

GUILHERME MAERSCHNER OGAWA

**PREVALÊNCIA DE *DIROFILARIA IMMITIS* (LEYD,1856) EM CÃES E SUA
OCORRÊNCIA EM MOSQUITOS (DIPTERA, CULICIDAE) NA CIDADE DE PORTO
VELHO, RONDÔNIA, 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 obtenção de Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

GUILHERME MAERSCHNER OGAWA

**PREVALÊNCIA DE *DIROFILARIA IMMITIS* (LEYD,1856) EM CÃES E SUA
OCORRÊNCIA EM MOSQUITOS (DIPTERA, CULICIDAE) NA CIDADE DE PORTO
VELHO, RONDÔNIA, 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 obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-hospedeiro

Orientador: 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
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ogawa, Guilherme Maerschner.

Prevalência de *Dirofilaria immitis* (Leyd, 1856) em cães e sua ocorrência em mosquitos (Diptera, Culicidae) na cidade de Porto Velho, Rondônia, Brasil / Guilherme Maerschner Ogawa. -- São Paulo, 2013.

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: Parasitose transmitida por vetores.

Versão do título para o inglês: Prevalence of *Dirofilaria immitis* (Leyd, 1856) in dogs and occurrence in mosquitoes (Diptera, Culicidae) in the city of Porto Velho, Rondônia, Brazilian Amazon.

1. Dilofilariose animal 2. Filarioses animal 3. Nematoda 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/SBIB055/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Guilherme Maerschner Ogawa.

Título da Tese: Prevalência de *Dirofilaria immitis* (Leyd, 1856) em cães e sua ocorrência em mosquitos (Diptera, Culicidae) na cidade de Porto Velho, Rondônia, 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:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Ocorrência de filarioses caninas e prevalência sazonal de *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856), e seus vetores no Município de Porto Velho, Rondônia-Brasil", protocolado sob o nº1667/2009, utilizando 250 (duzentos e cinquenta) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/05/09.

We certify that the Research "Occurrence of canine filarirosis and seasonal prevalence of *dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) among its vectors in the Porto Velho Municipality, rondoônia-Brasil", utilizing 250 (two hundred fifty) dogs, protocol number 1667/2009, under the Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/20/09.

São Paulo, 21 de maio de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP



Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP - Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

*À minha esposa e
meu filho. Vocês não
são Dirofilaria, mas
moram no meu
coração.*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luís Marcelo Aranha Camargo e todo o pessoal do ICB5 em Monte Negro pelo apoio em todas as etapas do trabalho.

Ao Laboratório de Genética da Faculdade São Lucas pelo apoio no PCR.

A coordenação e alunos de Biologia da Faculdade São Lucas pelo apoio nas coletas.

A Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro do projeto.

A Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Amazonas pela bolsa de estudos.

A todo o pessoal das clínicas veterinárias de Porto Velho que colaborou nas coletas de sangue.

A Mateus Duarte Ribeiro (UNIFRAN) pela análise estatística de Kernel e mapas.

A Dra. Norma W. Labarthe (FIOCRUZ-RJ) por ter cedido e enviado exemplares adultos de *D. immtis*.

RESUMO

OGAWA, G. M. **Prevalência de *Dirofilaria immitis* (Leyd, 1856) em cães e sua ocorrência em mosquitos (Diptera, Culicidae) na cidade de Porto Velho, Rondônia, Brasil.** 2013. 58 f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A dirofilariose canina é uma parasitose de distribuição mundial cujo agente etiológico é um verme nemátoda filarióide. Em sua fase adulta, os vermes produzem microfírias por meio de reprodução sexuada. Sua transmissão ocorre por meio de mosquitos que atuam como hospedeiros intermediários. No Brasil, até o momento, a dirofilariose canina foi encontrada em 15 estados de todas as regiões. A maioria dos estudos está concentrada nas regiões sudeste e sul. A prevalência nacional é de 2%, embora alguns trabalhos tenham encontrado prevalências locais mais elevadas. Neste trabalho apresentamos o primeiro registro de dirofilariose canina para o estado de Rondônia com mapas de distribuição dos cães positivos e análise de mosquitos. Amostras de sangue de 727 cães foram coletadas aleatoriamente na cidade de Porto Velho. As amostras foram analisadas em busca de microfírias e antígenos circulantes usando duas técnicas: microscopia ótica de gota espessa corada com Giemsa e imunocromatografia de fluxo lateral (ICT). As amostras positivas foram também testadas por reação em cadeia de polimerase, as negativas foram testadas na mesma técnica em *pools*. Mosquitos foram coletados no domicílio e peridomicílio de todos os casos de cães positivos. Estes mosquitos foram testados por PCR em busca de DNA de *Dirofilaria immitis*. Um mapa de distribuição dos casos de cães positivos foi elaborado. Noventa e três amostras de sangue foram positivas no ICT, representando 12,8% da amostra total, nenhuma amostra foi positiva na gota espessa. A PCR das amostras de sangue resultou em 10% para as positivas no ICT e 0% nas negativas no mesmo teste. Entre os 93 cães positivos, 89 (95,7%) nasceram em Porto Velho. Nenhuma diferença estatística foi observada entre cães que moram em quintais ou intradomicílio. O mapa de distribuição indica um “hotspot” na região norte da cidade. A PCR dos mosquitos resultou em apenas um pool positivo. A transmissão de dirofilariose canina ocorre na cidade de Porto Velho e a frequência que ocorre nos cães é considerada moderada. A técnica de imunocromatografia e PCR são mais eficazes na detecção de dirofilariose comparadas à gota espessa. A confirmação de transmissão de dirofilariose canina em Porto Velho coloca esta doença no ranking de diagnóstico diferencial de nódulos pulmonares em seres humanos em Porto Velho.

Palavras-chave: Verme do coração. Filária. Nematoda. Amazônia. Rondônia. Dirofilariose.

ABSTRACT

OGAWA, G. M. **Prevalence of *Dirofilaria immitis* (Leyd, 1856) in dogs and occurrence in mosquitoes (Diptera, Culicidae) in the city of Porto Velho, Rondônia, Brazilian Amazon.** 2013. 58 p. Ph. D. thesis (Pathogen-Host Biology interactions) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Heartworm is an infectious disease with worldwide distribution. Mosquitoes acts as intermediary host and vectors. In Brazil, until now, heartworm was found in 15 states with a national prevalence of 2%. The present work aims to report for the first time canine heartworm in the state of Rondônia and confirms the transmission of the disease in the state. Blood samples were randomly collected from 727 dogs in the municipality of Porto Velho. The samples were analyzed for the presence of microfilariae and circulating antigens using two different techniques: thick blood smears microscopy stained with Giemsa and immunochromatography for the detection of filarial antigens. Aiming to test the efficacy of the immunoassay test, all the positive cases were examined by PCR and pools of negative samples were also examined. Mosquitoes were collected at the domiciles presenting positive cases and analyzed by PCR. A distribution map was made with positive cases. Ninety three blood samples out of 727 (12.8%) were positive by the immunoassay technique and none by the thick smear method. All the positive cases by the immunoassay technique were examined by PCR and pools of all negatives samples were also examined resulting in 10% and 0% positivity frequency, respectively. Among the 93 positive dogs, 89 (95.7%) were born in Porto Velho. No differences in the frequency of infection were observed between dogs raised indoor or in the yards. The distribution map indicates a hotspot in the north area of the city. Mosquitoes were analyzed by PCR, resulting in only one positive pool. This result shows that the transmission of canine heartworm is occurring in the municipality of Porto Velho and has moderate prevalence among dogs. The immunoassay technique and the PCR method are more efficient in detecting *D. immitis* infections in dogs when compared to the blood smear technique. The confirmation of heartworm transmission in Porto Velho also includes this disease among the ranks of differential diagnosis of pulmonary nodules in humans in Rondônia.

Keywords: Dirofilariasis. Heartworm. *Dirofilaria immitis*. Amazon. Rondônia. Filarial worm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de transmissão de <i>Dirofilaria immitis</i>	16
Figura 2- Mapa de ocorrência de <i>Dirofilaria immitis</i> na Europa, comparação entre dados até 2001 e de 2001 a 2011.....	17
Figura 3- Mapa de prevalência de <i>D. immitis</i> nos Estados Unidos.....	18
Figura 4- Mapa do estado de Rondônia indicando o município de estudo.....	24
Figura 5- Zonas de coleta divididas de acordo com a população de cães estimada.....	26
Figura 6- Dispositivo para diagnóstico imunocromatográfico.....	30
Figura 7- Exemplo de teste positivo.....	39
Figura 8- Exemplo de gel de agarose com amostras positivas.....	40
Figura 9- Mapa de Porto Velho indicando pontos de GPS das residências dos cães amostrados.....	42
Figura 10- Mapa de Porto Velho com pontos positivos evidenciando “hotspot” em vermelho.....	43
Figura 11- Gel de agarose com amostra positiva.....	44
Figura 12- Imagem de satélite de Porto Velho indicando ponto de coleta de amostra positiva (ponto em vermelho).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação entre sintomas de dirofilariose e cães amostrados em clínicas veterinárias de Porto Velho.....	35
Tabela 2- Total de indivíduos positivos agrupados por faixa etária.....	36
Tabela 3- Número de cães amostrados de acordo com microrregião e população estimada de cães baseada na campanha de vacinação do primeiro semestre de 2010. (população total de cães em Porto Velho estimada em 40 mil).....	38
Tabela 4- Porcentagem de indivíduos positivos divididos por zona de coleta.....	39
Tabela 5- Total de indivíduos positivos agrupados por faixa etária.....	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 <i>Espécies e patogenicidade de filarias caninas</i>	13
1.2 <i>Diagnóstico, profilaxia e tratamento</i>	14
1.3 <i>Dirofilariose pulmonar humana e parasitismo por D. repens</i>	14
1.4 <i>Ciclo de transmissão e desenvolvimento biológico nos hospedeiros e vetores</i> ..	15
1.5 <i>Distribuição mundial de filariose canina</i>	17
1.6 <i>Ocorrência de filariose canina no Brasil</i>	19
1.7 <i>Vetores de filariose canina</i>	20
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 <i>Objetivos adicionais</i>	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 <i>Estudo de ocorrência de dirofilariose canina</i>	25
4.2 <i>Gota espessa</i>	27
4.3 <i>Membrana de policarbonato</i>	27
4.4 <i>Reação em Cadeia de Polimerase –PCR</i>	28
<u>4.4.1 <i>Extração de DNA</i></u>	28
<u>4.4.2 <i>Amplificação de DNA</i></u>	28
<u>4.4.3 <i>Eletroforese em gel de agarose</i></u>	29
4.5 <i>Teste Imunocromatográfico de Fluxo Lateral</i>	29
4.6 <i>Cálculo de prevalência de filariose canina</i>	31
4.7 <i>Relações entre prevalência e características do hospedeiro</i>	31
4.8 <i>Mapa de distribuição de cães amostrados</i>	31
4.9 <i>Coleta de mosquitos</i>	31
4.10 <i>Detecção de infecção natural de vetores por PCR</i>	32
<u>4.10.1 <i>Obtenção do DNA de D.immitis em mosquitos</i></u>	32
<u>4.10.2 <i>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</i></u>	33
<u>4.10.3 <i>Eletroforese em gel de agarose</i></u>	33
5 RESULTADOS	35
5.1 <i>Coletas-Piloto em clínicas veterinárias</i>	35
5.2 <i>Teste de acurácia dos métodos de diagnóstico</i>	37
5.3 <i>Estudo de prevalência na população canina domiciliada</i>	37

<i>5.3.1 Mapa de distribuição de cães amostrados</i>	42
<i>5.4 Análise de vetores</i>	44
6 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	46
<i>6.1 Estudo piloto</i>	46
<i>6.2 Teste de acurácia dos três métodos de diagnóstico</i>	46
<i>6.3 Estudo de prevalência em população canina domiciliada</i>	48
<i>6.4 Coleta e análise de vetores</i>	50
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE - Ficha de amostras.....	57
ANEXOS A - Mapas de Porto Velho com sobreposição de “hotspot”.....	58
ANEXO B - Gráficos de pluviosidade de Porto Velho.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espécies e patogenicidade de filárias caninas

A filariose canina é uma parasitose de distribuição mundial cujos agentes etiológicos são vermes nematodas filarióides. Estas filárias pertencem à ordem Spirurida, subordem Spirurina, superfamília Filarioidea e família Onchocercidae (ANDERSON, 2000). Em sua fase adulta, os vermes produzem microfílias por meio de reprodução sexuada. Sua transmissão ocorre por meio de mosquitos que atuam como hospedeiros intermediários.

No ano de 1626, na Itália, Francesco Birago publicou pela primeira vez o achado de um cão parasitado por verme filarióide (GENCHI; VENCO; GENCHI, 2007). Desde então, nove espécies de filárias caninas já foram descritas no mundo, e no Brasil, até o momento, apenas quatro: *Cercopithifilaria grassii* (Noe, 1907), *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1890), *Dirofilaria repens* Railliet & Henry, 1911 e *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856), sendo a última a mais comum (MANFREDI; DI CERBO; GENCHI, 2007).

A espécie *D. immitis* é a mais estudada devido a sua distribuição cosmopolita e por eventualmente parasitar o homem (MILANEZ DE CAMPOS, 1997). A forma adulta de *D. immitis* se alimenta de plasma e vive por vários meses ou anos. Ela pode ser encontrada no ventrículo direito e nas artérias pulmonares dos cães causando tosse, dispnéia, fraqueza seguida de ascite devido à falha no ventrículo direito, anorexia, desidratação e perda de peso (SEVIMLI et al., 2007).

A patogenicidade varia de acordo com o número de vermes adultos, podendo ser encontrados de 1 a 150 vermes em cada animal. Eles podem alcançar ou não a maturidade sexual em seus hospedeiros ocasionais, como lobos, coiotes, raposas, vários felinos (incluindo gatos domésticos), mustelídeos (ferrets), ursos, castores, quatis, coelhos, veados, lontras, pingüins, cavalos, primatas não-humanos (MANFREDI; DI CERBO; GENCHI, 2007) e o homem. Neste último, não completa o ciclo, mas instala-se nos pulmões, resultando na formação de nódulos que mimetizam tumores, situação diagnosticada como dirofilariose pulmonar humana. *C. grassii*, *A. reconditum* e *D. repens* são consideradas apatogênicas e ainda pouco estudadas (LINDEMANN; EVANS; MCCALL, 1983; SOULSBY, 1982). Suas formas adultas habitam o tecido conjuntivo dos cães, embora ocorram casos incomuns,

como *A. reconditum* que já foi registrada em tecido gorduroso perirenal de cães e *C. grassii* na cavidade peritoneal de cães (TRALDI, 1998). *D. repens* também parasita gatos domésticos e o homem ocasionalmente (PAMPIGLIONE; RIVAS, 2007). Todas as filárias caninas registradas no Brasil produzem microfilárias sanguíneas, exceto *C. grassii* que possui microfilárias linfáticas.

1.2 Diagnóstico, profilaxia e tratamento

Existem diversos métodos de diagnóstico para filariose canina, os mais utilizados são a gota espessa e o método de Knott, ambos por serem rápidos e baratos. Estes são utilizados para identificar as espécies de filárias e fazer a contagem do número de microfilárias circulantes. Apesar de serem muito utilizados, podem ocorrer falsos resultados negativos. Em alguns casos, a população de vermes adultos pode ser formada apenas por vermes do mesmo sexo e, de acordo com a fase biológica do parasita, pode não ocorrer a produção de microfilárias, causando resultado falso negativo no diagnóstico parasitológico. Desta forma é necessário um outro tipo de diagnóstico que seja capaz de detectar vermes adultos. Existem diversos kits comerciais de diagnóstico específicos para *D. immitis* que detectam antígenos produzidos apenas por vermes adultos. Diagnóstico por imagem (raios-X, tomografia etc.) também é uma forma de detectar vermes adultos, mas um baixo número de adultos pode acusar resultado falso negativo. A recomendação da *American Heartworm Society* é a utilização de dois ou mais métodos para diagnóstico.

A ivermectina, na dose de 6 mg/kg, é o fármaco mais utilizado no tratamento e profilaxia. Melhorias no saneamento básico e nas condições de abrigo dos cães também influenciam na profilaxia. O tratamento exige cuidados, porque, após a ingestão da droga, pode ocorrer morte em massa dos vermes adultos, causando congestão pulmonar e até a morte dos cães. Por isso, recomenda-se administração de medicamento em pequenas quantidades por um período prolongado.

1.3 Dirofilariose pulmonar humana e parasitismo por *D. repens*

No ser humano *D. immitis* não completa seu ciclo. Formas imaturas do verme se alojam e morrem nos ramos das artérias pulmonares formando nódulos. Na

maioria dos casos se apresenta assintomática, sendo diagnosticada acidentalmente na rotina para outras doenças do pulmão. Nos casos sintomáticos, devido a endoarterite e infarto pulmonar, causa dor no peito, tosse, dispnéia, fadiga e mialgia. O maior problema da dirofilariose pulmonar é a confusão com tumores, que geralmente leva a cirurgias desnecessárias. Até o momento foram identificados 51 casos de dirofilariose pulmonar humana no Brasil, e centenas de casos em todo o mundo (RODRIGUES-SILVA et al., 1995). Nenhum caso já foi registrado em Rondônia.

D. repens também parasita o ser humano ocasionalmente, sendo assintomática na maioria dos casos. Formas imaturas se alojam em tecidos subcutâneos que também podem ser confundidos com tumores. Uma forma mais grave desta parasitose ocorre quando a larva se aloja na cavidade ocular podendo causar opacidade e consequente prejuízo a visão. Já foram relatados 782 casos de parasitismo em humanos por *D. repens* em 37 países (GENCHI; VENCO; GENCHI, 2007). No Brasil ainda não há relatos.

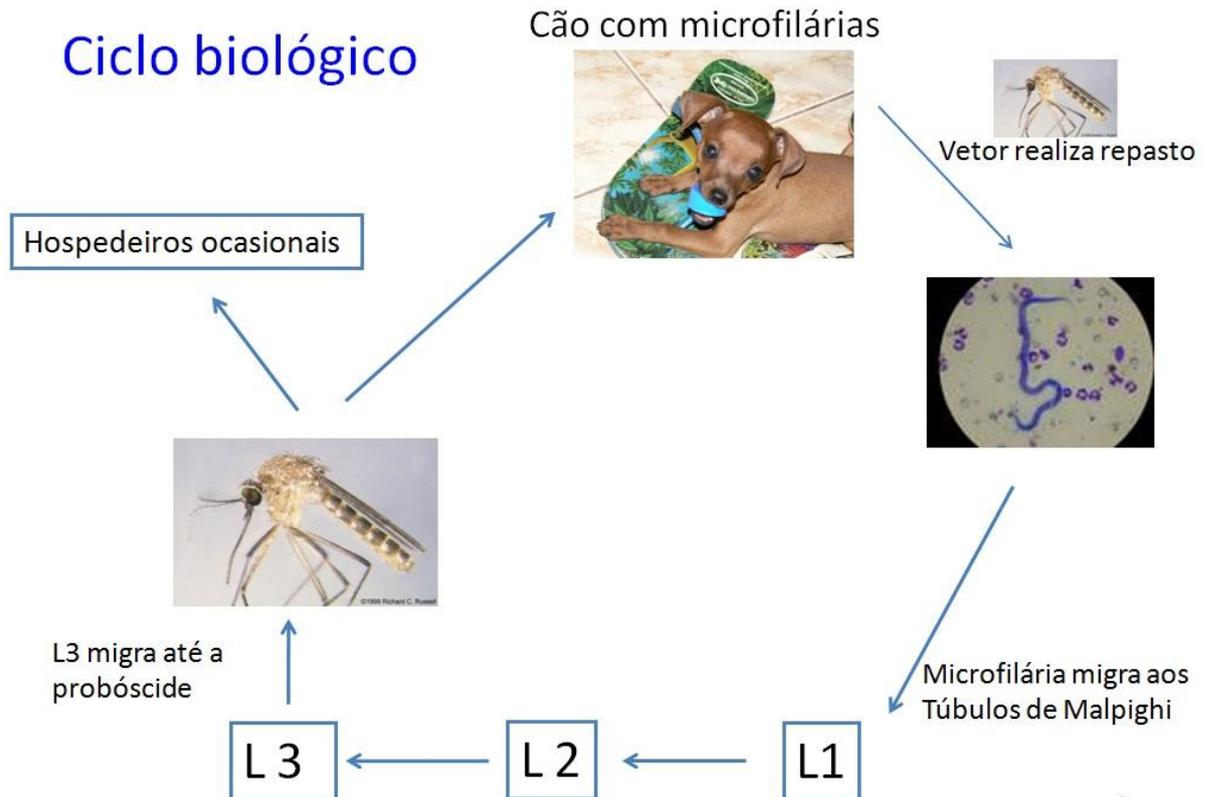
1.4 Ciclo de transmissão e desenvolvimento biológico nos hospedeiros e vetores

As filárias caninas possuem ciclo heteroxeno (figura 1). Os hospedeiros intermediários são dípteros hematófagos de mais de 70 espécies, embora apenas uma dúzia possa agir efetivamente como vetor (AHID; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1999; GARCEZ et al., 2006; LABARTHE et al., 1998; LUDLAM; JACHOWSKI; OTTO, 1970).

As fêmeas dos vetores necessitam do sangue de vertebrados para a maturação dos ovos e, por isso, realizam o repasto sanguíneo. No sangue ingurgitado estão as microfírias, que passam pela faringe e alcançam o esôfago, onde permanecem por cerca de 24 h. Posteriormente, elas migram para os túbulos de Malpighi e se estabelecem junto às células da terminação distal, onde se transformam em larva L1 e posteriormente em L2 e L3. A forma infectante (L3) rompe a terminação distal do túbulo de Malpighi e migra através da hemocele até a probóscide do inseto (CANCRINI; GABRIELLI, 2007). Quando o inseto realiza novo repasto, a larva penetra na circulação do hospedeiro vertebrado definitivo para se transformar em

verme adulto. Após 6 a 7 meses pode ocorrer o aparecimento de microfírias na circulação (RODRIGUEZ-SILVA et al., 1995).

Figura 1- Ciclo de transmissão de *Dirofilaria immitis*.



Fonte: Arquivo pessoal

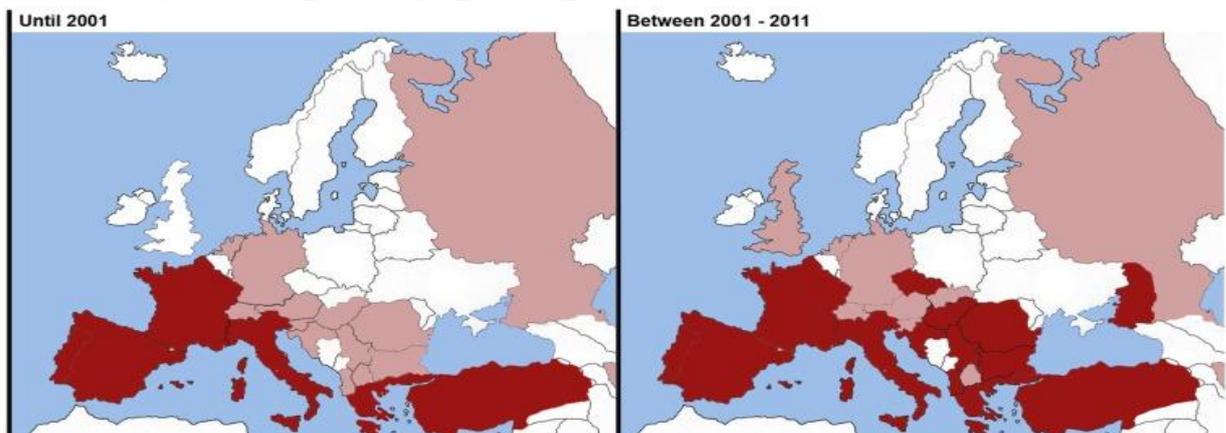
Os principais fatores que influenciam o ciclo de crescimento de formas larvais de filárias no vetor são a espécie do vetor e a temperatura do ambiente. Outro fator importante é a quantidade de microfírias circulantes. Um elevado número de microfírias que um vetor ingurgita pode levá-lo a morte e um baixo número pode não ser o suficiente para vencer todas as barreiras físicas e imunológicas dos mosquitos. A barreira física é o cibário que possui dentes que podem romper a membrana das microfírias e a imunológica principal é a matriz peritrófica. Dentre os fatores que mais influenciam a transmissão, a exposição ao vetor, densidade populacional, fecundidade e espécie do vetor são os mais importantes. O fato de o desenvolvimento biológico do vetor e parasito depender de condições ambientais faz com que a distribuição mundial de filariose canina esteja diretamente relacionada ao clima (CANCRINI; GABRIELLI, 2007).

1.5 Distribuição mundial de filariose canina

As filárias caninas são mais comuns nas regiões de clima tropical e subtropical (LOK, 1988). Na região tropical, o clima favorece a procriação dos vetores o ano inteiro devido às altas temperaturas, embora nas regiões de clima temperado também sejam notificados muitos casos de filariose canina, principalmente em países com temperatura mais amena. As taxas de prevalência em regiões costeiras e banhadas por grandes rios apresentam uma tendência a serem maiores, mas recentemente diversos casos autóctones foram notificados em regiões de perfil geográfico e climático diferente. A seguir são descritos os países em que já foi registrada a presença de *D. immitis*. Em alguns casos há maior detalhamento sobre a cidade ou região específica onde o estudo foi feito, em outros casos há apenas informação geral sobre o registro ou prevalência encontrada.

D. immitis já foi encontrada no sul e leste da Europa (figura 2). Sua ocorrência foi registrada na Itália, Espanha, Portugal, França, Grécia, Turquia, Hungria, República Tcheca, Eslováquia, Eslovênia, Bulgária, Romênia, Polônia e Croácia, com prevalências variando de 2 a 80%. Casos alóctones foram registrados na Alemanha, Áustria, Rússia e Holanda (CARDOSO; MENDAO; DE CARVALHO 2012; GENCHI et al., 2005; GENCHI; VENCO; GENCHI, 2007; MORCHÓN et al., 2012). Na última década houve um aumento do número de registros em países onde antes era considerada área livre de dirofilariose. Este aumento é creditado ao aquecimento global e maior tráfego de animais parasitados a estas novas áreas (BROWN et al., 2012; MORCHÓN et al., 2012).

Figura 2- Mapa de ocorrência de *Dirofilaria immitis* na Europa, comparação entre dados até 2001 e de 2001 a 2011.



Vermelho escuro: áreas endêmicas – Rosa: casos alóctones. Fonte: Morchón et al. (2012)

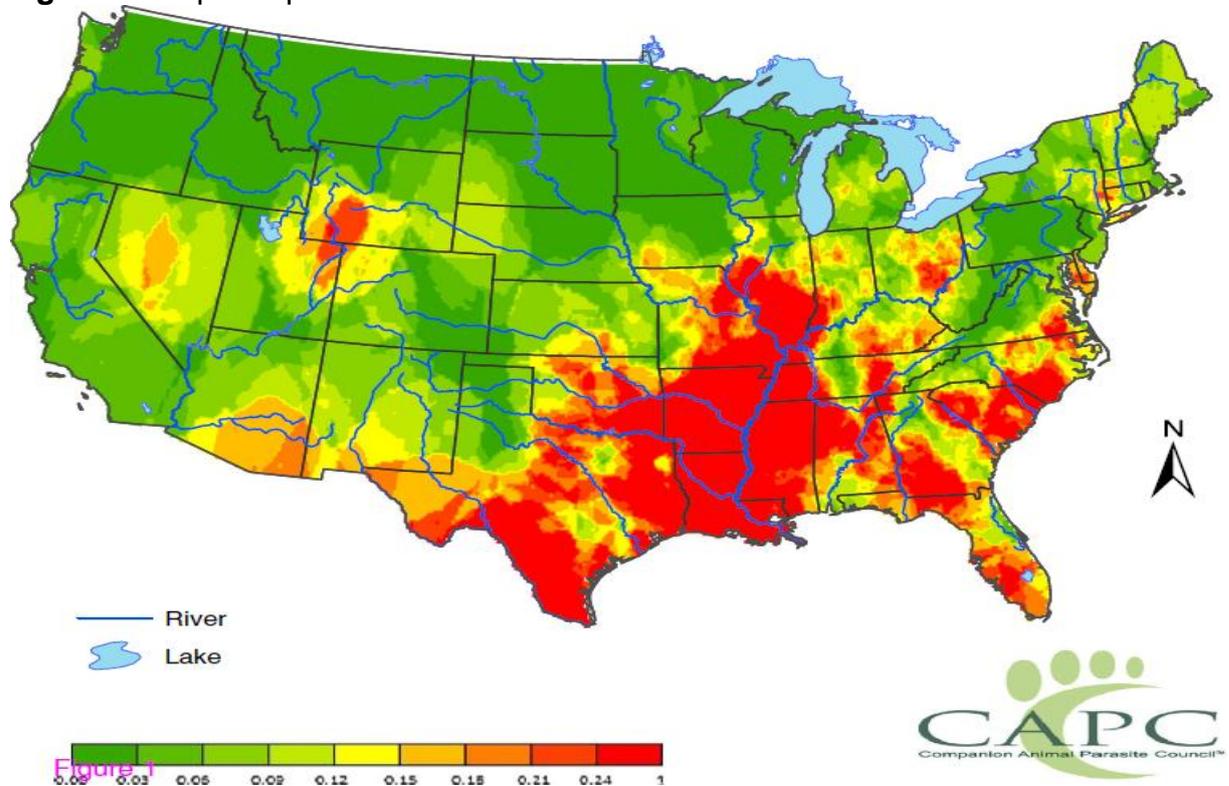
Na Ásia *D. immitis* já foi encontrada no Irã, Japão, Coréia do Sul e Taiwan, com prevalências entre 11,3 e 57% de cães parasitados (JAFARI; GAUR; KHAKSAR, 1996; LEE et al., 1996; TANAKA; WATANABE; OGAWA, 1985; WU; FAN, 2003).

D. immitis é comum na costa leste da África, podendo ser encontrada desde a África do Sul até a República do Sudão (SCHWAN; DURAND, 2002).

Na Austrália, *D. immitis* já foi encontrada na região costeira nordeste e em alguns estados do leste. Na cidade de Sidney foi encontrada com a prevalência de 11,4% (BIGGOOD; COLLINS, 1996).

Nos Estados Unidos, contando casos alóctones e autóctones, *D. immitis* já foi encontrada em todos os 50 estados (figura 3). Um estudo estima que existam aproximadamente 500 mil cães parasitados naquele país (GENCHI; VENCO; GENCHI, 2007). Outro estudo estima que existam 1,2% de cães parasitados naquele país (BROWN et al., 2012). No Canadá a prevalência geral é estimada em 0,2% (SLOCOMBE, 1992).

Figura 3- Mapa de prevalência de *D. immitis* nos Estados Unidos.



Fonte: CAPC em Brown et al. (2012)

Na América Central e no Caribe *D. immitis* já foi encontrada em Porto Rico, Cuba, Curaçao, Bahamas, República Dominicana e México com prevalências entre 3,1 a 67% (GUERRERO, 1992; KOZEK, 1995).

Na Argentina a prevalência varia entre 1 a 71% (VEZZANI; EIRAS; WISNIVESKY, 2006). Na Venezuela foram encontrados 2,3% de cães parasitados por *D. immitis* e no Peru 4,3% (GONZALES, 2002).

1.6 Ocorrência de filariose canina no Brasil

No Brasil, a filariose canina já foi encontrada em 15 estados de todas as regiões. Entretanto, a maioria dos estudos está concentrada nas regiões sudeste e sul. Segundo Bendas et al. (2007) a prevalência nacional é de 2%, embora outros trabalhos tenham encontrado prevalências locais mais elevadas.

No município de Coari, no Amazonas, Silva et al. (2008) encontraram 12,5% de cachorros parasitados por *D. immitis*. No Estado do Pará foram encontrados 53,5% de cães parasitados com *D. immitis* na Ilha de Marajó (GARCEZ et al., 2006) e 10,7% em Belém (SOUZA et al., 1997). Em Oiapoque, Amapá, Meneses et al. (1997) relataram o achado de um cão com microfilárias de *D. immitis*. Na cidade de Cuiabá, no Mato Grosso, foi registrada 11,8% de prevalência utilizando-se pesquisas por anticorpos contra antígenos de *D. immitis* (FERNANDES et al., 1996). Em São Luís do Maranhão a prevalência geral foi 15% de cães parasitados por *D. immitis*, e em duas localidades a prevalência foi de 43 e 46% (AHID; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; SARAIVA, 1999). Em Fortaleza, no Ceará, Moraes e Rocha (1993) encontraram um cão parasitado por *D. immitis*. Na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte, através de teste de cromatografia rápida, Suassuana et al. (2003) encontraram 8,6% de cães positivos. Nos municípios de Salvador e Lauro de Freitas na Bahia, a prevalência encontrada por Almeida et al. (2001) foi de 10,4%. Em Maceió, Estado de Alagoas, através de gota espessa e teste sorológico, foram encontrados 1,3% de cães parasitados por *D. immitis* e também 1,3% de prevalência para *A. reconditum* (BRITO et al., 2001). Em Recife, Pernambuco foram encontradas *D. immitis* e *A. reconditum* com prevalência de 2,3% por necropsia e 1% por busca de microfilária circulante, já o teste sorológico resultou em 1,3% (ALVES, 1999). No Estado do Rio de Janeiro, Labarthe et al. (1998) encontraram prevalência de 16,8% na cidade do Rio de Janeiro e 21,7% em Niterói através do teste de Knott

modificado. Em Minas Gerais foram encontrados 9,41% de prevalência na cidade de Uberlândia (FERREIRA; BARBOSA; MASTRANTONIO, 1999). No estado de São Paulo foi encontrada prevalência média de 8% através das técnicas de Knott e ELISA, sendo 3,9% na capital e 12,2% no litoral (SOUZA; LARSSON, 2001). Em Santa Catarina, utilizando-se gota espessa e Knott, foram encontrados 15% dos cães positivos para *D. immitis*. No litoral do Estado do Paraná, utilizando-se 5 métodos de diagnóstico (gota espessa, Knott, filtração e dois kits de detecção de antígenos), foram encontradas *D. immitis*, *A. reconditum* e uma espécie não identificada. A prevalência total foi de 31,25% e a espécie com maior prevalência foi *A. reconditum* com 22,6 % (REIFUR; THOMAZ-SOCCOL; MONTIANI-FERREIRA, 2004).

1.7 Vetores de filariose canina

Todos os vetores de filariose canina pertencem à família Culicidae. Este grupo possui distribuição cosmopolita e cerca de 3.500 espécies em todo o mundo. Dentre as espécies vetoras, os principais gêneros são: *Anopheles* Meigen, 1818, *Culex* L. 1758, *Aedes* Meigen, 1818, *Mansonia* Blanchard, 1901, *Psorophora* Robineau-Desvoidy, 1827 e *Coquillettidia* Dyar, 1905. Ao pesquisar vetores de filariose canina, Labarthe et al. (1998) indicaram *Ochlerotatus scapularis* (Rondani, 1848), *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann, 1821) e *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, como os principais vetores desta parasitose em Niterói, Estado do Rio de Janeiro. Os gêneros *Ochlerotatus*, *Anopheles*, *Psorophora*, *Mansonia* e *Aedes* têm como criadouros, principalmente, os de caráter transitório (naturais ou artificiais) no solo, como enchentes, várzeas inundáveis, vasos, pneus, garrafas etc. Apresentam pico de hematofagia no crepúsculo vespertino, mas também podem picar de dia e à noite (AHID; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1999). As espécies do gênero *Culex* têm criadouros em meios urbanos principalmente, em reservatórios hídricos artificiais no solo ou locais com água rica em matéria orgânica em decomposição e detritos, como fossas, ralos e poços. Têm hábito alimentar noturno (AHID; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1999).

A capacidade de um mosquito atuar na transmissão de filariose canina está diretamente relacionada com suas características morfológicas e comportamentais. Através de infecção experimental, muitas espécies já foram incriminadas como possíveis vetores de filariose canina, mas, apesar de ocorrer o desenvolvimento da

forma infectante (L3), outros fatores limitam a capacidade vetorial. As principais características são a presença ou não de dentes no cibário e a preferência por determinado vertebrado na hora de realizar repasto sanguíneo. O cibário (estrutura interna esclerotizada) pode possuir dentes no cibário que exercem ação mecânica contra a cutícula das microfilárias, causando rompimento e morte das mesmas. Mesmo uma espécie que não possua dentes e seja apta a desenvolver a L3 pode não ter o cão como fonte preferencial de alimento.

Apesar do conhecimento do grande número de potenciais espécies vetoras de filariose canina, pouco se sabe sobre a transmissão natural (AHID; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1999). Estudos sobre a prevalência sazonal de infecção natural de vetores foram feitos na Itália, Estados Unidos e Brasil (CANCRINI; GABRIELLI, 2007). No Brasil, os únicos trabalhos realizados com levantamento sazonal de prevalência de vetores infectados pertencem a Ahid e Lourenço-de-Oliveira (1999), Brito et al. (2001), Leite (2005) e Rocha (2007). Os primeiros realizaram, através de dissecação manual, um estudo sobre a infecção natural de mosquitos por *D. immitis* na cidade de São Luis, estado do Maranhão. Encontraram *Culex quinquefasciatus* parasitado com prevalência de 0,1% e *Aedes taeniorhynchus*, com 0,5%. Brito et al. (2001), em Maceió no estado de Alagoas, coletaram durante 24 meses e dissecaram manualmente 6.579 *Culex quinquefasciatus*, e destes, apenas 8 foram encontrados com formas larvais de *D. immitis*. Leite (2005) coletou 3.653 mosquitos em Guaratuba, Paraná, e encontrou 3 indivíduos parasitados com formas L1 de *D. immitis*. Rocha (2007) investigou a prevalência de mosquitos parasitados por *D. immitis* na ilha de Florianópolis e encontrou apenas uma amostra positiva utilizando técnicas moleculares.

Verificar a taxa de vetores parasitados com estágios larvais de filárias é uma forma de identificar como a possível transmissão está ocorrendo em locais onde haja cães parasitados por filárias. Também serve para monitorar áreas onde existam programas de tratamento com filaricidas.

2 JUSTIFICATIVA

O Brasil, principalmente a região amazônica, possui todas as características necessárias para ocorrer a transmissão de filariose canina. Além do clima favorecer o desenvolvimento biológico dos vetores, o desmatamento e a falta de saneamento básico contribuem para a manutenção de uma elevada população de vetores no meio urbano. A migração de hospedeiros parasitados a áreas antes livres de filariose canina é um dos principais modos de disseminação destas parasitoses. Não existem trabalhos sobre vetores de dirofilariose canina na região Norte do Brasil e são poucos os trabalhos em todo o território nacional. Este trabalho também teve como objetivo a interação com outros grupos de pesquisa (Faculdade São Lucas, ICB5/USP, INPA e UFAL) e a formação de massa crítica local. Por estes fatores, aqui foi proposto o primeiro inquérito em larga escala sobre dirofilariose canina feito na região norte e o primeiro estudo de prevalência utilizando técnicas moleculares para diagnóstico de vetores no Brasil.

3 OBJETIVOS

Estimar a ocorrência de dirofilariose canina entre os cães de Porto Velho.

Estimar a prevalência em cães utilizando quatro métodos de diagnóstico (gota espessa, filtração em membrana, imunocromatografia e PCR).

Verificar as características físicas dos cães portadores de dirofilariose canina.

Realizar análise espacial evidenciando os casos positivos.

Verificar a ocorrência de mosquitos infectados por *D. immitis*.

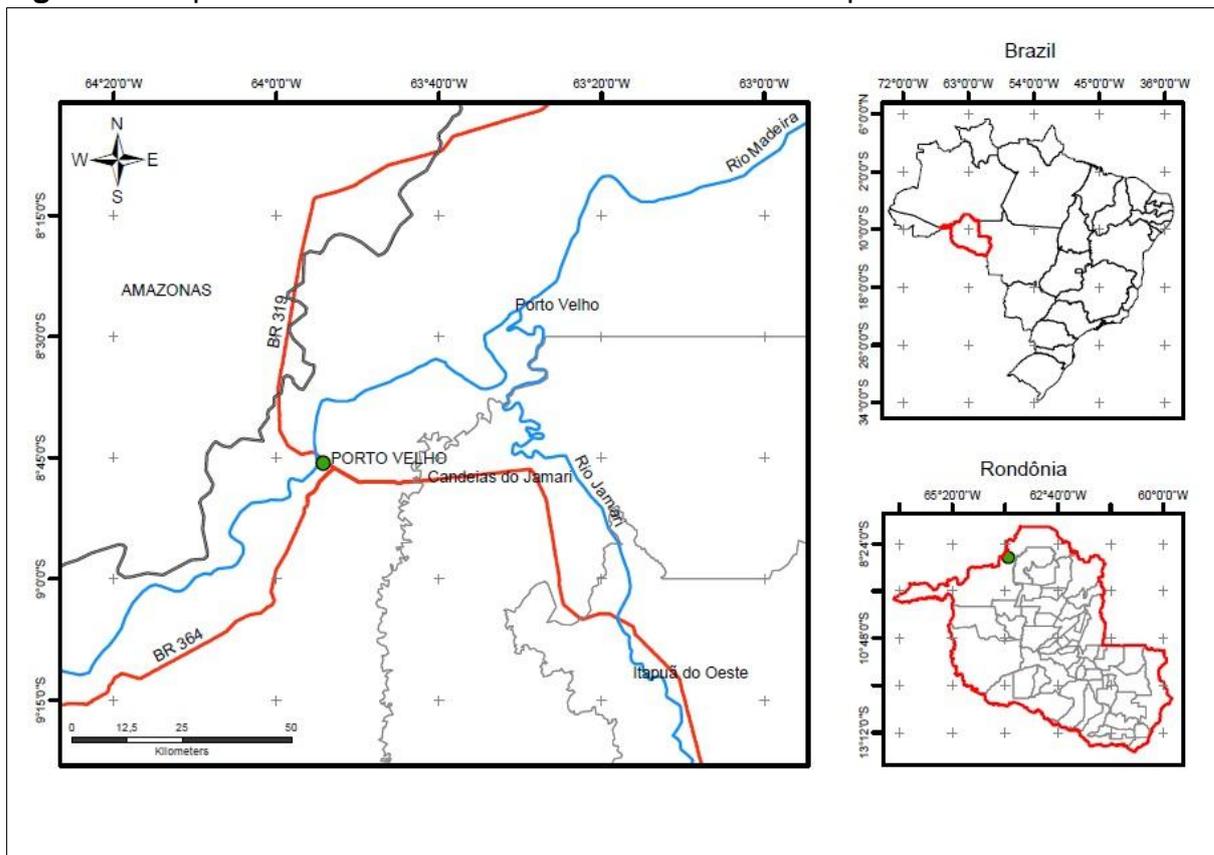
3.1 Objetivo adicional

Verificar a ocorrência de dirofilariose canina em cães que frequentam clínicas veterinárias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O município de Porto Velho possui 428.527 habitantes e uma área de 34.096 km² (figura 4). É o município mais populoso do estado, com densidade populacional de 12,57 habitantes/km² e sua população é formada principalmente por descendentes de moradores da região nordeste e norte do país (IBGE, 2010).

Figura 4- Mapa do estado de Rondônia indicando o município de estudo.



Fonte: Dr. Marcelo Zagonel - Inagemp, 2012

A título de estudo-piloto, uma coleta inicial foi realizada em cães que frequentam clínicas veterinárias. As amostras de sangue utilizadas foram provenientes de cães que passaram por procedimento cirúrgico ou que foi solicitado amostra de sangue para diagnósticos gerais (hematócrito ou suspeita de outras doenças). De cada cão foi retirado cerca de 2,0 mL de sangue. O sangue foi mantido sob refrigeração em tubo de ensaio contendo EDTA. Nesta coleta foram utilizados três métodos de diagnóstico, a gota espessa, filtração em membrana de policarbonato e teste imunocromatográfico de fluxo lateral (ICT). O padrão ouro no diagnóstico de Dirofilariose são os testes que detectam antígenos (AMERICAN

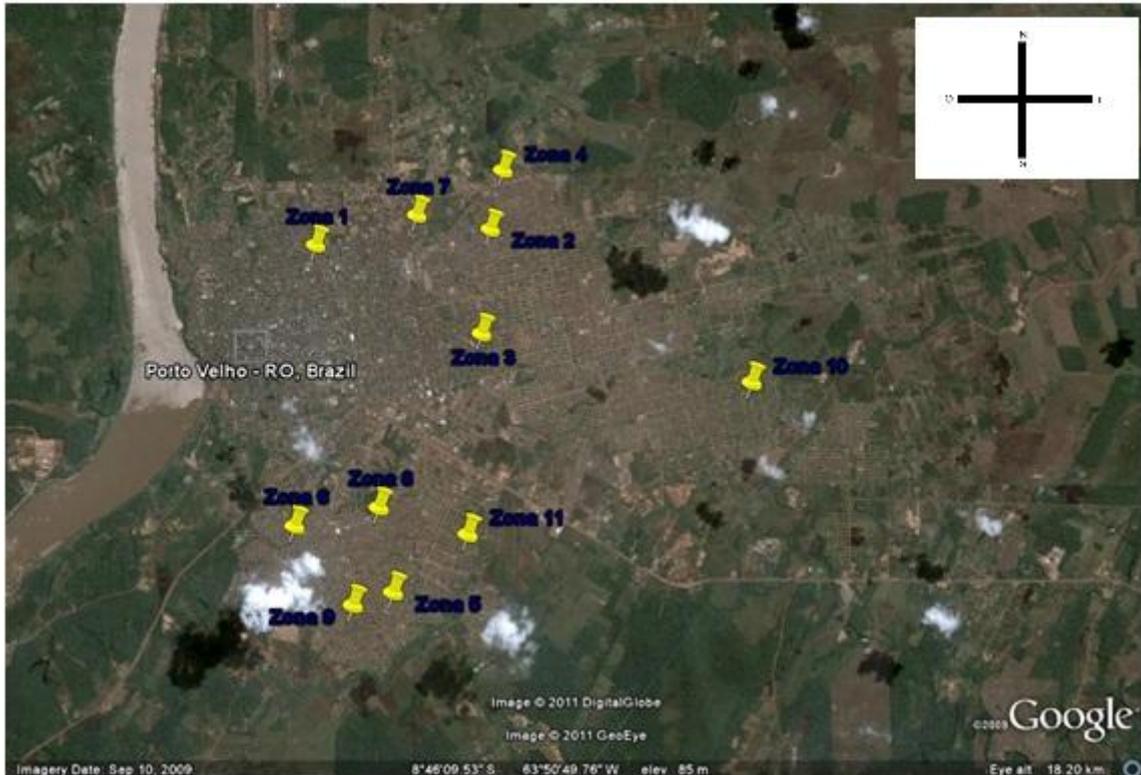
HERTWORM SOCIETY, 1993; GENCHI; VENCO; GENCHI, 2007; KNIGHT, 1998). Os métodos de concentração e gota espessa devem ser usados como complementares no diagnóstico, devido à possibilidade de falsos negativos no teste de antígenos e a presença de outras espécies de filarias.

Para cada indivíduo amostrado foi feita uma pesquisa em prontuário ou com questionário diretamente com o dono do animal para verificar uma possível relação entre cães positivos e os sintomas de dirofilariose (ambas na presença do veterinário responsável). Os sintomas levados em consideração foram: tosse frequente, dispneia, fraqueza, ascite, anorexia, desidratação e perda de peso. Outros fatores levados em consideração foram: sexo, idade, peso, local onde vive (quintal ou intradomiciliar), local onde nasceu e viagens realizadas.

4.1 Estudo de prevalência de dirofilariose canina

Para este estudo, a amostra mínima, estratificada por microrregiões do Centro de Zoonoses (CZ), foi definida em 543 cães domiciliados de Porto Velho e foi calculada através do programa EpiInfo, com nível de significância de 97%, considerando-se uma prevalência de 11%. Este número está baseado em estudos sobre prevalência de dirofilariose realizados nas cidades mais próximas a Porto Velho (Cuiaba-MT e Coari-AM). Para uniformizar a amostra, a coleta foi realizada juntamente com a campanha de vacinação de raiva promovida pelo CZ de Porto Velho. Uma parceria foi firmada com este centro e obteve-se a permissão de colocar equipes de coleta em onze postos de vacinação espalhados pela cidade (microrregiões) (figura 5). Os postos selecionados abrangiam todas as áreas da cidade e apresentavam número aproximado de cães que são vacinados (de acordo com dados da campanha de vacinação do primeiro semestre de 2010). No mapa é possível ver áreas urbanas distantes de pontos de coleta, estas áreas representam o centro comercial, áreas com terrenos sem uso, resquícios de floresta e bairros com baixa densidade demográfica (IBGE, 2010). As amostras foram coletadas de forma randômica. No dia da coleta, cada grupo selecionava os cães a serem amostrados de acordo com a ordem de chegada, baseados em uma lista contendo cem números gerados aleatoriamente pelo programa Epiinfo.

Figura 5- Zonas de coleta divididas de acordo com a população de cães estimada em Porto Velho, Rondônia 2012.



Fonte: Google Earth 2012 modificado pelo autor

A prevalência foi verificada através da pesquisa de microfilárias no sangue do hospedeiro e pela presença de antígenos circulantes. Foram coletados cerca de 1 a 2 mL de sangue da veia cefálica com o auxílio de uma seringa. Em campo o sangue foi acondicionado em tubos de ensaio contendo EDTA. Todas as amostras e o ICT foram mantidos em caixa de isopor com gelo reciclável. Logo após a coleta (em campo) foram feitos dois procedimentos: gota espessa e ICT. Estudos anteriores mostraram que este último método é o mais eficaz (ROSA, 2002), mas, como não é possível a identificação e contagem de microfilárias, neste trabalho foram utilizadas as duas técnicas. A identificação da microfilária em espécie se baseia principalmente nos caracteres morfológicos da parte cefálica e cauda, para isso seria utilizada chave taxonômica segundo Anderson (1976). No mesmo dia da coleta, as amostras de sangue foram congeladas visando a preservação de DNA para realização de diagnóstico por PCR.

4.2 Gota espessa

Para a realização do método de gota espessa foram utilizadas duas gotas de sangue (aproximadamente 0,05mL) sobre lâmina de microscópio, procedimento realizado em campo. Na semana seguinte, com as amostras já secas, foi colocada água destilada para lisar as hemácias e metanol para fixação do sangue. Após a fixação, a amostra foi corada com solução de Giemsa em água destilada na proporção de 1 gota/mL. Estas lâminas foram lidas em microscópio óptico sob objetiva de 4x e 10x. As lâminas foram lidas por dois pesquisadores de forma independente.

4.3 Membrana de policarbonato

A filtração em membrana (*Poretics Corporation® 5µm, San Francisco, CA, USA*) foi utilizada apenas na coleta teste e foi descartada na segunda etapa para facilitar as coletas no dia da campanha. Neste método foi misturado 1 mL de sangue a EDTA a 0,03% e 4 mL de soro fisiológico. Esta mistura foi armazenada em uma seringa de 5 mL. Na ponta de seringa foi acoplado o dispositivo (holder) onde a membrana de policarbonato foi colocada. De forma lenta e suave o embolo da seringa é empurrado fazendo com que as microfilárias fossem retidas pela membrana e os elementos sanguíneos não desejados fossem eliminados. O refugo foi despejado em recipiente próprio para o descarte de material biológico. Após este processo a membrana foi retirada e colocada em lâmina de microscópio. Sobre a lâmina foi adicionado metanol para fixar a amostra. Após a fixação foi colocado Giemsa na mesma proporção já citada. A leitura foi feita em microscópio óptico binocular sob objetiva de 4x e 10x. Neste método, junto com a gota espessa, é possível, além de identificar as filárias, calcular o índice de microfilaremia. As lâminas foram lidas por dois pesquisadores de forma independente.

4.4 Reação em Cadeia de Polimerase –PCR

O método de diagnóstico por PCR foi realizado em parceria com o Laboratório de Genética da Faculdade São Lucas em Porto Velho. As amostras de sangue foram analisadas em sua totalidade por membros do laboratório e 30% das amostras de mosquitos foram analisadas pelo responsável desta tese e o restante pelos membros do laboratório.

4.4.1 Extração de DNA

O diagnóstico molecular foi feito quatro meses após a coleta. Todas as amostras positivas no teste imunocromatográfico foram testadas individualmente pela PCR. As amostras negativas foram testadas em pools, contendo dez amostras cada. Após o descongelamento das amostras em temperatura ambiente, o DNA foi extraído com o uso do kit comercial *Quiamp DNA blood kit* (*Quiagen®*, *Düsseldorf, Germany*). A detecção de DNA de *D. immitis* no sangue foi realizada utilizando-se os iniciadores espécie-específicos descritos por Scoles e Kambhampati (1995), *Diro-Forward* (5'-ACGTATCTGAGCTGGCTCAC-3') e *Diro-Reverse* (5'ATGATCATTCCGCTTACGCC-3') (*OPERON, Alameda. CA*). O primer utilizado amplifica um segmento de DNA de 378 pares de bases. A extração de DNA foi realizada em lotes, cada lote era composto de cinco amostras, um controle negativo e um positivo. O controle negativo era composto de sangue humano e o positivo de sangue humano com pedaços de vermes adultos de *D. immitis*. No caso de não aparecer a banda de 378 pares de bases no controle positivo a extração era repetida. Não foram utilizados outros métodos para verificar a extração e a pureza de DNA.

4.4.2 Amplificação de DNA

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 20 µl contendo 200 mM de uma mistura de dNTPs (dTTP, dATP, dCTP, dGTP), 25 pmol de cada iniciador, uma unidade de Taq DNA polimerase e 4 µl de DNA obtido. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador com o seguinte programa: desnaturação inicial de 4 min a 95 °C, ligação dos iniciadores a 55 °C/1 min,

extensão a 72 °C/1 min, seguido de 25 ciclos 95 °C/1 min, 55 °C/1 min, extensão a 72 °C/1 min e um ciclo final de extensão a 72 °C/5 min (SCOLES; KAMBHAMPATI, 1995).

4.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Alíquotas de 4 µL de cada amostra amplificada foram misturadas a 4 µl do tampão de amostra 2X (azul de Bromofenol a 0,25%, Ficol a 15% p/v em água ultrapurificada) e aplicadas em gel de agarose 1,5% e submetidas à eletroforese (100V/90min) em tampão Tris-Borato- EDTA 1X (TBE, tris-HCL 0,09 M, ácido bórico 0,09 M e EDTA 0,002 M). A seguir o gel foi corado em brometo de etídio e as bandas visualizadas em transiluminador sendo fotodocumentado (KODAK *Gel logic*) e analisado para presença ou ausência de bandas compatíveis.

4.5 Teste Imunocromatográfico de Fluxo Lateral

O teste imunocromatográfico foi feito segundo as especificações do produto *Kit de Teste Heartworm Anigen Bioeasy® (Bionote inc, Seoul, Korea)*. Este teste detecta antígenos secretados pelos vermes adultos presentes no sangue do hospedeiro. O dispositivo de teste possui uma fita de papel poroso, e por capilaridade a amostra passa por dois pontos. O primeiro ponto possui anticorpos monoclonais de *D. immtis* conjugados com nanopartículas de ouro. Havendo presença de antígenos de *D. immtis* na amostra, ocorrerá a ligação antígeno-anticorpo e por ressonância plasmônica superficial as partículas de ouro conjugadas refletem a cor vermelha indicando resultado positivo. De acordo com o fabricante, este kit é capaz de detectar antígenos de vermes machos e fêmeas com sensibilidade de 94,4% e especificidade de 100%. O teste é estável se mantido em local seco e ao abrigo da luz em temperatura de até 30°C. O fabricante ainda afirma que não existe reação cruzada com *Dipetalonema reconditum*. Segue abaixo as etapas e materiais utilizados (adaptado da bula).

1. Ao utilizar a pipeta fornecida, aplica-se 1 ou 2 gotas de amostra (sangue total, soro ou plasma) ao frasco de amostra. (figura 6)

2. Logo após aplica-se 3 gotas do conjugado fornecido com o teste.
3. Após alguns minutos a amostra, que aparecerá na cor rosa, aparece na janela de resultados. Na janela de resultados existem duas marcas, uma com a letra C e outra com a letra T.
4. O resultado pode ser interpretado entre 8 a 15 minutos após a amostra percorrer toda a janela
5. Interpretação de resultados: Sempre que aparecer uma linha abaixo da letra C significa que o teste está funcionando, esta é a linha de controle do dispositivo. Se aparecer uma linha abaixo da letra T significa que o resultado é POSITIVO. Esta linha pode apresentar coloração variável de acordo com a concentração de antígeno presente na amostra.

Figura 6 – Dispositivo para diagnóstico imunocromatográfico.



Fonte: Arquivo pessoal

4.6 Cálculo de prevalência de filariose canina

A prevalência foi calculada pelo número de indivíduos positivos x 100 dividido pelo número total de indivíduos examinados.

4.7 Relações entre prevalência e características do hospedeiro

A positividade das amostras foi relacionada com fatores dos hospedeiros como idade, sexo, local de nascimento, se realizou viagens e local onde vive (endereço, latitude e longitude, local aberto ou fechado). No momento da coleta, foi aplicado um questionário no qual o dono do animal respondeu as questões acima e foi solicitada a permissão para a participação neste estudo. (APÊNDICE A- modelo da ficha)

4.8 Mapa de distribuição de cães amostrados

Nas semanas seguintes a data de coleta, todos os endereços indicados pelos donos dos cães foram visitados. Cada residência foi georeferenciada com o uso do *Garmin Global Positioning System device (GPS- model E-TREX- Legend HGx)*. As coordenadas obtidas pelo GPS foram utilizadas no programa *Terra view* versão 4.2. Este programa gerou mapas de distribuição de todos os cães amostrados, diferenciando casos negativos de positivos. O software utiliza análise estatística de densidade de Kernel, que basicamente possui o princípio de que pontos próximos possuem maior semelhança do que com pontos distantes. Para gerar os mapas de Kernel foram utilizados parâmetros de 250 colunas sobre os eventos com algoritmo de função quartica e raio adaptativo.

4.9 Coleta de mosquitos

Para verificar a ocorrência de infecção natural de vetores foram coletados mosquitos (principalmente fêmeas de *Culex quinquefasciatus*), no peri-domicílio, por busca ativa através de aparelho de sucção. As coletas foram feitas no horário de maior atividade dos mosquitos fêmeas de *C. quinquefasciatus*, com início às 18:00 e término às 01:00.

Após a verificação de casos positivos de dirofilariose canina, as coletas de mosquitos foram direcionadas nas residências e arredores destes casos. Pelo menos uma coleta foi feita nos arredores de casos positivos.

Nos locais próximos as residências, procurou-se criadouros de *C. quinquefasciatus*, como áreas alagadas com depósito de matéria orgânica, esgoto a céu aberto, fossas rudimentares e bueiros.

4.10 Detecção de infecção natural de vetores por PCR

Os insetos foram preservados em álcool isopropílico e conduzidos ao laboratório para diagnóstico molecular.

Os mosquitos foram identificados segundo Foratini (2002) e chaves auxiliares para cada subfamília, gêneros e espécies também foram utilizadas de acordo com a necessidade. Após a identificação, os indivíduos foram manualmente separados, com auxílio de estilete entomológico, em duas sub-amostras pareadas: cabeça e corpo (tórax + abdômen). Para a análise molecular, os pools contendo 10 indivíduos foram separados por espécie, parte do corpo (cabeça ou tórax+abdômen), data e local de coleta. A cabeça foi analisada separada para se calcular a taxa de infectividade.

4.10.1 Obtenção do DNA de *D.immitis* em mosquitos

A metodologia utilizada foi baseada na proposta de Rocha (2007). Os mosquitos coletados em campo foram retirados do álcool isopropílico para a retirada das pernas e das asas, foram em seguida, agrupados em *pools* de dez espécimes por tubo e colocados em frascos de micro centrífuga rotulados junto com 250µL de tampão de maceração (0,08 M NaCl, 0,16 M sacarose, 0,06 M EDTA, 0,1 M Tris-HCl pH 9,0 e 0,5% Sódio- Duodecil-Sulfato- SDS). Esta solução foi aquecida por 10 min a 95 °C e acrescida de proteinase K na concentração final de 100 µg/mL. Os mosquitos foram macerados, até que não houvesse mais partes identificáveis dos mosquitos. Após a maceração a solução foi aquecida a 95 °C por mais 10 min, passado este tempo os tubos foram transferidos a uma centrífuga onde ficaram por 3 minutos a 12.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante de cada tubo foi

retirado com auxílio de uma pipeta e armazenado em microtubo. Por final os tubos foram aquecidos a 100 °C para desativar a proteinase K. A extração de DNA dos mosquitos foi realizada em lotes. Cada lote era composto de cinco pools de mosquitos, um controle negativo de mosquitos machos e um positivo de mosquitos machos e pedaços de vermes adultos de *D. immitis*. Após extração, amplificação e eletroforese foi verificada a presença ou não da banda de 378 pares de bases no controle positivo. Caso esta banda não fosse visualizada a extração era realizada novamente. Não foram realizadas outras metodologias para verificar presença de DNA e pureza dos mesmos após a extração.

4.10.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A detecção de DNA de *D. immitis* nos mosquitos foi realizada utilizando-se os iniciadores espécie-específicos descritos por Scoles, Kambhampati (1995), Diro-Forward (5'-ACGTATCTGAGCTGGCTCAC-3') e Diro-Reverse (5'ATGATCATTCCGCTTACGCC-3') (OPERON, Alameda. CA). Este primer resulta na amplificação de uma sequência de 378 pares de bases. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 20 µL contendo 200 mM de uma mistura de dNTPs (dTTP, dATP, dCTP, dGTP), 25 nmol de cada iniciador, uma unidade de Taq DNA polimerase e 1-3 µL de DNA obtido do *pool* de mosquitos. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador seguindo o seguinte perfil de amplificação: desnaturação inicial de 4 min a 95 °C, ligação dos iniciadores a 55 °C/1 min, extensão a 72 °C/1 min, seguido de 25 ciclos 95 °C/1 min, 55 °C/1 min, extensão a 72 °C/1 min e um ciclo final de extensão a 72 °C/5 min (SCOLES; KAMBHAMPATI, 1995).

4.10.3 Eletroforese em gel de agarose

Alíquotas de 4 µL de cada amostra amplificada foram misturadas a 4 µL do tampão de amostra 2X (azul de Bromofenol a 0,25%, ficol a 15% p/v em água ultrapurificada) e aplicadas em gel de agarose 1,5% e submetidas à eletroforese (100 V/90min) em tampão Tris-Borato- EDTA 1X (TBE, tris-HCL 0,09 M, ácido bórico 0,09 M e EDTA 0,002 M). A seguir o gel foi corado em brometo de etídio, as bandas

visualizadas em transiluminador sendo fotodocumentado e analisado para presença ou ausência de bandas.

5 RESULTADOS

5.1 Coletas-Piloto em clínicas veterinárias

Foram coletadas 202 amostras de sangue de cães, do total coletado, 16 amostras foram positivas no teste imunocromatográfico, o que representa 7,9% de cães positivos.

Entre as 202 amostras, 54 (26,7%) apresentaram algum sintoma relacionado com dirofilariose. Nenhum indivíduo (positivo ou negativo) apresentou mais que um sintoma (tabela 1). Não foi comprovada relação positiva entre sintomas e resultados para dirofilariose.

Tabela 1- Relação entre sintomas de dirofilariose e cães amostrados em clínicas veterinárias de Porto Velho

	Tosse	Dispneia	Fraqueza	Ascite	Anorexia	Desidratação	Pedra	Peso	Total
Positivos	0%	0%	7,1%	0%	11,1%	12,5%	11,1%		9,3%
Negativo	100%	0%	92,9%	100%	88,9%	87,5%	88,9%		90,7%
Total (100%)	4	0	14	1	9	8	18		54

A tabela 2 mostra apenas os indivíduos positivos agrupados por idade. Há uma concentração de indivíduos nas faixas de 0 a 4 anos que representa 64% do total de positivos.

Tabela 2- Total de indivíduos positivos agrupados por faixa etária

Idade					Total	
	Negativo	%	Positivo	%	geral	%
0,6	4	100	0	0	4	2
0,8	2	100	0	0	2	1
0,9	3	100	0	0	3	1,5
1	18	90	2	10	20	9,9
2	29	93,5	2	6,5	31	15,3
3	23	88,5	3	11,5	26	12,9
4	20	87	3	13	23	11,4
5	13	86,7	2	13,3	15	7,4
6	13	81,3	3	18,8	16	7,9
7	17	100	0	0	17	8,4
8	12	100	0	0	12	5,9
9	2	100	0	0	2	1
10	16	100	0	0	16	7,9
11	5	83,3	1	16,7	6	3
12	4	100	0	0	4	2
13	1	100	0	0	1	0,5
14	2	100	0	0	2	1
16	2	100	0	0	2	1
Total	186		16		202	100

Quando divididos por sexo, a amostra é equilibrada, sendo 52,9% de machos e 47,1% de fêmeas. Estudos anteriores não demonstram relação com o sexo e os indivíduos positivos, neste estudo preliminar as fêmeas representam 64,3% dos positivos. O teste estatístico de chi-quadrado não resultou em significância ($\chi^2=0.135$, $p=0.713$).

Quando dividido por local de moradia (intradomiciliar ou quintal) existe pouca diferença entre os indivíduos positivos, sendo 42,9% intra-domiciliares e 57,1% que moram em quintal. O teste chi-quadrado não resultou em significância ($\chi^2=0.013$, $p=0.909$).

Um dado importante surgiu quando analisados deslocamentos (viagens para outros estados) e o local onde o indivíduo nasceu. O resultado mostra que 92,9% dos cães positivos nasceram e nunca saíram de Porto Velho. Apenas um indivíduo positivo nasceu em outra cidade. Este cão era proveniente de Recife, cidade já citada como endêmica para dirofilariose.

5.2 Teste de acurácia dos métodos de diagnóstico

Nesta etapa do trabalho apresentamos os resultados de três métodos de diagnóstico para dirofilariose canina. Utilizamos a gota espessa, filtração por membrana de policarbonato e teste imunocromatográfico em 100 amostras de cães de veterinária. De todos os testes apenas o imunocromatográfico apresentou resultado positivo, sete no total. Desta forma não foi possível realizar o teste de acurácia entre os 3 testes.

5.3 Estudo de prevalência na população canina domiciliada

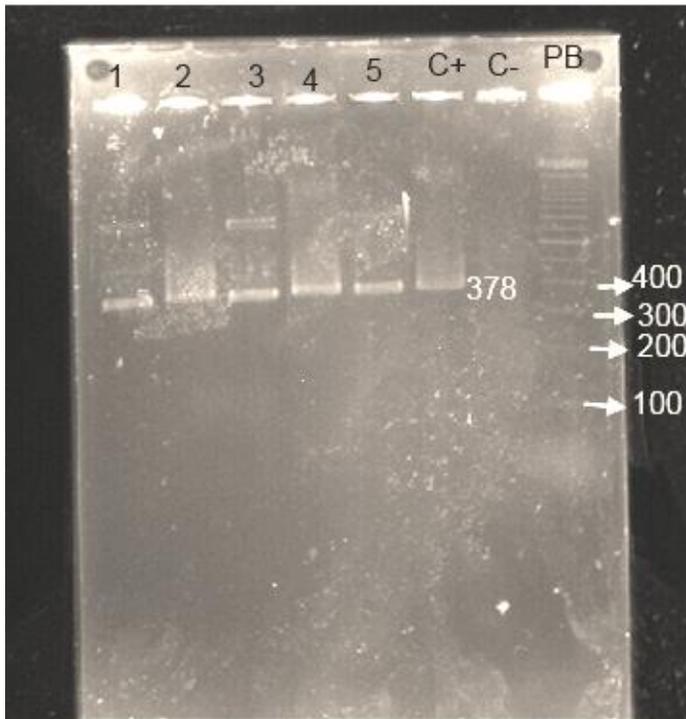
Uma vez constatada a ocorrência de *D. immitis* em P. Velho (estudo piloto em clínicas veterinárias), foram coletadas randomicamente 727 amostras da população canina de P. Velho (aproximadamente 40 mil cães, segundo o CZ) (tabela 3), número acima do mínimo esperado em uma amostra com 97% de nível de significância.

Tabela 3- Número de cães amostrados de acordo com microrregião e população estimada de cães baseada na campanha de vacinação do primeiro semestre de 2010. (população total de cães em Porto Velho estimada em 40 mil)

Microrregião	População Canina Estimada	% em relação ao total da população	Número de cães amostrados na microrregião
1	525	6,7	72
2	704	9,0	59
3	670	8,6	61
4	587	7,5	71
5	772	9,9	68
6	821	10,5	72
7	634	8,1	58
8	765	9,8	60
9	663	8,5	73
10	892	11,4	70
11	768	10,0	63
Total	7801	19,5	727

Do total coletado, 93 amostras foram positivas no teste imunocromatográfico (figura 7), o que representa 12,8% de cães positivos. Não foram encontrados resultados positivos na gota espessa. A PCR resultou em 73 (10%) amostras positivas (amostras previamente registradas como positivas no imunocromatográfico), nenhuma amostra de pools negativos foi positiva na PCR (figura 7). A tabela 4 mostra as prevalências encontradas em cada microrregião de coleta.

Figura 7 – Exemplo de gel de agarose com amostras positivas.



Legenda: 1 a 5 – amostras positivas, C+ controle positivo, C- controle negativo, PB pares de bases.

Tabela 4- Porcentagem de indivíduos positivos divididos por zona de coleta

Zona	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Positivos (%)	17,86	22,4	34,69	23,6	5,5	0	37,8	3,33	4	2,1	6,67

Figura 8- Exemplo de teste positivo



(C- controle; T-reagente/positivo) Fonte: Arquivo pessoal

A amostra geral possui as seguintes características: 65,3% dos cães são jovens (de 0 a 4 anos); 54% são machos e 46% são fêmeas; 75,7% moram em quintal e 24,3% no intradomicílio e 98,3% dos cães nasceram e nunca saíram de Porto Velho.

A idade dos cães amostrados está descrita na tabela 5. Este fator é importante de ser analisado devido ao fato da dirofilariose ser uma parasitose acumulativa, ou seja, quanto mais tempo de vida têm o hospedeiro mais tempo este ficou exposto a picadas e por consequência maior a chance de ser infectado e de desenvolver maior número de formas adultas. Apesar disso, os resultados mostram outra característica.

Tabela 5- Total de indivíduos analisados por ICT agrupados por faixa etária

Idade em anos	Negativo	(-%)	Positivo	(+%)	Total	%
6 a 11 meses	71	94,7	4	5,3	75	10,3
1	100	85,5	17	14,5	117	16,1
2	103	85,1	18	14,9	121	16,6
3	81	86,2	13	13,8	94	12,9
4	58	85,3	10	14,7	68	9,4
5	44	77,2	13	22,8	57	7,8
6	35	85,4	6	14,6	41	5,6
7	41	97,6	1	2,4	42	5,8
8	30	83,3	6	16,7	36	5
9	11	91,7	1	8,3	12	1,7
10	29	96,7	1	3,3	30	4,1
11	7	87,5	1	12,5	8	1,1
12	9	90	1	10	10	1,4
13	7	100	0	0	7	1
14	2	100	0	0	2	0,3
15	1	50	1	50	2	0,3
16	2	100	0	0	2	0,3
17	2	100	0	0	2	0,3
19	1	100	0	0	1	0,1
	634		93		727	100,0

A tabela 5 mostra os indivíduos agrupados por idade. Há uma concentração de indivíduos nas faixas de 0 a 4 anos. Entre os positivos são 66,6% de cães nesta faixa etária. Esta mesma característica foi observada na amostra de cães negativos.

Quando divididos por sexo, a amostra geral é equilibrada, sendo 53,5% de machos e 46,5% de fêmeas. Não há diferença quando divididos entre positivos e negativos.

Quando dividido por local de moradia (intradomiciliar ou quintal) existe grande diferença entre os indivíduos positivos, sendo 26,9% intra-domiciliares e 73,1% que moram em quintal. O teste qui-quadrado relacionando local de moradia com casos

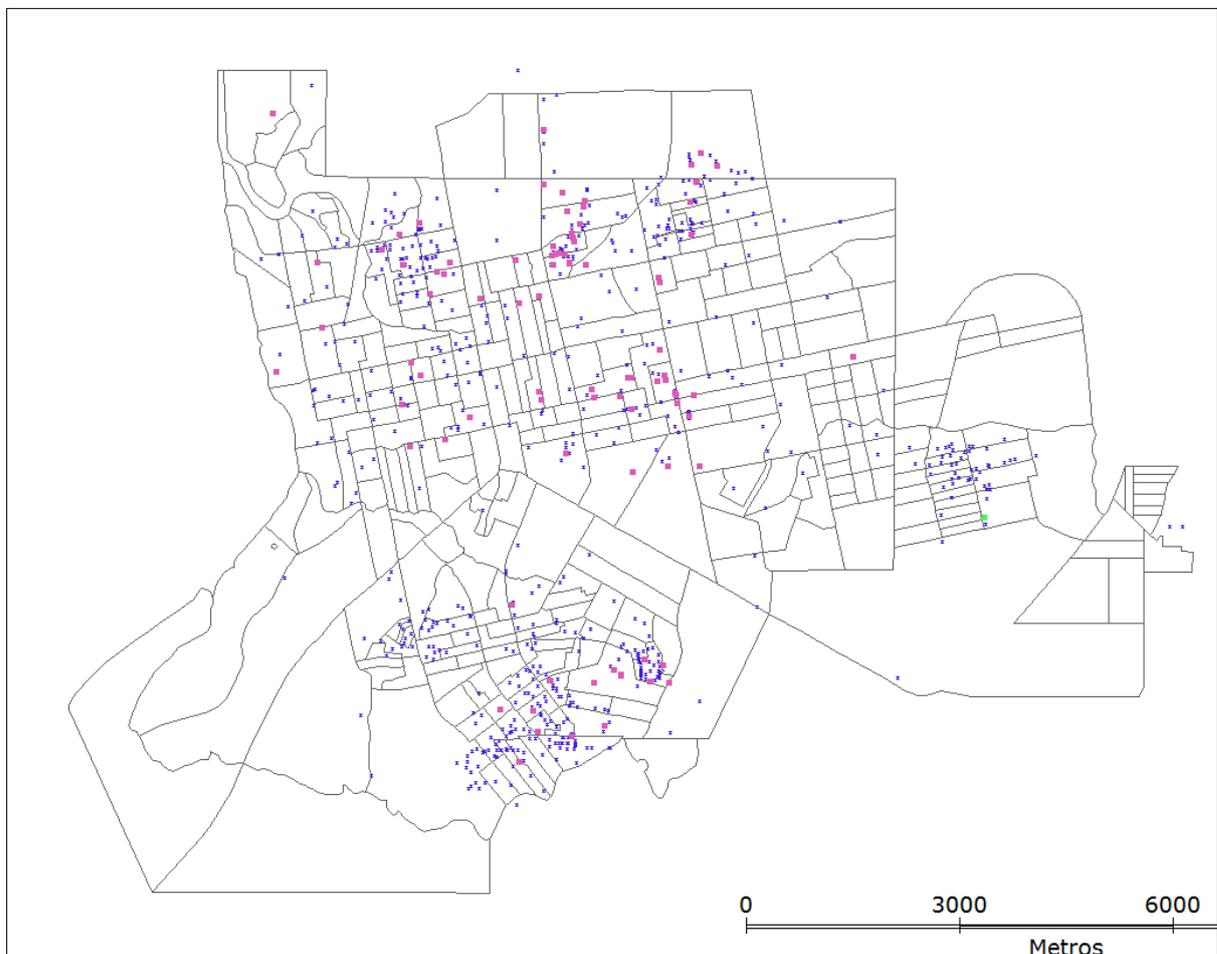
positivos não demonstrou significância ($\chi^2 = 0,363$, $p = 0,546$). Esta mesma característica foi observada na amostra de cães negativos.

Assim como foi feito na coleta piloto, foi registrado o local de nascimento dos cães. O resultado mostra que 95,7% dos cães positivos nasceram e nunca saíram de Porto Velho, quatro indivíduos positivos nasceram em outras cidades, Recife, São Paulo, Rio de Janeiro e São José do Rio Preto.

5.3.1 Mapa de distribuição de cães amostrados

O mapa de distribuição de todos os 727 cães amostrados (figura 8) mostra a maior parte da cidade com pontos. Existem algumas áreas com poucas ou nenhuma amostra. Estas áreas podem apresentar baixa densidade demográfica, resquícios de florestas ou áreas abertas sem uso.

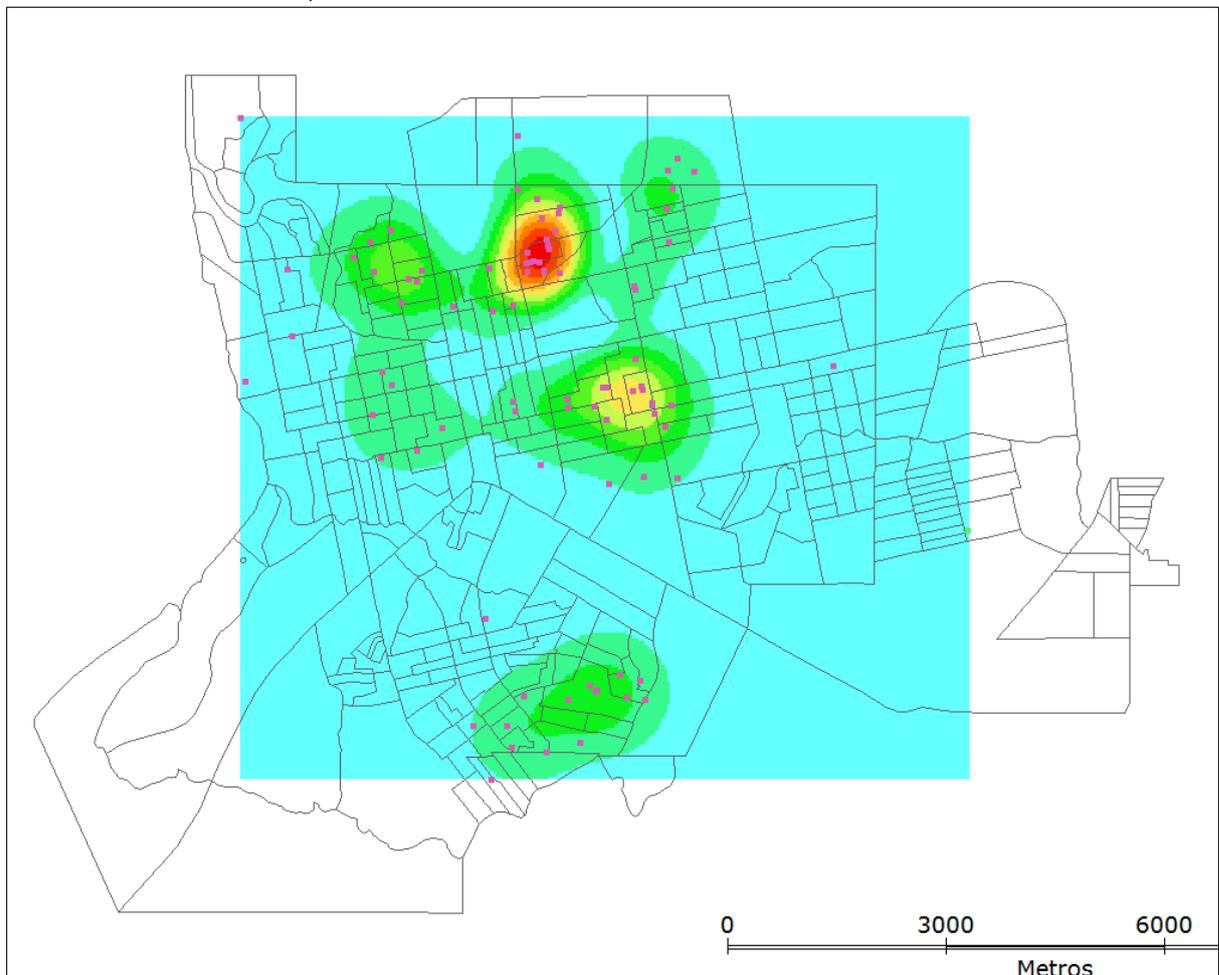
Figura 9- Mapa de Porto Velho indicando unidades georeferenciadas das residências dos cães amostrados



Legenda: Azul- cães negativos, rosa- cães positivos

A análise estatística de Kernel gerou um mapa com cores que indicam a densidade de pontos positivos amostrados (figura 9). No mapa é possível evidenciar um “hotspot” na região norte da cidade. Este mapa foi sobreposto com outros mapas, gerados pelo IBGE (ANEXO A), que indicam fatores locais que podem ter relação com a transmissão de dirofilariose. Estes fatores são: rede de esgoto, abastecimento de água e recolhimento de lixo. Estes fatores podem ter relação com criadouros de mosquitos e com o saneamento básico do local. A sobreposição das imagens não resultou em relação evidente do “hotspot” com algum fator social/ambiental do IBGE.

Figura 10- Mapa de Porto Velho com pontos positivos evidenciando *hotspot* em vermelho, 2013.

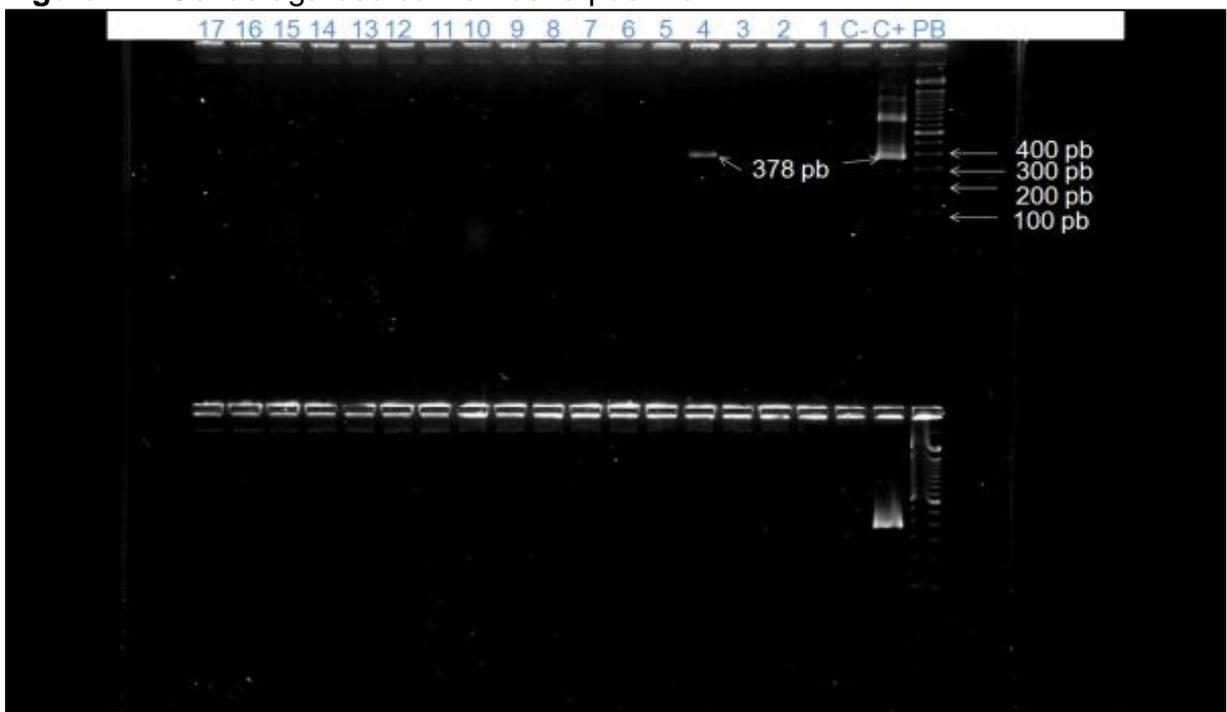


Legenda: Em rosa pontos positivos/Quadrado azul: área de abrangência/Fonte: Arquivo pessoal

5.4 Análise de vetores

Foram coletados 3.115 mosquitos, sendo 2.972 *Culex quinquefasciatus*, 142 *Aedes aegypti* e 1 *Anopheles triannulatus*. Do total de pools analisados, apenas um foi positivo na análise molecular (figura 10). O pool positivo era composto por tórax+abdômen de espécimes de *C. quinquefasciatus*. A banda evidenciada é compatível com os 378 pares de base do controle positivo. A análise estatística de estimativa de máxima verossimilhança no programa *Poolscreen* (KATHOLI et al., 1995), resultou em uma prevalência estimada em 0,32%, com intervalo de confiança de 95% entre 0,09% e 1,6%. Foram feitas 236 coletas, sendo 178 em locais próximos a residências e 152 em outros pontos. A figura 11 mostra o ponto de coleta da amostra positiva.

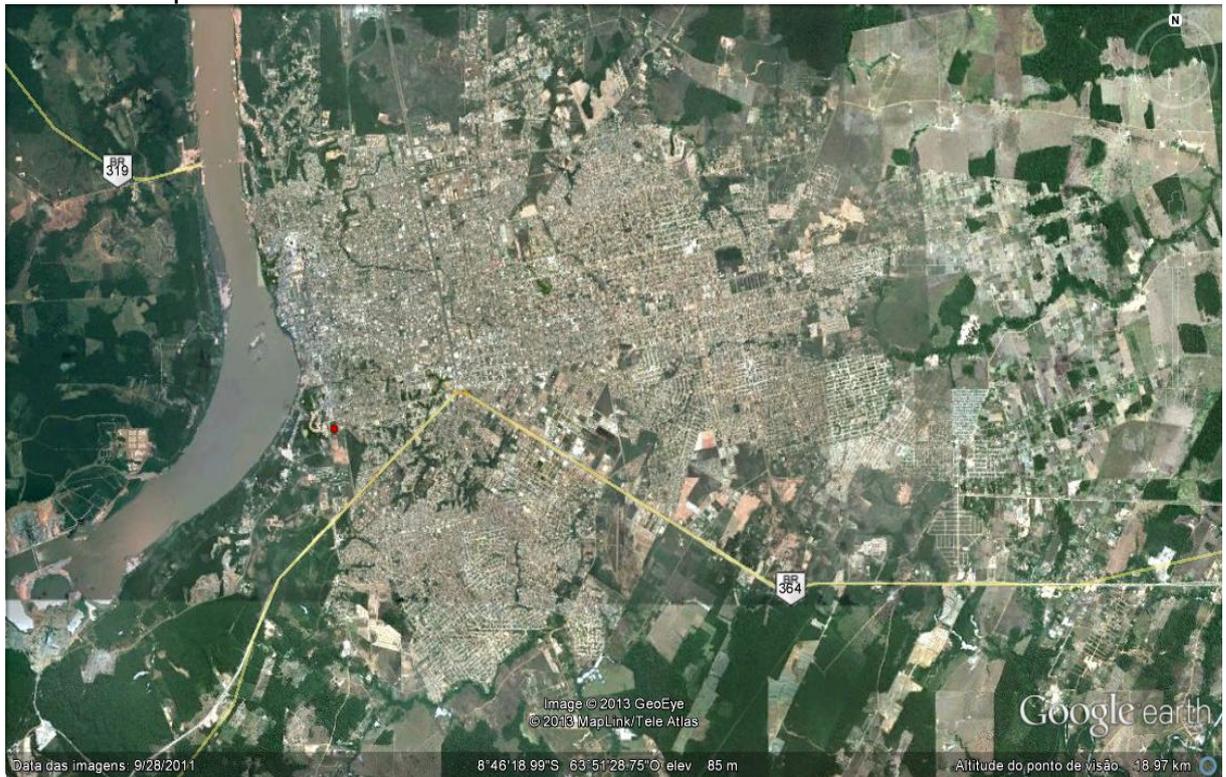
Figura 11- Gel de agarose com amostra positiva.



Poço 4 amostra positiva, controles negativo (C-) e positivo (C+), marcador de pares de base (PB) e demais amostras negativas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 12- Imagem de satélite de Porto Velho indicando ponto de coleta de amostra positiva.



Ponto vermelho na região oeste da cidade.

Fonte: Google Earth 2012, modificado pelo autor

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

6.1 *Estudo piloto*

Estes resultados preliminares mostraram a ocorrência de dirofilariose canina em Porto Velho em cães atendidos em clínicas veterinárias. Apesar de a amostra ser pequena, foi constatado um valor moderado (7,9%) de acordo com a literatura, onde locais com mais de 20% de cães positivos são considerados locais com alta prevalência (WATIER-GRILLOT; MARIÉ; CABRE; DAVOUST, 2011). Este valor não era esperado, teoricamente, cães que frequentam clínicas veterinárias recebem tratamento médico com maior frequência e por medidas profiláticas estão menos propensos a se infectar. Estes cães que frequentam clínicas veterinárias (para consultas ou estética), normalmente são de donos que vivem em bairros com melhores condições de habitação, ou seja, bairros com melhor infraestrutura o que diminui o contato dos animais com vetores. A relação entre os sintomas de dirofilariose e cães positivos não foi verificada. Os sintomas de dirofilariose canina são comuns a outras doenças e nem sempre cães portadores de dirofilariose apresentam sintomas (VENCO, 2007).

A maior parte dos estudos sobre dirofilariose na Brasil é direcionada a cães recolhidos em centros de zoonoses, cães que teoricamente estão mais expostos ao vetor e por isso com maior chance de serem infectados. Este resultado inicial motivou um estudo em larga escala para determinar a prevalência de dirofilariose nesta cidade.

6.2 *Teste de acurácia dos três métodos de diagnóstico*

Não foi estatisticamente possível realizar o teste de acurácia devido ao fato de resultados positivos apenas no ICT. De acordo com as recomendações do fabricante do kit ICT, os resultados foram interpretados como positivos com baixa quantidade de antígenos, isso porque o resultado é interpretado por uma faixa que adquire coloração quando positivo e a intensidade desta cor indica a quantidade de antígeno detectado. No caso deste trabalho esta faixa sempre apresentou fraca coloração. Este resultado pode explicar o porquê de não terem sido encontradas microfírias na gota espessa e filtração de membrana, já que a baixa quantidade de

antígenos indica baixa quantidade de vermes adultos e, conseqüentemente, uma menor ou ausência de produção de microfírias. Uma baixa quantidade de microfírias pode ser eliminada pelo organismo do hospedeiro ou pode não aparecer na quantidade de sangue utilizada nos outros testes. É possível que em uma amostra com maior número de cães sejam detectadas microfírias. Mesmo com a maior eficiência do teste imunocromatográfico é recomendado utilizar outros métodos pela possibilidade de serem encontradas espécies de filarias não detectadas na imunocromatografia.

O teste de antígenos, como já foi citado, é o padrão ouro no diagnóstico de dirofilariose. Após o desenvolvimento de testes rápidos de detecção de antígenos, os métodos de detecção de microfírias são indicados como complementares. Mas ainda hoje os métodos de visualização de microfírias ainda são os mais utilizados por serem mais baratos.

De acordo com Courtney e Zeng, (2001) os métodos de gota espessa e concentração apresentam diferença na sensibilidade apenas em cães com baixa microfíremia (menos de 10 microfírias por mL de sangue). Em amostras com microfíremia alta (acima de 50 microfírias por mL) a gota espessa resulta em sensibilidade de 100% e não há diferença nos resultados usando as duas técnicas (COURTNEY; ZENG, 2001). Em outro estudo, Milonakis et al, (2004), mostram que a gota espessa apresenta sensibilidade de 100% apenas em microfíremias acima de 400 microfírias por mL, enquanto que o método de concentração possui sensibilidade de 100% em concentrações a partir de 25 microfírias por mL. Apesar de o método de concentração ser eficiente também em baixas concentrações de microfírias, o teste de antígenos é o padrão ouro porque mesmo em locais com alta prevalência, até 20% dos cães podem não apresentar microfírias circulantes (WATIER-GRILLOT; MARIÉ; CABRE; DAVOUST, 2011). Esta proporção pode variar localmente de acordo com o número de cães que recebem fármacos contendo lactonas macrocíclicas sistêmicas que eliminam microfírias.

O teste de antígenos é o padrão ouro, mas existe a possibilidade de ocorrer resultado falso negativo e falso positivo. Resultados falsos negativos podem ocorrer devido a falha no dispositivo e a não detecção de antígenos quando em baixa concentração no sangue. Resultados falsos positivos podem ocorrer por reação cruzada com antígenos de outros parasitas, apesar do fabricante indicar especificidade de 100% para *D. immitis*. Um estudo feito por Schnyder e Deplazes

em 2012, demonstra resultado falso positivo em testes que detectam antígenos de *D. immitis*. Neste estudo eles testaram cinco kits comerciais de detecção de antígenos, sendo dois de fluxo lateral (nenhum foi o mesmo usado neste presente estudo). O resultado falso positivo encontrado foi causado por reação cruzada com antígenos de *Angiostrongylus vasorum*, um parasita de cães transmitido por moluscos. Este verme foi descrito pela primeira vez na França em 1913 e já foi registrado no Brasil nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (LIMA et al., 1985). Ainda não há registro deste verme no Estado de Rondônia, mas existe a possibilidade que esteja presente devido ao grande fluxo de migrantes no Estado.

6.3 Estudo de prevalência em população canina domiciliada

O valor total de cães positivos é considerado moderado. Estudo feito em Cuiabá por Fernandes et al. (1996), encontrou 11,8% de cães parasitados. Cuiabá está distante 1.466 km de Porto Velho e estão ligadas pela BR 364, assim a capital do Mato Grosso serve como passagem a pessoas vindas do sul e sudeste com destino a Porto Velho. A dirofilariose ainda é uma parasitose com maior prevalência em áreas litorâneas (REIFUR; THOMAZ-SOCCOL; MONTIANI-FERREIRA, 2004), mas o grande fluxo de pessoas (e seus animais de estimação) para cidades em crescimento (BROWN et al., 2012), como Porto Velho, pode ser a causa da expansão da dirofilariose ao interior do país .

A menor prevalência em áreas longe do litoral pode estar ligada aos vetores, pois é possível que estes tenham comportamento diferente de acordo com umidade e temperatura (CLEMENTS, 1999; LABARTHE et al. 1998). Outro fator pode ser a menor quantidade de estudos sobre dirofilariose em locais distantes do litoral, ainda hoje no Brasil a dirofilariose é relacionada como parasitose exclusiva do litoral. Durante a realização deste trabalho, quando foi explicado aos veterinários sobre o projeto, todos afirmaram que dirofilariose só ocorre no litoral.

Os dados colhidos durante as coletas mostraram que a maior parte dos cães amostrados compartilha as seguintes características; moram em quintal, são cães jovens e nasceram em Porto Velho. Esta mesma característica é compartilhada pela maioria dos cães positivos. O fato de a maioria dos cães positivos terem nascido e

nunca saído de Porto Velho, indica que ocorre a transmissão de dirofilariose neste cidade.

Entre as cidades dos cães que não nasceram em Porto Velho, apenas São José do Rio Preto ainda não possui dados sobre a presença desta parasitose. Este resultado reforça o indício de que a dirofilariose foi introduzida em Porto Velho por intermédio de cães oriundos de cidades com população de cães parasitados. Esta teoria também explica a presença de dirofilariose em Coari (SILVA et al., 2008), cidade na beira do rio Solimões, interior do Amazonas, e que só possui acesso fluvial ou aéreo.

O mapa de análise estatística de Kernel indica um “hotspot” que pode estar associado a: população local de vetores (criadouros favoráveis), criação de cães ou introdução maior de cães parasitados. O principal vetor encontrado, o mosquito *C. quinquefasciatus*, possui em média raio de voo de 2,5 km, mas quando há criadouro muito favorável e oferta de alimento próximo, a tendência é manter um curto raio de ação (CLEMENTS, 1999). A sobreposição do “hotspot” com os mapas de condições sanitárias do IBGE não gerou resultado significativo. A região do “hotspot” compartilha as mesmas características com áreas onde não foram registrados casos positivos. Apenas 2% da cidade de Porto Velho possui rede de esgoto. Na maioria o destino do esgoto são fossas sépticas ou rudimentares (um buraco no chão). Em alguns casos, que infelizmente não é difícil de ver, o esgoto corre nas ruas ou nos igarapés próximos, que são muitos.

Foram encontrados resultados positivos apenas no teste imunocromatográfico porque este é o mais sensível dos testes (AMERICAN HERTWORM SOCIETY, 1993; GENCHI; VENCO; GENCHI, 2007; KNIGHT, 1998). Microfilárias não foram encontradas, provavelmente pelos mesmos motivos já explicados na discussão da coleta preliminar. É possível que se nesta fase fosse utilizado o método de concentração de sangue, microfilárias seriam detectadas, mas optou-se por priorizar o sangue para o imunodiagnóstico e PCR. O resultado da PCR serviu para confirmar a presença de DNA de *D. immitis* no sangue dos cães. O menor número de amostras positivas na PCR pode ocorrer por não haver microfilárias circulantes ou baixo número de microfilárias.

Apesar do resultado da PCR ser positivo apenas nas amostras previamente positivas no ICT e negativo nas amostras negativas no ICT, é possível ocorrer resultados falsos positivos e negativos. Isso pode ter ocorrido por não terem sido utilizadas metodologias para verificar a presença, quantidade e pureza de DNA após a extração. Apesar de o controle positivo ter sido visualizado na eletroforese, pode ter ocorrido falha ao extrair DNA das amostras (de uma ou mais) gerando resultado falso negativo. Outra possibilidade é a presença de impurezas junto ao DNA extraído que podem inviabilizar a amplificação e eletroforese. Os resultados falsos positivos podem ter ocorrido devido a contaminação das amostras. Outro fator que pode gerar resultado falso positivo é a detecção de algum outro parasita presente no sangue dos cães. O primer utilizado neste estudo nunca havia sido testado na região Amazônica e apesar de ser específico para a espécie *D. immitis*, é possível que a mesma sequência deste primer seja compatível com a de outro animal presente na região, animal que pode ou não ser conhecido pela ciência.

6.4 Coleta e análise de vetores

O número total de mosquitos coletados foi abaixo do esperado. As coletas foram direcionadas a residências onde foram encontrados cães positivos para dirofilariose. No período destas coletas (abril de 2010 a janeiro de 2011), houve uma seca prolongada fora do normal (ANEXO B). Este fato pode ter influenciado na população de mosquitos. A aplicação sistemática de piretróides pela prefeitura (controle do *Aedes aegypti*) também pode ter influenciado neste resultado.

O fato de ser encontrado um pool positivo composto por corpo (tórax+abdômen) indica que esta espécie participa da transmissão, mas não comprova. A infectividade só pode ser comprovada com pools de cabeça positivos. Na cabeça só se encontram formas metacíclicas de filárias. Existe a possibilidade de haver restos de microfilárias ingeridas no repasto sanguíneo presas no cibário, mas estas não seriam detectadas no exame em microscopia ótica. Apesar de ter aparecido um pool positivo, podem ocorrer resultados falsos negativos e falsos positivos. Na metodologia de extração de DNA não foram utilizadas técnicas para verificar a presença e pureza de DNA após a extração. Desta forma resultados falsos

negativos podem ocorrer devido a falha na extração de DNA e a presença de impurezas que inviabilizam a amplificação e eletroforese. Falsos positivos podem ocorrer por contaminação e a mesma explicação dada sobre as amostras positivas de sangue pode ser usada para explicar possível resultado falso positivo. Os mosquitos da espécie encontrada positiva neste estudo podem se alimentar de diversas fontes (inclusive animais silvestres nativos), então não deve ser descartada a possibilidade de que DNA de outro parasita tenha sido detectado.

Estudos sobre prevalência de vetores naturalmente infectados no Brasil encontraram entre 0,1 a 0,5% de vetores parasitados com formas larvais (BRITO et al., 2001; LEITE, 2005; ROCHA, 2007). A espécie encontrada positiva neste estudo, também é a espécie com maior ocorrência de indivíduos parasitados em estudos sobre infecção natural de vetores de dirofilariose. O local de coleta do mosquito positivo é na beira de um igarapé que estava represado devido a uma obra. Naquele local havia acúmulo de lixo, orgânico e inorgânico e muitas residências tipo palafita próximas. O encontro deste mosquito positivo não significa que este local possui maior risco a transmissão, já que os mosquitos desta espécie podem voar num raio de 2,5 km (CLEMENTS, 1999). Este resultado, somado com os resultados das amostras de cães, comprova a importância da espécie *C. quinquefasciatus* no ciclo da dirofilariose e a ocorrência da transmissão de dirofilariose canina em Porto Velho.

REFERÊNCIAS*

- AHID, S. M. M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Mosquitos potenciais vetores de dirofilariose canina na região nordeste do Brasil. **Rev. Saude Publica**, v. 33, p. 560-565, 1999.
- AHID, S. M. M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; SARAIVA, L. Q. Dirofilariose canina na Ilha de São Luís, Nordeste do Brasil: uma zoonose potencial. **Cad. Saude Publica**, v. 15, p. 405-412, 1999.
- ALMEIDA, M. A. O. et al Parasitismo de cães por microfilárias *Dirofilaria immitis*: influência da raça, sexo e idade. **Rev. Brasileira de Saúde e Produção Animal.**, v. 1, p. 59-64, 2001.
- ALVES, L. C. et al. Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 587-590, 1999.
- ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates, their development and transmission**. 2nd ed. Wallingford, UK, 2000. 650 p.
- ANDERSON, R. C.; BAIN, O. **Keys to genera of the order Spirurida. Part 3. Diplostriaenoidea, Aprocotoidea and Filarioidea**. Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham Royal, Bucks, v. 3, p. 59–116, 1976.
- BENDAS, A. J. R. et al. Ocorrência de *Dirofilaria immitis* no entorno de um caso diagnosticado na Zona Sul do Rio de Janeiro/RJ, Brasil. **Acta Sci. Vet.**, v. 35, p. 678-679, 2007.
- BIDGOOD, A.; COLLINS, G. H. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Sydney. **Aust. Vet. J.**, v. 73, p. 103-104, 1996.
- BRITO, A. C. et al. Prevalência da filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió, Alagoas, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, p. 1497-1504, 2001.
- BROWN, H. E. et al. Key factors influencing canine heartworm, *Dirofilaria immitis*, in the United States. **Parasite Vectors**, v. 5, p. 255, 2012.
- CANCRINI G.; GABRIELLI S. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. **Mappe Parassitologiche**, v. 8. p. 57-64, 2007.
- CARDOSO, L.; MENDAO, C.; DE CARVALHO, L. M. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. **Parasite Vectors**, v. 5, p. 62, 2012.

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

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/dirofilariasis/biology_d_immitis.html> Acesso em: 07 abr. 2013.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes: sensory reception and behavior.** Wallingford, UK: CABI, 1999. v. 2, p. 77-79.

DI SACCO, B.; DEL ZOPPO, B.; GENCHI C. Survey of dog *Dirofilaria immitis* mosquito vectors in Milan and vicinity. **Parassitologia**, v. 36, p. 50, 1994

FERNANDES, C. G. N., et al. Incidência de dirofilariose canina na região da Grande Cuiabá, Estado de Mato Grosso, Brasil. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996. Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, MT, 1996. p. 323.

FERREIRA, A. F.; BARBOSA, F. C.; MASTRANTONIO, E. C. Ocorrência da dirofilariose canina na cidade de Uberlândia, MG, Brasil. **Veterinária Notícias**, v. 5, n. 1, p. 57-61, 1999.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia.** São Paulo: EDUSP, 2002. v. 2, p. 121-124.

GARCEZ, L. M. et al. Focos de dirofilariose canina na Ilha do Marajó: um fator de risco para a saúde humana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, p. 333-336, 2006

GENCHI, C.; RINALDI, L.; CASCONI, C.; MORTARINO, M.; CRINGOLI, G. Is heartworm really spreading in Europe? **Vet. Parasitol.**, v. 133, p. 137-148, 2005.

GENCHI, C.; VENCO, C.; GENCHI, M. Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria*. **Mappe Parassitologiche**, v. 8, p. 178-182. 2007.

GONZALES, J. A. **Seroprevalencia de la dirofilariosis y ehrlichiosis canina en los distritos de Chorrillos, La Molina y San Juan de Miraflores.** 2002. 101 f. [Ph. D. thesis] - Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 2002

GUERRERO, J. Update on the distribution of *Dirofilaria immitis* in dogs from southern Europe and Latin America. In: HEARTWORM SYMPOSIUM, 1992, Batavia IL. **Proceedings...** Batavia IL: American Heartworm Society, 1992. p. 31-37.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2010. Disponível em: <www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1> Acesso em: 4 jul. 2012.

JAFARI, S.; GAUR, S. N. S.; KHAKSAR, Z. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs of Fars province of Iran. **J. Appl. Anim. Res.**, v. 9, p. 27-31. 1996.

KATHOLI, C. R.; TOE, L.; MEERWATER, A.; UNNASCH, T, R. Determining the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in vector populations by polymerase chain reaction screening of pools of black flies. **J. Infect. Dis.**, v.172, p. 1414-1417. 1995.

KNIGHT, D.H. 1999 Guidelines for the diagnosis, prevention, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. pp. 257–264 in Seward, R.L. (Ed.)

Recent advances in heartworm disease: symposium '98. Batavia, Illinois, American Heartworm Society. 1998

KOZEK, W. J. Prevalence of canine filariae in Puerto Rico and the Caribbean. In HEARTWORM SYMPOSIUM, 1995, Batavia, IL. **Proceedings...** Batavia, IL: American Heartworm Society, 1995. p. 55- 64.

LABARTHE, N.; SERRAO, M. L.; MELO, Y. F.; DE OLIVEIRA, S. J.; LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R. Potential vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy 1856) in Itacoatiara, oceanic region of Niteroi municipality, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 425-432, 1998.

LEE, J. C.; LEE, C. Y.; SHIN, S. S.; LEE, C. G. A survey of canine heartworm infections among German shepherds in South Korea. **Korean J. Parasitol.**, v. 34, p. 225-231, 1996.

LEITE, L. C. **Mosquitos (Diptera, Culicidae) vetores potenciais de *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) em Guaratuba, Paraná.** 2005. 122 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

LIMA, W. S.; COSTA, H. M. A.; GUIMARÃES, M. P.; LEITE, A. C. R. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Nematoda: Protostonylidae, em cães de Minas Gerais, Brasil. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 233-235, 1985.

LINDEMANN, B. A.; EVANS, T. L.; MCCALL, J. W. Clinical responses of dogs to experimentally induced *Dipetalonema reconditum* infection. **Am. J. Vet. Res.**, v. 44, p. 2170–2172, 1983.

LOK, J. B. *Dirofilaria* sp: taxonomy and distribution. In: BOREHAM, P. F. L.; ATWELL, R. B. (Ed.). **Dirofilariasis**. Boca Raton, Florida: CRC Press, p. 82-84, 1988.

LUDLAM, K. W.; JACHOWSKI, L. A.; OTTO, G. F. Potential vectors of *Dirofilaria immitis*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 157, p. 1354-1359, 1970.

MANFREDI, M. T.; DI CERBO, A.; GENCHI, M. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. **Mappe Parassitologiche**. v. 8, p. 23-26, 2007.

MILANEZ DE CAMPOS, J. R. Human Pulmonary dirofilariasis analysis of 24 cases from Sao Paulo, Brazil. **Chest**. v. 112, p. 729-733, 1997.

MYLONAKIS, M.E.; PAPADOPOULOS, E.; KOUTINAS, A.F.; PAITAKI, C.; LEONTIDES, L. Comparative methodology for the detection and differentiation of circulating microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the dog. **Journal of Helminthology** 78, 137–140. 2004.

MENESES, A. M. C.; CARVALHO, F. M. G. M.; YOSHINO, E. H. **Relato de um caso de dirofilariose (*Dirofilaria immitis*) em um cão (*Canis familiaris*) na cidade do Oiapoque.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 14., 1997, Curitiba, Paraná. **Anais...** Curitiba, PR, 1997. p. 30.

- MORAES, M. V. B.; ROCHA, C. G. **Achado de microfilárias em cães procedentes de área não litorânea em Fortaleza (Primeiro Relato)**. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA EM LÍNGUA PORTUGUESA, 6., 1993, Salvador, BA. **Anais...** Salvador, BA, 1993. p. 337.
- MORCHÓN, R.; CARRETÓN, E.; GONZALES-MIGUEL, J.; MELLADO-HERNANDÉZ, I. Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe – New distribution trend. **Front. Physiol.**, v. 3, p. 1-11, 2012.
- PAMPIGLIONE, S.; RIVAS F. Human dirofilariasis due to *Dirofilaria (Nochtiella) repens*: an update of world literature from 1995 to 2000. **Mappe Parassitologiche**, v. 8, p. 221-224, 2007.
- REIFUR, L.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MONTIANI-FERREIRA, F. Epidemiological aspects of filariosis in dogs on the coast of Paraná state, Brazil: with emphasis on *Dirofilaria immitis*. **Vet. Parasitol.**, v. 122, p. 273–286, 2004.
- ROCHA, R. T. **Padronização da Reação de PCR para Detecção de *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) e Determinação da Taxa de Infecção em Mosquitos Coletados na Ilha de Santa Catarina**. 2007. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- RODRIGUES-SILVA, R.; MOURA, H.; DREYER, G.; REY, L. Human pulmonary dirofilariasis: a review. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 37, p. 523-530, 1995.
- ROSA, A. Prevalence of canine dirofilariasis in the City of Buenos Aires and its outskirts (Argentina). **Vet. Parasitol.**, v. 109, p. 261–264, 2002.
- SCHWAN, E. V.; DURAND, D. T. Canine filariosis caused by *Dirofilaria immitis* in Mozambique: a small survey on the identification of microfilarie. **J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.**, v. 73, p. 124-126, 2002.
- SCOLES, G. A.; KAMBHAMPATI, S. Polymerase chain reaction-based method for the detection of canine heartworm (Filaridea: Onchocercidae) in mosquitoes (Diptera: Culicidae) and vertebrate hosts. **J. Med. Entomol.** v. 32, p. 864-869, 1995.
- SEVIMLI, F. K.; KOZAN, E.; BÜLBÜL, A.; BIRDANE, F. M.; KÖSE, M.; SEVIMLI, A. *Dirofilaria immitis* infection in dogs: unusually located and unusual findings. **Parasitol. Res.**, v. 101, p. 1487–1494, 2007.
- SILVA A. M. A.; ALMEIDA, K. S, SOUSA, J. J. N.; FREITAS, F. L. C. Dirofilariose Canina No Município De Coari, Amazonas, Brasil. **Archives of Veterinary Sciences**, v. 13, p. 145-150, 2008.
- SLOCOMBE, J. O. D. **Reflections on heartworm surveys in Canada over 15 years**. In: HEARTWORM SYMPOSIUM, 92., Batavia, IL. **Proceedings...** Batavia, IL: American Heartworm Society, 1992. p. 21-30.
- SOULSBY, E. J. L. **Helminths, arthropods and protozoa of domestic animals**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1982. 143 p.

- SOUZA, N. F. et al. Prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães no município de Belém, PA, com base na microfilaremia. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 6, p. 83-86, 1997.
- SOUZA, N. F.; LARSSON, M. H. M. A. Freqüência de dirofilariose canina (*D. immitis*) em algumas regiões do Estado de São Paulo por meio da detecção de antígenos circulantes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, p. 321-325, 2001.
- SUASSUANA, A. C. D.; DE PAULA, V. V.; FEIJÓ, F. M. C. Ocorrência de cães parasitados por *Dirofilaria immitis* em Mossoró – RN. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 25, p. 210-213, 2003.
- TANAKA, H.; WATANABE, M.; OGAWA, Y. Parasites of stray dogs and cats in the Kanto region, Honshu, Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 771, p. 657-661, 1985.
- TRALDI, G. **Eziologia e ciclo biologico del parassita.** Milano, 1998.
- UNI, S. et al. *Onchocerca eberhardi* n. sp. (Nematoda: Filarioidea) from silka deer in Japan; relationships between species parasitic in cervids and bovids in the Holoartic region. **Parasite.** v. 14, p. 199-211. 2007.
- VENCO, L. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) in dogs. **Mappe Parassitologiche**, v. 8, p. 33-37, 2007.
- VEZZANI, D.; EIRAS, D. F.; WISNIVESKY, C. Dirofilariasis in Argentina: historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in a natural mosquito population. **Vet. Parasitol.**, v. 136, p. 259-273, 2006.
- WATIER-GRILLOT, S; MARIÉ. J-L; CABRE, O; DAVOUST, B. Survey of Canine *Dirofilaria immitis* Infection in New Caledonia. **Vet. Med. Intern.** v. 2011, P. 5, 2011.
- WU, C. C.; FAN, P. C. Prevalence of canine dirofilariasis in Taiwan. **J. Helminthol.**, v. 77, p. 83-88, 2003.

APÊNDICE A- Ficha de amostras

Ficha de amostras - Projeto filariose canina (ICB5 – USP) 25/09/2010 Equipe:_____

Nº _____

Idade: _____ Raça: _____ Sexo: M() F()

Cor: Escuro() Claro() Misturado() Pêlo: Longo() Curto()

Peso: _____ kg

Local de coleta: _____

Endereço do animal: _____

Moradia: Intradomiciliar() Quintal() Errante()

Viagens? _____

Local de nascimento: PVH() Outro: _____

Frequência de banho: Semanal() Quinzenal() Mensal() Raramente() Nenhum()

Tomou vermífugo: Sim() Não()

Qual? _____ Quando? _____

Resultado: Negativo Positivo em: Gota espessa () PCR () Sorológico ()

Obs: _____

ANEXO A- Mapas de Porto Velho com sobreposição de “hotspot”

Sobreposição do hotspot com indicadores sociais de Porto Velho. Todas as informações e os mapas foram gerados diretamente no site do IBGE. Em todos os mapas, o gradiente de cores indica do menor para o maior o número de residências. Mapas disponíveis on-line em: <http://www.censo2010.ibge.gov.br/painel/?nivel=st>

Figura 1- Domicílios abastecidos de água com a rede geral

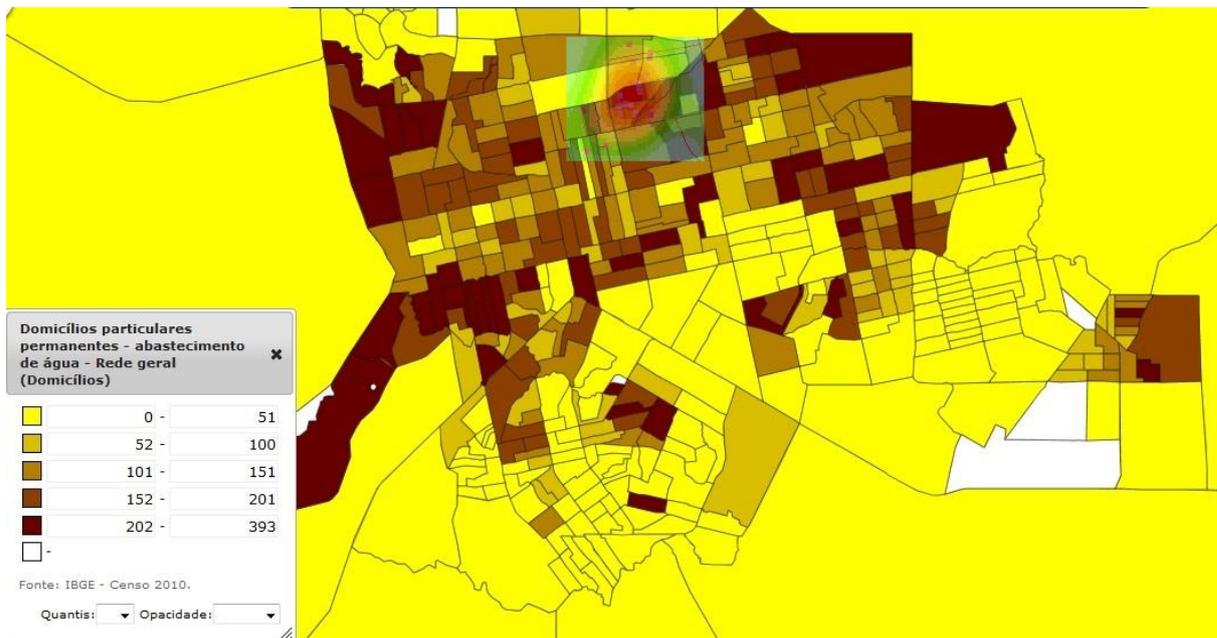


Figura 2- Domicílios com água de poço ou nascente.



Figura 3 – Domicílios com abastecimento de água e recolhimento de lixo.

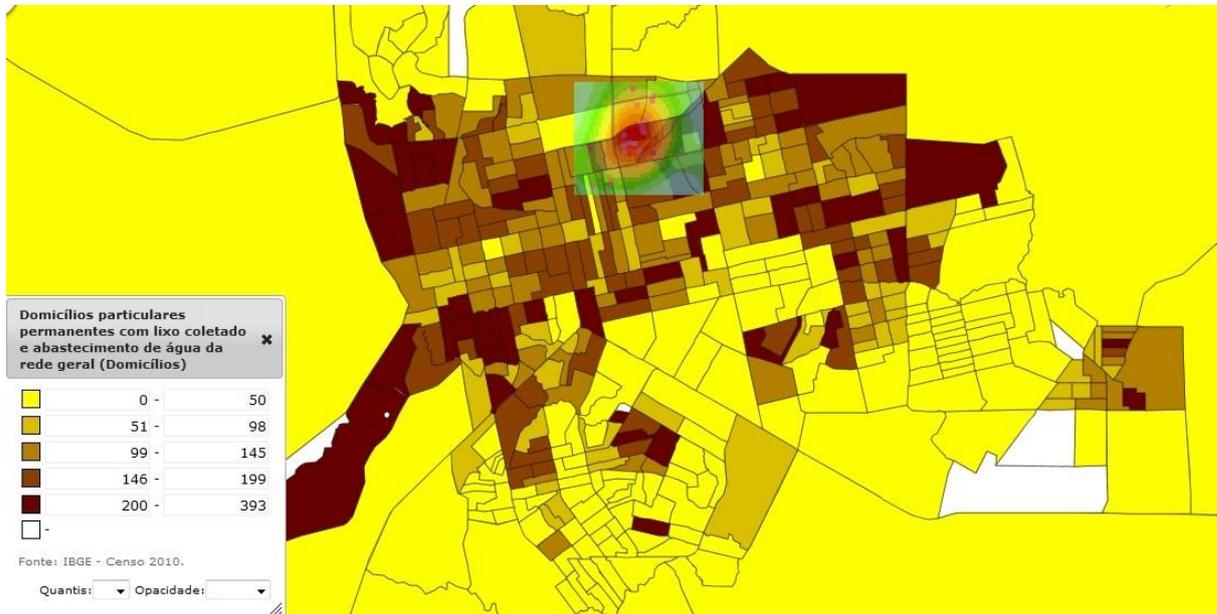


Figura 4 – Domicílios ligados e rede geral de esgoto ou rede pluvial.

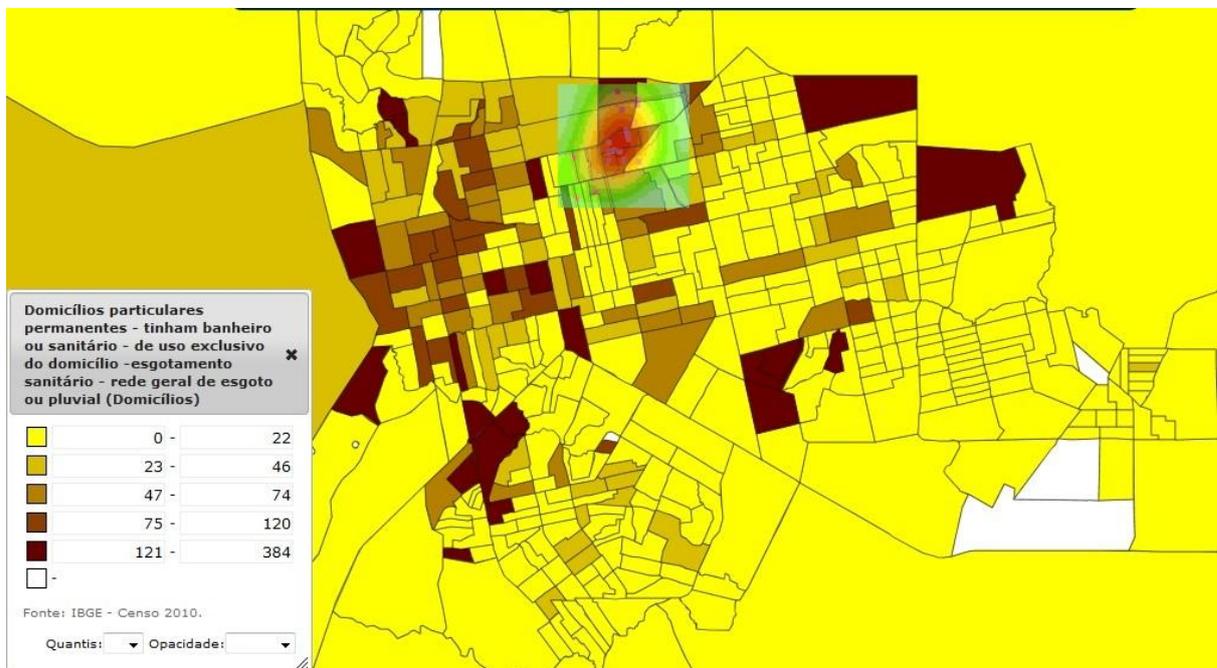


Figura 5 – Domicílios com fossa rudimentar.



Figura 6- Domicílios com fossa séptica.

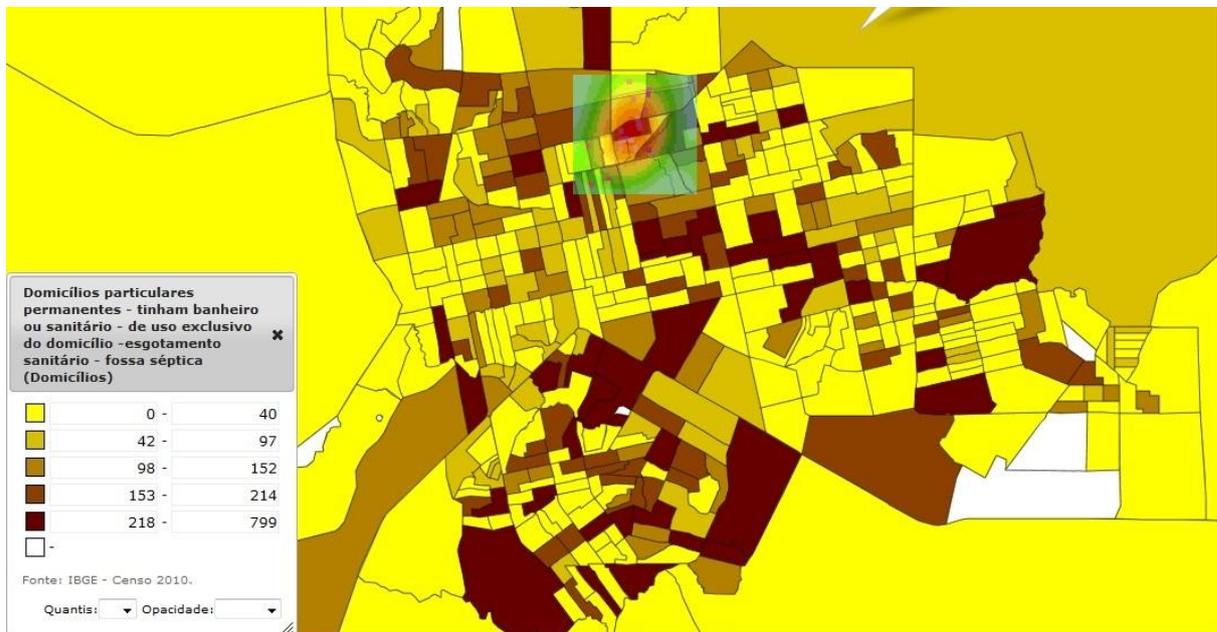


Figura 7 – Domicílios com lixo coletado por caçambas.

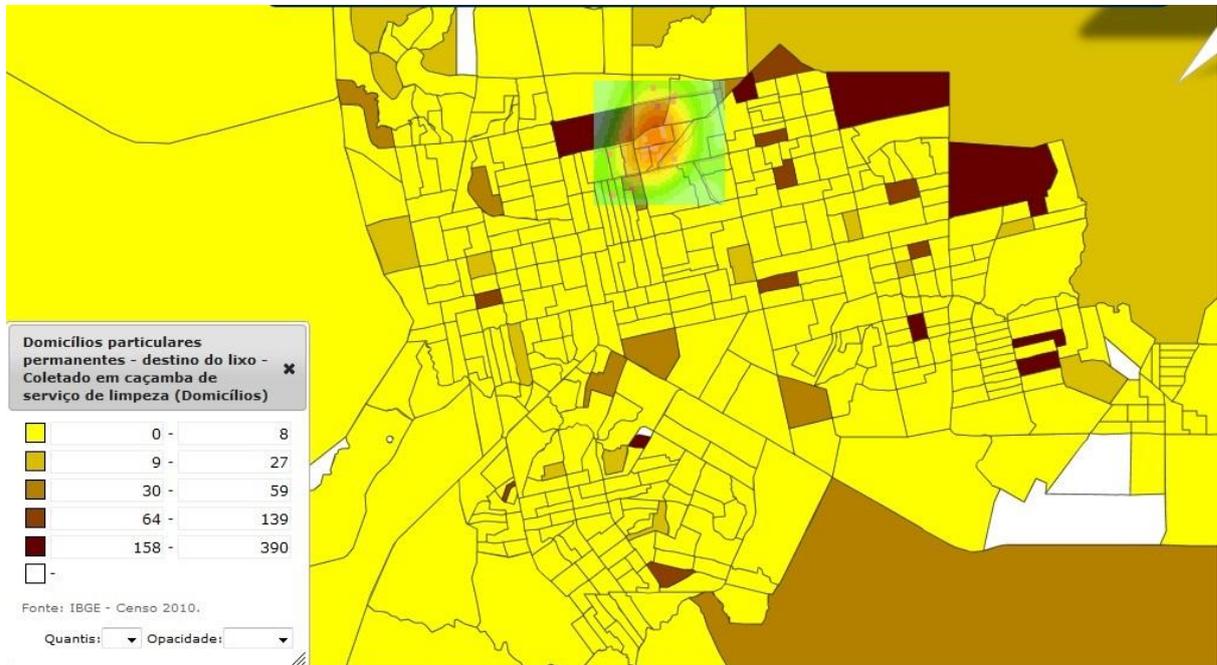


Figura 8 – Domicílios com lixo jogado em terrenos baldios.



Figura 9 – Domicílios com lixo jogado em igarapés.

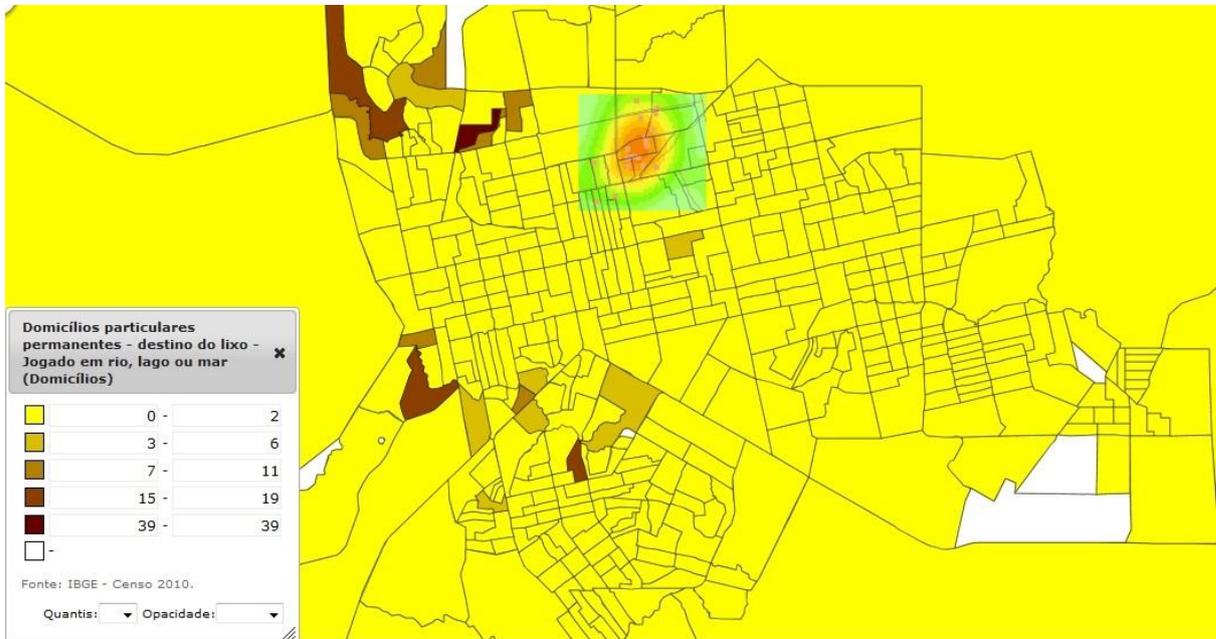


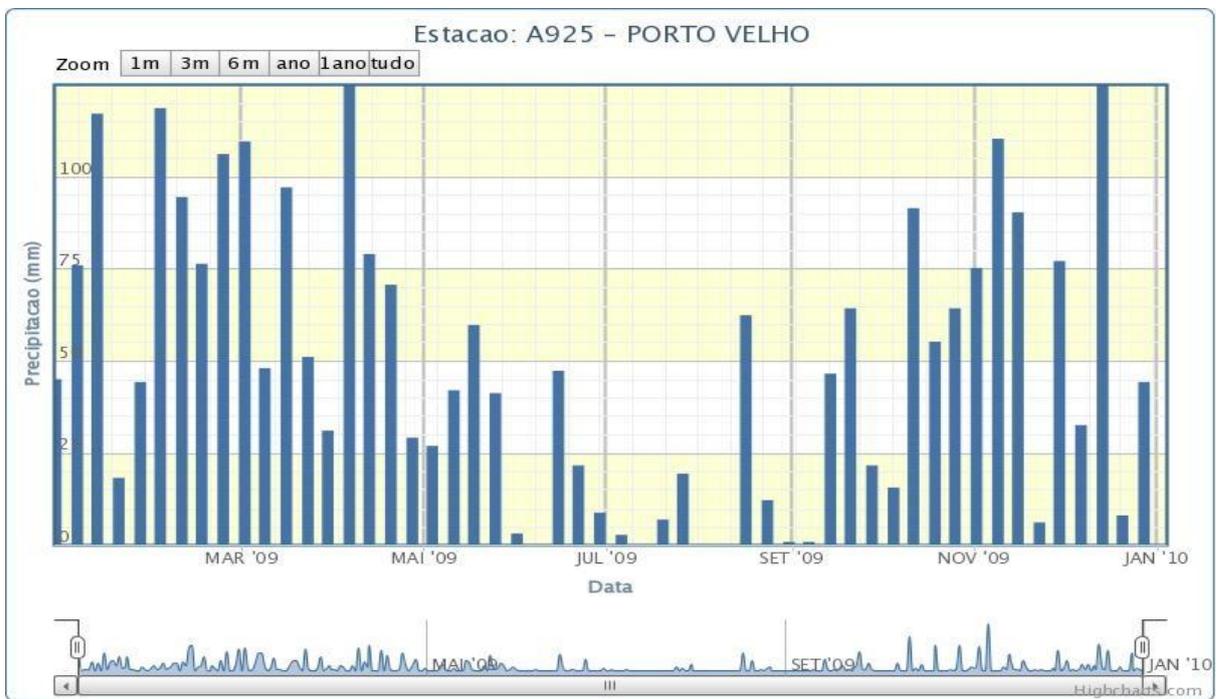
Figura 10 – Domicílios com lixo coletado.



ANEXO B- Gráficos de pluviosidade de Porto Velho

Gráficos de precipitação da cidade de Porto Velho. Primeiro um gráfico de 2009 com índice de chuvas considerado dentro da média. O segundo gráfico é de 2010 com média abaixo do normal. O terceiro gráfico é de 2011 que mostra novamente um índice considerado dentro do normal. Todos gráficos estão disponíveis no site: http://www.inmet.gov.br/porta1/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf

Figura 1- Gráfico de precipitação medida na cidade de Porto Velho em 2009



Fonte: Inmet 2012.

Figura 2- Gráfico de precipitação na cidade de Porto Velho em 2010.

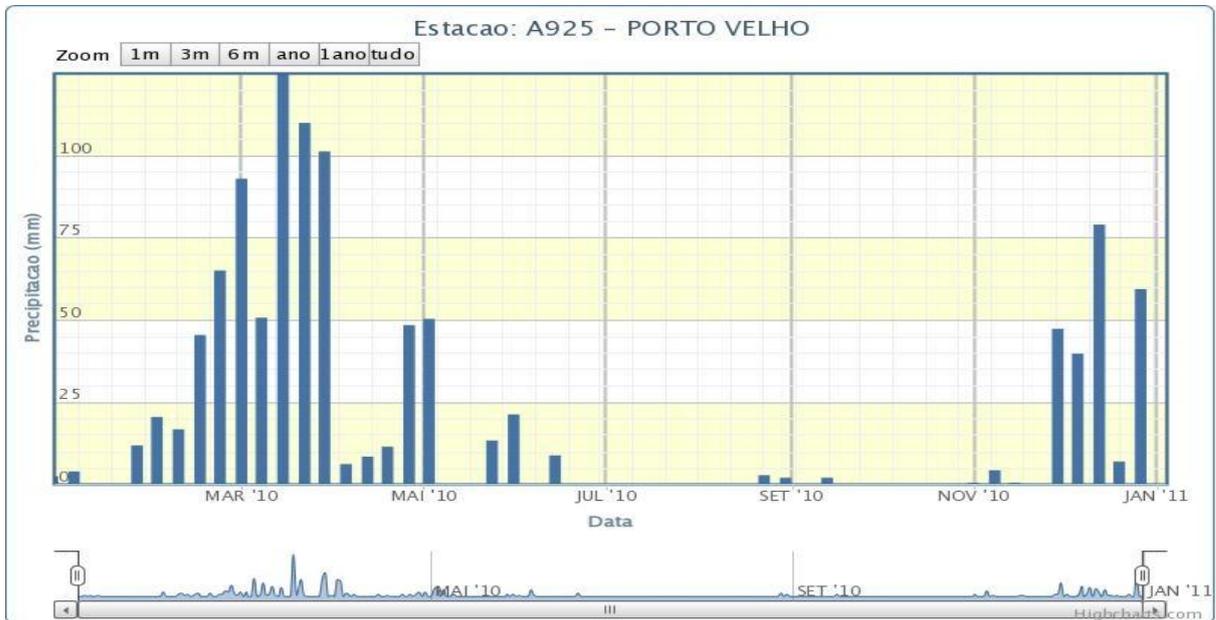
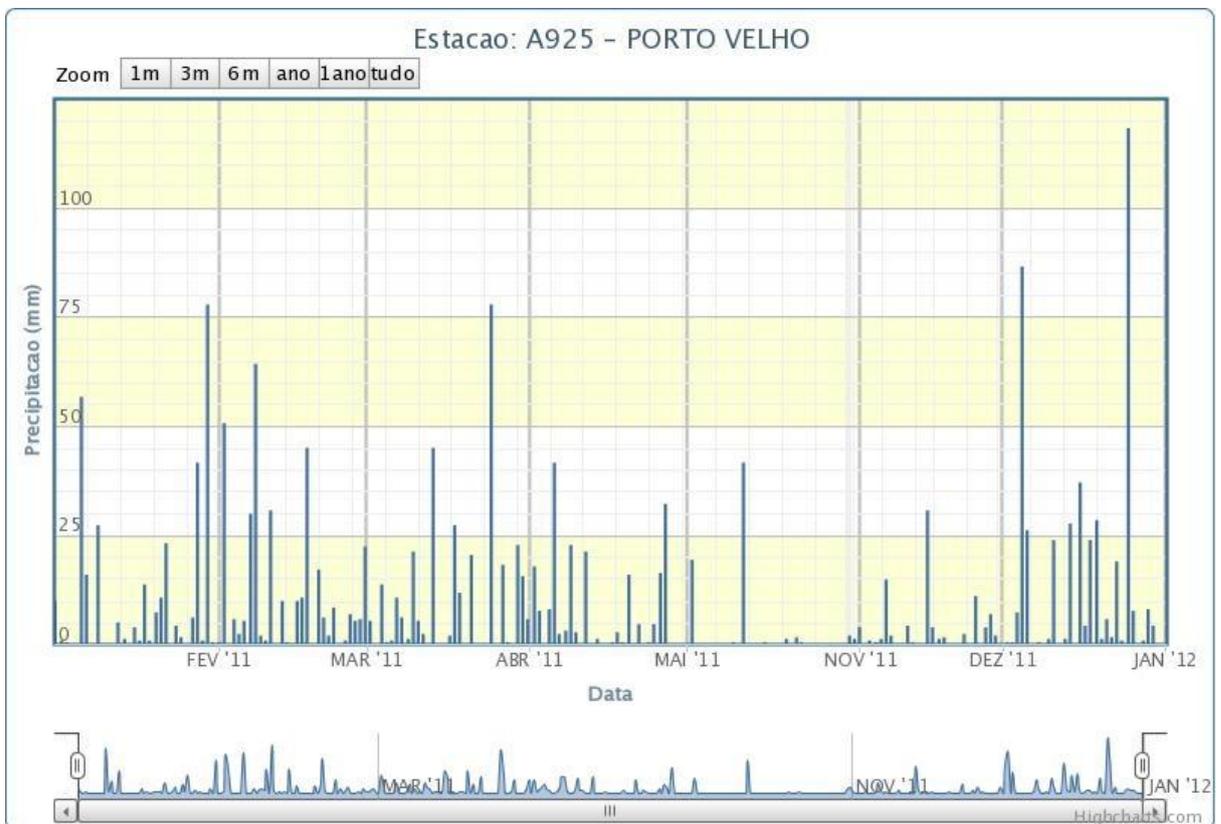


Figura 3- Gráfico de precipitação medida na cidade de Porto Velho em 2011



Fonte: Inmet 2012