,[12] and 6.5% of the patients reported by Tavares.[8]

The only consistent finding between this study and previous studies was the alteration of eosinophilia (64.4%). The same alterations were described by Batista and others[12] and Tavares,[8] and an extremely high value was reported by Nutman and others,[19] who reported 20% eosinophilia in one patient. However, values of eosinophil counts returned to normal levels after treatment ($P = 0.013$, by McNemar test and $P < 0.001$, Wilcoxon signed-rank test).

Another objective of the present study was to evaluate and compare the actual effectiveness of ivermectin and adverse reactions associated with treatment. To achieve this goal, treatment was supervised and patients were followed-up for 72 hours to evaluate signs and symptoms. The adverse reactions were not restrictive, although they occurred in a significant number (64.9%) of the patients. However, by D3, no adverse reactions remained, which was consistent with results of previous studies.[19,38]

Up to 30 days after the treatment, 68 (91.9%) of 74 persons reported relief from all symptoms that were present before treatment (hemoptysis, abdominal pain, back and neck pain, arthralgia, asthenia, leg pain, arm pain, chest pain, dyspnea, dizziness, headache, fever, body itching, nausea, vomiting, cold legs, adenomegaly, and blurred vision). It is also plausible that symptom alleviation could be caused by the treatment of other helminthes besides *M. ozzardi*..

Because this was a non-randomized single-arm study, these results may be biased and have a natural limitation, as described by Deeks and others.[27] We are aware that non-randomized study limitations are more remarkable when the intervention outcome is difficult to measure and that non-randomized designs should be undertaken only when randomized controlled trials are infeasible or unethical. In the absence of another treatment design, the ethics committee consulted reported that a randomized controlled trial would be unethical. Considering the dimension and the homogeneity of the results (in all 53 followed-up patients, the *M. ozzardi* clearance that was observed three days after the intervention was sustained for one year), we could not determine any other factor that could be related to such simultaneous, sustained clearance. Also, considering that no restrictive adverse reactions occurred and no adverse reactions remained at D3, corroborating the findings of previous studies,[19,38] it could be stated that ivermectin was safe.

Prichard and others reported the importance of establishing a research agenda for human helminthic diseases.[39] Considering the results from this study, we suggest that mansonelliasis should be included on that agenda. Moreover, the use of ivermectin may also contribute to the treatment of other helminthic diseases that also occur at this region, and its use could be a relevant strategy for public health programs in areas to which more than one disease is co-endemic.

Future controlled clinical assays based on these findings should evaluate the use of ivermectin in relation to other anti-helminthic drugs and/or a placebo to better understand clinical symptoms in a blind and randomized design over a two-year period. The prolonged suppression of microfilaraemia (12 months) and no severe AEs suggest the possibility of using this medication to control mansonelliasis.

Received July 14, 2013. Accepted for publication February 16, 2014.

Published online April 7, 2014.

Acknowledgments: We thank Professor Marisis Camargo, Professor Emey Camargo, and Flavia Fontes for English review of the manuscript; Marcelo Zagonel (Instituto Nacional de Genética Médica Populacional of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for drawing the map; and people of Lábrea Municipality, Brazilian Amazon, for participating in the study.

Financial support: This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant no. 2008/10817-6).

Authors' addresses: Sergio de Almeida Basano, Secretaria de Saúde do Estado de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil, and Faculdade São Lucas, Departamento de Medicina, Porto Velho, Rondônia, Brazil, E-mail: sergio@icbusp.org. Gilberto Fontes, Universidade Federal de São João Del Rei, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil, E-mail: gilberto.fontes@pq.cnpq.br. Jansen Fernandes Medeiros and Ricardo de Godoi Mattos Ferreira, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz-Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil, E-mails: jmedeiro@gmail.com and ricardogodoi@fiocruz.br. Juliana Souza de Almeida Aranha Camargo, Luana Janaína Souza Vera, Marcos Paulo Parente Araújo, and Maira Santiago Pires Parente, Faculdade São Lucas, Porto Velho, Rondônia, Brazil, E-mails: juliana@icbusp.org, janaina@icbusp.org, marcos_medppa@hotmail.com, and maira_s_pires@hotmail.com. Pedro di Tárique Barreto Crispim, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil. Luís Marcelo Aranha Camargo, Faculdade São Lucas, Departamento de Medicina, Porto Velho, Rondônia, Brasil, and Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas 5, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, E-mail: spider@icbusp.org.

REFERENCES

1. Tavares AM, Fraiha Neto H, 1997. Mansonelose. Leão RN, ed. *Doenças Infecciosas e Parasitárias, Enfoque Amazônico*. Belém, Brazil: UEPA/Instituto Evandro Chagas, 733–737.
2. Cerqueira NL, 1959. Sobre a transmissão da *Mansonella ozzardi*. *J Bras Med 1:* 885–914.
3. Shelley AJ, Coscarón S, 2001. Simuliid blackflies (Diptera: Simuliidae) and Ceratopogonide midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in northern Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz 96:* 451–458.
4. Deane MP, 1949. Sobre a incidência de filárias humanas em Manaus, estado do Amazonas. *Rev Serv Esp Saude Publ 2:* 849–858.
5. Lacerda NB, Rachou RG, 1956. Filarioses humanas nas sedes municipais do Estado do Amazonas e territórios do Acre, Guaporé Rio Branco. *Rev Bras Malariol Doencas Trop 8:* 437–442.
6. Moraes MA, 1959. Estudo sobre a variação nictemeral da microfilaremia de *Mansonella ozzardi*. *Hospital 56:* 869–873.
7. Moraes MA, 1976. *Mansonella ozzardi* microfilariae in skin snips. *Trans R Soc Trop Med Hyg 70:* 16.
8. Tavares AM, 1981. *Estudo da Infecção por Mansonella ozzardi*. MsD Thesis, Universidade de Brasília, Brasília.
9. Medeiros JF, Py-Daniel V, Barbosa UC, Ogawa GM, 2008. Ocorrência da *Mansonella ozzardi* (Nematoda, Onchocercidae) em comunidades ribeirinhas do rio Purus, Município de Boca do Acre, Amazonas, Brasil. *Cad Saude Publica 25:* 1421–1426.
10. Medeiros JF, Py-Daniel V, Barbosa UC, Izzo TJ, 2009. *Mansonella ozzardi* in Brazil: prevalence of infection in riverine communities in the Purus region, in the state of Amazonas. *Mem Inst Oswaldo Cruz 104:* 74–80.
11. Medeiros JF, Py-Daniel V, Barbosa UC, 2011. Prevalence of *Mansonella ozzardi* among riverine communities in the Labrea municipality, State of Amazonas, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop 44:* 186–190.

12. Batista D, Oliveira WR, Rabello VD, 1960. Estudo da patogenicidade da *Mansonella ozzardi* e da sintomatologia da mansonelose. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2:* 281–289.
13. Oliveira WR, 1961. Filarioses humanas na cidade de Manaus. *Hospital 56:* 301–303.
14. Branco BC, Chamom W, Belfort Neto R, Belfort JR, Costa AJA, 1998. Achados oculares entre habitantes do município de Pauini e possível associação entre lesões corneanas e mansonelose na Amazônia. *Arq Bras Oftalmol 61:* 674–682.
15. Garrido C, Campos M, 2001. First report of presumed parasititic keratitis in indians from the Brazilian Amazon. *Cornea 19:* 817–819.
16. Vianna LMM, Martins M, Cohen MJ, Cohen JM, Belfort R Jr, 2012. *Mansonella ozzardi* corneal lesions in the Amazon: a cross-sectional study. *BMJ Open 27:* 1–5.
17. Bartoloni A, Cancrini G, Bartalesi F, Marcolin D, Roselli M, Arce CC, Hall AJ, 1999. *Mansonella ozzardi* infection in Bolivia: prevalence and clinical associations in the Chaco region. *Am J Trop Med Hyg 61:* 830–833.
18. Gonzalez AA, Chadee DD, Rawlins SC, 1999. Ivermectin treatment of mansonellosis in Trinidad. *West Indian Med J 48:* 231–234.
19. Nutman TB, Nash TE, Ottesen EA, 1987. Ivermectin in the successful treatment of a patient with *Mansonella ozzardi* infection. *J Infect Dis 156:* 662–665.
20. Bisoffi Z, Buonfrate D, Angheben A, Boscolo M, Anselmi M, Marocco S, Monteiro G, Gobbo M, Bisoffi G, Gobbi F, 2011. Randomized clinical trial on ivermectin versus thiabendazole for the treatment of strongyloidiasis. *PLoS Negl Trop Dis 5:* e1254.
21. Suputtamongkol Y, Kungpanichkul N, Silpasakorn S, Beeching NJ, 2008. Efficacy and safety of a single-dose veterinary preparation of ivermectin versus 7-day high-dose albendazole for chronic strongyloidiasis. *Int J Antimicrob Agents 31:* 46–49.
22. Wen LY, Yan XL, Sun FH, Fang YY, Yang MJ, Lou LJ, 2008. A randomized, double-blind, multicenter clinical trial on the efficacy of ivermectin against intestinal nematode infections in China. *Acta Trop 106:* 190–194.
23. Naquira C, Jimenez G, Guerra JG, Bernal R, Nalin DR, Neu D, Aziz M, 1989. Ivermectin for human strongyloidiasis and other intestinal helminths. *Am J Trop Med Hyg 40:* 304–309.
24. Araújo CF, Fernandez CL, 2005. Prevalência de parasitoses intestinais na cidade de Eirunepé, Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop 38:* 69.
25. Gómez J, Magris M, Marín A, Frontado H, Rangel T, Botto C, 2000. Estudio del efecto de ivermectina en helmintos intestinales en comunidades yanomamis del Alto Orinoco Estado Amazonas Venezuela. *Bol Soc Venez Microbiol 20:* 131–134.
26. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2010. *Populações e Domicílios – Brasil, Censo 2007.* Available at: http://www.ibge.gov.br/home. Accessed February 10, 2012.
27. Deeks JJ, Dinnes J, D'Amico R, Sowden AJ, Sakarovitch C, Song F, Petticrew M, Altman DG, 2003. Evaluating non-randomised intervention studies. *Health Technol Assess 7:* 1–173.
28. Chularerk P, Desowitz RS, 1970. A simplified membrane filtration technique for the diagnosis of microfilaraemia. *J Parasitol 56:* 623–624.
29. Ottesen EA, Campbell WC, 1994. Ivermectin in human medicine. *J Antimicrob Chemother 34:* 195–203.
30. Vera LJ, Basano SA, Camargo JS, França AK, Ferreira RG, Casseb AA, Medeiros JF, Fontes G, Camargo LM, 2011. Improvement of a PCR test to diagnose infection by *Mansonella ozzardi*. *Rev Soc Bras Med Trop 44:* 380–382.
31. Aziz MA, Diallo S, Diop IM, Lariviere M, Porta M, 1982. Efficacy and tolerance of ivermectin in human onchocerciasis. *Lancet 2:* 171–173.
32. Fischer P, Buttner DW, Bamuhiiga J, Willians SA, 1998. Detection of the filarial parasite *Mansonella streptocerca* in skin biopsies by a nested polymerase chain reaction-based assay. *Am J Trop Med Hyg 58:* 816–820.
33. Fischer P, Tukesiga E, Buttner D, 1999. Long term suppression of *Mansonella streptocerca* microfilariae after treatment with ivermectin. *J Infect Dis 180:* 1403–1405.
34. Kyelem D, Sanou S, Boatin B, Medlock J, Coulibaly S, 2003. Impact of long-term ivermectin (Mectizan) on *Wuchereria bancrofti* and *Mansonella perstans* infections in Burkina Faso: strategic and policy implications. *Ann Trop Med Parasitol 97:* 827–838.
35. Kyelem D, Medlock J, Sanou S, Bonkoungou M, Boatin B, 2005. Impact of long-term (14 years) bi-annual ivermectin on *Wuchereria bancrofti* microfilaraemia. *Trop Med Int Health 10:* 1002–1004.
36. Mas J, Ascaso C, Escaramis G, Abellana R, Duran E, 2006. Reduction in the prevalence and intensity of infection in *Onchorcerca volvulus* microfilariae according to ethnicity and community after 8 years of ivermectin treatment on the island of Bioko, Equatorial Guinea. *Trop Med Int Health 11:* 1082–1091.
37. Canga AG, Prieto MA, Liébana MJ, Martínez NF, Veja MS, 2008. The pharmacokinets and interactions of ivermectin in humans – A mini-review. *AAPS J 10:* 42–46.
38. Krolewiecki AJ, Cajal SP, Villalpando C, Gil JF, 2011. Invermectin-related adverse clinical events in patients treated for *Mansonella ozzardi* infections. *Rev Arg Microb 43:* 48–50.
39. Prichard RK, Basáñez MG, Boatin BA, McCarthy JS, García HH, Yang GJ, Sripa B, Lustigman S, 2012. A research agenda for helminth diseases of humans: intervention for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis 6:* e1549.

APÊNDICE G - Artigo aceito para publicação

BASANO, S. A.; FONTES, G.; MEDEIROS, J. F.; CAMARGO, J. S. A. A.; VERA, L. J. S.; FERREIRA, R. G. M.; CAMARGO, L. M. A. Occurrence of *Mansonella ozzardi* using polycarbonate membrane in riverside population of Lábrea, western Brazilian Amazon *Mansonella ozzardi* (Manson, 1897) in Purus river. **(No prelo-Revista da Sociedade Braileira de Medicina Tropical)**

Occurrence of *Mansonella ozzardi* using polycarbonate membrane in riverside population of Lábrea, western Brazilian Amazon

Mansonella ozzardi in Purus river

ABSTRACT

Introduction:*Mansonella ozzardi* is one of the filaria worms with wide distribution in the amazon region.This study aimed to evaluate the prevalence of infection for *M. ozzardi* in riverine communities of the municipality of Lábrea using as a diagnostic method the filtration of blood in polycarbonate membrane. **Methods**: The prevalence of microfilariaemic individuals was investigated using as diagnostic blood filtration in polycarbonate membrane in the municipality of Lábrea, Amazonas State, Brazil. **Results**: *M. ozzardi* was found in 50.3% of persons examined, the highest prevalence was found in farmers/fishermen (69.4%) (ANOVA χ^2 = -19.14, $p<0.001$).It was observed that the prevalence was higher in those individuals who live longer in the communities (≥11 years=60.2%). **Conclusions**: These results confirm that rates of *M. ozzardi* infection are high in Purus river, suggesting that the prevalence are much greater than has been previously reported in other studies, using thick blood smear as diagnostic method.

Keywords: Mansonelliasis.*Mansonella ozzardi*. Brazilian Amazon.

*Mansonella ozzardi*is one of the filaria worms that parasitize humans with wide distribution in the State of Amazonas, Brazil, with high prevalences detected in residents of some regions of the Solimões, Negro and Purus rivers[1-5]. Simuliidae (blackflies) is the only vector of *M. ozzardi* in Brazil[6,7].

One of the endemic regions to *M. ozzardi* in Brazil is located in the municipality of Lábrea, in Purus river region, Amazonas, where it has been found since the first survey in the 1950s[1].Subsequently, studies in the 1970s and 1980s confirm the wide distribution of *M. ozzardi* in this region[8,9]. and more recently it was shown that the prevalence of this infection increased in riverine communities located in the Purus and Ituxi rivers [2,4].

In the Purus river region, only Adami et al.[10]utilized the concentration method (method of Knott) for the diagnosis of mansonelliasis. Therefore, this study aimed to evaluate the prevalence of infection for *M. ozzardi* in riverine communities of the municipality of Lábrea using as a diagnostic method the filtration of blood in polycarbonate membrane,that is more sensitive than thick blood smears[11].

This study was conducted in the riverside communities on the Purus river (Cassianã, Bacural, Jucuri, Buraco, Santa Rosa, Jurucuá and Samaúma), located approximately 200 km from the municipality of Lábrea (S: 07º15’ 34” and W: 64º47’ 59”), Amazonas State, Brazil (Fig.).

The sample consisted of volunteer men, women and children between 5 and 60 years selected by convenience and by a non-randomized form. It was estimated that there were 350 inhabitants in the communities evaluated, of which 171 (48.6%)were present at the time of the study and agreed to participate. To estimate the prevalence of *M. ozzardi*, was used the technique of filtration ofblood in polycarbonate membrane.[12]One milliliter of venous blood was collected from each individual that was diluted in 10ml of 0.9% saline and filtered in polycarbonate membrane (Nucleopore Corporation, Pleasanton, CA, USA), with pore size of 3µm of diameter. Subsequently, the membranes were removed from the filters and mounted on microscope slides, fixed in methanol, stained with Panoptic kit® and examined under an optical microscope with a 200 magnificence to search for microfilariae of *M. ozzardi*.

The prevalence of microfilariaemic individuals were evaluated in relation to gender, age group (5-15, 16-30, 31-45, 46-60), occupation (farmer/fishermen, housewife, students and

others) and time of residence (1 to 5 years, 6 to 10 years and ≥ 11 years) of individuals examined. The prevalence between genders was evaluated by the chi-square test (χ^2). The χ^2 test and trend analysis was conducted to see if there is a possible association between the number of microfilariaemic individuals and residence time of the riverine population[13]. The occupancy data and age group data were compared using the Linear Generalized Models. Subsequently, was performed a contrast analysis to verify in which were the differences were described. Furthermore, odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were determined for each group using OpenEpi. The data were adjusted to binomial distribution for errors and analyzed with the significance level of 5%.

Of the 171 individuals examined, 50.3% (95% CI: 42.8–57.8) had microfilariae and the prevalence of microfilariaemic individuals between communities ranged from 38.9% to 66.7% (Table). This is the first epidemiological survey that uses the filtration of blood in polycarbonate membrane for the diagnosis of *M. ozzardi* in the Purus river region, showing that this rate (50.3%) is higher to those found in other study in the Purus river region that used the thick blood smear: in Lábrea, was found a 20.7% prevalence of microfilariaemic individuals[4]. In othersPurus River municipalities, such as Pauini and Boca do Acre, prevalence of 24.8% and 24.1%, respectively, were found[3,14].Therefore, thick blood smear method presented above showlow levels of prevalence of*M. ozzardi*in the relation to this work, and thus, must be considered that there is a loss of sensitivity evidenced by the method of filtration ofblood in polycarbonate membrane, and consequently there is an under-reporting of the prevalence of microfilariaemic individuals by *M. ozzardi* in the Purus River region. Adami et al.[10]found high parasitic loads infection incommunities of the Purus river [Monte Verde (63.3%) and Praia do Gado (54.5%), Boca do Acre municipality] using the method ofKnott. In addition, the infection rates observed in Monte Verde were much higher than have previously been described (33.3%)[14]. Recently Vera et al.[15] also indicated higher sensitivity of polymerase chain

reaction (72.3% positive) compared to thick blood smear(42.6% positive) in the diagnosis of *M. ozzardi*. Our data corroborates with other studies that also found high prevalence (above 50%) of mansonelliasis in the riverine population of Purus[10,15].The prevalence rates was higher in men (52.5%) than among women (48.4%), however, without statistically difference significant (p=0.644). As to age group, it was observed that the number of microfilariaemic individuals increased according to age group (ANOVA χ^2 = -15.82, p<0.001) (Table). The prevalence of *M. ozzardi* was higher in male farmers/fishermen [49 examined/34 parasitized (69.4%)]and housewife[50 examined/30 parasitized (60.0%)] than in other occupational groups (ANOVA χ^2 = -19.14, p<0.001). The OR analyses for gender, occupation and age group indicated the following: men had a higher risk ratio than women (OR: 1.18; 95% CI: 0.64-2.16); according to occupation, the highest risk of acquiring the infection was in farmer/fishermen (OR: 5.32; 95% CI: 2.38-11.8) and individuals in the age group45-60(OR: 5.06; CI 95%: 1.84-14.5) (Table). For 166 individuals, the time of residence in the community has been checked and it was observed that the prevalence of microfilariaemic individuals increased with the residence time: 1 to 5 years: 24.0% (25 examined/6 microfilariaemic), 5 to 10 years: 39.5% (38 examined /15 microfilariaemic) and ≥11 years 60.2% (103 examined /62 microfilariaemic), showing a positive trend increasing significant (A=11,33; χ^2= 4,66, p=0,03) of the number of cases according to the time of residence in the area evaluated.

The slightly higher prevalence in men, although not significant, is possibly attributed to the increased contact of these, in their day-to-day, with insect vectors and isconsistent with the observation of other studies conducted in the Amazonas State[3-5,9,16].This degree of exposure to Simuliidae bites also explains the higher prevalence in individuals that work in the field, such as farmers, but also inthose with higher age[3-5,10].In this particular scenario, women are highly exposed to vectors due to their work in the fields with their husbands, leading to a high infection rate. Moreover, it was observed that the longer time living of individuals in

communities (≥11 years of housing), contributes to higher rates of infection. This observation shows evidence that the time of residence in endemic area, and consequently exposure to vectors are crucial for the maintenance of infection by *M. ozzardi*, and possibly is one of the factors responsible for an accumulation of parasites in the individuals, keeping several adult worms of different ages sustaining a continuous production of microfilariae, infection and transmission by insect vectors[3,5].There are no previous reports on time housing and prevalence rates ofmansonelliasis, however it is believed that this profile possibly also occurs in other regions.

Another important finding established in this study is that the filtration of blood in polycarbonate membrane was able to detect a high number of children and adolescents from 5-15 years of ageparasitized (32.4%), unlike other studies that used the thick blood smear method that found much lower prevalence of microfilariaemic individuals, for example, Medeiros et al.[2-4] who observed in individuals aged 10-18 years, prevalence of 20.7%, 9.7% and 10.2% respectively.

This study showed that the infection by *M. ozzardi* was present in 50.3% of the local population examined, suggesting that the prevalence of this parasite in the region are higher than those recorded in recent surveys[2-4]. This work shows that the method offiltration of blood in polycarbonate membrane can be used in epidemiological surveys, especially in regions of low microfilariae density, or in post-treatment control programs, which can be performed in field activity with minimum conditions for storing blood for later analysis. Finally, we highlight the need to structure an appropriate control model of this Amazonian endemic disease, currently neglected by the health authorities.

COMPETING INTERESTS

None declared.

REFERENCES

1. Lacerda NB, Rachou RG. Filarioses humanas nas sedes municipais do estado do Amazonas e territórios do Acre, Guaporée Rio Branco. Rev Bras Malariol Doenças Trop1956; 8: 437-442.
2. Medeiros JF, Py-Daniel V, Barbosa UC, Ogawa GM. Current profile of *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in communities along the Ituxi river, Lábrea municipality, Amazonas, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz2008;103: 409-411.
3. Medeiros JF, Py-Daniel V, Barbosa UC, Izzo TJ. *Mansonella ozzardi* in Brazil: prevalence of infection in riverine communities in the Purus region, in the state of Amazonas. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009a ;104: 74-80.
4. Medeiros JF, Py-Daniel V, Barbosa UC. Prevalence of *Mansonella ozzardi* among riverine communities in the municipality of Lábrea, state of Amazonas, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop2011;44: 186-190.
5. Martins M, Pessoa FAC, Medeiros MB, Andrade EV, Medeiros JF. *Mansonella ozzardi* in Amazonas, Brazil: prevalence and distribution in the municipality of Coari, in the middle Solimões river. Mem Inst Oswaldo Cruz2010;105: 246-253.
6. Batista D, Cerqueira NL, Moraes MAP. Epidemiologia da mansonelose em localidade do interior do Amazonas. Rev Ass Med Bras 1960a;6: 176-184.
7. Cerqueira NL. Sobre a transmissão da *Mansonella ozzardi*. J Bras Med 1959; 1: 885-914.
8. Shelley AJA. Preliminary survey of the prevalence of *Mansonella ozzardi* in some rural communities on the river Purus, state of Amazonas, Brasil. Ann Trop Med Parasitol1975;69: 407-412.

9. Tavares AM. Estudo da infecção por *Mansonella ozzardi*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília; 122pp, 1981.
10. Adami YL, Rodrigues G, Alves MC, Moraes MAP, Banic MD, Maia-Herzog M. New records of *Mansonella ozzardi*: a parasite that is spreading from the state of Amazonas to previously uninfected areas of the state of Acre in the Purus River region. Mem Inst Oswaldo Cruz 2014;109: 87-92.
11. Fontes G, Rocha EMM. *Wuchereria bancrofti* – Filariose linfática. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. Parasitologia Humana. 12ed. Rio de Janeiro: Ed. Atheneu, p. 323-333,2011.
12. Dennis DT, Kean BH. Isolation of microfilariae: report of a new method. J Parasit 1971;57: 1146-1157.
13. Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AA. Bioestat 5.0. USP, São Paulo. 359p, 2007.
14. Medeiros JF, Py-Daniel V, Barbosa UC, Ogawa GM. Ocorrência da *Mansonella ozzardi* (Nematoda, Onchocercidae) em comunidades ribeirinhas do rio Purus, Município de Boca do Acre, Amazonas, Brasil. Cad Saude Publica 2009b;25:1421-1426.
15. Vera LJ, Basano SA, Camargo JS, França AK, Casseb AA, Medeiros JF, Fontes G, Camargo LMA 2011. Improvement of a PCR test to diagnose infection by *Mansonella ozzardi*. Rev Soc Bras Med Trop 44: 380-382.
16. Batista D, Oliveira WR, Rabello VD. Estudo da patogenicidade da *Mansonella ozzardi* e da sintomatologia da mansonelose. Rev Inst Med Trop Sao Paulo1960b;2: 281-289.

APÊNDICE H - Tabelas sintomas

Tabela 1.

SINAIS E SINTOMAS D0					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Não	17	23.0	23.0	23.0
	Sim	57	77.0	77.0	100.0
	Total	74	100.0	100.0	

Tabela 2.

COMPARAÇÃO_NUMERO_SINAIS_E_SINTOMAS					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	aumentou	4	5.4	5.4	5.4
	ficou igual	14	18.9	18.9	24.3
	diminui	56	75.7	75.7	100.0
	Total	74	100.0	100.0	

Tabela 3.

		Frequency	**Percent**	**Valid Percent**	**Cumulative Percent**
		17	23.0	23.0	23.0
	artralgia	2	2.7	2.7	25.7
	artralgia,mialgia	1	1.4	1.4	27.0
	artralgia,tremor,sonolencia,ac	1	1.4	1.4	28.4
	artralgia,vermelhidao	1	1.4	1.4	29.7
	cefaleia	2	2.7	2.7	32.4
	cefaleia, dor abdominal	2	2.7	2.7	35.1
	cefaleia,diminuição da acuidade visual	1	1.4	1.4	36.5
	cefaléia,dor abdominal,diarréia	1	1.4	1.4	37.8
Valid	cefaleia,dor abdominal,diarreia,artralgia,prurido,mialgia,vermelhidao,ac	1	1.4	1.4	39.2
	cefaleia,nausea,artralgia,tremor,mialgia,diminuição de acuidade	1	1.4	1.4	40.5
	cefaleia,vertigem,anorexia,artralgia,adenite,ac	1	1.4	1.4	41.9
	cefaleia,vertigem,anorexia,mialgia,diminuição de acuidade	1	1.4	1.4	43.2
	cefaleia,vertigem,artralgia,sonolência	1	1.4	1.4	44.6
	cefaleia,vertigem,artralgia,sonolência,vermelhidão olhos	1	1.4	1.4	45.9
	cefaleia,vertigem,dor abdominal,nausea,prurido,tremor,mialgia,sonolencia	1	1.4	1.4	47.3

cefaleia,vertigem,nausea,tremor,mialgia	1	1.4	1.4	48.6
cefaleia,vertigem,sonolencia,vermelhidao olhos	1	1.4	1.4	50.0
dermatite, mialgia, prurido, hepatomegalia	1	1.4	1.4	51.4
dermatose	2	2.7	2.7	54.1
dor abdominal	2	2.7	2.7	56.8
dor abdominal,artralgia,prurido,tremor	1	1.4	1.4	58.1
dor abdominal.prurido	1	1.4	1.4	59.5
exantema, artralgia,mialgia	1	1.4	1.4	60.8
fraqueza, cefaleia,vertigem,nausea,artralgia,diminuição de acuidade	1	1.4	1.4	62.2
fraqueza,anorexia,mialgia	1	1.4	1.4	63.5
fraqueza,artralgia,ac	1	1.4	1.4	64.9
fraqueza,cefaléia, artralgia	1	1.4	1.4	66.2
fraqueza,cefaleia,artralgia,mialgia	1	1.4	1.4	67.6
fraqueza,cefaleia,artralgia,mialgia,ac	2	2.7	2.7	70.3
fraqueza,cefaléia,artralgia,sonolência,dormencia	1	1.4	1.4	71.6
fraqueza,cefaleia,dor abdominal,artralgia	1	1.4	1.4	73.0
fraqueza,cefaleia,dor abdominal,artralgia,prurido,edema,tremor, mialgia,verme,sono	1	1.4	1.4	74.3
fraqueza,cefaleia,dor abdominal,prurido,edema,vermelhidao,ac	1	1.4	1.4	75.7
fraqueza,cefaléia,vertigem,artralgia, prurido,tremor, mialgia,diminuição da acuidade visual	1	1.4	1.4	77.0
fraqueza,cefaléia,vertigem,artralgia,tremor	1	1.4	1.4	78.4
fraqueza,cefaleia,vertigem,artralgia,tremor ,sonolencia,vermelhidao,ac	1	1.4	1.4	79.7
fraqueza,cefaleia,vertigem,dor abdominal,anorexia,nausea,artralgia,mialgia	1	1.4	1.4	81.1
fraqueza,cefaléia,vertigem,dor abdominal,artralgia,sonolência,placas,máculas	1	1.4	1.4	82.4
fraqueza,cefaleia,vertigem,dor abdominal,prurido,tremor,adenite,sonolencia,acui	1	1.4	1.4	83.8
fraqueza,cefaleia,vertigem,nausea,artralgia ,mialgia,ac	1	1.4	1.4	85.1
fraqueza,cefaleia,vertigem,nausea,artralgia ,mialgia,sonolencia	1	1.4	1.4	86.5
fraqueza,dor abdominal,anorexia,diarreia, artralgia,diminuição visual	1	1.4	1.4	87.8
fraqueza,dor abdominal,artralgia	1	1.4	1.4	89.2
fraqueza,dor abdominal,nausea,vermelhidao olhos,ac	1	1.4	1.4	90.5
fraqueza,prurido,tremor,vista vermelha	1	1.4	1.4	91.9
fraqueza,vertigem,anorexia,artralgia,pruridotremor,mialgia	1	1.4	1.4	93.2
mialgia	1	1.4	1.4	94.6

prurido	1	1.4	1.4	95.9
sonolencia, dermatite	1	1.4	1.4	97.3
sonolencia,irritação na vista	1	1.4	1.4	98.6
vertigem,nausea,diarreia,prurido,mialgia,sonolência,dor abdominal, falta de ar	1	1.4	1.4	100.0
Total	74	100.0	100.0	

Tabela 4.

SINAIS E SINTOMAS D3

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Não	47	63.5	63.5	63.5
	Sim	27	36.5	36.5	100.0
	Total	74	100.0	100.0	

Tabela 5

		Frequency	**Percent**	**Valid Percent**	**Cumulative Percent**
Valid		47	63.5	63.5	63.5
	ac	1	1.4	1.4	64.9
	artralgia	3	4.1	4.1	68.9
	artralgia,ac	1	1.4	1.4	70.3
	artralgia,tontura	1	1.4	1.4	71.6
	calafrio,sonolência	1	1.4	1.4	73.0
	cefaleia	4	5.4	5.4	78.4
	cefaléia	3	4.1	4.1	82.4
	cefaléia, vertigem	1	1.4	1.4	83.8
	cefaléia, vertigem, artralgia	1	1.4	1.4	85.1
	cefaleia,vertigem,visãoescura	1	1.4	1.4	86.5
	diminuição da acuidade visual	5	6.8	6.8	93.2
	dor abdominal	1	1.4	1.4	94.6
	nausea,vomito	1	1.4	1.4	95.9
	sonolencia	1	1.4	1.4	97.3
	tontura	1	1.4	1.4	98.6
	vertigem	1	1.4	1.4	100.0
	Total	74	100.0	100.0	

Tabela 6

Variável		**N**	**Prevalencia (%)**	**RP**	**IC 95%**
Gânglios	Sim	42	16,7	0,81	0,38 – 1,73
	Não	116	20,7	1	
Dermatoses	Sim	34	11,8	0,56	0,21 – 1,50
	Não	119	21,0	1	
Dor Abdominal	Sim	60	23,3	1,47	0,78 – 2,77
	Não	107	15,9	1	
Dor nas costas*	Sim	47	29,8	**2,10**	1,13 – 3,92
	Não	120	14,2	1	
Artralgia*	Sim	38	34,2	**2,45**	1,33 – 4,53
	Não	129	14,0	1	

Fraqueza	Sim	53	24,5	1,55	0,82 – 2,93
	Não	114	15,8	1	
Dor nas pernas	Sim	54	27,8	1,96	1,05 – 3,67
	Não	113	14,2	1	
Dor nos braços*	Sim	32	31,2	**2,01**	1,05 – 3,84
	Não	135	15,6	1	
Dor no peito*	Sim	26	34,6	**2,22**	1,15 – 4,26
	Não	141	15,6	1	
Dispneia*	Sim	11	36,4	**2,10**	0,89 – 4,93
	Não	156	17,6	1	
Tontura	Sim	37	24,3	1,44	0,73 – 2,85
	Não	130	16,9	1	
Cefaleia*	Sim	83	27,1	**2,91**	1,38 – 6,13
	Não	84	9,52	1	
Coceira	Sim	35	20,0	1,10	0,52 – 2,34
	Não	132	18,2	1	
Vomito	Sim	13	30,8	1,75	0,72 – 4,25
	Não	154	17,5	1	
Frieza nas pernas	Sim	17	29,4	1,70	0,75 – 3,83
	Não	150	17,3	1	
Visão embaçada	Sim	27	29,6	1,80	0,90 – 3,60
	Não	140	16,4	1	

APÊNDICE I - Tabelas efeitos colaterais

Tabela 1

	EF_COLAT_1_SINTOMA REFERIDO	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid		3	4.1	4.1	4.1
	artralgia	2	2.7	2.7	6.8
	cefaléia	18	24.3	24.3	31.1
	dor abdominal	1	1.4	1.4	32.4
	não	23	31.1	31.1	63.5
	sensação de hipertermia	20	27.0	27.0	90.5
	sonolência	2	2.7	2.7	93.2
	tontura	3	4.1	4.1	97.3
	vertigem	2	2.7	2.7	100.0
	Total	74	100.0	100.0	

Tabela 2

	EF_COLAT_2_SINTOMA REFERIDO	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid		3	4.1	4.1	4.1
	artralgia	5	6.8	6.8	10.8
	calafrios	1	1.4	1.4	12.2
	cefaléia	6	8.1	8.1	20.3
	dor abdominal	1	1.4	1.4	21.6
	mialgia	2	2.7	2.7	24.3
	não	43	58.1	58.1	82.4
	náusea	1	1.4	1.4	83.8
	sensação de hipertemia	1	1.4	1.4	85.1
	sensação de hipertermia	4	5.4	5.4	90.5
	sonolência	1	1.4	1.4	91.9
	tontura	1	1.4	1.4	93.2
	vertigem	4	5.4	5.4	98.6
	vômitos	1	1.4	1.4	100.0
	Total	74	100.0	100.0	

Tabela 3

EF_COLAT_3_SINTOMA REFERIDO	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent

		3	4.1	4.1	4.1
	artralgia	3	4.1	4.1	8.1
	borramento visual	2	2.7	2.7	10.8
	cefaléia	1	1.4	1.4	12.2
	mialgia	3	4.1	4.1	16.2
	não	55	74.3	74.3	90.5
Valid	náuseas	1	1.4	1.4	91.9
	sensação de hipertermia	1	1.4	1.4	93.2
	tontura	2	2.7	2.7	95.9
	vertigem	1	1.4	1.4	97.3
	visão escura	1	1.4	1.4	98.6
	vômito	1	1.4	1.4	100.0
	Total	74	100.0	100.0	

Tabela 4

	EF_COLAT_4_SINTOMA REFERIDO				
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
		10	13.5	13.5	13.5
	fraqueza	1	1.4	1.4	14.9
Valid	não	62	83.8	83.8	98.6
	sensação de hipertermia	1	1.4	1.4	100.0
	Total	74	100.0	100.0	

Tabela 5

	Ef. 1	**Ef. 2**	**Ef. 3**	**Ef. 4**
Não	26	46	58	72
Sim	48	28	16	2
Não	35.1%	62.2%	78.4%	97.3%
Sim	64.9%	37.8%	21.6%	2.7%
	74.0	74.0	74.0	74.0

APÊNDICE J - Tabelas efeitos colaterais 2

Tabela 1.

EF	Frequency
artralgia	2
artralgia	5
artralgia	3
artralgia Total	10
borramento visual	2
borramento visual Total	2
calafrios	1
calafrios Total	1
cefaléia	18
cefaléia	6
cefaléia	1
cefaléia Total	25
dor abdominal	1
dor abdominal	1
dor abdominal Total	2
fraqueza	1
fraqueza Total	1
mialgia	2
mialgia	3
mialgia Total	5
não+nulo	26
não+nulo	46
não+nulo	58
não+nulo	72
não+nulo Total	202
náuseas	1
náuseas	1
náuseas Total	2
sensação de hipertermia	1
sensação de hipertermia	20
sensação de hipertermia	4
sensação de hipertermia	1
sensação de hipertermia	1
sensação de hipertermia Total	27
sonolência	2
sonolência	1
sonolência Total	3
tontura	3
tontura	1

tontura	2
tontura Total	6
vertigem	2
vertigem	4
vertigem	1
vertigem Total	7
visão escura	1
visão escura Total	1
vômitos	1
vômitos	1
vômitos Total	2
Total Geral	296

APÊNDICE K - Tabelas efeitos colaterais-tempo

Tabela 1

EF	Início/Fim	Tempo	Frequency	Tempo*Frequência
EF_1_fim	f	48	2	96
EF_1_fim	f	24	7	168
EF_2_fim	f	24	7	168
EF_3_fim	f	24	4	96
EF_4_fim	f	24	1	24
EF_1_fim	f	18	1	18
EF_1_fim	f	14	1	14
EF_2_fim	f	14	1	14
EF_3_fim	f	14	1	14
EF_1_fim	f	12	29	348
EF_2_fim	f	12	13	156
EF_3_fim	f	12	6	72
EF_1_fim	f	8	2	16
EF_2_fim	f	8	2	16
EF_3_fim	f	8	1	8
EF_1_fim	f	6	3	18
EF_2_fim	f	6	2	12
EF_3_fim	f	6	2	12
EF_1_fim	f	5	1	5
EF_2_fim	f	5	1	5
EF_1_fim	f	2	2	4
EF_2_fim	f	2	1	2
EF_3_fim	f	2	1	2
EF_2_fim	f	1	1	1
EF_3_fim	f	1	1	1
EF_1_início	i	48	1	48
EF_2_início	i	48	1	48
EF_1_início	i	27	1	27
EF_2_início	i	27	1	27
EF_3_início	i	27	1	27
EF_1_início	i	24	13	312
EF_2_início	i	24	7	168
EF_3_início	i	24	4	96
EF_1_início	i	22	1	22
EF_2_início	i	22	1	22
EF_1_início	i	20	1	20
EF_2_início	i	20	1	20
EF_1_início	i	18	1	18
EF_2_início	i	18	1	18
EF_3_início	i	18	1	18

EF_1_início	i	17	1	17
EF_2_início	i	17	1	17
EF_1_início	i	16	1	16
EF_2_início	i	16	1	16
EF_3_início	i	16	1	16
EF_1_início	i	14	1	14
EF_1_início	i	12	17	204
EF_2_início	i	12	11	132
EF_3_início	i	12	7	84
EF_3_início	i	12	1	12
EF_4_início	i	12	1	12
EF_1_início	i	9	1	9
EF_2_início	i	9	1	9
EF_3_início	i	9	1	9
EF_1_início	i	8	3	24
EF_2_início	i	8	1	8
EF_1_início	i	6	1	6
EF_1_início	i	5	1	5
EF_1_início	i	1	2	2
EF_1_início	i	0	2	0
EF_2_início	i	0	1	0

Tabela 2

	Tempos início	**Tempos Fim**
Média	16.16129032	13.87096774
Desvio Padrão	8.405860175	8.157719479

ANEXO A - Protocolo para cálculo de medicação

(Ministério da Saúde do Brasil, lote: NF27660/0832210, registro: 343368-5).

PESO CORPORAL (kg)	DOSE ORAL ÚNICA
15 A 24	**1/2 comprimido**
25 A 35	1 comprimido
36 A 50	**1,5 comprimido**
51 A 65	**2 comprimidos**
66 A 79	**2,5 comprimidos**
>80	**150 mcg/kg**