

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,
SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA

MANSONELOSE NO MUNICÍPIO DE SÃO GABRIEL DA
CACHOEIRA, AMAZONAS, BRASIL

LUCYANE BASTOS TAVARES DA SILVA

MANAUS
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,
SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA

LUCYANE BASTOS TAVARES DA SILVA

MANSONELOSE NO MUNICÍPIO DE SÃO GABRIEL DA
CACHOEIRA, AMAZONAS, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia.

ORIENTADOR: Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz

MANAUS
2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586m Silva, Lucyane Bastos Tavares da
Mansonelose no município de São Gabriel da Cachoeira,
Amazonas, Brasil. / Lucyane Bastos Tavares da Silva. 2016
101 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Sérgio Luiz Bessa Luz
Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na
Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Mansonelose. 2. Mansonella spp. 3. Nested PCR. 4. Sangue
impregnado em papel de filtro. 5. Gota espessa. I. Luz, Sérgio Luiz
Bessa II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

LUCYANE BASTOS TAVARES DA SILVA

MANSONELOSE NO MUNICÍPIO DE SÃO GABRIEL DA
CACHOEIRA, AMAZONAS, BRASIL

Projeto de pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz
Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz-AM)

Dr. Jansen Fernandes de Medeiros
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz – RO)

Dr. Felipe Arley Costa Pessoa
Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz-AM)

*Dedico este trabalho às minhas duas mães
Eliane Bastos e Maria da Conceição e aos meus
grandes amigos que tanto me incentivam, apoiam e
ensinam a nunca desistir, e sim, a sempre persistir em
meus objetivos.*

Agradecimentos

Primeiramente à Deus, que me amparou e confortou nos momentos mais conturbados de minha vida;

Ao Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz pelo constante acompanhamento e orientação;

Ao Dr. Felipe Arley Costa Pessoa, MSc. Tatiana Amaral Pires de Almeida pelo valioso auxílio e conforto psicológico para melhor desempenho e realização deste trabalho;

Aos funcionários do Instituto Leônidas e Maria Deane/ Fundação Oswaldo Cruz (ILMD/ Fiocruz).

Ao Dr. Sérgio Luz, Dr. Felipe Pessoa, Dr. Lee Crainey e Dr. Jansen Medeiros, membros do grupo do projeto de pesquisa que foi realizado.

Ao Uziel Suwa, Maria Oliveira, MsC. Joycenea, Jordam William e Ricardo Mota, integrantes do grupo de coleta de campo.

À Natashe, Uziel, Raquel, Adriana, Érika, Maria, Jordam, Luís Paulo, André, Manolo, Bruna, Fernando, Carliane, Luciana, Stephanie pelo apoio nos momentos de desespero, e suporte de minhas oscilações de humor durante a elaboração deste trabalho;

Ao Ângelo Quintanilha, Derlinda Gonçalves, Evair Lima, Aldair Braz, Avian Adrian, Monalisa Pinheiro, Alexandre, Ilma, 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.

AGRADEÇO!

Isso de a gente querer ser exatamente o que a gente é ainda vai nos levar além.

Paulo Leminski

RESUMO

As filárias são parasitas pertencentes ao filo Nematoda, superfamília Filarioidea, transmitidos por insetos vetores como simulídeos, ceratopogonídeos e culicídeos. Dentre as filárias que causam doenças em humanos, destacam-se: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi*, *Mansonella perstans*, *Mansonella streptocerca* e *Loa loa*. Na Amazônia brasileira, destacam-se três espécies: *O. volvulus*, agente da oncocercose, e *M. ozzardi* e *M. perstans*, agentes da mansonelose. A mansonelose causada pela *M. ozzardi* trata-se de uma doença cuja patogenicidade ainda é alvo de discussões, apresentando sintomatologia pouco característica, sendo comumente confundida com outras patologias tropicais, como a malária. Essa patologia apresenta prevalências que aumentam com a idade, acometendo preferencialmente, indivíduos do sexo masculino e com maior exposição ao vetor. A infecção por esse parasita era tipicamente rural, no entanto as prevalências em áreas urbanas tem crescido e se equiparado às aquelas encontradas em áreas rurais. Com o intuito de verificar a ocorrência de mansonelose no município de São Gabriel da Cachoeira(AM), foi realizado um estudo epidemiológico transversal, com coleta de sangue, através de punção digital, para impregnação em papel de filtro e confecção de lâmina de gota espessa, nos períodos de Julho a Agosto de 2015. O material foi armazenado em temperatura de geladeira (4°C a 8°C) até a chegada ao Laboratório Multiusuário do Instituto Leônidas e Maria Deane da Fundação Oswaldo Cruz, em Manaus, onde foram submetidas às etapas posteriores, de extração de DNA, *Nested* PCR, sequenciamento e leitura das lâminas de gota espessa. Dos 497 indivíduos analisados, 81 (16,3%) apresentaram resultado positivo pela análise molecular e 39 (7,9%) pela técnica de gota espessa, sendo que destes 50 (22,4%) pertenciam ao sexo masculino e 31 (11,3%) ao sexo feminino. Dos 81 indivíduos positivos pela FnPCR, 37 (45,7%) residiam em área considerada urbana (área 1), 20 (24,7%) em área periurbana (área 2) e 24 (29,6%) em área rura (área 3). Dos 39 participantes positivos pela técnica de gota espessa, 13 (33,3%) eram residentes em área urbana, 14 (35,9%) em área periurbana e 12 (30,8%) em área rural. O estudo revelou que não foi encontrada diversidade do parasita na região, no período de julho a agosto de 2015, com a obtenção de sequências compatíveis apenas com as de *Mansonella ozzardi*, demonstrando ainda que técnica molecular representa um potencial importante para o levantamento da epidemiologia de filárias na região, podendo ser utilizada com coleta simples, por punção digital, em papel de filtro facilitando a realização de levantamentos em áreas distantes e com restrições logísticas.

Palavras-chave: Mansonelose, *Mansonella* spp., *Nested* PCR, sangue impregnado em papel de filtro, gota espessa.

ABSTRACT

The filaria worms are parasites which belong to the phylum Nematoda, superfamily They are transmitted by insect vectors as black flies, mosquitoes and ceratopogonidea. Among the filaria worms that cause diseases in humans, there are: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi*, *Mansonella perstans*, *Mansonella streptocerca* and *Loa loa*. In the Brazilian Amazon, there are three species: *O. volvulus*, Onchocerciasis agent, and *M. ozzardi* and *M. perstans*, the mansonelliasis agents. The mansonelliasis caused by *M. ozzardi* is a disease whose pathogenicity is still a matter of debate, with some characteristic symptoms, being commonly confused with other tropical diseases such as malaria. This pathology shows that the prevalence increases with age, affecting preferably males with greater exposure to the vector. The infection by this parasite was typically rural, however the prevalence in urban areas has grown and it is now equivalent to those found in rural areas. In order to verify the occurrence of mansonelliasis in São Gabriel da Cachoeira (AM), an epidemiological study was conducted to collect blood by finger prick, for impregnation on filter paper and production of thick blood slide from July to August 2015. The material was stored at the cooling temperature of 4 ° C to 8 ° C until its arrival at the Multiuser Laboratory Leonidas Institute and Maria Deane of the Oswaldo Cruz Foundation in Manaus, where they were subjected to the later stages: DNA extraction, *Nested* PCR, sequencing and reading of thick films. Among 497 individuals analyzed, 81 (16.3%) were positive by molecular analysis and 39 (7.9%) by the thick drop technique, and of these, 50 (22.4%) were male and 31 (11.3%) female. Within 81 positive individuals by FnPCR, 37 (45.7%) live in areas considered urban (area 1), 20 (24.7%) in peri-urban area (area 2) and 24 (29.6%) in rural area (area 3). Within the 39 positive participants by the thick drop technique, 13 (33.3%) were living in urban areas, 14 (35.9%) in peri-urban and 12 (30.8%) in rural areas. The study revealed that there was no diversity of the parasite in the region from July to August 2015, with the acquisition of compatible sequences only the *Mansonella ozzardi*, further demonstrating that molecular technique represents an important potential for the lifting of the epidemiology of filaria in the region and can be used with simple collection, by fingerstick, on filter paper facilitating surveying in remote areas and logistical constraints.

Keywords: Mansonelliasis, *Mansonella* sp. *Nested* PCR, dried blood spots on filter paper, thick blood of blood.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Pium (Simuliidae)	25
Figura 2 - Maruim (Ceratopogonidae)	25
Figura 3 - Esquemática do ciclo biológico da <i>M. ozzardi</i>	26
Figura 4 - Microfilária de <i>Mansonella ozzardi</i>	28
Figura 5 - Microfilária de <i>Mansonella perstans</i>	28
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)...	34
Figura 7 - Mapa com demarcações de bairros estudados na área 1, e das comunidades estudadas na área 2	35
Figura 8 - Mapa com demarcações das comunidades estudadas na área 3	36
Figura 9 - Aplicação de TCLE e questionário	37
Figura 10 - Fluxograma do procedimento de extração de DNA total de sangue impregnado em papel de filtro, utilizando o <i>FTA purification reagent mais CHELEX 5%</i>	39
Figura 11 - Fluxograma do procedimento de purificação de DNA por coluna	45
Figura 12 - Microfilária de <i>Mansonella ozzardi</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> em humanos, obtida através de leitura de gota espessa, no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015).....	51
Tabela 2 - Frequência de infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> em humanos, obtida através de leitura de gota espessa, das áreas 1, 2 e 3 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)	51
Tabela 3 – Parasitemia dos 39 indivíduos positivos através de leitura de lâmina de gota espessa, das áreas 1, 2 e 3 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015).....	52
Tabela 4 - Frequência de infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> em humanos, obtida através de análise molecular, no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)	53
Tabela 5 - Frequência de infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> 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)	53
Tabela 6 - Comparação das prevalências, obtidas através das duas metodologias propostas, entre as áreas 1, 2, 3 e a amostragem geral	54
Tabela 7 - Frequência de infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> em humanos, por gênero e idade, no município São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)	55
Tabela 8 - Frequência de infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> em humanos, por ocupação e gênero, no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)	55
Tabela 9 - Comparação dos sintomas clínicos entre pacientes infectados e não infectados por <i>Mansonella ozzardi</i> no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015).....	56
Tabela 10 – Frequência dos indivíduos positivos, quanto a localização da casa em relação ao rio, igarapé e floresta	57
Tabela 11 – Frequência dos indivíduos positivos, em relação a presença ou ausência de telas em portas e janelas	57
Tabela 12 – Frequência dos indivíduos positivos, em relação a picadas de Piuns e Maruins	57
Tabela 13 - Frequência dos indivíduos positivos, em relação ao tempo de residência na área).....	58

Tabela 14 - Frequência de infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> em humanos, por gênero e idade, na área 1 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)	59
Tabela 15 - Frequência de infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> em humanos, por ocupação e gênero, na área 1 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015).....	59
Tabela 16 - Comparação dos sintomas clínicos dos pacientes positivos e negativos infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> em humanos, na área 1 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015).....	60
Tabela 17 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 1, quanto a localização da casa em relação ao rio, igarapé e floresta	61
Tabela 18 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 1, em relação a presença ou ausência de telas em portas e janelas.....	61
Tabela 19 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 2, em relação a picadas de Piuns e Maruins	61
Tabela 20 - Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 1, em relação ao tempo de residência na área	62
Tabela 21 - Frequência de infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> em humanos, por gênero e idade, na área 2 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)	63
Tabela 22 - Frequência de infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> em humanos, por ocupação e gênero, na área 2 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015).....	63
Tabela 23 - Comparação dos sintomas clínicos dos pacientes positivos e negativos infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> em humanos, na área 2 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015).....	64
Tabela 24 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 2, quanto a localização da casa em relação ao rio, igarapé e floresta.....	65
Tabela 25 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 2, em relação a presença ou ausência de telas em portas e janelas.....	65
Tabela 26 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 2, em relação a picadas de Piuns e Maruins	65
Tabela 27 - Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 2, em relação ao tempo de residência na área	66

Tabela 28 - Frequência de infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> em humanos, por gênero e idade, na área 3 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)	67
Tabela 29 - Frequência de infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> em humanos, por ocupação e gênero, na área 3 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015).....	67
Tabela 30 - Comparação dos sintomas clínicos dos pacientes positivos e negativos infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> em humanos, na área 3 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015).....	68
Tabela 31 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 3, quanto a localização da casa em relação ao rio, igarapé e floresta	69
Tabela 32 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 3, em relação a presença ou ausência de telas em portas e janelas.....	69
Tabela 33 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 2, em relação a picadas de Piuns e Maruins	69
Tabela 34 - Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 3, em relação ao tempo de residência na área	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Nome dos iniciadores utilizados para amplificação das sequências de DNA de <i>Mansonella</i> spp. na 1ª e 2ª PCR.....	40
Quadro 2: Tamanho dos <i>amplicons</i> gerados com produto da 1ª e da 2ª PCR, para detecção de <i>Mansonella</i> spp.....	41
Quadro 3: Concentração final de cada reagente utilizado na preparação do <i>mix</i> de 1ª e 2ª PCR.....	42
Quadro 4: Condições de termociclagem para 1ª PCR para obtenção de <i>amplicons</i> de <i>Mansonella</i> spp.	43
Quadro 5: Condições de termociclagem para 2ª PCR para obtenção de <i>amplicons</i> de <i>Mansonella</i> spp.	43
Quadro 6: Quantificação das amostras consideradas como positivas após eletroforese em gel de agarose.....	46
Quadro 7 – Identificação das 81 amostras consideradas positivas após sequenciamento da região ITS-1 do DNA ribossomal.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
AM	Amazonas
Cc	Centímetro cúbico
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
Cm	Centímetro
DEC	Dietilcarbamazina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenoaminotetracético
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FnPCR	<i>Nested</i> Reação em cadeia da Polimerase para filárias
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de Confiança
ILMD	Instituto Leônidas e Maria Deane
ITS	<i>Internal Transcription Space</i>
Km	Kilômetro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PF	Papel de Filtro
q.s.p	Quantidade suficiente para
rpm	Rotação por minuto
spp.	Espécies
SV	Sangue Venoso
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
V	Volt

LISTA DE SÍMBOLOS

°C Grau Celsius

∞ Infinito

U Unidade

% Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVOS	24
3.1	OBJETIVO GERAL	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4	REVISÃO DA LITERATURA	25
4.1	MANSONELOSE	25
4.2	DIAGNÓSTICO	27
4.3	TRATAMENTO	30
4.4	EPIDEMIOLOGIA	31
5	MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1	ÁREA DE ESTUDO: SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA	34
5.2	AMOSTRAGEM	36
5.3	COLETA DAS AMOSTRAS	36
5.4	IDENTIFICAÇÃO DOS PARASITAS	38
5.4.1	Diagnóstico microscópico	38
5.4.2	Diagnóstico molecular	38
5.4.2.1	Extração de DNA	38
5.4.2.2	<i>Nested</i> PCR (“FnPCR”)	40
5.4.2.3	Análise dos <i>amplicons</i>	43
5.4.2.4	Purificação e quantificação	44
5.4.2.5	Sequenciamento	46
5.5	ANÁLISES DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	47
5.6	ANÁLISES DAS AMOSTRAS SEQUENCIADAS	47
5.7	PROJETO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	47
6	RESULTADOS	49
6.1	ANÁLISE MICROSCÓPICA	49
6.2	ANÁLISE MOLECULAR	52
6.3	ANÁLISE MOLECULAR <i>versus</i> ANÁLISE MICROSCÓPICA	54
6.4	ANÁLISE DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	54
6.4.1	Análise dos dados epidemiológicos por áreas	58
6.5	SEQUENCIAMENTO	70
7	DISCUSSÃO	72
8	CONCLUSÃO	80
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	88
Anexo B.....	99

1 INTRODUÇÃO

As filárias são parasitas pertencentes ao filo Nematoda, superfamília Filarioidea, transmitidos por insetos vetores como simuliídeos, ceratopogonídeos e culicídeos. Dentre as filárias que causam doenças em humanos, destacam-se: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi*, *Mansonella perstans* e *Loa loa* (TANG et al., 2010).

Essas filárias são endêmicas em áreas subtropicais e tropicais do mundo e, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2010, cerca de 120 milhões de pessoas estavam infectadas por esses parasitas. Observa-se que boa parte dos dados epidemiológicos constantes nos boletins da OMS e do Centro de controle e prevenção de doença (CDC) são referentes a bancroftose e oncocercose, havendo escassez de pesquisas com outros filariídeos de importância médica para humanos.

No Brasil, estão presentes quatro espécies de filárias que causam doenças em humanos: *W. bancrofti* (bancroftose), *M. perstans* e *M. ozzardi* (mansonelose) e *O. volvulus* (oncocercose) (BASANO et al., 2011; JIMÉNEZ et al., 2011; MEDEIROS et al., 2009a; MEDEIROS; Py-DANIEL, 2009; MORALES-HOJAS et al., 2001; TANG et al., 2010).

Dentre essas, destaca-se na Amazônia Brasileira a *M. ozzardi*, assinalada por Deane, em 1949, no estado do Amazonas. Esta apresenta-se bem distribuída no estado do Amazonas e ao norte de Roraima, ocorrendo simpatricamente com a *O. volvulus* (MEDEIROS et al., 2009b; TANG et al., 2010).

A mansonelose é uma filariose humana que pode ser causada por três espécies distintas do parasita do gênero *Mansonella*: *Mansonella perstans*, *Mansonella ozzardi* e *Mansonella streptocerca*. É caracterizada pela presença de microfilárias (formas jovens) nos vasos sanguíneos periféricos do homem e, às vezes, em capilares pertencentes a tecidos subcutâneos (CDC, 2013).

A *Mansonella ozzardi* é transmitida através da picada de *Simulium* (Diptera: Simuliidae) e/ou *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) infectados e está amplamente distribuída em toda a África, América Latina e Caribe (COHEN et al., 2007; MEDEIROS et al., 2009a; RACCURT et al., 2014; TAVARES, 1981). Já a *Mansonella perstans* apresenta os *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) como

responsáveis por sua transmissão, e relatos indicam sua ocorrência em regiões tropicais da América do Sul e da África (KEISER et al., 2008; PHILLIPS et al., 2014; TAVARES, 1981).

Os sintomas associados à mansonelose causada pela *M. ozzardi*, frequentemente, se confundem com os de outras doenças comuns às áreas subtropicais e tropicais do planeta, como os associados à malária, por exemplo. Febre, dores no corpo, dores intensas de cabeça, calafrios em membros inferiores são algumas das manifestações clínicas comumente descritas em indivíduos com alta microfilaremia (BATISTA; RABELLO, 1960; MARTINS et al., 2010; MEDEIROS et al., 2008; TAVARES, 1981).

Lesões cutâneas como placas avermelhadas (BATISTA; RABELLO, 1960; MARTINS et al., 2010; TAVARES, 1981) e lesões oculares como prurido e conjuntivite costumam ser associadas à mansonelose por *M. ozzardi* (COHEN et al., 2007; VIANNA et al., 2012). Entretanto, o potencial patogênico dessas filárias é ainda bastante debatido na comunidade científica, e muitos dos mecanismos ainda não estão inteiramente esclarecidos, havendo uma enorme carência de estudos nessa área.

A mansonelose ocasionada pela *M. ozzardi*, apesar de muitas vezes, apresentar-se como oligosintomática, deve ser considerada como importante, visto que estudos na África mostraram que ela pode alterar os mecanismos de resposta imune dos hospedeiros, e influenciar a susceptibilidade de outras doenças de mesma distribuição geográfica de morbidades mais complicadas como malária, a tuberculose e HIV (SIMOSEN et al., 2011). Há carência de informações sobre diversos aspectos acerca desse parasita na região Amazônica, tais como: epidemiológicos, de diagnóstico, patogenia/patologia e tratamento (MEDEIROS et al., 2014).

Os estudos epidemiológicos sobre a *M. ozzardi* realizados na Amazônia, Brasil, verificaram a distribuição geográfica, características populacionais e sintomatologia (BATISTA; RABELLO, 1960; MEDEIROS et al., 2009b, 2011, 2014; TAVARES, 1981). Entretanto, a conclusão evidente desses estudos é de que a distribuição geográfica desse parasita é bem mais ampla, e contrariamente ao que se descrevia anteriormente, há indicativos que esse parasita realmente pode ser patogênico. Outrossim, um estudo realizado em populações ribeirinhas de Tefé e Coari/Codajás (AM), comparando diagnóstico molecular com o exame tradicional,

demonstrou que a prevalência aumentou cerca de 20% através de métodos moleculares (MEDEIROS et al., 2015). Dessa forma, verificou-se que existe subnotificação de casos de mansonelose em outras áreas.

Em paralelo, outra espécie, a *M. perstans*, também causadora de mansonelose e endêmica na África e em algumas áreas da América Latina, possui poucos registros de sua ocorrência no Brasil (MEDEIROS; PESSOA; MARTINS, 2010; TAVARES, 1981). Pesquisas realizadas no Alto do Rio Negro, nas comunidades indígenas, apontam a presença dessa filária na Amazônia brasileira ocorrendo simpatricamente com *M. ozzardi* (BASANO et al., 2011; MEDEIROS; PESSOA; MARTINS, 2010).

Dados indicam que a *M. perstans* começa a ter dispersão através da movimentação de seus hospedeiros humanos na área de fronteira da Colômbia com o Brasil. E, de fato, a dispersão indígena no lado da fronteira brasileira com a Colômbia, no estado do Amazonas, na região do Alto do Rio Negro, município de São Gabriel da Cachoeira, já é conhecida (BRANDHUBER, 1999). Logo, essa movimentação pode estar favorecendo a instalação de novas áreas com potencial de transmissão do parasita, tendo em vista a presença de possíveis vetores nessas áreas.

Martins e colaboradores (2010), encontraram nos bairros localizados próximo às margens do rio Solimões, na cidade de Coari, Amazonas, elevada prevalência (> 10%) de *M. ozzardi*, e cerca de 5% dos simulídeos, coletados em áreas urbanas, parasitados. O que pode indicar que a transmissão ocorre em áreas urbanas de municípios que são localizados em margens de grandes rios, onde haja presença de simulídeos realizando repasto sanguíneo em hospedeiros humanos infectados com o parasita, caracterizando um processo de urbanização da infecção por *M. ozzardi*.

Nesse cenário, o município de São Gabriel da Cachoeira possui diversos fatores necessários para o desenvolvimento e estabilização de uma área endêmica, tais como a localização geográfica, que além de favorecer a presença de possíveis espécies de vetores, devido o município estar localizado as margens do rio, também favorece a imigração de populações de áreas endêmicas do alto rio Negro. Essa população migrante está em busca de tratamentos de saúde e melhores oportunidades de trabalho e estudo (BRANDHUBER, 1999).

Além disso, a possível ocorrência de *M. perstans* pode estar passando despercebida devido à dificuldade na distinção correta dos parasitas no diagnóstico

tradicional ocasionado devido à falta de treinamento específico, pessoal técnico especializado e também por artefatos na preparação da técnica. E também, pelo fato de os profissionais da saúde serem treinados para identificação de espécies de *Plasmodium*, o qual é observado em aumento de 100X enquanto as espécies de *Mansonella* costumam ser observadas em aumentos de 10X e 40X (MEDEIROS, PESSOA; CAMARGO, 2014).

A relevância nesse contexto se deve ao tratamento, visto que em algumas áreas da região Amazônica acontece a administração de mectizan para tratamento de indivíduos com filariose por *M. ozzardi* (MEDEIROS et al. 2014). Essa prescrição sem o critério da correta identificação, em áreas de simpatria desses parasitas, pode ser inadequada para indivíduos infectados por *M. perstans* podendo causar quadros clínicos complicados (COULIBALY et al. 2009).

Assim, a migração humana para dentro ou fora das áreas consideradas endêmicas pode influenciar diretamente no surgimento de novos focos de filarioses nas Américas. E, em alguns estudos esse fator passou a ser considerado como uma provável causa de dispersão da doença nos continentes americanos e africanos (SHELLEY, 2002).

Essa situação também pode ser assinalada para outras patologias tropicais como a malária, leishmaniose e vários tipos de arbovírus, doenças que antes eram consideradas endêmicas de áreas de florestas e rurais e tem se tornado cada vez mais presentes em áreas urbanas. Com isso, sugere-se que esse fenômeno tem sido responsável pela geração de mudanças epidemiológicas na Amazônia e em outras regiões tropicais (TADEI et al., 1998; CONFALONIERI, 2005). A migração de pessoas de áreas florestais e rurais para áreas urbanas na região amazônica é um fator (WRIGHT & MULLER-LANDAU, 2006), que vem sendo responsável por áreas de alta concentração populacional (CONFALONIERI, 2005), com pessoas vindas de diversas áreas de focos tradicionais de doenças, podendo por consequência, aumentar o risco de dispersão de doenças.

Dessa forma, temos uma importante questão a ser estudada nessa área para auxiliar na compreensão da epidemiologia da mansonelose:

Qual é a prevalência de mansonelose e qual o parasita responsável pela infecção na população urbana de São Gabriel da Cachoeira?

2 JUSTIFICATIVA

Uma das principais considerações no desenho de estudos epidemiológicos sobre mansonelose é verificar a real situação epidemiológica. O conhecimento da distribuição geográfica das *Mansonella* spp. é crucial para a aplicação ou desenho de qualquer estratégia visando políticas de tratamento, vigilância e controle.

A *M. ozzardi* apresenta ampla distribuição no Amazonas (RACHOU, 1957) e, também é encontrada ao norte de Roraima, ocorrendo simpatricamente com a *O. volvulus* (POST et al., 2003), e concomitantemente com a *M. perstans* no estado do Amazonas, o que exige uma correta diferenciação das espécies (MEDEIROS; PESSOA; MARTINS, 2010). Porém, Adami (2014) em resposta ao artigo “Outstanding insecurities concerning the use of an Ov16-based ELISA in the Amazonia onchocerciasis focus” (LUZ et al., 2014), afirmou que nenhum grupo de pesquisa foi capaz de confirmar a existência de *M. perstans* no Brasil através de um consistente estudo epidemiológico.

Uma das principais dificuldades, mencionadas em alguns estudos, para conhecer a real distribuição das espécies de *Mansonella* ainda é o acesso às áreas e a distância entre muitas localidades, sendo considerados como impeditivos no que se refere a algumas ações, principalmente as voltadas ao diagnóstico da mansonelose, visto que a patogenicidade desses parasitas ainda não é bem definida. E, em virtude disso, acredita-se que uma possível estratégia seja o aproveitamento dos técnicos do programa de malária para identificação de infecções causadas por espécies de *Mansonella* (MEDEIROS, et al., 2008).

Uma área que exemplifica claramente essa dificuldade de acesso a determinadas áreas é o município de São Gabriel da Cachoeira, que se localiza na faixa de fronteira entre Brasil, Colômbia e Venezuela, na bacia do Alto Rio Negro, distante 852 km de Manaus, com quase 80% da população composta por indivíduos de etnia indígena (LEVINO; OLIVEIRA, 2007; IMBIRIBA et al., 2009). Esse município apresenta importante densidade populacional de indígenas e alta mobilidade desses grupos em área de fronteira (IMBIRIBA et al., 2009). Em virtude disso, pretendeu-se adquirir uma compreensão sobre os aspectos epidemiológicos da mansonelose na região.

As doenças transmitidas por vetores acometiam, preferencialmente, os indivíduos de áreas rurais, no entanto, diversas patologias começaram a apresentar vetores competentes em áreas urbanas (TAUIL et al., 2005). E, nos últimos anos alguns estudos tem demonstrado que as áreas rurais e urbanas estão apresentando altas prevalências de *M. ozzardi*, com percentuais muito semelhantes entre si (MARTINS et al., 2010; VIANNA et al., 2012).

Outro aspecto importante em relação as dificuldades do estudo da mansonelose é o método de diagnóstico. O método clássico laboratorial para diagnóstico dessa patologia, gota espessa, possui algumas limitações como a baixa sensibilidade, e a técnica molecular de amplificação de ácido nucléico, a PCR, apresenta-se bastante sensível na detecção do material genético desses parasitas. Variações dessa técnica, como a *Nested* PCR, tem sido utilizada para aumentar ainda mais a sensibilidade do teste (MEDEIROS et al., 2015; RUBIO et al., 2002; TANG et al., 2010). Entretanto, ainda existem poucos protocolos publicados e validados no Brasil para esse fim (MEDEIROS et al., 2015; TANG et al., 2010).

Todas essas técnicas necessitam da realização de coleta de sangue, acondicionamento desse material, transporte e correta preservação do mesmo. Em regiões amazônicas e endêmicas para a mansonelose, questões logísticas dificultam, muitas vezes, esse processo (MEDEIROS, et al., 2008). Neste sentido, torna-se uma condição imprescindível, para nossa região, possuir uma técnica auxiliar, validada, cuja sensibilidade e especificidade são possivelmente superiores às das técnicas clássicas de detecção e caracterização de espécies dessas filárias (MEDEIROS et al., 2015).

Ao comparar a técnica clássica com a técnica molecular, obtêm-se maior sensibilidade através da técnica molecular. Apesar das duas técnicas apresentarem resultados falsos negativos, a técnica molecular vem demonstrando que pode apresentar menores números de resultados falso-negativos e falso-positivos, e cerca de 1,8 vezes mais especificidade do que a técnica clássica (MEDEIROS et al., 2015).

Desta forma, esta proposta contribuiu para um conhecimento mais detalhado da epidemiologia de doenças causadas por esses parasitas na região, bem como relacionou os índices de prevalências em diferentes áreas do município de São Gabriel da Cachoeira.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o perfil epidemiológico da mansonelose no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a prevalência da mansonelose em três áreas, urbana, peri urbana e rural, do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas;
- Identificar a identidade dos parasitas responsáveis pela mansonelose no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 MANSONELOSE

A *M. ozzardi* foi descoberta no Brasil por Maria P. Deane na década de 1940, através de um inquérito epidemiológico, que visava averiguar a incidência de filárias envolvendo a população da cidade de Manaus (DEANE, 1949). O inquérito epidemiológico consistiu na leitura de gota espessa de sangue e incluiu cerca de 3,5% da população total da cidade, e destes 0,6% (15 indivíduos) foram positivos para *M. ozzardi* (BASANO et al., 2011; DEANE, 1949).

A mansonelose é primariamente caracterizada pela presença de microfilárias (formas jovens) de *M. ozzardi* ou *M. perstans*, nos vasos sanguíneos periféricos do homem e, às vezes, em capilares pertencentes a tecidos subcutâneos (BATISTA; OLIVEIRA; RABELLO, 1960; COHEN; RIBEIRO; MARTINS, 2008, MEDEIROS; PESSOA; MARTINS, 2010).

A *M. ozzardi* é transmitida por insetos de duas famílias de Diptera: Ceratopogonidae (popularmente chamados de maruins ou mosquito-pólvora) (figura 1), e Simuliidae (piuns ou borrachudos) (figura 2) (COHEN; RIBEIRO; MARTINS, 2008; MEDEIROS et al., 2009a; SHELLEY; SHELLEY, 1976). A infecção ao inseto ocorre quando o mesmo ingurgita as microfilárias no momento do repasto sanguíneo. As microfilárias se transformam em larvas de primeiro estágio (L1) e estas se diferenciam em larvas de segundo estágio ou L2 que, após nova muda, transformam-se em larvas infectantes L3 (CDC, 2013).



Figura 1 - Piun (Simuliidae)
Fonte: Felipe Pessoa, 2015



Figura 2 - Maruim (Ceratopogonidae)
Fonte: LPC Carvalho, 2015

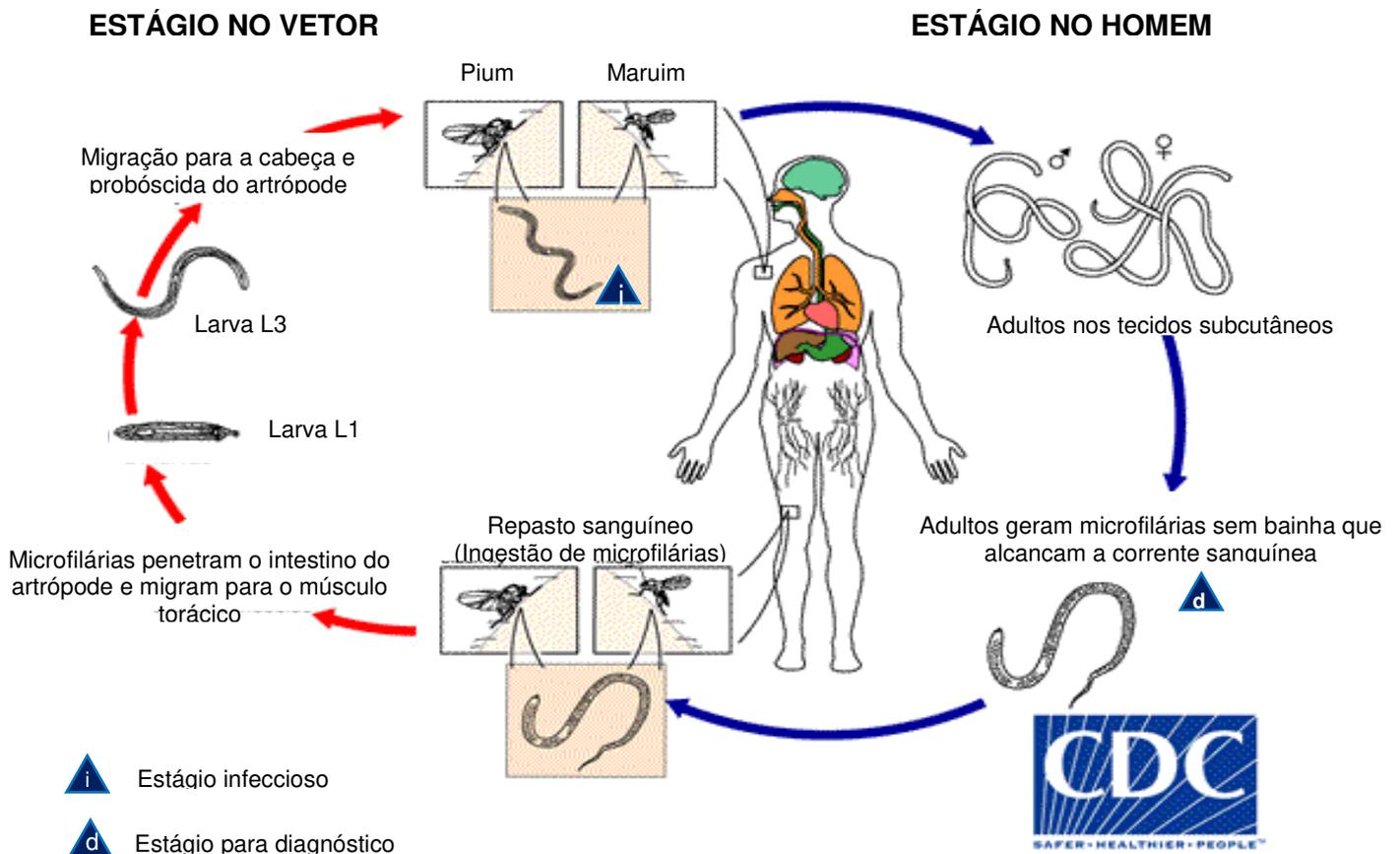


Figura 3 - Esquemática do ciclo biológico da *M. ozzardi*
 Fonte: Adaptado de CDC.

No Brasil, até o momento, apenas os simulídeos são os agentes transmissores de *M. ozzardi*. Os vetores são *Simullium (Psaroniocompsa) amazonicum*, *S. (P.) argentiscutum* (MORAES et al., 1983; SHELLEY; COSCARÓN, 2001), *S. (P.) oyapockense* (MORAES; SHELLEY; DIAS, 1985; SHELLEY; COSCARÓN, 2001), e o *S. (P.) pydanielli* foi relatado como um possível vetor no Amazonas (BASANO et al., 2011; PESSOA; BARBOSA; MEDEIROS, 2008). Esses simulídeos também são incluídos dentro do gênero *Cerqueirellum*, dependendo da escolha taxonômica do pesquisador (PY-DANIEL, 1983, PESSOA; BARBOSA; MEDEIROS, 2008). Ainda não se conhecem os vetores de *M. perstans* no Brasil. Sugere-se que devam ser *Culicoides* (SIMONSEN; ONAPA; ASIO, 2011), mas a realização de estudos entomológicos se faz necessária para incriminação dos mesmos.

Os sintomas associados à infecção causada pela *M. ozzardi* frequentemente se confundem com os de outras doenças comuns às áreas subtropicais e tropicais do planeta, como os associados à malária, por exemplo (MARTINS et al., 2010; MEDEIROS et al., 2014). Febre, dores no corpo, dores intensas de cabeça, calafrios em membros inferiores são algumas das manifestações clínicas comumente descritas em indivíduos com alta microfilaremia (BATISTA; OLIVEIRA; RABELLO, 1960; MARTINS et al., 2010; MEDEIROS et al., 2008; TAVARES, 1981). O potencial patogênico dessas filárias é ainda bastante debatido na comunidade científica, e muitos dos mecanismos ainda não estão inteiramente esclarecidos, havendo uma enorme carência de estudos nessa área.

A infecção ocasionada pela *M. pertans* pode acarretar sintomas como edema, prurido (BOUYOU-AKOTET et al., 2014; FUX et al., 2006; HOLMES et al., 1969), angioedema, dor nas articulações, linfoedema, febre, leve edema em órgãos como baço e fígado (FUX et al., 2006; HOLMES et al., 1969). No entanto, existem poucos estudos que envolvam sintomas associados a essa infecção.

Na região Amazônica, os sintomas parecem ser mais evidentes nos indivíduos com elevada microfilaremia (MEDEIROS et al., 2008). Na África, apesar há grandes esforços de tratamento em massa para oncocercose e filariose linfática, no entanto, a mansoniase tem sido inexplicavelmente negligenciada.

A *M. ozzardi* há muitos anos é considerada uma filariose não patogênica, a qual não consta na lista da OMS de doenças tropicais negligenciadas, mesmo possuindo algumas características dessas doenças, citadas pela OMS. Por conseguinte, há carência de informação sobre diversos aspectos acerca desse parasita, tais como: epidemiológicos, de diagnóstico, patogenia/patologia e tratamento. Os estudos mais recentes foram inquéritos desenvolvidos por Martins et al. em 2010, e por Medeiros et al., 2014, 2015 na região Amazônica.

4.2 DIAGNÓSTICO

Quanto à identificação das espécies de filárias, as características morfológicas do parasita são importantes para o exame microscópico de lâmina de gota espessa de sangue corada com Giemsa ou Panótico, que é o método mais

utilizado para identificação de *M. ozzardi* e *M. perstans* (MARTINS et al., 2010; TANG et al., 2010).

As microfilárias de *M. ozzardi* e de *M. perstans* possuem um tamanho médio de 200 a 220 μm , não apresentam bainha, suas diferenciações morfológicas baseiam-se nas características das extremidades anterior (cefálica) e posterior (caudal), e na distribuição dos núcleos (TAVARES, 1981; MEDEIROS; PY-DANIEL, 2009).



Figura 4 - Microfilária de *Mansonella ozzardi*
Fonte: Própria

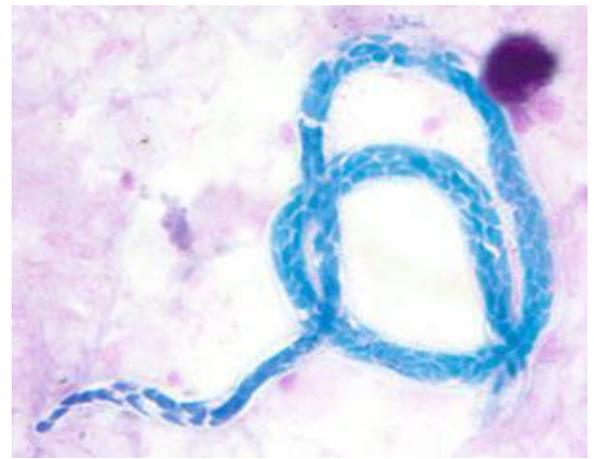


Figura 5 - Microfilária de *Mansonella perstans*
Fonte: CDC, 2013

Os métodos de gota fresca e de concentração também podem ser empregados no diagnóstico dessa doença (MEDEIROS; PESSOA; MARTINS, 2010; VERA et al., 2011). A gota fresca é capaz de verificar a motilidade das microfilárias, através da leitura da lâmina, logo em seguida a obtenção do sangue. Os métodos de concentração como o Knott, apesar de apresentam menor número de resultados falso-negativos quando comparado com a gota espessa, não são comumente empregados, devido à exigência de uma quantidade maior de sangue quando comparado a gota fresca e gota espessa (MEDEIROS; PESSOA; MARTINS, 2010; MEDEIROS; PY-DANIEL, 2009;). Além desses, existe o método imunológico *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), que consiste na identificação da infecção por espécies de *Mansonella*, através de reações de ligação de antígenos e anticorpos (ADAMI; BANIC; MAIA-HERZOG, 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).

Sem dúvidas, o diagnóstico por meio de leitura de lâmina de gota espessa é uma técnica simples e pouco dispendiosa, porém em casos com baixa microfilaremia pode apresentar baixa sensibilidade, requerendo profissionais treinados e qualificados na identificação e distinção dos caracteres morfológicos das filárias. Assim, a sua limitação em casos de baixa microfilaremia leva a necessidade de se procurar protocolos alternativos, como métodos moleculares (DEGESE et al., 2012; JIMÉNEZ; GONZÁLEZ et al., 2011; TANG et al., 2010).

A biologia molecular tem revolucionado o diagnóstico de diversas doenças, principalmente as infecciosas e parasitárias, através de suas ferramentas diagnósticas altamente sensíveis e específicas, baseadas na detecção e análise de ácidos nucleicos alvo (JIMÉNEZ; GONZÁLEZ et al., 2011).

Um aumento na sensibilidade da PCR clássica veio com a implementação da *Nested* PCR. Trata-se do mesmo fundamento básico, porém, com o objetivo de se melhorar a sensibilidade e especificidade da técnica clássica, realizam-se duas reações de PCR acopladas sendo que na segunda reação, utilizam-se iniciadores (*primers*) para região mais interna a da primeira PCR, usando como molde os produtos da PCR (*amplicons*) anterior, estabelecendo-se, assim, uma promissora e acurada estratégia de diagnóstico molecular (TANG; LÓPEZ-VÉLEZ et al., 2010).

No diagnóstico molecular de mansonelose, pode-se utilizar sangue venoso (SV) ou, ainda sangue de punção digital impregnado em papel de filtro (PF) (MEDEIROS et al., 2015). Este último vem ganhando destaque devido à praticidade, tanto em relação ao fácil manuseio, estabilidade a longo prazo de amostras de sangue em condições ideais, bem como o desconforto mínimo causado ao paciente ao se utilizar papel de filtro para coleta de material biológico. Todos esses atributos fazem com que esse procedimento torne-se uma alternativa promissora para o diagnóstico laboratorial de diversas patologias, principalmente em locais cuja logística de transporte, coleta e armazenamento de material biológico não é muito favorável (SANT'ANNA et al., 2008; FUEHRER et al., 2011).

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 de epidemiologia desses parasitas. Desta forma, com o conhecimento das rotas de transmissão e distribuição desses agentes, os estudos de patogenia, fisiopatologia e tratamento podem ser bem

caracterizados, permitindo o desenho de estratégias de controle e prevenção mais eficazes por parte das autoridades de saúde.

4.3 TRATAMENTO

No que se refere ao tratamento, a ivermectina é descrita como um recurso terapêutico no tratamento de indivíduos com microfilaremia de *M. ozzardi* (BASANO et al., 2014; GATTI et al., 2008; MEDEIROS; PESSOA; CARMAGO, 2014).

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 (TAVARES, 1981; GATTI et al., 2008). No entanto, estudos comprovam que o medicamento pode ocasionar reações adversas, como exacerbação clínica da filariose, juntamente com dor de cabeça, vômitos, náuseas, calafrios intensos e febre elevada. Tais reações podem ser tratadas com o uso de dipirona intravenosa, e, também, o uso de prednisona associado à ivermectina parece reduzir tais efeitos (SOARES, 2007, BASANO et al., 2014).

Diferentemente, a filariose ocasionada pela *M. perstans* apresenta dificuldade em ser tratada, não havendo concordância em relação ao tratamento, sendo o albendazol, tiabendazol, DEC (dietilcarbamazina) e mebendazol sugeridos no combate a filaremia (COULIBALY et al., 2009; SIMONSEN; ONAPA; ASIO, 2011). Entretanto, o DEC é considerado o fármaco mais recomendado no tratamento de *M. perstans* e, aparentemente, a combinação de DEC mais mebendazol parece resultar numa melhor atividade na eliminação das microfilárias (BREGANI et al., 2006; RIBEIRO et al., 200). 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*, deste que estas abriguem o endossimbionte intracelular denominado *Wolbachia* (COULIBALY et al., 2009; GEHRINGER et al., 2014).

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

(TAVARES, 1981; GATTI et al., 2008). No entanto, estudos comprovam que o medicamento pode ocasionar reações adversas, como exacerbação clínica da filariose, juntamente com dor de cabeça, vômitos, náuseas, calafrios intensos e febre elevada. Tais reações podem ser tratadas com o uso de dipirona intravenosa, e, também, o uso de prednisona associado à ivermectina parece reduzir tais efeitos (SOARES, 2007, BASANO et al., 2014). No município de Lábrea (AM), as reações adversas ao medicamento ocorreram em cerca de 64,9% dos pacientes, em contrapartida, 75,7% dos pacientes tiveram diminuição dos sintomas 3 dias após o medicamento ser administrado, e 91,9% após 30 dias (BASANO et al., 2014).

4.4 EPIDEMIOLOGIA

A *M. ozzardi* é encontrada na América Latina, e em algumas ilhas do Caribe. Na América do Sul, pode ser encontrada no Brasil, Guiana, Argentina, Panamá, Colômbia Suriname, Venezuela (MEDEIROS et al., 2015; MEDEIROS et al., 2009b; VERA et al., 2011).

No Brasil, a infecção por *M. ozzardi* teve seu primeiro relato em 1949, por Maria Deane Posteriormente, Rachou (1957) ao analisar 251 municípios do Brasil, num período de 5 anos, encontrou infecção por *M. ozzardi* em 48 (19,1%) dos locais estudados, sendo que dentre as localidades positivas 46 (82,1%) pertenciam ao estado do Amazonas.

No Amazonas, diversos estudos foram publicados com dados a respeito da patogenia, sintomatologia e prevalência ao longo dos rios Solimões, Purus, Negro (BASANO et al., 2011; MEDEIROS et al., 2014; VERA et al., 2011) e Tefé (MEDEIROS et al., 2012).

No rio Purus, Adami e Maia-Herzog (2008) demonstraram que 85,7% dos pacientes analisados estavam infectados com *M. ozzardi*, os quais alegavam ter sintomas como dor de cabeça, dor nas articulações e mal estar generalizado. E, Adami e colaboradores (2014) verificaram que 18,3% (65/355) dos participantes estavam infectados, e destes a maior frequência (24,3%) foi no grupo de indivíduos com ocupações desempenhadas fora de casa. Além desses estudos, Medeiros e colaboradores (2009a, 2009b) estimaram prevalência de 24,8% para indivíduos do município de Pauini e 27,3% para o município de Boca do Acre (AM), sendo que em

ambos os estudos os homens e os indivíduos com ocupações como aposentadoria e agricultura foram os mais acometidos pela infecção. Não obstante, relataram que a infecção se torna mais prevalente com o avanço da idade, proporcionalmente a exposição ao vetor.

No rio Solimões, especificamente no município de Coari (AM), há relatos que demonstram prevalências de 18,9%, 13,3% e 26,4% nos anos de 2008, 2010 e 2012, respectivamente (COHEN; RIBEIRO; MARTINS, 2008; MARTINS et al., 2010; VIANNA et al., 2012). No município de Lábrea (AM), nos anos de 2008 e 2011 encontraram prevalências de 30,2% e 20,7%, respectivamente (MEDEIROS et al., 2008; MEDEIROS, Py-DANIEL; BARBOSA, 2011). E, no município de Tefé (AM), foram relatadas prevalências de 6,3% em 2012 e de 13,5% em 2014 (MEDEIROS et al., 2012; MEDEIROS et al., 2014). Esses estudos observaram que a prevalência de infecção por *M. ozzardi* aumenta com a idade em ambos os sexos, e que essa infecção costuma ser mais frequente em indivíduos que tem maior exposição ao vetor e em indivíduos do sexo masculino (COHEN; RIBEIRO; MARTINS, 2008; MARTINS et al., 2010; MEDEIROS et al., 2008; MEDEIROS et al., 2012; MEDEIROS, Py-DANIEL; BARBOSA, 2011; VIANNA et al., 2012;). Entretanto, o trabalho de Medeiros e colaboradores (2014) demonstrou maior prevalência no sexo feminino.

Em 1981, no município de Lábrea (AM), Tavares relatou que dentre o grupo de indivíduos positivos, os sintomas mais frequentes foram dor nas articulações, frieza nas pernas e dor de cabeça. Além desses sintomas, um estudo realizado por Batista (1960), no município de Codajás (AM), observou que pacientes infectados por *M. ozzardi* também podem apresentar sintomas como placas avermelhadas e adenites. Até o presente momento, os estudos demonstraram sintomatologia semelhante as descritas por Batista (1960) e Tavares (1981) em pacientes positivos.

A infecção por *M. ozzardi*, antigamente, acometia principalmente indivíduos ribeirinhos e residentes em áreas rurais, no entanto, Martins e colaboradores (2010), no município de Coari (AM), demonstraram prevalências semelhantes entre a área rural e urbana (MARTINS et al., 2010).

Além do estado do Amazonas, a *M. ozzardi* também é encontrada nos estados de Rondônia (RACHOU, 1957), Roraima e Mato Grosso (MARTINS et al., 2010; VIANNA et al., 2012).

A infecção por *M. ozzardi* apresenta prevalências mais altas entre indivíduos do sexo masculino com idade igual ou superior a 40 anos, e que desempenham suas ocupações fora de casa (MARTINS et al., 2010; MEDEIROS et al., 2014; MEDEIROS; Py-DANIEL; BARBOSA, 2011).

A *M. perstans* é encontrada em regiões tropicais da América Latina e em 33 países da África (GEHRINGER et al., 2014; KEISER et al., 2008; MOUREMBOU et al., 2015; MULLER, 2002; SIMONSEN; ONAPA; ASIO, 2011), e estima-se que cerca de 114 milhões de pessoas residentes em países africanos estejam infectadas por *M. perstans* (SIMONSEN; ONAPA; ASIO, 2011). E, até o presente não há relatos consistentes que indiquem a ocorrência de *M. perstans* no Brasil (ADAMI; BANIC; MAIA-HERZOG, 2014).

No Gabão, Bouyou-Akotet e colaboradores (2014), demonstram 36,0% de prevalência de *M. perstans*, com os pacientes apresentando hipereosinofilia. E, em 2011, Akue e colaboradores demonstraram 10,2% de prevalência de *M. perstans*, com os indivíduos do sexo masculino e caçadores sendo os mais acometidos, e prevalências aumentando com a idade.

No Uganda, Stensgaard e colaboradores (2016) investigaram infecção por *M. perstans* em crianças, e detectaram prevalências variando de 0,4% a 72,8%, e ao compararem os grupos etários, notaram que o grupo etário com maior faixa etária foi o mais acometido.

As áreas rurais, são as que apresentam maior prevalência da infecção, porém essa infecção já tem sido relatada em áreas urbanas e peri-urbanas (SIMONSEN; ONAPA; ASIO, 2011). As maiores prevalências são encontradas entre indivíduos adultos do sexo masculino (MOUREMBOU et al., 2015; SIMONSEN; ONAPA; ASIO, 2011).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ÁREA DE ESTUDO: SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA

O projeto foi realizado no município de São Gabriel da Cachoeira, que está localizado ao noroeste do Estado do Amazonas, na margem esquerda do Rio Negro, com uma área total de 109.183,434 km² (IBGE, 2010). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), São Gabriel da Cachoeira apresentava em 2010 uma estimativa populacional de 37.896 habitantes, sendo 19.054 da área urbana e 18.842 da rural, já em 2015, o IBGE estimou a população de São Gabriel da Cachoeira em 43.094 habitantes. (IBGE, 2015).

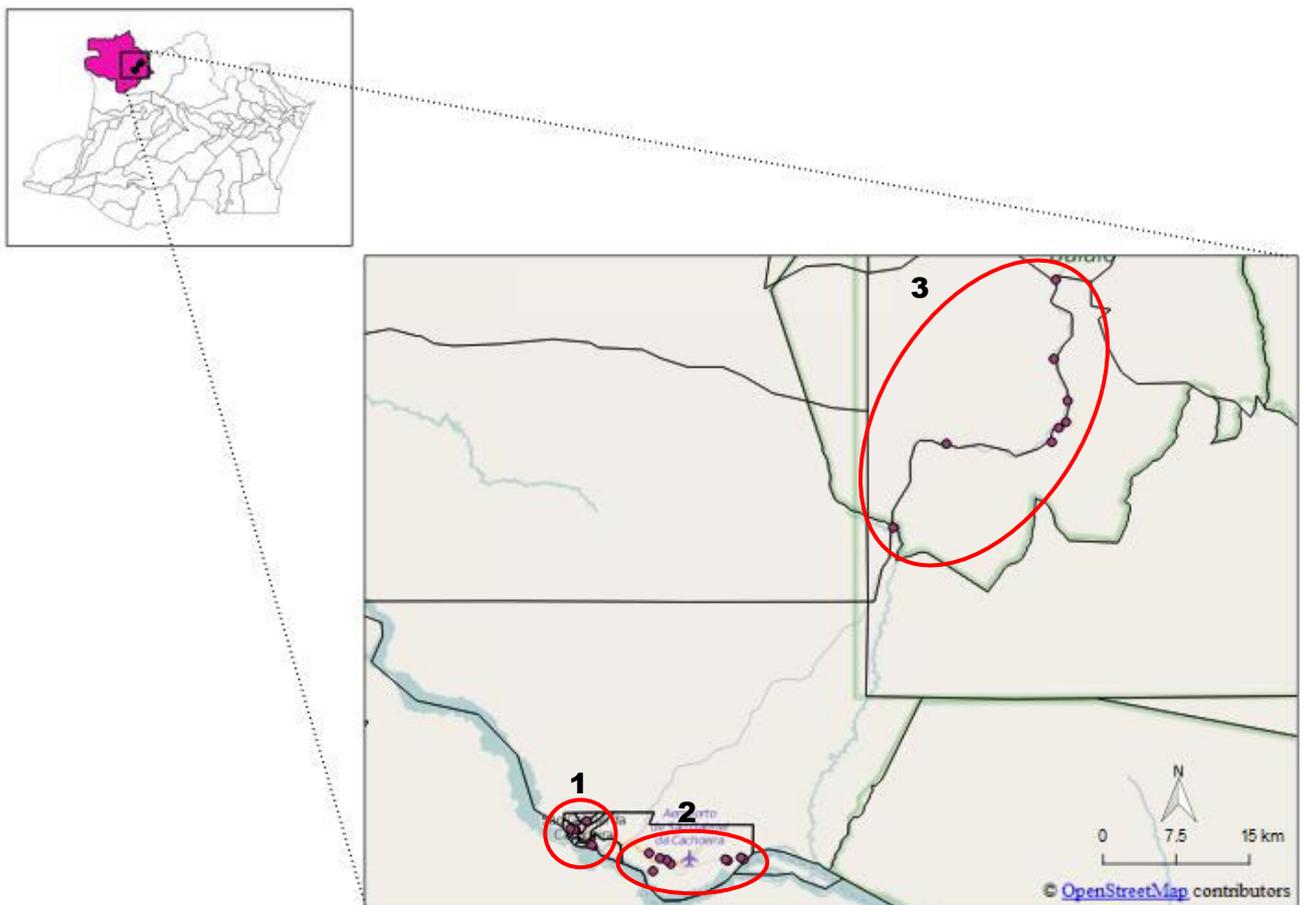


Figura 6 - Mapa do Estado do Amazonas, com o município de São Gabriel da Cachoeira em destaque e com pontos onde foram realizadas as coletas. Demarcações mostram as três áreas subdivididas (1- área 1, 2- área 2 e 3- área 3)

Fonte: IBGE, modificado.

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).

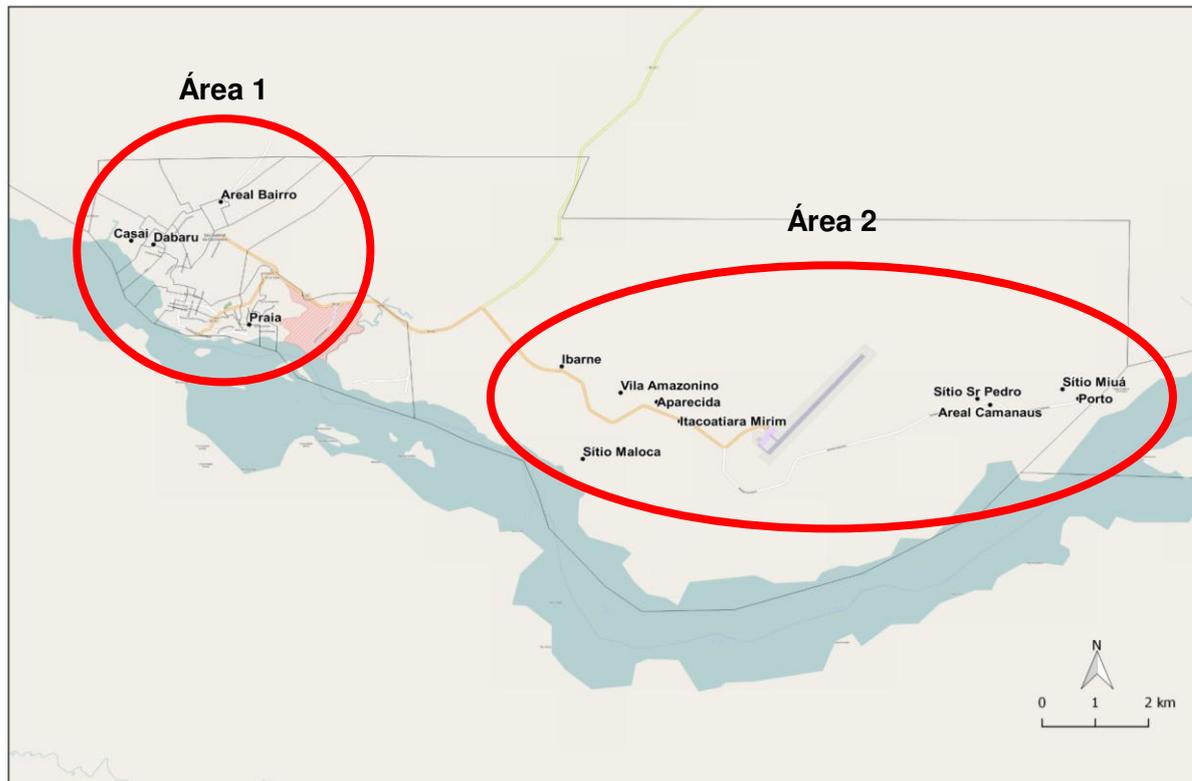


Figura 7 - Mapa com demarcações de bairros estudados na área 1, e das comunidades estudadas na área 2

Fonte: IBGE, modificado.



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

5.2 AMOSTRAGEM

A amostragem foi obtida por conveniência. O tamanho amostral foi baseado na população urbana do município com base no censo IBGE (2010), e calculado no *software R* (R Development Core Team, 2015). Como não existem 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.

CrITÉRIOS de inclusão: Indivíduos maiores de 2 anos de idade, de ambos os sexos, residentes no município e que concordaram em participar do estudo.

5.3 COLETA DAS AMOSTRAS

As coletas foram realizadas nas Unidades Básicas de Saúde (UBSs) dos bairros Praia, Dabaru, Areal e na Casa de Saúde Indígena (CASAI), e nas

comunidades: Ibarne, Vila Amazonino, Sítio Maloca, Aparecida, Itacoatiara Mirim, Sítio Sr. Pedro, Areal, Sítio Miuá, Porto, Sagrada Família, Poranga, Tukano, Parintins, Sítio Sozinho, Ya Mirim, Rodrigo Cibebe e Balaio.

Todas as atividades de coleta foram acompanhadas e tiveram o apoio das equipes de cada uma das UBSs citadas acima, e também de uma equipe, do Distrito Sanitário de Saúde Indígena (DSEI), responsável pelas regiões de estradas do município.

Primeiramente, os indivíduos foram abordados e convidados a participar da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A), em seguida foi aplicado um questionário estruturado, onde constavam itens como: número de identificação, nome do candidato amostrado, ocupação, sexo, idade, local de nascimento, origem e dados epidemiológicos, referentes às doenças tropicais como filariose, malária, dengue, leishmaniose entre outros, e também se o indivíduo realizou algum tratamento nos últimos dois anos (Anexo B).



Figura 9 - Aplicação de TCLE e questionário
Fonte: Própria

Para coleta de sangue em papel de filtro, utilizou-se o Whatman™ FTA *Classic Card* (GE Healthcare Whatman, Cat. no. WB1202205, Whatman International Ltd, Piscataway, NJ, USA)¹, sendo que tal material biológico fora obtido através da polpa digital do paciente, e armazenado em temperatura de geladeira

¹Este papel de filtro é indicado para coletas de amostras visando extração de ácidos nucléicos e posterior análises moleculares, podendo-se armazená-los em temperatura ambiente. Possui em sua composição substâncias químicas que lisam as membranas celulares e desnaturam proteínas, além de possuir conservantes de ácidos nucléicos.

(4°C a 8°C) até a chegada ao Laboratório Multiusuário do Instituto Leônidas e Maria Deane da Fundação Oswaldo Cruz (ILMD/FIOCRUZ Amazônia), em Manaus, onde permaneceram sendo armazenados nas mesmas condições até o início das análises.

O sangue obtido por punção digital também foi utilizado para confecção das lâminas de gota espessa, com volume aproximado de 60 µL de sangue cada gota.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS PARASITAS

5.4.1 Diagnóstico microscópico

As 497 lâminas de gota espessa, após desmembradas com azul de metileno e coradas com eosina-Giemsa, posteriormente, foram examinadas no microscópio óptico LEICA DMLB. A identificação da espécie segundo as características divulgadas por Post e colaboradores (2003), e a quantificação foram realizadas nas lâminas positivas, e as imagens foram registradas através de uma câmera digital JVC, modelo KY-F55BE.

5.4.2 Diagnóstico molecular

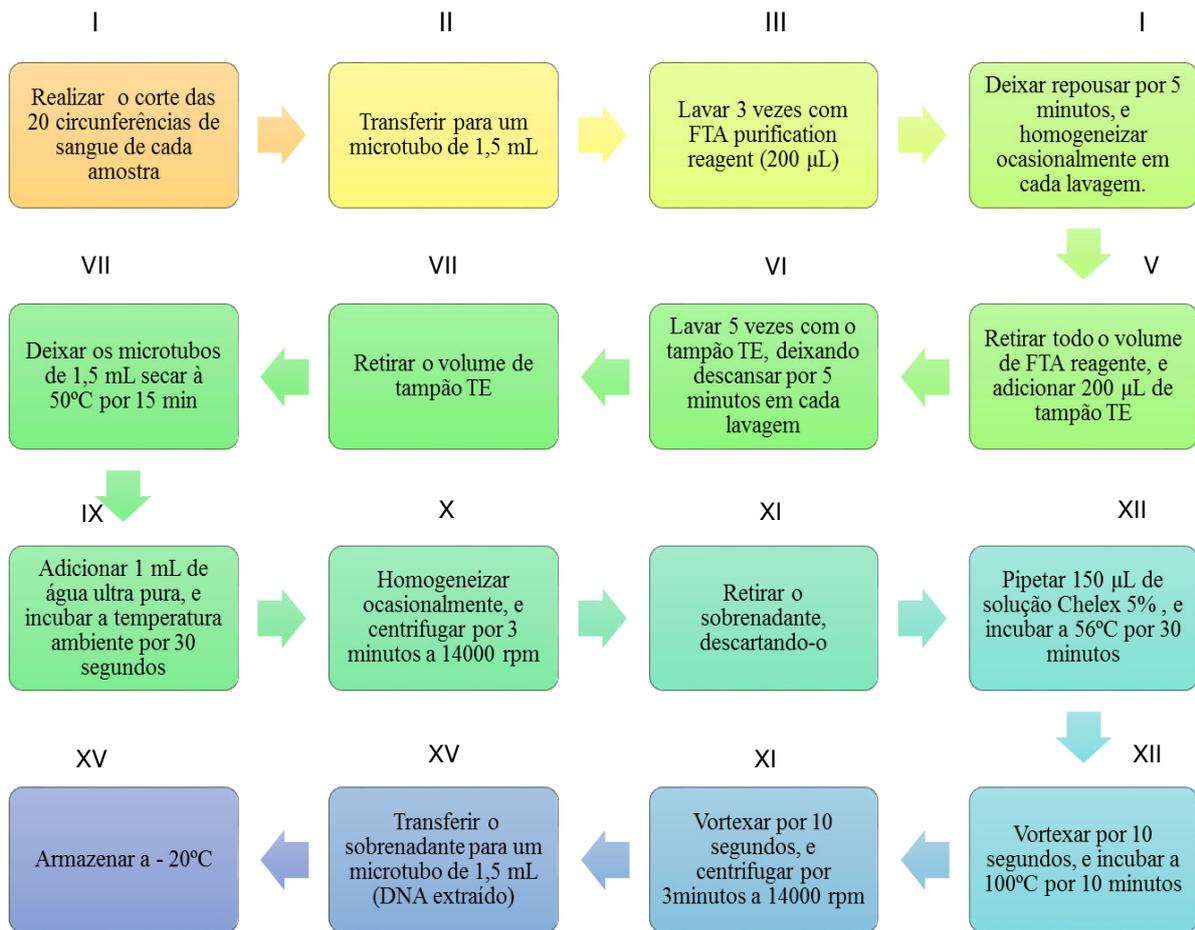
5.4.2.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA total a partir de sangue impregnado em papel de filtro, retirou-se os papéis de filtro da geladeira, e os mesmos foram deixados à temperatura ambiente, por cerca de 30 minutos, seguindo todas as etapas descritas por Medeiros et al, 2015.

Em cada papel de filtro foram realizados 20 cortes homogêneos, em circunferência de 1,2 mm de diâmetro, correspondendo aproximadamente à quantidade de amostra obtida por punção digital para técnica clássica de gota espessa. Este procedimento foi feito com auxílio de uma ferramenta denominada Harris® *micro-punch* (GE Healthcare Whatman, Cat. no. WB100005, Whatman International Ltd, Piscataway, NJ, USA) com ponta de corte de 1,2mm de diâmetro.

Entre uma amostra e outra, a ferramenta foi submetida à limpeza com álcool a 70%, coletando e desprezando 20 circunferências de 1,2 mm de diâmetro de papel de filtro sem sangue impregnado visando uma melhor higienização da ferramenta, e buscando evitar uma possível contaminação cruzada.

O processo de extração propriamente dito foi realizado seguindo o protocolo utilizado por Medeiros et al., 2015, como mostrado na Figura 10.



*A pinça foi limpa com álcool 70%.

Figura 10 - Fluxograma do procedimento de extração de DNA total de sangue impregnado em papel de filtro, utilizando o *FTA purification reagent* mais *CHELEX 5%*
Fonte: Própria

Vale ressaltar que as etapas de II à VIII foram feitas seguindo as instruções do fabricante, utilizando-se o *FTA® purification reagent* (Cat. no. WB, Whatman International Ltd, Piscataway, NJ, USA), e a etapa IX em diante, foram realizadas seguindo um protocolo que utiliza a solução de *CHELEX® 5%* (Sigma Prod. no. C7901, 3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA).

5.4.2.2 *Nested* PCR (“FnPCR”)

A técnica molecular utilizada foi a *Nested* PCR para filárias (“FnPCR”), a qual foi descrita por TANG et al., 2010, e baseia-se em duas reações de PCR acopladas.

Cada conjunto de amostras foi processado em paralelo com controles positivos (DNA extraído de amostra positiva para *M. ozzardi*), controle negativo (DNA extraído de amostra sabidamente negativa para filárias) e controles brancos (de 1ª PCR e de 2ª PCR, não contendo amostra, e sim água ultra pura em substituição da amostra).

A sequência dos iniciadores utilizados na técnica de FnPCR estão descritas no Quadro 1 e os tamanhos dos *amplicons* que gerados no Quadro 2.

Cada 50 µL da solução de reação de 1ª e 2ª PCR foram preparados utilizando-se os reagentes e suas concentrações finais, conforme descrito no Quadro 3.

Iniciadores	
1ª PCR	
Iniciadores utilizados	Sequência 5' – 3'
JM-F-0021-F largo	GTGCTGTAACCATTACCGAAAGG
JM-U-0022-R largo	CGCAGCTAGCTGCGTTCTTCATCG
2ª PCR	
ITS1-F	GGTGAACCTGCGGAAGGATC
ITS-F BIS	GGTGAACCTGCRGMWGGATC ^a
JM-F-0022-R corto	TGCTTATTAAGTCTACTTAA

Quadro 1 - Nome dos iniciadores utilizados para amplificação das sequências de DNA de *Mansonella* spp. na 1ª e 2ª PCR

^aNucleotídeo degenerado: “W” = T (timina) ou C (citosina).

Fonte: TANG et al., 2010.

Amplicons	
1ª PCR	
Espécie	Amplicon
<i>Mansonella ozzardi</i>	744pb
<i>Mansonella perstans</i>	749pb
<i>Onchocerca volvulus</i>	782pb
<i>Loa loa</i>	722pb
<i>Wuchereria bancrofti</i>	741pb
<i>Brugia malayi</i>	774pb
2ª PCR	
Espécie	Amplicon
<i>Mansonella ozzardi</i>	305pb
<i>Mansonella perstans</i>	312pb
<i>Onchocerca volvulus</i>	344pb
<i>Loa loa</i>	286pb
<i>Wuchereria bancrofti</i>	301pb
<i>Brugia malayi</i>	324pb

Quadro 2 - Tamanho dos *amplicons* gerados com produto da 1ª e da 2ª PCR, para detecção de *Mansonella* spp.
 Fonte: TANG et al., 2010.

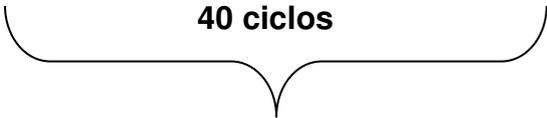
1ª PCR	
Reagente	Concentração final
Tampão (Flexi Buffer – Green)	1X
MgCl ₂	2mM
dNTP	0,2mM
JM-F-0021-F largo	0,5µM
JM-U-0022-R largo	0,5µM
<i>Taq</i> DNA polimerase	1,25U
Água ultrapura	q.s.p 50,0µL
DNA extraído	5,0µL
2ª PCR (Nested)	
Reagente	Concentração final
Tampão (Flexi Buffer – Green)	1X
MgCl ₂	2mM
dNTP	0,2mM
ITS-1 F	0,025µM
ITS-F BIS	0,025µM
JM-F-0022-R corto2	0,050µM
<i>Taq</i> DNA polimerase	1,25U
Água ultrapura	q.s.p 50,0µL
<i>Amplicon</i> 1ª PCR diluído 1:10	5,0µL

Quadro 3 - Concentração final de cada reagente utilizado na preparação do *mix* de 1ª e 2ª PCR
 Fonte: TANG et al., 2010.

As etapas de termociclagem foram realizadas no termociclador *GeneAmp Thermal Cycler 9700* (Applied Biosystems, 639033413), seguindo as condições térmicas e de tempo explicitadas nos Quadros 4 e 5.

1ª PCR						
Temperatura	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	4°C
Tempo	7 minutos	20 segundos	20 segundos	30 segundos	10 minutos	∞

40 ciclos



Quadro 4 - Condições de termociclagem para 1ª PCR para obtenção de *amplicons* de *Mansonella* spp.
Fonte: TANG et al., 2010.

2ª PCR						
Temperatura	94°C	94°C	50°C	72°C	72°C	4°C
Tempo	5 minutos	20 segundos	20 segundos	20 segundos	10 minutos	∞

35 ciclos



Quadro 5 - Condições de termociclagem para 2ª PCR para obtenção de *amplicons* de *Mansonella* spp.
Fonte: TANG et al., 2010.

5.4.2.3 Análise dos *amplicons*

Os produtos (*amplicons*) da 1ª e 2ª PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0%, corado com 3µL brometo de etídio a 10µg/mL a cada 100mL de gel, visualizando-se e captando-se imagem do mesmo no fotodocumentador LPIX *Molecular Imaging* (Loccus Biotecnologia). O tampão de corrida utilizado foi o TAE (Tris-acetato-EDTA) na concentração de 1X e a eletroforese foi realizada na cuba

horizontal LCH-13cm x 15cm (Loccus Biotecnologia), pentes de 1,5mm de espessura, nas seguintes condições de corrida: 100V por uma hora e vinte minutos.

Foram consideradas positivas para *Mansonella* spp., as amostras que apresentaram bandas com boa resolução, no tamanho aproximado de 305/312pb, e tais resultados foram aceitos mediante validação via controles branco com resultado negativo, controles positivos com resultados positivos e controles negativos com resultados negativos.

5.4.2.4 Purificação e quantificação

Após a etapa de amplificação, foi realizada a purificação das amostras consideradas positivas, utilizando-se o Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System purification kit (Promega Corporation, #A9282, Milan, Italy), seguindo as etapas do protocolo mostrado na Figura 11.

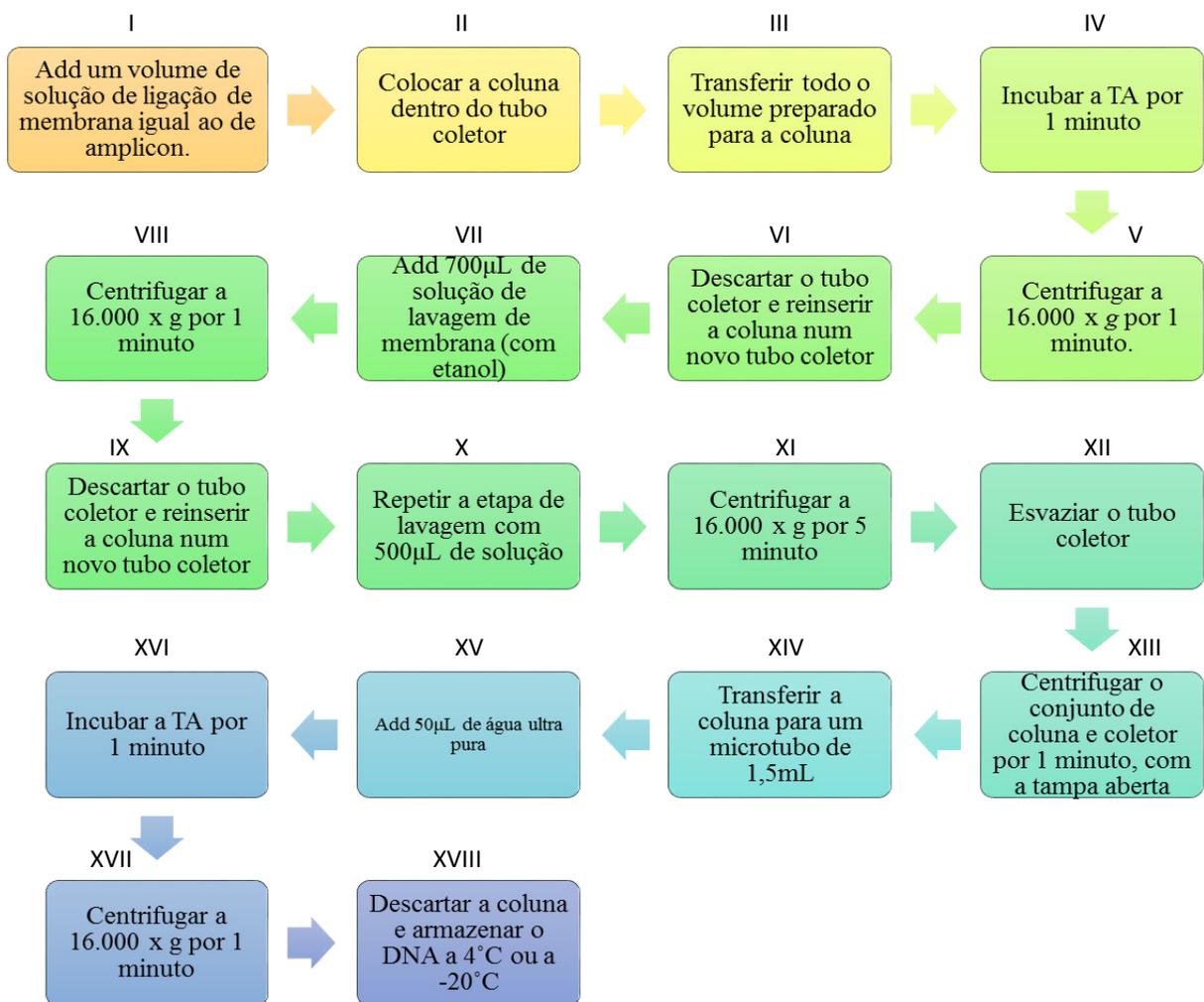


Figura 11 - Fluxograma do procedimento de purificação de DNA por coluna
Fonte: Própria

Após o processo de purificação, foi realizada a etapa de quantificação das amostras, através do espectrofotômetro do tipo Biodrop Duo UV-Vis (BioDrop Ltd, #80300661, South San Francisco, CA 94080 USA), iniciando-se com uma amostra considerada como controle branco, seguido pela quantificação da metade das amostras positivas, intercalando com um controle branco, e por fim a quantificação da segunda metade das amostras.

Todas as respectivas concentrações foram devidamente registradas, e as amostras que foram selecionadas para serem sequenciadas encontram-se destacadas no quadro abaixo:

ID	Quantificação	ID	Quantificação	ID	Quantificação
4	33,05	160	30,71	656	22,08
6	34,58	164	26,72	657	24,15
7	30,66	170	31,85	662	28,42
8	33,13	171	30,89	700	24,55
11	33,24	172	27,02	705	23,98
24	33,92	173	29,28	708 FG	24,69
25	27,16	174	25,67	708 MJ	26,33
50	32,98	176	20,44	710	23,78
52	33,37	177	31,76	712	20,45
60	31,95	181	26,74	720	21,26
61	31,88	188	26,73	721	23,92
84	31,24	190	33,18	723	27,34
99	33,7	194	31,79	728	20,18
100	29,66	199	24,52	735	27,04
112	27,29	200	23,84	739	31,06
113	22,43	205	25,35	740	33,19
118	33,15	218	27,51	760	30,06
130	34,09	220	29,08	763	32,45
131	28,4	226	25,6	769	23,19
136	32,51	248	27,23	776	22,39
139	34,72	251	26,15	781	20,96
140	26,36	264	27,05	783	25,19
154	34,81	524	24,58	786	22,32
155A	31,61	525	23	787	20,62
155K	27,91	616	22,11	791	28,15
157	28,18	653	20,5	798	24,49
159	27,04	654	22,98	801	29,87

Quadro 6 - Quantificação das amostras consideradas positivas após eletroforese em gel de agarose
Fonte: Própria.

5.4.2.5 Sequenciamento

O sequenciamento genético foi realizado a partir dos produtos obtidos pelas reações de amplificação por PCR, os quais foram submetidos à reação de purificação pelo kit de purificação Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (PROMEGA) seguindo as recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas pela Rede de Plataformas Tecnológicas – PDTIS, unidade [RPT01A] Sequenciamento de DNA - RJ. Por fim, as sequências de DNA foram obtidas através do sequenciador automatizado ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems®), utilizando kit para sequenciamento BigDye® v3.1 adotando-se, novamente, as recomendações do fabricante.

5.5 ANÁLISES DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Todas as informações coletadas foram tabuladas e armazenadas em um banco de dados, utilizando-se planilhas eletrônicas do *EXCEL*.

As análises estatísticas (teste exato de *Fisher* e frequência de casos) foram realizadas com a utilização do *software R 3.2.3*, sendo considerada estatística significativa uma margem de erro de 5% ($p < 0,05$). E, os dados obtidos através do processo de sequenciamento foram analisados utilizando o *Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Mega®) software 6.0.6*, onde foi possível a comparação do sequenciamento da região ITS-1 do DNA ribossomal com sequências equivalentes disponíveis no banco de genes.

5.6 ANÁLISES DAS AMOSTRAS SEQUENCIADAS

As sequências consensos foram obtidas a partir da correspondência entre as sequências senso e anti-senso do gene ITS1, e em seguida foram alinhadas com auxílio dos *softwares* Lasergene SeqMan v7.0.0 (DnaStar2006) e BioEdit, respectivamente. E, para assegurar que todas as sequências obtidas eram do gene ITS1, pesquisas no BLAST foram realizadas.

As sequências foram agrupadas para realização de análises filogenéticas baseadas em distâncias genéticas utilizando o modelo de Tamura-Nei (TAMURA & NEI. 1993) e produção de diagramas baseados em Maximum-Likelihood. Por fim, as sequências serão depositadas nas bases públicas de dados moleculares (GeneBank, EMBL, BOLD).

5.7 PROJETO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo é do tipo observacional transversal, e foi composto por indivíduos que concordaram em participar do projeto, e assinaram o termo de consentimento

livre e esclarecido, ficando de posse de uma via do termo. Para os indivíduos menores de idade, seus responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O termo de consentimento livre e esclarecido foi lido para o paciente ou responsável que não sabia ler. Os pacientes não foram submetidos a riscos adicionais àqueles necessários à coleta de sangue por punção digital, a qual não ocasionou nenhum dano aos participantes. Nenhum paciente optou por interromper a sua participação no estudo, e todos os pacientes que apresentaram doença filarial foram encaminhados para o sistema de saúde do município para realizarem o tratamento, com medicamentos cedidos pelo projeto de pesquisa. As informações obtidas dos resultados do projeto serão apresentadas em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a identidade do paciente.

6 RESULTADOS

Foram coletadas 497 amostras em lâmina de gota espessa e 497 de sangue impregnado em papel de filtro, de indivíduos residentes no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas.

6.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Todas as amostras de sangue em papel de filtro foram obtidas simultaneamente com lâminas de gota espessa.

Foi realizada a leitura de 497 lâminas de gota espessa, das quais 39 (7,9%) foram consideradas positivas devido a presença de microfilária de *M. ozzardi* (Tabela 1).

Dos 497 indivíduos que participaram do estudo, 26 (5,3%) eram do sexo masculino e 13 (2,6%) do sexo feminino, com diferença estatística significativa ($p=0.007$), conforme demonstra a tabela 1.

A área 1 foi composta por 247 indivíduos residentes nos bairros da Praia, Dabaru, Areal e Casai, dos quais 13 (5,3%) apresentaram resultado positivo, através de leitura de gota espessa, sendo 9 (3,6%) do sexo masculino e 4 (1,7%) do sexo feminino (Tabela 2).

A área 2 foi constituída por 105 indivíduos residentes em comunidades distintas, localizadas na estrada de Camanaus (Ibarne, Vila Amazonino, Sítio Maloca, Aparecida, Itacoatiara Mirim, Sítio Sr. Pedro, Areal, Sítio Miuá, Porto), destes 14 (13,3%) foram positivos por gota espessa, sendo 10 (9,5%) do sexo masculino e 4 (3,8%) do sexo feminino (Tabela 2).

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 12 (8,3%) estavam infectados por *M. ozzardi*, sendo 7 (4,8%) do sexo masculino e 5 (3,5%) do sexo feminino (Tabela 2).

As 39 lâminas positivas foram quantificadas e tiveram uma variação de 1 a 219 parasitas por lâmina, sendo destes 13 (33,3%) eram provenientes da área 1, 14 (35,9%) da área 2 e 12 (30,8%) da área 3. Na área 1, a maior parasitemia encontrada foi de 86 microfilárias, e a segunda maior foi 9 microfilárias. Na área 2, a

maior parasitemia correspondeu a lâmina com 219 microfilárias, seguida pela lâmina com 98 microfilárias. E, na área 3, as maiores parasitemias foram 16 e 15 microfilárias, respectivamente (Tabela 3).

Dentre os 39 pacientes positivos por leitura de lâmina de gota espessa, 28 (71,8%) apresentaram entre 1 e 11 microfilárias por lâmina, distribuídos nas áreas 1, 2 e 3.

Os indivíduos positivos apresentaram lâminas com 12, 15, 16, 19, 43, 56, 77, 86, 98 e 219 microfilárias. Apenas os pacientes com 12, 15, 16 e 86 microfilárias não residiam na área 2, sendo que os pacientes que apresentaram 12, 15 e 16 microfilárias por lâmina residiam na área 3 e o paciente com 86 microfilárias por lâmina residia na área 1 (Tabela 3).

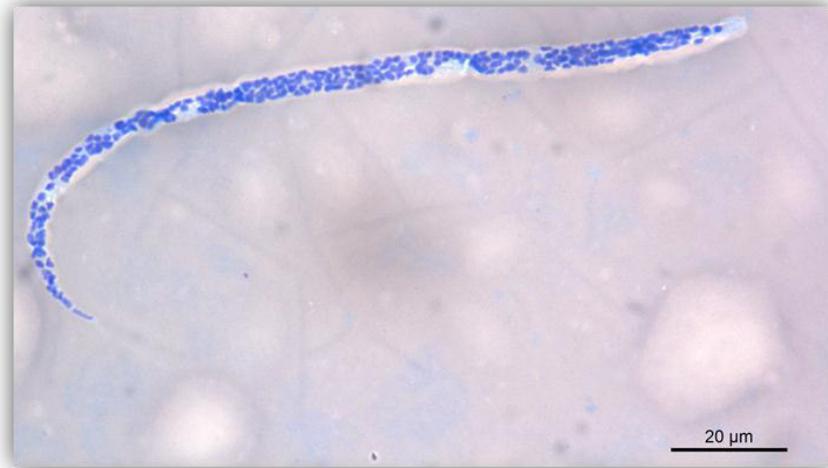


Figura 12 - Microfilária de *Mansonella ozzardi*
Fonte: Própria

Tabela 1 - Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, obtida através de leitura de gota espessa, no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)

Variável	Números absolutos			% Frequência			P
	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total	
Resultado da lâmina							0.007*
Positivo	26	13	39	5,3	2,6	7,9	
Negativo	197	261	458	39,6	52,5	92,1	
Total	223	274	497	44,9	55,1	100,0	

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

Tabela 2 - Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, obtida através de leitura de gota espessa, 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 da lâmina - Área 1				0.080
Positivo	9 (3,6%)	4 (1,7%)	13 (5,3%)	
Negativo	97 (39,3%)	137 (55,4%)	234 (94,7%)	
Total	106 (42,9%)	141 (57,1%)	247 (100,0%)	
Resultado da lâmina - Área 2				0.043*
Positivo	10 (9,5%)	4 (3,8%)	14 (13,3%)	
Negativo	37 (35,3%)	54 (51,4%)	91 (86,7%)	
Total	47 (44,8%)	58 (55,2%)	105 (100,0%)	
Resultado da lâmina - Área 3				0.553
Positivo	7 (4,8%)	5 (3,5%)	12 (8,3%)	
Negativo	63 (43,5%)	70 (48,2%)	133 (91,7%)	
Total	70 (48,3%)	75 (51,7%)	145 (100,0%)	

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

Tabela 3 – Parasitemia dos 39 indivíduos positivos através de leitura de lâmina de gota espessa, das áreas 1, 2 e 3 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)

Variável	Número de participantes				% Frequência			
	Área 1	Área 2	Área 3	Total	Área 1	Área 2	Área 3	Total
Microfilárias/lâmina								
1	6	2	2	10	15,4	5,1	5,1	25,6
2	2	2	2	6	5,1	5,1	5,1	15,4
3	1	0	1	2	2,6	0,0	2,6	5,1
5	0	2	2	4	0,0	5,1	5,1	10,3
6	1	0	0	1	2,6	0,0	0,0	2,6
9	2	1	1	4	5,1	2,6	2,6	10,3
11	0	1	0	1	0,0	2,6	0,0	2,6
12	0	0	1	1	0,0	0,0	2,6	2,6
15	0	0	1	1	0,0	0,0	2,6	2,6
16	0	0	2	2	0,0	0,0	5,1	5,1
19	0	1	0	1	0,0	2,6	0,0	2,6
43	0	1	0	1	0,0	2,6	0,0	2,6
56	0	1	0	1	0,0	2,6	0,0	2,6
77	0	1	0	1	0,0	2,6	0,0	2,6
86	1	0	0	1	2,6	0,0	0,0	2,6
98	0	1	0	1	0,0	2,6	0,0	2,6
219	0	1	0	1	0,0	2,6	0,0	2,6
Total	13	14	12	39	33,3	35,9	30,8	100,0

6.2 ANÁLISE MOLECULAR

Foram analisadas 497 amostras de sangue impregnado em papel de filtro, das quais 81 (16,3%) demonstraram resultado positivo para *M. ozzardi*, destes 50 (10,1%) pertenciam ao sexo masculino e 31 (6,2%) ao sexo feminino, com diferença estatística significativa ($p=0.001$), conforme elucidada na tabela 4.

Dos 247 participantes residentes na área 1, 37 (15,0%) apresentaram resultados positivos para infecção por *M. ozzardi*, sendo 21 (8,5%) do sexo masculino e 16 (6,5%) do sexo feminino (Tabela 5).

Na área 2, dos 105 indivíduos que aceitaram participar do estudo, 20 (19,0%) foram positivos por análise molecular, sendo 12 (11,4%) do sexo masculino e 8 (7,6%) do sexo feminino (Tabela 5).

Dos 145 indivíduos domiciliados na área 3, 24 (16,5%) estavam infectados por *M. ozzardi*, sendo 17 (11,7%) do sexo masculino e 7 (4,8%) do sexo feminino, com diferença estatística significativa ($p=0.024$), conforme demonstra a tabela 5.

Tabela 4 - 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 ($p<0,05$)

Tabela 5 - 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 ($p<0,05$)

6.3 ANÁLISE MOLECULAR *versus* ANÁLISE MICROSCÓPICA

Dos 497 indivíduos analisados, observou-se que as frequências obtidas através da FnPCR tiveram uma variação entre 15,0% e 19,0%, e através da técnica de gota espessa entre 5,3% e 13,3% (Tabela 6).

A área 1 apresentou frequências de 15,0% e 5,3% para FnPCR e gota espessa, respectivamente. Na área 2, a FnPCR apresentou 19,0% e a gota espessa 13,3%. E, na área 3 a maior frequência (16,6%) foi obtida através FnPCR e a menor (8,3%) pela gota espessa (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação das prevalências, obtidas através das duas metodologias propostas, entre as áreas 1, 2, 3 e a amostragem geral

Variável	Área 1	Área 2	Área 3	Total
Frequência				
FnPCR de Papel de filtro	15,0% (37/247)	19,0% (20/105)	16,6% (24/145)	16,3% (81/497)
Gota espessa	5,3% (13/247)	13,3% (14/105)	8,3% (12/145)	7,9% (39/497)

6.4 ANÁLISE DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os 497 indivíduos analisados tinham entre 2 e 90 anos de idade, dos quais 46 (9,3%) estavam na faixa de 0 a 10 anos, 91 (18,3%) estavam entre 11 e 20 anos, 73 (14,7%) entre 21 e 30 anos, 76 (15,3%) entre 31 e 40 anos, 69 (13,9%) entre 41 e 50 anos, 128 (25,7%) estavam com 51 ou mais anos, e 14 (2,8%) não informaram a idade durante o preenchimento do questionário (Tabela 7).

Do total de indivíduos participantes, 274 (55,1%) pertenciam ao sexo feminino e 223 (44,9%) ao sexo masculino, com o sexo masculino apresentando uma frequência de 22,4% de casos positivos e o sexo feminino de 11,3% de casos positivos (Tabela 7).

O grupo de indivíduos com idade igual ou superior a 51 anos obteve a maior taxa de infecção (32,8%), e o grupo de 0 a 10 anos a menor taxa de infecção (0,0%), em ambos os sexo (Tabela 7).

Os participantes estavam divididos em: 239 (48,1%) agricultores, 20 (4,0%) aposentados, 23 (4,6%) donas de casa, 132 (26,6%) estudantes, 20 (4,0%)

funcionários públicos, 39 (7,9%) outros serviços e 24 (4,8%) não informaram sua ocupação (Tabela 8).

A aposentadoria foi a ocupação mais frequente entre os indivíduos infectados (30,0%), sendo 57,1% de homens e 15,4% de mulheres, seguida pela agricultura com 25,5%, sendo 30,7% de homens e 20,8% de mulheres, conforme elucida a tabela 8.

Dos sintomas auto declarados pelos 497 participantes do estudo, houve diferença estatística significativa para dores no corpo ($p < 0.001$), dores nas articulações ($p < 0.001$), calafrios ($p = 0.010$) e tonturas ($p = 0.002$), conforme demonstra a tabela 9.

Tabela 7 - Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, por gênero e idade, no município São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)

Grupo etário	Postivos/ Examinados			% Frequência			p
	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total	
0-10	0/22	0/24	0/46	0,0	0,0	0,0	1.000
11-20	5/35	2/56	7/91	14,3	3,6	7,7	0.103
21-30	4/32	3/41	7/73	12,5	7,3	9,6	0.692
31-40	3/32	8/44	11/76	9,4	18,2	14,5	0.335
41-50	8/36	4/33	12/69	22,2	12,1	17,4	0.348
> = 51	29/60	13/68	42/128	48,3	19,1	32,8	<0.000*
Não informaram a idade	1/6	1/8	2/14	16,7	12,5	14,3	1.000
Total	50/223	31/274	81/497	22,4	11,3	16,3	-

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

Tabela 8 - Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, por ocupação e gênero, no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)

Ocupação	Postivos/ Examinados			% Frequência			p
	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total	
Agricultor	35/114	26/125	61/239	30,7	20,8	25,5	0.102
Aposentado	4/7	2/13	6/20	57,1	15,4	30,0	0.122
Dona de casa	0/0	1/23	1/23	0,0	4,3	4,3	1.000
Estudante	6/56	1/76	7/132	10,7	1,3	5,3	0.041*
Funcionário Público	1/13	0/7	1/20	7,7	0,0	5,0	1.000
Outros serviços	1/22	1/17	2/39	4,5	5,9	5,1	1.000
Sem informação	3/11	0/13	3/24	27,3	0,0	12,5	0.062
Total	50/223	31/274	81/497	22,4	11,3	16,3	-

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

Tabela 9 - Comparação dos sintomas clínicos entre pacientes infectados e não infectados por *Mansonella ozzardi* no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)

Sintomas Clínicos	Amostrado Individual				p
	Indivíduo positivo para M.O (n= 81)	%	Indivíduo negativo para M.O (n= 416)	%	
Febre	35	43,2	142	34,1	0.129
Dor no corpo	55	67,9	181	43,5	< 0.001*
Dor de cabeça	52	64,2	232	55,8	0.178
Dor nas articulações	49	60,5	164	39,4	< 0.001*
Sudorese	27	33,3	130	31,3	0.697
Calafrios	33	40,7	108	26,0	0.010*
Frieza nas pernas	28	34,6	103	24,8	0.074
Linfadenite	7	8,6	31	7,5	0.652
Tontura	46	56,8	157	37,7	0.002*
Cansaço constante	37	45,7	158	38,0	0.214
Dormência nas pernas	31	38,3	119	28,6	0.087
Sem informação	2	2,5	2	0,5	0.126

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

Dentre os 81 pacientes que apresentaram resultado positivo para infecção por *M. ozzardi*, 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 10.

Dos 81 pacientes com infecção por *M. ozzardi*, 40 (49,4%) informaram não possuir telas em portas e janelas, sendo 26 (32,1%) homens e 14 (17,3%) mulheres (Tabela 11). Destes 81 indivíduos, 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 12).

Dentre os 81 indivíduos positivos, 21 (25,9%) residiam na região entre 0 dias e 5 anos, sendo 12 (14,8%) do sexo masculino e 9 (11,1%) do sexo feminino (Tabela 13).

Tabela 10 – 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
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
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*
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 ($p < 0,05$)**Tabela 11** – 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	-

Tabela 12 – 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	-

Tabela 13 - Frequência dos indivíduos positivos, em relação ao tempo de residência na área

Variável	Homens (frequência %)	Mulheres (frequência %)	Total (frequência %)	p
Tempo de residência na área				0.158
0 - 5 anos	12 (14,8%)	9 (11,1%)	21 (25,9%)	
6 - 10 anos	6 (7,4%)	4 (4,9%)	10 (12,3%)	
11 - 15 anos	5 (6,2%)	5 (6,2%)	10 (12,3%)	
16 - 20 anos	1 (1,2%)	3 (3,7%)	4 (4,9%)	
21 - 25 anos	9 (11,1%)	0 (0,0%)	9 (11,1%)	
26 - 30 anos	6 (7,4%)	3 (3,7%)	9 (11,1%)	
31 - 35 anos	1 (1,2%)	1 (1,2%)	2 (2,5%)	
36 - 40 anos	2 (2,5%)	0 (0,0%)	2 (2,5%)	
≥ 41 anos	4 (4,9%)	1 (1,2%)	5 (6,2%)	
Sempre morou	4 (4,9%)	4 (4,9%)	8 (9,9%)	
Não responderam	0 (0,0%)	1 (1,2%)	1 (1,2%)	
Total	50 (61,7%)	31 (38,3%)	81 (100,0%)	-

6.4.1 Análise dos dados epidemiológicos por áreas

Área 1

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 (Tabela 13).

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 13).

Do total de pacientes avaliados, a agricultura foi a ocupação com maior frequência (30,1%) de indivíduos infectados com microfilária de *M. ozzardi*, com a aposentadoria sendo a ocupação mais frequente no gênero masculino (40,0%) (Tabela 14).

A dor de cabeça foi o sintoma mais, frequentemente, relatado tanto no grupo de indivíduos positivos (45,9%) quanto no grupo de indivíduos sem infecção (42,9%)

por *M. ozzardi*, e não se obteve diferença estatística significativa para nenhum dos sintomas auto declarados (Tabela 15).

Tabela 14 - Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, por gênero e idade, na área 1 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)

Grupo etário	Postivos/ Examinados			% Frequência			p
	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total	
0-10	0/5	0/9	0/14	0,0	0,0	0,0	1.000
11-20	3/20	2/24	5/44	15,0	8,3	11,4	0.646
21-30	1/17	3/22	4/39	5,9	13,6	10,3	0.618
31-40	2/17	2/22	4/39	11,8	9,1	10,3	1.000
41-50	3/14	2/16	5/30	21,4	12,5	16,7	0.642
> = 51	11/28	6/41	17/69	39,3	14,6	24,6	0.025*
Não informaram a idade	1/5	1/7	2/12	20,0	14,3	16,7	1.000
Total	21/106	16/141	37/247	19,8	11,3	15,0	-

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

Tabela 15 - Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, por ocupação e gênero, na área 1 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)

Ocupação	Postivos/ Examinados			% Frequência			p
	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total	
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	-

Tabela 16 - Comparação dos sintomas clínicos dos pacientes positivos e negativos infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, na área 1 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)

Sintomas Clínicos	Amostrado Individual				p
	Indivíduo positivo para M.O (n= 37)	%	Indivíduo negativo para M.O (n= 210)	%	
Febre	12	32,4	63	30,0	0.847
Dor no corpo	16	43,2	68	32,4	0.258
Dor de cabeça	17	45,9	90	42,9	0.723
Dor nas articulações	14	37,8	57	27,1	0.236
Sudorese	6	16,2	31	14,8	0.804
Calafrios	7	18,9	41	19,5	1.000
Frieza nas pernas	7	18,9	29	13,8	0.449
Linfadenite	2	5,4	9	4,3	0.672
Tontura	11	29,7	44	21,0	0.283
Cansaço constante	13	35,1	52	24,8	0.224
Dormência nas pernas	4	10,8	25	11,9	1.000
Sem informação	2	5,4	2	1,0	0.108

Dentre os 37 pacientes que apresentaram resultado positivo para infecção por *M. ozzardi*, 27 (73,0%) informaram morar a menos de 100 metros da floresta, 27 (73,0%) a menos de 100 metros do igarapé, e 23 (62,2%) a menos de 100 metros do rio (Tabela 16)

Dos 37 pacientes com infecção por *M. ozzardi*, 13 (35,1%) informaram não possuir telas em portas e janelas, sendo 9 (24,3%) homens e 4 (10,8%) mulheres (Tabela 17). Destes 37 indivíduos, 29 (78,4%) informaram que eram, frequentemente, picados por Piuns (Simulídeos) e Mariuns (Ceratopogonídeos), sendo 15 (40,5%) homens e 14 (37,8%) mulheres (Tabela 18).

Dos 37 pacientes positivos para infecção por *M. ozzardi* residentes na área 1, 37,8% residiam no local num período de 0 a 5 anos, sendo 24,3% do sexo masculino e 13,5% do sexo feminino (Tabela 19).

Tabela 17 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 1, 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
Longe (>100)	2 (9,5%)	1 (6,2%)	3 (8,1%)	
Não responderam	4 (19,1%)	3 (18,8%)	7 (18,9%)	
Perto (<100)	15 (71,4%)	12 (75,0%)	27 (73,0%)	
Em relação ao igarapé				0.757
Longe (>100)	3 (14,3%)	1 (6,2%)	4 (10,8%)	
Não responderam	3 (14,3%)	3 (18,8%)	6 (16,2%)	
Perto (<100)	15 (71,4%)	12 (75,0%)	27 (73,0%)	
Em relação ao rio				0.404
Longe (>100)	5 (23,8%)	2 (12,5%)	7 (18,9%)	
Não responderam	5 (23,8%)	2 (12,5%)	7 (18,9%)	
Perto (<100)	11 (52,4 %)	12 (75,0%)	23 (62,2%)	
Total	21	16	37	-

Tabela 18 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 1, em relação a presença ou ausência de telas em portas e janelas

Variável	Homens	%	Mulheres	%	Total	%	p
Casa telada							0.291
Não	9	24,3	4	10,8	13	35,1	
Sim	5	13,5	2	5,4	7	18,9	
Não respondeu	7	18,9	10	27,0	17	46,0	
Total	21	56,8	16	43,2	37	100,00	-

Tabela 19 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 2, em relação a picadas de Piuns e Maruins

Variável	Homens	%	Mulheres	%	Total	%	p
Picada frequente							0.533
Não	5	13,5	2	5,4	7	18,9	
Sim	15	40,5	14	37,8	29	78,4	
Não respondeu	1	2,7	0	0,0	1	2,7	
Total	21	56,8	16	43,2	37	100,00	-

Tabela 20 - Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 1, em relação ao tempo de residência na área

Variável	Homens (frequência %)	Mulheres (frequência %)	Total (frequência %)	p
Tempo de residência na área				0.530
0 - 5 anos	9 (24,3%)	5 (13,5%)	14 (37,8%)	
6 - 10 anos	3 (8,1%)	2 (5,4%)	5 (13,5%)	
11 - 15 anos	1 (2,7%)	1 (2,7%)	2 (5,4%)	
16 - 20 anos	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
21 - 25 anos	2 (5,4%)	0 (0,0%)	2 (5,4%)	
26 - 30 anos	1 (2,7%)	1 (2,7%)	2 (5,4%)	
31 - 35 anos	0 (0,0%)	1 (2,7%)	1 (2,7%)	
36 - 40 anos	1 (2,7%)	0 (0,0%)	1 (2,7%)	
≥ 41 anos	2 (5,4%)	0 (0,0%)	2 (5,4%)	
Sempre morou	1 (2,7%)	3 (8,1%)	4 (10,8%)	
Não responderam	1 (2,7%)	3 (8,1%)	4 (10,8%)	
Total	21 (56,8%)	16 (43,2%)	37 (100,0%)	-

Área 2

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%) demonstraram estar infectados por *M. ozzardi* (Tabela 20).

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 (Tabela 20).

A maior frequência de positividade entre participantes do gênero feminino foi observada na faixa etária de 31 a 40 anos (36,4%), conforme elucidada na tabela 20.

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 21).

Dos sintomas auto declarados pelos 105 indivíduos da área 2, apenas tontura apresentou diferença estatística significativa ($p=0.005$), com 85,0% dos pacientes infectados e 50,0% dos não infectados relataram sofrer com tonturas (Tabela 22).

Tabela 21 - Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, por gênero e idade, na área 2 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)

Grupo etário	Postivos/ Examinados			% Frequência			p
	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total	
0-10	0/13	0/11	0/24	0,0	0,0	0,0	1.000
11-20	2/6	0/12	2/18	33,3	0,0	11,1	0.098
21-30	1/6	0/7	1/13	16,7	0,0	7,7	0.462
31-40	1/3	4/11	5/14	33,3	36,4	35,7	1.000
41-50	2/7	1/6	3/13	28,6	16,7	23,1	1.000
> = 51	6/12	3/10	9/22	50,0	30,0	40,9	0.415
Não informaram a idade	0/0	0/1	0/1	0,0	0,0	0,0	1.000
Total	12/47	8/58	20/105	25,5	13,8	19,0	-

Tabela 22 - Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, por ocupação e gênero, na área 2 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)

Ocupação	Postivos/ Examinados			% Frequência			p
	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total	
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	-

Tabela 23 - Comparação dos sintomas clínicos dos pacientes positivos e negativos infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, na área 2 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)

Sintomas Clínicos	Amostrado Individual				p
	Indivíduo positivo para M.O (n= 20)	%	Indivíduo negativo para M.O (n=85)	%	
Febre	7	35,0	38	44,7	0.616
Dor no corpo	17	85,0	57	67,1	0.111
Dor de cabeça	14	70,0	61	71,8	1.000
Dor nas articulações	14	70,0	52	61,2	0.609
Sudorese	12	60,0	47	55,3	0.804
Calafrios	11	55,0	31	36,5	0.135
Frieza nas pernas	8	40,0	32	37,6	0.804
Linfadenite	3	15,0	8	9,4	0.431
Tontura	17	85,0	43	50,6	0.005*
Cansaço constante	11	55,0	57	67,1	0.438
Dormência nas pernas	11	55,0	47	55,3	1.000
Sem informação	0	0,0	0	0,0	1.000

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

Na área 2, 100% dos indivíduos infectados informaram morar a menos de 100 metros da floresta, 13 (65,0%) a menos de 100 metros do igarapé e 15 (75,0%) a mais de 100 metros do rio (Tabela 23).

Dos 20 indivíduos positivos para infecção por *M. ozzardi*, 11 (55,0%) informaram que as portas e janelas de suas casas possuíam telas (Tabela 24), e 16 (80,0%) declararam que eram, frequentemente, picados por picados por piuns e mariuns (Tabela 25).

Na área 2, dos 20 indivíduos infectados, 5 (25,0%) possuíam de 26 a 30 anos de residência na área, sendo 3 (15,0%) do sexo masculino e 2 (10,0%) do sexo feminino (Tabela 26).

Dos 12 indivíduos positivos do sexo masculino, as maiores frequências (15,0%) foram encontradas nos grupos de 21 a 25 anos e de 26 a 30 anos, e dentre as 8 mulheres, a maior frequência (15,0%) foi encontrada no grupo 11 a 15 anos de residência na área, conforme demonstra a tabela 26.

Tabela 24 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 2, 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
Longe (>100)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Não responderam	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Perto (<100)	12 (100,0%)	8 (100,0%)	20 (100,0%)	
Em relação ao igarapé				0.062
Longe (>100)	2 (16,7%)	5 (62,5%)	7 (35,0%)	
Não responderam	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Perto (<100)	10 (83,3%)	3 (37,5%)	13 (65,0%)	
Em relação ao rio				0.108
Longe (>100)	11 (91,7%)	4 (50,0%)	15 (75,0%)	
Não responderam	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Perto (<100)	1 (8,3%)	4 (50,0%)	5 (25,0%)	
Total	12 (100,0%)	8 (100,0%)	20 (100,0%)	-

Tabela 25 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 2, em relação a presença ou ausência de telas em portas e janelas

Variável	Homens	%	Mulheres	%	Total	%	p
Casa telada							0.361
Não	4	20,0	5	25,0	9	45,0	
Sim	8	40,0	3	15,0	11	55,0	
Não respondeu	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Total	12	60,0	8	40,0	20	100,0	-

Tabela 26 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 2, em relação a picadas de Piuns e Maruins

Variável	Homens	%	Mulheres	%	Total	%	p
Picada frequente							0.618
Não	3	15,0	1	5,0	4	20,0	
Sim	9	45,0	7	35,0	16	80,0	
Não respondeu	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Total	12	60,0	8	40,0	20	100,0	-

Tabela 27 - Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 2, em relação ao tempo de residência na área

Variável	Homens (frequência %)	Mulheres (frequência %)	Total (frequência %)	P
Tempo de residência na área				0.517
0 - 5 anos	0 (0,0%)	1 (5,0%)	1 (5,0%)	
6 - 10 anos	2 (10,0%)	1 (5,0%)	3 (15,0%)	
11 - 15 anos	1 (5,0%)	3 (15,0%)	4 (20,0%)	
16 - 20 anos	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
21 - 25 anos	3 (15,0%)	0 (0,0%)	3 (15,0%)	
26 - 30 anos	3 (15,0%)	2 (10,0%)	5 (25,0%)	
31 - 35 anos	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
36 - 40 anos	1 (5,0%)	0 (0,0%)	1 (5,0%)	
≥ 41 anos	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Sempre morou	1 (5,0%)	0 (0,0%)	1 (5,0%)	
Não responderam	1 (5,0%)	1 (5,0%)	2 (10,0%)	
Total	12 (60,0%)	8 (40,0%)	20 (100,0%)	-

Área 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* (Tabela 27).

A maior frequência de indivíduos infectados foi observada no grupo de indivíduos com idade igual ou superior a 51 anos (43,2%), conforme demonstra a tabela 27.

Os dados exibidos na tabela 28, demonstram as seguintes frequências de infecção: 50,0% para funcionários públicos, 25,0% para os que não informaram a ocupação, e 20,4% para agricultores agricultura, sem diferença estatística significativa.

Os sintomas como febre ($p=0.005$), dor no corpo ($p=0.000$), dor nas articulações ($p=0.000$), frieza nas pernas ($p=0.038$) e dormência nas pernas (0,014) apresentaram diferença estatística significativa, após análise do grupo de indivíduos infectados e não infectados, como detalhado na tabela 29.

Tabela 28 - Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, por gênero e idade, na área 3 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)

Grupo etário	Postivos/ Examinados			% Frequência			p
	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total	
0-10	0/4	0/4	0/8	0,0	0,0	0,0	1.000
11-20	0/9	0/20	0/29	0,0	0,0	0,0	1.000
21-30	2/9	0/12	2/21	22,2	0,0	9,5	0.171
31-40	0/12	2/11	2/23	0,0	18,2	8,7	0.217
41-50	3/15	1/11	4/26	20,0	9,1	15,4	0.614
> = 51	12/20	4/17	16/37	60,0	23,5	43,2	0.045*
Não informaram a idade	0/1	0/0	0/1	0,0	0,0	0,0	1.000
Total	17/70	7/75	24/145	24,3	9,3	16,6	-

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

Tabela 29 - Frequência de infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, por ocupação e gênero, na área 3 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)

Ocupação	Postivos/ Examinados			% Frequência			p
	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total	
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	-

Tabela 30 - Comparação dos sintomas clínicos dos pacientes positivos e negativos infecção por *Mansonella ozzardi* em humanos, na área 3 do município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil (Julho de 2015)

Sintomas Clínicos	Amostrado Individual				p
	Indivíduo positivo para M.O (n= 24)	%	Indivíduo negativo para M.O (n=121)	%	
Febre	16	66,7	41	33,9	0.005*
Dor no corpo	22	91,7	56	46,3	0.000*
Dor de cabeça	21	87,5	80	66,1	0.050
Dor nas articulações	21	87,5	54	44,6	0.000*
Sudorese	9	37,5	50	41,3	0.822
Calafrios	15	62,5	38	31,4	0.005*
Frieza nas pernas	13	54,2	38	31,4	0.038*
Linfadenite	2	8,3	14	11,6	1.000
Tontura	18	75,0	70	57,9	0.169
Cansaço constante	13	54,2	49	40,5	0.261
Dormência nas pernas	16	66,7	47	38,8	0.014*
Sem informação	0	0,0	0	0,0	1.000

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

Na área 3, todos os 24 indivíduos infectados informaram morar a menos de 100 metros da floresta e a mais de 100 metros do rio, e 21 (87,5%) relataram morar a menos de 100 metros do igarapé (Tabela 30).

Dos 24 indivíduos positivos para infecção por *M. ozzardi*, 18 (75,0%) informaram além de não possuir telas em portas e janelas (Tabela 31) eram frequentemente picados por piuns e maruins (Tabela 32).

Dentre os 24 participantes positivos da área 3, a maior frequência (25,0%) foi no grupo de indivíduos que possuíam de 0 dias a 5 anos de residência no local, sendo 12,5% de frequência tanto no sexo masculino quanto no sexo feminino (Tabela 33).

Dentre os 17 indivíduos positivos do sexo masculino, a maior frequência (16,7%) foi no grupo de indivíduos que possuíam de 21 a 25 anos de residência na área (Tabela 33).

Tabela 31 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 3, 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
Longe (>100)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Não responderam	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Perto (<100)	17 (100,0%)	7 (100,0%)	24 (100,0%)	
Em relação ao igarapé				0.193
Longe (>100)	1 (5,9%)	2 (28,6%)	3 (12,5%)	
Não responderam	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Perto (<100)	16 (94,1%)	5 (71,4%)	21 (87,5%)	
Em relação ao rio				1.000
Longe (>100)	17 (100%)	7 (100%)	24 (100%)	
Não responderam	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Perto (<100)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Total	17 (100,0%)	7 (100,0%)	24 (100,0%)	-

Tabela 32 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 3, em relação a presença ou ausência de telas em portas e janelas

Variável	Homens	%	Mulheres	%	Total	%	p
Casa telada							1.000
Não	13	54,2	5	20,8	18	75,0	
Sim	4	16,7	2	8,3	6	25,0	
Não respondeu	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Total	17	70,8	7	29,2	24	100,0	-

Tabela 33 – Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 2, em relação a picadas de Piuns e Maruins

Variável	Homens	%	Mulheres	%	Total	%	p
Picada frequente							0.306
Não	3	12,5	3	12,5	6	25,0	
Sim	14	58,3	4	16,7	18	75,0	
Não respondeu	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Total	17	70,8	7	29,2	24	100,0	-

Tabela 34 - Frequência dos indivíduos positivos, residentes na área 3, em relação ao tempo de residência na área

Variável	Homens (frequência %)	Mulheres (frequência %)	Total (frequência %)	P
Tempo de residência na área				0.587
0 - 5 anos	3 (12,5%)	3 (12,5%)	6 (25,0%)	
6 - 10 anos	1 (4,2%)	1 (4,2%)	2 (8,3%)	
11 - 15 anos	3 (12,5%)	1 (4,2%)	4 (16,7%)	
16 - 20 anos	1 (4,2%)	2 (8,3%)	3 (12,5%)	
21 - 25 anos	4 (16,7%)	0 (0,0%)	4 (16,7%)	
26 - 30 anos	2 (8,3%)	0 (0,0%)	2 (8,3%)	
31 - 35 anos	1 (4,2%)	0 (0,0%)	1 (4,2%)	
36 - 40 anos	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
≥ 41 anos	1 (4,2%)	0 (0,0%)	1 (4,2%)	
Sempre morou	1 (4,2%)	0 (0,0%)	1 (4,2%)	
Não responderam	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Total	17 (70,8%)	7 (29,2%)	24 (100,0%)	-

6.5 SEQUENCIAMENTO

Das 81 amostras submetidas a etapa de sequenciamento de DNA e, posteriormente, a comparação do sequenciamento da região ITS-1 do DNA ribossomal, 9 (11,1%) obtiveram sequências equivalentes as de M. P e 72 (88,9%) equivalentes a de M.O, quando comparadas as sequências disponíveis no banco de genes (Quadro 7).

ID	Espécie	ID	Espécie	ID	Espécie
1	<i>M. perstans</i>	28	<i>M. ozzardi</i>	55	<i>M. ozzardi</i>
2	<i>M. ozzardi</i>	29	<i>M. ozzardi</i>	56	<i>M. perstans</i>
3	<i>M. ozzardi</i>	30	<i>M. ozzardi</i>	57	<i>M. perstans</i>
4	<i>M. perstans</i>	31	<i>M. ozzardi</i>	58	<i>M. ozzardi</i>
5	<i>M. ozzardi</i>	32	<i>M. ozzardi</i>	59	<i>M. ozzardi</i>
6	<i>M. ozzardi</i>	33	<i>M. ozzardi</i>	60	<i>M. ozzardi</i>
7	<i>M. ozzardi</i>	34	<i>M. ozzardi</i>	61	<i>M. ozzardi</i>
8	<i>M. ozzardi</i>	35	<i>M. ozzardi</i>	62	<i>M. ozzardi</i>
9	<i>M. ozzardi</i>	36	<i>M. ozzardi</i>	63	<i>M. ozzardi</i>
10	<i>M. ozzardi</i>	37	<i>M. ozzardi</i>	64	<i>M. ozzardi</i>
11	<i>M. ozzardi</i>	38	<i>M. ozzardi</i>	65	<i>M. ozzardi</i>
12	<i>M. ozzardi</i>	39	<i>M. ozzardi</i>	66	<i>M. ozzardi</i>
13	<i>M. ozzardi</i>	40	<i>M. ozzardi</i>	67	<i>M. ozzardi</i>
14	<i>M. ozzardi</i>	41	<i>M. ozzardi</i>	68	<i>M. ozzardi</i>
15	<i>M. ozzardi</i>	42	<i>M. ozzardi</i>	69	<i>M. ozzardi</i>
16	<i>M. ozzardi</i>	43	<i>M. ozzardi</i>	70	<i>M. ozzardi</i>
17	<i>M. ozzardi</i>	44	<i>M. ozzardi</i>	71	<i>M. ozzardi</i>
18	<i>M. ozzardi</i>	45	<i>M. ozzardi</i>	72	<i>M. ozzardi</i>
19	<i>M. perstans</i>	46	<i>M. ozzardi</i>	73	<i>M. ozzardi</i>
20	<i>M. perstans</i>	47	<i>M. perstans</i>	74	<i>M. ozzardi</i>
21	<i>M. ozzardi</i>	48	<i>M. ozzardi</i>	75	<i>M. ozzardi</i>
22	<i>M. ozzardi</i>	49	<i>M. ozzardi</i>	76	<i>M. perstans</i>
23	<i>M. ozzardi</i>	50	<i>M. ozzardi</i>	77	<i>M. ozzardi</i>
24	<i>M. ozzardi</i>	51	<i>M. ozzardi</i>	78	<i>M. perstans</i>
25	<i>M. ozzardi</i>	52	<i>M. ozzardi</i>	79	<i>M. ozzardi</i>
26	<i>M. ozzardi</i>	53	<i>M. ozzardi</i>	80	<i>M. ozzardi</i>
27	<i>M. ozzardi</i>	54	<i>M. ozzardi</i>	81	<i>M. ozzardi</i>

Quadro 7 – Identificação das 81 amostras consideradas positivas após sequenciamento da região ITS-1 do DNA ribossomal.

Fonte: Própria.

7 DISCUSSÃO

O diagnóstico de *M. ozzardi* é historicamente focado na identificação de microfilárias no sangue circulante e principalmente realizado utilizando métodos baseados em microscopia, com preparações de lâminas de sangue e coloração. A identificação microscópica do parasito é realizada através da combinação de características morfológicas específicas das espécies. Através dessa leitura também é possível verificar os níveis de parasitemia. É um método simples, rápido diagnóstico, direto e pouco dispendioso.

Igualmente a isso, esse método é amplamente utilizado para diagnóstico da malária que ocorre de forma endêmica na região amazônica, o que possibilita uma grande aceitabilidade por parte da população e a realização de inquéritos integrados. Dessa forma, utilizando o exame da microscopia, diversos inquéritos foram desenvolvidos.

O primeiro registro da incidência de filárias humanas em Manaus, Amazonas, foi realizado por Maria P. Deane e colaboradores (1948) através de um inquérito, que tinha como base um levantamento para *W. bancrofti*, utilizando a confecção e leitura de lâminas de gota espessa de sangue. Este detectou 0,6% (15) de lâminas positivas para microfilária de *M. ozzardi* em um universo de 2.405 indivíduos examinados.

A amostragem para o presente estudo, segundo a metodologia utilizada, foi estimada em N=377 indivíduos, no entanto, 497 indivíduos aceitaram participar do estudo, tendo-se um aumento de aproximadamente 0,32% na amostragem inicialmente proposta.

A amostragem foi, espacialmente dividida em 3 áreas, a área 1 com localidades no centro urbano da cidade, a área 2 com localidades com perfil urbano/rural (peri-urbano), com as moradias mais afastadas uma das outras com um perfil de periferia apesar de pertencer a área urbana da cidade, e a área 3 com perfil rural de comunidades que se distribuem ao longo da rodovia. No entanto, em relação a frequência de infecção de *M. ozzardi*, não observou-se diferenças significativas, sendo que apenas a área 2 apresentou uma pequena diferença em relação as outras duas áreas. Na área 1 a frequência foi de 15,0%, na área 2: 19,0% e a área 3: 16,6%.

Este estudo demonstrou 7,9% (39) de amostras positivas para a presença de microfilária de *M. ozzardi*. Na realidade avaliando estudos realizados sobre prevalência podemos ver que existe uma diversidade entre as frequências encontradas. No estudo de Maria Deane et al. (1948) o alvo do inquérito era a identificação de *W. bancrofti* e dessa forma a baixa frequência encontrada, apesar do grande número de indivíduos examinados, pode estar relacionada com a amostragem que abrangeu a população mais urbana da cidade. O ciclo de transmissão dessa filária está relacionado com áreas urbanas e de periferia da cidade onde o vetor principal *Culex quinquefasciatus* se cria com grande facilidade pela presença de criadouros de água servida. Enquanto que os vetores da *M. ozzardi*, na Amazônia, são os simúlideos que se criam em corredeiras, cachoeiras, igarapés de água corrente, rios caudalosos e quase que a maioria em águas límpidas.

Na realidade o risco de transmissão de patógenos deve ser avaliado em associação a diversos fatores. Dentre desses os principais são: presença de vetor competente e em alta densidade e pessoas infectadas expostas nas áreas.

Dessa forma, a distribuição de mansonelose na floresta amazônica parece seguir as populações ribeirinhas e os locais de reprodução dos vetores, de uma forma semelhante a que acontece com a oncocercose tanto na África quanto na América Latina (oncocercose é mais comumente conhecida como "cegueira dos rios" por causa da patologia ocular mais grave que pode causar e sua relação epidemiológica com a proximidade dos rios).

No Brasil sua presença parece estar confinada a algumas áreas geográficas como Alto Amazonas (rio Solimões) e ao longo dos rios Purus e Negro (MORAES et al., 1985).

Seguindo esse contexto, um estudo realizado no Amazonas, por Batista et al. (1960) no município de Codajás, localizado a margem esquerda do rio Solimões onde a presença de simúlideos vetores de *Mansonella* já era assinalada desde os primeiros estudos sobre a patologia realizados por Lacerda e Rachou (1956), encontraram uma prevalência de 30,3% de *M. ozzardi*, sendo que essa prevalência foi maior entre indivíduos do sexo masculino (33,0%) do que entre indivíduos do sexo feminino (27,9%).

Na sequência desses trabalhos, ao longo do rio Solimões, em um estudo realizado no município de Coari, que se localiza a margem direita entre o lago de

Mamiá e o Lago do Coari, Martins e colaboradores em 2010, encontraram uma prevalência de 13,3% de infecção por *M. ozzardi*, com participação de indivíduos da área rural e área urbana, sendo a maior prevalência tendo sido observada dentre pacientes do sexo masculino (14,5%), e a menor entre as mulheres (6,7%). Localidade onde a presença de simúlideos vetores é reconhecida e atribuída as espécies *Simulium amazonicum* e *S. argentiscutum*.

Nas áreas do rio Purus, no município de Lábrea, detectou-se 20,7% de prevalência de *M. ozzardi*, através de um estudo realizado por Medeiros et al. (2011), com os homens apresentando 27,6% de prevalência, e as mulheres apresentaram 14,3% de prevalência. Essa área também indica a presença de *S. amazonicum* como principal vetor na área (MEDEIROS et al. 2009).

As características observadas nas microfilárias visualizadas, nas lâminas consideradas positivas foram: ausência de bainha, núcleos somáticos que não alcançavam a extremidade posterior e região caudal afilada. Esses dados vão de encontro com os dados fornecidos por Tavares em 1981, o qual realizou uma breve descrição a respeito das características de *M. ozzardi*.

As frequências assinaladas nos estudos através da microscopia podem ser consideradas representativas, entretanto, os baixos níveis de microfilaremia, por vezes, demasiadamente encontrados, dificultam a detecção através do exame de sangue simples da gota espessa, e assim métodos para concentrar o parasita são utilizados para melhorar a sensibilidade da detecção baseada na microscopia.

Os métodos de filtragem de *Knott* e membrana de policarbonato são amplamente utilizados para resolver este problema (MEDEIROS; PESSOA; MARTINS, 2010). No entanto, estes métodos podem distorcer algumas estruturas morfológicas das microfilárias de *M. ozzardi* e gerar erros nas identificações.

O desenvolvimento de métodos alternativos como moleculares para o diagnóstico através da reação em cadeia da polimerase (PCR) para diversas espécies de filárias sempre esteve dentre as recomendações da OMS para os programas de controle de doenças. Igualmente a avaliação e estudos comparativos com as técnicas mais tradicionais para avaliação (LUZ et al., 2014; TANG et al 2010).

Dessa forma, através de um estudo realizado por Medeiros et al. (2015) para comparação da técnica molecular (FnPCR) com a microscopia, detectou-se que a técnica molecular (FnPCR) apresenta 1,80 vezes mais prevalência do que a

microscopia. Esses dados corroboram com os achados deste estudo, onde encontrou-se 2,06 vezes mais indivíduos infectados pela técnica molecular do que pela técnica tradicional (gota espessa).

As amostras foram submetidas à análise de sequenciamento de DNA, e a espécie foi confirmada através do sequenciamento do produto da PCR, o que sugere que não há diversidade do parasita circulante nas áreas estudadas, visto que a única espécie encontrada nos indivíduos infectados foi a *Mansonella ozzardi*.

Esses dados demonstram que a infecção *M. ozzardi* está se mantendo estável, persistindo ao longo de décadas, e demonstrando ausência de medidas de profilaxia e combate ao vetor. E, que as parasitemias subpatentes podem representar uma fonte de contaminação aos vetores.

Vários fatores de risco demográficos têm sido associados com infecções por *M. ozzardi*. Sabe-se, por exemplo, que aqueles que têm profissões em áreas externas de trabalho (como pescador e agricultores) na região amazônica (onde simúlideos parecem ser os principais vetores) estão em maior risco de serem infectados do que aqueles que não o fazem. A idade também é fortemente correlacionada positivamente com o estado de infecção em uma variada gama de configurações. A causa é desconhecida, mas é muitas vezes atribuída a mais antiga residência tendo o maior risco de exposição a picadas de vetor infecciosas. Os níveis de prevalência do parasita também são conhecidos por variar drasticamente ao longo do tempo e espaço.

Os dados publicados, demonstram que os homens são os participantes mais acometidos por essa infecção ao longo de décadas (BATISTA; RABELLO, 1960; MARTINS et al., 2010; MEDEIROS et al., 2008, 2009, 2011, 2012; TAVARES, 1981).

Em relação a prevalência por grupos etários, dois estudos realizados no município de Lábrea (AM), por Medeiros e colaboradores em 2008 e outro em 2011, demonstraram que os participantes com idade acima de 48 anos de idade são os mais acometidos pela infecção por *M. ozzardi*, com 75% e 57,1% de prevalência, respectivamente. E, os participantes de 2 a 9 anos de idade são menos acometidos com 0% e 4,9% de prevalência, respectivamente.

Um estudo realizado por Medeiros e colaboradores (2014) no município de Tefé (AM), demonstrou que as maiores prevalências foram oriundas dos grupos com idade superior a 67 anos (38%), seguidos pelos grupos com idade entre 48 e 57

anos (28,6%), e 58 a 67 anos (28,6%), e a menor prevalência foi proveniente do grupo com idade entre 2 a 9 anos (1,6%). E, no município de Coari (AM), em 2010, Martins e colaboradores encontraram a maior prevalência no grupo com 51 ou mais anos, tanto de área urbana (26,9%) quanto de área rural (61,5%) (35,1%), e a menor no grupo de 0 a 10 anos, tanto da área urbana (2,3%) quanto da área rural (2,1%).

Tavares em 1981, através da sua dissertação, demonstrou que a maior prevalência foi no grupo de indivíduos com idade entre 40 e 49 anos (22,7%), seguindo pelo grupo de 50 a 59 anos (22,5%), e menor prevalência no grupo de 0 a 9 anos (0,2%).

Os dados obtidos nesse trabalho, em relação a maior prevalência por grupos etários coincidem com os dados publicados por Martins et al., 2010 e Medeiros et al., 2008, 2011 e 2014, porém discordam do estudo de Tavares de 1981, visto que a maior prevalência encontrada nesse estudo foi dos grupos com idade igual ou superior a 51 anos (32,8%), seguido pelo grupo com idade entre 41 e 50 anos (17,4%). Essa contradição entre os dados de Tavares (1981) e os dados obtidos nesse estudo, pode ter sido ocasionada pelo fato dos indivíduos com 48 e 49 anos estarem dentro de um grupo etário, que em geral, costuma apresentar uma prevalência mais baixa do que o grupo que inclui indivíduos a partir de 48 anos. Além disso, os grupos com idade de 40 a 49 anos e de 50 a 59 anos, do estudo de Tavares (1981), não apresentaram diferença estatística significativa ($p=1.000$).

A alta prevalência nos indivíduos com idades mais elevadas pode indicar que há o aumento da exposição ao vetor ao longo dos anos, principalmente, entre os indivíduos do sexo masculino. E, que as mulheres e crianças desempenham atividades com menor nível de exposição ao vetor, com atividades sendo desempenhadas em suas casas e escolas (MARTINS et al., 2010; MEDEIROS et al., 2009a, 2009b, 2011 e 2014).

Um estudo realizado no município de Boca do Acre (AM), por Medeiros e colaboradores em 2009, mostrou que a agricultura e a aposentadoria foram as ocupações com maior prevalência de *M. ozzardi*, com 48% e 40%, respectivamente. E, em um estudo realizado em 2014, por Medeiros e colaboradores, no município de Tefé (AM), demonstrou 28,9% de prevalência de indivíduos aposentados e 27% de prevalência de agricultores.

Medeiros et al., em 2011, no município de Tefé (AM), também demonstrou que as maiores prevalências eram provenientes dos grupos de participantes

aposentados (64%), seguido pelos agricultores (47,1%). E, em 2008, Medeiros e colaboradores relataram que a maior prevalência acometeu o grupo de participantes que eram responsáveis pelos afazeres domésticos (45,4%), seguido pelo grupo de agricultores (38,7%).

Em 2014, Adami e colaboradores reportaram que, após análise de diversas comunidades do Rio Purus (AC e AM), o grupo que abrangia agricultura, pesca e pecuária, foi o grupo com maior prevalência (24,3%).

No presente trabalho obteve-se as maiores prevalências nos grupos de indivíduos aposentados (30%) e agricultores (25,5%), o que corrobora com os dados fornecidos por Adami (2014) e Medeiros et al., (2008, 2009, 2011 e 2014), onde os agricultores e aposentados foram os grupos que apresentaram as prevalências mais altas, indicando que possa haver relação entre a ocupação e o grau de exposição ao vetor, e também que os indivíduos continuam trabalhando mesmo estando aposentados, sofrendo sucessivas reinfecções e, conseqüentemente, um acúmulo de microfilárias.

Em 1981, no município de Lábrea (AM), Tavares relatou que dentre o grupo de indivíduos positivos, os sintomas mais frequentes foram dor nas articulações (71,7%), frieza nas pernas (69,5%) e cefaleia (65,2%), e dentre o grupo de indivíduos negativos, os sintomas mais frequentes foram cefaleia (56,5%), dor nas articulações (50%), frieza nas pernas e adenites, ambas com 21,7%. E, houve diferença estatística significativa para dor nas articulações ($p < 0.005$), frieza nas pernas ($p < 0.0001$) e febre sem causa aparente ($p < 0.0002$).

Em 2010, no município de Coari (AM), Martins e colaboradores relataram que dos indivíduos infectados por *M. ozzardi*, 59,3% não possuíam sintomas clínicos, 24,7% apresentaram dor nas articulações e 23,8% apresentaram frieza nas pernas. E, dentre os indivíduos não infectados, 43,1% não apresentaram sintomas clínicos, 20,7% sentiam dor de cabeça, e 12,1% sentiam dor nas articulações. E, a diferença estatística significativa foi obtida para dor nas articulações ($p < 0.01$), frieza nas pernas ($p < 0.01$), febre ($p < 0.01$), e também para a ausência de sintomas clínicos ($p < 0.01$).

No entanto, esse estudo observou que dentre os indivíduos positivos, 67,9% disseram sentir dor no corpo, 64,2% dor de cabeça e 60,5% dor nas articulações. E, dentre os indivíduos negativos para infecção por *M. ozzardi*, 55,8% disseram sentir dor de cabeça, 43,5% dor no corpo e 39,4% dor nas articulações, com diferenças

estatísticas sendo apresentadas para dor no corpo ($p < 0.001$), dor nas articulações ($p < 0.001$), calafrios ($p = 0.010$) e tontura ($p = 0.002$).

Em relação a sintomatologia, poucos foram os sintomas com diferença estatística significativa. Os sintomas mais comumente associados a infecção por *M. ozzardi*, são dor nas articulações e frieza nas pernas, sendo que no presente estudo, não se obteve diferença estatística significativa para 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.

A detecção de espécies de *Mansonella* através de métodos de amplificação de ácidos nucleicos é comumente utilizada por diversos autores como Mourembou et al., 2015, Tang et al., 2010, Medeiros et al., 2015, Keiser et al., 2008. No entanto, somente estudos realizados no continente africano relatam a obtenção de sequências equivalentes as de *M. perstans*. E, utilizando-se a amplificação da região ITS-1 do DNA ribossomal, foram obtidas sequências equivalentes as de *M. ozzardi* e *M. perstans* provenientes de amostras de pacientes que informaram não terem saído da América do Sul, comprovando a existência do primeiro foco de *M. perstans* na América do Sul. Visto que, até o presente momento não há relatos de um consistente estudo que confirme a presença de *M. perstans* na América do Sul.

A respeito da urbanização, nota-se que a transição demográfica do meio rural para urbano da população está associada a mudanças comportamentais, e as previsões indicam que a saúde humana deve se tornar um dos principais focos tendo em vista a determinação social da saúde, reconhecendo-se que a urbanização pode ter fortes impactos no desenvolvimento, na pobreza e no bem-estar das pessoas, cidades e países.

Especificamente na mansonelose, em São Gabriel da Cachoeira o fluxo migratório é alto, há evidências de padrões de urbanização mal planejada, com consequências negativas para a saúde e segurança das pessoas. Isso inclui aumento de fatores de risco e de exposição da população. Entretanto, sem estudos de transmissão e entomológicos a questão da urbanização da mansonelose fica em aberto para trabalhos mais detalhados que possam testar essa hipótese.

Outrossim, coexistem nas áreas endêmicas uma série de patologias tropicais onde a maioria dos sintomas são semelhantes, dificultando a diferenciação e até a definição correta. Da mesma forma, a coleta da informação muitas vezes é

prejudicada durante o inquérito, seja pela simples falta de informação e/ou conhecimento do indivíduo examinado, e algumas vezes pela própria vontade do indivíduo que muitas vezes concorda e quer fazer o exame mas se recusa a fornecer qualquer informação.

8 CONCLUSÃO

Espera-se através desse estudo contribuir com informações úteis sobre os aspectos epidemiológicos da mansonelose. Em vista disso é possível observar que:

- 1) A filária presente na região estudada é a *Mansonella ozzardi*, não havendo, durante todo o processo dessa investigação a identificação de outras espécies de *Mansonella*, o que permite concluir que não foi encontrada diversidade do parasita nas áreas do município de São Gabriel da Cachoeira;
- 2) A técnica molecular, como ferramenta utilizada, representa um potencial importante para o levantamento da epidemiologia de filárias na região e pode ser usada com coleta simples, por punção digital, em papel de filtro facilitando a realização de levantamentos em áreas distantes e com restrições logísticas;
- 3) Com base em estudos anteriores, os fatores demográficos relacionados ao risco epidemiológico apresentaram poucas variações podendo sugerir a necessidade da prospecção mais refinada e específica nas localidades;
- 4) E, os sintomas relatados nesse estudo, pelos indivíduos positivos para infecção de *Mansonella ozzardi*, não apresentaram variações significativas quando comparados aos estudos anteriores;

Diante dos resultados e das conclusões obtidas nesta pesquisa consideramos que, em se tratando de indivíduos positivos para *Mansonella ozzardi*, estudos clínicos precisam ser desenvolvidos com o intuito de identificar a relação entre os sintomas e a parasitemia.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMI, Y. L. 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.

AKUE J.P. et al. Epidemiology of concomitant infection due to *Loa loa* and *Mansonella perstans* in Gabon. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 10, 2011.

BASANO, S. D. A. et al. Sustained Clearance of *Mansonella ozzardi* Infection after Treatment with Ivermectin in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 6, p. 1170–1175, 2014.

BASANO, S. DE A. 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.

BATISTA, D.; OLIVEIRA, W. R.; RABELLO, V. D. 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.

BOUYOU AKOTET, M. K. 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.

BRANDHUBER, G. Why Tukanoans migrate? Some remarks on conflict on the Upper Rio Negro (Brazil). **Journal de la Société des Américanistes**, v. 85, n. 1, p. 261–280, 1999.

BREGANI, E.R. et al. Comparison of different anthelmintic drug regimens against *Mansonella perstans* filariasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 100: p.458-63, 2006.

CDC [homepage on the Internet]. Centers for Disease Control and Preventions. Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2016.

COHEN, J. M.; RIBEIRO, J. A. S.; MARTINS, M. Acometimento ocular em pacientes

com mansonelose. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 71, n. 2, p. 167–171, 2008.

CONFALONIERI, U. Um Modelo Conceitual. **Estudos Avançados**, v. 19, n. 53, p. 221–236, 2005.

COULIBALY, Y.I et al., A randomized trial od doxycycline for *Mansonella perstans* infection. **The New England Journal of Medicine**; 361:1448-58, 2009.

DEANE, M.P. Sobre a incidência de filárias humanas em Manaus, Estado do Amazonas. **Revista Fundação SESP 2**: p.849-858, 1949.

DEGESE, M.F. et al. Aporte de la técnica de PCR en el diagnóstico de *Mansonella ozzardi* en zonas endémicas de la Argentina. **Rev Argent Microbiol**: vol.44, n.2, pp.97-100, 2012.

FUEHRER, H.P. et al. Novel Nested direct PCR technique for malaria diagnosis using filter paper samples. **Journal of Clinical Microbiology**: vol. 49; p. 1628-1630, 2011.

GATTI, F. R. et al. Tungíase disseminada tratada com ivermectina. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 4, p. 339–342, 2008.

GEHRINGER, C. et al. Molecular Evidence of Wolbachia Endosymbiosis in *Mansonella perstans* in Gabon, Central Africa. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 10, p. 1633–1638, 2014.

HOLMES G.K, GELFAND M, BOYT W, MACKENZIE P. A study to investigate the pathogenicity of a parasite resembling *Acanthocheilonema perstans*. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 63:479–484, 1969.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico: São Gabriel da Cachoeira, Amazonas. Brasil, 2010. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/6A7>> Acesso em: 20 de dezembro de 2015.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico: São Gabriel da Cachoeira, Amazonas. Brasil, 2015. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/6A7>> Acesso em: 5 de janeiro de 2016.

IMBIRIBA, E.B, et al. Hanseníase em populações indígenas do Amazonas, Brasil: um estudo epidemiológico nos municípios de Autazes, Eirunepé e São Gabriel da Cachoeira (2000 a 2005). **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 5, May 2009.

JIMÉNEZ, M. et al. Detection and discrimination of *Loa loa*, *Mansonella perstans* and *Wuchereria bancrofti* by PCR-RFLP and nested-PCR of ribosomal DNA ITS1 region. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 1, p. 282–6, 2011.

KEISER, P. B. et al. Molecular identification of *Wolbachia* from the filarial nematode *Mansonella perstans*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 160, n. 2, p. 123–8, 2008.

LACERDA, N.B., RACHOU, R.G. Filarioses humanas nas sedes municipais do estado do Amazonas e territórios do Acre, Guaporé e Rio Branco. **Revista Brasileira de Malariologia e Doença Tropicais**, 8:437-442, 1956.

LEVINO, A. OLIVEIRA, R.M. Tuberculose na população indígena de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil. **Cad. Saúde Pública**: vol.23, n.7, p. 1728-1732, 2007.

LUZ, S. L. B. et al. Outstanding insecurities concerning the use of an Ov16-based ELISA in the Amazonia onchocerciasis focus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 4, p. 506–509, 2014.

MARTINS, M. et al. *Mansonella ozzardi* in Amazonas, Brazil: prevalence and distribution in the municipality of Coari, in the middle Solimões River. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 246–53, 2010.

MEDEIROS, J. F. 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**, v. 8, n. 1, p. 280, 2015.

MEDEIROS, J. F. et al. Current profile of *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in communities along the Ituxi river, Lábrea municipality, Amazonas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 409–411, 2008.

MEDEIROS, J. F. et al. *Mansonella ozzardi* in Brazil: prevalence of infection in riverine communities in the Purus region, in the state of Amazonas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 74–80, 2009a.

MEDEIROS, J. F. et al. MANSONELLIASIS : A BRAZILIAN NEGLECTED DISEASE. **Rev Patol Trop**, v. 43, n. 1, p. 1–6, 2014.

MEDEIROS, J. F. et al. Occurrence of *Mansonella ozzardi* (Nematoda, Onchocercidae) in riverine communities of the Purus river, Boca do Acre municipality, Amazonas State, Brazil. **Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública**, v. 25, n. 6, p. 1421–6, 2009b.

MEDEIROS, J. F.; PESSOA, F. A. C.; MARTINS, M. Importância do método de gota espessa de sangue no diagnóstico de filárias simpátricas no Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 4, p. 779–780, 2010.

MEDEIROS, J. F.; PY-DANIEL, V.; BARBOSA, U. C. Prevalence of *Mansonella ozzardi* among riverine communities in the municipality of Lábrea, State of Amazonas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 186–190, 2011.

MEDEIROS, J.F.; Py-DANIEL, V. **Mansonelose**. In: **Carlos Brisola Marcondes. (Org.). Doenças transmitidas e causadas por artrópodes**. 1 ed. São Paulo: Atheneu: vol. 19, p. 274-280, 2009.

MORAES M.A, SHELLEY A.J, DIAS A.P, SILVA C.J. The concentration of *Mansonella ozzardi* microfilariae in skin capillaries. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.77, p. 463-466, 1983.

MORAES, M. A. P.; SHELLEY, A. J.; LUNA DIAS, A. P. *Mansonella ozzardi* no território federal de Roraima, Brasil: distribuição e achado de um novo vetor na área do rio Surumu. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.80, n.4, p.395-400, 1985.

MORALES-HOJAS, R. et al. Characterisation of nuclear ribosomal DNA sequences from *Onchocerca volvulus* and *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Filarioidea) and development of a PCR-based method for their detection in skin biopsies. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 2, p. 169–77, 2001.

MOUREMBOU, G. et al. *Mansonella*, including a Potential New Species, as Common Parasites in Children in Gabon. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004155, 2015.

MULLER, R. Worms and Human Disease, 2nd Edn. **CABI Publishing**, London Wallingford, 2002.

PESSOA, F.A.C.; BARBOSA, U.C.; MEDEIROS, J. . A new species of *Cerqueirellum* Py-Daniel, 1983 (Diptera: Simuliidae) and proven new vector of mansonelliasis from the Ituxi River, Amazon basin, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 3, p. 560–582, 2008.

PHILLIPS, R. O. et al. Infection with *Mansonella perstans* Nematodes in Buruli Ulcer Patients, Ghana. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 6, p. 1000–3, 2014.

POST, R. J. et al. The morphological discrimination of microfilariae of *Onchocerca volvulus* from *Mansonella ozzardi*. **Parasitology**, v. 127, p. 21–27, 2003.

PY-DANIEL, V. Caracterização de dois novos subgêneros em Simuliidae (Diptera: Culicomorpha) neotropical. **Amazoniana**, 8(2): 159-223. 1983.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <<https://www.R-project.org>>, 2015.

RACCURT, C. P. et al. Epidemiologic Survey of *Mansonella ozzardi* in Corail, Haiti. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 6, p. 1167–1169, 2014.

RACHOU R.G. Distribuição geográfica das Filariose humanas no Brasil. **Rev Bras Malariol D Trop**, 9:79-100, 1957.

RIBEIRO, Fernando A. Q. et al. **Tratamento da miíase humana cavitária com ivermectina oral. Rev. Bras. Otorrinolaringol.:** vol.67, n.6, pp. 755-761, 2001.

RUBIO, J. M. et al. Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96 Suppl 1, p. S199–S204, 2002.

SANT'ANNA, M.R.V. et al. Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. **Acta Trop**; 107(3): 230-237, 2008.

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

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. Human onchocerciasis in Brazil: an overview. **Cad. Saúde Pública**,18(5): 1167 – 1177, 2002.

SIMONSEN, P. E.; ONAPA, A. W.; ASIO, S. M. *Mansonella perstans* filariasis in Africa. **Acta Tropica**, v. 120, n. SUPPL. 1, 2011.

SOARES, O.E (Org.). **Parasitismo em área indígena**. p.69-82. In: SOARES, O.E. *Ações em saúde indígena amazônica: o modelo do Alto rio Negro*, p.192, 2007.

STENSGAARD, A. et al. Ecological Drivers of *Mansonella perstans* Infection in Uganda and Patterns of Co- endemicity with Lymphatic Filariasis and Malaria. p. 1–16, 2016.

TADEI, W.P et al. Ecologic observations on Anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 59 (2): p.325-335, 1998.

TANG, T. H. T. 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. September, p. 823–828, 2010.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 275–277, 2006.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 275–277, 2006.

TAVARES, A.M. Estudo da infecção por *Mansonella ozzardi*. **MsD Thesis**,

Universidade de Brasília, Brasília, p.122, 1981.

VERA, L. J. S. 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.

VIANNA, L. M. M. et al. *Mansonella ozzardi* corneal lesions in the Amazon: a cross-sectional study. **BMJ open**, v. 2, n. 6, p. 1–5, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World health statistics annual, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 15 dezembro 2015.

WRIGHT, S.J, MULLER-LANDAU, H.C. The future os Tropical Forest Species. **Biotropica** 38 (3): 287-301, 2006.

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: “Epidemiologia da *Mansonella perstans* e *M. ozzardi* em área urbana de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil”. Nesta pesquisa, pretendemos colher uma pequena quantidade de seu sangue do dedo (coleta da polpa digital) para observar se está contaminado com um tipo de verme sanguíneo, a *Mansonella*, que é transmitido por um tipo de “mosquito” o pium. Esse verme causa uma doença chamada mansonelose que atinge muitas pessoas em algumas áreas do Amazonas, que pode causar dor de cabeça, dores articulares e febre. O objetivo deste projeto é estudar a ocorrência da doença e quais seus sintomas, por meio da realização de um estudo epidemiológico (inquérito) nos bairros e casas da área urbana de São Gabriel da Cachoeira que forem sorteadas.

Para esta pesquisa adotaremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): Após leitura e assinatura do TCLE, será aplicado um questionário contendo informações clínicas e posteriormente será coletado duas gotas sangue da polpa digital (ponta do dedo), por meio de uma lanceta estéril descartável, o que implica em apenas um pequeno incômodo passageiro e um risco mínimo, visto que poderá ocorrer por exemplo, a formação de um pequeno hematoma no local da coleta e a possibilidade de infecção no orifício causado pela lanceta. Entretanto, entende-se que você não será submetido a riscos adicionais àqueles necessários à coleta de sangue. Quanto à possibilidade de infecção no orifício gerado pela lanceta, este risco será minimizado pela utilização de lancetas descartáveis, além disso, os procedimentos de assepsia serão adotados e após os procedimento de coleta será colocado um *bandaid* no local lesionado. Qualquer risco ocasionado por esse procedimento será resolvido pela equipe de pesquisa. Todas as medidas de segurança serão adotadas, e os profissionais durante a coleta de sangue estarão utilizando EPI. A coleta de sangue da polpa digital servirá para realização de gota espessa e coleta em papel filtro (somente será coletado o sangue da polpa digital, não será realizado nenhum procedimento de punção venosa).

Poderá haver ainda o risco decorrente da aplicação do questionário (Ficha Clínica), podendo ocorrer um leve desconforto ao responder a quaisquer um dos itens questionados pelo Médico(a) que realizará a aplicação do questionário. Com a finalidade de assegurar o sigilo, privacidade e confidencialidade de suas informações, o Termo de Consentimento e o questionário receberá um código numérico de identificação para sua identificação (podendo ser também utilizado as iniciais do seu nome) para posterior lançamento das informações no banco de dados do projeto e futura análise das variáveis de interesse na pesquisa (neste banco de dados não constará o seu nome, somente o código numérico de identificação).

Se você aceitar participar desta pesquisa, terá como benefício direto o diagnóstico para mansonelose, que pode ser causada tanto por *M. perstans* como por *M. ozzardi*. Você receberá o resultado desta pesquisa e caso o diagnóstico seja positivo para mansonelose, você será atendido por um Médico(a) da equipe deste estudo, onde receberá atendimento, acompanhamento e tratamento específico para filariose.

Além dos benefícios diretos, esta pesquisa trará ainda benefícios indiretos, visto que o inquérito realizado trará a verdadeira dimensão da mansonelose na área urbana de São Gabriel da Cachoeira, podendo ser utilizado como subsídio para a elaboração de políticas de vigilância em saúde e controle da mansonelose na região. E, a detecção de bactérias do gênero *Wolbachia* nas microfilárias também poderá dar subsídios a propostas futuras de tratamento alternativo além dos existentes atualmente, já que as filárias que infectam humanos estão associadas a essas bactérias (que podem ser eliminadas por antibióticos), e quando eliminadas, causam esterilidade e morte de vermes fêmeas.

Para participar desta pesquisa, você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Entretanto, caso ocorra algum dano decorrente de sua participação nesta pesquisa você terá o direito à indenização. 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. 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 fornecido a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com

padrões profissionais de sigilo e confidencialidade, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos previstos na pesquisa.

Em caso de dúvidas ou outras informações a respeito do projeto você pode entrar em contato com pesquisador responsável pela pesquisa, Felipe Arley Costa Pessoa, através dos telefones (92) 3621 2335/ (92) 98839 3577 e também através do endereço Rua Teresina, 476 – Adrianópolis – CEP – 69057-070, Manaus-AM ou ainda pelo e-mail facpessoa@amazonia.fiocruz.br.

Caso queira entrar em contato com o Comitê de Ética em pesquisa em Seres Humanos que avaliou e aprovou o projeto, os dados do CEP para eventuais dúvidas relativas à eticidade da pesquisa: Av. Brasil, 4036, sala 705 - campus Expansão - Manguinhos - Tel.: 021 38829011 - cepfiocruz@ioc.fiocruz.br.

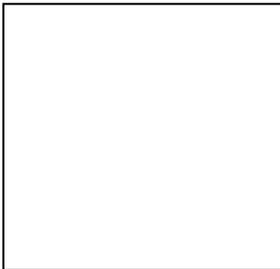
O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos tem por objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Dessa forma o comitê tem o papel de avaliar e monitorar o andamento do projeto de modo que a pesquisa respeite os princípios éticos de proteção aos direitos humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade dos participantes.

DECLARAÇÃO DO (A) PARTICIPANTE (A):

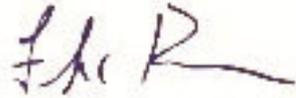
Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em 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, AM _____ de _____ de 20 .

Assinatura do participante
ou Impressão digital



Assinatura do (a) Pesquisador


Felipe Arley Costa Pessoa
Pesquisador em Saúde pública
INSTITUTO LEÓNIDAS & MARIA
DEANE
Siape 1557609

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (2 a 13 anos)

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: **“Epidemiologia da *Mansonella perstans* e *M. ozzardi* em área urbana de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil”**, após autorização dos seus pais (ou dos responsáveis legais). Nesta pesquisa, pretendemos colher uma pequena quantidade de seu sangue do dedo (duas gotas) para observar se está contaminado com um tipo de verme sanguíneo, “um verme muito pequeno, parecido com a lombriga, que pode estar no sangue” a *Mansonella*, que é transmitido por um tipo de “mosquito” o pium. Esse verme causa uma doença chamada mansonelose. O objetivo deste projeto é estudar a ocorrência da doença e quais seus sintomas, por meio da realização de visitas nas casas da vizinhança, na área urbana de São Gabriel da Cachoeira que forem sorteadas.

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: Após leitura e assinatura do TCLE, pelos seus pais será coletado duas gotas sangue da polpa digital (ponta do dedo), por meio de uma lanceta estéril descartável (tipo de agulha), o que implica em apenas um pequeno incômodo passageiro e um risco mínimo, visto que poderá ocorrer por exemplo, a formação de uma pequena ferida no local da coleta e a possibilidade de infecção no orifício causado pela lanceta. Quanto à possibilidade de infecção no orifício gerado pela lanceta, este risco será minimizado pela utilização de lancetas descartáveis, além disso, os procedimentos de limpeza serão adotados e após os procedimento de coleta será colocado um bandaid no local lesionado. Qualquer risco ocasionado por esse procedimento será resolvido pela equipe de pesquisa. Todas as medidas de seguranças serão adotadas, e os profissionais durante a coleta de sangue estarão luvas, jalecos e máscaras. A coleta de sangue da polpa digital servirá para realização de gota espessa (teste parecido com o da malária) e coleta em papel filtro.

Seus pais ou responsáveis, junto com você irão responder um questionário, que você pode querer ou não responder, Nenhuma imagem sua ou seu nome serão identificados para manter seu direito de segredo sobre sua saúde. Se você aceitar participar desta pesquisa, terá como benefício direto o diagnóstico para mansonelose, Você e seus pais receberão o resultado desta pesquisa e caso você

tenha o verme, um médico irá tratar de você, além de você ajudar a pesquisarmos como anda a saúde de você, seu bairro e sua cidade.

Para participar desta pesquisa, você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Entretanto, caso ocorra algum dano decorrente de sua participação nesta pesquisa você terá o direito à indenização. Você, após o esclarecimento sobre o projeto, é livre para dizer que quer participar ou recusar-se a participar e poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. 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 fornecido a seus pais ou responsáveis. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos previstos na pesquisa.

Em caso de dúvidas ou outras informações a respeito do projeto você ou seus responsáveis podem entrar em contato com pesquisador responsável pela pesquisa, **Felipe Arley Costa Pessoa**, através dos telefones (92) 3221 2323/ (92) 98839 3577 (pode ligar a cobrar) e também através do endereço Rua Terezina, 476 – Adrianópolis – CEP – 69057-070, Manaus-AM ou ainda pelo e-mail: facpessoa@amazonia.fiocruz.br.

Caso queira entrar em contato com o Comitê de Ética em pesquisa em Seres Humanos que avaliou e aprovou o projeto, os dados do CEP para eventuais dúvidas relativas à eticidade da pesquisa: Av. Brasil, 4036, sala 705 - campus Expansão - Manguinhos - Tel.: 38829011 - cepfiocruz@ioc.fiocruz.br.

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos tem por objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Dessa forma o comitê tem o papel de avaliar e monitorar o andamento do projeto de modo que a pesquisa respeite os princípios éticos de proteção aos direitos humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade dos participantes.

DECLARAÇÃO DO (A) PARTICIPANTE:

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____, responsável pelo menor _____, fui informado (a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Assinatura do (a) Responsável

Assinatura do (a) Pesquisador (a)

ASSENTIMENTO

Eu, menor voluntário _____, fui informado (a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas. Concordo em participar do estudo.

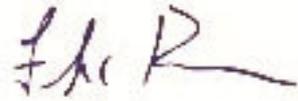
São Gabriel da Cachoeira, AM _____ de _____ de 20

Assinatura do participante

ou impressão digital



Assinatura do (a) Pesquisador(a)


Felipe Arley Costa Pessoa
Pesquisador em Saúde pública
INSTITUTO LEÔNIDAS & MARIA
DEANE
Siape 1557609

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (14 a 17 anos)

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: **“Epidemiologia da *Mansonella perstans* e *M. ozzardi* em área urbana de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil”**. Nesta pesquisa, pretendemos colher uma pequena quantidade de seu sangue do dedo (coleta da polpa digital) para observar se está contaminado com um tipo de verme sanguíneo, a *Mansonella*, que é transmitido por um tipo de “mosquito” o pium. Esse verme causa uma doença chamada mansonelose que atinge muitas pessoas em algumas áreas do Amazonas, que pode causar dor de cabeça, dores articulares e febre. O objetivo deste projeto é estudar a ocorrência da doença e quais seus sintomas, por meio da realização de um estudo epidemiológico (inquérito) nos bairros e casas da área urbana de São Gabriel da Cachoeira que forem sorteadas.

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: Após leitura e assinatura do TCLE, será aplicado um questionário contendo informações clínicas e posteriormente será coletado duas gotas sangue da polpa digital (ponta do dedo), por meio de uma lanceta estéril descartável, o que implica em apenas um pequeno incômodo passageiro e um risco mínimo, visto que poderá ocorrer por exemplo, a formação de um pequeno hematoma no local da coleta e a possibilidade de infecção no orifício causado pela lanceta. Entretanto, entende-se que você não será submetido a riscos adicionais àqueles necessários à coleta de sangue. Quanto à possibilidade de infecção no orifício gerado pela lanceta, este risco será minimizado pela utilização de lancetas descartáveis, além disso, os procedimentos de assepsia serão adotados e após os procedimento de coleta será colocado um bandaid no local lesionado. Qualquer risco ocasionado por esse procedimento será resolvido pela equipe de pesquisa. Todas as medidas de segurança serão adotadas, e os profissionais durante a coleta de sangue estarão utilizando EPI. A coleta de sangue da polpa digital servirá para realização de gota espessa e coleta em papel filtro (somente será coletado o sangue da polpa digital, não será realizado nenhum procedimento de punção venosa).

Poderá haver ainda o risco decorrente da aplicação do questionário (Ficha Clínica), podendo ocorrer um leve desconforto ao responder a quaisquer um dos itens questionados pelo Médico(a) que realizará a aplicação do questionário. Com a

finalidade de assegurar o sigilo, privacidade e confidencialidade de suas informações, o Termo de Consentimento e o questionário receberá um código numérico de identificação para sua identificação (podendo ser também utilizado as iniciais do seu nome) para posterior lançamento das informações no banco de dados do projeto e futura análise das variáveis de interesse na pesquisa (neste banco de dados não constará o seu nome, somente o código numérico de identificação).

Se você aceitar participar desta pesquisa, terá como benefício direto o diagnóstico para mansonelose, que pode ser causada tanto por *M. perstans* como por *M. ozzardi*. Você receberá o resultado desta pesquisa e caso o diagnóstico seja positivo para mansonelose, você será atendido por um Médico(a) da equipe deste estudo, onde receberá atendimento, acompanhamento e tratamento específico para filariose.

Além dos benefícios diretos, esta pesquisa trará ainda benefícios indiretos, visto que o inquérito realizado trará a verdadeira dimensão da mansonelose na área urbana de São Gabriel da Cachoeira, podendo ser utilizado como subsídio para a elaboração de políticas de vigilância em saúde e controle da mansonelose na região. E, a detecção de bactérias do gênero *Wolbachia* nas microfilárias também poderá dar subsídios a propostas futuras de tratamento alternativo além dos existentes atualmente, já que as filárias que infectam humanos estão associadas a essas bactérias (que podem ser eliminadas por antibióticos), e quando eliminadas, causam esterilidade e morte de vermes fêmeas.

Para participar desta pesquisa, você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Entretanto, caso ocorra algum dano decorrente de sua participação nesta pesquisa você terá o direito à indenização. 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. 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 é para ser entregue aos seus pais para guardar e a outra é do pesquisador responsável. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade, atendendo a legislação brasileira

(Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos previstos na pesquisa.

Em caso de dúvidas ou outras informações a respeito do projeto você pode entrar em contato com pesquisador responsável pela pesquisa, **Felipe Arley Costa Pessoa**, através dos telefones(92) 3621 2335/ (92) 98839 3577, podendo ligar a cobrar e também através do endereço Rua Teresina, 476 – Adrianópolis – CEP – 69057-070, Manaus-AM ou ainda pelo e-mail: facpessoa@amazonia.fiocruz.br.

Caso queira entrar em contato com o Comitê de Ética em pesquisa em Seres Humanos que avaliou e aprovou o projeto, os dados do CEP para eventuais dúvidas relativas à eticidade da pesquisa: Av. Brasil, 4036, sala 705 - campus Expansão - Manguinhos - Tel.: 38829011 - cepfiocruz@ioc.fiocruz.br.

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos tem por objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Dessa forma o comitê tem o papel de avaliar e monitorar o andamento do projeto de modo que a pesquisa respeite os princípios éticos de proteção aos direitos humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade dos participantes.

ASSENTIMENTO DO MENOR DE IDADE EM PARTICIPAR COMO VOLUNTÁRIO

Eu, _____, 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. Meu (minha) responsável recebeu uma via original deste termo de assentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

São Gabriel da Cachoeira, AM _____ de _____ de 20 .

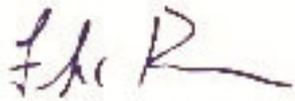
Assinatura do participante

ou impressão digital



Assinatura do (a) Pesquisador(a)

Assinatura do responsável


Felipe Arley Costa Pessoa
Pesquisador em Saúde pública
INSTITUTO LEÔNIDAS & MARIA
DEANE
Siape 1557609

Anexo B – Questionário de pesquisa

**MANSONELOSE NO MUNICÍPIO
DE SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA**

QUESTIONÁRIO DE PESQUISA (SÓCIO-DEMOGRÁFICO)

Nº Questionário _____

Entrevistador: _____ **Entrevistado:** _____

Endereço: _____

Bairro: _____ **Nº da Casa:** _____

Telefone: _____ **Coordenadas (GPS) Nº do ponto:** _____

Nome completo: _____

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

Sexo: () M () F **Naturalidade:** _____

Quanto tempo reside na área: _____ **Nº de residentes:** _____

Onde residiu anteriormente: _____ **Por quanto tempo:** _____

Qual o período em que residiu fora de São Gabriel da Cachoeira: _____

Ocupação: _____

Local onde exerce a ocupação: () No centro de São Gabriel da Cachoeira

() Fora do centro de São Gabriel da Cachoeira

Local de trabalho: _____

Retorna no mesmo dia para casa: () Sim () Não **Quanto tempo fica fora de casa:** _____

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

() 12 ou mais anos () Não se aplica

Conhece Pium/ Maruim/ Borrachudo: () Sim () Não

Você é picado frequentemente: () Sim () Não

Nº Questionário_____

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

Tuberculose: () Sim () Não

Houve tratamento nos últimos 2 anos: () Sim () Não

Medicamento utilizado: _____ **Por quanto tempo:**_____

Houve diagnóstico: () Sim () Não **Onde:** _____

Como foi feito o diagnóstico: _____

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

() sudorese/ suadeira () tremedeira/calafrios () frieza nas pernas () íngua

() tonturas () cansaço constante () dormência nas pernas

Características da casa – Localização

Em relação a floresta/vegetal: () perto ≤ 100m () longe > 100m

Em relação ao igarapé: () perto ≤ 100m () longe > 100m

Em relação ao rio: () perto ≤ 100m () longe > 100m

Parede – tipo: () madeira () alvenaria () taipa/ pau-a-pique () palha

() lona/plástico () outro_____

Parede – estado: () com frestas () sem frestas **Casa telada:** () Sim () Não

A família cria animais: () Sim () Não

Se sim, número aproximado de:

Cachorros_____ Gatos_____ Galinhas_____

Outros animais domésticos:_____

Animais silvestres:_____