



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ILMD

INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
FioCruz Amazônia

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ

INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONDIÇÕES DE VIDA E
SITUAÇÕES DE SAÚDE NA AMAZÔNIA – PPGVIDA**

UZIEL FERREIRA SUWA

**INVESTIGAÇÃO DIAGNÓSTICA DE PACIENTES COM MANSONELOSE
SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM IVERMECTINA NO MUNICÍPIO DE SÃO
GABRIEL DA CACHOEIRA, AMAZONAS**

MANAUS

2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ILMD

INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
FioCruz Amazônia

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ

INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONDIÇÕES DE VIDA E
SITUAÇÕES DE SAÚDE NA AMAZÔNIA – PPGVIDA**

UZIEL FERREIRA SUWA

**INVESTIGAÇÃO DIAGNÓSTICA DE PACIENTES COM MANSONELOSE
SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM IVERMECTINA NO MUNICÍPIO DE SÃO
GABRIEL DA CACHOEIRA, AMAZONAS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia-PPGVIDA do Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, área de concentração: Produção e modulação social e biológica de processos endêmico epidêmicos.

ORIENTADOR: Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz

CO-ORIENTADOR: Dr. James Lee Crainey

MANAUS

2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ILMD

INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
FioCruz Amazônia

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ

INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONDIÇÕES DE VIDA E
SITUAÇÕES DE SAÚDE NA AMAZÔNIA – PPGVIDA**

UZIEL FERREIRA SUWA

**INVESTIGAÇÃO DIAGNÓSTICA DE PACIENTES COM MANSONELOSE
SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM IVERMECTINA NO MUNICÍPIO DE SÃO
GABRIEL DA CACHOEIRA, AMAZONAS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia-PPGVIDA do Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, área de concentração: Produção e modulação social e biológica de processos endêmico epidêmicos.

ORIENTADOR: Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz

CO-ORIENTADOR: Dr. James Lee Crainey

MANAUS

2017

Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz-AM)

FICHA CATALOGRÁFICA
Seção Biblioteca Dr. Antônio Levino da Silva Neto - ILMD

S968i

Suwa, Uziel Ferreira.

Investigação diagnóstica de pacientes com Mansonelose submetidos ao tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas. / Uziel Ferreira Suwa. - Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2017.

72 f.

Dissertação (Mestrado em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz.

Co-orientador: Dr. James Lee Crainey

1. Mansonella 2. Filárias 3. Ivermectina 4. PCR I. Título

CDU 616.995(811.3) (043.3)

CDD 616.9652098113

22. ed.

UZIEL FERREIRA SUWA

**INVESTIGAÇÃO DIAGNÓSTICA DE PACIENTES COM MANSONELOSE
SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM IVERMECTINA NO MUNICÍPIO DE SÃO
GABRIEL DA CACHOEIRA, AMAZONAS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia-PPGVIDA do Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, área de concentração: Produção e modulação social e biológica de processos endêmico epidêmicos.

Aprovada em: 25 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz - Orientador

Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz-AM)

Dr. Felipe Arley Costa Pessoa – Membro Interno ao Programa

Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz-AM)

Dr. Pritesh Jaychand Lalwani – Membro Externo ao Programa

Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz-AM)

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz pela fundamental orientação desde a minha iniciação científica, pelos ensinamentos e experiências que foram de um valor inestimável para o desenvolvimento desse trabalho; pela parceria estabelecida ao longo desses seis anos; pela confiança em mim depositada, além da grande amizade;

Ao Dr. James Lee Crainey pela co-orientação, pela paciência e ajuda nas análises moleculares;

Ao Dr. Felipe Arley Costa Pessoa, pelo excelente trabalho na coordenação do projeto, pelo apoio e condução do trabalho de campo, além da amizade e incentivo no meio científico;

À MsC. Lucyane, Maria Oliveira, MsC. Joycenea, Jordam William e ao Téc. Ricardo Moura Mota, integrantes do grupo de coleta de campo;

Ao Sr. Ângelo Quintanilha, Derlinda Gonçalves, Evair Lima, Adrian Lopes, Aldair Braz, Monalisa Pinheiro, funcionários do Distrito Sanitário Especial Indígena (DSEI) que auxiliaram em todo o trabalho de campo.

Ao secretário e ao subsecretário de saúde do município, Luís Lopes e Dieckson Weslen, assim como a todos os funcionários das Unidades Básicas de Saúde, pelo apoio logístico na coleta do material biológico;

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane/ Fundação Oswaldo Cruz (ILMD/ Fiocruz) pela oportunidade e apoio recebidos durante o desenvolvimento deste trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPEAM) pela concessão de bolsas de estudo que possibilitaram o desenvolvimento científico;

À coordenação da pós-graduação e à secretaria acadêmica do ILMD, pelo apoio constante;

Aos colegas do curso, Carol, Cláudia, Layssa, Marcello e Tiziana pelo incentivo e apoio nos momentos de dificuldade;

Aos meus amigos, em especial à Andréa, Adriana, Cláudia, Dayna, Érika, Ilzinei, Lucyane, Maila, Marla e Maria, pelos bons momentos que sempre compartilhamos juntos;

Finalmente aos meus pais, Iêda e Janildo pela paciência e tolerância nos momentos de ausência e preocupações esporádicas, bem como meus irmãos Josiane e Adriano e meus sobrinhos Leda, Marcos e Ana Júlia – família a qual declaro meu amor infinito. Vocês são, sem dúvida, o alicerce para esta conquista.

À todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Meu sincero muito obrigado!

“Na vida de todo homem, chega aquele momento especial em que figurativamente lhe tocam no ombro e lhe oferecem a oportunidade de realizar algo muito especial, uma coisa única em sua vida e ajustada ao seu talento; que tragédia se esse momento vier a encontrá-lo despreparado ou não qualificado para a tarefa que representaria o seu melhor momento”.

(Winston Churchill)

RESUMO

Mansonelose é uma Doença Tropical Negligenciada (DTN) que possui ampla distribuição geográfica na Amazônia, acometendo populações indígenas e ribeirinhas. Apesar de ter sido descrita há muitos anos, os padrões clínicos patológicos desta doença continuam sem comprovações científicas, e, por isso, tem sido negligenciada e considerada uma filariose assintomática com pouco interesse e incentivo à pesquisa, com carência de informações epidemiológicas, clínico patológicas e de tratamento. Em relação a isso, este projeto, na perspectiva de contribuir para o estudo desta endemia regional, teve por objetivo investigar os pacientes tratados com Ivermectina no município de São Gabriel da Cachoeira, em amostras coletadas após 3 meses do tratamento. Foram analisadas por testes tradicionais (gota espessa de sangue) e testes mais sensíveis (moleculares - PCR), 34 amostras de sangue. Deste quantitativo, 8 (23,5%) amostras foram confirmadas nas lâminas de gota espessa e 18 (52,9%) amostras permaneceram positivas em testes moleculares utilizando *primers* para a amplificação de sequências de DNA específicas para mansonelas. Desta forma, o diagnóstico molecular mostra-se mais sensível que o diagnóstico microscópico, com um aumento de (2,3%) antes do tratamento, e (2,1%) depois o tratamento. A sintomatologia declarada pelos pacientes positivos como febre, dor no corpo, dor nas articulações, dor de cabeça, frieza nas pernas, tontura e dormência nas pernas apresentaram redução após tratamento. As análises moleculares também incluíram a busca da identificação de alvos de resistência do parasito ao medicamento, tendo em vista que 18 amostras permaneceram positivas. O tratamento utilizado para eliminação de microfilaremia com uma dose de 0,15mg/kg de ivermectina, não demonstrou eficácia nos pacientes tratados no município de São Gabriel da Cachoeira, com possibilidade de reinfecção e resistência dos parasitas ao medicamento. Contudo, o diagnóstico microscópico apresenta baixa sensibilidade, principalmente em indivíduos com baixa parasitemia. Já o diagnóstico molecular tem se mostrado mais sensível, podendo ser útil em áreas de transmissão para certificação das espécies circulantes, tendo em vista que o tratamento aplicado é diferenciado para cada espécie de mansonela. A sintomatologia declarada pelos pacientes neste estudo foi semelhante à de outros estudos, e o tratamento com ivermectina reduziu a frequência desses sintomas. Não foi identificada resistência das mansonelas ao medicamento por meio dos 12 *primers* testados para β -tubulina, apesar disso, podem existir outros genes que estejam proporcionando a resistência e que não sejam os mesmos testados nesse estudo e que encontrem-se vinculados (ou não) especificamente para mansonelas.

Palavras-chave: Filárias; Amazônia; *Mansonella*; PCR; Ivermectina.

ABSTRACT

Mansonellosis is a Neglected Tropical Disease (NTD) that has a wide geographic distribution in the Amazon, affecting indigenous and riverside populations. Although it was described many years ago, the pathological clinical patterns of this disease still lack scientific evidence. It has been put aside and considered an asymptomatic filariasis which is of little interest and encouragement to be investigated thoroughly. Epidemiological and pathological clinical information as well as treatment are scarce and difficult to access. Thus, this project aims to contribute to the study of this regional endemic, analysing the the blood samples collected from patients after a three- month treatment period with ivermectin in São Gabriel da Cachoeira. 34 blood samples were tested using traditional tests (thick blood drop) and more sensitive ones (molecular – PCR). Considering this quantitative, 8 (23.5 %) samples were confirmed on thick slides and 18 (52,9%) samples remained positive in molecular tests using primers for the amplification of DNA sequences specific for mansonelas. As a result, the molecular diagnosis is far more sensitive than the microscopic one, which represents an increase of 2.3% before the treatment, and 2.1 % after it. The symptoms, such as fever, headache, body pain, joint pain, cold legs, dizziness and numbness in the legs reported by patients tested positive, reduced after the treatment. Molecular analyses also included the search for the identification of resistance targets of the parasite to the drug, considering that 18 samples still remained positive. However, the microscopic diagnosis presents low sensitivity, especially with coma parasitemia. Already the molecular diagnosis has appeared more sensitive, and may be useful in areas of transmission for the test of circulating species, considering that the applied treatment is differentiated for each species of mansonella. The symptomatology reported by the patients in this study was published in other studies, and treatment with ivermectin reduced the frequency of symptoms. No drug resistance was identified by the 12 primers tested for β -tubulin; however, there are other resistance genes that are providing resistance that are not the same as those tested in this study and that are bound (or not) specifically for mansonelas.

Keywords: Filarias; Amazônia; Mansonella; PCR; Ivermectin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: a- <i>Mansonella ozzardi</i> b- <i>Mansonella perstans</i>	17
Figura 2: Distribuição da <i>Mansonella ozzardi</i> nas Américas.....	18
Figura 3: Maruim (Ceratopogonidae).....	21
Figura 4: Pium (Simuliidae).....	22
Figura 5: Esquema do ciclo biológico da Mansonelose por <i>M. ozzardi</i>	23
Figura 6: Mapa do Estado do Amazonas, com o município de São Gabriel da Cachoeira em destaque e com pontos onde foram realizadas as coletas. Demarcações mostram as três áreas subdivididas (1- área 1, 2- área 2 e 3- área 3).....	29
Figura 7: Mapa com demarcações de bairros na área 1, e das comunidades estudadas na área 2.....	29
Figura 8: Mapa com demarcações das comunidades estudadas na área 3.....	30
Figura 9: Integrantes do grupo de coleta da 1ª Excursão em São Gabriel da Cachoeira. (Da esquerda para direita - Joycenea, Jordam William, Ricardo Mota, Lucyane, Felipe, Maria Oliveira e Uziel).....	30
Figura 10: Equipe da 2ª Excursão em São Gabriel da Cachoeira. (Monalisa, Uziel, Lucyane, Adrian e Aldair).....	31
Figura 11: Coleta de sangue total para análise molecular em indivíduo positivo para mansonelose no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, em outubro de 2015.....	32
Figura 12: Coleta de sangue para gota espessa, em indivíduo positivo para mansonelose no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, em outubro de 2015.....	33
Figura 13: Eletroforese em gel agarose da ‘NestedPCR’ para filárias (com banda de 344pb caracterizando <i>O. volvulus</i> , banda de 312pb caracterizando <i>Mansonella perstans</i> , banda de 305pb caracterizando <i>Mansonella Ozzardi</i> e conjunto de bandas caracterizando marcador referência - Lader).....	34
Figura 14: Paciente recebendo o procedimento clínico realizado por médico da Equipe do DSEI-Rio Negro/SGC, em outubro de 2015.....	35
Figura 15: Fluxograma das amostras analisadas nos diagnósticos de microscopia e molecular, dos indivíduos positivos antes e após tratamento com ivermectina do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas.....	42
Figura 16: Microfilária de <i>Mansonella ozzardi</i> em gota espessa de sangue, coradas com Giemsa, de um indivíduo positivo do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas.....	42

Figura 17: Microfilária de <i>Mansonella perstans</i> em gota espessa de sangue, coradas com Giemsa, de um indivíduo positivo do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas.....	42
Figura 18: Ilustração da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de ITS de indivíduos tratados com ivermectina no município de São Gabriel da Cachoeira-Am. As amostras analisadas e os controles positivos apresentaram aproximadamente 310pb, o controle negativo não apresentou banda e o Ladder (marcador de 100pb).....	43
Figura 19: Ilustração da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de CO1 de indivíduos tratados com ivermectina no município de São Gabriel da Cachoeira-Am. As amostras analisadas e os controles positivos apresentam aproximadamente 680pb, os controles branco e negativos não apresentaram bandas e o Ladder (marcador de 100pb).....	44
Figura 20: Ilustração da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de 12S de indivíduos tratados com ivermectina no município de São Gabriel da Cachoeira-Am. As amostras analisadas e os controles positivos apresentaram aproximadamente 500pb, o controle negativo e controle branco não apresentaram banda e o Ladder (marcador de 100pb).....	44
Figura 21: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 1, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 700pb.....	47
Figura 22: F Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 2, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 700pb.....	47
Figura 23: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 1, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 400pb.....	48
Figura 24: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 4, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 300pb.....	48
Figura 25: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 5, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 500pb.....	49
Figura 26: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 6, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 500pb.....	49
Figura 27: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 7, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 500pb.....	50

Figura 28: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 8, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 500pb.....50

Figura 29: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 9, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 400pb.....51

Figura 30: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 10, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 500pb.....51

Figura 31: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 11, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 500pb.....52

Figura 32: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 12, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 500pb.....52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Descrição da sequência dos iniciadores para detecção do componente proteico β -tubulina com suas respectivas temperaturas de anelamento e sequência gênica da região amplificada.....36
- Tabela 2 -** Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, por análise molecular do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015).....37
- Tabela 3 -** Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, por análise molecular por área no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015).....38
- Tabela 4 -** Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, por ocupação e gênero, na área 1, 2 e 3 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015).....38
- Tabela 5 –** Frequência dos indivíduos positivos, quanto a localização da casa em relação ao rio, igarapé e floresta.....40
- Tabela 6–** Frequência dos indivíduos positivos, em relação a presença ou ausência de telas em portas e janelas.....40
- Tabela 7 –** Frequência dos indivíduos positivos, em relação a picadas de Piuns e Maruins.....41
- Tabela 8 -** Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, obtida através de análise molecular após tratamento, das áreas 1, 2 e 3 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Outubro de 2015).....45
- Tabela 9 -** Comparação de infecção por *Mansonella* em humanos, obtida através de leitura de gota espessa e diagnóstico molecular, no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho/Outubro de 2015) antes e depois do tratamento com ivermectina.....46
- Tabela 10-** Comparação dos sintomas clínicos dos pacientes positivos e negativos da infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil.....46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ L - Microlitro

CDC- Centers for Disease Control and Prevention

DEC (dietilcarbamazina)

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

DNT- Doença Tropical Negligenciada

EDTA - Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia

FAPEAM - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas

FnPCR - Nested Reação em cadeia da Polimerase para Filárias

GES- Gota Espessa de Sangue

ILMD- Instituto Leônidas e Maria Deane

ITS - Internal Transcription Space

Kg – Quilograma

mg – Miligrama

OMS- Organização Mundial da Saúde

Pb – Pares de Base

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PPSUS - Programa Pesquisa para o SUS

PROEP- Programa de Apoio à Pesquisa

spp. – Espécies

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3. 1 HISTÓRICO E ATUALIDADE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS MANSONELAS	17
3. 2 VETORES DE <i>Mansonella ozzardi</i> E <i>M. perstans</i>	20
3.3 HABITAT E CICLO BIOLÓGICO DA MANSONELOSE	22
3. 4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA MANSONELOSE	23
3.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA MANSONELOSE	24
3.6 TRATAMENTO DA MANSONELOSE E A RESISTÊNCIA AO MEDICAMENTO ...	25
4 OBJETIVOS	27
4.1 OBJETIVO GERAL	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
5 METODOLOGIA	28
5.1 PROJETO E COMITÊ DE ÉTICA.....	28
5.2 AMOSTRAS.....	31
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS PARASITAS	33
5.3.1 Coloração e leitura das lâminas	33
5.3.2 Extração de DNA	33
5.3.3 Nested PCR para filárias (“FnPCR”) após tratamento	33
5.4 ESTUDO DA SINTOMATOLOGIA	34
5.5 CORRELAÇÃO ENTRE OS DIAGNÓSTICOS MICROSCÓPICO E MOLECULAR ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO E ENTRE TRATAMENTO E SINTOMATOLOGIA.....	36
5.6 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA GÊNICA DE B-TUBULINA	36
6 RESULTADOS	37
6.1 RESULTADOS DO PROJETO MAIOR	37
6.2.1 Diagnósticos microscópicos e moleculares das amostras dos pacientes submetidos no tratamento realizado pela secretaria de saúde de São Gabriel da Cachoeira	41
6.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS DIAGNÓSTICOS MICROSCÓPICO E MOLECULARE NOS INDIVÍDUOS POSITIVOS ANTES E APÓS SEREM SUBMETIDOS AO TRATAMENTO PELA SEC. DE SAÚDE	46

6.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA SINTOMATOLOGIA DECLARADA PELOS INDIVÍDUOS POSITIVOS PARA MANSONELOSE ANTES E APÓS TRATAMENTO .	46
6.5 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA GÊNICA DO COMPONENTE PROTEICO β -TUBULINA NAS AMOSTRAS APÓS O TRATAMENTO E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA A IVERMECTINA	47
7 DISCUSSÃO	53
CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	69
ANEXO B – Questionário de pesquisa	71

1 INTRODUÇÃO

As filaríoses são doenças tropicais negligenciadas causadas por parasitos conhecidos por filárias, cujas formas adultas parasitam o sistema linfático, cavidade abdominal e os tecidos de vertebrados (OTABIL; TENKORANG, 2015). As microfilárias, formas jovens deste parasito, são encontradas no sangue ou na pele, dependendo da espécie (KNOPP et al., 2012). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 120 milhões de pessoas foram infectadas com filariose no ano de 2000, e, atualmente, 947 milhões de pessoas em 54 países vivem em área de risco para essas infecções parasitárias (OMS, 2017).

As filaríoses mais conhecidas no Brasil são a bancroftose e a oncocercose por serem doenças debilitantes com um alto impacto social e econômico (FONTES et al., 2012). A mansonelose, por sua vez, é uma doença tropical negligenciada (DTN) que não está incluída entre as dezessete principais DTN segundo a OMS, entretanto, é caracterizada como tal por ser um problema de saúde e social da Amazônia em virtude de estar associada a condições de pobreza da população afetada e à carência de serviços de saneamento e abastecimento de água tratada (MEDEIROS; PESSOA; CAMARGO, 2014; OMS, 2016).

No gênero *Mansonella*, existem três espécies distintas com capacidade de causar doenças em humanos: *Mansonella perstans*, *Mansonella ozzardi* e *Mansonella spreptocerca* (CDC, 2013). Esses parasitos são transmitidos por meio da picada de simulídeos (Diptera) e/ou culicídeos (Diptera, Ceratopogonidae) que estão presentes em toda África, América Latina e Caribe (SHELLEY; COSCARÓN, 2001; SHELLEY; DIAS; MORAES, 1980).

A filária *Mansonella ozzardi* (Nematoda, Onchocercidae) tem ampla distribuição geográfica nas Américas estando presente desde o México até o norte da Argentina, com exceção de Chile, Uruguai e Paraguai (AYBAR; JURI; ZAIDENBERG, 2016; MEDEIROS; PESSOA; CAMARGO, 2014). Também, há relatos de que este nematoide esteja presente no hemisfério oriental (CRAINEY; SILVA; LUZ, 2016). No Brasil, este parasito é encontrado nos estados do Acre (ADAMI et al., 2014), Amazonas (DEANE, 1949), Mato Grosso (alto rio Xingu) e Roraima (D'ANDRETTA; PIO DA SILVA; KAMEYANA, 1969; OLIVEIRA, 1963). No Amazonas, possui ampla distribuição e infecta comunidades indígenas e ribeirinhas dos rios Purus, Juruá, Jutáí, Javari, Japurá, Negro, Solimões e seus afluentes (LACERDA; RACHOU, 1956; MEDEIROS et al., 2009^a; MEDERIOS; PESSOA, 2015). Já a *Mansonella perstans* está presente em 33 países da África com elevada prevalência (SIMONSEN; ONAPA; ASIO, 2011), nas Américas esta filária está presente na Colômbia (KOZEK et al., 1983), Guiana ocidental

(ORIHÉL, 1967), Venezuela (GÓMEZ; GUERRERO, 2000), e, recentemente, foi descrita molecularmente por Silva et al. (2017) pela primeira vez no Brasil, no município de São Gabriel da Cachoeira no estado do Amazonas.

Atualmente, a distribuição desses parasitos tem sido ampliada devido a novas ferramentas disponíveis para o diagnóstico da mansonelose como o métodos moleculares e imunológicos (ADAMI et al., 2014; MEDEIROS et al., 2015; TANG et al., 2010), e com estudos epidemiológicos utilizando a técnica clássica (gota espessa) (MARTINS et al., 2010; MEDEIROS et al., 2014).

Em relação ao potencial patogênico da mansonelose, este ainda é bastante debatido na comunidade científica e muitos dos mecanismos ainda não foram inteiramente comprovados (HERRERA et al., 2013). No entanto, estudos indicam que um portador com níveis altos de microfilaremia apresenta dores de cabeça, nas articulações, febre moderada, adenite acompanhada de tonturas, inchaço e frieza nas pernas (BATISTA; OLIVEIRA; RABELLO, 1960; BOUYOU AKOTET et al., 2015). Também, estudos revelaram que pacientes com parasitemia elevada, apresentam lesões oculares, com círculos brancos na córnea, que podem evoluir para cegueira (BRANCO et al., 1998; COHEN; RIBEIRO; MARTINS, 2008).

Os sintomas associados à mansonelose frequentemente se confundem com os de outras doenças comuns às áreas endêmicas, como os da malária e outras doenças tropicais do mundo, dificultando o diagnóstico clínico desta patologia (MEDEIROS et al., 2014; MEDEIROS; PESSOA; MARTINS, 2010).

Apesar de ter sido descoberta há muitos anos e esses sintomas supracitados terem sido atribuídos a mesma, esta doença tem sido negligenciada e considerada uma filariose assintomática com pouco interesse e incentivo à pesquisa, com carência de informações epidemiológicas, clínicos patológicos (DANTUR JURI et al., 2013; HERRERA et al., 2013), e principalmente sobre o tratamento (BASANO et al., 2014; NUTMAN; NASH; OTTESEN, 1987).

No que tange ao tratamento da mansonelose por *M. ozzardi*, não há um padrão no Brasil, sendo adotado o mesmo tratamento preconizado para a onconcerose, uma dose única de 0,15 mg/kg de ivermectina (Mectizan®). Diferentemente, para a mansonelose causada por *M. perstans*, há dificuldade de ser tratada, não havendo concordância em relação ao tratamento, sendo utilizado o albendazol, tiabendazol, DEC (dietilcarbamazina) e mebendazol no combate a filaremia (ASIO; SIMONSEN; ONAPA, 2009^a; COULIBALY et al., 2009).

Nesse contexto de tratamento, a ivermectina tem sua ação na fecundidade das fêmeas adultas e agindo sobre a parede celular das microfílias, paralisando-as, e assim, detendo o avanço

da doença e interrompendo a transmissão pelos vetores (TAVARES, 1996). No entanto, estudos vêm demonstrando a resistência anti-helmíntica, que é um fenômeno hereditário resultante de alterações no perfil genético de uma população de parasitos que subsequentemente leva a um fenótipo de resposta reduzida ao tratamento (OSEI-ATWENEBOANA et al., 2012). A exemplo, o β -tubulina, componente proteico formador dos microtúbulos, presente na parede celular dos helmintos, tem sido associado à seleção e resistência da ivermectina em vários estudos devido a supressão em massa deste medicamento (NANA-DJEUNGA et al., 2012).

Dessa forma, questionamentos que podem ser respondidos pela capacidade instalada e que venham auxiliar servindo de base para orientação em relação ao diagnóstico e tratamento da mansonelose são:

A ivermectina tem sido eficaz no tratamento da mansonelose? Existem alterações na sequência gênica do componente proteico β -tubulina dos parasitas presente nos portadores de mansonelose que estejam levando uma resistência ao medicamento?

2 JUSTIFICATIVA

Existem poucos estudos no Brasil relacionados com a descrição da infecção humana por mansonelas, por mais que alguns estados amazônicos apresentem um grande número de populações indígenas e ribeirinhas infectadas com estes parasitos. Este reduzido número de publicações sobre esta infecção, foi realizado com o objetivo de mostrar a situação epidemiológica da doença. Dessa forma, houve pouca contribuição com dados sobre a clínica, diagnóstico e tratamento desta patologia.

O problema relacionado à alta taxa de prevalência de mansonelose na Amazônia se deve ao fato de haver os vetores destas filárias nas regiões endêmicas, somado à inexistência de políticas públicas voltadas para o tratamento e controle da doença nas áreas com foco de transmissão, de modo que a mansonelose afeta diretamente as condições sociais, de saúde e bem-estar das populações acometidas.

A discussão de protocolos para o tratamento de mansonelose é bastante complexa e necessita de estudos que contemplem diferentes perspectivas: compreensão da realidade local para esquemas seguros de administração de medicamento e criação de mecanismos para efetuar o controle desta endemia nos diversos municípios da Amazônia onde as populações são susceptíveis à infecção e vivem em constante mobilidade.

Assim, existe a necessidade de estudos clínicos para estabelecer o tratamento desta patologia. Atualmente, situação semelhante pode ser observada em relação ao vírus Zika, que apesar de todos os estudos com dados e correlações que apontavam para ser o responsável pela microcefalia, apenas após a conclusão de um rígido protocolo é que foi aceita e comprovada a correlação entre o vírus e a patologia, demonstrando assim a necessidade de se comprovar uma patologia causada por qualquer microrganismo. Entretanto, a execução desses estudos é complexa e exige o desenvolvimento de protocolos específicos, apoio e orientação do Ministério da Saúde, instituições e equipes multidisciplinares envolvidas no esforço para o enfrentamento dessa nova patologia.

No atual cenário, muito provavelmente a mansonelose vai continuar a ser considerada apatogênica até a construção e execução de protocolos seguros para o tratamento desta doença. Enquanto isso, a Fiocruz Amazônia na perspectiva de contribuir ao estudo desta endemia regional, por meio do Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia – EDTA coordena o projeto “Filarioses na Amazônia: uma abordagem translacional” em que uma das metas desse projeto inclui a abordagem de estratégias para o tratamento eficaz verificando o efeito e sua

resistência ao medicamento que tem sido administrado para o tratamento e o diagnóstico mais sensível e específico desta parasitose.

Dessa forma, a presente proposta apresentada possui direta relação com projeto do Laboratório se correlacionando com a linha de pesquisa da Pós-Graduação: “*Produção e modulação social e biológica de processos endêmico epidêmicos*” e, principalmente, buscando auxiliar na análise da magnitude de agravos de interesse para a população e a região Amazônica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HISTÓRICO E ATUALIDADE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS MANSONELAS

Na Amazônia são encontrados descritas até o momento, duas espécies de mansonella, *Mansonella ozzardi* e *Mansonella perstans* (**Figura 1**), ambas com capacidade de causar doenças em humanos (DEANE, 1949; SILVA et al., 2017).

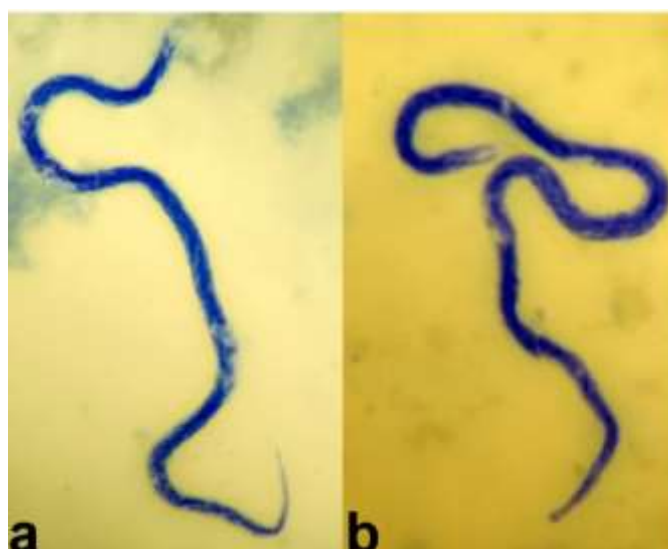


Figura 1: a- *Mansonella ozzardi* b- *Mansonella perstans*

Fonte: Medeiros et al. (2016).

A *Mansonella ozzardi* teve seu primeiro relato em 1896 por Fredrick P. Henry na Universidade de Ciências Naturais da Filadélfia, o qual registrou uma nova espécie de filária (*Filaria demarquayi*) descoberta pelo parasitologista britânico Patrick Manson. Em 1897, Manson publicou um relato sobre microfílarias de *M. ozzardi* observadas no sangue periférico dos povos indígenas que viviam na Guiana Inglesa e na ilha caribenha de São Vicente, por terem sido coletadas por Ozzardi, recebeu a denominação “*Filaria ozzardi*”. Posteriormente, Faust em 1929, integrou-a ao gênero *Mansonella* (BAIN et al., 2015; ORIHIEL; EBERHARD, 1982; TAVARES; NETO, 1997).

A *M. ozzardi* é uma filária humana própria do continente americano, com focos já detectados na Bolívia (BARTOLONI et al., 1999), Colômbia (LIGHTNER et al., 1980), Guatemala, Guiana (ORIEL, 1967), Ilhas do Caribe (RACCURT; LOWRIE; MCNEELEY, 1980),

México (BIAGI; TAY; DE BIAGI, 1958), Panamá (PETERSEN et al., 1984), Peru (KOZEK; D'ALESSANDRO; HOYOS, 1982), Suriname, Venezuela (GODOY et al., 1980) e norte da Argentina (TARANTO; CASTELLI, 1888) (**Figura 2**). No entanto, há evidências também, que a *M. ozzardi* ocorra em Papua Nova Guiné, e, portanto, a distribuição geográfica deste parasita, pode ter se estendido para o hemisfério oriental (CRAINEY; SILVA; LUZ, 2016).

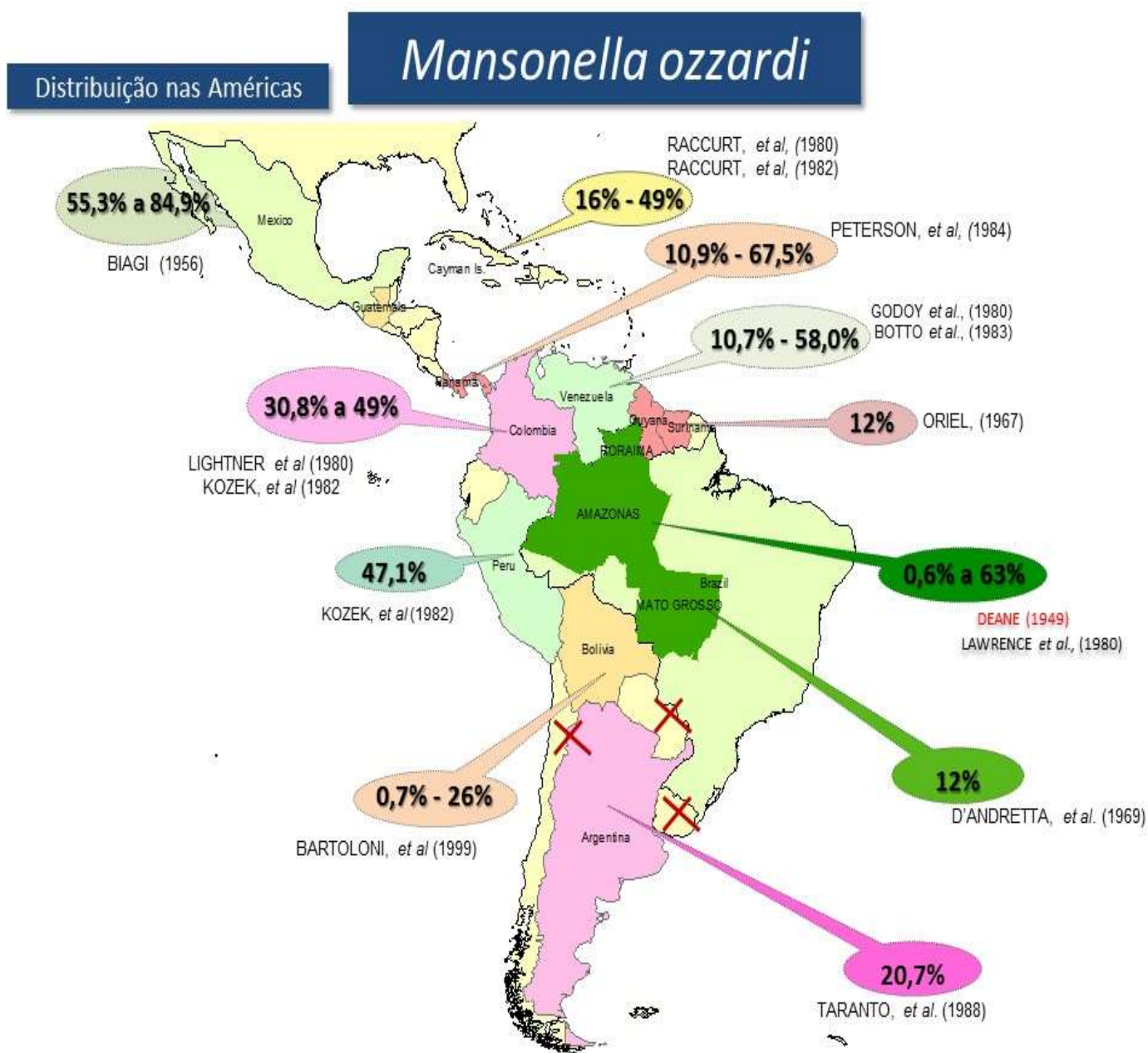


Figura 2: Distribuição da *Mansonella ozzardi* nas Américas.

Fonte: Adaptado de Medeiros et al. (2016).

No Brasil, o primeiro relato de *M. ozzardi* foi realizado pela pesquisadora Maria P. Deane na década de 40, no Estado do Amazonas. Posteriormente, a mansonelose por *M. ozzardi* já foi descrita nos estados de Roraima (COSTA, 1956; MORAES; SHELLEY; LUNA DIAS, 1985), Mato Grosso(alto do rio Xingu) e Acre (D'ANDRETTA; PIO DA SILVA; KAMEYANA, 1969; ADAMI et al., 2014).

No estado do Amazonas, Deane (1949) por meio de um inquérito epidemiológico, investigou a prevalência de filárias na cidade de Manaus em 2.045 pessoas, e concluiu que 0,6% (15 indivíduos) eram positivos para *M. ozzardi*. Deane (1953) em estudo realizado no município de São Paulo de Olivença, descreveu a prevalência de 12,6% de 586 indivíduos de populações indígenas com *M. ozzardi*.

No município de Codajás, Moraes (1958) descreveu a prevalência de 23,1% e, posteriormente, Batista; Oliveira; Rabello (1960) em estudo sobre a patogenicidade da *M. ozzardi* e sintomatologia da mansonelose, encontraram uma prevalência de 30,3%.

Moraes (1976) trabalhando em vilas indígenas ao norte do estado do Amazonas, encontrou microfíliarias de *Mansonella ozzardi* em 350 (49,9%) das 701 pessoas examinadas, através de esfregaço de sangue em lâminas. Moraes et al. (1978) em estudo no alto Solimões entre os índios Ticunas, examinaram 800 índios, destes 366 (45,7%) apresentaram infecção por *Mansonella ozzardi*.

Lawrence et al. (1980) em 13 aldeias dos estados do Amazonas e Acre (Baniwas, Jaminawa, Kanawari, Katukina, Marubo, Kashinawa e Tikuna), determinaram a prevalência de 15,5% em indivíduos portadores de *Mansonella ozzardi*.

Garrido; Campos (2000) em estudo sobre transtornos da córnea em pacientes com doença parasitária sistêmica, no município de São Gabriel da Cachoeira, detectou (28,23%) de indivíduos com *M. ozzardi* em amostras de 140 pessoas.

Medeiros et al. (2007) encontraram prevalências de (28,4%) em população indígena do rio Purus e seus afluentes no município de Pauiní, no Amazonas. Medeiros et al. (2008) em comunidade ribeirinha do rio Ituxi, no município de Lábrea, no estado do Amazonas evidenciaram a prevalência de (28,23%) de *Mansonella ozzardi* dos 129 indivíduos investigados. Medeiros et al., (2009b) também encontraram uma prevalência de (27,3%) de indivíduos infectados no município de Boca do Acre.

Em 2010, em Coari, Martins et al. (2010) descreveu prevalência de (13,3%) de infecção por *M. ozzardi*, em área rural e área urbana do município.

No município de Lábrea, foi detectado 20,7% de prevalência de *M. ozzardi*, através de um estudo realizado por Medeiros; Py-Daniel; Barbosa (2011) com os homens apresentando uma prevalência de 27,6% e as mulheres 14,3% de prevalência.

Medeiros et al. (2014) demonstrou prevalência de 13,5% em 1083 indivíduos de comunidades ribeirinhas do município de Tefé. (Medeiros et al. (2015) em estudo nos municípios de Codajás e Coari, obtiveram uma prevalência de 9,4% e 22,0% respectivamente nos municípios. E Medeiros et al. (2015) nos municípios e Codajás e Tefé, descreveram prevalências de 45% e 44,8% respectivamente, em testes moleculares.

Silva (2016) em estudo na área urbana do município de São Gabriel da Cachoeira, encontrou a prevalência de 16,3% de um total de 497 amostras de sangue diagnosticadas através de reações moleculares e gota espessa.

Atualmente, no estado do Amazonas, esta filária está presente em comunidades rurais indígenas e ribeirinhas dos rios Purus, Ituxi, Juruá, Jutai, Javari, Japurá, Negro, Solimões e seus afluentes, atingindo 22 municípios (MEDERIOS; PESSOA, 2015).

A *M. perstans* é encontrada em 33 países da África e estima-se que cerca de 114 milhões de pessoas residentes em países africanos estejam infectadas por *M. perstans* (SIMONSEN; ONAPA; ASIO, 2011). Nas Américas, esta filária está presente na Colômbia (KOZEK et al., 1983), Guiana ocidental (ORIHÉL, 1967), Venezuela (GÓMEZ; GUERRERO, 2000), e recentemente foi descrita molecularmente por Silva et al. (2017) pela primeira vez no Brasil, no município de São Gabriel da Cachoeira no estado do Amazonas.

3. 2 VETORES DE *Mansonella ozzardi* E *M. perstans*

As espécies da família Ceratopogonidae são conhecidas popularmente como maruins, “mosquitinhos pólvora” e “mosquitinhos de mangue” no Brasil, “jejénes” nos países com idioma espanhol e “polvorines” na América do Norte (TRINDADE; GARAYEB, 2010). Dentre o gênero Culicoides, os maruins (**Figura 3**) são os mais diversificados da família com mais de 1.400 espécies registradas em todo o mundo, destas, 96% atacam mamíferos e aves (TRINDADE; GARAYEB, 2010).



Figura 3: Maruim (Ceratomyzidae)
Fonte: LPC Carvalho, 2015.

As espécies relacionadas à transmissão de *M. ozzardi* são *Culicoides furens*, *C. barbosai* e *C. phlebotomus* em Trinidad e Tobago (RACCURT; BRASSEUR; BONCY, 2014). No México e São Vicente, há presença da espécie *C. furens* e acredita-se que também a espécie *C. araenses* esteja envolvida na transmissão de *M. ozzardi*, em Trinidad esta filária é transmitida pela espécie *C. phlebotomus*, na Argentina *C. paraenses*, na Colômbia *C. insinuatus* e *C. caprilesi* e no Suriname *C. guttatus* (ASIO; SIMONSEN; ONAPA, 2009b; SHELLEY; COSCARÓN, 2001).

No Brasil, até o momento não há registro de Culicídeos transmitindo estas filárias, mas a realização de estudos entomológicos se faz necessária para incriminá-los.

A família Simuliidae (Diptera: Nematocera) possui 31 gêneros, 53 subgêneros e cerca de mil e oitocentas espécies foram descritas em todo o mundo. Na América do Sul, os principais vetores são insetos do gênero *Simulium* (*Psaroniocompsa*). Os principais vetores incriminados para a transmissão de *M. ozzardi* no Brasil são os simulídeos, *S. (Psaroniocompsa) amazonicum* e *S. (P.) argentiscutum*, em especial na região norte do país (PEPINELLI; TRIVINHO-STRIXINO; HAMADA, 2003; SHELLEY; DIAS; MORAES, 1980).

Moraes; Shelley; Luna Dias (1985) identificaram a espécie *S. (Psaroniocompsa) oyapockense* como vetor da *M. ozzardi* no Estado de Roraima. Em território nacional, estes são denominados “piuns” (**Figura 4**) nas regiões norte e nordeste, e “borrachudos” nas demais regiões, enquanto que nos demais países são chamados de moscas pretas “*black flies*” (PEPINELLI; TRIVINHO-STRIXINO; HAMADA, 2003).



Figura 4: Pium (Simulidae).
Fonte: Medeiros (2016).

3.3 HABITAT E CICLO BIOLÓGICO DA MANSONELOSE

A sobrevivência das microfilárias é estimada em 32 meses, com o seu ciclo biológico completado em dípteros do gênero *Simulium* em nove dias (CERQUEIRA, 1959; SHELLEY; DIAS; MORAES, 1980), e em dípteros do gênero *Culicoides* em doze dias (NATHAN, 1978).

O ciclo biológico da mansonelose (**Figura 5**) é do tipo heteroxênico, envolvendo insetos e humanos. As fêmeas dípteras, ao realizarem o repasto sanguíneo em indivíduos infectados, ingurgitam as microfilárias que se transformam em L1, após poucas horas no estômago do inseto, atravessam a parede do estômago deste e migram para o tórax alojando-se alinhadas com as fibras musculares utilizadas para o voo. A partir do 4º dia, a larva faz sua primeira muda, dando origem a L2. Decorridos 10 a 15 dias, a segunda muda cresce e transforma-se em larva infectante L3, medindo cerca de 700µm. Essa larva infectante migra da musculatura até a probóscide do inseto, concentrando nos lábios deste e assim que o inseto praticar o próximo repasto sanguíneo, as larvas L3 saem pelo lábio do inseto e penetram na pele do hospedeiro. Posteriormente, estas larvas migram pelos vasos linfáticos e sanguíneos até a mucosa abdominal, tornam-se vermes adultos, e, sete ou oito meses depois, as fêmeas que acasalaram, tornam-se grávidas e produzem as primeiras microfilárias que migram para o sangue periférico (CDC, 2013; MULLER, 2002).

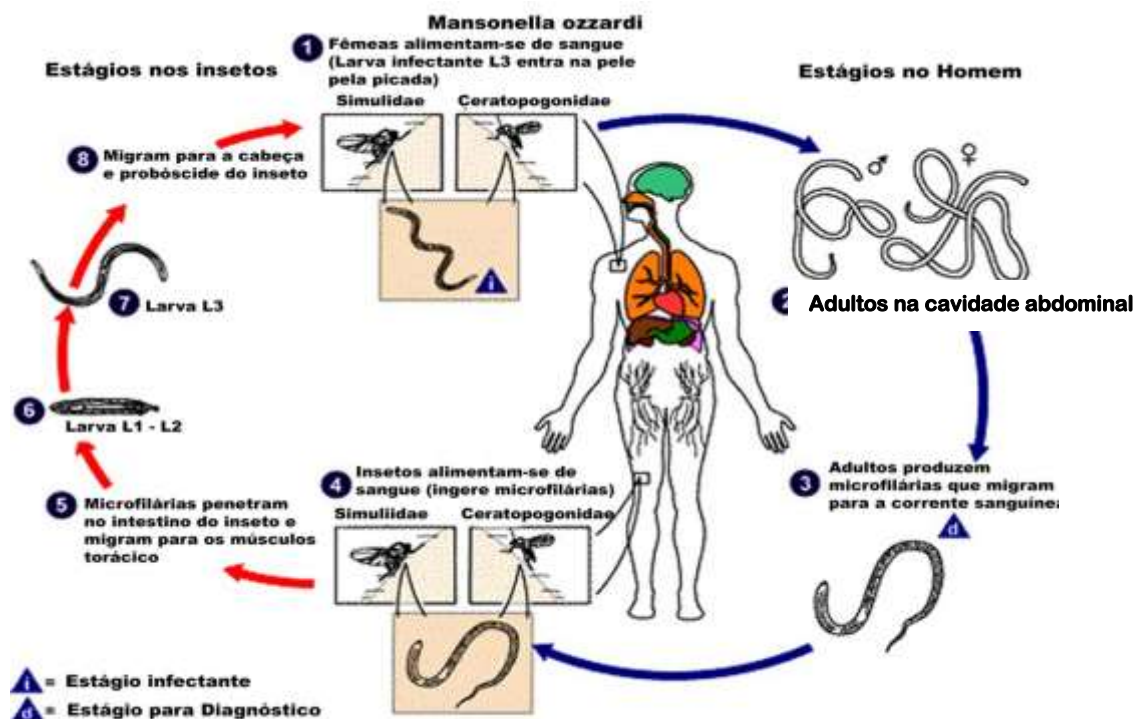


Figura 5: Esquema do ciclo biológico da Mansonelose por *M. ozzardi*.

Fonte: Adaptado do CDC, 2013.

3. 4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA MANSONELOSE

De maneira geral, o Brasil foi o país que mais contribuiu a respeito das características clínicas da mansonelose com estudos realizados, em sua grande maioria, na região Amazônica (BASANO, 2015).

No estudo realizado por Batista, Tavares e Rabelo (1960) foi descrito que os portadores de mansonelose apresentavam como principais sintomas: cefaleia 47,7%, artralgia 34,9% e “frieza nas pernas” 34,4%.

Tavares (1981) demonstrou que os sintomas mais frequentes em seu estudo apresentavam grande semelhança com os estudos de Batista, Oliveira e Rabello (1960) que foram: dores articulares 77%, frieza nas pernas 69,5%, cefaleia 65,2%, febre sem causa aparente 44,4%, adenite 34,7% e erisipela 32,6%.

Martins et al. (2010) em estudo realizado em zona rural e urbana do município de Coari-Am, descreveram como principais sintomatologias as dores articulares (24,7%), “frieza nas pernas” referida pelo paciente (23,8%) e a cefaleia (22,5%).

Basano et al. (2014) quantificaram os sintomas gerais do dia 0 ao dia 3 (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 três dias e havendo melhora gradativa após 180 e 360 dias.

Silva (2016) em estudo realizado no município de São Gabriel da Cachoeira, descreveu com principais sintomatologias as dores no corpo (67,9%), dor de cabeça (64,2%) e dor nas articulações (60,5%).

A infecção ocasionada pela *M. pertans* pode acarretar sintomas como edema, prurido, angioedema, dor nas articulações, linfoedema, febre, leve edema em órgãos como baço e fígado (FUX et al., 2006; SIMONSEN; ONAPA; ASIO, 2011).

3.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA MANSONELOSE

O diagnóstico definitivo para a mansoneose pode ser feito através da detecção do parasito no sangue (RAOULT, 2010), o qual pode ser realizado por meio das seguintes técnicas: gota espessa de sangue, filtração de sangue em membrana de policarbonato, técnica de Knott e molecular (PCR) (ADAMI et al., 2014).

A Gota Espessa de Sangue - HGE, também conhecida como esfregaço sanguíneo corada com Giemsa ou Panótico, é o método mais utilizado para identificação quando temos simpatria entre *M. ozzardi* e *M. perstans* (MEDEIROS; PESSOA; MARTINS, 2010).

A Técnica de Filtração de Sangue em Membrana de Policarbonato (TFMP) consiste em um processo de concentração, filtrando um volume de sangue em uma membrana de policarbonato, com poros de 03 µm a 05 µm de diâmetro (BASANO, 2015). Essa membrana retém as microfilárias quando existentes, deixando os elementos figurados do sangue atravessarem pelos poros, após é confeccionada lâmina utilizado o metanol para a fixação (ALHASSAN et al., 2015).

A técnica de Knott trata-se da diluição do sangue em formol a 2% em uma proporção de 1:10 (uma parte do sangue coletado com EDTA e nove partes de formol à 2%). Em seguida, a diluição em formol é centrifugada e com o sedimento são confeccionadas lâminas de gota espessa fixada em metanol e corada em Giemsa (BASANO, 2015).

Além dessas técnicas, existe o método imunológico *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), que consiste em uma reação de ligação de antígeno e anticorpo (ADAMI et al., 2014). No entanto, em 2014 essa metodologia foi questionada devido ao índice de reações cruzadas entre *M. ozzardi* e *O. volvulus* (LUZ et al., 2014). No entanto, a técnica que revolucionou o contexto do diagnóstico das parasitoses é a Reação em Cadeia da Polimerase-PCR, uma técnica que se baseia

na amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA, possibilitando a exponenciação específica de uma fita de DNA complementar por meio de um molde específico e por intermédio de uma simples reação enzimática (TANG et al., 2010).

3.6 TRATAMENTO DA MANSONELOSE E A RESISTÊNCIA AO MEDICAMENTO

No que tange ao tratamento da mansonelose por *M. ozzardi*, têm sido adotado o mesmo tratamento preconizado para a onconcerose, uma dose única de 0,15 mg/kg de ivermectina (Mectizan®), um antibiótico anti-helmíntico de amplo espectro, que age sobre as microfilárias e inibe as fêmeas adultas de reproduzirem, detendo o avanço da doença e interrompendo a transmissão pelos vetores (TAVARES, 1996).

Para *M. ozzardi*, especificamente, existem poucos estudos sobre tratamento com ivermectina. No entanto, estes poucos demonstraram a eficácia deste medicamento como microfilaricida.

Nutman; Nash; Ottesen (1987) demonstram a eficácia da ivermectina por nove meses em uma única por paciente. Tavares; Neto (1997) verificaram eficácia da ivermectina por um período de seis meses a um ano.

Gonzalez; Chadee; Rawlins (1999) determinaram a eficácia e os efeitos a longo prazo de um programa de intervenção com base em uma dose única de ivermectina (6 mg) administrada em 40 pessoas com infecções por *M. ozzardi* em Blanchisseuse, Trinidad e Tobago. Após quatro anos, concluíram que uma única dose de ivermectina reduz as densidades de microfilárias e proporciona reduções a curto e longo prazo.

Basano et al. (2014) estudou a eficácia do uso de uma dose única de ivermectina (0,15 mg/kg) no tratamento de 74 pacientes com infecção pela filária *M. ozzardi* em área endêmica, no município de Lábrea. E, chegou à conclusão que o uso da ivermectina nesta dose é um microfilaricida eficaz, mantendo um efeito supressor de microfilárias, por pelo menos 1 ano.

Para a mansonelose causada por *M. perstans*, a ivermectina apresenta dificuldade para a eliminação desses parasitas, e se administrada, causa sérias reações. Ainda não há concordância em relação ao tratamento deste parasito, o qual tem sido adotado albendazol, tiabendazol, DEC (dietilcarbamazina) e mebendazol no combate a microfilaremia (ASIO; SIMONSEN; ONAPA, 2009a; COULIBALY et al., 2009; DUONGL et al., 1998). No entanto, o DEC é considerado o medicamento mais recomendado no tratamento de *M. perstans* e, aparentemente, a combinação de DEC mais mebendazol pode haver melhor atividade anti-helmíntica (BREGANI et al., 2006).

Além disso, a doxiciclina demonstrou ser eficaz quando administrada uma dose de 200mg por dia, durante 6 semanas, no combate a microfilárias de *M. perstans*, desde que as microfilárias possuam o endossimbionte intracelular denominado *Wolbachia* (COULIBALY et al., 2009; HOERAUF, 2009; RAOULT, 2010).

Dentro desse contexto de tratamento habitual e amplamente utilizado com administração da ivermectina, estudos já demonstraram para o filárideo *Onchocerca volvulus* a resistência do mesmo a este medicamento (NANA-DJEUNGA et al., 2012; OSEI-ATWENEBOANA et al., 2012). Em áreas da região Amazônica, esse mesmo fármaco, a ivermectina, também é aplicada em indivíduos positivos para *M. ozzardi*. Dessa forma, a dependência de um único fármaco pode proporcionar a resistência do parasito nessas regiões. Igualmente a isso, outros estudos tem relatado alterações genéticas em populações de parasitas sob alta pressão de ivermectina (ARDELLI; PRICHARD, 2004; OSEI-ATWENEBOANA et al., 2012).

Sobre alterações genéticas, um estudo em Gana, demonstrou que após análise do polimorfismo de 16 genes de *O. volvulus* em duas populações de filárias há diferenças significativas nas frequências alélicas entre pacientes tratados e não tratados com ivermectina, mais precisamente nos componentes proteicos P-glicoproteína e β -tubulina (ENG; PRICHARD, 2005), dois genes anteriormente associados com resistência anti-helmíntica em outros nematoides (BEECH; PRICHARD; SCOTT, 1994; KERBOEUF et al., 2003).

Recentemente, também em Gana, Osei-Atweneboana et al. (2012) pesquisaram o gene do isotipo1 da β -tubulina completa para polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e encontraram uma relação consistente entre quatro SNPs e a fraca resposta de populações de *O. volvulus* a Ivermectina.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar indivíduos com mansonelose submetidos ao tratamento com Ivermectina realizado pela Secretaria de Saúde de São Gabriel da Cachoeira e a resistência dos parasitas ao medicamento.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar diagnóstico microscópico e molecular nas amostras de indivíduos com mansonelose, antes e após tratamento realizado pela Secretaria de Saúde de São Gabriel da cachoeira;
- Comparar os resultados dos diagnósticos de microscopia e molecular de Mansonelose nos indivíduos positivos antes e após tratamento pela Sec. de Saúde;
- Comparar os resultados da sintomatologia declarada pelos indivíduos positivos para Mansonelose antes e após tratamento;
- Analisar a sequência gênica do componente proteico β -tubulina nas amostras após o tratamento e sua relação com a resistência a Ivermectina.

5 METODOLOGIA

5.1 PROJETO E COMITÊ DE ÉTICA

Esta pesquisa é exploratória do tipo pesquisa de laboratório, a qual faz parte de um projeto maior aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Osvaldo Cruz-FIOCRUZ/IOC, sob o número CAAE: 41678515.1.0000.5248, cuja proposta é investigar a manselose em área urbana do município de São Gabriel da Cachoeira (**Figura 6**). Projeto este, que foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas PPSUS/FAPEAM (Processo 105.062.00647/2014) e PROEP/FAPEAM (Processo 062.02005/2014), o qual contou com duas excursões para o município de São Gabriel da Cachoeira (**Figuras 9 e 10**). Município que localiza-se ao noroeste do Estado do Amazonas, na margem esquerda do Rio Negro, com uma área total de 109.183,434 km². Segundo o IBGE(2015), São Gabriel da Cachoeira apresenta uma estimativa populacional de 43.094 habitantes.

A área de estudo foi subdividida em três áreas que agrupavam bairros ou comunidades mais próximas umas das outras.

Composição das áreas subdivididas:

Área 1: Bairro da Praia, Bairro do Dabaru, Bairro do Areal e Casai (**Figura 7**).

Área 2: Ibarne, Vila Amazonino, Sítio Maloca, Aparecida, Itacoatiara Mirim, Sítio Sr. Pedro, Areal, Sítio Miuá, Porto (**Figura 7**).

Área 3: Sagrada Família, Poranga, Tukano, Parintins, Sítio Sozinho, Ya Mirim, Rodrigo Cibele e Balaio (**Figura 8**).

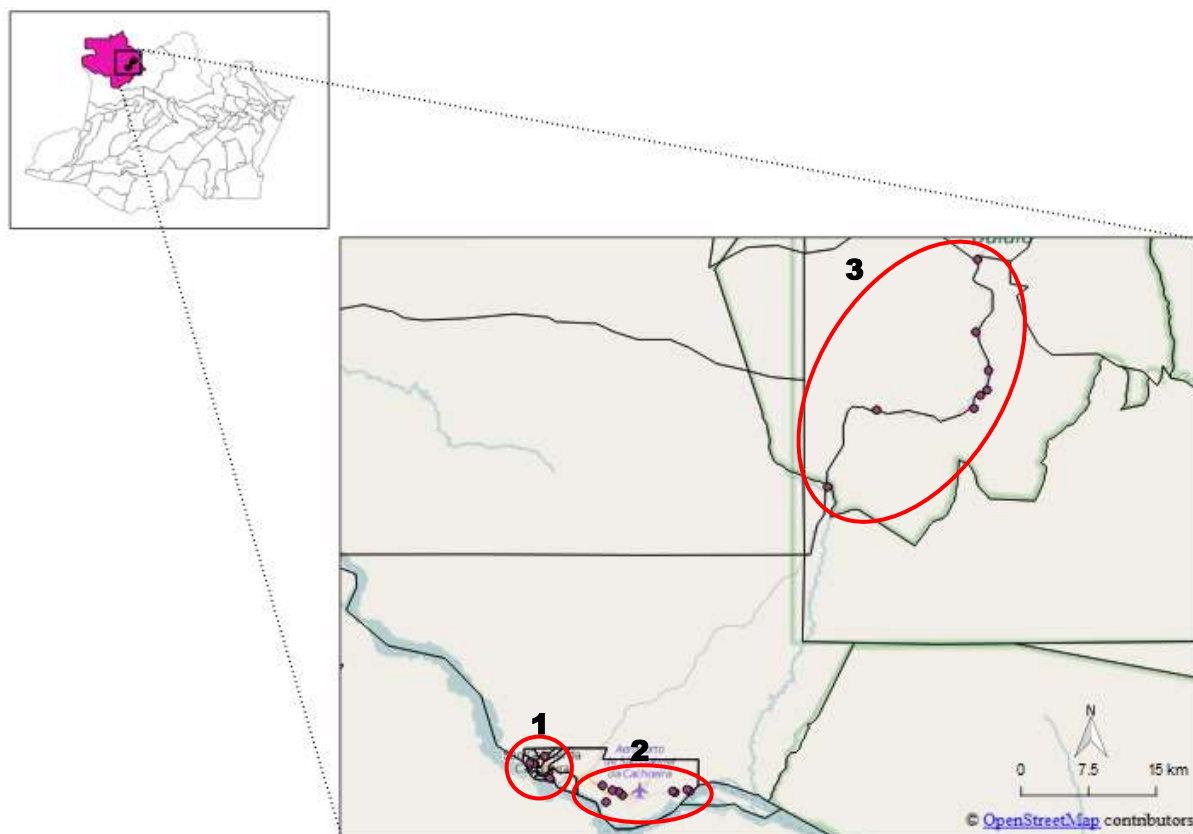


Figura 6: Mapa do Estado do Amazonas, com o município de São Gabriel da Cachoeira em destaque e com pontos onde foram realizadas as coletas. Demarcações mostram as três áreas subdivididas (1- área 1, 2- área 2 e 3- área 3)

Fonte: IBGE, modificado.



Figura 7: Mapa com demarcações de bairros na área 1, e das comunidades estudadas na área 2.

Fonte: IBGE, modificado.



Figura 8: Mapa com demarcações das comunidades estudadas na área 3.
Fonte: IBGE, modificado.



Figura 9: Integrantes do grupo de coleta da 1ª Excursão em São Gabriel da Cachoeira. (Da esquerda para direita – Joycenea, Jordam William, Ricardo Mota, Lucyane, Felipe, Maria Oliveira e Uziel).
Fonte: Própria.



Figura 10: Equipe da 2ª Excursão em São Gabriel da Cachoeira. (Monalisa, Uziel, Lucyane, Adrian e Aldair).

Fonte: Própria.

5.2 AMOSTRAS

No projeto supracitado, foram coletadas 497 amostras de sangue total (**Figura 11**). Essa amostragem foi obtida por conveniência, e a população alvo desse estudo consistiu de indivíduos maiores de 2 anos de idade e de ambos os sexos. O tamanho amostral foi baseado na população urbana do município com base no censo do IBGE (2010), e calculado no *software R*. Como não existia dados de prevalência de *Mansonella* spp. para a sede do município, foi calculado o tamanho da amostra assumindo um valor de $p = 50\%$, um efeito de desenho de 1 e intervalo de confiança 95%. Assim, a partir dos dados do IBGE, a amostra mínima representativa da população a ser examinada seria de 377 indivíduos.



Figura 11: Coleta de sangue total para análise molecular em indivíduo positivo para mansonelose no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, em outubro de 2015.
Fonte: Própria.

Do total amostral coletado, 81 amostras foram positivas através do diagnóstico molecular por PCR convencional, por meio do protocolo de Tang et al (2010) e sequenciamento de última geração. Os indivíduos positivos para mansonelose foram tratados com ivermectina pela Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de São Gabriel da Cachoeira e após 3 meses, 34 pacientes foram recuperados e aceitaram realizar uma nova coleta de sangue total (**Figura 11**), assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo- A**). As 81 amostras positivas e mais estas 34 coletadas posteriormente fazem parte do universo amostral desta pesquisa, as quais encontram-se armazenadas em temperatura de geladeira (4°C a 8°C) no Laboratório Multiusuário do Instituto Leônidas e Maria Deane da Fundação Oswaldo Cruz (ILMD/FIOCRUZ Amazônia).

5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS PARASITAS

5.3.1 Coloração e leitura das lâminas

As lâminas de gota espessa, foram desemoglobinizadas com azul de metileno, fixadas em metanol e coradas em Eosina-Giemsa, sendo examinada toda a superfície da lâmina com microscópio óptico (LEICA DMLB) (**Figura 12**).

A identificação da espécie foi baseada nas características morfológicas (RACHOU, 1957), para a quantificação foi adotado o número total de microfilárias encontradas em toda a superfície da lâmina, e as imagens foram registradas através de uma câmera digital JVC, modelo KY-F55BE.



Figura 12: Coleta de sangue para gota espessa, em indivíduo positivo para mansonelose no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, em outubro de 2015.
Fonte: Própria.

5.3.2 Extração de DNA

A Extração de DNA total foi realizada utilizando-se o kit *DNeasy Blood and Tissue* (QIAGEN, Inc.) protocolo para sangue, conforme descrita por Medeiros et al. (2015).

5.3.3 *Nested* PCR para filárias (“FnPCR”) após tratamento

A PCR foi conduzida utilizando um protocolo de *Nested*PCR para filárias (“FnPCR”), que visa à amplificação de região específica do DNA de algumas filárias de importância em humanos,

conforme protocolo desenvolvido por (TANG et al., 2010). Foram utilizados controles de amostras sabidamente positivas (um de DNA extraído de amostra positiva para *O. volvulus* e outro de *M. ozzardi*), controle negativo (DNA extraído de amostra sabidamente negativa para filárias) e controles brancos (não contendo amostra, apenas os reagentes de PCR e água ultrapura). Para as amostras que apresentaram positividade mesmo após tratamento, estas serão confirmadas com protocolos adaptados de Marcos et al. (2012) já validados no Laboratório EDTA, utilizando as sequência gênica mitocondrial 12S (F: 5'-GTTCCAGAATAATCGGCTA-3', R: 5'-ATTGACGGATGRTTTGTACC-3') e região do citocromo oxidase I – COI (F:5'-TGATTGGTGGTTTTGGTAA-3', R:5'-ATAAGTACGAGTATCAATATC-3').

5.3.4 Eletroforese em gel de agarose após tratamento

A detecção da presença dos componentes amplificados foi realizada a partir da eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. A captura da imagem foi feita por fotodocumentador LPIX *Molecular Imaging* (Loccus Biotecnologia). O tamanho dos amplicons gerados para *O. volvulus* são de 344pb e para *Mansonella pertans* é de 305 e *Mansonella ozzardi*-de 312pb (**Figura 13**).

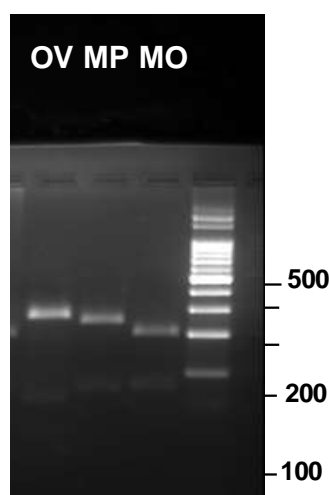


Figura 13: Eletroforese em gel agarose da ‘NestedPCR’ para filárias (com banda de 344pb caracterizando *O. volvulus*, banda de 312pb caracterizando *Mansonella pertans*, banda de 305pb caracterizando *Mansonella Ozzardi* e conjunto de bandas caracterizando marcador referência – Lader).

Fonte: Própria.

5.4 ESTUDO DA SINTOMATOLOGIA

Este estudo foi realizado nos pacientes examinados, onde coletou-se dados referentes à identificação do indivíduo (nome do indivíduo, sexo, idade, ocupação, localidade), características

individuais, histórico epidemiológico e exame físico, devidamente preenchido em um questionário – (**Anexo-B**), antes e após o tratamento. Neste questionário constam os sintomas que podem estar relacionados com a presença da filariose: dores articulares, frieza nas pernas, cefaleia, febre sem causa aparente. Em relação ao exame clínico, para cada sinal de sintoma no indivíduo sua resposta correspondia a presente ou ausente. Ressalta-se que todo o procedimento clínico foi realizado por um médico da Equipe do DSEI-Rio Negro/SGC (**Figura 14**). Os dados coletados foram armazenados em planilhas do programa Excel.



Figura 14: Paciente recebendo o procedimento clínico realizado por médico da Equipe do DSEI-Rio Negro/SGC, em outubro de 2015.

Fonte: Própria.

5.5 CORRELAÇÃO ENTRE OS DIAGNÓSTICOS MICROSCÓPICO E MOLECULAR ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO E ENTRE TRATAMENTO E SINTOMATOLOGIA

Visando comparar diferentes diagnósticos e a sintomatologia antes e depois do tratamento, foi utilizado o teste qui-quadrado, método não paramétrico para comparação das possíveis diferenças entre as frequências observadas para determinado evento. Este método busca um valor de dispersão para duas variáveis, avaliando a associação entre elas, com nível de significância de $p < 0,05$. Estas análises foram realizadas através do Software R na versão 2.14.1(2011-12-22).

5.6 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA GÊNICA DE B-TUBULINA

Para a amplificação do gene de β -tubulina, foram utilizados dois protocolos de PCR, com um total de doze pares de *primers* de diferentes regiões desse gene (Tabela 1), conforme descrito por (NANA-DJEUNGA et al., 2012; OSEI-ATWENEBOANA et al., 2012).

Os reagentes da PCR foram utilizados nas mesmas concentrações em todas as reações realizadas neste estudo. Cada poço da placa de amostras conteve um volume final de 50 μ L, composto de 2,5 μ L de DNA, 0,3U de enzima Taq-DNA-Polimerase, 10 μ L de tampão de reação [5X], 4 μ L de MgCl₂ [25mM], 1 μ L de dNTPs [10mM], 0,5 μ L de cada iniciador [100mM] e 31,2 de água ultrapura. As condições de temperatura foram realizadas conforme descrita pelos autores.

Tabela 1: Descrição da sequência dos iniciadores para detecção do componente proteico β -tubulina com suas respectivas temperaturas de anelamento e sequência gênica da região amplificada.

Par de iniciadores	Temperatura de Anelamento (°C)	Posição da Sequência gênicas de β -tubulina
5'-ATGAGAGAAATTGTTTCATG3' 5'-GAAATTCGAATTAAGAACTTC-3'	50	2-747
5'-CAAAGTTGGAACCTTCGAAG-3' 5'-CTCGAATGGAATCCATAGTA-3'	52	665-1493
5'-ATATGTACCACGAGCAATC-3' 5'-CGATCCGGATATTCCTCACGA-3'	51	1437-1856
5'-CATTTCGTAAATAATTCAGT-3' 5'-GTATCCACTCTAGACACTTG-3'	49	1721-1999
5'-GTATGGGAACATTGTTGATC-3' 5'-GATTGAGATCGCCATAAGT-3'	52	1809-2268
5'-GACATCTGCTTCCGAAC-3' 5'-CAGCGAAAATCTTGATAGT-3'	50	2214-2652
5'-CTTCGCACGTCTCTTAGT-3' 5'-GATGAATTCTTATTCTGCAC-3'	52	2596-3079
5'-ATGATGCAAGTGCAGAATAAG-3' 5'-CATAAAGTATATCAGATGACG-3'	51	3051-3350
5'-GATAATGGATGAATGTGAT-3' 5'-GCTTTTACTCTTCCTGTTC-3'	50	3288-3644
5'-TACACACCGTAGTCTATGG-3' 5'-CCAGATCGACAAGGATTGC-3'	52	970-1468
5'-GTCTGCATCTCTTCCAAGG-3' 5'-GCCCAATTGTTGCTAGCTCC-3'	52	1083-1568
5'-GGTGGCAAATATGTACCACG-3' 5'-TGGTACAACCGAAAAAGAGC-3'	53	1429-1884

6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS DO PROJETO MAIOR

No projeto maior em que este estudo está inserido, foram coletadas 497 amostras de sangue de indivíduos do município de São Gabriel da Cachoeira, sendo 223 (44,9) amostras do sexo masculino e 274 (55,1) do sexo feminino. Após o diagnóstico molecular dessas amostras, 81 (16,3%) amostras foram positivas para mansonelose (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, obtida através de análise molecular, no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015).

Variável	Números absolutos			% Frequência			p
	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total	
Resultado molecular							0.001*
Positivo	50	31	81	10,1	6,2	16,3	
Negativo	173	243	416	34,8	48,9	83,7	
Total	223	274	497	44,9	55,1	100,0	-

*com valor estatístico significativo (p<0,05)

A área 1 foi composta por 247 indivíduos residentes nos bairros da Praia, Dabaru, Areal e Casai, dos quais 37 (15,0%) apresentaram resultados positivos para infecção por *M. ozzardi*, destes 21 (19,8%) pertenciam ao gênero masculino e 16 (11,3%) ao gênero feminino. Dos 247 indivíduos analisados nessa área, observou-se que a maior frequência de casos positivos (24,6%) ocorreu no grupo com idade igual ou superior a 51 anos com diferença estatística significativa (p=0.025), e a menor frequência (0,0%) ocorreu no grupo de 0 a 10 anos (**Tabela 3**).

A área 2 foi constituída por 105 indivíduos residentes em 9 comunidades distintas, localizadas na estrada de Camanaus (Ibarne, Vila Amazonino, Sítio Maloca, Aparecida, Itacoatiara Mirim, Sítio Sr. Pedro, Areal, Sítio Miuá, Porto). Destes, 20 (19,0%) positivos para mansonela. Dos 20 indivíduos diagnosticados com infecção por *M. ozzardi*, 8 (13,8%) eram mulheres e 12 (25,5%) eram homens, bem como 40,9% se enquadravam no grupo com 51 ou mais anos. A maior frequência de positividade entre participantes do gênero feminino foi observada na faixa etária de 31 a 40 anos (36,4%), conforme elucidada a tabela (**Tabela 3**).

A área 3 foi composta pelas comunidades de Sagrada Família, Poranga, Tukano, Parintins, Sítio Sozinho, Ya Mirim, Rodrigo Cibele e Balaio, e apresentou um total de 145 participantes, dos quais 24 (16,6%) estavam infectados por *M. ozzardi*. A maior frequência de indivíduos infectados foi observada no grupo de indivíduos com idade igual ou superior a 51 anos (43,2%) (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, obtida através de análise molecular, das áreas 1, 2 e 3 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015).

Variáveis	Homens (frequência %)	Mulheres (frequência %)	Total (frequência %)	P
Resultado molecular - Área 1				0.073
Positivo	21 (8,5%)	16 (6,5%)	37 (15,0%)	
Negativo	85 (34,4%)	125 (50,6%)	210 (85,0%)	
Total	106 (42,9%)	141 (57,1%)	247 (100,0%)	
Resultado molecular - Área 2				0.142
Positivo	12 (11,4%)	8 (7,6%)	20 (19,0%)	
Negativo	35 (33,3%)	50 (47,7%)	85 (81,0%)	
Total	47 (44,7%)	58 (55,3%)	105 (100,0%)	
Resultado molecular - Área 3				0.024*
Positivo	17 (11,7%)	7 (4,8%)	24 (16,5%)	
Negativo	53 (36,6%)	68 (46,9%)	121 (83,5%)	
Total	70 (48,3%)	75 (51,7%)	145 (100,0%)	

*com valor estatístico significativo ($p < 0,05$)

Do total de pacientes avaliados, a agricultura foi a ocupação com maior frequência (30,1%) de indivíduos infectados com microfilária, com a aposentadoria sendo a ocupação mais frequente no gênero masculino (40,0%). A tabela de frequência de infecção, por ocupação e gênero da área 2, mostra que dos 105 participantes, a maior frequência de infecção foi detectada no grupo de pacientes aposentados (66,7%) e a menor no grupo de pessoas responsáveis pelos afazeres domésticos (0,0%) (**Tabela 4**). A área 3 apresenta 50,0% para funcionários públicos, 25,0% para os que não informaram a ocupação, e 20,4% para agricultores, sem diferença estatística significativa entre a ocupação e gênero.

Tabela 4 - Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, por ocupação e gênero, na área 1,2 e 3 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015).

	Ocupação	Positivos/ Examinados			% Frequência			P
		Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total	
ÁREA 1	Agricultor	13/37	12/46	25/83	35,1	26,1	30,1	0.471
	Aposentado	2/5	2/12	4/17	40,0	16,7	23,5	0.538
	Dona de casa	0/0	1/22	1/22	0,0	4,5	4,5	1.000
	Estudante	4/29	1/32	5/61	13,8	3,1	8,2	0.182
	Funcionário Público	0/10	0/1	0/11	0,0	0,0	0,0	1.000
	Outros serviços	1/23	0/19	1/42	4,3	0,0	2,4	1.000
	Sem informação	1/2	0/9	1/11	50,0	0,0	9,1	0.182
	Total		21/106	16/141	37/247	19,8	11,3	15,0
ÁREA 2	Agricultor	7/22	7/26	14/48	31,8	26,9	29,2	0.758
	Aposentado	2/2	0/1	2/3	100,0	0,0	66,7	0.333
	Dona de casa	0/0	0/1	0/1	0,0	0,0	0,0	1.000
	Estudante	2/17	0/24	2/41	11,8	0,0	4,9	0.166
	Funcionário Público	0/0	0/0	0/0	0,0	0,0	0,0	1.000
	Outros serviços	0/0	1/3	1/3	0,0	33,3	33,3	1.000
	Sem informação	1/6	0/3	1/9	16,7	0,0	11,1	1.000
	Total		12/47	8/58	20/105	25,5	13,8	19,0
ÁREA 3	Agricultor	15/55	7/53	22/108	27,3	13,2	20,4	0.094
	Aposentado	0/0	0/0	0/0	0,0	0,0	0,0	1.000
	Dona de casa	0/0	0/0	0/0	0,0	0,0	0,0	1.000
	Estudante	0/10	0/20	0/30	0,0	0,0	0,0	1.000
	Funcionário Público	1/2	0/0	1/2	50,0	0,0	50,0	1.000
	Outros serviços	0/0	0/1	0/1	0,0	0,0	0,0	1.000
	Sem informação	1/3	0/1	1/4	33,3	0,0	25,0	1.000
	Total		17/70	7/75	24/145	24,3	9,3	16,6

*com valor estatístico significativo ($p < 0,05$)

Dentre os 81 pacientes que apresentaram resultado positivo para infecção por microfilárias, 71 (87,7%) informaram morar a menos de 100 metros da floresta, 61 (75,3%) a menos de 100 metros do igarapé, e 46 (56,8%) a mais de 100 metros do rio. Destas variáveis, apenas a localização quanto ao rio apresentou diferença estatística significativa ($p=0.040$), conforme mostra a (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Frequência dos indivíduos positivos, quanto a localização da casa em relação ao rio, igarapé e floresta.

Variáveis	Homens (frequência%)	Mulheres (frequência%)	Total (frequência%)	p
Em relação a floresta				1.000
ÁREA 1				
Longe (>100)	2 (4,0%)	1 (3,2%)	3 (3,7%)	
Não responderam	4 (8,0%)	3 (9,7%)	7 (8,6%)	
Perto (<100)	44 (88,0%)	27 (87,1%)	71 (87,7%)	
Em relação ao igarapé				0.204
ÁREA 2				
Longe (>100)	6 (12,0%)	8 (25,8%)	14 (17,3%)	
Não responderam	3 (6,0%)	3 (9,7%)	6 (7,4%)	
Perto (<100)	41 (82,0%)	20 (64,5%)	61 (75,3%)	
Em relação ao rio				0.040*
ÁREA 3				
Longe (>100)	33 (66,0%)	13 (41,9%)	46 (56,8%)	
Não responderam	5 (10,0%)	2 (6,5%)	7 (8,6%)	
Perto (<100)	12 (24,0%)	16 (51,6%)	28 (34,6%)	
Total	50	31	81	-

*com valor estatístico significativo ($p < 0,05$)

Dos 81 pacientes que apresentaram resultado positivo para infecção por *Mansonella ozzardi*, 40 (49,4%) informaram não possuir telas em portas e janelas, sendo 26 (32,1%) homens e 14 (17,3%) mulheres (**Tabela 6**).

Tabela 6– Frequência dos indivíduos positivos, em relação a presença ou ausência de telas em portas e janelas.

Variável	Homens	%	Mulheres	%	Total	%	p
Casa telada							0.161
Não	26	32,1	14	17,3	40	49,4	
Sim	17	21,0	7	8,6	24	29,6	
Não responderam	7	8,6	10	12,4	17	21,0	
Total	50	61,7	31	38,3	81	100,0	-

Dos 81 indivíduos infectados por *M. ozzardi*, 63 (77,8%) informaram que eram, frequentemente, picados por Piuns (Simulídeos) e Mariuns (Ceratopogonídeos), sendo 38 (46,9%) homens e 25 (30,9%) mulheres (**Tabela 7**).

Tabela 7 – Frequência dos indivíduos positivos, em relação a picadas de Piuns e Maruins.

Variável	Homens	%	Mulheres	%	Total	%	P
Picada frequente							0.869
Não	11	13,6	6	7,4	17	21,0	
Sim	38	46,9	25	30,9	63	77,8	
Não respondeu	1	1,2	0	0,0	1	1,2	
Total	50	61,7	31	38,3	81	100,0	-

6.2 RESULTADOS PÓS MEDICAMENTO

Dos 81 indivíduos portadores de microfilárias, 54 pacientes foram tratados com ivermectina pela Secretaria de Saúde do município e após 3 meses do tratamento, foram recuperados 34 pacientes do total medicado, sendo coletadas novas amostras de sangue desses pacientes tratados em três áreas do município, sendo 10 pacientes da área 1, 10 pacientes da área 2 e 14 pacientes da área 3. Desses 34 pacientes, 7 já tiveram filariose anteriormente e foram tratados com ivermectina. Para a ocupação dos 34 pacientes, 31 são agricultores, 2 são aposentados e 1 é microscopista.

6.2.1 Diagnósticos microscópicos e moleculares das amostras dos pacientes submetidos no tratamento realizado pela secretaria de saúde de São Gabriel da Cachoeira

Foram confeccionadas ao todo 68 lâminas de gota de espessa, 34 antes do tratamento e 34 após o tratamento. Antes do tratamento, das 34 amostras, 32 (94,1%) eram da espécie *M. ozzardi* e 2 (5,9%) da espécie *M. perstans* diagnosticadas no teste molecular (**Figura 2**). Destas 34 amostras, 15 (44,1%) foram confirmadas nas lâminas de gota espessa (**Figuras 3 e 4**), das quais 10 (29,4%) eram do sexo masculino e 5 (14,7%) do sexo feminino, havendo diferença estatística significativa ($p=0.0441$), conforme demonstra a tabela 2. Estas lâminas positivas foram quantificadas havendo uma variação na parasitemia de 1 a 77 microfilárias.

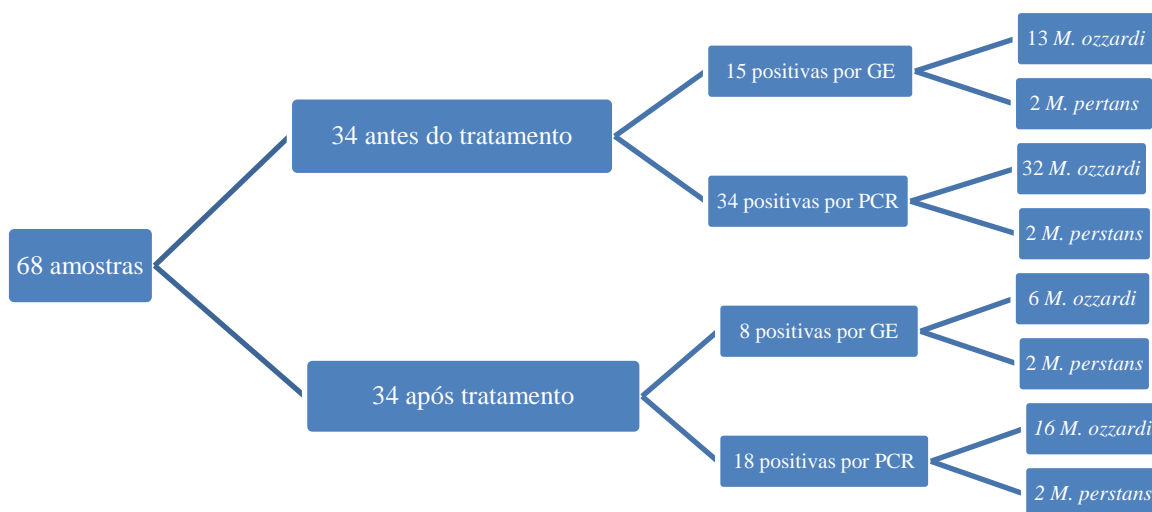


Figura 15: Fluxograma das amostras analisadas nos diagnósticos de microscopia e molecular, dos indivíduos positivos antes e após tratamento com ivermectina do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas.
Fonte: Própria.

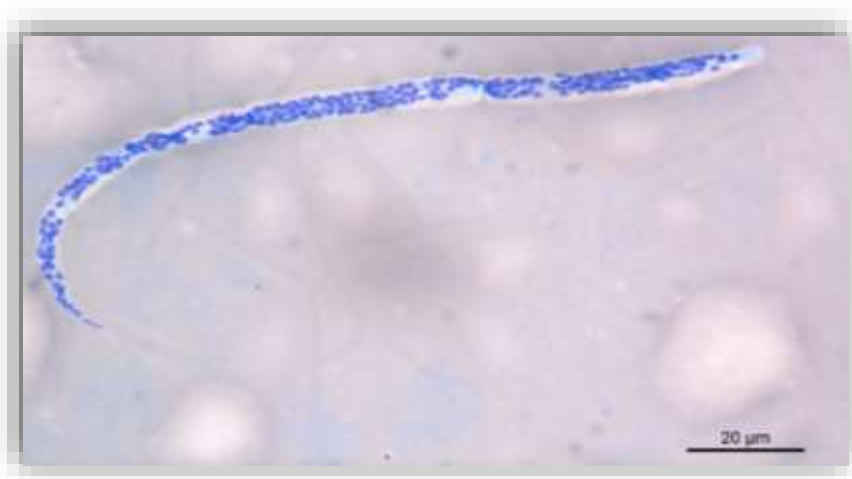


Figura 16: Microfilária de *Mansonella ozzardi* em gota espessa de sangue, coradas com Giemsa, de um indivíduo positivo do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas.
Fonte: Própria.

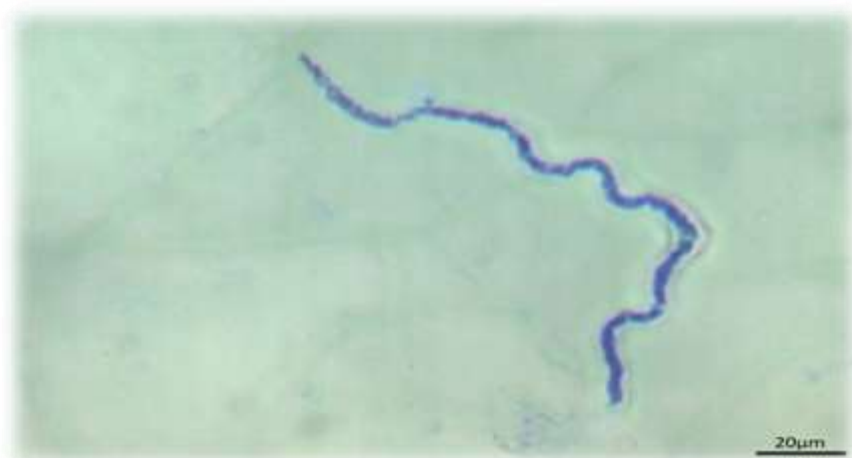


Figura 17: Microfilária de *Mansonella perstans* em gota espessa de sangue, coradas com Giemsa, de um indivíduo positivo do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas.

Após o tratamento, das 34 amostras positivas anteriormente, 8 (23,5%) foram confirmadas em lâminas de gota espessa, sendo 6 (17,6%) do sexo masculino e 2 (5,9%) do sexo feminino, não havendo diferença estatística significativa ($p=0.28$), somente em valores absolutos, conforme demonstra a tabela 7. As lâminas positivas também foram quantificadas e a parasitemia variou entre 1 a 15 microfilárias.

Foram analisadas por testes moleculares as 34 amostras após o tratamento, deste quantitativo, 18 destas amostras permaneceram positivas utilizando *primers* para a amplificação da sequência ribossomal ITS1, para a sequência gênica mitocondrial 12S e para a região do citocromo oxidase I COI, conforme (Figura 5, 6 e 7).

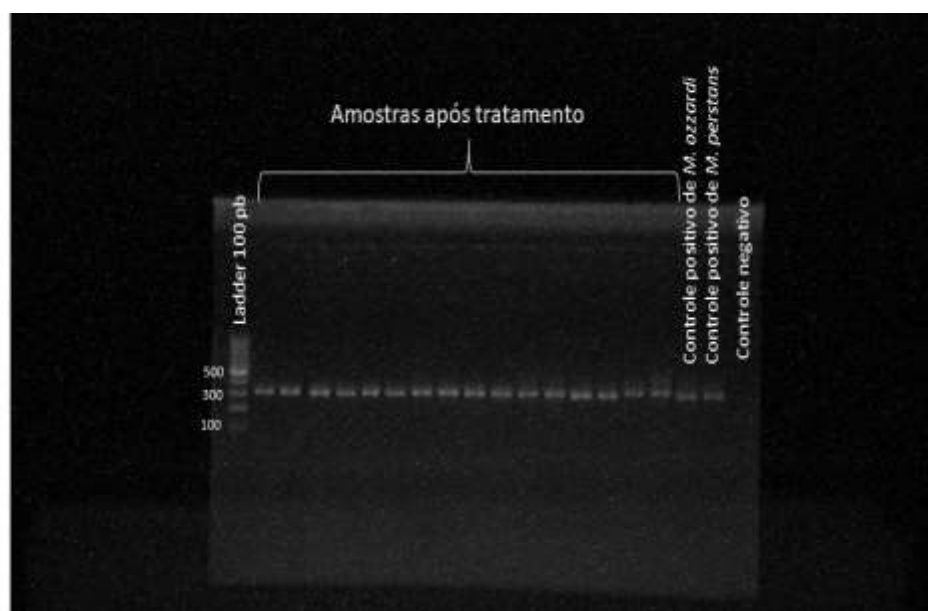


Figura 18: Ilustração da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de ITS de indivíduos tratados com ivermectina no município de São Gabriel da Cachoeira-Am. As amostras analisadas e os controles positivos apresentaram aproximadamente 310pb, o controle negativo não apresentou banda e o Ladder (marcador de 100pb).
Fonte: Própria.

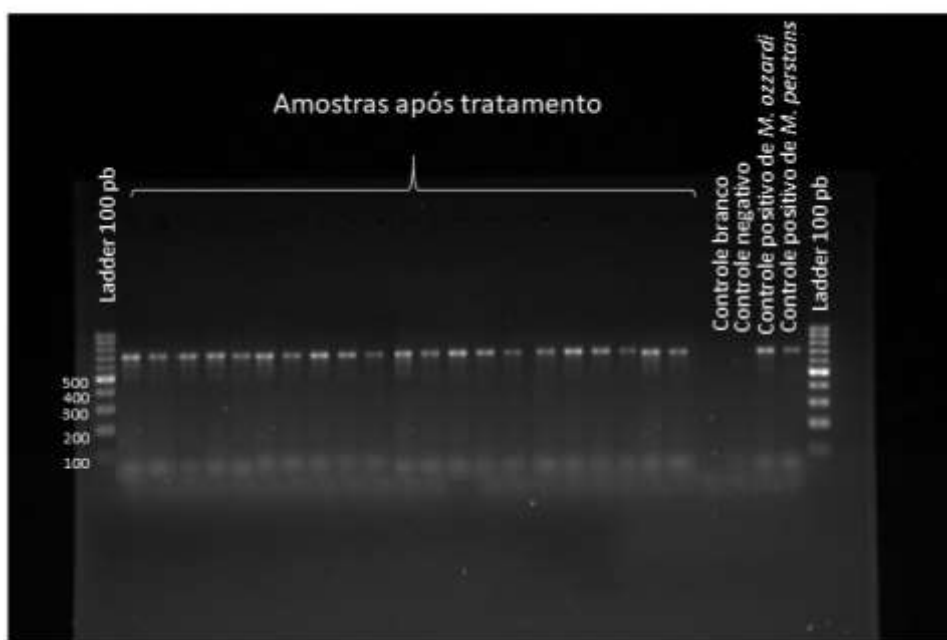


Figura 19: Ilustração da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de CO1 de indivíduos tratados com ivermectina no município de São Gabriel da Cachoeira-Am. As amostras analisadas e os controles positivos apresentam aproximadamente 680pb, os controles branco e negativos não apresentaram bandas e o Ladder (marcador de 100pb).

Fonte: Própria.

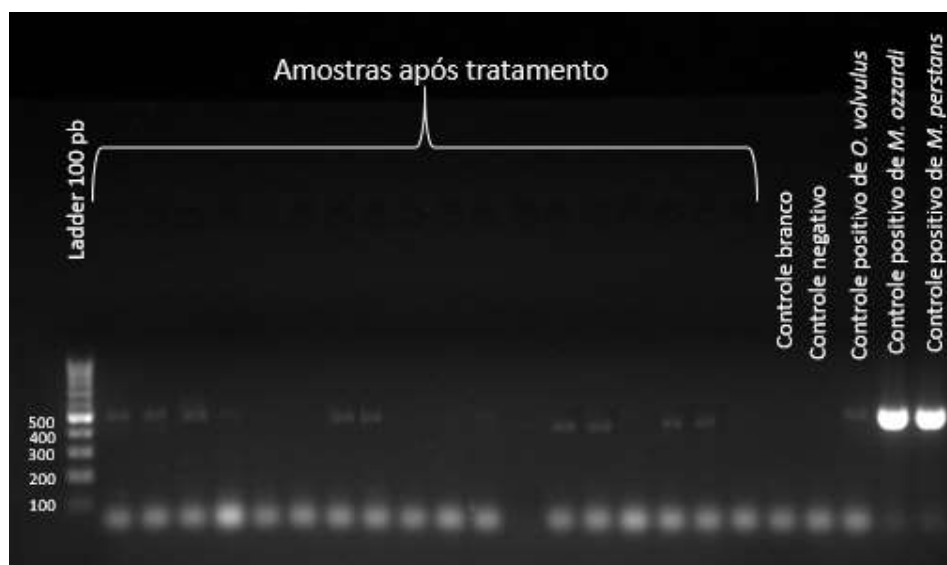


Figura 20: Ilustração da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de 12S de indivíduos tratados com ivermectina no município de São Gabriel da Cachoeira-Am. As amostras analisadas e os controles positivos apresentaram aproximadamente 500pb, o controle negativo e controle branco não apresentaram banda e o Ladder (marcador de 100pb).

Fonte: Própria.

Das 18 (52,9%) amostras positivas após medicamento, 5 (27,7%) dos pacientes residem na área 1, 5 residem na área 2 e 8 são da área 3. Dos 5 (14,7%) pacientes da área 1, 4 são do sexo masculino e 1 do sexo feminino e todos agricultores, têm a mediana de 59 anos de idade, residem em média na área há 20,4 anos e 1 deles já teve mansonelose, e foi relatado tratamento com ivermectina, conforme tabela 4. Já dos 5 (14,7%) pacientes da área 2, 4 são do sexo masculino e 1 do sexo feminino, também são todos agricultores, possuem mediana de 55 anos de idade, moram em média há 22,4 anos na área e nenhum deles teve mansonelose anteriormente. E por fim, dos 8 (23,5%) pacientes da área 3, 6 são do sexo masculino e 2 do feminino, são todos agricultores, possuem mediana de 62,5 anos de idade, residem em média há 25,9 anos na área e 3 desses pacientes já tiveram mansonelose anteriormente, e relataram tratamento com ivermectina (**Tabela 8**).

Tabela 8 - Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, obtida através de análise molecular após tratamento, Mediana de Idade e Tempo médio de residência das áreas 1, 2 e 3 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Outubro de 2015)

Variáveis	Homens (frequência%)	Mulheres (frequência%)	Total (frequência%)	
ÁREA 1	Positivo molecular	4 (40%)	1 (10%)	5 (50%)
	Negativo molecular	4 (40%)	1 (10%)	5 (50%)
	Mediana da Idade			59
	Tempo médio de residência			20,4
	Total	8 (80%)	2 (20%)	10 (100%)
ÁREA 2	Positivo molecular	4 (40%)	1 (10%)	5 (50%)
	Negativo molecular	3 (30%)	2 (20%)	5 (50%)
	Mediana da Idade			55
	Tempo médio de residência			22,4
	Total	7 (70%)	3 (30%)	10 (100%)
ÁREA 3	Positivo molecular	6 (42,8%)	2(14,3%)	8 (57,1%)
	Negativo molecular	4 (28,6%)	2(14,3%)	6(42,9%)
	Mediana da Idade			62,5
	Tempo médio de residência			25,9
	Total	10 (100%)	0 (0%)	10 (100%)

6.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS DIAGNÓSTICOS MICROSCÓPICO E MOLECULAR NOS INDIVÍDUOS POSITIVOS ANTES E APÓS SEREM SUBMETIDOS AO TRATAMENTO PELA SEC. DE SAÚDE

Na correlação entre diagnósticos antes e depois do tratamento, o diagnóstico molecular mostra-se mais sensível que o diagnóstico microscópico, com um aumento de 2,3% antes do medicamento, e após o tratamento de 2,1%, conforme (**Tabela 9**).

Tabela 9 - Comparação de infecção por *Mansonella* em humanos, obtida através de leitura de gota espessa e diagnóstico molecular, no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho/Outubro de 2015) antes e depois do tratamento com ivermectina.

	Microscopia		Molecular	
	Antes	Depois	Antes	Depois
Positivo	15(44,1)	8(23,5)	34(100)	18(53)
Negativo	19(55,9)	26(76,5)	0	16(47)
Sensibilidade			2,1	2,3

6.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA SINTOMATOLOGIA DECLARADA PELOS INDIVÍDUOS POSITIVOS PARA MANSONELOSE ANTES E APÓS TRATAMENTO

Os sintomas como febre, dor no corpo, dor nas articulações, dor de cabeça, dor nas articulações, frieza nas pernas, tontura e dormência nas pernas apresentaram redução após tratamento com diferença estatística significativa, como detalhado na (**Tabela 10**).

Tabela 10- Correlação dos sintomas clínicos dos pacientes positivos e negativos da infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil.

Sintomas Clínicos	Indivíduo positivo		
	Antes	Depois	p
Febre	18 (52,9)	0	0,000*
Dor no corpo	22(64,7)	5(14,7)	0.002*
Dor de cabeça	23(67,6)	5(14,7)	0.001*
Dor nas articulações	20(58,8)	1(2,94)	0,0001*
Frieza nas pernas	20(58,8)	5(14,7)	0.005*
Tontura	18(52,9)	2(5,9)	0.0007*
Dormência nas pernas	10(29,2)	2(5,9)	0,04*
Sem informação	0	0	0

*com valor estatístico significativo ($p < 0,05$)

6.5 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA GÊNICA DO COMPONENTE PROTEICO β -TUBULINA NAS AMOSTRAS APÓS O TRATAMENTO E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA A IVERMECTINA

As análises moleculares para detecção do componente proteico β -tubulina, utilizando os 12 pares *primers* diferentes, não foi identificada resistência das mansonelas ao medicamento por meio dos 12 primers testados para β -tubulina, conforme ilustrações abaixo.

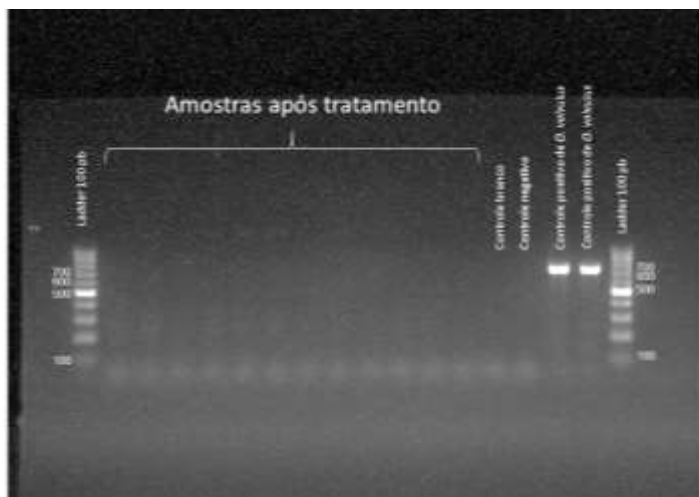


Figura 21: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 1, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 700pb.

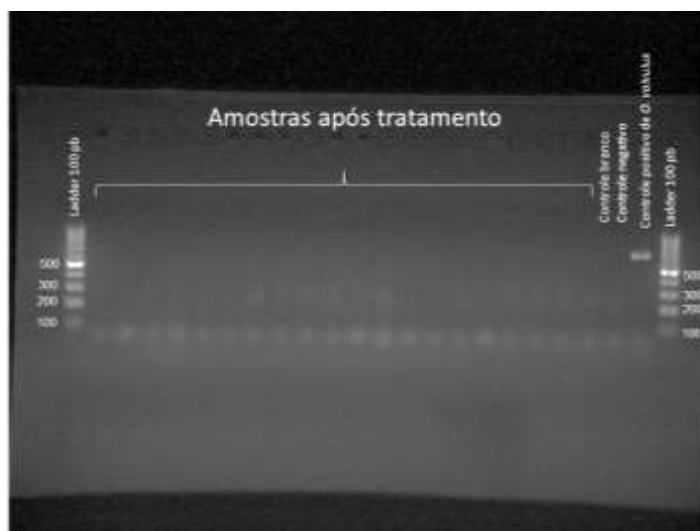


Figura 22: F Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 2, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 700pb.

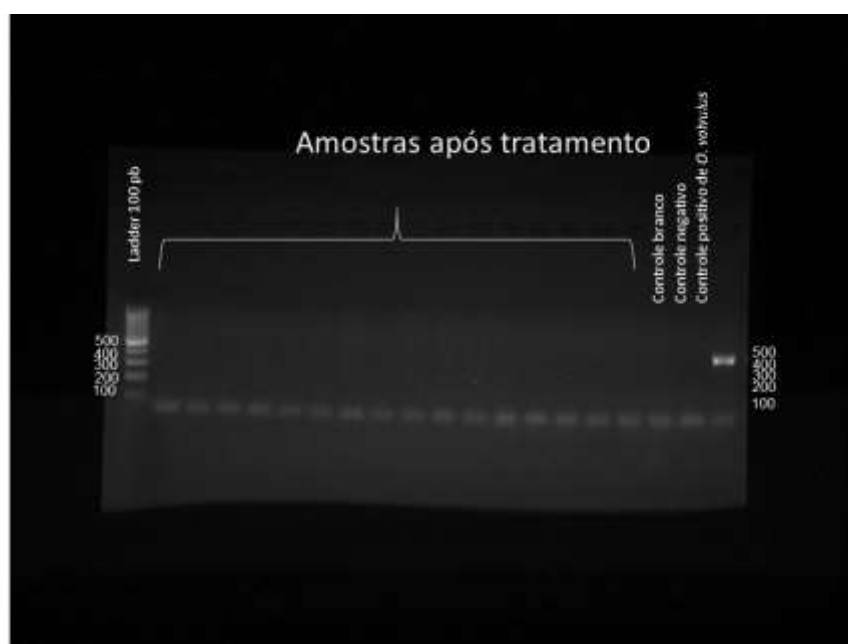


Figura 23: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 1, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 400pb.

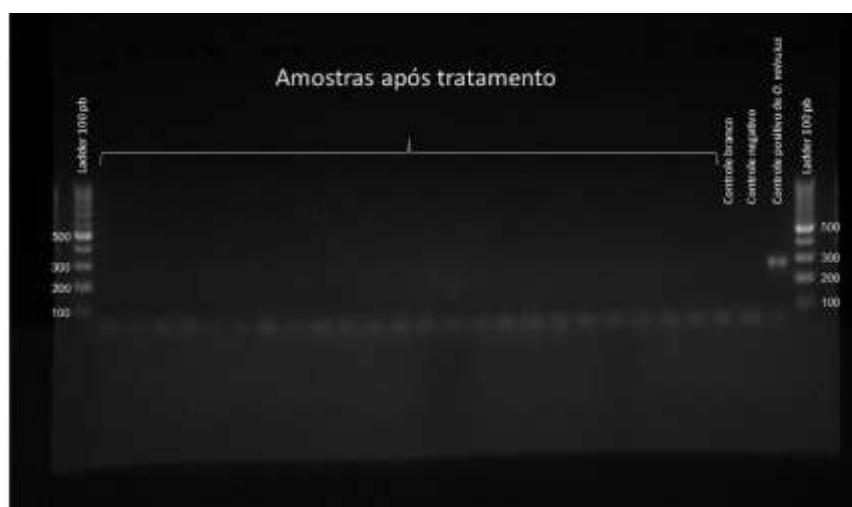


Figura 24: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 4, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 300pb.

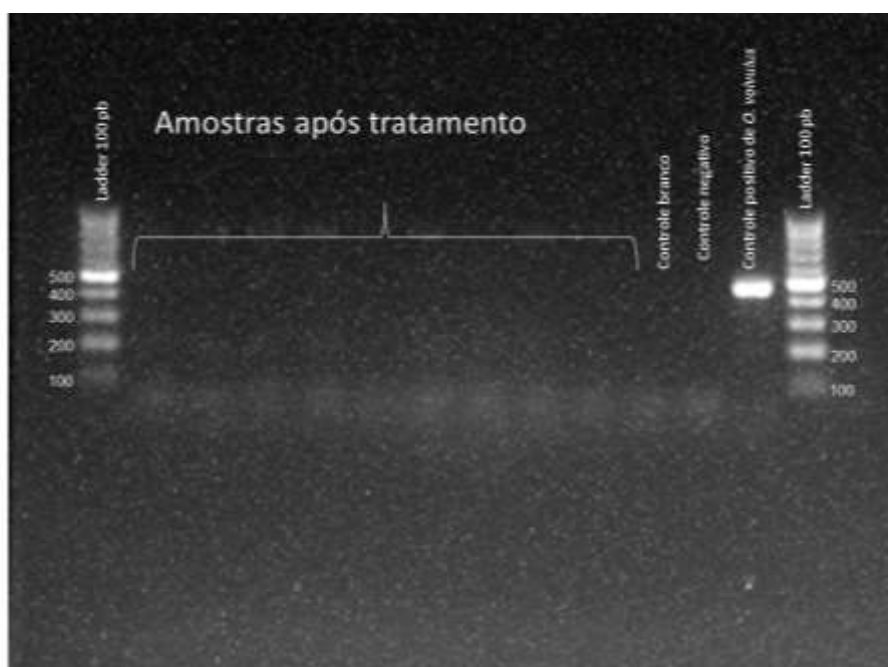


Figura 25: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 5, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 500pb.

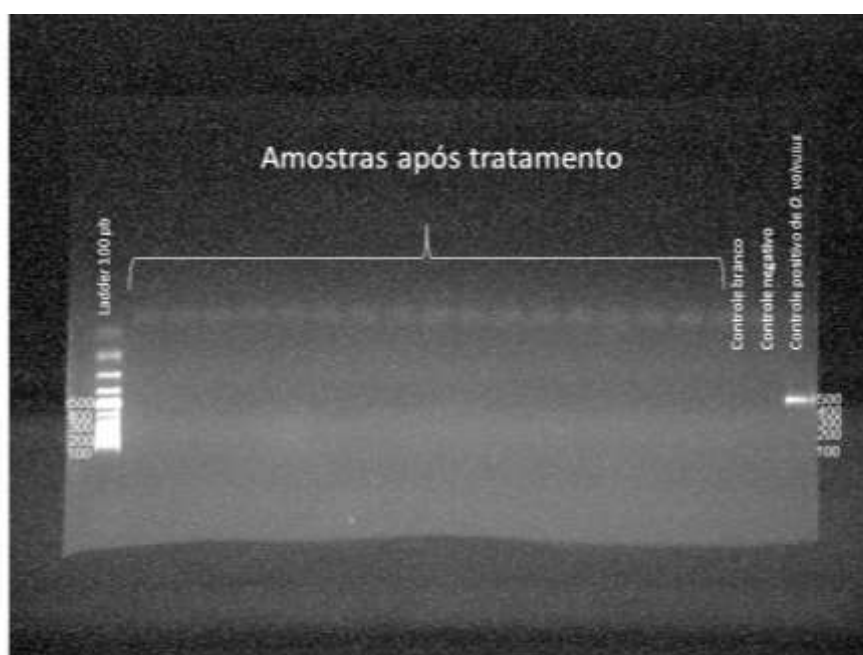


Figura 26: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 6, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 500pb.

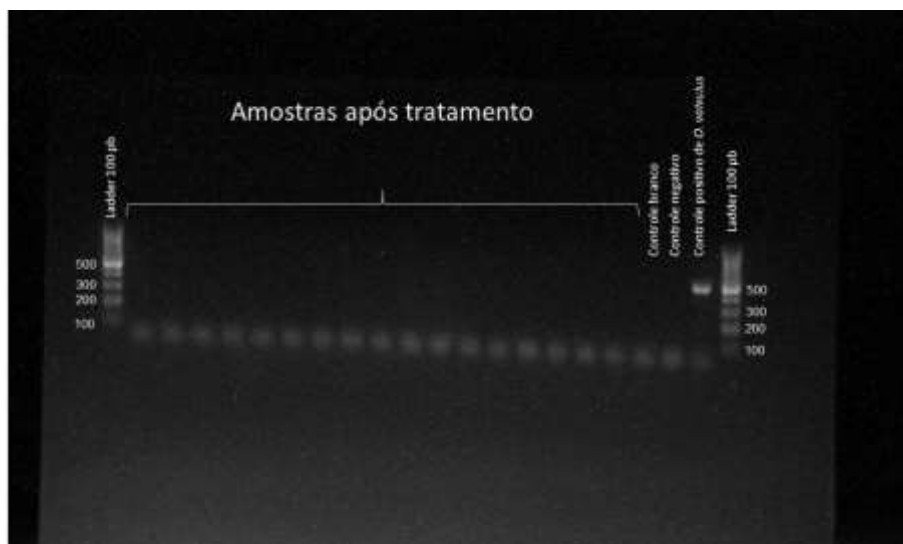


Figura 27: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 7, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 500pb.

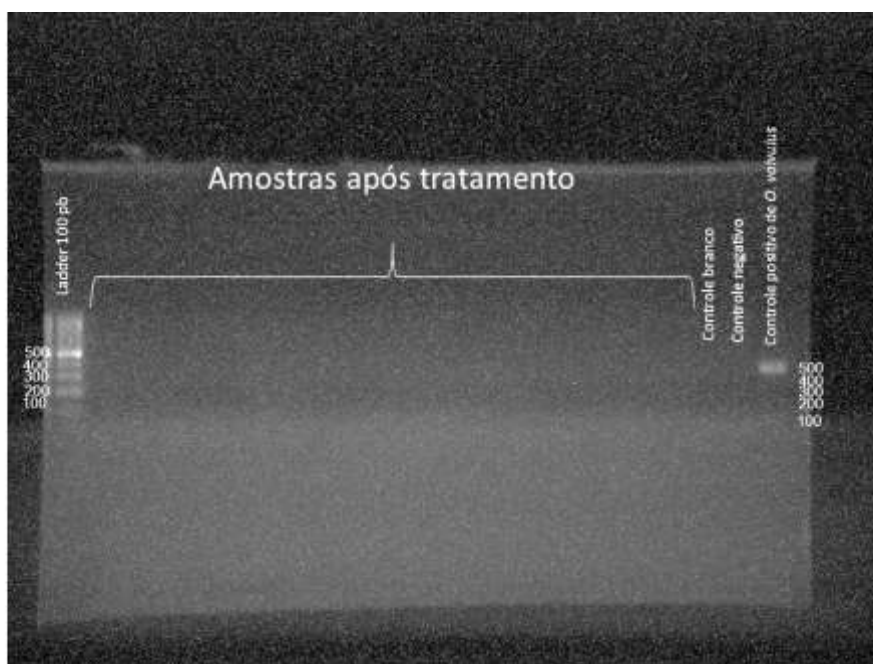


Figura 28: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 8, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 500pb.

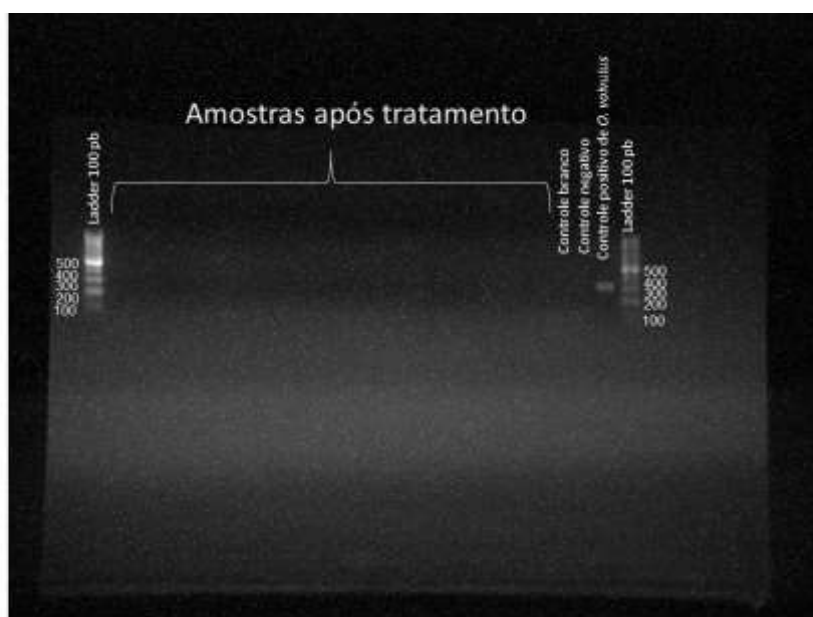


Figura 39: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 9, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 400pb.

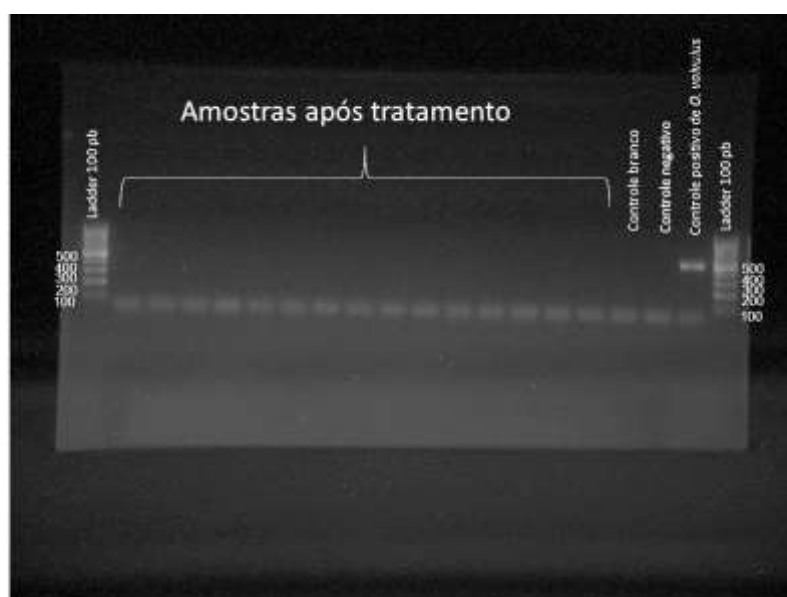


Figura 30: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 10, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 500pb.

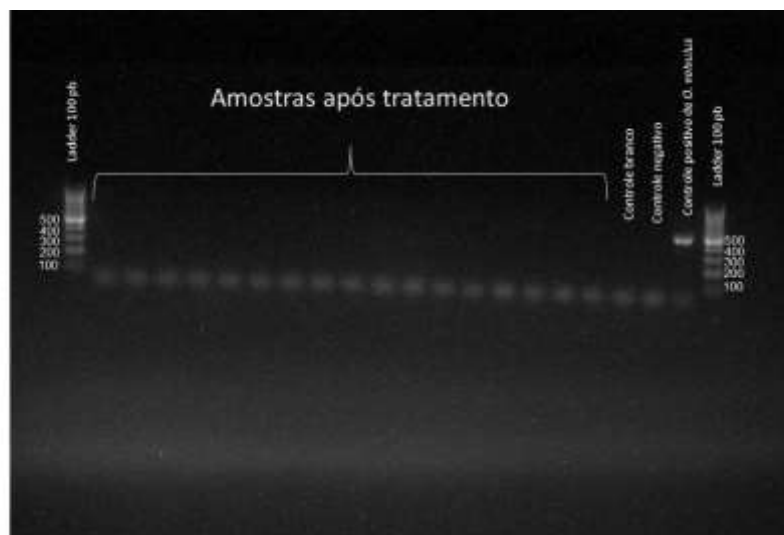


Figura 31: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 11, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 500pb.

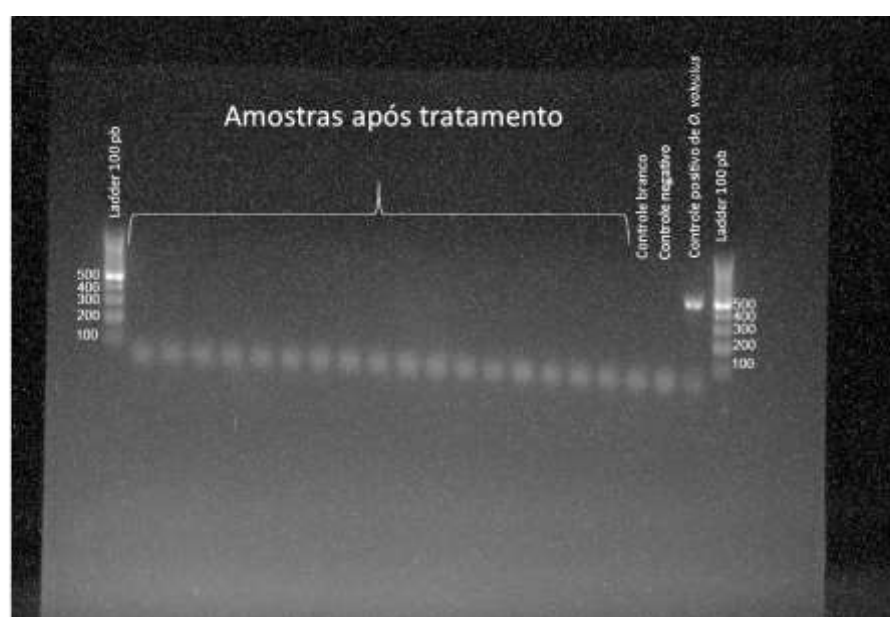


Figura 33: Foto da Eletroforese em gel de agarose da reação molecular de BETA 12, dos indivíduos que permaneceram positivos após tratamento com Ivermectina no município de São Gabriel de Cachoeira. As amostras após tratamento foram negativas assim como o controle branco e controle negativo, e os controles positivos apresentaram bandas de aproximadamente 500pb.

7 DISCUSSÃO

O diagnóstico microscópico da gota espessa de sangue (GES) até os dias atuais continua sendo uma das ferramentas mais práticas para inquéritos epidemiológicos de doenças parasitárias, por ser de baixo custo e de grande facilidade na obtenção e processamento das amostras. E, por isso, desde a descoberta da mansonelose no Brasil por Maria Deane, em 1949, vários outros estudos epidemiológicos demonstraram a prevalência desta doença na região Amazônica com o auxílio deste diagnóstico.

Neste estudo, com o diagnóstico de GES antes do tratamento dos pacientes com ivermectina, foram confeccionadas 34 lâminas, sendo destas 15 (44,1%) positivas, com 10 (29,4%) do sexo masculino e 5 (14,7%) do sexo feminino. E, após tratamento, (23,5%) dos pacientes foram confirmados em lâminas de GES, sendo 6 (17,6%) do sexo masculino e 2 (5,9%) do sexo feminino. A maior frequência apresentada para o sexo masculino pode ser explicada por serem os homens os indivíduos mais expostos a picadas dos vetores em atividades do dia a dia fora de casa como agricultura, caça e pesca, sofrendo sucessivas reinfecções e, conseqüentemente, um acúmulo de microfilárias mantendo vermes adultos de diferentes idades sustentando uma produção contínua de microfilárias e, por conseqüência, a transmissão para os vetores, mantendo o ciclo da parasitose.

Os resultados supracitados corroboram com o estudo de Lacerda e Rachou (1956) que encontraram prevalências de *M. ozzardi* em Codajás (23,9%), Fonte Boa (17,8%), São Paulo de Olivença (12,6%) e Coari (10,0%), utilizando diagnóstico microscópico de GES. Do mesmo modo Batista, Oliveira; e Rabelo (1960) também utilizando GES, encontraram uma prevalência de 30,3% de *M. ozzardi*, em indivíduos do município de Codajás, sendo a maior prevalência no sexo masculino (33,0%). Moraes (1976) trabalhando em vilas indígenas ao norte do estado do Amazonas, encontrou uma prevalência de (49,9%) de microfilárias de *M. ozzardi*, através de GES. Moraes et al. (1978) em estudo no alto Solimões entre os índios Ticunas, utilizando a mesma técnica, encontrou (45,7%) de prevalência de *M. ozzardi* no sangue.

Ainda, Martins et al. (2010) encontraram no município de Coari, uma prevalência de (13,3%) de infecção por *M. ozzardi*, em área rural e área urbana, sendo a maior prevalência no sexo masculino (14,5%), e o sexo feminino com (6,7%). E, no município de Lábrea, detectou-se (20,7%) de prevalência de *M. ozzardi*, através de um estudo realizado por Medeiros; Py-Daniel; Barbosa (2011) com os homens apresentando uma prevalência de (27,6%) e as mulheres apresentaram (14,3%) de prevalência.

Apesar dos trabalhos realizados com prevalências demonstradas através do diagnóstico microscópico, este método apresenta como viés uma baixa sensibilidade, principalmente em pacientes com baixa parasitemia, dependente diretamente da subjetividade e treinamento do microscopista. Igualmente a isso, em áreas onde ocorre a presença de mais de uma espécie, essa diferenciação é muito importante, pois incide diretamente no tratamento do indivíduo infectado. Por outro lado, os métodos de concentração de microfilárias (técnicas de Knott e filtração de sangue em membrana de polycarbonato) são pouco utilizados nas rotinas de diagnóstico devido a algumas restrições quanto a sua aplicação.

Dessa forma, o diagnóstico molecular tem se mostrado mais sensível e específico quando comparado ao diagnóstico clássico, surgindo como uma ferramenta alternativa de auxílio, fornecendo novas informações epidemiológicas sobre infecções parasitárias, promovendo a determinação de maiores taxas de prevalência e principalmente a identificação e diferenciação de espécies de *Mansonella*. Neste contexto, este estudo foi o primeiro a utilizar o diagnóstico molecular para avaliar a eficácia da ivermectina em pacientes com mansonelose. Neste diagnóstico molecular para a identificação de *Mansonella*, foram utilizados alvos de três diferentes genes: um nuclear – ITS (18s+ITS1+5.8s+ITS2+28s) e dois mitocondriais -12S e CO1, e todos mostraram-se eficazes para amostras de pacientes com mansonelose.

Os resultados da comparação entre os métodos diagnósticos microscópico e molecular demonstram um aumento de 2,1 vezes mais indivíduos infectados na técnica molecular em relação a técnica clássica (GES). Recentemente, Vera e colaboradores (2011) também assinalaram maior sensibilidade da reação em cadeia da polimerase (PCR) (100%) e filtração de membrana de polycarbonato (88,9%) em relação à gota espessa de sangue no diagnóstico de *M. ozzardi*. Esses resultados se assemelham aos resultados encontrados por Medeiros et al. (2015) que compararam os dois métodos e demonstraram que o diagnóstico molecular apresentava 1,80 vezes mais sensibilidade do que a microscopia. Desta forma, o desenvolvimento de novos protocolos baseados em tecnologia moderna e de acentuada acurácia visando um melhor e mais preciso conhecimento das filárias circulantes na Amazônia, bem como em áreas de fronteiras e países vizinhos, pode contribuir para um conhecimento mais detalhado da epidemiologia desses parasitos.

Do mesmo modo em relação à identificação da espécie, Silva (2016) utilizando o mesmo diagnóstico molecular com os mesmos alvos, e posterior sequenciamento de DNA, foi encontrado percentuais de 2,05 mais sensibilidade do que a microscopia e também a identificação da presença de *M. perstans* em co-infecções.

Na literatura, *M. perstans* já havia sido assinalada através da microscopia por (MEDEIROS; PY-DANIEL, 2009), porém Adami; Maia-Herzog; Banic (2014) questionaram essa informação afirmando que não existiam quaisquer dados epidemiológicos consistentes e também assinalaram a dificuldade da identificação correta através da microscopia. De fato, a diferenciação na microscopia entre as espécies de *M. ozzardi* e *perstans* basicamente é feita através da extremidade caudal e cabeça da microfilária, e para tal as preparações das lâminas precisam estar bem adequadas e muitas vezes a visualização não é favorável devido a artefatos da coloração ou até mesmo da posição do parasito envolto às células. Somado a isso, um treinamento técnico adequado é essencial.

Desta forma, o diagnóstico molecular pode ser útil em áreas de transmissão para certificar as espécies que circulam, tendo em vista que o tratamento aplicado é diferenciado para cada espécie de filária. O tratamento que tem sido seguido nas regiões endêmicas para *M. ozzardi* é o esquema terapêutico utilizado para outra filária a *O. volvulus* utilizando a ivermectina, que em alguns estudos relacionados, demonstraram eficácia.

Em nosso estudo, em relação ao diagnóstico dos pacientes depois do tratamento com 0,15 mg/kg de ivermectina (Mectizan®), 8 (23,5) pacientes permaneceram apresentando positividade para mansonelose no diagnóstico microscópico e 18 (52,9%) no diagnóstico molecular. Estes resultados não se assemelham a outros estudos que demonstraram a eficácia deste medicamento, porém, utilizando diagnósticos diferentes do molecular, para verificar a densidade da microfilaremia.

No estudo de Nutman; Nash; Ottsen (1987) foi demonstrado a eficácia da ivermectina por nove meses em uma única paciente, utilizando o teste de concentração de Knott's para o diagnóstico da *M. ozzardi*, no entanto esta paciente foi tratada previamente para outros tipos de parasitos com uma dose de metronidazol contribuindo para a eficácia da Ivermectina. Gonzalez; Chadee e Rawlins (1999) também determinaram a eficácia e os efeitos a longo prazo de um programa de intervenção com base em uma dose única de ivermectina (6 mg) administrada em 40 pessoas com infecções por *M. ozzardi* em Blanchisseuse - Trinidad e Tobago, e, após quatro anos, concluíram que uma única dose de ivermectina reduz (82,2%) as densidades de microfilárias.

No estudo de Gatti et al. (2008), a ivermectina demonstrou-se eficaz em casos de microfilaremia por *M. ozzardi* num período de seis a 24 horas, possuindo boa absorção por via oral, e completa excreção através do sistema renal, sendo considerada uma forma segura de tratamento farmacológico, desde que administrada nas doses recomendadas.

Nossos resultados também não foram iguais aos de (BASANO et al., 2014), que trabalhando na Amazônia, no município de Lábrea - Am, estudou a eficácia do uso de uma dose única de ivermectina (0,15 mg/kg) no tratamento de 74 pacientes com infecção pela filária *M. ozzardi* e verificando a microfiliaremia com a técnica de filtração em membrana de policarbonato, chegou à conclusão que o uso da ivermectina nesta dose é um medicamento eficaz para *M. ozzardi*.

Com base nos nossos resultados e observando a literatura, é possível identificar que a hipótese mais próxima é de que existe uma maior sensibilidade no diagnóstico molecular perante tanto ao método tradicional da microscopia, como já foi verificado nos estudos, mas também em relação a filtragem utilizando a membrana. Sem dúvidas que um estudo direcionado nesse sentido se faz necessário para trazer, principalmente, recomendações no sentido de ajudar aos programas e estudos em curso com abordagem terapêutica para o tratamento que necessitam ter um diagnóstico seguro.

O diagnóstico integrado, incluindo provas moleculares para confirmação da eficácia de qualquer medicamento a ser utilizado deve ser primordial nas políticas públicas. Aliás, essa recomendação já é utilizada em outras doenças como a Doença de Chagas, em que para confirmação do diagnóstico, notificação e liberação de tratamento são necessários diagnósticos diferenciados.

Apesar de todas as vantagens dos métodos moleculares em relação ao método microscópico, ainda são pouco utilizados nas rotinas laboratoriais devido a algumas restrições quanto à sua aplicação em condições de campo, alto custo dos reagentes e equipamentos, além de ser mais trabalhoso na opinião de alguns pesquisadores (TANG et al., 2010; VERA et al., 2011). Entretanto, é clara sua recomendação para estudos que buscam alvos terapêuticos, pois para a maioria das DTN prioritárias nos programas especiais da OMS, as opções terapêuticas são insuficientes e apresentam uma série de problemas, tais como baixa eficácia, elevada toxicidade e a emergência de cepas resistentes (GUIDO; OLIVA, 2009).

Esse cenário é agravado pelo número limitado e pela falta de inovação nos programas de inovação de fármacos na área das DTN (NWAKA; HUDSON, 2006; NWAKA et al., 2008). Dessa forma, é essencial a concentração de esforços globais (governo – academia – indústria) para a descoberta de novas alternativas terapêuticas para o controle e tratamento dessas doenças (GUIDO; OLIVA, 2009), assim como em levantamentos iniciais em áreas endêmicas para definição de circulação de espécies e muito provavelmente nas estruturas de saúde dos bancos de sangue de áreas endêmicas. Isto é de extrema importância, pois não há triagem de sangue para este parasita.

No que se refere a bancos de sangue, Shulman e Appleman (1989) em estudo sobre parasitas sanguíneos em doadores na Nigéria revelaram as seguintes prevalências parasitárias: *Loa loa* (1,3%), *Mansonella perstans* (15,6%), *Plasmodium falciparum* (3,3%), *Plasmodium malariae* (1,0%) e uma mistura de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae* (0,2%). Bregani et al. (2003) descreveram um caso de uma criança que adquiriu mansonelose pós-tranfusional na África Central e após três meses o paciente teve os níveis de microfilárias diminuídos e não desenvolveu eosinofilia, principal alteração em um hemograma de um paciente com mansonelose.

Neste contexto, Abrahim (2004) observou que até 15,0% das bolsas de sangue totais, em bancos de sangue de municípios do interior do estado do Amazonas, estavam contaminadas com *Mansonella ozzardi*. Abrahim também enfatizou que as microfilárias permaneceram viáveis nas bolsas de sangue por 15 dias. Dessa forma, exige-se novas políticas para manter a segurança transfusional.

Avançando nessa perspectiva, atualmente, com a possibilidade de realizar provas moleculares que sejam capazes de quantificar os parasitos como a técnica conhecida como PCR em Tempo Real, existe a possibilidade de também entender melhor essa questão da positividade encontrada após o tratamento, e, ainda, talvez auxiliar no entendimento da sintomatologia.

Em relação à sintomatologia, os resultados obtidos neste estudo demonstram que os sintomas mais frequentes declarados pelos pacientes foram febre, dor no corpo, dor de cabeça, dor nas articulações, frieza nas pernas, tontura e dormência nas pernas. Ao se comparar a sintomatologia antes e após tratamento, os sintomas declarados anteriormente foram menos frequentes, e, apenas 5 dos 34 pacientes ainda declararam sentir dor no corpo, dor de cabeça e frieza nas pernas. A frieza nas pernas é descrita como sendo ocasionada por vasoconstrição periférica, a qual pode ser causada pela liberação de toxinas ou substâncias metabolizadas pelas microfilárias.

Montestruc, Blache e Laborde (1950) foram dos primeiros autores estrangeiros a correlacionar dor de cabeça 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.

Desta maneira, os sintomas obtidos nesse estudo são semelhantes com os resultados encontrados por Tavares (1981) e Batista, Oliveira e Rabello (1960) que descreveram como

sintomatologia dores articulares, frieza nas pernas, dor de cabeça, febre sem causa aparente, adenite e erisipela. Já, Martins et al. (2010) avaliando sintomatologia clínica da mansonelose, relataram que (56,1%) dos indivíduos com mansonelose, não apresentaram nenhum sintoma clínico e (32,5%) apresentaram pelo menos um dos sintomas supracitados.

Corroborando com os resultados dessa pesquisa, obtidos sobre a diminuição dos sintomas declarados pelos portadores de mansonelose após tratamento, Basano et al. (2014) avaliando a eficácia da ivermectina descreveram uma diminuição de (75,7%) dos sintomas em três dias, com melhora gradativa após 180 e 360 dias. Ensaio clínico controlado são indicados para 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 envolvidos com relações de simbiose entre helmintos e bactérias.

No contexto de positividade, após tratamento com ivermectina, surgem algumas hipóteses: primeiramente que após três meses possa ter havido uma reinfeção, ou o medicamento não está sendo eficaz devido à resistência dos parasitos. Entretanto, o período é muito curto para que novas microfilárias possam ter completado seu ciclo, que é em torno de seis a oito meses. Isto posto, esta primeira hipótese não fica descartada, pois nessas amostras, cerca de 50% dos indivíduos positivos vivem em áreas com possibilidade de transmissão e com muita mobilidade a outras áreas onde ocorre transmissão. Todavia, ainda não existem estudos entomológicos de transmissão nessa área, e assim faltam informações necessárias de comprovação dessa hipótese.

De tal modo, a segunda hipótese levantada devido a achados anteriores, em que foi demonstrada a resistência dos helmintos a este medicamento, torna-se factível. Entretanto, nesse estudo os resultados mostraram-se divergentes e foram negativos nos alvos moleculares (12 diferentes regiões do gene β -Tubulina) utilizados para pesquisar resistência dos helmintos à ivermectina. De igual forma, esse resultado também não descarta essa hipótese, pois utilizou-se o gene β -Tubulina que demonstra esse mecanismo de resistência em outro verme (*O. volvulus*). Assim, podem existir outros genes de resistência que estejam proporcionando a resistência que não sejam os mesmos testados nesse estudo e que sejam vinculados (ou não) especificamente a esse parasito.

Refletindo sobre o descaso da mansonelose no Brasil, especificamente na Amazônia, poder-se-ia chamar a atenção das autoridades sanitárias para a necessidade de se estruturar um modelo adequado de controle dessa endemia amazônica. Entretanto, esta endemia regional continua sendo uma doença negligenciada devido a controvérsia em relação à clínica patológica

que há várias décadas é discutida e até o momento não foi elucidada, pois poucos autores se dedicaram em estudos clínicos sintomatológicos.

CONCLUSÕES

O tratamento utilizado para eliminação de microfilaremia com uma dose de 0,15mg/kg de ivermectina não demonstrou eficácia nos pacientes tratados no município de São Gabriel da Cachoeira, com possibilidade de reinfecção e resistência dos parasitas ao medicamento.

O diagnóstico microscópico apresenta baixa sensibilidade, principalmente em indivíduos com baixa parasitemia. Já o diagnóstico molecular tem se mostrado mais sensível, podendo ser útil em áreas de transmissão para certificação das espécies circulantes, tendo em vista que o tratamento aplicado é diferenciado para cada espécie de mansonella.

A sintomatologia declarada pelos pacientes, neste estudo, foi semelhante à de outros estudos e o tratamento com ivermectina reduziu a frequência desses sintomas.

Não foi identificada resistência das mansonelas ao medicamento por meio dos 12 *primers* testados para β -tubulina. Apesar disso, podem existir outros genes de resistência que estejam proporcionando a resistência que não sejam os mesmos testados nesse estudo e que sejam vinculados (ou não) especificamente para mansonelas.

Diante dos resultados e das conclusões obtidas nesta pesquisa considera-se que, em se tratando de indivíduos positivos para mansonelose, estudos clínicos precisam ser desenvolvidos com o intuito de verificar a eficácia da ivermectina com a relação aos sintomas e a parasitemia.

REFERÊNCIAS

ABRAHIM, Claudia M. M. **Mansonelose em populações do Interior do Amazonas**. [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-graduação. Universidade Federal do Amazonas, 2004.

ADAMI, Yara Leite; RODRIGUES, Gabriel; ALVES, Marilene Costa et al. 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. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 87–92, 2014.

ADAMI, Yara Leite; MAIA-HERZOG, Marilza; BANIC, Dalma Maria The seroepidemiology and the use of an ELISA test with a cocktail of Ov-recombinant proteins in the Brazilian Amazon. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 4, p. 508–510, 2014.

ALHASSAN, Andy; LI, Zhiru, POOLE, Catherine B et al. Expanding the MDx toolbox for filarial diagnosis and surveillance. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 391–400, 2015.

ARDELLI, B. F.; PRICHARD, R. K. Identification of variant ABC-transporter genes among *Onchocerca volvulus* collected from ivermectin-treated and untreated patients in Ghana, West Africa. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 98, n. 4, p. 371–384, 2004.

ASIO, Santa Maria; SIMONSEN, Paul E.; ONAPA, Ambrose W. A randomised, double-blind field trial of ivermectin alone and in combination with albendazole for the treatment of *Mansonella perstans* infections in Uganda. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 3, p. 274–279, 2009a.

ASIO, Santa Maria; SIMONSEN, Paul E.; ONAPA, Ambrose W. Analysis of the 24-h microfilarial periodicity of *Mansonella perstans*. **Parasitology Research**, v. 104, n. 4, p. 945–948, 2009b.

AYBAR, Cecilia; JURI, María; ZAIDENBERG, Mario. *Mansonella ozzardi* in Neotropical region of Argentina: Prevalence through time (1986-2010). **Acta Tropica**, v. 153, p. 1–6, 2016.

BAIN, Odile; MUTAFCHIEV, Yassen; JUNKER, Kerstin et al. 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.

BARTOLONI, Alessandro; CANCRINI, Gabriella; BARTALESI, Filippo et al. *Mansonella ozzardi* infection in Bolivia: prevalence and clinical associations in the Chaco region. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, n. 5, p. 830–833, 1999.

BASANO, Sergio De Almeida; SOUZA, Juliana de; ARANHA, Almeida. et al. Investigation of the occurrence of *Mansonella ozzardi* in the State of Rondônia, Western Amazonia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 600–603, 2011.

BASANO, Sergio De Almeida; FONTES, Gilberto; MEDEIROS, Jansen Fernandes et al. Sustained Clearance of *Mansonella ozzardi* Infection after Treatment with Ivermectin in the Brazilian Amazon. **Am J. Tro. Mol. Hyg**, v. 90, n. 6, p. 1170–1175, 2014.

BASANO, Sérgio 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.** [Tese de Doutorado] Universidade de São Carlos, 2015.

BATISTA, Djalma; OLIVEIRA, Wallace Ramos; RABELLO, Virgínia Dupré. Estudo da patogenicidade da *Mansonella ozzardi* e da sintomatologia da mansonelose. **Revista instituto medicina tropical de São Paulo**, v. 2, n. 5, p. 281–289, 1960.

BEECH, R. N.; PRICHARD, R. K.; SCOTT, M. E. Genetic-Variability of the Beta-Tubulin Genes in Benzimidazole-Susceptible and -Resistant Strains of *Haemonchus contortus*. **Genetics Society of America**, v. 138, n. 1, p. 103–110, 1994.

BIAGI, F.; TAY, J.; DE BIAGI, A. Observaciones sobre Mansonelosis en la península de Yucatán. *Culicoides furens* como transmisor. **Rev Med México**, v. 38, p. 377–379, 1958.

Bouyou Akotet, M.K.; Owono-Medang, M.; Mawili-Mboumba, D.P. et al. The relationship between microfilaraemic and amicrofilaraemic loiasis involving co-infection with *Mansonella perstans* and clinical symptoms in an exposed population from Gabon. **Journal of Helminthology**, p. 1–7, 2015.

BRANCO, B.C.; Chamon, W.; Belfort, R. et al. Achados Oculares Entre Habitantes do Município de Pauini e Possível Associação entre Lesões Corneanas e Mansonelose na Amazônia. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 6, n. 6, p. 674–682, 1998.

BREGANI, E.; BALZARINI, G.; GHIRINGHELLI, C. et al. Transfusional *Mansonella perstans* na microfilíase. **Parassitologia**. 2003 Jun; 45 (2): 71-2.

BREGANI, Enrico Rino; ROVELLINI, Angelo; MBAÏDOUM, Narassem et al. Comparison of different anthelmintic drug regimens against *Mansonella perstans* filariasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 5, p. 458–463, 2006.

CDC. **Centers for Disease Control and Preventions**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

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

COHEN, Jacob Moysés; RIBEIRO, Jefferson Augusto Santana; MARTINS, Marilaine. Acometimento ocular em pacientes com mansonelose. **Arq. Bras. Oftalmol.**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 167-171, Apr. 2008 .

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

COULIBALY, Yaya I; DEMBELE, Benoit; DIALLO, Abdallah A et al. A Randomized Trial of Doxycycline for *Mansonella perstans* Infection. **Screening**, v. 361, n. 15, p. 1448–1458, 2009.

CRAINEY, James. Lee.; SILVA, Túllio. Romão. Ribeiro da; LUZ, Sérgio Luiz Bessa. Historic accounts of *Mansonella* parasitaemias in the South Pacific and their relevance to lymphatic filariasis elimination efforts today. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 3, p. 205–210, 2016.

D'ANDRETTA, J.; 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.

DANTUR JURI, María J; VEGGIANI AYBAR, Cecilia A; ORTEGA, Eugenia S et al. *Plasmodium vivax* and *Mansonella ozzardi* co-infection in north-western Argentina. **Malaria journal**, v. 12, p. 248, 2013.

DEANE, Leônidas M. et al. Alguns dados relativos à prevalência da *Mansonella ozzardi* no Brasil. Doenças. **Rev. Bras. Malariol. Trop.**, v. 6, p. 219–224, 1953.

DEANE, Maria. P. Sobre a incidência de filárias humanas em Manaus, Estado do Amazonas. **Rev Serv Esp Saude Publ** 2 , p. 849–858, 1949a.

DEANE, Maria P. Sobre a incidência de filárias humanas em Manaus, Estado do Amazonas. **Rev Serv Esp Saude Publ**, v. 2, p. 849–858, 1949b.

DUONGL, Thanh Hai; KOMBILA, Maryvone; FERRER, Alain. Decrease in *Mansonella perstans* microfilaraemia after albendazole treatment. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 15(92):459, 1998.

ENG, J. K. L.; PRICHARD, R. K. A comparison of genetic polymorphism in populations of *Onchocerca volvulus* from untreated- and ivermectin-treated patients. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 142, n. 2, p. 193–202, 2005.

FONTES, Gilberto; LEITE, Anderson Brandão; LIMA, Ana Rachel Vasconcelos de et al. Lymphatic filariasis in Brazil: epidemiological situation and outlook for elimination. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 272, 2012.

FUX, Christoph A.; CHAPPUIS, Bernard; HOLZER, Benedikt et al. *Mansonella perstans* causing symptomatic hypereosinophilia in a missionary family. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 4, n. 5, p. 275–280, 2006.

GARRIDO, Cristina; CAMPOS, Mauro. First Report of Presumed Parasitic 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. et al. *Mansonella ozzardi* infections in Indians of the southwestern part of the State of Bolívar, Venezuela. **J. trop. Med. Hyg**, v. 29, p. 373–376, 1980.

GÓMEZ, J.; GUERRERO, R. Environmental Factors and the Distribution of Mansonelliasis in Southern Venezuela. **Parasite**, v. 7, p. 71–76, 2000.

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

HERRERA, Javier; ARRÓSPIDE, Nancy; GONZÁLEZ, Sonia et al. Report of four clinical cases of filariasis in Alto Nanay, Loreto. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 30, n. 3, p. 506–511, 2013.

HOERAUF, A. *Mansonella perstans* - The Importance of an Endosymbiont. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 15, p. 1502–1504, 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, I. **Cidades**. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=130380&search=amazonas%7Csao-gabriel-da-cachoeira>>. Acesso em: 5 abr. 2016.

KERBOEUF, Dominique; BLACKHALL, William; KAMINSKY, Ronald et al. P-glycoprotein in helminths: Function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 3, p. 332–346, 2003.

KNOPP, Stefanie; STEINMANN, Peter; HATZ, Christoph et al. Nematode Infections: Filariases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 359–381, 2012.

KOZEK, WJ; PALMA, G; HENAO, A et al. Filariasis in Colombia: prevalence and distribution of *Mansonella ozzardi* and *Mansonella* (=Dipetalonema) *perstans* infections in the Comisaría del Guainía. **Am J Trop Med Hyg**, v. 32, n. 2, p. 379–84, 1983.

KOZEK, W. J.; D’ALESSANDRO, A.; HOYOS, M. Filariasis in Colombia: presence of *Dipetalonema perstans* in the Comisaría del Guainía. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 31, n. 3 Pt 1, p. 486–9, maio 1982.

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

LAWRENCE, Dale; ERDTMANN, Bernardo; PEET, Jennifer et al. Estudos Epidemiológicos entre populações indígenas da Amazônia. **Acta Amazonica**, p. 763–769, 1980.

LIGHTNER, L. K.; EWERT, A.; CORREDOR, A. et al. A Parasitologic Survey for *Mansonella Ozzardi* in the Comisaría Del Vaupés, Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, n. 1, p. 43–45, 1980.

LUZ, Sérgio Luiz Bessa; CRAINEY, James Lee; SHELLEY, Anthony John et al. Outstanding insecurities concerning the use of an Ov16-based ELISA in the Amazonia onchocerciasis focus. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 4, p. 506–509, 2014.

MARCOS, Luis A; ARROSPIDE, Nancy; RECUENCO, Sergio et al. Short Report: Genetic Characterization of Atypical *Mansonella* (*Mansonella*) *ozzardi* Microfilariae in Human Blood Samples from Northeastern Peru. **Am J. Tro. Mol. Hyg**, v. 87, n. 3, p. 491–494, 2012.

MARTINS, Marilaine; PESSOA, Felipe Arley Costa; MEDEIROS, Maurício Borborema et al. *Mansonella ozzardi* in Amazonas, Brazil: Prevalence and distribution in the municipality of Coari, in the middle Solimões River. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 246–253, 2010.

MEDERIOS, Jansen Fernandes; RODRIGUES, Moreno Souza; MARTINS, Marilaine. Epidemiological snapshot of the mansonelliasis infection in the Amazonian riverine communities in two contiguous municipalities of Solimões river, Amazonas State, Brazil. **Rev Pan-Amaz Saude** v. 6, n. 2, p. 83–87, 2015.

MEDEIROS, Jansen Fernandes; PY-DANIEL, Victor; BARBOSA, Ulysses Carvalho et al. Epidemiological studies of *Mansonella ozzardi* (Nematoda, Onchocercidae) in indigenous

communities of Pauini municipality, Amazonas, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 241–246, 2007.

MEDEIROS, Jansen Fernandes; PY-DANIEL, Victor; BARBOSA, Ulysses Carvalho et al. *Mansonella ozzardi* in Brazil: Prevalence of infection in riverine communities in the Purus region, in the state of Amazonas. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 74–80, 2009a.

MEDEIROS, Jansen Fernandes; PY-DANIEL, Victor; BARBOSA, Ulysses Carvalho et al. Occurrence of *Mansonella ozzardi* (Nematoda, Onchocercidae) in riverine communities of the Purus river, Boca do Acre municipality, Amazonas State, Brazil. **Cade Saúde Pública**, v. 25, n. 6, p. 1421–6, 2009b.

MEDEIROS, Jansen Fernandes; RODRIGUES, Moreno Souza; KATSURAGAWA, Tony Hiroshi et al. *Mansonella ozzardi* in the municipality of Tefé, Amazonas, Brazil, 60 years after the first report: An epidemiologic study. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 4, p. 480–483, 2014.

MEDEIROS, Jansen Fernandes; ALMEIDA, Tatiana Amaral Pires; SILVA, Lucyane Bastos Tavares et al. A field trial of a PCR-based *Mansonella ozzardi* diagnosis assay detects high-levels of submicroscopic *M. ozzardi* infections in both venous blood samples and FTA® card dried blood spots. **Parasites & Vectors**, p. 1–8, 2015.

MEDEIROS, Jansen Fernandes; PESSOA, Felipe Arley Costa; MARTINS, Marilene. Importância do método de gota espessa de sangue no diagnóstico de filárias simpátricas no Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 4, p. 779–780, 2010.

MEDEIROS, Jansen. Fernandes.; PESSOA, Felipe Arley Costa.; CAMARGO, Luiz Marcelo Aranha. Mansonellosis: a brazilian neglected disease. **Rev Patol Trop**, v. 43, n. 1, p. 1–6, 2014.

MEDEIROS, Jansen Fernandes; PY-DANIEL, Victor. Mansonellosis. In: ATHENEU PRESS (Ed.). **Diseases transmitted and caused by arthropods**. [s.l: s.n.]. p. 277–282.

MEDEIROS, Jansen Fernandes; PY-DANIEL, Victor.; BARBOSA, Ulysses Carvalho. Prevalência de *Mansonella ozzardi* entre comunidades ribeirinhas do município de Lábrea, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 186–190, 2011.

MORAES, Mario A P; ALMEIDA, Margarida M R; LOVELACE, James K. *Mansonella ozzardi* entre índios ticunas do estado do Amazonas, Brasil. **Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 85, n. 1, p. 16–25, 1978.

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

MORAES, Mario. A. P. *Mansonella ozzardi* Microfilariae in Skin Snips. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 1, p. 16, 1976.

MORAES, M.; SHELLEY, A.; LUNA DIAS, A. *Mansonella ozzardi* no território federal de Roraima, Brasil. Distribuição e achado de um novo vetor na área do Rio Surumu. **Mem. do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 80, n. 4, p. 395–400, 1985.

- MULLER, R. **Worms and Human Disease**. 2nd. ed. London: CABI publishing, 2002.
- NANA-DJEUNGA, Hugues; BOURGUINAT, Catherine; PION, Sébastien D S et al. Single nucleotide polymorphisms in B-tubulin selected in *Onchocerca volvulus* following repeated ivermectin treatment: Possible indication of resistance selection. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 185, n. 1, p. 10–18, 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.
- NUTMAN, Thomas B.; NASH, Theodore E.; OTTESEN, Eric A. Ivermectin in the Successful Treatment of a Patient with *Mansonella ozzardi* Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 156, n. 4, p. 662–665, 1987.
- OLIVEIRA, Wallace Ramos. Infestação por filárias em habitantes de vila Pereira, território de Roraima, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, p. 287–288, 1963.
- OMS. **WHO | World Health Organization**. Neglected Diseases. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/en/>. Acesso em: 28 mar. 2016.
- OMS, O. M. DE S. **Filariose Linfática**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/en/>>. Acesso em: 17 abr. 2017.
- ORIEL, T. C. Infections with *Dipetalonema pertans* and *Mansonella ozzardi* in the aboriginal Indians of Guyana. **Amer. J. trop. Med. Hyg.**, v. 16, n. 6, p. 1142–1147, 1967.
- ORIHÉL, T. C. Infections with *Dipetalonema perstans* and *Mansonella ozzardi* in the aboriginal Indians of Guyana. **Am J Trop Med Hyg**, v. 16, n. 5, p. 628–35, 1967.
- ORIHÉL, T. C.; EBERHARD, M. L. *Mansonella ozzardi*: A redescription with comments on its taxonomic relationships. **Am J Trop Med Hyg**, n. 31, p. 1142–1147, 1982.
- OSEI-ATWENEBOANA, Mike Y.; AWADZI, Kwablah; ATTAH, Simon K. et al. Phenotypic evidence of emerging ivermectin resistance in *Onchocerca volvulus*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. 1–12, 2011.
- OSEI-ATWENEBOANA, Mike Y.; BOAKYE, Daniel A; AWADZI, Kwablah et al. Genotypic analysis of B-tubulin in *Onchocerca volvulus* from communities and individuals showing poor parasitological response to ivermectin treatment. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 20–28, 2012.
- OTABIL, Kenneth Bentum; TENKORANG, Seth Boateng. Review Filarial hydrocele: a neglected condition of a neglected tropical disease. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9(5), p. 456–462, 2015.
- PEPINELLI, Mateus; TRIVINHO-STRIXINO, Susana; HAMADA, Neusa. Description of *Simulium* (*Chirostilbia*) *Friedlanderi* Py- Daniel, 1987 (Insecta: Diptera: Simuliidae) Female. **Ecologia**, v. 1987, p. 1–6, 2003.
- PETERSEN, J.L.; BAWDEN, M.P.; WIGNALL, F.S. et al. *Mansonella ozzardi* in Darién (Panama). **Rev Med Panama**, v. 9, p. 3235–46, 1984.

RACCURT, Christian; LOWRIE, R. C. J.; MCNEELEY, D. F. *Mansonella ozzardi* in Haiti. **Epidemiological survey. Am J Trop Med**, v. 29, p. 803–808, 1980.

RACCURT, Christian Pierre; BRASSEUR, Philippe; BONCY, Jacques. Mansonelliasis, a neglected parasitic disease in Haiti. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 709–711, 2014.

RACHOU, R. G. Distribuição geográfica das filarioses humanas no Brasil. **Rev Bras Malariol Doenças Trop**, p. 79–100, 1957.

RAOULT, D. Doxycycline for *Mansonella perstans* Infection. **The New England of Medicine**, 363:(3), 2010.

SHELLEY, A. J.; COSCARÓN, S. Simuliid Blackflies (Diptera: Simuliidae) and Ceratopogonid Midges (Diptera: Ceratopogonidae) as Vectors of *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in Northern Argentina. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 4, p. 451–458, 2001.

SHELLEY, A. J.; DIAS, A. P. A. L.; MORAES, M. A. P. *Simulium* species of the amazonicum group as vectors of *Mansonella ozzardi* in the Brazilian Amazon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 6, p. 784–788, 1980.

SHULMAN, I. A.; APPLEMAN, M. D. Haemoparasitas de doadores de sangue em Calabar. **Trop Geogr Med**. 1989;41: 61-5, 1989.

SILVA, Lucyane Bastos Tavares. **Mansanelose no município de São Gabriel da Cachoeira**. [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-Graduação. Universidade Federal do Amazonas, 2016.

SILVA, Lucyane Bastos Tavares; Crainey, James Lee; Suwa, Uziel Ferreira et al. Molecular Verification of New World *Mansonella perstans* Parasitemias. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 545–547, 2017.

SIMONSEN, Paul E.; ONAPA, Ambrose W.; ASIO, Santa Maria. *Mansonella perstans* filariasis in Africa. **Acta Tropica**, v. 120, n. SUPPL. 1, 2011.

TANG, Thuy Huong Ta; LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio; LANZA, Marta et al. Nested PCR to detect and distinguish the sympatric filarial species *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi* and *Mansonella perstans* in the Amazon Region. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 823–828, 2010.

TARANTO, N.; CASTELLI, E. Detección de un foco de microfilariasis en el Noroeste Argentino. **Rev Arg Microbiol**, v. 20, p. 49–51, 1988.

TAVARES, A. M. **Estudo da infecção por *M. ozzardi***. [Dissertação de Mestrado] Universidade de Brasília, 1981.

TAVARES, A. M.; NETO, F. Mansanelose. In: **Doenças infecciosas e parasitárias, Enfoque Amazônico**. [s.l: s.n.]. p. 733–737.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e quimioterápicos Antiinfecciosos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

TRINDADE, R. L.; GARAYEB, I. DE S. Maruins (Diptera: Ceratopogonidade: Culicoides), após

a estação chuvosa, na reserva de Desenvolvimento Sustentável Itatupã-Baquiá, Gurupá, Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saude**, v. 1, n. 2, p. 121–130, 2010.

VERA, Luana Janaína Souza; BASANO, Sergio de Almeida; CAMARGO, Julianade Souza Almeida Aranha. et al. Adequação da técnica da PCR para diagnóstico de infecção de *Mansonella ozzardi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 380–382, 2011.

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Adulto)**

O(A) Sr(a) está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: **“Mansonelose em área urbana do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil”**. Nesta pesquisa, pretendemos determinar se conseguimos detectar em uma pequena quantidade de seu sangue, se você está contaminado com um tipo de verme sanguíneo, a Mansonella, que é transmitido por um tipo de “mosquito” o pium.

Para esta pesquisa adotaremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): Exame de sangue para determinação das taxas de infecção por Mansonella na população. Neste procedimento, será coletado sangue venoso (punção venosa), por meio de uma seringa estéril descartável, o que implica em apenas um pequeno incômodo passageiro e nenhum risco de contaminação ao voluntário. Se houver incômodos ocorridos durante a coleta do material, serão prontamente dirimidos pelos pesquisadores.

Para participar desta pesquisa, você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você, após o esclarecimento sobre o projeto, é livre para participar ou recusar-se a participar e poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. Você não será identificado em nenhuma publicação. Não há riscos de exposição de imagens ou afins. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no **Instituto Leônidas e Maria Deane/ FIOCRUZ, Manaus** e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Caso queira entrar em contato com o Comitê de Ética em pesquisa em Seres Humanos que avaliou e aprovou o projeto os dados do CONEP: AQUI IREMOS PREENCHER DE ACORDO COM O ENCAMINHAMENTO DADO PELO CONEP, SE NECESSÁRIO.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento

poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

São Gabriel da Cachoeira _____ de _____ de 2015.

Assinatura do(a) Responsável

Assinatura do(a) Pesquisador(a)

Pesquisador responsável

Eu, Felipe Arley Costa Pessoa, responsável pelo projeto "**Mansonelose em área urbana do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil**", declaro que obtive espontaneamente o consentimento deste sujeito de pesquisa (ou do seu representante legal) para realizar este estudo. Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas por minha pessoa através dos telefones (92) 3221 2323/ (92) 98839 3577 e também através do endereço Rua Teresina, 476 – Adrianópolis – CEP – 69057-070, Manaus-AM.

ANEXO B – Questionário de pesquisa

**MANSONELOSE EM ÁREA URBANA DO
MUNICÍPIO DE SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA**

QUESTIONÁRIO DE PESQUISA

N° Questionário _____

Entrevistador: _____ Entrevistado: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ N° da Casa: _____

Telefone: _____ Coordenadas (GPS) N° do ponto: _____

Latitude: _____ Longitude: _____

Nome completo: _____

Apelido: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Sexo: () M () F Naturalidade: _____

Quanto tempo reside na área: _____ N° de residentes: _____

Ocupação: _____

Local onde exerce a ocupação: () Em São Gabriel da Cachoeira

() Fora de São Gabriel da Cachoeira

Escolaridade: () Nenhuma () 1 a 3 anos () 4 a 7 anos () 8 a 11 anos

() 12 ou mais anos () Não se aplica

Estado civil: () solteiro(a) () casado(a) () divorciado(a) () viúvo(a)

() união estável () amigado(a)

Cor da pele: () branco () pardo () moreno () negro

Tipo sanguíneo: () A () B () AB () O

Rh sanguíneo: () + () -

Já teve filariose: () Sim () Não **Quantas vezes:**_____ **1ª infecção:** () Sim () Não

Doença de Chagas: () Sim () Não

Malária: () Sim () Não

Dengue: () Sim () Não

Leishmaniose: () Sim () Não

Fumante: () Sim () Não

Ingere bebida alcoólica: () Sim () Não

Periodicidade: () sempre () socialmente () raramente

Sintomas: () febre () dor no corpo () dor de cabeça () dores nas articulações

() sudorese () tremedeira/calafrios () fraqueza