



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**ESTUDOS SOBRE A COMPETÊNCIA VETORIAL DE POPULAÇÕES DE
MOSQUITOS (DIPTERA, CULICIDAE) DA REGIÃO METROPOLITANA DO
RECIFE, PERNAMBUCO E DE CAMPINAS, SÃO PAULO, BRASIL, PARA
Dirofilaria immitis (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE)**

GÍLCIA APARECIDA DE CARVALHO SILVA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando Salgueirosa de Andrade

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>GÍLCIA APARECIDA DE CARVALHO SILVA.</u>
e aprovada pela Comissão Julgadora. <u>[Assinatura]</u> <u>24-JAN-2006</u>

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Campinas - SP
2006

UNIDADE 73c
Nº CHAMADA T/UNICAMP
Si.38e
V EX
TOMBO BCI 67409
PROC 16-P.00123.06
C X
PREÇO 11.00
DATA 17/03/06
Nº CPD

Bib. n.º 375691

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Si38e

Silva, Gílcia Aparecida de Carvalho

Estudos sobre a competência vetorial de populações de mosquitos (Diptera, Culicidae) da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco e de Campinas, São Paulo, Brasil para *Dirofilaria immitis* (Nematoda, Onchocercidae) / Gílcia Aparecida de Carvalho. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Carlos Fernando Salgueirosa de Andrade.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Dirofilaria immitis*. 2. Mosquito como transmissão de doenças. 3. Susceptibilidade a doença. I. Andrade, Carlos Fernando Salgueirosa de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Vectorial competence studies of mosquitoes populations (Diptera, Culicidae) of Metropolitan Region of Recife, Pernambuco and Campinas, São Paulo, Brazil, to *Dirofilaria immitis* (Nematoda, Onchocercidae).

Palavras-chave em inglês: *Dirofilaria immitis*; Mosquitoes as carriers of disease; Disease susceptibility.

Área de concentração: Entomologia.

Titulação: Doutora em Parasitologia.

Banca examinadora: Carlos Fernando Salgueirosa de Andrade, Angelo Pires do Prado, Silmara Marques Allegretti, Leucio Câmara Alves, Mário Antonio Navarro da Silva.

Data da defesa: 24/01/2006.

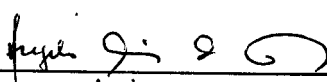
Campinas, 24 de janeiro de 2006.

Banca Examinadora

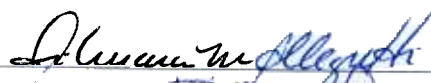
Prof. Dr.
Carlos Fernando Salgueirosa de Andrade


Assinatura

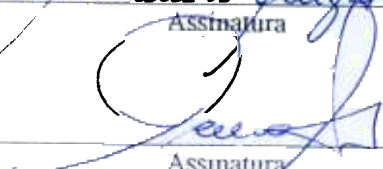
Prof. Dr.
Ângelo Pires do Prado


Assinatura

Profª. Dra.
Silmara Marques Allegretti


Assinatura

Prof. Dr.
Leucio Câmara Alves


Assinatura

Prof. Dr.
Mário Antonio Navarro da Silva


Assinatura

Profª. Dra
Marlene Tiduko Ueta

Assinatura

Profª. Dra.
Ana Maria Aparecida Guaraldo

Assinatura

Dra.
Carmen Maria Ambrós Ginarte

Assinatura

DEDICATÓRIA

À minha filha Gabriela Carvalho Silva, ao meu esposo Edson Ferreira da Silva e aos meus pais Francisco Alicindo de Carvalho e Genny Giamarco de Carvalho, por todo o amor, incentivo, dedicação e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A *Deus* por iluminar o meu caminho.

Ao Prof. Dr. Carlos Fernando Salgueirosa de Andrade pela confiança, amizade e orientação.

Ao Prof. Dr. Leucio Câmara Alves pela orientação, dedicação, paciência, ensinamentos, apoio, companheirismo e amizade durante todas as etapas deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Nelson da Silva Cordeiro, Silmara Marques Allegretti, Odair Benedito Ribeiro, Ângelo Pires do Prado e Leucio Câmara Alves pelas sugestões durante os Exames de Qualificação e Prévio.

Aos pesquisadores dos Departamentos de Entomologia e de Biologia Celular do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fiocruz, Recife, PE, pela fundamental colaboração.

Ao Biólogo Rafael Trindade Maia pela amizade e apoio constante durante as pesquisas de campo e de laboratório.

A Profa. Dra. Maria Aparecida da Glória Faustino e ao Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva pela leitura e correções do manuscrito com valiosas sugestões.

À minha amiga Giovanna Garcia Fagundes pelo companheirismo e muitas sugestões em todos os momentos.

À minha amiga Déborah Regina Serrano (*in memoriam*) pelo carinho e incentivo.

A Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta, ao Rubens Madi e ao Isaías Cabrini pela amizade e apoio.

Aos docentes e funcionários dos Departamentos de Parasitologia e de Zoologia, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, por permitir o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, que auxiliaram nos trabalhos de campo e de laboratório. Em especial aos amigos Fábio L. C. Brito, Carlos A. N. Ramos, Eduardo H. L. Machado, Edmilson Oliveira e Frederico Celso L. Maia.

Ao cãozinho doador de microfilárias e seus proprietários.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

RESUMO

ABSTRACT

	Página
1 – INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 – Agente Etiológico	1
1.2 – Ciclo Biológico	2
1.3 – Distribuição Geográfica e Prevalência	4
1.4 – Vetores	7
1.5 – Competência vetorial para a transmissão de <i>D. immitis</i>	9
1.6 – Reações imunes do vetor à <i>D. immitis</i>	12
2 – OBJETIVOS	15
2.1 – Geral	15
2.2 – Específicos	15
CAPÍTULO 1	
3 - FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO POR <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE) EM CÃES DOMICILIADOS NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE E NO MUNICÍPIO DE BEZERROS, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL	16
Resumo	17
3.1 – INTRODUÇÃO	17
3.2 – MATERIAL E MÉTODOS	20
3.2.1 – Áreas de Estudo	20
3.2.2 – Animais	22
3.2.3 – Coleta de sangue	22
3.2.4 – Processamento do Material	23
3.2.4.1 – Teste Parasitológico	23
3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
3.4 – CONCLUSÃO.....	27
3.5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

CAPÍTULO 2

4 – COMPETÊNCIA VETORIAL DE <i>Culex quinquefasciatus</i> SAY, 1823 (DIPTERA, CULICIDAE) EXPOSTO A DIFERENTES DENSIDADES DE MICROFILÁRIAS DE <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856)(NEMATODA, ONCHOCERCIDAE).....	33
Resumo	34
4.1 – INTRODUÇÃO	34
4.2 – MATERIAL E MÉTODOS	35
4.2.1 – Criação e manutenção dos mosquitos utilizados nos experimentos	35
4.2.2 - Obtenção de microfilárias de <i>D. immitis</i>	36
4.2.2.1 - Coleta do sangue	36
4.2.2.2 – Processamento do Material	36
4.2.3 - Exposições experimentais dos mosquitos as microfilárias de <i>D. immitis</i>	36
4.2.3.1 – Teste preliminar	36
4.2.3.2 - Exposições experimentais	37
4.2.4 - Dissecção dos mosquitos e observação de larvas de <i>D. immitis</i>	39
4.2.5 – Análise da competência vetorial de <i>Cx. quinquefasciatus</i> para transmitir <i>D. immitis</i>	39
4.2.6 – Análise Estatística	40
4.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.4 – CONCLUSÃO.....	47
4.5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

CAPÍTULO 3

5 – EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DE DUAS POPULAÇÕES E DE UMA LINHAGEM DE <i>Aedes aegypti</i> LINNAEUS, 1762 E DE UMA POPULAÇÃO DE <i>Aedes albopictus</i> SKUSE, 1894 (DIPTERA, CULICIDAE) À <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856)(NEMATODA, ONCHOCERCIDAE)	52
Resumo	53
5.1 – INTRODUÇÃO	53
5.2 – MATERIAL E MÉTODOS	54
5.2.1 – Criação dos mosquitos utilizados nos experimentos.....	54
5.2.2 - Obtenção de microfilárias de <i>D. immitis</i>	55

	Página
5.2.2.1 - Coleta do sangue	55
5.2.3 - Exposições experimentais dos mosquitos as microfilárias de <i>D. immitis</i>	55
5.2.4 - Dissecção dos mosquitos e observação de larvas de <i>D. immitis</i>	56
5.2.5 – Análise Estatística	57
5.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.4 – CONCLUSÃO.....	66
5.5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
CAPÍTULO 4	
6 – ESTUDOS SOBRE A MELANIZAÇÃO DE LARVAS DE <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE) EM <i>Culex quinquefasciatus</i> SAY, 1823, <i>Aedes aegypti</i> LINNAEUS, 1762 E <i>Aedes albopictus</i> SKUSE, 1894 (DIPTERA, CULICIDAE)	71
Resumo	72
6.1 – INTRODUÇÃO	72
6.2 – MATERIAL E MÉTODOS	73
6.2.1 – Criação e manutenção dos mosquitos utilizados nos experimentos	73
6.2.2 - Obtenção de microfilárias de <i>D. immitis</i>	74
6.2.2.1 - Coleta do sangue	75
6.2.3 - Exposições experimentais dos mosquitos as microfilárias de <i>D. immitis</i>	75
6.2.4 - Dissecção dos mosquitos e observação de larvas de <i>D. immitis</i>	75
6.2.5 – Análise Estatística	76
6.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
6.4 – CONCLUSÃO.....	81
6.5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
7 – CONCLUSÕES GERAIS	85
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXO 1	100
ANEXO 2	102
ANEXO 3	104

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 1	
3 - FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO POR <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE) EM CÃES DOMICILIADOS NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE E NO MUNICÍPIO DE BEZERROS, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL	16
Tabela 1 – Localização e área dos municípios do Estado de Pernambuco onde o estudo foi desenvolvido.....	22
Tabela 2 – Número de cães infectados com <i>D. immitis</i> e/ou <i>D. reconditum</i> na Região Metropolitana do Recife e em Bezerros no agreste pernambucano.....	24
CAPÍTULO 2	
4 – COMPETÊNCIA VETORIAL DE <i>Culex quinquefasciatus</i> SAY, 1823 (DIPTERA, CULICIDAE) EXPOSTO A DIFERENTES DENSIDADES DE MICROFILÁRIAS DE <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856)(NEMATODA, ONCHOCERCIDAE).....	33
Tabela 1 – Número de fêmeas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> população RECIFE alimentadas com sangue contendo diferentes densidades de microfilárias de <i>D. immitis</i> e com sangue sadio (Controle)	37
Tabela 2 – Porcentagem de fêmeas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> população RECIFE ingurgitadas, após alimentação com diferentes densidades de microfilárias de <i>D. immitis</i> / ml de sangue (mf/ml) em alimentador artificial, com respectiva média de mf ingeridas e Índice de eficiência vetorial (IEV)	45
Tabela 3 – Razão de infecção (%) de <i>Cx. quinquefasciatus</i> população RECIFE exposta experimentalmente a diferentes densidades de microfilárias de <i>D. immitis</i>	46
CAPÍTULO 3	
5 –EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DE DUAS POPULAÇÕES E DE UMA LINHAGEM DE <i>Aedes aegypti</i> LINNAEUS, 1762 E DE UMA POPULAÇÃO DE <i>Aedes albopictus</i> SKUSE, 1894 (DIPTERA, CULICIDAE) À <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856)(NEMATODA, ONCHOCERCIDAE)	52

Tabela 1 – Índice de eficiência vetorial (IEV) de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER e <i>Ae. albopictus</i> população RECIFE, alimentadas com sangue canino com a densidade de 2000 microfilárias de <i>D. immitis</i> /ml de sangue em membrana artificial, com respectivas médias e desvios padrões (DP) de microfilárias (mf) ingeridas e de larvas infectantes	65
---	----

Tabela 2 – Número de fêmeas dissecadas e número de fêmeas infectadas de <i>Ae. aegypti</i> populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER e <i>Ae. albopictus</i> população RECIFE, alimentadas com sangue canino com a densidade de 2000 microfilárias de <i>D. immitis</i> /ml de sangue	65
---	----

CAPÍTULO 4

6 – ESTUDOS SOBRE A MELANIZAÇÃO DE LARVAS DE <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE) EM <i>Culex quinquefasciatus</i> SAY, 1823, <i>Aedes aegypti</i> LINNAEUS, 1762 E <i>Aedes albopictus</i> SKUSE, 1894 (DIPTERA, CULICIDAE)	71
--	----

Tabela 1 – Porcentagens de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i> população RECIFE, <i>Aedes albopictus</i> população RECIFE e <i>Ae. aegypti</i> populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER apresentando, ou não, o processo de melanização contra as larvas de <i>D. immitis</i>	80
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1 – INTRODUÇÃO GERAL	1
Figura 1 – Representação esquemática do ciclo biológico de <i>Dirofilaria immitis</i> (LABARTHE <i>et al.</i> , 2002)	4
 CAPÍTULO 1	
3 - FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO POR <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE) EM CÃES DOMICILIADOS NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE E NO MUNICÍPIO DE BEZERROS, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL	16
Figura 1 – Mapa do Estado de Pernambuco com a localização das áreas estudadas com destaque ao município de Bezerros na Região Agreste e locais da Região Metropolitana do Recife.....	21
Figura 2 – Microfilária (larva de 1º estágio) de <i>D. immitis</i> encontrada no sangue de cão infectado por meio do método modificado de Knott (472x)	25
 CAPÍTULO 2	
4 – COMPETÊNCIA VETORIAL DE <i>Culex quinquefasciatus</i> SAY, 1823 (DIPTERA, CULICIDAE) EXPOSTO A DIFERENTES DENSIDADES DE MICROFILÁRIAS DE <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856)(NEMATODA, ONCHOCERCIDAE).....	33
Figura 1A – Alimentação artificial de <i>Culex quinquefasciatus</i> população RECIFE por meio de membrana com pele de <i>Coturnix coturnix</i> (codorna), com sangue canino contendo microfilárias de <i>D. immitis</i>	38
Figura 1B – Desenho esquemático do alimentador artificial	38
Figura 2 – Porcentagem de mortalidade de <i>Cx. quinquefasciatus</i> população RECIFE após alimentação com sangue contendo diferentes densidades de microfilárias de <i>D. immitis</i>	43
Figura 3 – Porcentagem de mortalidade dos cinco grupos Controle de <i>Cx. quinquefasciatus</i> população RECIFE após alimentação com sangue sadio.....	43

CAPÍTULO 3

Página

5 –EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DE DUAS POPULAÇÕES E DE UMA LINHAGEM DE <i>Aedes aegypti</i> LINNAEUS, 1762 E DE UMA POPULAÇÃO DE <i>Aedes albopictus</i> SKUSE, 1894 (DIPTERA, CULICIDAE) À <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE)	52
---	----

Figura 1 – Porcentagem de mortalidade de <i>Ae. aegypti</i> populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER e de <i>Ae. albopictus</i> população RECIFE expostas a densidade de 2000 microfilárias de <i>D. immitis</i> por mililitro de sangue.....	59
--	----

Figura 2A – Estágio salsichóide de <i>D. immitis</i> isolada de túbulo de Malpighi de <i>Ae. albopictus</i> população RECIFE (153,5x)	62
--	----

Figura 2B – Larvas de 2º estágio de <i>D. immitis</i> em túbulos de Malpighi de <i>Ae. albopictus</i> população RECIFE (58,5x)	62
---	----

Figura 2C – Larvas infectantes de <i>D. immitis</i> em probóscide de <i>Ae. aegypti</i> linhagem ROCKFELLER (51,7x)	62
--	----

Figura 2D – Larva de 3º estágio de <i>D. immitis</i> isolada da probóscide de <i>Ae. aegypti</i> linhagem ROCKFELLER (54x)	62
---	----

CAPÍTULO 4

6 – ESTUDOS SOBRE A MELANIZAÇÃO DE LARVAS DE <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE) EM <i>Culex quinquefasciatus</i> SAY, 1823, <i>Aedes aegypti</i> LINNAEUS, 1762 E <i>Aedes albopictus</i> SKUSE, 1894 (DIPTERA, CULICIDAE)	71
--	----

Figura 1A – Larva de 1º estágio de <i>D. immitis</i> melanizada em túbulo de Malpighi de <i>Ae. aegypti</i> linhagem ROCKFELLER (56,3x)	77
--	----

Figura 1B – Larva de 1º estágio de <i>D. immitis</i> melanizada, isolada do túbulo de Malpighi de <i>Ae. aegypti</i> linhagem ROCKFELLER (107x)	77
--	----

Figura 1C – Larva no estágio salsichóide de <i>D. immitis</i> melanizada em túbulo de Malpighi de <i>Ae. aegypti</i> linhagem ROCKFELLER (60x)	77
---	----

Figura 1D – Larva de 2º estágio de <i>D. immitis</i> melanizada em túbulo de Malpighi de <i>Ae. aegypti</i> linhagem ROCKFELLER (70x)	77
--	----

RESUMO

Mosquitos pertencentes aos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Mansonia*, *Psorophora* e *Coquillettidia* são susceptíveis à infecção por *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856), podendo transmitir o filarídeo aos cães e gatos. Os vetores de *D. immitis* no Brasil são conhecidos apenas nos Estados do Rio de Janeiro e do Maranhão, fazendo-se necessária a investigação da susceptibilidade e da competência vetorial de espécies existentes nos demais Estados brasileiros. O presente trabalho teve por finalidade verificar a frequência de infecção por *D. immitis* em cães domiciliados na Região Metropolitana do Recife, bem como avaliar a susceptibilidade e a competência vetorial de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 e *Ae. albopictus* Skuse, 1894 provenientes de área endêmica e não endêmica para a transmissão desse filarídeo, em condições experimentais. A resposta imune humoral (melanização) apresentada pelos mosquitos expostos à infecção também foi avaliada. Para a realização do inquérito epidemiológico, 816 amostras de sangue canino foram coletadas nas áreas costeiras da Região Metropolitana do Recife e no município de Bezerros, agreste do Estado de Pernambuco. As amostras sangüíneas foram analisadas por meio de teste parasitológico para a pesquisa de microfilárias de *D. immitis*, utilizando-se o método modificado de Knott. Para a avaliação da competência vetorial *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE, *Ae. aegypti* populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER e *Ae. albopictus* população RECIFE foram criados em insetário sob condições controladas ($28 \pm 1^\circ\text{C}$ e $80 \pm 5\%$ de umidade relativa do ar). As fêmeas das espécies estudadas foram alimentadas com sangue canino contendo diferentes densidades de microfilárias de *D. immitis*, por meio de membrana artificial confeccionada com pele fresca de animal. Para *Cx. quinquefasciatus*, que é uma espécie ornitofílica, foi utilizada pele de codorna, e para *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* a membrana artificial foi confeccionada com pele de rato. Os resultados obtidos no estudo mostraram frequência de 3,61%, 7,89% e 7,69% de cães infectados na Ilha de Itamaracá, Igarassu e Recife, respectivamente. Após as infecções experimentais, observou-se que a mortalidade de *Cx. quinquefasciatus* não foi influenciada pela exposição a diferentes densidades de microfilárias de *D. immitis* ($F = 0,0615$, $p > 0,05$) e os índices encontrados variaram de 8,9% a 36,25%. Os índices de eficiência vetorial (IEV) apresentados por *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE variaram de 7,8% a 56,5%. Em relação à razão de infecção, o maior índice foi encontrado no grupo de fêmeas expostas a

densidade de 1913 microfilárias/ml, entretanto, não foi influenciado pela taxa de ingurgitamento das fêmeas ($F=3,2937$, $p>0,05$). Por meio de melanização, *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE, limitou a intensidade do parasitismo, promovendo o equilíbrio da relação parasito-hospedeiro e deste modo passando a ser um excelente vetor de *D. immitis* na Região Metropolitana do Recife. Dentre as espécies de *Aedes* estudadas, verificou-se que a população RECIFE de *Ae. aegypti* apresentou maior mortalidade (70,7%) ao final dos experimentos, apresentando diferença estatisticamente significativa ($p<0,01$) em relação à linhagem ROCKFELLER, população UNICAMP e *Ae. albopictus* população RECIFE, que não diferiram entre si ($p>0,05$). Em relação ao índice de eficiência vetorial (IEV) foi detectado um índice de 7,4% para a linhagem ROCKFELLER e uma variação de 20,0% a 53,8% para as populações de *Ae. aegypti* e 25,2% para *Ae. albopictus* população RECIFE. O maior número de larvas de *D. immitis* infectantes na probóscide foi apresentado por *Ae. albopictus* população RECIFE, além de uma baixa mortalidade. Desta forma, esta população mostrou-se susceptível ao filarídeo e por apresentar baixa mortalidade, foi considerada como a melhor vetora. *Ae. aegypti* população RECIFE não apresentou reação de melanização e apresentou mortalidade acentuada, enquanto que *Ae. aegypti* população UNICAMP e linhagem ROCKFELLER mostraram-se refratárias à infecção por *D. immitis*.

Palavras-chave: dirofilariose, mosquitos, susceptibilidade, transmissão

ABSTRACT

Mosquitoes belong to the genus *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Mansonia*, *Psorophora* and *Coquillettidia* are susceptible to infection of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) and some of them serve as vectors heartworm disease in dogs and cats. Although the potential vectors of canine heartworm in Brazil have been recorded only in Rio de Janeiro and Maranhão State and no more data are available. The objective of this study was to verify the frequency of heartworm infection in dogs in metropolitan region of Recife and also identify under experimental conditions their ability of *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 and *Ae. albopictus* Skuse, 1894 from enzootic and non enzootic areas to become infected with and transmit *D. immitis*. After the experimental infection of mosquitoes, the melanization response to larvae of *D. immitis* also was evaluated. The survey study were performed on a total of 816 dogs from costal areas of Metropolitan Region of Recife and Bezerros County, located in agreste area of Pernambuco State. Whole blood samples were collected from all animals and were examined for the presence of microfilariae of *D. immitis* by the modified Knott test. To verify the vector competence of *Cx. quinquefasciatus* RECIFE population, *Ae. aegypti* RECIFE, UNICAMP populations and also ROCKFELLER strain and *Ae. albopictus* RECIFE population, the mosquitoes were reared under constant insectary conditions ($28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ and $80 \pm 5\%$ relative humidity). Females mosquitoes, were exposed to blood's dog with different density of *D. immitis* microfilariae by artificial feeding apparatus made by fresh animal skin. For this purpose, ornithophilic *Cx. quinquefasciatus* was feeding by skin quail membrane, and for the *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* the artificial membrane was made by rat skin. The results of the survey study showed 3.61%, 7.89%, and 7.69% of heartworm infection frequency in dog from Itamaracá Island, Igarassu and the city of Recife respectively. The mortality of *Cx. quinquefasciatus* RECIFE population observed in the vector competence study did not show influence of different density of microfilariae of *D. immitis* ($F = 0.0615$, $p > 0.05$) and the mortality rate was 8.9% to 36.25%. The vector efficiency (VE) rates of *Cx. quinquefasciatus* RECIFE population were 7.8% to 56.5%. The higher infection rate was showed in females feeding with blood containing 1913 mf/ml, but no influence was observed in engorged females. The melanization response observed in *Cx. quinquefasciatus* was important for vector survival by limiting the number of larvae, acting as an important mechanism of parasitic-host interactions. The data

indicate that the *Cx. quinquefasciatus* RECIFE population should be an excellent vector of *D. immitis* at metropolitan region of Recife. Significant difference ($p < 0.01$) was observed in the mortality rates between the RECIFE population of *Ae. aegypti*, UNICAMP population, ROCKFELLER strain, and *Ae. albopictus* RECIFE population. Although no difference were observed between *Ae. aegypti* ROCKFELLER, UNICAMP and *Ae. albopictus* RECIFE population. The vector efficiency (VE) rates of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* RECIFE population were 7.4% to 53.8% and 25.2% respectively. Not only the high number of infective third stage larvae of *D. immitis* in mouth of mosquitoes but also low mortality was observed in *Ae. albopictus* RECIFE population. This data showed that this species is the best vector of heartworm infection in the study area. No melanization response was observed in *Ae. aegypti* RECIFE population but high mortality was reported. The UNICAMP population and ROCKFELLER strain of *Ae. aegypti* were refractory to infection to *D. immitis*.

Key words: Heartworm infection, mosquitoes, susceptibility, transmission

DEDICATÓRIA

À minha filha Gabriela Carvalho Silva, ao meu esposo Edson Ferreira da Silva e aos meus pais Francisco Alicindo de Carvalho e Genny Giamarco de Carvalho, por todo o amor, incentivo, dedicação e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A *Deus* por iluminar o meu caminho.

Ao Prof. Dr. Carlos Fernando Salgueirosa de Andrade pela confiança, amizade e orientação.

Ao Prof. Dr. Leucio Câmara Alves pela orientação, dedicação, paciência, ensinamentos, apoio, companheirismo e amizade durante todas as etapas deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Nelson da Silva Cordeiro, Silmara Marques Allegretti, Odair Benedito Ribeiro, Ângelo Pires do Prado e Leucio Câmara Alves pelas sugestões durante os Exames de Qualificação e Prévio.

Aos pesquisadores dos Departamentos de Entomologia e de Biologia Celular do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fiocruz, Recife, PE, pela fundamental colaboração.

Ao Biólogo Rafael Trindade Maia pela amizade e apoio constante durante as pesquisas de campo e de laboratório.

A Profa. Dra. Maria Aparecida da Glória Faustino e ao Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva pela leitura e correções do manuscrito com valiosas sugestões.

À minha amiga Giovanna Garcia Fagundes pelo companheirismo e muitas sugestões em todos os momentos.

À minha amiga Déborah Regina Serrano (*in memorian*) pelo carinho e incentivo.

A Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta, ao Rubens Madi e ao Isaías Cabrini pela amizade e apoio.

Aos docentes e funcionários dos Departamentos de Parasitologia e de Zoologia, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, por permitir o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, que auxiliaram nos trabalhos de campo e de laboratório. Em especial aos amigos Fábio L. C. Brito, Carlos A. N. Ramos, Eduardo H. L. Machado, Edmilson Oliveira e Frederico Celso L. Maia.

Ao cãozinho doador de microfilárias e seus proprietários.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

RESUMO

ABSTRACT

	Página
1 – INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 – Agente Etiológico	1
1.2 – Ciclo Biológico	2
1.3 – Distribuição Geográfica e Prevalência	4
1.4 – Vetores	7
1.5 – Competência vetorial para a transmissão de <i>D. immitis</i>	9
1.6 – Reações imunes do vetor à <i>D. immitis</i>	12
2 – OBJETIVOS	15
2.1 – Geral	15
2.2 – Específicos	15
 CAPÍTULO 1	
3 - FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO POR <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE) EM CÃES DOMICILIADOS NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE E NO MUNICÍPIO DE BEZERROS, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL	16
Resumo	17
3.1 – INTRODUÇÃO	17
3.2 – MATERIAL E MÉTODOS	20
3.2.1 – Áreas de Estudo	20
3.2.2 – Animais	22
3.2.3 – Coleta de sangue	22
3.2.4 – Processamento do Material	23
3.2.4.1 – Teste Parasitológico	23
3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
3.4 – CONCLUSÃO.....	27
3.5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

CAPÍTULO 2

4 – COMPETÊNCIA VETORIAL DE <i>Culex quinquefasciatus</i> SAY, 1823 (DIPTERA, CULICIDAE) EXPOSTO A DIFERENTES DENSIDADES DE MICROFILÁRIAS DE <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856)(NEMATODA, ONCHOCERCIDAE).....	33
Resumo	34
4.1 – INTRODUÇÃO	34
4.2 – MATERIAL E MÉTODOS	35
4.2.1 – Criação e manutenção dos mosquitos utilizados nos experimentos	35
4.2.2 - Obtenção de microfilárias de <i>D. immitis</i>	36
4.2.2.1 - Coleta do sangue	36
4.2.2.2 – Processamento do Material	36
4.2.3 - Exposições experimentais dos mosquitos as microfilárias de <i>D. immitis</i>	36
4.2.3.1 – Teste preliminar	36
4.2.3.2 - Exposições experimentais	37
4.2.4 - Dissecção dos mosquitos e observação de larvas de <i>D. immitis</i>	39
4.2.5 – Análise da competência vetorial de <i>Cx. quinquefasciatus</i> para transmitir <i>D. immitis</i>	39
4.2.6 – Análise Estatística	40
4.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.4 – CONCLUSÃO.....	47
4.5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

CAPÍTULO 3

5 – EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DE DUAS POPULAÇÕES E DE UMA LINHAGEM DE <i>Aedes aegypti</i> LINNAEUS, 1762 E DE UMA POPULAÇÃO DE <i>Aedes albopictus</i> SKUSE, 1894 (DIPTERA, CULICIDAE) À <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856)(NEMATODA, ONCHOCERCIDAE)	52
Resumo	53
5.1 – INTRODUÇÃO	53
5.2 – MATERIAL E MÉTODOS	54
5.2.1 – Criação dos mosquitos utilizados nos experimentos.....	54
5.2.2 - Obtenção de microfilárias de <i>D. immitis</i>	55

	Página
5.2.2.1 - Coleta do sangue	55
5.2.3 - Exposições experimentais dos mosquitos as microfilárias de <i>D. immitis</i>	55
5.2.4 - Dissecção dos mosquitos e observação de larvas de <i>D. immitis</i>	56
5.2.5 – Análise Estatística	57
5.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.4 – CONCLUSÃO.....	66
5.5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
CAPÍTULO 4	
6 – ESTUDOS SOBRE A MELANIZAÇÃO DE LARVAS DE <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE) EM <i>Culex quinquefasciatus</i> SAY, 1823, <i>Aedes aegypti</i> LINNAEUS, 1762 E <i>Aedes albopictus</i> SKUSE, 1894 (DIPTERA, CULICIDAE)	71
Resumo	72
6.1 – INTRODUÇÃO	72
6.2 – MATERIAL E MÉTODOS	73
6.2.1 – Criação e manutenção dos mosquitos utilizados nos experimentos	73
6.2.2 - Obtenção de microfilárias de <i>D. immitis</i>	74
6.2.2.1 - Coleta do sangue	75
6.2.3 - Exposições experimentais dos mosquitos as microfilárias de <i>D. immitis</i>	75
6.2.4 - Dissecção dos mosquitos e observação de larvas de <i>D. immitis</i>	75
6.2.5 – Análise Estatística	76
6.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
6.4 – CONCLUSÃO.....	81
6.5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
7 – CONCLUSÕES GERAIS	85
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXO 1	100
ANEXO 2	102
ANEXO 3	104

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 1	
3 - FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO POR <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE) EM CÃES DOMICILIADOS NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE E NO MUNICÍPIO DE BEZERROS, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL	16
Tabela 1 – Localização e área dos municípios do Estado de Pernambuco onde o estudo foi desenvolvido.....	22
Tabela 2 – Número de cães infectados com <i>D. immitis</i> e/ou <i>D. reconditum</i> na Região Metropolitana do Recife e em Bezerros no agreste pernambucano.....	24
CAPÍTULO 2	
4 – COMPETÊNCIA VETORIAL DE <i>Culex quinquefasciatus</i> SAY, 1823 (DIPTERA, CULICIDAE) EXPOSTO A DIFERENTES DENSIDADES DE MICROFILÁRIAS DE <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856)(NEMATODA, ONCHOCERCIDAE).....	33
Tabela 1 – Número de fêmeas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> população RECIFE alimentadas com sangue contendo diferentes densidades de microfilárias de <i>D. immitis</i> e com sangue sadio (Controle)	37
Tabela 2 – Porcentagem de fêmeas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> população RECIFE ingurgitadas, após alimentação com diferentes densidades de microfilárias de <i>D. immitis</i> / ml de sangue (mf/ml) em alimentador artificial, com respectiva média de mf ingeridas e Índice de eficiência vetorial (IEV)	45
Tabela 3 – Razão de infecção (%) de <i>Cx. quinquefasciatus</i> população RECIFE exposta experimentalmente a diferentes densidades de microfilárias de <i>D. immitis</i>	46
CAPÍTULO 3	
5 –EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DE DUAS POPULAÇÕES E DE UMA LINHAGEM DE <i>Aedes aegypti</i> LINNAEUS, 1762 E DE UMA POPULAÇÃO DE <i>Aedes albopictus</i> SKUSE, 1894 (DIPTERA, CULICIDAE) À <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856)(NEMATODA, ONCHOCERCIDAE)	52

Tabela 1 – Índice de eficiência vetorial (IEV) de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER e <i>Ae. albopictus</i> população RECIFE, alimentadas com sangue canino com a densidade de 2000 microfilárias de <i>D. immitis</i> /ml de sangue em membrana artificial, com respectivas médias e desvios padrões (DP) de microfilárias (mf) ingeridas e de larvas infectantes	65
---	----

Tabela 2 – Número de fêmeas dissecadas e número de fêmeas infectadas de <i>Ae. aegypti</i> populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER e <i>Ae. albopictus</i> população RECIFE, alimentadas com sangue canino com a densidade de 2000 microfilárias de <i>D. immitis</i> /ml de sangue	65
---	----

CAPÍTULO 4

6 – ESTUDOS SOBRE A MELANIZAÇÃO DE LARVAS DE <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE) EM <i>Culex quinquefasciatus</i> SAY, 1823, <i>Aedes aegypti</i> LINNAEUS, 1762 E <i>Aedes albopictus</i> SKUSE, 1894 (DIPTERA, CULICIDAE)	71
--	----

Tabela 1 – Porcentagens de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i> população RECIFE, <i>Aedes albopictus</i> população RECIFE e <i>Ae. aegypti</i> populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER apresentando, ou não, o processo de melanização contra as larvas de <i>D. immitis</i>	80
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1 – INTRODUÇÃO GERAL	1
Figura 1 – Representação esquemática do ciclo biológico de <i>Dirofilaria immitis</i> (LABARTHE <i>et al.</i> , 2002)	4
 CAPÍTULO 1	
3 - FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO POR <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE) EM CÃES DOMICILIADOS NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE E NO MUNICÍPIO DE BEZERROS, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL	16
Figura 1 – Mapa do Estado de Pernambuco com a localização das áreas estudadas com destaque ao município de Bezerros na Região Agreste e locais da Região Metropolitana do Recife.....	21
Figura 2 – Microfilária (larva de 1º estágio) de <i>D. immitis</i> encontrada no sangue de cão infectado por meio do método modificado de Knott (472x)	25
 CAPÍTULO 2	
4 – COMPETÊNCIA VETORIAL DE <i>Culex quinquefasciatus</i> SAY, 1823 (DIPTERA, CULICIDAE) EXPOSTO A DIFERENTES DENSIDADES DE MICROFILÁRIAS DE <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856)(NEMATODA, ONCHOCERCIDAE).....	33
Figura 1A – Alimentação artificial de <i>Culex quinquefasciatus</i> população RECIFE por meio de membrana com pele de <i>Coturnix coturnix</i> (codorna), com sangue canino contendo microfilárias de <i>D. immitis</i>	38
Figura 1B – Desenho esquemático do alimentador artificial	38
Figura 2 – Porcentagem de mortalidade de <i>Cx. quinquefasciatus</i> população RECIFE após alimentação com sangue contendo diferentes densidades de microfilárias de <i>D. immitis</i>	43
Figura 3 – Porcentagem de mortalidade dos cinco grupos Controle de <i>Cx. quinquefasciatus</i> população RECIFE após alimentação com sangue sadio.....	43

CAPÍTULO 3

Página

5 –EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DE DUAS POPULAÇÕES E DE UMA LINHAGEM DE <i>Aedes aegypti</i> LINNAEUS, 1762 E DE UMA POPULAÇÃO DE <i>Aedes albopictus</i> SKUSE, 1894 (DIPTERA, CULICIDAE) À <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE)	52
---	----

Figura 1 – Porcentagem de mortalidade de <i>Ae. aegypti</i> populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER e de <i>Ae. albopictus</i> população RECIFE expostas a densidade de 2000 microfilárias de <i>D. immitis</i> por mililitro de sangue.....	59
--	----

Figura 2A – Estágio salsichóide de <i>D. immitis</i> isolada de túbulo de Malpighi de <i>Ae. albopictus</i> população RECIFE (153,5x)	62
--	----

Figura 2B – Larvas de 2º estágio de <i>D. immitis</i> em túbulos de Malpighi de <i>Ae. albopictus</i> população RECIFE (58,5x)	62
---	----

Figura 2C – Larvas infectantes de <i>D. immitis</i> em probóscide de <i>Ae. aegypti</i> linhagem ROCKFELLER (51,7x)	62
--	----

Figura 2D – Larva de 3º estágio de <i>D. immitis</i> isolada da probóscide de <i>Ae. aegypti</i> linhagem ROCKFELLER (54x)	62
---	----

CAPÍTULO 4

6 – ESTUDOS SOBRE A MELANIZAÇÃO DE LARVAS DE <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE) EM <i>Culex quinquefasciatus</i> SAY, 1823, <i>Aedes aegypti</i> LINNAEUS, 1762 E <i>Aedes albopictus</i> SKUSE, 1894 (DIPTERA, CULICIDAE)	71
--	----

Figura 1A – Larva de 1º estágio de <i>D. immitis</i> melanizada em túbulo de Malpighi de <i>Ae. aegypti</i> linhagem ROCKFELLER (56,3x)	77
--	----

Figura 1B – Larva de 1º estágio de <i>D. immitis</i> melanizada, isolada do túbulo de Malpighi de <i>Ae. aegypti</i> linhagem ROCKFELLER (107x)	77
--	----

Figura 1C – Larva no estágio salsichóide de <i>D. immitis</i> melanizada em túbulo de Malpighi de <i>Ae. aegypti</i> linhagem ROCKFELLER (60x)	77
---	----

Figura 1D – Larva de 2º estágio de <i>D. immitis</i> melanizada em túbulo de Malpighi de <i>Ae. aegypti</i> linhagem ROCKFELLER (70x)	77
--	----

RESUMO

Mosquitos pertencentes aos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Mansonia*, *Psorophora* e *Coquillettidia* são susceptíveis à infecção por *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856), podendo transmitir o filarídeo aos cães e gatos. Os vetores de *D. immitis* no Brasil são conhecidos apenas nos Estados do Rio de Janeiro e do Maranhão, fazendo-se necessária a investigação da susceptibilidade e da competência vetorial de espécies existentes nos demais Estados brasileiros. O presente trabalho teve por finalidade verificar a frequência de infecção por *D. immitis* em cães domiciliados na Região Metropolitana do Recife, bem como avaliar a susceptibilidade e a competência vetorial de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 e *Ae. albopictus* Skuse, 1894 provenientes de área endêmica e não endêmica para a transmissão desse filarídeo, em condições experimentais. A resposta imune humoral (melanização) apresentada pelos mosquitos expostos à infecção também foi avaliada. Para a realização do inquérito epidemiológico, 816 amostras de sangue canino foram coletadas nas áreas costeiras da Região Metropolitana do Recife e no município de Bezerros, agreste do Estado de Pernambuco. As amostras sangüíneas foram analisadas por meio de teste parasitológico para a pesquisa de microfilárias de *D. immitis*, utilizando-se o método modificado de Knott. Para a avaliação da competência vetorial *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE, *Ae. aegypti* populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER e *Ae. albopictus* população RECIFE foram criados em insetário sob condições controladas ($28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $80 \pm 5\%$ de umidade relativa do ar). As fêmeas das espécies estudadas foram alimentadas com sangue canino contendo diferentes densidades de microfilárias de *D. immitis*, por meio de membrana artificial confeccionada com pele fresca de animal. Para *Cx. quinquefasciatus*, que é uma espécie ornitofílica, foi utilizada pele de codorna, e para *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* a membrana artificial foi confeccionada com pele de rato. Os resultados obtidos no estudo mostraram frequência de 3,61%, 7,89% e 7,69% de cães infectados na Ilha de Itamaracá, Igarassu e Recife, respectivamente. Após as infecções experimentais, observou-se que a mortalidade de *Cx. quinquefasciatus* não foi influenciada pela exposição a diferentes densidades de microfilárias de *D. immitis* ($F = 0,0615$, $p > 0,05$) e os índices encontrados variaram de 8,9% a 36,25%. Os índices de eficiência vetorial (IEV) apresentados por *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE variaram de 7,8% a 56,5%. Em relação à razão de infecção, o maior índice foi encontrado no grupo de fêmeas expostas a

densidade de 1913 microfilárias/ml, entretanto, não foi influenciado pela taxa de ingurgitamento das fêmeas ($F=3,2937$, $p>0,05$). Por meio de melanização, *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE, limitou a intensidade do parasitismo, promovendo o equilíbrio da relação parasito-hospedeiro e deste modo passando a ser um excelente vetor de *D. immitis* na Região Metropolitana do Recife. Dentre as espécies de *Aedes* estudadas, verificou-se que a população RECIFE de *Ae. aegypti* apresentou maior mortalidade (70,7%) ao final dos experimentos, apresentando diferença estatisticamente significativa ($p<0,01$) em relação à linhagem ROCKFELLER, população UNICAMP e *Ae. albopictus* população RECIFE, que não diferiram entre si ($p>0,05$). Em relação ao índice de eficiência vetorial (IEV) foi detectado um índice de 7,4% para a linhagem ROCKFELLER e uma variação de 20,0% a 53,8% para as populações de *Ae. aegypti* e 25,2% para *Ae. albopictus* população RECIFE. O maior número de larvas de *D. immitis* infectantes na probóscide foi apresentado por *Ae. albopictus* população RECIFE, além de uma baixa mortalidade. Desta forma, esta população mostrou-se susceptível ao filarídeo e por apresentar baixa mortalidade, foi considerada como a melhor vetora. *Ae. aegypti* população RECIFE não apresentou reação de melanização e apresentou mortalidade acentuada, enquanto que *Ae. aegypti* população UNICAMP e linhagem ROCKFELLER mostraram-se refratárias à infecção por *D. immitis*.

Palavras-chave: dirofilariose, mosquitos, susceptibilidade, transmissão

ABSTRACT

Mosquitoes belong to the genus *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Mansonia*, *Psorophora* and *Coquilleltidia* are susceptible to infection of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) and some of them serve as vectors heartworm disease in dogs and cats. Although the potential vectors of canine heartworm in Brazil have been recorded only in Rio de Janeiro and Maranhão State and no more data are available. The objective of this study was to verify the frequency of heartworm infection in dogs in metropolitan region of Recife and also identify under experimental conditions their ability of *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 and *Ae. albopictus* Skuse, 1894 from enzootic and non enzootic areas to become infected with and transmit *D. immitis*. After the experimental infection of mosquitoes, the melanization response to larvae of *D. immitis* also was evaluated. The survey study were performed on a total of 816 dogs from costal areas of Metropolitan Region of Recife and Bezerros County, located in agreste area of Pernambuco State. Whole blood samples were collected from all animals and were examined for the presence of microfilariae of *D. immitis* by the modified Knott test. To verify the vector competence of *Cx. quinquefasciatus* RECIFE population, *Ae. aegypti* RECIFE, UNICAMP populations and also ROCKFELLER strain and *Ae. albopictus* RECIFE population, the mosquitoes were reared under constant insectary conditions ($28 \pm 1^\circ\text{C}$ and $80 \pm 5\%$ relative humidity). Females mosquitoes, were exposed to blood's dog with different density of *D. immitis* microfilariae by artificial feeding apparatus made by fresh animal skin. For this purpose, ornithophilic *Cx. quinquefasciatus* was feeding by skin quail membrane, and for the *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* the artificial membrane was made by rat skin. The results of the survey study showed 3.61%, 7.89%, and 7.69% of heartworm infection frequency in dog from Itamaracá Island, Igarassu and the city of Recife respectively. The mortality of *Cx. quinquefasciatus* RECIFE population observed in the vector competence study did not show influence of different density of microfilariae of *D. immitis* ($F = 0.0615$, $p > 0.05$) and the mortality rate was 8.9% to 36.25%. The vector efficiency (VE) rates of *Cx. quinquefasciatus* RECIFE population were 7.8% to 56.5%. The higher infection rate was showed in females feeding with blood containing 1913 mf/ml, but no influence was observed in engorged females. The melanization response observed in *Cx. quinquefasciatus* was important for vector survival by limiting the number of larvae, acting as an important mechanism of parasitic-host interactions. The data

indicate that the *Cx. quinquefasciatus* RECIFE population should be an excellent vector of *D. immitis* at metropolitan region of Recife. Significant difference ($p < 0.01$) was observed in the mortality rates between the RECIFE population of *Ae. aegypti*, UNICAMP population, ROCKFELLER strain, and *Ae. albopictus* RECIFE population. Although no difference were observed between *Ae. aegypti* ROCKFELLER, UNICAMP and *Ae. albopictus* RECIFE population. The vector efficiency (VE) rates of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* RECIFE population were 7.4% to 53.8% and 25.2% respectively. Not only the high number of infective third stage larvae of *D. immitis* in mouth of mosquitoes but also low mortality was observed in *Ae. albopictus* RECIFE population. This data showed that this species is the best vector of heartworm infection in the study area. No melanization response was observed in *Ae. aegypti* RECIFE population but high mortality was reported. The UNICAMP population and ROCKFELLER strain of *Ae. aegypti* were refractory to infection to *D. immitis*.

Key words: Heartworm infection, mosquitoes, susceptibility, transmission

1 – INTRODUÇÃO GERAL

A dirofilariose canina é uma doença parasitária de caráter zoonótico de distribuição cosmopolita, que pode atingir taxas de prevalência superiores a 50% em determinadas áreas geográficas, levando os cães a óbito (LUZON-PENA & GÓMEZ-BAUTISTA, 1993). Frequentemente os parasitas localizam-se nas artérias pulmonares e no ventrículo direito do coração de cães, podendo ainda ser encontrado erraticamente no cérebro, espaço epidural, artéria femural, no interior de abscessos no membro pélvico e globo ocular destes animais (GRIEVE *et al.*, 1983). Tais parasitas podem acometer também felinos e outros mamíferos, incluindo o homem (OMS, 1979). Na literatura mundial registra-se 270 casos de dirofilariose pulmonar humana, onde o filarídeo é encontrado frequentemente encapsulado, sendo que destes registros, 41 foram feitos no Brasil (RODRIGUES-SILVA *et al.*, 1995; CAMPOS *et al.*, 1997). Vale ressaltar ainda, que TO *et al.* (2003) relataram a ocorrência de localização ectópica do filarídeo também em humanos.

1.1 – Agente etiológico

A classificação sistemática do agente etiológico da dirofilariose apresentada abaixo foi elaborada segundo ANDERSON & BAIN (1976) e MAGGENTI (1981).

Reino: Animalia

Filo: Nematoda

Classe: Secernentea

Subclasse: Spiruria

Ordem: Spirurida

Superfamília: Filarioidea Weiland, 1958

Família: Onchocercidae Leiper, 1911

Subfamília: Dirofiliinae Sandground, 1921

Gênero: *Dirofilaria* Railliet & Henry, 1911

Espécie: *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856)

O gênero *Dirofilaria* possui espécies que na fase adulta, apresentam-se como nematódeos longos, de coloração esbranquiçada, com região oral circundada por papilas cefálicas pequenas e esôfago dividido em porções anterior muscular e posterior glandular. Estes adultos apresentam acentuado dimorfismo sexual. Os machos medem de 12 a 20 cm de comprimento, apresentando a cauda espiralada, dois espículos diferentes em tamanho e em forma, sem gubernáculo. As fêmeas medem de 25 a 31 cm de comprimento, apresentam extremidade caudal arredondada e vulva ligeiramente abaixo da junção do esôfago com o intestino (ANDERSON, 1952; WEBBER & HAWKING, 1955; SOULSBY, 1968; LOK, 1988; BOWMAN & LYNN, 1995).

Espécimes adultos de *D. immitis* parasitam principalmente canídeos domésticos e silvestres, podendo infectar também outros mamíferos, inclusive o homem. Os adultos localizam-se nas artérias pulmonares e no ventrículo direito do coração dos canídeos, onde liberam larvas de primeiro estágio (L1), conhecidas como microfilárias (SOULSBY, 1968; LOK, 1988).

As microfilárias de *D. immitis*, apresentam em média 308 μm (295 – 325 μm) de comprimento e 7 μm (5 – 7,5 μm) de espessura, não possuem bainha e são encontradas em quantidades variáveis na corrente sanguínea de cães infectados (LOK, 1988). Quando amostras de sangue são analisadas utilizando-se o método modificado de Knott (NEWTON & WRIGHT, 1956), observam-se as microfilárias com o corpo e extremidade caudal estendidas e com a extremidade cefálica afilada (REDINGTON *et al.*, 1977).

Assim como a maioria dos filarídeos, as espécies do gênero *Dirofilaria* necessitam de um artrópode como hospedeiro intermediário para completar o seu ciclo biológico. Este gênero é o único na família Onchocercidae em que seus estágios larvais desenvolvem-se nos túbulos de Malpighi de mosquitos da família Culicidae (SYMES, 1960; WALTERS & LAVOPIERRE, 1982; SAUERMAN & NAYAR, 1983).

1.2 – Ciclo Biológico

Os nematódeos adultos localizam-se nas artérias pulmonares e no ventrículo direito dos hospedeiros susceptíveis, onde liberam as microfilárias ou larvas de primeiro estágio (L1).

As fêmeas de culicídeos ingerem sangue canino contendo as microfilárias durante o repasto sangüíneo. Estas permanecem no intestino médio do mosquito por aproximadamente 24 horas e após este período, as larvas migram pela luz dos túbulos de Malpighi e invadem suas células primárias distais, alojando-se no citoplasma (TAYLOR, 1960; BRADLEY & NAYAR, 1987).

Durante os quatro dias seguintes, as larvas tornam-se mais grossas e curtas, passando para o estágio chamado de “salsichóide”. A partir do sexto dia após a infecção, as larvas migram das células dos túbulos de Malpighi para a luz dos mesmos, e então realizam a primeira muda passando para o segundo estágio, e a seguir fazem a segunda muda, atingindo o terceiro estágio que é infectante para os hospedeiros vertebrados. As larvas infectantes medem cerca de 1,3 mm de comprimento e são muito ativas quanto a movimentação. A seguir, as larvas perfuram a extremidade distal dos túbulos de Malpighi, migram pela hemocele e vão se alojar nos espaços cefálicos e na probóscide do mosquito (KARTMAN, 1953; TAYLOR, 1960). As larvas de *D. immitis* no estágio infectante permanecem na probóscide do mosquito até que este realize o repasto sangüíneo, para que elas possam migrar para os tecidos da pele de um novo hospedeiro vertebrado susceptível.

A penetração das larvas no tecido subcutâneo do hospedeiro vertebrado se dá pelo orifício produzido durante a picada do mosquito (ABRAHAM, 1988). Caso o hospedeiro seja um canídeo ou um felídeo, o ciclo do parasita se completará conforme ilustrado na Figura 1. Nos caninos as larvas fazem uma muda, passando para larvas de quarto estágio, três a quatro dias após a infecção. Nesta fase as larvas medem 18 mm de comprimento e iniciam a migração em direção ao tórax. A última muda ocorre 50 a 70 dias após a infecção, quando se desenvolvem as larvas de quinto estágio ou estágio de adulto jovem (ABRAHAM, 1988; KNIGHT, 1987).

Entre 71 e 110 dias após a infecção os parasitas atingem as artérias pulmonares e o ventrículo direito. Após três meses, os nematódeos atingem a maturidade sexual, acasalam e o ciclo biológico do mesmo se completa com a liberação de microfilárias no sangue circulante dos cães (KNIGHT, 1987). As microfilárias são encontradas na circulação periférica após seis meses da infecção.

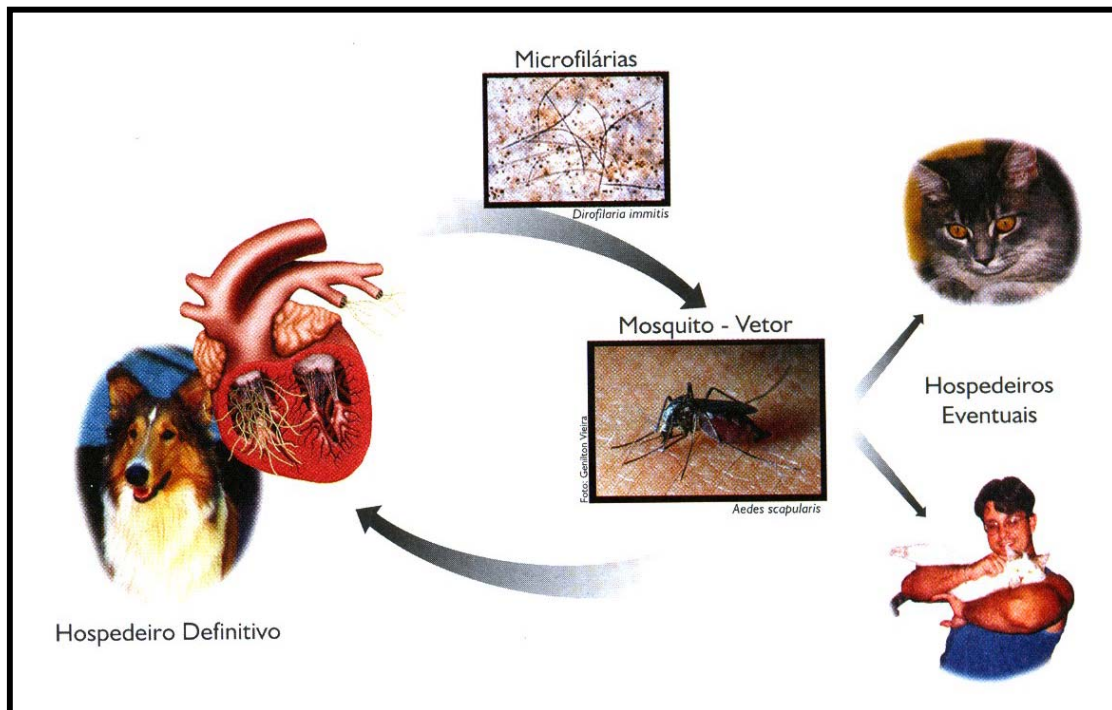


Figura 1 – Representação esquemática do ciclo biológico de *Dirofilaria immitis* (LABARTHE *et al.*, 2002).

1.3 - Distribuição Geográfica e Prevalência

A dirofilariose tem sido apontada como uma parasitose em dispersão principalmente devido ao deslocamento de cães infectados para áreas contíguas através da utilização de eixos viários em comum, além da via aérea ou marítima (SLOCOMBE & McMILLAN, 1977; GUERRERO *et al.*, 1992; WALTERS, 1995). Ao acompanharem seus proprietários em viagens, os cães constituem-se em fontes de infecções para os mosquitos locais susceptíveis, podendo resultar no estabelecimento de novos focos da doença (GUERRERO *et al.*, 1989; GUERRERO *et al.*, 1992; WALTERS, 1995).

De acordo com OTTO (1969), quatro condições são necessárias para a dirofilariose ocorrer e permanecer em um determinado local: população hospedeira; reservatório da doença; população estável de espécies vetoras competentes e temperaturas favoráveis ao desenvolvimento do hospedeiro invertebrado e do parasita.

Quanto ao clima, as larvas de *D. immitis* necessitam de aproximadamente duas semanas em temperatura igual ou superior a 27°C, não sendo possível o desenvolvimento em temperaturas abaixo de 15°C (LUZON-PENA & GÓMEZ-BAUTISTA, 1993; McCALL, 2000).

A dirofilariose canina vem ocorrendo em todos os continentes nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, exceto na Antártida (JOHNSTONE *et al.*, 1997).

Na Europa, há registros de dirofilariose em vários países (GUERRERO *et al.*, 1992; GUERRERO *et al.*, 1995; GENCHI *et al.*, 1995; ARANDA *et al.*, 1998; CRINGOLI *et al.*, 2001). Na França, GUERRERO *et al.* (1992) encontraram uma baixa prevalência não ultrapassando 1%. Em Portugal, ARAÚJO (1996) registrou uma prevalência variando entre 10 a 30% e na Espanha encontrou 6,6% na costa mediterrâneo sul. GALIANA (1995), ainda na Espanha, encontrou 33,8% dos cães da região do delta do rio Ebro apresentando a infecção. Na Itália, apesar de FIORETTI *et al.* (2003) terem observado apenas 19,6% de cães infectados na região da Umbria, a maior prevalência foi registrada por GENCHI *et al.* (1992) no norte da Itália com 50 a 80% dos cães infectados.

Nos países da África, a prevalência da infecção varia de 10,2% na Tanzânia (MATOLA, 1991) a 30,7% em Moçambique (SCHWAN & DURAND, 2002).

No continente asiático, foi registrada a presença de *D. immitis* no Japão com prevalência variando de 5,7 a 20,6% (HATSUSHIKA *et al.*, 1992; ODA *et al.*, 1995), enquanto que na Coreia do Sul as taxas de infecção variaram de 1,5% a 40% (YOON *et al.*, 2002; SONG *et al.*, 2003) e no Irã, LOLE (1988) encontrou uma prevalência de 11,3% para dirofilariose canina.

WU & FAN (2003) observaram que a prevalência aumentou nos últimos dez anos em Taiwan, chegando a atingir índices de 30% de cães apresentando microfilárias de *D. immitis*.

Pesquisas recentes demonstraram prevalência de 9,3% da infecção em cães da Turquia (OGE *et al.*, 2003).

Em 1991, KENDALL *et al.* registraram uma prevalência de 30% em cães domiciliados em Sidney, Austrália. Posteriormente, BIDGOOD & COLLINS (1996) reportaram a frequência da infecção em 11,4% dos cães. Estes resultados levaram

McCALL (2000) a concluir que a dirofilariose é enzoótica ao longo da costa norte ocidental da Austrália, além dos estados de Queensland, Nova Gales do Sul e Victoria.

Na América do Norte, SLOCOMBE (1992) detectou a prevalência de 0,24% no Canadá. Nos Estados Unidos a infecção já foi detectada em todos os estados apresentando maior prevalência na região Sudeste (STROMBERG *et al.*, 1995; WALTERS, 1995; McCALL, 2000).

Na América Central a infecção foi constatada em Porto Rico com uma prevalência variando entre 3,1 a 20,4% de cães infectados (KOZEK *et al.*, 1995). No México, GUERRERO *et al.* (1992) encontraram uma prevalência de dirofilariose de 7,5%. DURAN-STRUUCK *et al.* (2005) relataram 18,2% de cães parasitados por *D. immitis* na República Dominicana. Na América do Sul há registros em todos os países (GUERRERO *et al.*, 1992; ROSA *et al.*, 2002; LABARTHE & GUERRERO, 2004), com exceção do Chile (ALCAINO *et al.*, 1984), com áreas apresentando prevalência variando de 3,8 na Colômbia a 34,2% em Formosa, Argentina (GUERRERO *et al.*, 1992).

No Brasil, o parasitismo por *D. immitis* em cães já foi registrado em todas as regiões, com prevalência média nacional de 10,2% em exames parasitológicos e de 9,1% para testes sorológicos (SILVA *et al.*, 1999). Em 2001, a prevalência no país declinou para 2% (LABARTHE & GUERRERO, 2005).

Na região Sul foi observado 1,1% no Rio Grande do Sul, 12,5% a 15% em Santa Catarina (LABARTHE *et al.*, 1992; ARAÚJO *et al.*, 2003) e 5,47% no Paraná (REIFUR *et al.*, 2004). Na região Sudeste 8,0% no Estado de São Paulo, sendo 12,2% na área litorânea; 14% no Estado do Rio de Janeiro, com uma taxa de 24,5% na cidade de Niterói. (LABARTHE, 1997; LABARTHE *et al.*, 1997; SOUZA & LARSSON, 2001). Na região Centro-Oeste, 9,6% em Cuiabá-MT (FERNANDES *et al.*, 1996). Na região Norte, 10,7% em Belém-PA (SOUZA *et al.*, 1997). Em Estados da região Nordeste SILVA *et al.* (1999) observaram 10,6% de cães infectados por *D. immitis*, sendo que na Bahia foi registrado 7,4% de animais positivos; em Sergipe a prevalência foi de 5,6% (BARBOSA, 2001); 12,5% no Estado de Alagoas; 12,4% na Paraíba e 4,6% no município de Patos, localizado no sertão do Estado paraibano (BARBOSA *et al.*, 1999); Rio Grande do Norte com 8,66% (SUASSUNA *et al.*, 1999) e 40,8% no Maranhão (AHID *et al.*, 1999).

No Estado de Pernambuco, a dirofilariose vem sendo investigada em diversas localidades da região litorânea (PIMENTEL & ALVES, 1987; PIMENTEL *et al.*, 1988; ALVES *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2001). Na cidade do Recife, ALVES *et al.* (1999) observaram que 2,3% dos cães estavam parasitados, sendo que 1% dos animais apresentava microfilárias circulantes e 1,3% dos animais apresentaram-se sorologicamente positivos. SILVA *et al.* (1999), estudando a região litorânea do Estado por meio de pesquisa parasitológica, detectaram uma variação de 3,2% no litoral Sul a 21,3% no litoral Norte, no entanto, os resultados sorológicos revelaram prevalência de 6% e 43%, nas respectivas regiões.

1.4 - Vetores

Apesar de *D. immitis* ser considerado parasito cosmopolita, adaptando-se a mosquitos de várias espécies, em muitas partes do mundo os vetores deste nematódeo ainda são desconhecidos. Entre os transmissores que têm sido assinalados, destacam-se as espécies pertencentes aos gêneros *Aedes* Meigen, 1818, *Culex* Say, *Anopheles* Meigen, 1818, *Mansonia* Walker, *Psorophora* Robineau-desvoidy, 1827 e *Coquillettidia* Dyar, 1905 (LUDLAM *et al.*, 1970).

De acordo com LUDLAM *et al.* (1970) várias espécies de diversos gêneros de mosquitos podem participar do ciclo de *D. immitis*, entretanto, há uma grande variação na capacidade dessas espécies como vetoras (SAUERMAN, 1980), pois fatores intrínsecos, como as reações imunes dos mosquitos, e aqueles extrínsecos relacionados com fatores ambientais podem interferir na sobrevivência das larvas do nematódeo no interior do corpo dos mosquitos, além das diferenças genéticas existentes entre as espécies ou entre populações de determinadas espécies do vetor (SULAIMAN & TOWSON, 1980; CHRISTENSEN, 1977).

Deve-se considerar ainda que a sobrevivência do vetor é um fator limitante para que se complete o ciclo do nematódeo, tanto no hospedeiro invertebrado, como nos cães. Sendo assim, há dois períodos críticos, onde as chances de mortalidade do culicídeo aumentam. Inicialmente, quando as larvas de primeiro estágio de *D. immitis* invadem os túbulos de Malpighi e o outro no momento em que as larvas do nematódeo já estão em terceiro estágio

ou fase infectante e rompem os túbulos de Malpighi para migrarem para a cabeça e probóscide (KERSHAW *et al.*, 1953).

Neste contexto, diversos estudos têm sido realizados com intuito de determinar os vetores da dirofilariose canina, através de infecção natural e/ou experimental.

No continente asiático foram encontradas quatro espécies naturalmente infectadas com *D. immitis*, sendo elas *Ae. albopictus*¹ Skuse, 1894, *Cx. tritaeniorhynchus* Giles, 1901, *Cx. quinquefasciatus* Say, 1823 e *Mansonia uniformis* (Theobald, 1901) (CHOOCHOTE *et al.*, 1986; CHOOCHOTE *et al.*, 1987; SULAIMAN & JEFFERY, 1986; KONISHI, 1989; LAI *et al.*, 2001; GRATZ, 2004).

Na Austrália, RUSSELL (1985) e RUSSELL & GEARY (1996) demonstraram que *Ae. notoscriptus* (Skuse) e *Cx. annulirostris* Skuse são os vetores primários de *D. immitis* e que *Anopheles annulipes* Walker, 1856 e *Cx. quinquefasciatus* são os secundários.

Na Itália, as espécies consideradas vetoras deste filarídeo foram *Ae. caspius* (Pallas) e *Cx. pipiens* Linnaeus, 1758 (CANCRINI *et al.*, 1995) além de *Ae. albopictus* (CANCRINI *et al.*, 2003; GRATZ, 2004). Na Espanha segundo ARANDA *et al.* (1998) os vetores de *D. immitis* são os mosquitos das espécies *Cx. pipiens* e *Ae. vexans* (Meigen, 1830).

Nos Estados Unidos os principais vetores da dirofilariose são *Ae. taeniorhynchus* (Wiedemann, 1821), *Ae. sollicitans* (Walker, 1856), *Ae. albopictus*, *Cx. salinarius* Coquillett, 1904, *Cx. quinquefasciatus* e *An. quadrimaculatus* Say, 1824, *Ae. vexans* (YEN, 1938; JOHNSTONE *et al.*, 1997; GRATZ, 2004). LOFTIN *et al.* (1995) relataram que, no Novo México, as espécies *Ae. vexans*, *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. tarsalis* Coquillett, 1896 possuem potencial para a transmissão de *D. immitis*.

No Brasil, particularmente na região Sudeste, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & DEANE (1995) encontraram *Ae. taeniorhynchus* e *Ae. scapularis* (Rondani, 1848) parasitados por *D. immitis* na baixada litorânea do Rio de Janeiro, sugerindo serem estes os vetores de dirofilariose nesta localidade. Posteriormente, LABARTHE *et al.* (1998 a,b) consideraram estas espécies como vetores primários e *Cx. quinquefasciatus* como vetor secundário da dirofilariose na região oceânica de Niterói, Rio de Janeiro.

¹ Gêneros abreviados de acordo com REINERT (2001)

De acordo com LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & DEANE (1995) e LABARTHE *et al.* (1998) a espécie *Ae. scapularis* é o vetor primário da dirofilariose apenas na região Sudeste do país.

Na região Nordeste, duas espécies foram encontradas naturalmente infectadas. Em São Luís, Estado do Maranhão, AHID & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (1999) encontraram *Ae. taeniorhynchus* e *Cx. quinquefasciatus* naturalmente infectados por *D. immitis*, indicando serem estes os vetores naturais da dirofilariose canina nesta localidade. Em Maceió, no estado de Alagoas, BRITO *et al.* (2001) encontraram espécimes de *Cx. quinquefasciatus* naturalmente infectados.

Portanto, como *Ae. taeniorhynchus* foi detectado naturalmente infectado por *D. immitis* no Sudeste e no Nordeste, AHID & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (1999) sugerem que essa espécie seja vetora primária da dirofilariose canina ao longo do litoral brasileiro, entre as regiões supra citadas.

1.5 - Competência vetorial para a transmissão de *D. immitis*

A competência vetorial dos mosquitos transmissores de *D. immitis* é dependente de fatores como: resistência à infecção, relacionada à capacidade de suportar o desenvolvimento das larvas do nematódeo até a forma infectante; ocorrência do hematofagismo em espécies hospedeiras susceptíveis a infecção; adaptação à região geográfica; abundância; estacionalidade; dispersão e longevidade (LUDLAM *et al.*, 1970; APPERSON *et al.*, 1989; SCOLES & CRAIG, 1993; SCOLES, 1998); além da diversidade genética de cada população de culicídeo (McGREEVY *et al.*, 1974; SULAIMAN & TOWNSON, 1980).

No que concerne à adaptação das espécies vetoras em diversos ambientes, a competência vetorial encontra-se associada aos habitats de cada espécie. Sendo assim, *Ae. canadensis* Theobald, *Ae. stimulans* (Walker, 1848) vivem em habitats silvestres (BUXTON & MULLEN, 1980), enquanto que *Cx. quinquefasciatus*, *An. punctipennis* (Say, 1823) e *Ae. vexans* habitam os peridomicílios e os domicílios (VILLAVASO & STEELMAN, 1970; TOLBERT & JOHNSON, 1982).

O comportamento reprodutivo de uma espécie de mosquito durante o ano é muito importante, pois espécies que apresentam altas taxas reprodutivas produzem várias gerações anuais. Como exemplo, *Ae. sollicitans* e *Ae. vexans*, *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* (LUDLAM *et al.*, 1970; HENDRIX *et al.*, 1980; CÔNSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994) têm mais condições de se infectarem e de transmitirem a *D. immitis* aos hospedeiros vertebrados. Por outro lado, espécies como *Ae. canadensis* e *Ae. stimulans* que apresentam apenas um pico populacional por ano também podem desempenhar papel importante na transmissão do parasita (MAGNARELLI, 1978).

Vale salientar que as espécies *Ae. vexans*, *Ae. sollicitans*, *Ae. aegypti* e *Ae. taeniorhynchus* que apresentam grande capacidade de dispersão (LUDLAM *et al.*, 1970; HENDRIX *et al.*, 1980) são mais importantes na cadeia de transmissão da doença do que *Ae. sierrensis* (Ludlow, 1905) que possui pequena dispersão (WALTERS & LAVOPIERRE, 1982).

Em relação ao repasto sangüíneo, o potencial de transmissão é maior entre as espécies de culicídeos que realizam várias alimentações durante a vida. Algumas espécies necessitam de muitos repastos sangüíneos para completar o desenvolvimento dos ovos, sendo que este comportamento fisiológico aumenta o potencial para a infecção e transmissão do nematódeo. Nestas circunstâncias a transmissão a um novo hospedeiro é assegurada pelo rápido desenvolvimento de *D. immitis* nos seus vetores (TRAVI & ORIHIEL, 1987).

A longevidade do mosquito vetor é primordial, para que o nematódeo se desenvolva até o estágio infectante (L₃). Vários fatores ambientais e biológicos influenciam na longevidade dos culicídeos, entre eles, pode-se citar a temperatura, a umidade, a precipitação pluviométrica, a intensidade de luz, a disponibilidade de alimento, a predação e a ocorrência de doenças, nestes vetores. CHRISTENSEN (1978) ressalta ainda o fato dos efeitos patológicos das larvas de *D. immitis* limitarem a longevidade do vetor, pois dependendo do número de larvas do nematódeo nos túbulos de Malpighi do mosquito este pode não sobreviver à infecção.

Deste modo, algumas espécies como *Ae. fluviatilis* (Lutz, 1904) (KASAI & WILLIAMS, 1986), *Ae. aegypti* (MENDONÇA *et al.*, 1998), *Cx. quinquefasciatus* (BRITO

et al., 1999) e *Ae. albopictus* (LAI *et al.*, 2000), apresentam longevidade suficiente para desenvolvimento de larvas infectantes.

Um outro fator que faz com que ocorra variação da competência vetorial para *D. immitis* é a capacidade do mosquito limitar o número de larvas em desenvolvimento em seus órgãos por meio de reações imunes específicas.

Diversos estudos em laboratório foram realizados visando avaliar a competência vetorial de diferentes espécies de mosquito em relação a transmissão de *D. immitis*. Dentre as espécies mais estudadas encontra-se *Ae. aegypti* (NAYAR & SAUERMAN, 1975; BUXTON & MULLEN, 1981; SULAIMANN, 1983; APPERSON *et al.*, 1989; MAHMOOD, 2000), *Ae. albopictus* (APPERSON *et al.*, 1989; KONISHI, 1989; ZYTOON *et al.*, 1992; NAYAR & KNIGHT, 1999; LAI *et al.*, 2000), *Ae. canadensis* (BICKLEY *et al.*, 1977), *Ae. taeniorhynchus* (PARKER, 1993; 2000; THEIS *et al.*, 2000), *Ae. notoscriptus* (RUSSELL & GEARY, 1992), *Ae. sierrensis* (SCOLES *et al.*, 1993), *Ae. sollicitans* (PARKER, 2000), *Ae. togoi* (Theobald, 1907) (JUNKUM *et al.*, 2003), *Ae. trivittatus* (Coquillett, 1902) (CHRISTENSEN, 1977), *Ae. vexans* (LOFTIN *et al.*, 1995; ARANDA *et al.*, 1998), *An. annulipes* (RUSSELL, 1985; LOFTIN *et al.*, 1995), *An. quadrimaculatus* (BRADLEY & NAYAR, 1987), *Cx. annulirostris* (RUSSELL & GEARY, 1992), *Cx. quinquefasciatus* (RUSSELL, 1985; LOFTIN *et al.*, 1995, LAI *et al.*, 2000), *Cx. tarsalis* (LOFTIN *et al.*, 1995), *Cx. tritaeniorhynchus* (KONISHI, 1989), *Mansonia titillans* Walker, 1848 (LUDLAM *et al.*, 1970) e *Culiseta incidens* (Thomson, 1869) (THEIS *et al.*, 2000).

No Brasil, apenas as espécies *Ae. fluviatilis*, *Ae. scapularis*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* demonstraram susceptibilidade e potencial para a transmissão de *D. immitis* (KASAI & WILLIAMS, 1986; MACÊDO *et al.*, 1998; BRITO *et al.*, 1999; AHID *et al.*, 2000; SERRÃO *et al.*, 2001; SERRÃO, 2004).

McGREEVY *et al.* (1974) e SULAIMAN & TOWNSON (1980) observaram diferenças genéticas em *Ae. aegypti* que implicavam em variações na susceptibilidade desta espécie a *D. immitis*. Vários estudos comprovaram que estas diferenças genéticas entre as espécies ou linhagens do vetor influenciam na competência vetorial, podendo ocorrer variação na susceptibilidade a *D. immitis* entre populações de mosquito isoladas geograficamente (SULAIMAN & TOWNSON, 1980; CHRISTENSEN, 1977).

1.6 - Reações imunes do vetor à *D. immitis*

Os insetos apresentam respostas contra infecções que podem ser do tipo celular ou humoral (BREY & HUTMARK, 1998; HOFFMANN *et al.*, 1999; BASSET *et al.*, 2000).

A resposta celular nos insetos está relacionada com o tamanho, a quantidade e a propriedade do agente invasor, e se caracteriza por fagocitose, formação de nódulos e encapsulamento (GOTZ & VEY, 1974; RATCLIFFE & ROWLEY, 1979; RATCLIFFE & WALTERS, 1983; WIESNER, 1992).

Segundo RATCLIFFE (1986), a presença de lipopolissacarídeos na membrana plasmática do patógeno pode desempenhar um papel importante no processo de fagocitose. Portanto, a indução da adesão de células pode ocorrer como consequência da degranulação celular, ativação da cascata de profenoloxidase, com depósitos de melanina ao redor do agente e o consequente encapsulamento melanótico (MANDATO *et al.*, 1997; INFANGER *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005).

O encapsulamento celular se dá pela deposição de camadas de plasmatócitos sobre o patógeno melanizado que ao unir-se com células granulares degeneradas formam-se os nódulos (MANDATO *et al.*, 1997).

WILSON *et al.* (2001) observaram que insetos quando em grandes densidades populacionais, como por exemplo, *Spodoptera exempta* (Walker) (Lepidoptera) desenvolvem mais reações imunes aos patógenos do que aqueles em baixas densidades populacionais e que a reação se dá principalmente por meio de melanização cuticular, com contribuição da enzima fenoloxidase, presente também em dípteros.

Nos dípteros o encapsulamento é considerado uma resposta humoral, pois há pouca participação de hemócitos, uma vez que estes insetos possuem um número reduzido destas células (VEY & GOTZ, 1975). O encapsulamento celular ocorre pela formação de um envelope multicelular ao redor do parasita que se torna melanizado após várias horas do início da infecção (HO *et al.*, 1982). Por outro lado, o encapsulamento humoral é realizado dentro de poucos minutos após a infecção, sendo realizado por material homogêneo depositado ao redor do parasita (CHRISTENSEN *et al.*, 1984).

O encapsulamento humoral é descrito em culicídeos como resposta à infecção por fungos (VEY & GOTZ, 1975; BENTO, 1999) e por nematódeos (ESSLINGER, 1962). A

resposta humoral caracteriza-se pela indução de peptídeos e proteínas antibacterianas secretados na hemolinfa e ocorre após a resposta celular (LAMBERT *et al.*, 1989; DIMARCQ *et al.*, 1994; CHALK *et al.*, 1995; HETRU *et al.*, 1998). Os peptídeos são produzidos no corpo gorduroso ou nos hemócitos dos insetos. Os peptídeos associados com a defesa humoral nos mosquitos são as defensinas (CHALK *et al.*, 1995; LOWENBERGER *et al.*, 1995; LOWENBERGER *et al.*, 1999).

No que se refere a *D. immitis*, os mosquitos possuem a capacidade de limitar o número de larvas do nematódeo em desenvolvimento em seus órgãos através de resposta humoral, sendo este mecanismo de defesa evidenciado em vários gêneros de mosquitos, particularmente espécies de *Aedes* (MACÊDO *et al.*, 1998; SHIAO *et al.*, 2001). Espécies como *Armigeres subalbatus* Coquillett, 1898, *Ae. trivittatus* e *Ae. aegypti* reduzem o número de microfilárias de *D. immitis* ingeridas por meio destes mecanismos (LI & CHRISTENSEN, 1990; SHIAO *et al.*, 2001; INFANGER *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005).

O desenvolvimento das microfilárias de *D. immitis* pode, entretanto, ser interrompido antes do aparecimento do estágio “salsichóide”, sem ocorrer o encapsulamento (SULAIMAN & TOWNSON, 1980; BUXTON & MULLEN, 1981). Nestas circunstâncias, as células dos túbulos de Malpighi infectadas pelo filarídeo, emitem informações intracelulares, que ativam mecanismos que lisam a cutícula do parasita e a destroem (TALLURI & CANCRINI, 1994). Esta reação é um dos mais importantes efeitos moduladores da carga parasitária de vários vetores incluindo *Ae. aegypti* (LINDEMANN, 1977), *Ae. trivittatus* (CHRISTENSEN, 1981), *Mansonia titillans*, *Ae. sollicitans* e *Ae. taeniorhynchus* (NAYAR & SAUERMAN, 1975).

Outros mecanismos também utilizados por algumas espécies são: a destruição das larvas do filarídeo pela armadura cibarial (COLUZZI & TRABUCCHI, 1968) ou por cristais de oxihemoglobina no coágulo formado no trato digestório do mosquito (NAYAR & SAUERMAN, 1975; LOWRIE, 1991), aprisionamento das microfilárias pela formação rápida de coágulo após ingestão do sangue infectado (KARTMAN, 1953), lise da cutícula da larva por ação das próprias células dos túbulos de Malpighi do vetor (TALLURI & CANCRINI, 1994) e ainda a infecção por outros parasitas como protozoários (VAUGHAN, 1997; COMISKEY *et al.*, 1999).

Em locais onde os cães apresentam alta microfilaremia de *D. immitis*, algumas espécies de culicídeo demonstram ter maior capacidade que outras espécies para reduzir o número de larvas do nematódeo que atingiriam o estágio infectivo e, portanto tem maior capacidade de infecção. Esse fato foi observado por RUSSELL & GEARY (1996), LAI *et al.* (2000) e PARKER (2000) nas espécies *Cx. annulirostris*, *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. taeniorhynchus*, respectivamente.

2 - OBJETIVOS:

2.1 – GERAL:

Estudar a competência de quatro populações e de uma linhagem de mosquitos (Diptera, Culicidae) para a transmissão de *Dirofilaria immitis* na região metropolitana do Recife (RMR) e em Campinas, SP.

2.2 – ESPECÍFICOS:

- Avaliar a ocorrência de infecção natural por *D. immitis* em cães na região metropolitana de Recife (RMR), PE, área endêmica para dirofilariose canina.
- Estudar a competência vetorial de *Culex quinquefasciatus* proveniente de área endêmica (RMR) quando exposto a diferentes densidades de microfilárias de *D. immitis*, por meio de infecções experimentais em laboratório.
- Estudar a susceptibilidade e a competência vetorial de populações e linhagem de *Ae. aegypti* e população *Aedes albopictus*, provenientes de área endêmica (RMR) e de área não-endêmica (Campinas, SP) à *D. immitis*, por meio de infecções experimentais em laboratório.
- Verificar a ocorrência de melanização em larvas de *D. immitis* nas populações e linhagem de culicídeos estudadas após infecção experimental.

CAPÍTULO 1

3. FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE) EM CÃES DOMICILIADOS NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE E NO MUNICÍPIO DE BEZERROS, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

3. FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE) EM CÃES DOMICILIADOS NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE E NO MUNICÍPIO DE BEZERROS, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL.

RESUMO

A dirofilariose canina é uma zoonose com distribuição mundial. No Brasil, ocorre em praticamente todos os estados, com maior prevalência no nordeste, sendo endêmica na Região Metropolitana do Recife (RMR), PE. No presente estudo foi avaliada a presença da infecção por microfilárias de *D. immitis* em cães domiciliados na região metropolitana do Recife e no município de Bezerros, localizado no agreste pernambucano. Amostras de sangue de animais, com idade superior a seis meses, foram obtidas por meio de punção venosa da veia cefálica e analisadas por meio do método modificado de Knott. Foi detectada uma frequência de 3,61%, 7,89% e 7,69% de cães parasitados por *D. immitis* na Ilha de Itamaracá, Igarassu e Recife, respectivamente. Esses dados comprovam que a RMR continua sendo endêmica para essa parasitose.

3.1 - INTRODUÇÃO

A dirofilariose canina é uma cardiopatia parasitária (KNIGHT, 1987; LABARTHE *et al.*, 1997; McCALL, 2000), que acomete os canídeos (ALVES *et al.*, 1999; McCALL, 2000), podendo também atingir os felídeos e humanos (GRIEVE *et al.*, 1983) constituindo-se assim em uma zoonose (OMS, 1979; LABARTHE *et al.*, 1997). Entre os filarídeos conhecidos por infectar cães, somente *D. immitis* é patogênica aos seus hospedeiros (ALVES *et al.*, 1999).

Dentro da cadeia epidemiológica, *D. immitis* é transmitida aos vertebrados por fêmeas de mosquitos da família Culicidae (PARKER, 1993) que depositam a larva infectante do nematódeo sobre a pele destes ao realizarem o repasto sanguíneo (TAYLOR, 1960).

A doença tem distribuição geográfica mundial, e vem sendo encontrada na maioria das regiões tropicais e subtropicais (McCALL, 2000) com predominância para áreas litorâneas (GENCHI *et al.*, 1988). As taxas de infecção variam nas diferentes regiões

geográficas, podendo apresentar um grande número de animais infectados em determinados locais, enquanto que em outros não há presença de animais infectados (LUZON-PENA & GOMES-BAUTISTA, 1993; ALVES *et al.*, 1999).

Na Europa, há registros de dirofilariose na França (GUERRERO *et al.*, 1992), Itália (GENCHI *et al.*, 1995; CRINGOLI *et al.*, 2001) e na Espanha (GUERRERO *et al.*, 1995; ARANDA *et al.*, 1998).

No continente asiático, foi registrada a ocorrência da infecção no Japão (HATSUSHIKA *et al.*, 1992; ODA *et al.*, 1995), Coréia (LEE *et al.*, 1996; SONG *et al.*, 2003), Irã (LOLE, 1988), Malásia, Indonésia e Papua Nova Guiné (McCALL, 2000).

Na Austrália, BIDGOOD & COLLINS (1996) e McCALL (2000) reportaram a presença de dirofilariose canina.

Por outro lado, na África, MATOLA (1991) e SCHWAN & DURAND (2002) relataram a ocorrência da doença em cães na Tanzânia e em Moçambique, respectivamente.

Nas Américas, a dirofilariose ocorre em quase todos os países. Na América do Norte há ocorrência no Canadá (SLOCOMBE, 1992) e no Estados Unidos (STROMBERG *et al.*, 1995; WALTERS, 1995; McCALL, 2000); na América Central a infecção foi constatada em Porto Rico (KOZEK *et al.*, 1995), no México (GUERRERO *et al.*, 1992) e na República Dominicana (DURAN-STRUUCK *et al.*, 2005), enquanto que na América do Sul, há registros em todos os países (GUERRERO *et al.*, 1992; ROSA *et al.*, 2002; LABARTHE & GUERRERO, 2004), com exceção do Chile (ALCAINO *et al.*, 1984).

No Brasil, SILVA *et al.* (1999) reportaram que a prevalência média nacional para dirofilariose é de 10,17% em exames parasitológicos e de 9,07% para testes sorológicos, entretanto, segundo LABARTHE & GUERRERO (2005) em 2001 esta prevalência declinou para 2%.

O parasitismo em cães por *D. immitis* já foi registrado em todas as regiões brasileiras. Na região Sul foi observado 1,1% no Rio Grande do Sul, 12,5% em Santa Catarina (LABARTHE *et al.*, 1992) e 5,47% no Paraná (REIFUR *et al.*, 2004). Na região Sudeste, 14% no Estado do Rio de Janeiro e 8,0% no Estado de São Paulo, sendo que neste Estado foi observada uma frequência de 12,2% na área litorânea (LABARTHE, 1997; LABARTHE *et al.*, 1997; SOUZA & LARSSON, 2001). Na região Centro-Oeste, 9,6% (FERNANDES *et al.*, 1996), enquanto que, na região Norte foi detectado 10,7% de cães

infectados (SOUZA *et al.*, 1997). Em Estados da região Nordeste, SILVA *et al.* (1999) observaram 10,6% de cães parasitados por *D. immitis*, sendo que na Bahia foi registrado 7,41% de animais positivos; em Sergipe, a prevalência foi de 5,61% (BARBOSA, 2001), 12,5% no Estado de Alagoas, 12,4% na Paraíba. Neste último, foram encontrados ainda animais infectados (4,6%) no sertão do Estado (BARBOSA *et al.*, 1999). No Rio Grande do Norte também houve a ocorrência de dirofilariose, com uma frequência de 8,66% (SUASSUNA *et al.*, 1999) e no Maranhão foi detectado 40,8% de cães portando o filarídeo (AHID *et al.*, 1999).

No Estado de Pernambuco, a dirofilariose vem sendo investigada em diversas localidades da região litorânea (PIMENTEL & ALVES, 1987; PIMENTEL *et al.*, 1988; ALVES *et al.*, 1993; ALVES *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2001). Na cidade do Recife, ALVES *et al.* (1999) detectaram que 2,3% dos cães estavam parasitados, sendo que 1% dos animais apresentava microfilárias circulantes e 1,3% dos animais apresentavam antígenos circulantes. SILVA *et al.* (1999) estudando a região litorânea do Estado por meio de pesquisa parasitológica, obtiveram uma variação de 3,2% no litoral Sul a 21,3% no litoral Norte e por meio de testes sorológicos observaram uma prevalência entre 6% e 43%, respectivamente.

Trabalhando nas mesmas localidades ALVES *et al.* (2001) encontraram variação de 11,5%, 30,8% e 28,7% nos municípios de Olinda, Igarassu e Ilha de Itamaracá, no litoral norte do Estado, respectivamente.

Informações referentes a dirofilariose canina em áreas distantes do litoral pernambucano ainda são escassas, entretanto PIMENTEL *et al.* (1988) encontraram 2% de cães microfilarêmicos no município de Caruaru, situado no agreste do Estado, confirmando a ocorrência de filárias em áreas distantes do litoral.

O presente trabalho teve por objetivo verificar a frequência de *D. immitis* em cães domiciliados na Região Metropolitana do Recife e no município de Bezerros localizado no agreste pernambucano.

3.2 - MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 - Áreas de Estudo

O desenvolvimento deste estudo iniciou-se com a realização de coletas de sangue canino nas áreas costeiras de cidades pertencentes à Região Metropolitana do Recife e em bairros e vilas do município de Bezerros (Figura 1) situado no Agreste do Estado de Pernambuco (Tabela 1).

Tabela 1 – Localização e área dos municípios do Estado de Pernambuco onde o estudo foi desenvolvido.

Localização	Municípios do Estado de Pernambuco	Coordenadas geográficas Latitude / Longitude	Área (Km ²)	Locais de coleta
Litoral Norte	Itamaracá	7°44'00"/ 34°49'32"	65	Vila Velha Forte Orange
	Igarassu	7°53'29"/ 34°49'28"	306	Nova Cruz I Nova Cruz II
	Paulista	7°56'27"/ 34°52'23"	94	Janga Pau Amarelo Maria Farinha
	Recife	8°03'14"/ 34°52'52"	217	Boa Viagem
Litoral Sul	Ipojuca	8°23'56"/ 35°03'50"	527	Serrambi
Agreste	Bezerros	8°14'00"/ 35°47'49"	493	Área rural e vilas

3.2.2 - Animais

Foi analisado um total de 816 animais, no período de agosto de 2001 a abril de 2003. Para tanto foi realizada a amostragem não probabilística por conveniência segundo REIS (2003). Os cães eram pertencentes a raças variadas, de ambos os sexos, com idade superior a seis meses e domiciliados e residentes nos locais pesquisados. Para cada animal foi preenchida uma ficha de identificação individual (ANEXO 1) contendo dados referentes a presença de ectoparasitos, estado nutricional dos cães, presença de mosquitos e local de procedência dos animais.

3.2.3 - Coleta de sangue

Uma amostra de aproximadamente três mililitros (ml) de sangue foi obtida de cada animal por meio de punção venosa da veia cefálica com auxílio de seringa de 5 ml com agulha de 28 x 8 mm (Plastik). O sangue foi colocado em tubos de ensaio estéreis contendo

ácido etilenodiaminotetracético de sódio – EDTA (Reagen) a 10%, identificado, acondicionado em caixa isotérmica e encaminhado ao Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para a realização de testes parasitológicos. De cada amostra, foi retirado um ml para realização do teste parasitológico.

3.2.4 - Processamento do Material

3.2.4.1 - Teste Parasitológico

O teste parasitológico para a pesquisa de microfilárias circulantes de *D. immitis* ou *Dipetalonema reconditum* foi realizado por meio do Método Modificado de Knott (NEWTON & WRIGHT, 1956). O sedimento obtido no final do processamento foi retirado com pipeta automática de 20 microlitros (µl) e utilizado na confecção de esfregaços em lâmina, que foram posteriormente fixados em álcool metílico (Reagen), corados pelo método Panótico (Newprov) e examinados em microscópio óptico utilizando-se a objetiva de 10x. As espécies de microfilárias foram diferenciadas conforme as descrições de REDDINGTON *et al.* (1978).

3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de animais avaliados, 1,59% (13/816) mostraram-se positivos ao parasitismo (Tabela 2) apresentando microfilárias circulantes, sendo sete cães com microfilárias de *D. immitis* e seis com microfilárias de *D. reconditum*.

Tabela 2 – Número de cães infectados com *D. immitis* e/ou *D. reconditum* na Região Metropolitana do Recife e em Bezerros no agreste pernambucano.

Municípios	Locais de coleta	Número de cães examinados	Número de cães com Microfilárias	
			<i>D. immitis</i>	<i>D. reconditum</i>
Itamaracá	Vila Velha	35	03	02
	Forte Orange	48	0	02
Igarassu	Nova Cruz I	12	01	0
	Nova Cruz II	26	02	0
Paulista	Janga	72	0	0
	Pau Amarelo	56	0	0
	Maria Farinha	57	0	0
Recife	Boa Viagem	13	01	0
Ipojuca	Serrambi	12	0	0
Bezerros	Área Rural e Vilas	485	0	02
Total		816	07	06

Os resultados obtidos demonstram que a prevalência de *D. immitis* (Figura 2) na Ilha de Itamaracá (3,61%) e no litoral de Igarassu (7,89%) continuam representando áreas endêmicas, estando de acordo com os resultados obtidos por SILVA *et al.* (1999) e ALVES *et al.* (2001) que realizaram estudo epidemiológico na população canina dos referidos municípios e encontraram uma prevalência superior a 25%. Apesar das taxas de prevalência serem diferentes, a eliminação dos animais sororeagentes nos programas de controle do calazar e na vigilância epidemiológica da raiva, realizados pelas Prefeituras municipais, o repovoamento da população de cães, com grande quantidade de animais jovens, e a utilização desordenada de anti-helmínticos devem ser considerados como fatores importantes em relação à queda das referidas taxas.



Figura 2 – Microfilária (larva de 1º estágio) de *D. immitis* encontrada no sangue de cão infectado por meio do método modificado de Knott (472x).

De acordo com LABARTHE & GUERRERO (2005) vários fatores podem afetar a transmissão de *D. immitis*, como por exemplo, a redução de cães com microfilaremia devido a quimioprofilaxia com ivermectina, ou ainda pelo uso das tetraciclina e seus derivados para o controle da erliquiose canina. As tetraciclina eliminam bactérias do gênero *Wolbachia* sp. que vivem em simbiose com adultos de *D. immitis*, provocando assim a redução da capacidade reprodutiva destes nematódeos.

Por outro lado, não foram detectados animais com infecção por filarídeos no município de Paulista.

Sabe-se que a detecção de microfilárias algumas vezes pode ser mascarada por reações imunológicas existentes que levam a supressão das microfilárias na circulação sangüínea e conseqüentemente o resultado do teste apresenta-se negativo, demonstrando então um resultado falso negativo. Contudo esperava-se encontrar animais positivos no município de Paulista, uma vez que a referida cidade encontra-se situada entre as cidades de Olinda e Igarassu que são áreas endêmicas para a dirofilariose canina (SILVA *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2001).

Provavelmente as espécies de mosquito que vivem nesta faixa litorânea deslocam-se por toda região propiciando a transmissão da dirofilariose em ambas as áreas. Entretanto, os resultados obtidos podem estar relacionados a diversos fatores como a presença de animais amicrofilarêmicos devido à utilização de anti-helmínticos e também a grande expansão imobiliária que vem ocorrendo na região, modificando os criadouros e fazendo com que ocorra o deslocamento das espécies vetoras para outros locais.

No bairro de Boa Viagem na cidade do Recife, a detecção de 7,69% (01/13) caracteriza a área como endêmica. Apesar deste resultado, deve-se considerar que a amostragem foi pequena no local, pois se sabe que a área estudada possui baixa transmissibilidade por ser um bairro muito urbanizado, dificultando o desenvolvimento dos vetores de *D. immitis*, já que o ambiente natural foi degradado e assim muitas das espécies vetoras desapareceram.

Segundo LABARTHE *et al.* (1997), ambientes degradados não favorecem a transmissão do filarídeo por dificultar a sobrevivência dos vetores primários, mesmo havendo grande densidade populacional de cães e de outras espécies de mosquito, corroborando assim com os dados de ALVES *et al.* (1999) que obtiveram baixa prevalência na cidade do Recife.

Da mesma forma, que ocorreu em Paulista, não foi encontrado nenhum animal parasitado por filarídeos na praia de Serrambi localizada em Ipojuca, litoral Sul, diferindo dos achados de SILVA *et al.* (1999) que encontraram uma prevalência variando de 6,0% a 17,8% em Porto de Galinhas, praia também localizada no município de Ipojuca, e na cidade de Tamandaré, respectivamente. Para a elucidação da natureza atual da infecção em Serrambi serão necessários mais estudos.

No que se refere ao município de Bezerros, foi detectada a presença de microfilárias circulantes de *D. reconditum* (0,41%), enquanto que microfilárias de *D. immitis* não foi registrada.

PIMENTEL *et al.*, (1988) relataram uma baixa prevalência de cães microfilarêmicos no município de Caruaru, cidade situada no agreste pernambucano, distante 26 Km da cidade de Bezerros, contudo não foi realizada a identificação das microfilárias.

Embora tenha sido detectada a presença do filarídeo *D. reconditum* em uma área rural do município de Bezerros, o mesmo não apresenta caráter patogênico aos cães. Os

vetores de *D. reconditum* são pulgas e as baixas condições sócio-econômicas do local onde foi detectado contribuem para o aumento destes vetores e para a transmissão do nematódeo.

Apesar de existirem espécies de culicídeos com potencial vetor para a transmissão de *D. immitis* em todas as regiões estudadas, a taxa de transmissão encontra-se baixa, provavelmente devido ao pequeno número de cães infectados apresentando microfilárias circulantes. Vale salientar que durante as coletas de sangue canino observou-se a presença de *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* e *Psorophora* sp. na RMR e *Cx. quinquefasciatus* no município de Bezerros.

Por outro lado, a grande diversidade geográfica das áreas estudadas, incluindo vegetação e grau de urbanização não influenciou na frequência da infecção.

3.4 - CONCLUSÃO

A Região Metropolitana do Recife continua sendo endêmica para a dirofilariose canina, com predominância no litoral norte. O município de Bezerros situado no agreste pernambucano, não apresentou endemicidade para *D. immitis*. O risco dos animais se infectarem com *D. immitis* é maior na Região Metropolitana do Recife.

3.5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHID, S.M.M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; SARAIVA, L.Q. Dirofilariose canina na Ilha de São Luís, Nordeste do Brasil: uma zoonose potencial. **Cad. Saúde Pública**, v. 15, n. 2, p. 405-412, 1999.

ALCAINO, H.A.; GORMAN, T.R.; PUELMA, M.C. Filariasis canina en Chile. **Arch. Med. Vet.**, v. 16, p. 67-73, 1984.

ALVES, L.C.; LABARTHE, N.; SIMSON, C.; MAIA, F.C.; SIQUEIRA, R.S.; FAUSTINO, M.A.G. Survey of canine heartworm on the coast of the Pernambuco State, Brazil. **Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium**. San Antonio, TX, p. 20-21, 2001.

ALVES, L.C.; SILVA, L.V.A.; FAUSTINO, M.A.G.; MCCALL, J.W.; SUPAKONDERJ, P.; LABARTHE, N.; SANCHEZ, M.; CAIRES, O. Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 587-590, 1999.

ALVES, L.C.; COLE, E.F.; ATHAYDE, A.C.R. Prevalência da filariose canina no Bairro de dois Irmãos. **Rev. Bras. Parasitol.**, v. 2, n. 1, p. 68, 1993.

ARANDA, C.; PANYELLA, O.; ERITJA, R.; CASTELLA, J. Canine filariasis. Importance and transmission in the Baix Llobregat area, Barcelona (Spain). **Vet. Par.**, v. 77, p. 267-275, 1998.

BARBOSA, C.L. **Aspectos epidemiológicos da dirofilariose canina na cidade de Aracajú, Sergipe**. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal Rural de Pernambuco, 39p., 2001.

BARBOSA, C.L.; MELO, M.A.; SILVA, E. Ocorrência de cães sororeagentes ao teste de imunoabsorção enzimática para *Dirofilaria immitis* no município de Patos, Paraíba. In: Seminário Bras. de Parasitologia Veterinária, XI, **Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul**, II, Salvador, **Anais**, 1999.

BIDGOOD, A.; COLLINS, G.H. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Sydney. **Australian Vet. J.**, v. 73, n. 3, p. 103-104, 1996.

CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; VENEZIANO, V.; CAPELLI, G. A prevalence survey and risk analysis of filariasis in dogs from the Mt. Vesuvius area of southern Italy. **Vet. Par.**, v. 102, p. 243-252, 2001.

DURAN-STRUUCK, R.; JOST, C.; HERNANDEZ, A.H. *Dirofilaria immitis* prevalence in a canine population in the Samana Peninsula (Dominican Republic) – June 2001. **Vet. Parasitol.**, v. 133, n. 4, p. 323-327, 2005.

FERNANDES, C.G.N.; DIAS, A.R.; MOURA, S.T.; BARROS, L.A.; OMORI, M.M.; SOUZA, J.O.O.; BORGES, D.C. Incidência de dirofilariose canina na região da grande Cuiabá, Estado do Mato Grosso, Brasil. In: PANVET, XV, Campo Grande, MS. **Anais**, p. 1210, 1996.

GENCHI, C.; BASANO, F.S.; BANDI, C.; Di SACCO, B.; VENCO, L.; VEZZONI, A.; CANCRINI, G. Factors influencing the spread of heartworms in Italy. Interactions between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens*. In: SOLL, M.D.; DAVID, H.K. (Eds.), **Proc. Heartworm Symposium'95**, Batavia, IL, p. 5-26, 1995.

GENCHI, C.; TRALDI, G.; DI SACCO, B.; BENEDETTI, M.C. Epidemiological aspects of canine heartworm disease in Italy. **Atti del 4º Seminário: Filariosi**: Itália, p. 53-64, 1988.

GRIEVE, R.B.; LOK, J.B.; GLICKMAN, L.T. Epidemiology of canine heartworm infection. **Epidem. Rev.**, v. 5, p. 220-246, 1983.

GUERRERO, J.; DUCOS, H.J.; GENCHI, C.; ROJO, E.; GOMEZ-BAUTISTA, M.; VARELA, M.C.; LABARTHE, N.; BORDIN, E.; GONZALEZ G.; MANCEBO, O.; PATINO, F.; URIBE, L.F.; SAMANO, R. Update on the distribution of *Dirofilaria immitis* in dogs from Southern Europa and Latin America. American Hookworm Society. **Proc. Heartworm Symposium'92**, Austin, TX., p. 31-37, 1992.

GUERRERO, J.; RODENAS, A.; GUTIERREZ, G.; FLORIT, F. The extension of the prevalence of *Dirofilaria immitis* in Cataluna, Spain. In: SOLL, M.D.; KNIGHT, D.H. American Hookworm Society. **Proc. Heartworm Symposium'95**, Auburn, AL, p. 73-77, 1995.

HATSUSHIKA, R.; OKINO, T.; OHYAMA, F. The prevalence of dog hearthworm (*Dirofilaria immitis*) infection in stray dogs in Okayama, **Japan. K. Med. J.**, v. 18, p. 75-83, 1992.

KNIGHT, D.H. Heartworm infection. **Vet. Clin. N. Am. Small An. Practice**, v. 17, p. 1463-1517, 1987.

KOZEK, W.J.; VAZQUEZ, A.E.; GONZALEZ, C. Prevalence of canine filariae in Puerto Rico and the Caribbean. In: SOLL, M.D.; KNIGHT, D.H. eds. **Proccedings of the Heartworm Symposium '95**, Batavia, IL: p. 55-64, 1995.

LABARTHE, N.; GUERRERO, J. Epidemiology of heartworm: What is happening in South América and Mexico? **Vet. Parasitol.**, v. 133, n. 2-3, p. 149-156, 2005.

LABARTHE, N.; GUERRERO, J. What is happening in South América? American Hookworm Society. **Proc. Heartworm Symposium'04**, 20, Philadelphia, 2004.

LABARTHE, N. Dirofilariose canina: diagnóstico, prevenção e tratamento adulticida (revisão de literatura). **Clin. Vet.**, v. 2, p. 10-16, 1997.

LABARTHE, N.; ALMOSNY, N.; GUERRERO, J.; DUQUE-ARAÚJO, A.M. Description of the occurrence of canine dirofilariasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 1, p. 47-51, 1997.

LABARTHE, N.; ARAUJO, A.M.; BORDIN, E.L. Update on the distribution of *Dirofilaria immitis* in dogs in Brazil. In: **Proc. XVII WSAVA World Congress**, Roma, Italy, p. 287-289, 1992.

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

LOLE, J.B. *Dirofilaria* sp: taxonomy and distribution. In: Boreham PFL, Atwell RB, eds. **Dirofilariasis**. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 1-28, 1988.

LUZON-PENA, M.; GOMES-BAUTISTA, M. Epidemiologia da dirofilariose. **Canis et Felis**, v. 3, p. 19-31, 1993.

MATOLA, Y.G. Periodicity of *Dirofilaria immitis* microfilariae in a dog from Muheza district. **Tanz. J. Helminthol.**, v. 65, p. 76-78, 1991.

McCALL, J.W. Prevalência global da dirofilariose em cães e gatos: Visão geral. **Topics em Med. Vet. para animais de companhia**, v. 2, p. 24-30, 2000.

NEWTON, W.L.; WRIGHT, W.H. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. **J. Parasitol.**, v. 42, n. 3, p. 246-258, 1956.

ODA, T.; SUENAGA, O.; ZAITSU, M.; MORI, A.; KUROKAWA, K.; FUJITA, K.; OGAWA, Y.; YAMAZAKI, I.; IIDA, K.; DOI, K.; MINE, M.; KATO, K. Studies on annual changes in microfilarial prevalence of *Dirofilaria immitis* among house dogs for 27 years in Nagasaki City, Japan. **Jap. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 23, n. 2, p. 133-137, 1995.

OMS – Organización Mundial de la Salud. Zoonosis parasitarias. **Informe Técnico**, v. 637, p. 105-106, 1979.

PARKER, B.M. Variation in mosquito (Diptera: Culicidae) relative abundance and *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) vector potential in coastal North Carolina. **J. Med. Entomol.**, v. 30, p. 436-442, 1993.

PIMENTEL, A.; ALVES, L.C. Estudos epidemiológico preliminares na população canina de Itamaracá-PE. In: **Simpósio Nac. Filariose, Recife, PE**, 1987.

PIMENTEL, A.; BEZERRA, M.J.G.; PONTUAL, S.A.; OLIVEIRA, D.S.C.; SOARES, P.C.; LEITE, A.; BEZERRA, R.; ALVES, L.C. Prevalência da filariose canina no município de Caruaru, PE. In: **XXI Cong. Bras. Med. Veterinária**. Salvador, BA, p.32, 1988.

REDDINGTON, B.C.; RONALD, F.J.; GOODWIN, S.W. The various microflariae found in dogs in the United States. In: OTTO, G.F., **Proc. Heartworm Symposium'77**, Bonner Springs, KS, p. 14-21, 1978.

REIFUR, L.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MONTIANI-FERREIRA, F. Epidemiological aspects of filariosis in dogs on the coast of Paraná state, Brazil: with emphasis on *Dirofilaria immitis*. **Vet. Par.**, v. 122, p. 273-286, 2004.

REIS, J. C. **Estatística aplicada à pesquisa em Ciência Veterinária**. 1ª edição, Copyright, p. 651, 2003.

ROSA, A.; RIBICICH, M.; BETTI, A.; KISTERMANN, N.; CARDILLO, N.; BASSO, N.; HALLU, R. Prevalence of canine dirofilariosis in the City of Buenos Aires and its outskirts (Argentina). **Vet. Par.**, v. 109, p. 261-264, 2002.

SCHWAN, E.V.; DURAND, D.T. Canine filariosis caused by *Dirofilaria immitis* in Mozambique: a small survey based on the identification of microfilariae. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 73, n. 3, p. 124-126, 2002.

SILVA, E.; ALVES, L.C.; BARBOSA, C.L. Dirofilariose canina: situação atual no Brasil. In: **XXVI Congresso Bras. Med. Veterinária**, Campo Grande, MS, **Anais**, p. 47, 1999.

SLOCOMBE, J.O D. Reflexions on heartworm surveys in Canadá over 15 years. In: American Hookworm Society. **Proc. Heartworm Symposium'92**, Austin, TX, p. 21-30, 1992.

SONG, K.H.; LEE, S.E.; HAYASAKI, M.; SHIRAMIZU, K.; KIM, D.H.; CHO, K.W. Seroprevalence of canine dirofilariosis in South Korea. **Vet. Parasitol.**, v. 114, p. 231-236, 2003.

SOUZA, N.F.; BENIGNO, R.N.M.; FIGUEIREDO, M.J.F.M. Prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães no município de Belém, PA, com base na microfilária. **Rev. Bras. Par. Vet.**, v. 6, n. 1, p. 83-86, 1997.

SOUZA, N.F.; LARSSON, M.H.M.A. Frequência de dirofilariose canina (*D. immitis*) em algumas regiões do Estado de São Paulo por meio da detecção de antígenos circulantes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, n. 3, p. 321-325, 2001.

STROMBERG, B.E.; PROUTY, S.M.; SCHLOTTHAUER, J.C. Six decades of Heartworm in Minnesota. In: Soll, M.L. American Hookworm Society. **Proc. Heartworm Symposium'95**, Batavia, IL, p. 5-26, 1995.

SUASSUNA, A.C.D.; DEPAULA, V.V.; FEIJÓ, F.M.C. Ocorrência de cães parasitados com *Dirofilaria immitis* adulta pelo método de imunomigração rápida no município de Mossoró, RN. In: **Cong. Bras. Clínicos Veterinários de Pequenos Animais**, XX, Águas de Lindóia, SP, Anais, p. 31, 1999.

TAYLOR, A.E.R. The development of *Dirofilaria immitis* the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Helminthol.**, v. 34, p. 27-38, 1960.

WALTERS, L.L. Risk factors for heartworm infection in northern California. In: SOLL, M.D.; Knight, D.H. American Hookworm Society. **Proc. Heartworm Symposium'95**, Auburn, AL, p. 5-26, 1995.

CAPÍTULO 2

4. COMPETÊNCIA VETORIAL DE *Culex quinquefasciatus* SAY, 1823 (DIPTERA, CULICIDAE) EXPOSTO A DIFERENTES DENSIDADES DE MICROFILÁRIAS DE *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE)

4. COMPETÊNCIA VETORIAL DE *Culex quinquefasciatus* SAY, 1823 (DIPTERA, CULICIDAE) EXPOSTO A DIFERENTES DENSIDADES DE MICROFILÁRIAS DE *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE)

RESUMO

A Região Metropolitana do Recife é endêmica para *Dirofilaria immitis* e possui alta densidade de *Culex quinquefasciatus* que é um dos vetores deste nematódeo. Neste estudo avaliou-se a competência vetorial de *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE para a transmissão do referido filarídeo. As fêmeas foram alimentadas, por meio de membrana natural, com sangue canino contendo diferentes densidades de microfilárias de *D. immitis*, variando de 1820 a 2900 mf/ml. Os dados obtidos demonstraram que *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE tem grande potencial para a transmissão de *D. immitis*, pois permitiu o desenvolvimento do filarídeo até o estágio infectante nas diferentes densidades de microfilárias as quais foi exposta.

4.1 – INTRODUÇÃO

Dirofilaria immitis é um parasita comumente encontrado nas cavidades cardíacas e artérias pulmonares de canídeos e de felídeos, podendo também infectar o homem (SAMARAWICKREMA *et al.*, 1992).

A transmissão de *D. immitis* é realizada por espécies de *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Mansonia*, *Psorophora* e *Coquillettidia* (LUDLAM *et al.*, 1970). Muitos estudos estão sendo realizados em várias regiões do mundo com a finalidade de elucidar quais são as espécies de culicídeos transmissoras deste nematódeo. Entre as espécies que se destacam, *Cx. quinquefasciatus* desempenha um importante papel como vetor de *D. immitis* em áreas endêmicas de dirofilariose canina, como Estados Unidos, Austrália e Taiwan (VILLAVASO & STELLMAN, 1970; RUSSEL, 1985 e WU *et al.*, 1997).

No Brasil, *Cx. quinquefasciatus* é considerado um vetor em potencial para *D. immitis* nos Estados do Rio de Janeiro, de Alagoas e do Maranhão (LOURENÇO-DE-

OLIVEIRA & DEANE, 1995; LABARTHE *et al.*, 1998 a,b; AHID & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1999; BRITO *et al.*, 1999 e AHID *et al.*, 2000).

No nordeste brasileiro, *Cx. quinquefasciatus* tem grande importância nas localidades endêmicas para *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877), por ser o principal vetor deste filarídeo (MEDEIROS *et al.*, 1992), particularmente na Região Metropolitana do Recife, no Estado de Pernambuco, onde a filariose bancroftiana (ALBUQUERQUE *et al.*, 1999 e LIMA *et al.*, 2003) e a dirofilariose canina (ALVES *et al.*, 1999) são endêmicas.

O desenvolvimento de *D. immitis* em *Cx. quinquefasciatus* provenientes da cidade do Recife foi observado por AHID *et al.* (2000), sem, entretanto, verificar a influência da densidade de microfilárias.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a competência vetorial de *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE quando exposta a diferentes densidades de microfilárias de *D. immitis*.

4.2 - MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 - Criação e manutenção dos mosquitos utilizados nos experimentos

A colônia de *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE foi estabelecida a partir de ovos fornecidos pelo Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), Recife, PE.

A manutenção da colônia foi feita em sala climatizada com temperatura de $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $80 \pm 5\%$ de umidade relativa do ar e ciclo natural de fotoperíodo no Insetário do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE. As larvas eclodiram dos ovos em cubas plásticas contendo dois litros de água decolorada e receberam diariamente alimento industrializado para cães moído (T-Bone® - Nutron Alimentos Ltda.). As pupas foram transferidas para recipientes plásticos com água e colocadas em gaiolas teladas (30 x 30 x 25 cm) para emergência dos adultos. Estes foram alimentados permanentemente com cubos de açúcar colocados sobre algodão umedecido com água. Uma vez por semana foi oferecido sangue de cão em alimentador artificial (RUTLEDGE *et al.*, 1964; MENDONÇA *et al.*, 1998) às fêmeas para que realizassem o

repasto sangüíneo. Os recipientes plásticos onde as pupas foram mantidas serviram também para as fêmeas realizarem a oviposição.

4.2.2 - Obtenção de microfilárias de *D. immitis*:

As microfilárias de *D. immitis* utilizadas para as infecções experimentais das fêmeas de mosquito foram obtidas do sangue de um cão sem raça definida, naturalmente infectado, domiciliado na Região Metropolitana do Recife.

Este estudo foi desenvolvido após a aprovação do Projeto pelo Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Resolução nº 245/2002 – ANEXO 2).

4.2.2.1 - Coleta do sangue

Dez mililitros de sangue foram coletados através de punção venosa da veia cefálica e em seguida um mililitro foi colocado em um tubo de ensaio contendo ácido etilenodiaminotetracético de sódio – EDTA (Reagen) a 10% para realizar a quantificação de microfilárias. Os nove mililitros restantes foram divididos em tubos de ensaio contendo heparina (SoloPak Laboratories Inc.), pois este sangue foi destinado à alimentação infectante das fêmeas de mosquito.

4.2.2.2 – Processamento do material

A microfilaremia do animal foi quantificada utilizando-se o método modificado de Knott (NEWTON & WRIGTH, 1956), onde após o processamento do sangue, o sedimento obtido foi retirado com pipeta automática de 20 µl e utilizado na confecção de lâminas para posterior observação em microscópio óptico.

4.2.3 - Exposições experimentais dos mosquitos às microfilárias de *D. immitis*:

4.2.3.1 – Teste preliminar

Por não haver no Brasil informações sobre infecção experimental com *D. immitis* em mosquitos por meio de alimentação artificial, em aparelhos utilizando pele de animais *in natura* (como membrana para o repasto), decidiu-se elaborar um teste preliminar para avaliar a viabilidade do uso de pele animal na infecção experimental de mosquitos. Como

Cx. quinquefasciatus é predominantemente ornitofílico, utilizou-se pele de codorna (*Coturnix coturnix* (L.)).

Este teste constou de uma alimentação de 52 fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE.

4.2.3.2 - Exposições experimentais

Para a exposição foram utilizadas 2104 fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE com idade entre três e sete dias, expostas a diferentes densidades de microfilárias de *D. immitis* por mililitro de sangue, e como controle foram utilizadas fêmeas alimentadas com sangue não infectado (Tabela 1). Os mosquitos foram mantidos em caixas de papelão com dimensões de 8,75cm de diâmetro por 17cm de altura, cobertas com tela fina.

Tabela 1 – Número de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE alimentadas com sangue contendo diferentes densidades de microfilárias de *D. immitis* e com sangue sadio (Controle).

Densidades de microfilárias/ml de sangue	Número de fêmeas expostas às microfilárias de <i>D. immitis</i>	Número de fêmeas utilizadas como Controle
1.820	302	300
1.913	250	250
2.000	900	300
2.558	52	50
2.900	600	300

Antes da exposição as fêmeas de mosquito foram privadas de alimentação sangüínea e de solução açucarada por 24 horas. As fêmeas foram alimentadas artificialmente por meio de membrana (RUTLEDGE *et al.*, 1964) por duas horas, contendo sangue canino com microfilárias de *D. immitis* e anticoagulante (Figuras 1A e 1B). A membrana utilizada foi pele fresca de codorna (*C. coturnix*).

Após a exposição, as fêmeas ingurgitadas foram alimentadas com solução açucarada que foi obtida colocando-se cubos de açúcar sobre algodão umedecido com água. As

fêmeas de mosquito que não ficaram totalmente ingurgitadas durante o repasto sanguíneo foram descartadas.



Figura 1A – Alimentação artificial de *Culex quinquefasciatus* população RECIFE por meio de membrana com pele de *Coturnix coturnix* (codorna), com sangue canino contendo microfilárias de *D. immitis*.

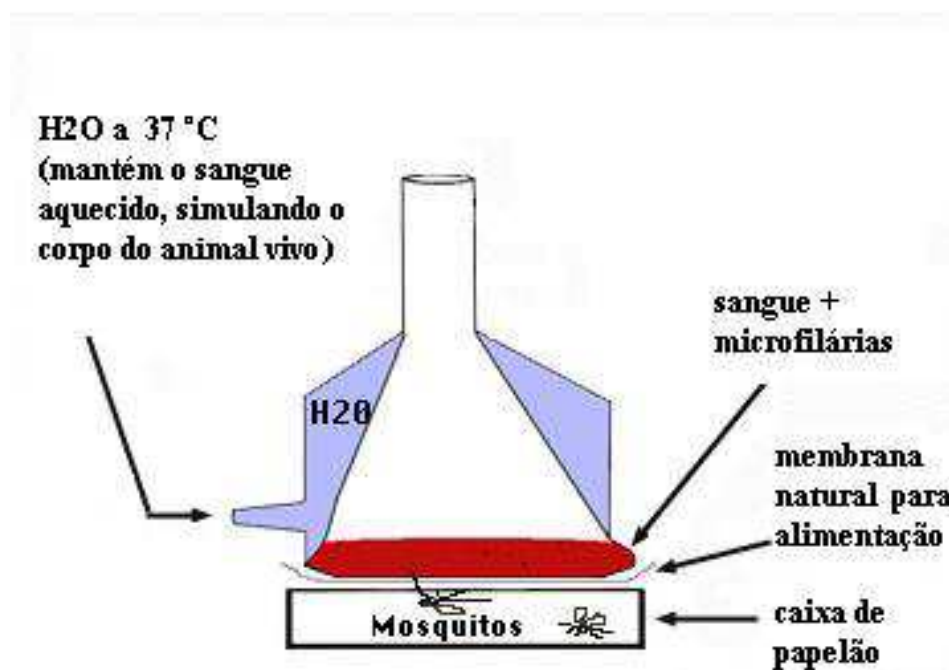


Figura 1B – Desenho esquemático do alimentador artificial.

4.2.4 - Dissecção dos mosquitos e observação de larvas de *D. immitis*:

Durante 14 dias, dez fêmeas foram retiradas diariamente da caixa com o auxílio de aspirador manual, as quais foram transferidas para frascos de vidro onde eram anestesiadas com éter e posteriormente colocadas em placas de Petri plásticas onde as pernas e as asas foram removidas. As fêmeas foram transferidas individualmente para lâminas onde os túbulos de Malpighi foram extraídos em solução salina. Posteriormente a cabeça e o tórax também foram separados em diferentes gotas da mesma solução, macerados por meio de compressão entre lâmina e lamínula e corados pelo método de Giemsa (Merck) para facilitar a análise microscópica das larvas de *D. immitis*. As observações foram realizadas em microscópio óptico com objetiva de 10X e de 40X. As dissecções foram realizadas com o auxílio de estiletos e pinças oftalmológicas para recuperação das larvas do filarídeo e observação dos estágios de desenvolvimento determinados segundo TAYLOR (1960).

4.2.5 – Análise da competência vetorial de *Cx. quinquefasciatus* para transmitir *D. immitis*

Após o repasto sangüíneo em alimentador artificial foi calculada a porcentagem de fêmeas ingurgitadas. O número médio de microfilárias ingeridas foi calculado após a alimentação com sangue canino infectado. Para tanto, dez mosquitos tiveram seus intestinos médios dissecados sobre uma gota de solução salina, e foi confeccionado um esfregaço com o conteúdo intestinal. O esfregaço foi fixado com álcool metílico e corado através do método Panótico (Newprov) e analisado em microscópio óptico com objetiva de 40X, para mensuração do número de microfilárias ingeridas.

A mortalidade foi observada diariamente de forma cumulativa e expressa em valores absolutos e relativos. Os mosquitos mortos foram dissecados e examinados para larvas de *D. immitis*, conforme descrito no item 4.2.4.

A razão de infecção (RI) expressa em porcentagem foi calculada de acordo com a expressão: $RI = (\text{Número de fêmeas infectadas} \times 100) / \text{Número de fêmeas dissecadas}$ (AHID *et al.*, 2000).

O índice de eficiência das espécies como vetoras (IEV) em porcentagem foi determinado conforme KARTMAN (1954), onde: $IEV = [\text{Número médio de larvas infectantes (L}_3\text{)}] \times 100 / \text{Número médio de microfilárias ingeridas}$.

4.2.6 – Análise Estatística

A ingestão de microfilárias por *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE nas diferentes densidades de microfilárias de *D. immitis* por ml de sangue, foi avaliada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. O desenvolvimento de larvas até o estágio infectante nas fêmeas do culicídeo, bem como a variação da mortalidade dos mosquitos nas diferentes densidades de mf/ml foi comparada por ANOVA.

O teste de regressão linear foi utilizado para avaliar a influência das várias densidades de microfilárias de *D. immitis* por ml de sangue, as quais os mosquitos foram expostos, sobre a ingestão de microfilárias, sobre o número de larvas infectantes e sobre a mortalidade dos mosquitos.

A influência da proporção de ingurgitamento das fêmeas e a diferença de microfilárias ingeridas sobre a razão de infecção, e ainda de microfilárias ingeridas sobre o número de larvas infectantes também foi avaliada por regressão linear.

O *software* utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o BioEstat na versão 2.0 para microcomputador (AYRES *et al.*, 2000).

4.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A alimentação de *Cx. quinquefasciatus* com sangue canino contendo microfilárias de *D. immitis*, durante duas horas por meio de membrana natural, com pele fresca de codorna mostrou-se eficiente na infecção experimental. Estes resultados estão de acordo com CARVALHO *et al.* (no prelo), que avaliaram a utilização de pele de codorna como membrana para o estudo da infecção de *D. immitis* em *Cx. quinquefasciatus* (ANEXO 3).

Cx. quinquefasciatus é uma espécie de mosquito preferencialmente ornitofílica (CÔNSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994), sendo assim a pele de codorna

utilizada como membrana natural para alimentação proporcionou uma ação atraente sobre as fêmeas fazendo com que o repasto sanguíneo fosse mais satisfatório.

Após a alimentação de *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE com sangue contendo diferentes densidades de microfilárias/ml observou-se uma variação de 92,3% a 98,8% de fêmeas ingurgitadas (Tabela 2). O número médio de microfilárias ingeridas por fêmea variou de 6,6 a 29,2, sendo que a menor média foi observada na densidade mais baixa (1820), e diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) das médias encontradas para as densidades 1913 e 2558. Não houve diferença estatística quanto à ingestão de microfilárias entre as outras densidades. Foi observado também que a média de ingestão de microfilárias não sofreu acréscimo com o aumento da densidade das mesmas ($F = 0,1244$, $p > 0,05$).

Os resultados do presente trabalho são similares aos relatados por AHID *et al.* (2000) sobre *Cx. quinquefasciatus* proveniente da cidade do Recife, que obteve uma média de 24,6 microfilárias ingeridas por mililitro de sangue. Tal similaridade sugere que apesar da densidade de microfilárias utilizada no presente trabalho ser 30 a 48 vezes superior àquela utilizada por AHID *et al.* (2000), deve existir um mecanismo de regulação do número de microfilárias ingeridas por parte do inseto vetor.

Sabe-se que *Cx. quinquefasciatus* pode ingerir grandes quantidades de microfilárias, no entanto devido a reações fisiológicas e imunológicas os mesmos conseguem limitar o número de larvas do parasita que se desenvolverão até o estágio infectante. Esta estratégia garante a sobrevivência do culicídeo, pois o desenvolvimento de grande quantidade de larvas de *D. immitis* destrói os túbulos de Malpighi do mosquito causando alta mortalidade (PALMER *et al.*, 1986).

Por outro lado, os resultados aqui expressos, referentes à média de microfilárias ingeridas (28,3) por *Cx. quinquefasciatus* RECIFE para a densidade de 2.558 mf/ml foram superiores aos observados por LAI *et al.* (2000) para a população de Taiwan (15,3).

Vale salientar que a mortalidade e o índice de eficiência vetorial observados em *Cx. quinquefasciatus* RECIFE para esta densidade foi de 8,9% e 56,5% respectivamente.

Segundo SCOLES (1998) uma espécie de culicídeo para apresentar eficiência vetorial deve resistir à infecção independente da carga parasitária, sobreviver por tempo suficiente para permitir o desenvolvimento das larvas até a forma infectante para mamíferos, alimentar-se também de sangue canino, estar bem adaptada à região geográfica,

ser abundante e apresentar vários picos populacionais ao longo do ano (LUDLAM *et al.*, 1970; CHRISTENSEN, 1977).

A população RECIFE de *Cx. quinquefasciatus* demonstrou as condições acima citadas, e mesmo exposta a diferentes densidades de microfilárias de *D. immitis* a mortalidade não ultrapassou os 36,25%.

No final dos experimentos, observou-se que a mortalidade de *Cx. quinquefasciatus* não foi influenciada pela exposição a diferentes densidades de microfilárias de *D. immitis* ($F = 0,0615$, $p > 0,05$) e os índices encontrados variaram de 8,9% a 36,25% (Figura 2).

Taxas de mortalidade semelhantes (ANOVA $p > 0,05$) foram encontradas em fêmeas expostas às densidades de 1913 e 2558 mf/ml de sangue. Essas taxas foram inferiores (ANOVA $p < 0,05$) as encontradas nas densidades 1820, 2000 e 2900 mf/ml de sangue e que não diferiram estatisticamente entre si (ANOVA $p > 0,05$).

A mortalidade observada nas fêmeas alimentadas com sangue sadio (controle) variou de 3,0% a 9,0%. (Figura 3). A porcentagem de mortalidade observada no grupo de fêmeas utilizado como controle foi inferior a encontrada no grupo de fêmeas exposto as microfilárias de *D. immitis*. Este resultado demonstra que a mortalidade está diretamente relacionada ao parasitismo.

Sabe-se que os mosquitos infectados ficam mais sensíveis às variações de temperatura, diminuindo a sobrevivência em temperaturas elevadas (KUTZ & DOBSON, 1974). Entretanto, a principal causa de mortalidade de fêmeas infectadas está atribuída ao desenvolvimento do parasita no corpo do mosquito, ocorrendo geralmente um pico de mortalidade nas primeiras 48 horas de infecção que é quando se observa as larvas de 1º estágio (L_1) do nematódeo e a invasão dos túbulos de Malpighi das fêmeas e posteriormente entre o 12º e o 14º dia quando as larvas infectantes rompem os túbulos de Malpighi e migram para a cabeça e probóscide dos culicídeos (KARTMAN, 1953; BUXTON & MULLEN, 1981).

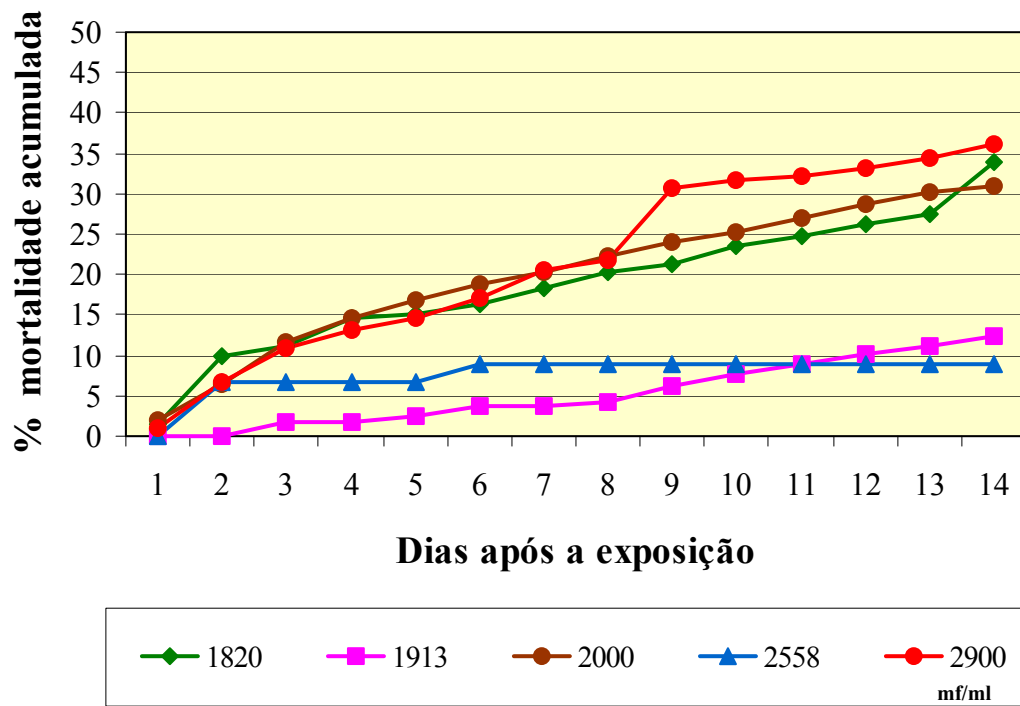


Figura 2 – Porcentagem de mortalidade de *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE após alimentação com sangue contendo diferentes densidades de microfilárias de *D. immitis*.

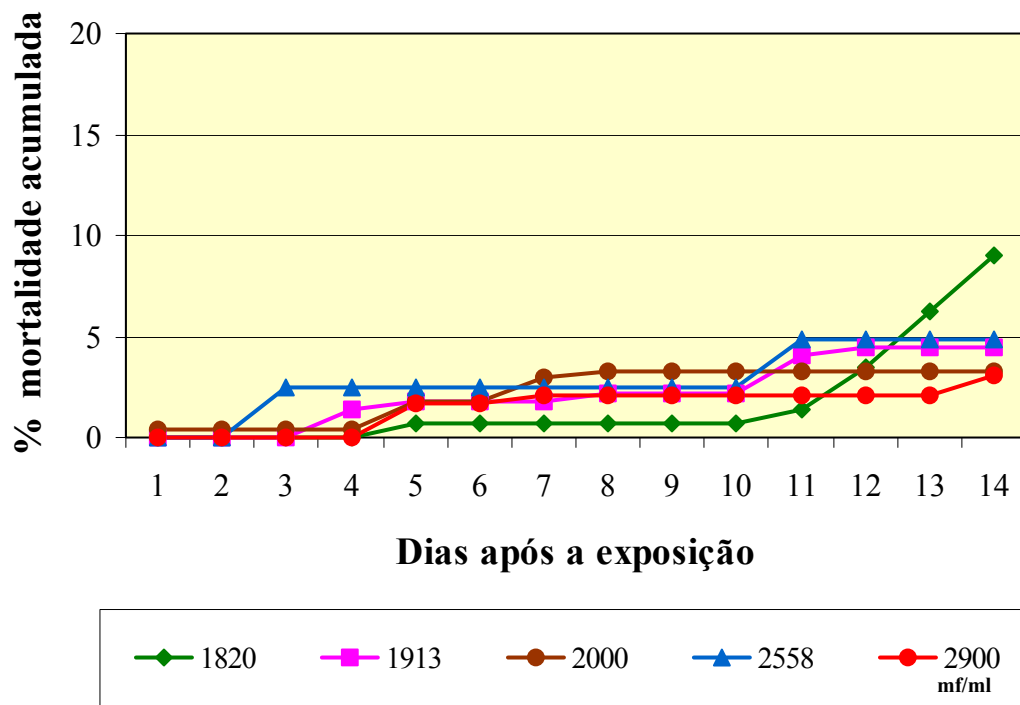


Figura 3 – Porcentagem de mortalidade dos cinco grupos Controle de *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE após alimentação com sangue sadio.

O tempo de desenvolvimento de *D. immitis* na população RECIFE de *Cx. quinquefasciatus* foi semelhante para todas as densidades de microfilárias, estando de acordo com os dados obtidos por TAYLOR (1960) e MENDONÇA *et al.* (1998) para *Ae. aegypti*, além de ser também semelhante aos resultados obtidos por AHID *et al.* (2000) para *Cx. quinquefasciatus*. O estágio salsichóide começou a ser observado a partir do terceiro dia após a infecção, persistindo até o nono dia. Entretanto, em 86 larvas neste estágio houve resposta imune do vetor e esta reação foi observada até o 14º dia nas diferentes densidades. Entretanto, este mecanismo não foi observado nas larvas presentes nos mosquitos expostos à densidade de 2.558 mf/ml de sangue.

Nas densidades de 1.913 e 2.900 mf/ml de sangue encontrou-se uma e três larvas de primeiro estágio (L₁), respectivamente, com as extremidades alteradas devido a resposta de defesa do mosquito.

A observação de larvas de *D. immitis* que sofreram resposta imune nos experimentos enfatiza a limitação que a população de culicídeo exerceu sobre o parasita em relação ao seu desenvolvimento.

Segundo McGREEVY *et al.* (1978) e COLUZZI *et al.* (1982), *Cx. quinquefasciatus* elimina grande número das microfilárias ingeridas por meio de aprisionamento no cibário e posterior destruição, além de mecanismos de melanização do parasita (CHRISTENSEN & FORTON, 1986), ou ainda por coagulação rápida do sangue ingerido e também pela presença de cristais de oxihemoglobina no conteúdo intestinal resultante da oxidação do sangue ingerido (NAYAR & SAUERMAN, 1975; LOWRIE, 1991, LOFTIN *et al.*, 1995), permitindo apenas o desenvolvimento de um número suportável de larvas que não lhe cause muitos danos.

Do 6º ao 11º dia foram observadas larvas de segundo estágio (L₂), enquanto que larvas de terceiro estágio (L₃) foram observadas a partir do 12º dia após a infecção para todas as densidades, exceto para a densidade de 1913 mf/ml de sangue que apresentou larvas infectantes a partir do 13º dia.

As fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* apresentaram larvas infectantes (L₃) nos túbulos de Malpighi a partir do 12º dia, enquanto que na cabeça e na probóscide foram observadas a partir do 13º dia após a infecção.

BRITO *et al.* (1999) encontraram larvas infectantes nos túbulos de Malpighi de *Cx. quinquefasciatus* população ALAGOAS no 14º dia, enquanto que AHID *et al.* (2000) observaram larvas infectantes (L₃) nos túbulos de Malpighi de *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE no 11º dia e na probóscide apenas no 14º dia após a infecção.

Os períodos de detecção dos estágios larvais aqui observados estão de acordo com os relatos de TAYLOR (1960) e MENDONÇA *et al.* (1998) para *Ae. aegypti*.

Os índices de eficiência vetorial (IEV) apresentados por *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE foram de 7,8 a 56,5 (Tabela 2). Em relação à razão de infecção, o maior índice foi encontrado no grupo de fêmeas expostas a densidade de 1913 microfilárias/ml (Tabela 3), entretanto, não foi influenciado pela taxa de ingurgitamento das fêmeas (F=3,2937, p>0,05) e pelo número de microfilárias ingeridas (F = 2,1952, p>0,05). Estes dados são semelhantes aos de RUSSELL & GEARY (1996) que observaram a ausência de relação entre o aumento da densidade de microfilárias de *D. immitis* com aumento da razão de infecção de *Cx. annulirostris*.

Tabela 2– Porcentagem de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE ingurgitadas, após alimentação com diferentes densidades de microfilárias de *D. immitis* / ml de sangue (mf/ml) em alimentador artificial, com respectiva média de mf ingeridas e Índice de eficiência vetorial (IEV).

Densidades de mf / ml de sangue	Fêmeas ingurgitadas (%)	X mf ingeridas*	X L ₃ **	IEV (%)
1820	94,7	6,6 ± 8,0 ^a	2,2 ± 1,4 ^A	33,3
1913	93,6	29,2 ± 11,7 ^b	2,3 ± 1,9 ^A	7,8
2000	94,8	17,7 ± 14,5 ^a	1,8 ± 1,6 ^A	10,2
2558	92,3	28,3 ± 4,1 ^b	16,0 ± 2,6 ^B	56,5
2900	98,8	16,5 ± 8,5 ^a	2,2 ± 1,4 ^A	13,3

* número médio de microfilária ingeridas - observado logo após o repasto sangüíneo.

** número médio de L₃ de *D. immitis* nas fêmeas de mosquito. Valores representados nas colunas por letras distintas são estatisticamente diferentes.

mf - microfilárias

Tabela 3– Razão de infecção (%) de *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE exposta experimentalmente a diferentes densidades de microfilárias de *D. immitis*.

Densidades de mf / ml de sangue	Número de fêmeas dissecadas	Número de fêmeas infectadas	Razão Infecção (%)
1820	276	85	30,8
1913	224	105	46,8
2000	824	111	13,5
2558	45	18	40,0
2900	573	146	25,5

mf - microfilárias

Em relação ao desenvolvimento de larvas de *D. immitis* até o estágio infectante em *Cx. quinquefasciatus*, o presente estudo confirma a limitação do desenvolvimento do nematódeo citada por diversos autores (RUSSELL & GEARY, 1992; RUSSELL & GEARY, 1996; LAI *et al.*, 2000), uma vez que foi observado que o número de larvas recuperadas no estágio infectante não foi influenciado pelas diferentes densidades de microfilárias ($F=0,5912$, $p>0,05$) as quais os mosquitos foram expostos e nem pelo aumento de microfilárias ingeridas ($F=1,3569$, $p>0,05$).

Os dados obtidos demonstraram que *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE apresentou grande potencial para a transmissão de *D. immitis*, pois o mesmo suportou bem o desenvolvimento do nematódeo até o estágio infectante nas diferentes densidades de microfilárias as quais foi exposto. Para se caracterizar como um bom vetor, é necessário ainda, verificar a sua biologia, abundância e taxas reprodutivas. Outro fator que reforça esta hipótese é que o *Cx. quinquefasciatus* apresenta altas taxas reprodutivas na Região Metropolitana do Recife (OLIVEIRA, 1996).

Cx. quinquefasciatus foi considerado por LABARTHE *et al.* (1998a) como vetor secundário no Rio de Janeiro, assim como em São Luis, MA e AHID *et al.* (1999) encontraram esta espécie naturalmente parasitada por larvas no estágio infectante sugerindo ser um bom vetor de *D. immitis* no Nordeste. Os resultados do presente estudo ampliam esta possibilidade.

4.4 – CONCLUSÃO

A população RECIFE de *Cx. quinquefasciatus* demonstrou ter competência para a transmissão de *D. immitis*, por meio de infecções experimentais, sugerindo que possa ser uma das espécies transmissoras deste nematódeo na Região Metropolitana do Recife.

4.5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHID, S.M.M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Mosquitos vetores potenciais de dirofilariose canina na Região Nordeste do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v.33, n. 6, p. 560-565, 1999.

AHID, S.M.M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R; SARAIVA, L.Q. Dirofilariose canina na Ilha de São Luís, Nordeste do Brasil: uma zoonose potencial. **Cad. Saúde Pública**, v. 15, n. 2, p. 405-412, 1999.

AHID, S.M.M.; VASCONCELOS, P.S.S.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Vector competence of *Culex quinquefasciatus* Say from different regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 6, p. 769-775, 2000.

ALBUQUERQUE, C.M.R.; CAVALCANTI, V.M.S.; MELO, M.A.V.; VERÇOSA, P.; REGIS, L.N.; HURD, H. Bloodmeal microfilariae density and the uptake and establishment of *Wuchereria bancrofti* infections in *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 591-596, 1999.

ALVES, L.C.; SILVA, L.V.A.; FAUSTINO, M.A.G.; MCCALL, J.W.; SUPAKONDERJ, P.; LABARTHE, N.; SANCHEZ, M.; CAIRES, O. Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 587-590, 1999.

AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.L. **BioEstat 2.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, CNPq, Brasília, 272 p., 2000.

BRITO, A.C.; FONTES, G.; ROCHA, E.M.M.; ROCHA, D.A.M.; REGIS, L. Development of *Dirofilaria immitis* (Leidy) in *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) from Maceió, Alagoas, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 4, p. 575-576, 1999.

BUXTON, B.A.; MULLEN, G.R. Comparative susceptibility of four strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection with *Dirofilaria immitis*. **J. Med. Entomol.**, v.18, n. 5, p. 434-440, 1981.

CARVALHO, G.A.; ALVES, L.C.; MAIA, R.T.; ANDRADE, C.F.S.; BRITO, F.L.C.; FAUSTINO, M.A.G. Use of the quail *Coturnix coturnix* (Linne, 1758) skin as feeding membrane to continuously study *Dirofilaria immitis* in *Culex quinquefasciatus* (Say). **Rev.Entomol. y Vectores**. (in press).

CHRISTENSEN, B.N.; FORTON, K.F. Hemocyte-mediated melanization of microfilariae in *Aedes aegypti*. **J. Parasitol.**, v. 72, n. 2, p. 220-225, 1986.

CHRISTENSEN, B.M. Laboratory studies on the development and transmission of *Dirofilaria immitis* by *Aedes trivittatus*. **Mosquito News**, v. 37, n. 3, p. 367-372, 1977.

COLUZZI, M.; CONCETTI, A.; ASCOLI, F. Effect of cibarial armature of mosquitoes (Diptera: Culicidae) on blood-meal haemolysis. **J. Insect Physiol.**, v. 28, p. 885-888, 1982.

CÔNSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, 228 p., 1994.

KARTMAN, L. Factors influencing infection of the mosquito with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). **Exp. Parasitol.**, v. 2, p. 27-28, 1953.

KARTMAN, L. Suggestions concerning an index experimental filaria infection in mosquitoes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 3, p. 329-337, 1954.

KUTZ, F.W.; DOBSON, R.C. Effects of temperature on the development of *Dirofilaria immitis* (Leidy) in *Anopheles quadrimaculatus* Say and on vector mortality resulting from this development. **An. Entomol. Soc. Am.**, v. 67, p. 325-331, 1974.

LABARTHE, N.; SERRÃO, M.L.; MELO, Y.F.; OLIVEIRA, S.J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Potential vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in Itacoatiara, oceanic region of Niterói municipality, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 4, p. 425-432, 1998a.

LABARTHE, N.; SERRÃO, M.L.; MELO, Y.F.; OLIVEIRA, S.J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Mosquito frequency and feeding habits in an enzootic canine dirofilariasis area in Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 145-154, 1998b.

LAI, C.H.; TUNG, K.C.; OOI, H.K.; WANG, J.S. Competence of *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus* as vector of *Dirofilaria immitis* after blood meal with different microfilarial density. **Vet. Par.**, v. 90, n. 3, p. 231-237, 2000.

LIMA, C.A.; ALMEIDA, W.R.; HURD, H.; ALBUQUERQUE, C.M.R. Reproductive aspects of the *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) infected with *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 2, p. 217-222, 2003.

LOFTIN, K.M.; BYFORD, R.L.; LOFTIN, M.J.; CRAIG, M.E. Potential mosquito vectors of *Dirofilaria immitis* in Bernalillo County, New Mexico. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 11, n. 1, p. 90-93, 1995.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DEANE, L.M. Presumed *Dirofilaria immitis* infections in wild-caught *Aedes taeniorhynchus* and *Aedes scapularis* in Rio de Janeiro, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 387-388, 1995.

LOWRIE, R.C. Poor vector efficiency of *Culex quinquefasciatus* following infection with *Dirofilaria immitis*. **J. Am. Mosq. Assoc.**, v. 7, p. 30-37, 1991.

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

McGREVY, P.B.; BRYAN, J.H.; OOTHMAN, P.; KOLSTRUP, N. The lethal effects of the cibarial and pharyngeal armatures of mosquitoes on microfilariae. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, p. 361-368, 1978.

MEDEIROS, Z.; DREYER, G.; ANDRADE, L.D. *Wuchereria bancrofti* microfilarial density of autochthonous cases and natural *Culex* infectivity rates in Northeast Brazil.. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, p. 214-217, 1992.

MENDONÇA, I.L.; ALVES, L.C.; MCCALL, J.W.; FAUSTINO, M.A.G.; SUPAKONDERJ, P. Porcentual de Infecção por *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) em *Aedes aegypti* (Linnaeus) através da utilização de membrana artificial. **Ciênc. Vet. Trop.**, v.1, p. 30-32, 1998.

NAYAR, J.K.; SAUERMANN, D.M. Physiological basis of host susceptibility of Florida mosquitoes to *Dirofilaria immitis*. **J. Insect Physiol.**, v. 21, n. 12, p. 1965-1975, 1975.

NEWTON, W.L.; WRIGHT, W.H. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. **J. Parasitol.**, v. 42, n. 3, p. 246-258, 1956.

OLIVEIRA, C.M.F. **Condições ambientais e densidade populacional do *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae), em áreas urbanas do Recife e Olinda.** Dissertação de Mestrado, Departamento de Zoologia, UFPE, Recife, 71 pp., 1996.

PALMER, C.A.; WITTROCK, D.D.; CHRISTENSEN, B.M. Ultrastructure of malpighian tubules of *Aedes aegypti* infected with *Dirofilaria immitis*. **J. Invert. Pathol.**, v. 48, p. 310-317, 1986.

RUSSELL, R.C. Report of a field study on mosquito (Diptera: Culicidae) vectors of dog heartworm *Dirofilaria immitis* (Spirurida: Onchocercidae) near Sydney, N.S.W., and the implications for veterinary and public health concern. **Aust. J. Zool.**, v. 33, p. 461-472, 1985.

RUSSELL, R.C.; GEARY, M.J. The susceptibility of the mosquitoes *Aedes notoscriptus* and *Culex annulirostris* to infection with dog heartworm *Dirofilaria immitis* and their vector efficiency. **Med. Vet. Entomol.**, v. 6, p. 154-158, 1992.

RUSSELL, R.C.; GEARY, M.J. The influence of microfilarial density of dog heartworm *Dirofilaria immitis* on infection rate and survival of *Aedes notoscriptus* and *Culex annulirostris* from Australia. **Med. Vet. Entomol.**, v. 10, p. 29-34, 1996.

RUTLEDGE, L.C.; WARD, R.A.; GOULD, D.J. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. **Mosq. News**, v. 24, p. 407-419, 1964.

SAMARAWICKEMA, W.A.; KIMURA, E.; SONES, F.; PAULSON, G.S.; CUMMINGS, E.F. Natural infections of *Dirofilaria immitis* in *Aedes polynesiensis* and *Aedes* (Finlaya) *samoamus* and their implication in human health in Samoa. **Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.**, v. 86, p. 187-188, 1992.

SCOLES, G.A. Vectors of canine heartworm in the United States: a review of the literature including new data from Indiana, Florida and Louisiana. In: SEAWARD, R.L.; COURTNEY, C.H. **Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium'98**. Tampa, FL: American Heartworm Society, p. 21-36, 1998.

TAYLOR, A.E.R. The development of *Dirofilaria immitis* the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Helminthol.**, v. 34, p. 27-38, 1960.

VILLAVASO, E.J.; STEELMAN, C.D. Laboratory and field studies of the southern house mosquito, *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, *Dirofilaria immitis* (Leidy), in Louisiana. **J. Med. Entomol.**, v. 7, n. 4, p. 471-476, 1970.

WU, C.C.; CHEN, C.C.; FAN, P.C. Natural infection of mosquitoes with *Dirofilaria immitis* in northern Taiwan. **J. Chin. Soc. Vet. Sc.**, v. 23, p. 12-20, 1997.

CAPÍTULO 3

5. EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DE DUAS POPULAÇÕES E DE UMA LINHAGEM DE *Aedes aegypti* LINNAEUS, 1762 E DE UMA POPULAÇÃO DE *Aedes albopictus* SKUSE, 1894 (DIPTERA, CULICIDAE) À *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE)

5. EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DE DUAS POPULAÇÕES E DE UMA LINHAGEM DE *Aedes aegypti* LINNAEUS, 1762 E DE UMA POPULAÇÃO DE *Aedes albopictus* SKUSE, 1894 (DIPTERA, CULICIDAE) À *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE)

RESUMO

Aedes aegypti e *Ae. albopictus* são susceptíveis à *D. immitis* podendo transmitir o filarídeo aos cães e gatos. Fêmeas de *Ae. aegypti* Linnaeus, 1762 populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER e de *Ae. albopictus* Skuse, 1894 população RECIFE foram expostas experimentalmente a *D. immitis* com a finalidade de avaliar a eficiência destes culicídeos na transmissão do mesmo. Os mosquitos foram expostos a uma concentração de 2000 microfilárias por mililitro de sangue, por meio de membrana natural confeccionada com pele de rato. Dentre as espécies estudadas, *Ae. albopictus* população RECIFE apresentou o maior número de larvas de *D. immitis* infectantes na probóscide, com índice de eficiência vetorial de 25,2%, além de uma baixa mortalidade.

5.1 - INTRODUÇÃO

Apesar de mais de 70 espécies de mosquitos pertencentes à família Culicidae serem susceptíveis a infecção por *D. immitis*, apenas 14 possuem capacidade de transmissão deste nematódeo (LUDLAM *et al.*, 1970), sendo que em muitas partes do mundo as espécies vetorais ainda são desconhecidas (McCALL, 2000).

Entretanto, para ocorrer o processo de transmissão, fatores intrínsecos aos hospedeiros invertebrados como resistência à infecção, desenvolvimento da larva infectante, alimentação em hospedeiro susceptível, adaptação à região geográfica e apresentação de vários picos populacionais, entre outros, são características importantes em se tratando de vetor (LUDLAM *et al.*, 1970; APPERSON *et al.*, 1989 e SCOLES & CRAIG, 1993).

Sendo assim, a limitação do desenvolvimento de microfilárias pode ser um fator decisivo para a sobrevivência do parasita (LAI *et al.*, 2000). Como o ciclo biológico do nematódeo se desenvolve nos túbulos de Malpighi do mosquito (TAYLOR, 1960), ocorre muitas vezes destruição total destes órgãos quando a infecção é alta (BUXTON &

MULLEN, 1981). Assim, a sobrevivência do vetor e do parasita é garantida nas espécies aonde ocorre o desenvolvimento de apenas um número limitado de microfilárias (LAI *et al.*, 2000; MAHMOOD, 2000).

No Brasil, as espécies *Ae. taeniorhynchus*, *Ae. scapularis* e *Cx. quinquefasciatus* foram até o momento reconhecidas como vetores nos Estados do Rio de Janeiro e do Maranhão respectivamente (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & DEANE, 1995; LABARTHE *et al.*, 1998 a,b; AHID & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1999). Nos demais Estados os vetores naturais e suas respectivas competências para transmissão do parasita ainda necessitam de esclarecimentos.

Segundo ALVES *et al.* (1999) a região metropolitana do Recife além de ser endêmica para dirofilariose, registra a ocorrência de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, o que ressalta a importância de se verificar a competência destas espécies na transmissão de *D. immitis*.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento de *D. immitis* em populações e linhagem de *Ae. aegypti* e população de *Ae. albopictus* em condições experimentais de laboratório, para determinar a eficiência vetorial das espécies de áreas endêmica e não-endêmica.

5.2 - MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 - Criação dos mosquitos utilizados nos experimentos

Para a realização dos experimentos foram utilizadas fêmeas de *Ae. aegypti* populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER obtidas de colônias estabelecidas a partir de ovos de *Ae. aegypti* população RECIFE e linhagem ROCKFELLER, fornecidos pelo Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), Recife, PE e *Ae. aegypti* UNICAMP proveniente de Campinas, SP que foi estabelecida a partir de ovos de população existente no Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP. A colônia de *Ae. albopictus* população RECIFE foi obtida a partir de larvas coletadas no Campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) em Recife, PE.

Os mosquitos foram criados e mantidos em sala climatizada com temperatura de 28 $\pm$ 1°C e 80 $\pm$ 5% de umidade relativa do ar e ciclo natural de fotoperíodo, no Insetário do

Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE. As larvas eclodiram dos ovos em cubas plásticas contendo dois litros de água decolorada e receberam diariamente alimento industrializado para cães moído (T-Bone®, Nutron Alimentos Ltda.). As pupas foram transferidas para recipientes plásticos com água e colocadas em gaiolas com dimensões de 30 x 30 x 25 cm para emergência dos adultos. Estes foram alimentados permanentemente com solução açucarada obtida colocando-se cubos de açúcar em algodões umedecidos com água sobre a gaiola. Uma vez por semana as fêmeas foram alimentadas com sangue canino em membrana natural confeccionada com pele de rato [*Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769)], conforme RUTLEDGE *et al.* (1964) e MENDONÇA *et al.* (1998). Recipientes contendo água decolorada foram revestidos com papel de filtro e colocados nas gaiolas para as fêmeas de *Aedes* realizarem a oviposição.

5.2.2 - Obtenção de microfilárias de *D. immitis*

As microfilárias de *D. immitis* utilizadas para as infecções experimentais das fêmeas de mosquito foram obtidas do sangue de um cão naturalmente infectado, sem raça definida, com idade de aproximadamente seis anos, macho, domiciliado procedente da Região Metropolitana do Recife.

5.2.2.1 - Coleta do sangue

O sangue foi coletado por meio de punção venosa da veia cefálica, e em seguida uma amostra foi colocada em tubo de ensaio contendo ácido etilenodiaminotetracético de sódio – EDTA (Reagen) a 10%, para quantificar a microfilaremia, utilizando-se o método modificado de Knott (NEWTON & WRIGTH, 1956). O sangue restante foi destinado à alimentação infectante das fêmeas de mosquito e por esse motivo foi transferido para tubos contendo heparina (SoloPak Laboratories Inc.).

5.2.3 - Exposições experimentais dos mosquitos às microfilárias de *D. immitis*

Foram utilizadas 2.700 fêmeas de *Ae. aegypti*, sendo 900 de cada população e linhagem estudada, e 900 fêmeas de *Ae. albopictus*, sempre com idade entre três e sete dias, expostas à densidade de 2.000 microfilárias de *D. immitis* por mililitro de sangue. Como

controle, foram utilizadas 300 fêmeas, de cada população e linhagem, alimentadas com sangue não infectado.

Antes da exposição, as fêmeas de mosquitos foram privadas de alimentação sangüínea e de solução açucarada por 24 horas. Decorrido este tempo, as fêmeas foram alimentadas com sangue canino contendo microfilárias de *D. immitis* por meio de membrana natural (RUTLEDGE *et al.*, 1964; MENDONÇA *et al.*, 1998), durante duas horas. Após a exposição, as fêmeas visivelmente bem ingurgitadas foram alimentadas com solução açucarada. As fêmeas que não ficaram totalmente ingurgitadas durante o repasto sangüíneo foram descartadas. O cálculo do percentual de fêmeas ingurgitadas foi realizado após uma contagem por meio de visibilização.

Para calcular o número médio de microfilárias ingeridas, dez mosquitos foram mortos diariamente e tiveram seus intestinos médios dissecados sobre uma gota de solução salina, para a confecção de esfregaços, que foram fixados e corados pelo método Panótico (Newprov). O número de microfilárias ingeridas foi estabelecido pela contagem direta em microscópio óptico com objetiva de 40X. A mortalidade de fêmeas expostas a *D. immitis* também foi acompanhada diariamente e expressa em valores cumulativos absolutos e em porcentagem.

5.2.4 - Dissecção dos mosquitos e observação de larvas de *D. immitis*

Diariamente, durante 14 dias, dez fêmeas foram retiradas da caixa com o auxílio de aspirador manual, transferidas para frascos de vidro, anestesiadas com éter e posteriormente colocadas em placas de Petri plásticas para a remoção das pernas e das asas. Depois foram transferidas individualmente para lâminas visando a extração dos túbulos de Malpighi em solução salina. Posteriormente ocorreu a separação da cabeça e do tórax em diferentes gotas da mesma solução, onde foram macerados por meio de compressão entre lâmina e lamínula e corados com Giemsa (Merck) para facilitar a análise microscópica das larvas de *D. immitis*. Realizaram-se as observações em microscópio óptico com objetiva de 10X e de 40X. Utilizaram-se estiletes e pinças oftalmológicas durante as dissecções para a recuperação das larvas do filarídeo e os estágios de desenvolvimento determinados segundo TAYLOR (1960).

Após o término dos experimentos, foram calculados a razão de infecção (RI) expressa em porcentagem, de acordo com AHID *et al.* (2000) e o índice de eficiência vetorial (IEV) em porcentagem, conforme KARTMAN (1954), onde:

$$RI = \frac{\text{Número de fêmeas infectadas} \times 100}{\text{Número de fêmeas dissecadas}}$$

$$IEV = \frac{\text{Número médio de larvas infectantes (L}_3\text{)} \times 100}{\text{Número médio de microfilárias ingeridas}}$$

5.2.5 – Análise Estatística

O número médio de microfilárias ingeridas e a mortalidade observada nas diferentes populações e linhagem estudadas foram analisados utilizando-se o teste paramétrico de Tukey aplicado à ANOVA, enquanto que, o número médio de larvas infectantes foi comparado através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

A análise de regressão linear foi feita para verificar a influência da ingestão de microfilárias na mortalidade das fêmeas infectadas. Foi utilizado também para verificar a mesma influência sobre a razão de infecção e sobre o número de larvas infectantes. A mesma análise foi realizada para relacionar a razão de infecção à proporção de ingurgitamento.

Para tanto, utilizou-se o *software* estatístico BioEstat na versão 2.0 para microcomputador (AYRES *et al.*, 2000).

5.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de ingurgitamento de fêmeas de *Ae.aegypti* após o repasto sangüíneo em membrana artificial foi de 97,6% para a população RECIFE, de 91,5% para a população UNICAMP, e de 97,6% para a linhagem ROCKFELLER, enquanto que para a espécie *Ae. albopictus* população RECIFE o ingurgitamento foi de 93,3%.

Em um estudo semelhante, SERRÃO (2004) observou taxas de fêmeas ingurgitadas de 52,83% para *Ae. aegypti* linhagem ROCKFELLER e de 39,1% para *Ae. albopictus* população ALBUQUERQUE. A razão para esta diferença deve-se ao fato da membrana utilizada pelo referido autor ser a Baudruche confeccionada com intestino bovino industrializado, e que não exerceu a mesma atração que a pele animal “fresca” produziu às

fêmeas de culicídeo. No presente estudo foi utilizada uma membrana com pele de rato recém eutanaziado, contendo pêlos, simulando assim as condições naturais de um repasto sangüíneo em um animal vivo, o que proporcionou uma excelente atração das fêmeas de culicídeo.

Diversos autores têm pesquisado várias técnicas de alimentação artificial utilizando diferentes membranas para estudar a transmissão de parasitas e patógenos por artrópodos (RUTLEDGE *et al.*, 1964; WALADDE *et al.*, 1996; MOURYA *et al.*, 2000).

KASAP *et al.* (2003) verificaram a eficiência de três membranas para a alimentação de *Anopheles sacharovi* Favre, 1903 e observaram que uma membrana produzida por pele de intestino de bezerro proporcionou maior porcentagem de fêmeas ingurgitadas (50,5%) do que aquelas confeccionadas com látex ou membrana plástica de polietileno (Parafilm®). TSENG (2003) também observou um ingurgitamento relativamente baixo para *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, de 31% e de 53% respectivamente, ao utilizar membrana plástica de polietileno como membrana de alimentação.

Por outro lado, MELLOR (1971) ao alimentar *Culicoides nubeculosus* (Meigen) e *C. variipennis sonorensis* Coquillett sobre uma membrana confeccionada com pele de galinha, obteve ingurgitamento total dos dípteros. BLACKWELL *et al.* (1994) estudando também pele de galinha e membrana plástica de polietileno (Nescofilm®) para alimentação de *C. impunctatus* Goetghebuer, obtiveram 61,7% de fêmeas ingurgitadas.

Os dados obtidos no presente estudo estão de acordo com as observações realizadas por BURKOT *et al.* (2001) quando estudaram o ingurgitamento de artrópodes sobre membrana confeccionada com pele de rato, obtendo taxas de ingurgitamento satisfatórias.

Quanto à ingestão de microfilárias (Tabela 1), observou-se que *Ae. albopictus* população RECIFE ingeriu quantidade semelhante a *Ae. aegypti* população RECIFE e linhagem ROCKFELLER ($p > 0,05$), enquanto que *Ae. aegypti* população UNICAMP ingeriu um número de microfilárias inferior as outras populações e linhagem ($p < 0,01$).

A população de *Ae. aegypti* RECIFE apresentou maior mortalidade (Figura 1) ao final do experimento, apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) em relação à linhagem ROCKFELLER, população UNICAMP e *Ae. albopictus* população RECIFE, que não diferiram entre si ($p > 0,05$). Entretanto, verificou-se que o aumento da

proporção da mortalidade não foi influenciado pelo aumento da ingestão de microfilárias ($F = 0,6899$, $p > 0,05$).

O parasitismo por *D. immitis* exerceu grande impacto sobre as fêmeas de *Ae. aegypti* população RECIFE comprometendo a sobrevivência das fêmeas logo após o repasto sanguíneo contendo microfilárias. Observação semelhante foi realizada por PAIGE & CRAIG, (1975); SAMARWICKERMA & LAURENCE (1978) e MAHMOOD & NAYAR (1989), onde a susceptibilidade de *Ae. aegypti* ao nematódeo comprometeu a sobrevivência dos mosquitos.

MENDONÇA *et al.* (1998) estudando a competência vetorial de *Ae. aegypti* linhagem LIVERPOOL para a transmissão de *D. immitis*, obtiveram 77,95% de mortalidade, ressaltando que além da grande motilidade das microfilárias no intestino do mosquito, fatores ambientais como a temperatura e a umidade relativa do ar também podem influenciar a mortalidade das fêmeas infectadas.

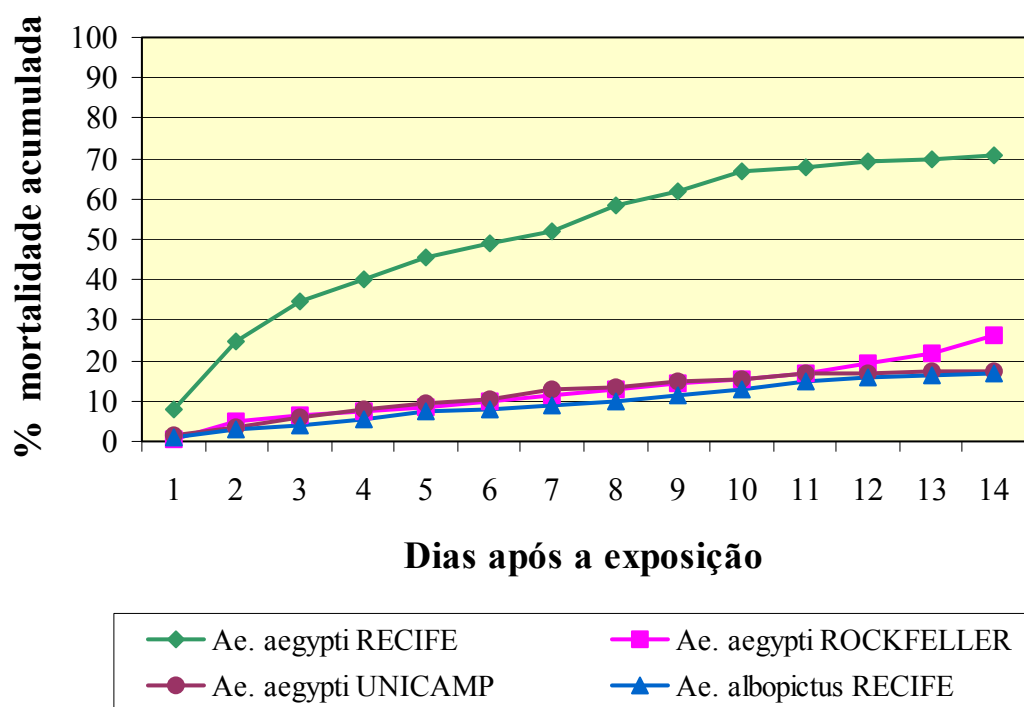


Figura 1 – Porcentagem de mortalidade de *Ae. aegypti* populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER e de *Ae. albopictus* população RECIFE expostas a densidade de 2000 microfilárias de *D. immitis* por mililitro de sangue.

Com relação ao período de desenvolvimento de *D. immitis* encontrado para as três populações e linhagem estudadas, pequenas diferenças foram detectadas quando comparado às observações de TAYLOR (1960) e MENDONÇA *et al.* (1998) para *Ae. aegypti*. Esses autores ressaltaram que diferenças entre cepas do nematódeo podem ser responsáveis pela variação no tempo de duração dos estágios larvais. Vale salientar que o estágio salsichóide começou a ser observado em *Ae. aegypti* RECIFE a partir do quarto dia após a infecção.

Na população UNICAMP e na linhagem ROCKFELLER de *Ae. aegypti* ocorreu a permanência de larvas de primeiro estágio (L₁) de *D. immitis* até o término dos experimentos no 14º dia após a exposição. O tempo de desenvolvimento de *D. immitis* da população foi igual ao da linhagem, sendo observadas larvas no estágio salsichóide a partir do 6º dia.

Em se tratando de *Ae. albopictus* RECIFE, a biologia de *D. immitis* apresentou um ciclo mais precoce em relação à *Ae. aegypti*, pois no segundo dia após a exposição já foram encontradas larvas no estágio salsichóide (Figura 2A). Essa antecipação permaneceu para os outros estágios, sendo encontradas larvas de segundo estágio -L₂ (Figura 2B) no quinto dia e larvas infectantes (L₃) a partir do nono dia, permanecendo até o 14º dia (larvas no túbulo de Malpighi, cabeça e probóscide).

KARTMAN (1953), McGREY *et al.* (1974), NAYAR & SAUERMAN (1975), BUXTON & MULLEN (1981), trabalhando com infecção experimental de diferentes populações de *Ae. aegypti* com *D. immitis* também observaram o estágio L₁ durante todo o experimento, o que segundo estes autores, demonstra a inibição do desenvolvimento do parasita, podendo refletir na resistência do mosquito à infecção.

A população UNICAMP e a linhagem ROCKFELLER de *Ae. aegypti* apresentaram larvas de *D. immitis* em L₂ no oitavo dia e larvas infectantes -L₃ (Figura 2C e 2D) a partir do décimo dia para a população UNICAMP e 14º para a linhagem ROCKFELLER, sendo que foram observadas reação de melanização nos dois vetores. Esse fato demonstra a limitação que estes mosquitos exerceram sobre o desenvolvimento do parasita.

Em relação ao número de larvas infectantes (L₃) observadas (Tabela 1), não houve influência do número de microfilárias ingeridas ($F=0,0415$; $p>0,05$).

Neste contexto, a população UNICAMP e a linhagem ROCKFELLER de *Ae. aegypti* apresentaram o mesmo número médio de larvas infectantes ($p > 0,05$), e diferiram

das populações RECIFE de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus* que também apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,05$).

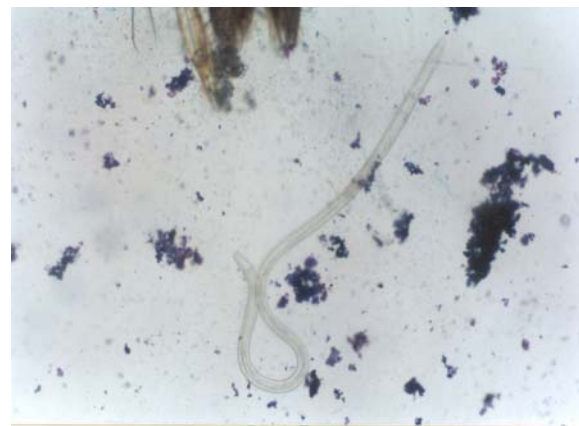
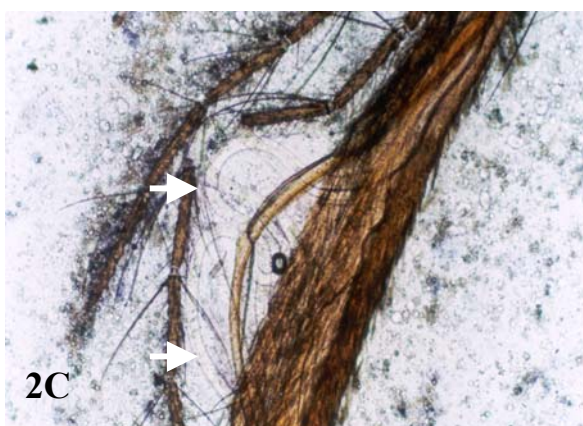
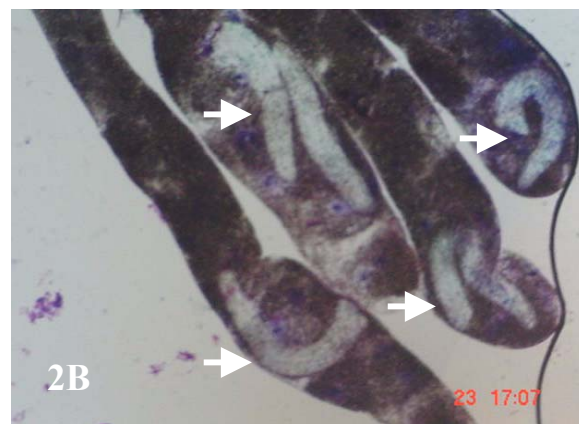


Figura 2A – Estágio salsichóide de *D. immitis* isolada de túbulo de Malpighi de *Ae. albopictus* população RECIFE (153,5x)

Figura 2B – Larvas de 2º estágio de *D. immitis* em túbulos de Malpighi de *Ae. albopictus* população RECIFE (58,5x)

Figura 2C – Larvas infectantes de *D. immitis* na probóscide de *Ae. aegypti* linhagem ROCKFELLER (51,7x)

Figura 2D – Larva de 3º estágio de *D. immitis* isolada da probóscide de *Ae. aegypti* linhagem ROCKFELLER (54x)

Sabe-se que a ROCKFELLER é uma linhagem resistente à infecção por *D. immitis* (BUXTON & MULLEN, 1981), assim o comportamento semelhante da população UNICAMP sugere que esta não seja também susceptível ao nematódeo, ou que não esteja adaptada ao mesmo.

Entre os culicídeos estudados, *Ae. albopictus* população RECIFE apresentou o maior número de larvas de terceiro estágio, destas, 5,75% (05/87) foram encontradas na cabeça, 42,52% (37/87) na probóscide e as demais 51,72% (45/87) nos túbulos de Malpighi. Vale salientar que nesta população também foi observada resposta humoral, como descrito para as populações anteriores.

A razão de infecção de *Ae. aegypti* foi de 17,5, 11,6 e 16,9% para as populações RECIFE, UNICAMP e para a linhagem ROCKFELLER, respectivamente, enquanto que para *Ae. albopictus* RECIFE a razão foi de 15,6% (Tabela 2).

Ao comparar as taxas de razão de infecção com as proporções de ingurgitamento das fêmeas e de ingestão de microfilárias, observou-se que não houve influência da taxa de ingurgitamento sobre a razão de infecção ($F=12,8754$; $p>0,05$), entretanto, o aumento do número de microfilárias ingeridas proporcionou maiores razões de infecção ($F=141,3808$; $p<0,01$).

O índice de eficiência vetorial (IEV) para as populações e para a linhagem de *Ae. aegypti* variou de 7,4% a 53,8% e para *Ae. albopictus* RECIFE foi de 25,2% (Tabela 1).

O índice obtido para *Ae. aegypti* população UNICAMP foi superior ao encontrado por SERRÃO *et al.* (2001) para *Ae. aegypti* população RIO DE JANEIRO (6,3%). Embora a população UNICAMP tenha apresentado um IEV de 20%, o comportamento biológico foi semelhante ao da linhagem ROCKFELLER, para a qual foi obtido o menor índice (7,4%) confirmando a refratariedade da população a *D. immitis*, como observado por SULAIMAN (1983).

Apesar de *Ae. aegypti* RECIFE ter apresentado maior razão de infecção e índice de eficiência vetorial esta população não pode ser considerada uma boa vetora devido à alta taxa de mortalidade apresentada (70,7%), demonstrando assim não ter competência vetorial para a transmissão de *D. immitis*.

Segundo SCOLE (1998) uma espécie de culicídeo para apresentar eficiência vetorial deve resistir à infecção independente da carga parasitária, sobreviver por tempo

Tabela 1 – Índice de eficiência vetorial (IEV) de fêmeas de *Ae. aegypti* populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER e *Ae. albopictus* população RECIFE, alimentadas com sangue canino com a densidade de 2000 microfilárias de *D. immitis*/ml de sangue em membrana artificial, com respectivas médias e desvios padrões (DP) de microfilárias (mf) ingeridas e de larvas infectantes.

Espécies	X mf ingeridas $\pm$ DP*	X L ₃ $\pm$ DP**	IEV (%)
<i>Aedes aegypti</i> RECIFE	13,0 $\pm$ 10,4 ^a	7,0 $\pm$ 0 ^B	53,8
<i>Ae. aegypti</i> UNICAMP	5,0 $\pm$ 4,0 ^b	1,0 $\pm$ 0 ^A	20,0
<i>Ae. aegypti</i> ROCKFELLER	13,4 $\pm$ 7,7 ^a	1,0 $\pm$ 0 ^A	7,4
<i>Ae. albopictus</i> RECIFE	11,3 $\pm$ 9,4 ^a	2,8 $\pm$ 2,0 ^C	25,2

* número médio de microfilárias ingeridas observado logo após o repasto sangüíneo.

** número médio de larvas infectantes (L₃) de *D. immitis* nas fêmeas de mosquito.

Valores representados nas colunas com letras distintas são estatisticamente diferentes.

Tabela 2 – Número de fêmeas dissecadas e número de fêmeas infectadas de *Ae. aegypti* populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER e *Ae. albopictus* população RECIFE, alimentadas com sangue canino com a densidade de 2000 microfilárias de *D. immitis*/ml de sangue.

Espécies	Número de fêmeas dissecadas	Número de fêmeas infectadas
<i>Aedes aegypti</i> RECIFE	849	149
<i>Ae. aegypti</i> UNICAMP	821	95
<i>Ae. aegypti</i> ROCKFELLER	878	149
<i>Ae. albopictus</i> RECIFE	838	131

suficiente para permitir o desenvolvimento das larvas até a forma infectante para mamíferos, alimentar-se também de sangue canino e/ou felino, estar bem adaptada à região geográfica, ser abundante e apresentar vários picos populacionais ao longo do ano (LUDLAM *et al.*, 1970; CHRISTENSEN, 1977).

O índice encontrado para *Ae. albopictus* população RECIFE foi semelhante ao observado por SERRÃO (2004) para população ITAIPU (27,8%). LAI *et al.* (2001) estudando a eficiência vetorial de *Ae. albopictus* população TAIWAN encontrou um índice de 19,7%. Entretanto, CANCRINI *et al.* (1995) ao pesquisar a população CIVITAVECCHIA obteve um índice de eficiência vetorial de 86%.

LAI *et al.* (2001) e CANCRINI *et al.* (2003) enfatizaram que *Ae. albopictus* oferece maior risco potencial para a transmissão de *D. immitis*, da população canina à humana, pois esta espécie além de fazer transição com área urbana e rural possui intenso comportamento antropofílico.

5.4 - CONCLUSÃO

A população RECIFE de *Ae. albopictus* foi susceptível a infecção por *D. immitis* e permitiu o desenvolvimento do filarídeo apresentando um número elevado de larvas infectantes na probóscide além de baixa mortalidade, demonstrando ser um vetor em potencial da dirofilariose na RMR.

5.5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHID, S.M.M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Mosquitos vetores potenciais de dirofilariose canina na Região Nordeste do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v.33, n. 6, p. 560-565, 1999.

AHID, S.M.M.; VASCONCELOS, P.S.S.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Vector competence of *Culex quinquefasciatus* Say from different regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 6, p. 769-775, 2000.

ALVES, L.C.; SILVA, L.V.A.; FAUSTINO, M.A.G.; MCCALL, J.W.; SUPAKONDERJ, P.; LABARTHE, N.; SANCHEZ, M.; CAIRES, O. Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 587-590, 1999.

APPERSON, C.S.; ENGBER, B.; LEVINE, J.F. Relative suitability of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in North Carolina to support development of *Dirofilaria immitis*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 5, p. 377-382, 1989.

AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.L. **BioEstat 2.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, CNPq, Brasília, 272 p., 2000.

BLACKWELL, A.; MELLOR, P.S.; MORDUE, W. Laboratory feeding of *Culicoides impunctatus* (Diptera: Ceratopogonidae) through natural and artificial membranes. **J. Med. Entomol.**, v. 31, n. 2, p. 302-305, 1994.

BURKOT, T.R.; HAPP, C.M.; DOLAN, M.C.; MAUPIN, G.O. Infection of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with *Borrelia burgdorferi* using a new artificial feeding technique. **J. Med. Entomol.**, v. 38, n. 2, p. 167-171, 2001.

BUXTON, B.A.; MULLEN, G.R. Comparative susceptibility of four strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection with *Dirofilaria immitis*. **J. Med. Entomol.**, v.18, n. 5, p. 434-440, 1981.

CANCRINI, G.; PIETROBELLI, M.; FRANGIPANE DI REGALBONO, A.; TAMPIERI, M.P.; DELLA TORRE, A. Development of *Dirofilaria* and *Setaria* nematodes in *Aedes albopictus*. **Parassitologia**, v. 37, p. 141-145, 1995.

CANCRINI, G.; REGALBONO, A.F.; RICCI, I.; TESSARIN, C.; GABRIELLI, S.; PIETROBELLI, M. *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. **Vet. Par.**, v. 118, p. 195-202, 2003.

CHRISTENSEN, B.M. Laboratory studies on the development and transmission of *Dirofilaria immitis* by *Aedes trivittatus*. **Mosquito News**, v. 37, n. 3, p. 367-372, 1977.

KARTMAN, L. Factors influencing infection of the mosquito with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). **Exp. Parasitol.**, v. 2, p. 27-28, 1953.

KARTMAN, L. Suggestions concerning an index experimental filaria infection in mosquitoes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 3, p. 329-337, 1954.

KASAP, H.; ALPTEKIN, D.; KASAP, M.; GUZEL, A.I.; LULEYAP, U. Artificial bloodfeeding of *Anopheles sacharovi* on a membrane apparatus. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, v. 19, n. 4, p. 367-370, 2003.

LABARTHE, N.; SERRÃO, M.L.; MELO, Y.F.; OLIVEIRA, S.J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Potential vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in Itacoatiara, oceanic region of Niterói municipality, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 4, p. 425-432, 1998a.

LABARTHE, N.; SERRÃO, M.L.; MELO, Y.F.; OLIVEIRA, S.J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Mosquito frequency and feeding habits in an enzootic canine dirofilariasis area in Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 145-154, 1998b.

LAI, C.H.; TUNG, K.C.; OOI, H.K.; WANG, J.S. Susceptibility of mosquitoes in Central Taiwan to natural infections of *Dirofilaria immitis*. **Med. Vet. Entomol.**, v. 15, n. 1, p. 64-67, 2001.

LAI, C.H.; TUNG, K.C.; OOI, H.K.; WANG, J.S. Competence of *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus* as vector of *Dirofilaria immitis* after blood meal with different microfilarial density. **Vet. Par.**, v. 90, n. 3, p. 231-237, 2000.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DEANE, L.M. Presumed *Dirofilaria immitis* infections in wild-caught *Aedes taeniorhynchus* and *Aedes scapularis* in Rio de Janeiro, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 387-388, 1995.

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

MAHMOOD, F.; NAYAR, J.K. Effects of *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) infection on life table characteristics of susceptible and refractory strains of *Aedes aegypti* (Vero Beach) (Diptera: Culicidae). **Fla. Entomol.**, v. 72, p. 567-578, 1989.

MAHMOOD, F. Susceptibility of geographically distinct *Aedes aegypti* L. from Florida to *Dirofilaria immitis* (Leidy) infection. **J. Vector Ecol.**, v. 25, n. 1, p. 36-47, 2000.

McCALL, J.W. Prevalência global da dirofilariose em cães e gatos: Visão geral. **Topics em Med. Vet. para animais de companhia**, v. 2, p. 24-30, 2000.

McGREVY, P.B.; McCLELLAND, G.A.H.; LAVOPIERRE, M.M.J. Inheritance of susceptibility of *Dirofilaria immitis* infection in *Aedes aegypti*. **An. Trop. Med. Parasitol.**, v. 68, n. 1, p. 97-109, 1974.

MELLOR, P.S. A membrane feeding technique for the infection of *Culicoides nubeculosus* Mg. and *Culicoides variipennis sonorensis* Coq. with *Onchocerca cervicalis* Rail. and Henry. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 2, p. 199-201, 1971.

MENDONÇA, I.L.; ALVES, L.C.; MCCALL, J.W.; FAUSTINO, M.A.G.; SUPAKONDERJ, P. Porcentual de Infecção por *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) em *Aedes aegypti* (Linnaeus) através da utilização de membrana artificial. **Ciênc. Vet. Trop.**, v.1, p. 30-32, 1998.

MOURYA, D.T.; GOKHALE, M.D.; BARDE, P.V.; PADBIDRI, V.S. A simple artificial membrane feeding method for mosquitoes. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, n. 4, p. 460, 2000.

NAYAR, J.K.; SAUERMANN, D.M. Physiological basis of host susceptibility of Florida mosquitoes to *Dirofilaria immitis*. **J. Insect Physiol.**, v. 21, n. 12, p. 1965-1975, 1975.

NEWTON, W.L.; WRIGHT, W.H. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. **J. Parasitol.**, v. 42, n. 3, p. 246-258, 1956.

PAIGE, C.J.; CRAIG Jr., G.B. Variations in filarial susceptibility among East African populations of *Aedes aegypti*. **J. Med. Entomol.**, v. 12, p. 485-493, 1975.

RUTLEDGE, L.C.; WARD, R.A.; GOULD, D.J. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. **Mosq. News**, v. 24, p. 407-419, 1964.

SAMARWICKERMA, W.A.; LAURENCE, B.R. Loss of filarial larvae in a natural population. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 72, n. 6, p. 561-565, 1978.

SCOLES, G.A. Vectors of canine heartworm in the United States: a review of the literature including new data from Indiana, Florida and Louisiana. In: SEAWARD, R.L.; COURTNEY, C.H. **Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium'98**. Tampa, FL: American Heartworm Society, p. 21-36, 1998.

SCOLES, G.A.; CRAIG JR., G.B. Variation in susceptibility to *Dirofilaria immitis* among U.S. strains of *Aedes albopictus*. **Vector Control Bull. N.C. States**, v. 2, p. 98-103, 1993.

SERRÃO, M.L.C. **Competência Vetorial de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) proveniente do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, para *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) Railliet & Henry, 1911**. Tese de Doutorado apresentada no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 87 p., 2004.

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

SULAIMAN, I. Susceptibility of *Aedes aegypti* to infections with *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens*. **South. Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 14, n. 4, p. 543-547, 1983.

TAYLOR, A.E.R. The development of *Dirofilaria immitis* the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Helminthol.**, v. 34, p. 27-38, 1960.

TSENG, M. A simple parafilm M-based method for blood-feeding *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, v. 40, p. 588-589, 2003.

WALADDE, S.M.; YOUNG, A.S.; MORZARIA, S.P. Artificial feeding of ixodid ticks. **Parasitol. Today**, v. 12, n. 7, p. 272-278, 1996.

CAPÍTULO 4

6. ESTUDOS SOBRE A MELANIZAÇÃO DE LARVAS DE *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE) EM *Culex quinquefasciatus* SAY, 1823, *Aedes aegypti* LINNAEUS, 1762 E *Aedes albopictus* SKUSE, 1894 (DIPTERA, CULICIDAE)

6. ESTUDOS SOBRE A MELANIZAÇÃO DE LARVAS DE *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) (NEMATODA, ONCHOCERCIDAE) EM *Culex quinquefasciatus* SAY, 1823, *Aedes aegypti* LINNAEUS, 1762 E *Aedes albopictus* SKUSE, 1894 (DIPTERA, CULICIDAE)

RESUMO

A melanização é o processo de resposta imune que mais ocorre em mosquitos, sendo importante por controlar a capacidade de transmissão de parasitas nas espécies vetoras. O presente trabalho teve por finalidade verificar a ocorrência de melanização em *Culex quinquefasciatus* população RECIFE, *Aedes aegypti* populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER e em *Ae. albopictus* população RECIFE que foram expostas a *D. immitis*, por meio de infecções experimentais. Apenas *Ae. aegypti* população RECIFE não apresentou reação de melanização ao desenvolvimento de *D. immitis*. Entretanto, *Ae. aegypti* linhagem ROCKFELLER e população UNICAMP apresentaram refratariedade ao desenvolvimento de *D. immitis*. *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE, por meio de melanização, limitou a intensidade do parasitismo, promovendo o equilíbrio da relação parasito-hospedeiro e deste modo passando a ser um bom vetor de *D. immitis*.

6.1 - INTRODUÇÃO

Segundo LACKIE (1988) os hemócitos presentes na hemolinfa dos insetos são classificados de acordo com a sua morfologia. Desta maneira, oito tipos têm sido observados: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, coagulócitos, adipohemócitos, esferulócitos, oenocitóides e células cristais. Entretanto, o número de tipos de hemócitos presentes nos insetos é variável entre as espécies.

As principais funções dos hemócitos são realizar a fagocitose, o encapsulamento, bem como a melanização, a coagulação, a distribuição e o estoque de nutrientes, além da síntese de proteínas.

A resposta imune de mosquitos adultos contra nematódeos tem sido estudada intensamente, em condições de laboratório, em *Ae. aegypti*, *Ae. trivittatus*, *An.*

quadrимaculatus e *Armigeres subalbatus* (CHRISTENSEN, 1986; CHRISTENSEN & TRACY, 1989; ZHAO *et al.*, 1995; SHIN *et al.*, 2003; INFANGER *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2005).

Dentre os mecanismos de defesa, a melanização é um dos processos mais importantes em mosquitos, onde o parasita é englobado por uma cápsula melanótica (HUANG *et al.*, 2005), formada ao seu redor bloqueando completamente os nutrientes necessários a sua sobrevivência (CHEN & CHEN, 1995), além de liberar metabólitos oxigenados tóxicos culminando com a morte do agente invasor (NAPPI *et al.*, 1995).

FORTON *et al.* (1985) e BEERNTSEN *et al.* (2000) observaram deposição de substâncias melanóticas em microfilárias de *Dirofilaria immitis* após a agregação de hemócitos lisados à superfície das mesmas em *Ar. subalbatus*. Observação semelhante foi realizada por DRIF & BREHELIN (1983) em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. Posteriormente, CHRISTENSEN *et al.* (1984) e MAHMOOD (2000) também observaram o processo de melanização em diferentes populações de *Ae. aegypti*.

De acordo com PASKEWITZ & CHRISTENSEN (1996), a resposta imune pode reduzir ou restringir a capacidade vetorial de algumas espécies de mosquitos para a transmissão de parasitas. Por outro lado, a resposta imune pode proporcionar o aumento do potencial de competência dos culicídeos para a transmissão, por permitir o desenvolvimento de um número suportável de parasitas, equilibrando a interação parasita-vetor. Esse fato pode ser observado em algumas espécies de *Aedes* que por meio de melanização permitem o desenvolvimento de um número limitado de larvas de *D. immitis* em seus órgãos (CHRISTENSEN, 1981; MACÊDO *et al.*, 1998).

Este trabalho teve por finalidade verificar a ocorrência de melanização em *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE, *Ae. aegypti* populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER e em *Ae. albopictus* população RECIFE, expostas a *D. immitis*, por meio de infecções experimentais em laboratório.

6.2 – MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 - Criação e manutenção dos mosquitos utilizados nos experimentos

Para a realização dos experimentos foram utilizadas fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE, *Ae. albopictus* população RECIFE, *Ae. aegypti* populações RECIFE,

UNICAMP e linhagem ROCKFELLER obtidas de colônias estabelecidas a partir de ovos de *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE e de *Ae. aegypti* população RECIFE e linhagem ROCKFELLER, fornecidos pelo Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), Recife, PE e *Ae. aegypti* UNICAMP proveniente de Campinas, SP que foi estabelecida a partir de ovos de população existente no Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP. A colônia de *Ae. albopictus* população RECIFE foi obtida a partir de larvas coletadas no Campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) em Recife, PE.

Os mosquitos foram criados e mantidos em sala climatizada com temperatura 28 ± 1 °C e $80 \pm 5\%$ de umidade relativa do ar e ciclo natural de fotoperíodo no Insetário do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE. As larvas eclodiram dos ovos em cubas plásticas contendo dois litros de água de torneira declorada e receberam diariamente alimento industrializado para cães moído (T-Bone®, Nutron Alimentos Ltda.). As pupas foram transferidas para recipientes plásticos com água e colocadas em gaiolas com dimensões de 30 x 30 x 25 cm, para emergência dos adultos. Os insetos foram alimentados permanentemente com solução açucarada obtida colocando-se cubos de açúcar em algodões umedecidos com água sobre a gaiola. Uma vez por semana as fêmeas de *Aedes* sp. foram alimentadas com sangue canino em membrana natural confeccionada com pele de rato [*Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769)], enquanto que as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* com pele de codorna (*Coturnix coturnix*) conforme RUTLEDGE *et al.* (1964) e MENDONÇA *et al.* (1998). Os recipientes plásticos onde as pupas de *Cx. quinquefasciatus* foram mantidas serviram também para as fêmeas realizarem a oviposição. Nas gaiolas com fêmeas de *Aedes* sp. foram colocados recipientes contendo água declorada e revestidos com papel de filtro para a realização da postura.

6.2.2 - Obtenção de microfilárias de *D. immitis*:

As microfilárias de *D. immitis* utilizadas para as infecções experimentais foram obtidas do sangue de um cão naturalmente infectado, sem raça definida, com idade de aproximadamente seis anos, macho, domiciliado na Região Metropolitana do Recife.

6.2.2.1 - Coleta do sangue

O sangue foi coletado por meio de punção venosa da veia cefálica, e em seguida uma amostra foi colocada em tubo de ensaio contendo ácido etilenodiaminotetracético de sódio – EDTA (Reagen) a 10%, para quantificar a microfilaremia através do Método Modificado de Knott (NEWTON & WRIGTH, 1956), sendo o restante transferido para tubos contendo heparina (SoloPak Laboratories Inc.) e destinado à alimentação infectante das fêmeas de mosquito.

6.2.3 - Exposições experimentais dos mosquitos as microfilárias de *D. immitis*

As populações de mosquito expostas experimentalmente as microfilárias de *D. immitis* foram *Cx. quinquefasciatus* RECIFE, *Ae. albopictus* RECIFE, *Ae. aegypti* RECIFE, *Ae. aegypti* UNICAMP e *Ae. aegypti* linhagem ROCKFELLER.

Novecentas fêmeas, de cada população e linhagem, com idade de três a sete dias foram expostas à densidade de 2000 microfilárias de *D. immitis* por mililitro de sangue e como controle foram utilizadas 300 fêmeas, de cada população e linhagem, alimentadas com sangue não infectado.

6.2.4 - Dissecção dos mosquitos e observação de larvas de *D. immitis*

Diariamente, durante 14 dias, dez fêmeas de cada população e linhagem foram retiradas da caixa com o auxílio de aspirador manual, transferidas para frascos de vidro, anestesiadas com éter e colocadas em placas de Petri plásticas para a remoção das pernas e das asas. Posteriormente as fêmeas foram transferidas individualmente a lâminas para a extração dos túbulos de Malpighi em solução salina. Utilizaram-se estiletes e pinças oftalmológicas durante as dissecções para a separação da cabeça e do tórax em diferentes gotas da mesma solução, onde foram macerados por meio de compressão entre lâmina e lamínula e corados com Giemsa (Merck) para facilitar a visibilização dos estágios larvais de *D. immitis* melanizados na hemocele, nos túbulos de Malpighi, na cabeça e na probóscide dos mosquitos. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico com objetiva de 10X e de 40X e os estágios de desenvolvimento do filarídeo foram determinados segundo TAYLOR (1960).

Após o término dos experimentos, foram calculadas as porcentagens de fêmeas infectadas e de fêmeas apresentando larvas de *D. immitis* melanizadas. A porcentagem de larvas do filarídeo melanizadas também foi calculada.

6.2.5 – Análise Estatística

Com o objetivo de verificar a influência da melanização de *D. immitis* na competência vetorial de diferentes espécies e populações de mosquitos estudadas foi realizado o teste de independência do Qui-quadrado: Partição, utilizando-se o *software* estatístico BioEstat na versão 2.0 para microcomputador (AYRES *et al.*, 2000).

6.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à ocorrência de larvas de *D. immitis* melanizadas nos culicídeos estudados estão apresentados na Tabela 1.

Culex quinquefasciatus população RECIFE apresentou larvas melanizadas no estágio salsichóide, no período de dez a 14 dias após a alimentação infectante, enquanto que em *Ae. albopictus* população RECIFE foi observada apenas uma larva parcialmente melanizada no estágio salsichóide no 11º dia pós-infecção.

A população UNICAMP e a linhagem ROCKFELLER de *Ae. aegypti* apresentaram reação de melanização no primeiro estágio (L₁) de *D. immitis* (Figuras 1A e 1B), encontrando-se estas larvas melanizadas na região distal dos túbulos de Malpighi. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por MAHMOOD (2000) que ao estudar cinco populações de *Ae. aegypti* de regiões geográficas distintas da Flórida observou microfilárias melanizadas nos túbulos de Malpighi, intestino e hemocele.

No que se refere à linhagem ROCKFELLER, observa-se que as larvas melanizadas no primeiro estágio foram detectadas a partir de três dias após o início dos experimentos e permaneceram até o último dia de avaliação (14º dia), enquanto que as larvas no estágio salsichóide (Figura 1C) foram observadas entre o 11º e o 14º dias, e uma larva no segundo estágio (Figura 1D) foi encontrada melanizada no 14º dia de avaliação.

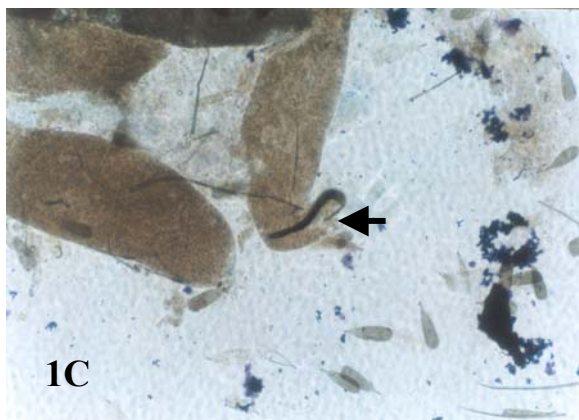
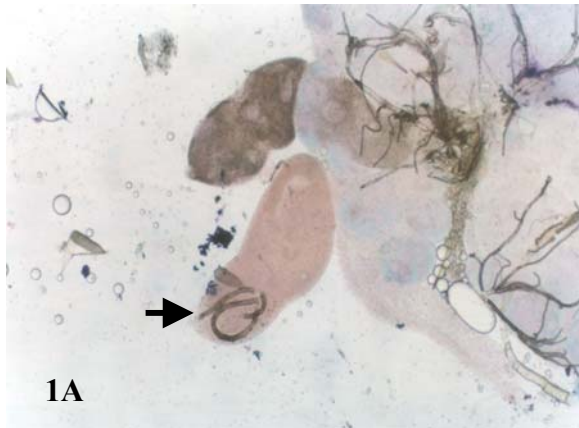


Figura 1A – Larva de 1º estágio de *D. immitis* melanizada em túbulo de Malpighi de *Ae. aegypti* linhagem ROCKFELLER (56,3x)

Figura 1B – Larva de 1º estágio de *D. immitis* melanizada, isolada do túbulo de Malpighi de *Ae. aegypti* linhagem ROCKFELLER (107x)

Figura 1C – Larva no estágio salsichóide de *D. immitis* melanizada em túbulo de Malpighi de *Ae. aegypti* linhagem ROCKFELLER (60x)

Figura 1D – Larva de 2º estágio de *D. immitis* melanizada em túbulo de Malpighi de *Ae. aegypti* linhagem ROCKFELLER (70x)

Ae. aegypti população UNICAMP apresentou melanização em 2,9% (06/209) das larvas de *D. immitis* encontradas nos túbulos de Malpighi. Nas larvas de primeiro estágio (L₁), a reação de melanização foi total em 1,2% (02/173) das larvas e parcial em 1,7% (03/173) dos filarídeos. Foi observada melanização em 20% (01/05) das larvas no estágio infectante (L₃). Estas reações foram observadas nos períodos de cinco a sete dias para as larvas de primeiro estágio e no 14º dia para a larva no estágio infectante.

Neste estudo, houve a permanência de larvas no estágio de L₁ na linhagem ROCKFELLER e na população UNICAMP de *Ae. aegypti* até o último dia do experimento (14º dia). Observação semelhante foi realizada por MAHMOOD (2000) que encontrou larvas de *D. immitis* no estágio de L₁ e salsichóides nos túbulos de Malpighi até o 13º dia após a infecção.

A reação de melanização parcial ou total observada nas larvas de *D. immitis* ocorre em fêmeas pertencentes a populações refratárias ao parasitismo, podendo sugerir resistência do mosquito ao parasita (CHRISTENSEN, 1981). BUXTON & MULLEN (1981) e SAUERMAN & NAYAR (1985) ao estudar *Ae. aegypti* linhagem ROCKFELLER observaram resistência desta ao desenvolvimento de *D. immitis*.

A refratariedade à infecção por filárias em *Ae. aegypti* é controlada pela presença de um gene dominante. De acordo com SULAIMAN & TOWNSON (1980) a susceptibilidade de *Ae. aegypti* a *D. immitis* é uma característica controlada pelo gene fⁱ. Fêmeas que possuem os genes FⁱFⁱ ou Fⁱf são refratárias e esses genes influenciam diretamente na fisiologia dos túbulos de Malpighi, afetando assim o desenvolvimento do parasita. Provavelmente esse fator genético influencie também no desencadeamento do processo de melanização, podendo causar modificações neste mecanismo (SHIN *et al.*, 2003; e HUANG *et al.*, 2005).

Estudos genéticos de espécies vetoras demonstraram que a presença do gene Fⁱ pode afetar consideravelmente a competência vetorial (WATTAM & CHRISTENSEN, 1992).

KARTMAN (1953) sugeriu que as diferenças do número de fêmeas infectadas com larvas melanizadas em diferentes populações de *Ae. aegypti* deve-se a influência genética para este tipo de resposta imune. LINDEMANN (1977) confirmou esta suposição ao observar uma porcentagem de microfilárias melanizadas de zero a 100%, num período de três a sete dias após a infecção. Estes dados concordam com as observações de

SULAIMAN & TOWNSON (1980) que enfatizaram que as diferenças genéticas entre as populações de *Ae. aegypti* podem implicar em linhagens com maior susceptibilidade e competência vetorial para agentes patogênicos (McGREEVY *et al.*, 1974), ou em linhagens refratárias, indicando assim resistência ao desenvolvimento de *D. immitis*.

Das fêmeas que apresentaram melanização ao desenvolvimento de *D. immitis* houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre *Ae. aegypti* linhagem ROCKFELLER em relação a *Ae. albopictus* população RECIFE e *Ae. aegypti* população RECIFE, sugerindo que as populações RECIFE de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* sejam susceptíveis a infecção pelo filarídeo. Estas populações também apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) da população RECIFE de *Cx. quinquefasciatus*. *Ae. aegypti* linhagem ROCKFELLER diferiu ($p < 0,05$) também de *Ae. aegypti* população UNICAMP.

Neste estudo, uma maior reação de defesa ao parasitismo por *D. immitis* foi observada em *Ae. aegypti* linhagem ROCKFELLER, seguida por *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE, que também demonstrou eficiência ao limitar o número de parasitas, que poderia se desenvolver, por meio de melanização e morte das larvas do nematódeo. *Ae. aegypti* população UNICAMP, embora tenha apresentado uma resposta imune mais discreta, também demonstrou limitação ao desenvolvimento do nematódeo por meio dos mesmos mecanismos.

Em todas as populações e linhagem foi observada uma destruição total das células dos túbulos de Malpighi nas regiões parasitadas por *D. immitis*. As membranas plasmáticas das células dos túbulos de Malpighi foram rompidas durante a migração dos estágios larvais de *D. immitis* ficando com aparência de que os túbulos foram dilatados quando comparados aos túbulos não infectados do grupo controle. As larvas infectantes causaram a destruição das paredes dos túbulos ao migrarem para a cabeça e probóscide do mosquito com a finalidade de passarem para o hospedeiro vertebrado. Nesta fase, após a saída dos túbulos de Malpighi, não foi observada reação imune em nenhum dos culicídeos estudados. Observação semelhante foi realizada por MAHMOOD (2000), que não detectou reação imune em *Ae. aegypti* após as larvas de *D. immitis* deixarem os túbulos de Malpighi.

Ae. aegypti população RECIFE e *Ae. albopictus* população RECIFE mostraram-se susceptíveis a *D. immitis*, porém *Ae. aegypti* população RECIFE não apresentou eficiência

como vetor deste nematódeo por não suportar o desenvolvimento do mesmo, apresentando alta mortalidade (70,7%). Entretanto, *Ae. albopictus* população RECIFE pode ser considerado um bom vetor, por ser susceptível e apresentar baixa mortalidade (16,9%).

A melanização observada em *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE limitou a intensidade do parasitismo, permitindo então que um número adequado de larvas atingisse o estágio infectante, demonstrando ser um bom vetor de *D. immitis*. CHRISTENSEN (1981) também observou a limitação desses filarídeos em *Ae. trivittatus*, garantindo a sobrevivência do vetor.

A resposta imune é importante na manutenção do sistema vetor-parasita por reduzir consideravelmente a carga parasitária e, portanto, garantir a sobrevivência do culicídeo e permitindo assim a sua eficiência como vetor (CHRISTENSEN, 1981).

Com exceção da linhagem ROCKFELLER, a resposta de melanização ocorrida nas populações de mosquito estudadas não indicou refratariedade, pois houve o desenvolvimento de larvas do nematódeo até o estágio infectante. Pode-se dizer então, que a reação de melanização neste caso teve a função de equilibrar o sistema mosquito-nematódeo.

Tabela 1 – Porcentagens de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE, *Ae. albopictus* população RECIFE e *Ae. aegypti* populações RECIFE, UNICAMP e linhagem ROCKFELLER apresentando, ou não, melanização contra as larvas de *D. immitis*.

	<i>Cx. quinquefasciatus</i> população RECIFE	<i>Ae. albopictus</i> população RECIFE	<i>Ae. aegypti</i> população RECIFE	<i>Ae. aegypti</i> população UNICAMP	<i>Ae. aegypti</i> linhagem ROCKFELLER
Fêmeas com larvas de <i>D. immitis</i> (%)*	13,47 (111/824)	15,63 (131/838)	17,55 (149/849)	11,57 (95/821)	16,97 (149/878)
Fêmeas com larvas de <i>D. immitis</i> melanizadas**(%)	10,81 ^a (12/111)	0,76 ^b (01/131)	0 ^b (0/149)	5,26 ^{a, c} (05/95)	19,46 ^{a, d} (29/149)

*Número de fêmeas infectadas/ Número de fêmeas dissecadas; **Número de fêmeas com larvas melanizadas / Número de fêmeas infectadas.

Letras iguais – não há diferença estatística; Letras diferentes - há diferença estatística.

Obs.: *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE não difere estatisticamente da população UNICAMP e da linhagem ROCKFELLER de *Ae. aegypti*, entretanto esta população e esta linhagem de *Ae. aegypti* diferem entre si.

6.4 – CONCLUSÃO

A transmissão de *D. immitis* na Região Metropolitana do Recife provavelmente é realizada por *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE que limitou a intensidade do parasitismo por meio de melanização e por *Ae. albopictus* população RECIFE que apresentou-se susceptível ao nematódeo.

6.5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.L. **BioEstat 2.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, CNPq, Brasília, 272 p., 2000.

BEERNTSEN, B.T.; JAMES, A.A.; CHRISTENSEN, B.M. Genetics of the mosquito vector competence. **Microbiol. Mol. Bio. Rew.**, v. 64, n. 1, p. 115-137, 2000.

BUXTON, B.A.; MULLEN, G.R. Comparative susceptibility of four strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection with *Dirofilaria immitis*. **J. Med. Entomol.**, v.18, n. 5, p. 434-440, 1981.

CHEN, C.C.; CHEN, C.S. *Brugia pahangi*: Effects of melanization on the uptake of nutrients by microfilariae *in vitro*. **Exp. Parasito.**, v. 81, n. 1, p. 72-78, 1995.

CHRISTENSEN, B.M. Immune mechanisms and mosquito-filarial worm relationships. In: Immune mechanisms in invertebrate vectors, **Zool. Soc. London Symposia 56**, A.M. LACKIE (ed.). Clarendon University Press, Oxford, p. 145-160, 1986.

CHRISTENSEN, B.M. Observations on the immune response of *Aedes trivittatus* against *Dirofilaria immitis*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 75, n. 3, p. 439-443, 1981.

CHRISTENSEN, B.M.; SUTHERLAND, D.R.; GLEASON, L.M. Defense reactions of mosquitoes to filarial worms: comparative studies on the response of three different mosquitoes to inoculated *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* microfilariae. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 44, p. 267-274, 1984.

CHRISTENSEN, B.M.; TRACY, J.W. Arthropod transmitted parasites: mechanisms of immune interactions. **Am. Zool.**, v. 29, p. 387-398, 1989.

DRIF, L.; BREHELIN, M. The circulating hemocytes of *Culex pipiens* and *Aedes aegypti*: Cytology, histochemistry, hemograms and functions. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 7, p. 687-690, 1983.

FORTON, K.F.; CHRISTENSEN, B.M.; SUTHERLAND, D.R. Ultrastructure of the melanization response of *Aedes trivittatus* against inoculated *Dirofilaria immitis* microfilariae. **J. Parasitol.**, v. 71, n. 3, p. 331-341, 1985.

HUANG, C.Y.; CHOU, S.Y.; BARTHOLOMAY, L.C.; CHRISTENSEN, B.M.; CHEN, C.C. The use of gene silencing to study the role of dopa decarboxylase in mosquito melanization reactions. **Insect Mol. Biol.**, v. 14, n. 3, p. 237-244, 2005.

INFANGER, L.C.; ROCHELEAU, T.A.; BARTHOLOMAY, L.C.; JOHNSON, J.K.; FUCHS, J.; HIGGS, S.; CHEN, C.C.; CHRISTENSEN, B.M. The role of phenylalanine hydroxylase in melanotic encapsulation of filarial worms in two species of mosquitoes. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 34, n. 12, p. 1329- 1338, 2004.

KARTMAN, L. Factors influencing infection of the mosquito with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). **Exp. Parasitol.**, v. 2, p. 27-28, 1953.

LACKIE, A.M. Immune mechanisms in insects. **Parasitol. Today**, v. 4, p. 98-105, 1988.

LINDEMANN, B.A. *Dirofilaria immitis* encapsulation in *Aedes aegypti*. **Mosquito News**, v. 37, p. 293-295, 1977.

MACÊDO, F.C.; LABARTHE, N.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Susceptibility of *Aedes scapularis* (Rondani, 1848) to *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) an emerging zoonosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 4, p. 435-437, 1998.

MAHMOOD, F. Susceptibility of geographically distinct *Aedes aegypti* L. from Florida to *Dirofilaria immitis* (Leidy) infection. **J. Vector Ecol.**, v. 25, n. 1, p. 36-47, 2000.

McGREEVY, P.B.; McCLELLAND, G.A.H.; LAVOIEPIERRE, M.M.J. Inheritance of susceptibility to *Dirofilaria immitis* infection in *Aedes aegypti*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 68, p. 97-109, 1974.

MENDONÇA, I.L.; ALVES, L.C.; MCCALL, J.W.; FAUSTINO, M.A.G.; SUPAKONDERJ, P. Porcentual de Infecção por *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) em *Aedes aegypti* (Linnaeus) através da utilização de membrana artificial. **Ciênc. Vet. Trop.**, v.1, p. 30-32, 1998.

NAPPI, A.J.; VASS, E.; FREY, F.; CARTON, Y. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 68, p. 450-456, 1995.

NEWTON, W.L.; WRIGHT, W.H. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. **J. Parasitol.**, v. 42, n.3, p. 246-258, 1956.

PASKEWITZ, S.M.; CHRISTENSEN, B.M. Immune responses of vectors. In: BEATY, B.J.; MARQUARDT, W.C. editors, **The biology of disease vectors**. Univ. Press Colorado, p. 371-392, 1996.

RUTLEDGE, L.C.; WARD, R.A.; GOULD, D.J. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. **Mosq. News**, v. 24, p. 407-419, 1964.

SAUERMAN, D.M.; NAYAR, J.K. Characterization of refractoriness in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Dirofilaria immitis*. **J. Med. Entomol.**, v. 22, p. 94-101, 1985.

SHIN, S.W.; KOKOZA, V., LOBKOV, I.; RAIKHEL, A.S. Relish-mediated immune deficiency in the transgenic mosquito *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 100, p. 2616-2621, 2003.

SULAIMAN, I.; TOWNSON, H. The genetic basis of susceptibility of infection with *Dirofilaria immitis* in *Aedes aegypti*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 74, p. 635-646, 1980.

TAYLOR, A.E.R. The development of *Dirofilaria immitis* the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Helminthol.**, v. 34, p. 27-38, 1960.

WATTAM, A.R.; CHRISTENSEN, B.M. Further evidence that the genes controlling susceptibility of *Aedes aegypti* to filarial parasites function independently. **J Parasitol.**, v. 78, n. 6, p. 1092-1095, 1992).

ZHAO, X.; FERDIG, M.T.; LI, J.; CHRISTENSEN, B.M. Biochemical pathway of melanotic encapsulation of *Brugia malayi* in the mosquito *Armigeres subalbatus*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 19, p. 205-215, 1995.

7 - CONCLUSÕES GERAIS

1 – A região metropolitana do Recife continua sendo endêmica para a dirofilariose canina, com predominância da parasitose no litoral norte. O município de Bezerros, situado no agreste pernambucano, não apresenta endemicidade para *D. immitis*.

2 – *Cx. quinquefasciatus* população RECIFE demonstrou ter competência para a transmissão de *D. immitis* na Região Metropolitana do Recife, sugerindo que possa ser uma das espécies transmissoras deste nematódeo nesta localidade.

3 – *Ae. aegypti* população RECIFE não é um bom vetor por não suportar o desenvolvimento de *D. immitis* apresentando alta mortalidade.

4 - *Ae. aegypti* população UNICAMP é refratária ao desenvolvimento de *D. immitis*, portanto não é a espécie transmissora deste filarídeo na região de Campinas, SP.

5 - *Ae. albopictus* RECIFE demonstrou permitir um melhor desenvolvimento de *D. immitis* até o estágio infectante, sendo assim uma das espécies com potencial de transmissão deste filarídeo na Região Metropolitana do Recife.

6 – A reação de melanização apresentada pelos culicídeos estudados exerceu a limitação do desenvolvimento do parasita, equilibrando o sistema mosquito-nematódeo.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, D. Biology of *Dirofilaria immitis*. In: BOREHAM, P.F.; ATWELL, R.B. **Dirofilariasis**. CRC Press Florida, p. 29-46, 1988.

AHID, S.M.M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Mosquitos vetores potenciais de dirofilariose canina na Região Nordeste do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v.33, n. 6, p. 560-565, 1999.

AHID, S.M.M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; SARAIVA, L.Q. Dirofilariose canina na Ilha de São Luís, Nordeste do Brasil: uma zoonose potencial. **Cad. Saúde Pública**, v. 15, n. 2, p. 405-412, 1999.

AHID, S.M.M.; VASCONCELOS, P.S.S.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Vector competence of *Culex quinquefasciatus* Say from different regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 6, p. 769-775, 2000.

ALCAINO, H.A.; GORMAN, T.R.; PUELMA, M.C. Filariasis canina en Chile. **Arch. Med. Vet.**, v. 16, p. 67-73, 1984.

ALVES, L.C.; LABARTHE, N.; SIMSON, C.; MAIA, F.C.; SIQUEIRA, R.S.; FAUSTINO, M.A.G. Survey of canine heartworm on the coast of the Pernambuco State, Brazil. **Recent Adv. in Heartworm Disease: Symposium**. San Antonio, TX, p. 20-21, 2001.

ALVES, L.C.; SILVA, L.V.A.; FAUSTINO, M.A.G.; MCCALL, J.W.; SUPAKONDERJ, P.; LABARTHE, N.; SANCHEZ, M.; CAIRES, O. Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 587-590, 1999.

ALVES, L.C.; COLE, E.F.; ATHAYDE, A.C.R. Prevalência da filariose canina no Bairro de dois Irmãos. **Rev. Bras. Parasitol.**, v. 2, n. 1, p. 68, 1993.

ANDERSON, R.C.; BAIN, O. Keys to the genera of the order Spirurida. Diplostriaenoidea, Aprocotoidea and Filarioidea. In: ANDERSON, R.C.; CHABAUD, A.G.; WILLMOTT, S. **Keys to nematode parasites of vertebrates 3**. Commonwealth Agricultural Bureaux. Parte 3, p. 59-116, 1976.

ANDERSON, R.C. Description and relationships of *Dirofilaria ursi* Yamaguti, 1941, and a review of the genus *Dirofilaria* Railliet and Henry, 1911. **Trans. R. Can. Inst.**, v. 29, p. 35-64, 1952.

APPERSON, C.S.; ENGBER, B.; LEVINE, J.F. Relative suitability of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in North Carolina to support development of *Dirofilaria immitis*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 5, p. 377-382, 1989.

ARANDA, C.; PANYELLA, O.; ERITJA, R.; CASTELLA, J. Canine filariasis. Importance and transmission in the Baix Llobregat area, Barcelona (Spain). **Vet. Par.**, v. 77, p. 267-275, 1998.

ARAÚJO, A.M. Canine and human *Dirofilaria immitis* infections in Portugal. A review. **Parassitologia**, v. 38, p. 366, 1996.

ARAÚJO, R.T.; MARCONDES, C.B.; BASTOS, L.C.; SARTOR, D.C. Canine dirofilariasis in the region of Conceição Lagoon, Florianópolis and in the Military Police Kennel, São José, State of Santa Catarina, Brazil. **Vet. Par.**, v. 113, p. 239-242, 2003.

BARBOSA, C.L. **Aspectos epidemiológicos da dirofilariose canina na cidade de Aracajú, Sergipe**. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal Rural de Pernambuco, 39pp., 2001.

BARBOSA, C.L.; MELO, M.A.; SILVA, E. Ocorrência de cães sororeagentes ao teste de imunoabsorção enzimática para *Dirofilaria immitis* no município de Patos, Paraíba. In: Seminário Bras. de Parasitologia Veterinária, XI, **Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul**, II, Salvador, **Anais**, 1999.

BASSET, A.; KHUSH, R.S.; BRAUN, A.; GARDAN, L.; HOFFMANN, J.A.; LEMAITRE, B. The phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** **97**, p. 3376-3381, 2000.

BENTO, J.S.S. **Mecanismos de defesa imune do mosquito *Culex quinquefasciatus* à infecção com fungo *Candida albicans***. Dissertação de Mestrado em Biologia Animal, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 59 p., 1999.

BICKLEY, W.E.; LAWRENCE, R.S.; WARD, G.M.; SHILLINGER, R.B. Dog-to-dog transmission of heartworm by *Aedes canadensis*. **Mosquito News**, v. 37, n. 1, p. 137-138, 1977.

BIDGOOD, A.; COLLINS, G.H. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Sydney. **Australian Vet. J.**, v. 73, n. 3, p. 103-104, 1996.

BOWMAN, D.D.; LYNN, C.R. **Georgis' parasitology for veterinarians**. Saunders Company. Philadelphia, p. 212-223, 1995.

BRADLEY, T.J.; NAYAR, J.K. An ultrastructural study of *Dirofilaria immitis* infection in the malpighian tubules of *Anopheles quadrimaculatus*. **J. Parasitol.**, v. 73, p. 1035-1043, 1987.

BREY, P.T.; HUTMARK, D. **Molecular mechanisms of immune response in insects**. Ed. Chapman and Hall, 135 p. 1998.

BRITO, A.C.; VILA-NOVA, M.C.; ROCHA, D.A.M.; COSTA, L.G.; ALMEIDA, W.A.P.; VIANA, L.S.; LOPES Jr., R.R.; FONTES, G.; ROCHA, E.M.M.; REGIS, L. Prevalência da filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió, Alagoas, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, n. 6, p. 1497-1504, 2001.

BRITO, A.C.; FONTES, G.; ROCHA, E.M.M.; ROCHA, D.A.M.; REGIS, L. Development of *Dirofilaria immitis* (Leidy) in *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) from Maceió, Alagoas, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 4, p. 575-576, 1999.

BUXTON, B.A.; MULLEN, G.R. Field isolations of *Dirofilaria* from mosquitoes in Alabama. **J Parasitol.**, v. 66, n.1, p. 140-141, 1980.

BUXTON, B.A.; MULLEN, G.R. Comparative susceptibility of four strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection with *Dirofilaria immitis*. **J. Med. Entomol.**, v.18, n. 5, p. 434-440, 1981.

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

CANCINI, G.; PIETROBELLI, M.; FRANGIPANE DI REGALBONO, A.; TAMPIERI, M.P.; DELLA TORRE, A. Development of *Dirofilaria* and *Setaria* nematodes in *Aedes albopictus*. **Parassitologia**, v. 37, p. 141-145, 1995.

CANCINI, G.; REGALBONO, A.F.; RICCI, I.; TESSARIN, C.; GABRIELLI, S.; PIETROBELLI, M. *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. **Vet. Par.**, v. 118, p. 195-202, 2003.

COLUZZI, M.; TRABUCCHI, R. Importanza de l'armatura buccofaringeana in *Anopheles* e *Culex* in relazione alle infezioni con *Dirofilaria*. **Parassitologia**, v. 10, p. 47-59, 1968.

COMISKEY, N.M.; LOWRIE, R.C.; WESSON, D.M. Effect of nutrient levels and *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) infections on the vector competence of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) for *Dirofilaria immitis* (Filarioidea: Onchocercidae). **J. Med. Entomol.**, v. 36, n. 1, p. 55-61, 1999.

CÔNSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, 228 p., 1994.

CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; VENEZIANO, V.; CAPELLI, G. A prevalence survey and risk analysis of filariasis in dogs from the Mt. Vesuvius area of southern Italy. **Vet. Par.**, v. 102, p. 243-252, 2001.

CHALK, R.; ALBUQUERQUE, C.M.R.; HAM, P.J.; TOWNSON, H. Full sequence and characterization of two insect defensins: immune peptides from the mosquito *Aedes aegypti*. **Proc. R. Soc. Lond.**, v. 261, p. 217-221, 1995.

CHOOCHOTE, W.; SOMBOON, P.; KAMBOONRUANG, C.; SUWANPANIT, P. A survey for natural vectors of *Dirofilaria immitis* in Chiang Mai Province, Northern Thailand. **South. Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 17, n. 1, p. 146-147, 1986.

CHOOCHOTE, W.; SUKHAVAT, K.; KEHA, P.; SOMBOON, P.; KHAMBOONRUANG, C.; SUWANPANIT, P. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in stray dog and its potential in Amphur Muang Chiang Mai, Northern Thailand. **South. Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 18, n. 1, p. 131-134, 1987.

CHRISTENSEN, B.M. *Dirofilaria immitis*: Effect on the longevity of *Aedes trivittatus*. **Exp. Parasitol.**, v. 44, p. 116-123, 1978.

CHRISTENSEN, B.M.; SUTHERLAND, D.R.; GLEASON, L.M. Defense reactions of mosquitoes to filarial worms: comparative studies on the response of three different mosquitoes to inoculated *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* microfilariae. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 44, p. 267-274, 1984.

CHRISTENSEN, B.M. Laboratory studies on the development and transmission of *Dirofilaria immitis* by *Aedes trivittatus*. **Mosquito News**, v. 37, n. 3, p. 367-372, 1977.

CHRISTENSEN, B.M. Observations on the immune response of *Aedes trivittatus* against *Dirofilaria immitis*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 75, n. 3, p. 439-443, 1981.

DIMARCQ, J.L.; HOFFMANN, D.; MEISTER, M.; BULET, P.; LANOT, R.; REICHART, J.; HOFFMANN, J.A. Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. **Eur. J. Biochem.**, v. 221, p. 201-209, 1994.

DURAN-STRUUCK, R.; JOST, C.; HERNANDEZ, A.H. *Dirofilaria immitis* prevalence in a canine population in the Samana Peninsula (Dominican Republic) – June 2001. **Vet. Parasitol.**, v. 133, n. 4, p. 323-327, 2005.

ESSLINGER, J.H. Behaviour of microfilaria of *Brugia pahangi* in *Anopheles quadrimaculatus*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 11, p. 749-755, 1962.

FERNANDES, C.G.N.; DIAS, A.R.; MOURA, S.T.; BARROS, L.A.; OMORI, M.M.; SOUZA, J.O.O.; BORGES, D.C. Incidência de dirofilariose canina na região da grande Cuiabá, Estado do Mato Grosso, Brasil. In: PANVET, XV, Campo Grande, MS. **Anais**, p. 1210, 1996.

FIORETTI, D.P.; DIAFERIA, M.; GRELLONI, V.; MARESCA, C. Canine filariosis in Umbria: an update of the occurrence one year after the first observation of autochthonous foci. **Parassitologia**, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

GALIANA, A. La dirofilariosis canina en el Delta del Ebro. **Med. Vet.**, v. 12, n. 4, p. 242-246, 1995.

GENCHI, C.; DI SACCO, B.; CANCRINI, G. Epizootiology of canine and feline heartworm infection in northern Italy: possible mosquito vectors. In: SOLL, M.D. **Proc. Heartworm Symposium'92**. Batavia, IL, p. 39-46, 1992.

GENCHI, C.; BASANO, F.S.; BANDI, C.; Di SACCO, B.; VENCO, L.; VEZZONI, A.; CANCRINI, G. Factors influencing the spread of heartworms in Italy. Interactions between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens*. In: SOLL, M.D.; DAVID, H.K. (Eds.), **Proc. Heartworm Symposium'95**, Batavia, IL, p. 5-26, 1995.

GOTZ, P.; VEY, A. Humoral encapsulation in Diptera (Insecta): defence reactions of *Chironomus* larvae against fungi. **Parasitol.**, v. 68, p. 193-205, 1974.

GRATZ, N.G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. **Med. Vet. Entomol.**, v. 18, n. 3, p. 215-227, 2004.

GRIEVE, R.B.; LOK, J.B.; GLICKMAN, L.T. Epidemiology of canine heartworm infection. **Epidem. Rev.**, v. 5, p. 220-246, 1983.

GUERRERO, J.; VEZZONI, A.; DUCOS DE LAHITTE, J.; BUSSIERAS, J.; ROJO, F.A.; ORTEGA, L.M.; RODENAS, A.; BULMAN, G.M.; LARSSON, M.H.; LABARTHE, N.V.; CHARLES, T.; BORDIN, E.L. Distribution of *Dirofilaria immitis* in selected areas of Europe and South America. **Proc. Heartworm Symposium'89**, Charleston, SC, p. 13-18, 1989.

GUERRERO, J.; DUCOS, H.J.; GENCHI, C.; ROJO, E.; GOMEZ-BAUTISTA, M.; VARELA, M.C.; LABARTHE, N.; BORDIN, E.; GONZALEZ G.; MANCEBO, O.; PATINO, F.; URIBE, L.F.; SAMANO, R. Update on the distribution of *Dirofilaria immitis* in dogs from Southern Europa and Latin America. American Hookworm Society. **Proc. Heartworm Symposium'92**, Austin, TX, p. 31-37, 1992.

GUERRERO, J.; RODENAS, A.; GUTIERREZ, G. FLORIT, F. The extension of the prevalence of *Dirofilaria immitis* in Cataluna, Spain. In: SOLL, M.D.; Knight, D.H. American Hookworm Society. **Proc. Heartworm Symposium'95**, Auburn, AL, p. 73-77, 1995.

HATSUSHIKA, R.; OKINO, T.; OHYAMA, F. The prevalence of dog hearthworm (*Dirofilaria immitis*) infection in stray dogs in Okayama, **Japan. K. Med. J.**, v. 18, p. 75-83, 1992.

HENDRIX, C.M.; BEMRICK, W.J.; SCHLOTTHAUER, J.C. Natural transmission of *Dirofilaria immitis* by *Aedes vexans*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 41, p. 1253-11255, 1980.

HETRU, C.; HOFFMANN, D.; BULET, P. Antimicrobial peptides from insects. In: BREY, P.T.; HUTMARK, D. **Molecular mechanisms of immune response in insects**. Ed. Chapman and Hall, p. 40-66, 1998.

HO, B.C.; YAP, E.H.; SINGH, M. Melanization and encapsulation in *Aedes aegypti* and *Aedes togoi* in response to parasitization by a filarioid nematode (*Breinlia booliati*). **Parasitol.**, v. 85, p. 567-575, 1982.

HOFFMANN, J.A.; KAFATOS, F.C.; JANEWAY, C.A. Jr.; EZEKOWITZ, R.A.B. Phylogenetic perspective in innate immunity. **Science**, v. 284, p. 1313-1318, 1999.

INFANGER, L.C.; ROCHELEAU, T.A.; BARTHOLOMAY, L.C.; JOHNSON, J.K.; FUCHS, J.; HIGGS, S.; CHEN, C.C.; CHRISTENSEN, B.M. The role of phenylalanine hydroxylase in melanotic encapsulation of filarial worms in two species of mosquitoes. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 34, n. 12, p. 1329- 1338, 2004.

JOHNSTONE, C.; KNIGHT, D.H.; LOK, J.B. Heartworm - *Dirofilaria immitis* - Epidemiology. **Parasitology** **4001**, http://www.cal.vet.upenn.edu/parasit/heartworm/lw_3.html, 1997.

JUNKUM, A.; CHOOCHOTE, W.; JIPAKDI, A.; LEEMINGSAWAT, S.; KOMALAMISRA, N.; JARIYAPAN, N.; BOONYATAKORN, C. Comparative studies on the biology and filarial susceptibility of selected blood-feeding and autogenous *Aedes togoi* sub-colonies. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 481-485, 2003.

KARTMAN, L. Factors influencing infection of the mosquito with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). **Exp. Parasitol.**, v. 2, p. 27-28, 1953.

KASAI, N.; WILLIAMS, P. Infecção experimental de *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) por *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). **Rev. Bras. Biol.**, v. 46, p. 277-283, 1986.

KENDALL, K.; COLLINS, G.H.; POPE, S.E. *Dirofilaria immitis* in cats from inner Sydney. **Aust. Vet. J.**, v. 68, p. 356-357, 1991.

KERSHAW, W.E.; LAVOPIERRE, M.M.J.; CHALMERS, T.A. Studies on the intake of microfilariae by their insect vectors, their survival, and their effect on the survival of their vectors. **An. Trop. Med. Parasitol.**, v. 47, p. 207-224, 1953.

KNIGHT, D.H. Heartworm infection. **Vet. Clin. N. Am. Small An. Practice**, v. 17, p. 1463-1517, 1987.

KONISHI, E. 1989. *Culex tritaeniorhynchus* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) as natural vectors of *Dirofilaria immitis*. **J. Med. Entomol.**, v. 26, p. 294-300, 1989.

KOZEK, W.J.; VAZQUEZ, A.E.; GONZALEZ, C. Prevalence of canine filariae in Puerto Rico and the Caribbean. In: SOLL, M.D.; KNIGHT, D.H. eds. **Proc. of the Heartworm Symposium '95**, Batavia, IL: p. 55-64, 1995.

LABARTHE, N.; GUERRERO, J. Epidemiology of heartworm: What is happening in South America and Mexico? **Vet. Parasitol.**, v. 133, n. 2-3, p. 149-156, 2005.

LABARTHE, N.; GUERRERO, J. What is happening in South América? American Hookworm Society. **Proc. Heartworm Symposium'04**, 20, Philadelphia, 2004.

LABARTHE, N.; SERRÃO, M.L.; MELO, Y.F.; GOULART, I.; GUERRERO, J.; MENEZES, S.; ALVES, L.C.; OLIVEIRA, S.J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Heartworm in dogs in the state of Rio de Janeiro, Brazil. In: **Recent Adv. Heartworm Disease: Symposium'98**, Tampa, FL, p. 67-73, 1998.

LABARTHE, N.; SERRÃO, M.L.; MELO, Y.F.; OLIVEIRA, S.J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Potential vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in Itacoatiara, oceanic region of Niterói municipality, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 4, p. 425-432, 1998a.

LABARTHE, N.; SERRÃO, M.L.; MELO, Y.F.; OLIVEIRA, S.J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Mosquito frequency and feeding habits in an enzootic canine dirofilariasis area in Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 145-154, 1998b.

LABARTHE, N. Dirofilariose canina: diagnóstico, prevenção e tratamento aduicida (revisão de literatura). **Clin. Vet.**, v. 2, p. 10-16, 1997.

LABARTHE, N.; ALMOSNY, N. GUERRERO, J.; DUQUE-ARAÚJO, A.M. Description of the occurrence of canine dirofilariasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 1, p. 47-51, 1997.

LABARTHE, N.; ARAUJO, A.M.; BORDIN, E.L. Update on the distribution of *Dirofilaria immitis* in dogs in Brazil. In: **Proc. XVII WSAVA World Cogress**, Roma, Italy, p. 287-289, 1992.

LABARTHE, N.; ALVES, L.C.; SERRÃO, M.L. Dirofilariose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonose**. Ed. L.F. Livros de Veterinária Ltda., Rio de Janeiro, RJ, cap. 6, p. 111-135, 2002.

LAI, C.H.; TUNG, K.C.; OOI, H.K.; WANG, J.S. Competence of *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus* as vector of *Dirofilaria immitis* after blood meal with different microfilarial density. **Vet. Par.**, v. 90, n. 3, p. 231-237, 2000.

LAI, C.H.; TUNG, K.C.; OOI, H.K.; WANG, J.S. Susceptibility of mosquitoes in Central Taiwan to natural infections of *Dirofilaria immitis*. **Med. Vet. Entomol.**, v. 15, n. 1, p. 64-67, 2001.

LAMBERT, J.; KEPPI, E.; DIMARQ, J.; WICKER, C.; REICHART, J.; DUNBAR, B.; LEPAGE, P.; VAN DORSSELAER, A.; HOFFMANN, J.; FOTHERGILL, J.; HOFFMANN, D. Insect immunity: Isolation immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 86, p. 262-266, 1989.

LI, J.Y.; CHRISTENSEN, B.M. Immune competence of *Aedes trivittatus* hemocytes as assessed by lectin binding. **J. Parasitol.**, v. 76, n. 2, p. 276-278, 1990.

LINDEMANN, B.A. *Dirofilaria immitis* encapsulation in *Aedes aegypti*. **Mosquito News**, v. 37, p. 293-294, 1977.

LOFTIN, K.M.; BYFORD, R.L.; LOFTIN, M.J.; CRAIG, M.E. Potential mosquito vectors of *Dirofilaria immitis* in Bernalillo County, New Mexico. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 11, n. 1, p. 90-93, 1995.

LOK, J.B. *Dirofilaria* sp.: Taxonomy and distribution. In: BOREHAM, P.F.L.; ATWELL, R.B. **Dirofilariasis**. CRC Florida, p. 1-28, 1988.

LOLE, J.B. *Dirofilaria* sp: taxonomy and distribution. In: Boreham PFL, Atwell RB, eds. **Dirofilariasis**. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 1-28, 1988.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DEANE, L.M. Presumed *Dirofilaria immitis* infections in wild-caught *Aedes taeniorhynchus* and *Aedes scapularis* in Rio de Janeiro, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 387-388, 1995.

LOWENBERGER, C.; BULET, P.; CHARLET, M.; HETRU, C.; HODGEMAN, B.; CHRISTENSEN, B.M.; HOFFMANN, J.A. Insect immunity: isolation of three novel inducible antibacterial defensins from the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Biochem. Molec. Biol.**, v. 25, p. 867-875, 1995.

LOWENBERGER, C.; SMARTT, C.T.; BULET, P.; FERDIG, M.T.; SEVERSON, D.; HOFFMANN, J.A.; CHRISTENSEN, B.M.; Insect immunity: molecular cloning, expression, and characterization of cDNAs and genomic DNA encoding three isoforms of insect defensin in *Aedes aegypti*. **Insect Molec. Biol.**, v. 8, p. 107-118 1999.

LOWRIE, R.C. Poor vector efficiency of *Culex quinquefasciatus* following infection with *Dirofilaria immitis*. **J. Am. Mosq. Assoc.**, v. 7, p. 30-37, 1991.

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

LUZON-PENA, M.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. Epidemiologia da dirofilariose. **Canis et Felis**, v. 3, p. 19-31, 1993.

MACÊDO, F.C.; LABARTHE, N.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Susceptibility of *Aedes scapularis* (Rondani, 1848) to *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) an emerging zoonosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 4, p. 435-437, 1998.

MAGGENTI, A.R. **General Nematology**. Springer Verlag, New York, 458p., 1981.

MAGNARELLI, L.A. Presumed *Dirofilaria immitis* infections in natural mosquito populations of Connecticut. **J. Med. Entomol.**, v. 15, p. 84-85, 1978.

MAHMOOD, F. Susceptibility of geographically distinct *Aedes aegypti* L. from Florida to *Dirofilaria immitis* (Leidy) infection. **J. Vector Ecol.**, v. 25, n. 1, p. 36-47, 2000.

MANDATO, C.A.; DIECHI-JONES, W.L.; MOORE, S.J.; DOWNIER, R.G.H. The effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on prophenoloxidase activation, phagocytosis and cell spreading in *Galleria mellonella*. **J. Insect Physiol.**, v. 43, p. 1-8, 1997.

MATOLA, Y.G. Periodicity of *Dirofilaria immitis* microfilariae in a dog from Muheza district. **Tanz. J. Helminthol.**, v. 65, p. 76-78, 1991.

McCALL, J.W. Prevalência global da dirofilariose em cães e gatos: Visão geral. **Topics em Med. Vet. para animais de companhia**, v. 2, p. 24-30, 2000.

McGREVY, P.B.; McCLELLAND, G.A.H.; LAVOPIERRE, M.M.J. Inheritance of susceptibility of *Dirofilaria immitis* infection in *Aedes aegypti*. **An. Trop. Med. Parasitol.**, v. 68, n. 1, p. 97-109, 1974.

MENDONÇA, I.L.; ALVES, L.C.; MCCALL, J.W.; FAUSTINO, M.A.G.; SUPAKONDERJ, P. Porcentual de Infecção por *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) em *Aedes aegypti* (Linnaeus) através da utilização de membrana artificial. **Ciênc. Vet. Trop.**, v.1, p. 30-32, 1998.

NAYAR, J.K.; KNIGHT, J.W. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): an experimental and natural host of *Dirofilaria immitis* (Filarioidea: Onchocercidae) in Florida, U.S.A. **J. Med. Entomol.**, v. 36, n. 4, p. 441-448, 1999.

NAYAR, J.K.; SAUERMAN, D.M. Physiological basis of host susceptibility of Florida mosquitoes to *Dirofilaria immitis*. **J. Insect Physiol.**, v. 21, n. 12, p. 1965-1975, 1975.

NEWTON, W.L.; WRIGHT, W.H. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. **J. Parasitol.**, v. 42, n. 3, p. 246-258, 1956.

ODA, T.; SUENAGA, O; ZAITSU, M.; MORI, A; KUROKAWA, K.; FUJITA, K.; OGAWA, Y.; YAMAZAKI, I.; IIDA, K.; DOI, K.; MINE, M.; KATO, K. Studies on annual changes in microfilarial prevalence of *Dirofilaria immitis* among house dogs for 27 years in Nagasaki City, Japan. **Jap. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 23, n. 2, p. 133-137, 1995.

OGE, H.; DOGANAY, A.; OGE, S.; YILDIRIM, A. Prevalence and distribution of *Dirofilaria immitis* in domestic dogs from Ankara and vicinity in Turkey. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, v. 110, n. 2, p. 69-72, 2003.

OMS – Organización Mundial de la Salud. Zoonosis parasitarias. **Informe Técnico**, v. 637, p. 105-106, 1979.

OTTO, G.F. Geographical distribution, vector and life-cycle of *Dirofilaria immitis*. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 154, n. 4, p. 370-377, 1969.

PARKER, B.M. Variation in mosquito (Diptera: Culicidae) relative abundance and *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) vector potential in coastal North Carolina. **J. Med. Entomol.**, v. 30, p. 436-442, 1993.

PARKER, B.M. Density and distribution of *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) third-stage larvae in *Aedes sollicitans* and *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, v. 37, n. 5, p. 695-700, 2000.

PIMENTEL, A.; ALVES, L.C. Estudos epidemiológico preliminares na população canina de Itamaracá-PE. In: **Simpósio Nac. Filariose, Recife, PE**, 1987.

PIMENTEL, A.; BEZERRA, M.J.G.; PONTUAL, S.A.; OLIVEIRA, D.S.C.; SOARES, P.C.; LEITE, A.; BEZERRA, R.; ALVES, L.C. Prevalência da filariose canina no município de Caruaru, PE. In: **XXI Cong. Bras. Medicina Veterinária**. Salvador, BA, p.32, 1988.

RATCLIFFE, N.A. Insect cellular immunity and the recognition of foreignness. In: Immune mechanisms in invertebrate vectors. **Symp. Zool. Soc. Lond. Oxf. Sci. Publ.**, v. 56, p. 21-43, 1986.

RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F. Role of hemocytes in defense against biological agents. In: **Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 331-414, 1979.

RATCLIFFE, N.A.; WALTERS, J.B. Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: fate pathogenic and nonpathogenic bacteria in *Galleria mellonella* nodule. **J. Insect Physiol.**, v. 29, p. 407-415, 1983.

REDINGTON, B.C.; JACKSON, R.F.; SEYMOUR, W.G.; OTTO, G.F. The various microfilariae found in dogs in the United States. In: **Proc. Heartworm Symposium'77**, Atlanta, GA, p. 14-21, 1977.

REIFUR, L.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MONTIANI-FERREIRA, F. 2004. Epidemiological aspects of filariosis in dogs on the coast of Paraná state, Brazil: with emphasis on *Dirofilaria immitis*. **Vet. Par.**, v. 122, p. 273-286, 2004.

REINERT, J.E. Revised list of abbreviations for genera and subgenera of Culicidae (Diptera) and notes on generic and subgeneric changes. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, v. 17, n. 1, p. 51-55, 2001.

RODRIGUES-SILVA, R.; MOURA, H.; DREYER, G.; REY, L. Human pulmonary dirofilariasis: a review. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 37, p. 523-530, 1995.

ROSA, A; RIBICICH, M.; BETTI, A; KISTERMANN, N.; CARDILLO, N.; BASSO, N.; HALLU, R. Prevalence of canine dirofilariosis in the City of Buenos Aires and its outskirts (Argentina). **Vet. Par.**, v. 109, p. 261-264, 2002.

RUSSELL, R.C.; GEARY, M.J. The influence of microfilarial density of dog heartworm *Dirofilaria immitis* on infection rate and survival of *Aedes notoscriptus* and *Culex annulirostris* from Australia. **Med. Vet. Entomol.**, v. 10, p. 29-34, 1996.

RUSSELL, R.C.; GEARY, M.J. The susceptibility of the mosquitoes *Aedes notoscriptus* and *Culex annulirostris* to infection with dog heartworm *Dirofilaria immitis* and their vector efficiency. **Med. Vet. Entomol.**, v. 6, p. 154-158, 1992.

RUSSELL, R.C. Report of a field study on mosquito (Diptera: Culicidae) vectors of dog heartworm *Dirofilaria immitis* (Spirurida: Onchocercidae) near Sydney, N.S.W., and the implications for veterinary and public health concern. **Aust. J. Zool.**, v. 33, p. 461-472, 1985.

SAUERMAN, D.M. Jr.; NAYAR, J.K. A survey for natural potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Vero Beach, Florida. **Mosquito News**, v. 43, p. 222-225, 1983.

SAUERMAN, D.M. Jr. **Mechanisms in mosquitoes responsible for variation in susceptibility to infection by *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856), etiologic agent of canine heartworm disease.** PhD Thesis, University of Florida, Vero Beach, Florida, 170 p., 1980.

SCOLES, G.A.; CRAIG JR., G.B. Variation in susceptibility to *Dirofilaria immitis* among U.S. strains of *Aedes albopictus*. **Vector Control Bull. N.C. States**, v. 2, p. 98-103, 1993.

SCOLES, G.A. Vectors of canine heartworm in the United States: a review of the literature including new data from Indiana, Florida and Louisiana. In: SEAWARD, R.L.; COURTNEY, C.H. **Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium'98.** Tampa, FL: American Heartworm Society, p. 21-36, 1998.

SCOLES, G.A.; DICKSON, S.L.; BLACKMORE, M.S. Assesment of *Aedes sierrensis* as a vector of canine heartworm in Utah using a new technique for determining the infectivity rate. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 9, n. 1, p. 88-90, 1993.

SCHWAN, E.V.; DURAND, D.T. Canine filariosis caused by *Dirofilaria immitis* in Mozambique: a small survey based on the identification of microfilariae. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 73, n. 3, p. 124-126, 2002.

SERRÃO, M.L.C. **Competência Vetorial de *Aedes albopictus* (Skuse, 1848) proveniente do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, para *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) Railliet & Henry, 1911.** Tese de Doutorado apresentada no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 87 p., 2004.

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

SHIAO, S.H.; HIGGS, S.; ADELMAN, Z.; CHRISTENSEN, B.M.; LIU, S.H. CHEN, C.C. Effect of prophenoloxidase expression knockout on the melanization of microfilariae in the mosquito *Armigeres subalbatus*. **Insect Mol. Biol.**, v. 10, n. 4, p. 315-321, 2001.

SILVA, E.; ALVES, L.C.; BARBOSA, C.L. Dirofilariose canina: situação atual no Brasil. In: **XXVI Cong. Bras. Med. Veterinária**, Campo Grande, MS, **Anais**, 1999.

SLOCOMBE, J.O.D.; McMILLAN, I. The geographic distribution of heartworm in Canada. In: **Proc. Heartworm Symposium'77**, Atlanta, GA, p. 5-7, 1977.

SLOCOMBE, J.O D. Reflexions on heartworm surveys in Canadá over 15 years. In: American Hookworm Society. **Proc. Heartworm Symposium'92**, Austin, TX, p. 21-30, 1992.

SONG, K.H.; LEE, S.E.; HAYASAKI, M.; SHIRAMIZU, K.; KIM, D.H.; CHO, K.W. Seroprevalence of canine dirofilariosis in South Korea. **Vet. Par.**, v. 114, p. 231-236, 2003.

SOULSBY, E.J.L. **Helminths, arthropods & protozoa of domesticated animals (Mönnig)**. 6^a ed. London: Baillière, Tindall and Cassel, 824 p., 1968.

SOUZA, N.F.; BENIGNO, R.N.M.; FIGUEIREDO, M.J.F.M. Prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães no município de Belém, PA, com base na microfilária. **Rev. Bras. Par. Vet.**, v. 6, n. 1, p. 83-86, 1997.

SOUZA, N.F.; LARSSON, M.H.M.A. Frequência de dirofilariose canina (*D. immitis*) em algumas regiões do Estado de São Paulo por meio da detecção de antígenos circulantes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, n. 3, p. 321-325, 2001.

STROMBERG, B.E.; PROUTY, S.M.; SCHLOTTHAUER, J.C. Six decades of Heartworm in Minnesota. In: Soll, M.L. American Hookworm Society. **Proc. Heartworm Symposium'95**, Batavia, IL, p. 5-26, 1995.

SUASSUNA, AC.D.; DEPAULA, V.V.; FEIJÓ, F.M.C. Ocorrência de cães parasitados com *Dirofilaria immitis* adulta pelo método de imunomigração rápida no município de Mossoró, RN. In: **Cong. Bras. Clínicos Veterinários de Pequenos Animais**, XX, Águas de Lindóia, SP, Anais, p. 31, 1999.

SULAIMAN, I.; JEFFERY, J. The ecology of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in a rubber estate in Malaysia. **Bull. Entomol. Res.**, v. 76, p. 553-557, 1986.

SULAIMAN, I.; TOWNSON, H. The genetic basis of susceptibility to infection with *Dirofilaria immitis* in *Aedes aegypti*. **An. Trop. Med. Parasitol.**, v. 74, p. 635-646, 1980.

SULAIMAN, I. Susceptibility of *Aedes aegypti* to infections with *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens*. **South. Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 14, n. 4, p. 543-547, 1983.

SYMES, C.B. A note on *Dirofilaria immitis* and its vectors in Fiji. **J. Helminthol.**, v. 34, n. 1/2, p. 39-42, 1960.

TALLURI, V.M.; CANCRINI, G. An ultrastructural study on the early cellular response to *Dirofilaria immitis* (Nematoda) in the malpighian tubules of *Aedes aegypti* (refractory strains). **Parasite**, v. 1, p. 343-348, 1994.

TAYLOR, A.E.R. The development of *Dirofilaria immitis* the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Helminthol.**, v. 34, p. 27-38, 1960.

THEIS, J.H.; KOVALTCHOUK, J.G.; FUJIOKA, K.K.; SAVISKAS, B. Vector competence of two species of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from southern California for *Dirofilaria immitis* (Filariidea: Onchocercidae). **J. Med. Entomol.**, v.37, n. 2, p. 295-297, 2000.

TO, E.W.; TSANG, W.M.; CHAN, K.F. Human dirofilariasis of the bucal mucosa: a case report. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 32, n. 1, p. 104-106, 2003.

TOLBERT, R.H.; JOHNSON, W.E. Jr. Potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Macon County, Alabama. **Am. J. Vet. Res.**, v. 43, p. 2054-2056, 1982.

TRAVI, B.L.; ORIHIL, T.C. Development of *Brugia malayi* and *Dirofilaria immitis* in *Aedes aegypti*: Effect of the host's nutrition. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 38, p. 19-22, 1987.

VAUGHAN, J. The effect of mosquito-borne parasites on the ability of mosquitoes to transmit arboviruses. **ESA Annual Meeting**. <http://www.sheridan.com/entsoc/abs/SD1/E2730.html>, 1997.

VEY, A.; GOTZ, P. Humoral encapsulation in Diptera (Insecta): comparative studies in vitro. **Parasitol.**, v. 70, p. 77-86, 1975.

VILLAVASO, E.J.; STEELMAN, C.D. Laboratory and field studies of the southern house mosquito, *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, *Dirofilaria immitis* (Leidy), in Louisiana. **J. Med. Entomol.**, v. 7, n. 4, p. 471-476, 1970.

WALTERS, L.L.; LAVOPIERRE, M.M. *Aedes vexans* e *Aedes sierrensis* (Diptera: Culicidae): potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Tehama County, Northern California, USA. **J. Med. Entomol.**, v. 19, p. 15-23, 1982.

WALTERS, L.L. Risk factors for heartworm infection in northern California. In: SOLL, M.D.; Knight, D.H. American Hookworm Society. **Proc. Heartworm Symposium'95**, Auburn, AL, p. 5-26, 1995.

WANG, X.; FUCHS, J.F.; INFANGER, L.C.; ROCHELEAU, T.A.; HILLYER, J.F.; CHEN, C.C.; CHRISTENSEN, B.M. Mosquito innate immunity: involvement of beta 1,3-glucan recognition protein in melanotic encapsulation immune responses in *Armigeres subalbatus*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 139, n. 1, p. 65-73, 2005.

WEBBER, W.A.; HAWKING, F. Experimental maintenance of *Dirofilaria repens* and *D. immitis* in dogs. **Exp. Parasitol.**, v. 4, p. 143-164, 1955.

WIESNER, A. Characteristics of inert beads provoking humoral immune responses in *Galleria mellonella* larvae. **J. Insect Physiol.**, v. 38, p. 533-541, 1992.

WILSON, K.; COTTER, S.C.; REESON, A.F.; PELL, J.K. Melanism and disease resistance in insects. **Ecol. Letters**, v. 4, n. 6, p. 637-649, 2001.

WU, C.C.; FAN, P.C. Prevalence of canine dirofilariasis in Taiwan. **J. Helminthol.**, v. 77, n. 1, p. 83-88, 2003.

YEN, C. Studies on *Dirofilaria immitis* Leidy, with special reference to the susceptibility of some Minnesota species of mosquitoes to the infection. **J. Parasitol.**, v. 24, p. 189-205, 1938.

YOON, H.; YOON, C.; JEONG, S.; KIM, T.; PARK, S.; CHUNG, B.; CHOI, Y.; LEE, W. Prevalence and relative risk of canine dirofilariasis among dogs in Seoul, South Korea. **Vet. Rec.**, v. 151, p. 576-577, 2002.

ZYTOON, E.M.; EL-BELBASI, H.I.; KONISHI, E.; MATSUMURA, T. Susceptibility of *Aedes albopictus* mosquitoes (Oahu strain) to infection with *Dirofilaria immitis*. **Kobe J. Med. Sci.**, v. 38, p. 289-305, 1992.

ANEXO 1

Ficha de Inquérito Epidemiológico sobre Dirofilariose

PROJETO DE PESQUISA (DIROFILARIOSE)

1 – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO:

NOME DO ANIMAL: _____ Nº _____ IDADE _____
SEXO: _____ RAÇA: _____ PELAGEM: _____
PROCEDÊNCIA: _____
PROPRIETÁRIO: _____
ENDEREÇO: _____
COMPLEMENTO: _____ BAIRRO: _____

2 – AVALIAÇÃO DO ANIMAL:

ESTADO NUTRICIONAL	(ÓTIMO) (BOM) (REGULAR) (PÉSSIMO)
ECTOPARASITOS	(SIM) (NÃO) CARRAPATICIDA? _____
ENDOPARASITOS	(SIM) (NÃO) VERMIFUGADO? _____
INAPETÊNCIA	(SIM) (NÃO)
PERDA DE PESO	(SIM) (NÃO)
DISTENSÃO ABDOMINAL	(SIM) (NÃO)
CANSAÇO	(SIM) (NÃO)
DISPNÉIA	(SIM) (NÃO)

3 – OUTRAS INFORMAÇÕES QUE JULGAR NECESSÁRIO:

4 – DADOS SOBRE O VETOR:

HÁ QUEIXA DE MOSQUITOS? (SIM) (NÃO)
PERÍODO DE MAIOR QUEIXA (MANHÃ) (TARDE) (NOITE)
VEGETAÇÃO PRIMÁRIA () OU SECUNDÁRIA () NAS
MEDIAÇÕES

5 – RESULTADO DOS EXAMES:

SOROLOGIA COM PLASMA / SORO: _____
MÉTODO MODIFICADO DE KNOTT: _____

ANEXO 2

Resolução nº 245/2002

ANEXO 3

Revista Entomologia y Vectores

Nota de pesquisa / Research note

**USE OF THE QUAIL *Coturnix coturnix* (LINNE, 1758) SKIN AS FEEDING
MEMBRANE TO CONTINUOUSLY STUDY *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) IN *Culex
quinquefasciatus* SAY, 1823.**

Nota de pesquisa / Research note

**USE OF THE QUAIL *Coturnix coturnix* (LINNE, 1758) SKIN AS FEEDING
MEMBRANE TO CONTINUOUSLY STUDY *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) IN *Culex*
quinquefasciatus SAY, 1823.**

**Gílcia A. Carvalho⁽¹⁾, Leucio C. Alves⁽²⁾, Rafael T. Maia⁽²⁾, Carlos F. S. Andrade⁽³⁾,
Fábio L. C. Brito⁽²⁾ & Maria A. G. Faustino⁽²⁾**

Abstract

To continuously study the development of *Dirofilaria immitis*, the suitability of the quail (*Coturnix coturnix*) skin as a feeding membrane was assessed on a total of 52 females of *Culex quinquefasciatus*. The mosquito strain was reared and maintained at the insectary of Parasitic Disease Laboratory at Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil. The developmental stages of the parasite were identified and mortality rate of engorged females was recorded daily. *D. immitis* larvae were detected in 57.8 % (26/45) of

⁽¹⁾ Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cx.P. 6109, CEP:13084-971 Campinas, São Paulo, Brasil; (2) Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros s/nº, CEP: 52171-900 Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. FAX 55-81-33021404, E-mail: leucioalves@hotmail.com; (3) Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cx.P. 6109, CEP:13084-971 Campinas, São Paulo, Brasil.

Recebido em: 02/02/2005

Aceito em:

the *Cx. quinquefasciatus* dissected mosquitoes and the percentage of engorged females was 92.3%. The use of this feeding membrane showed to be comparatively advantageous.

Key Words: Heartworm, mosquitoes, model

Dirofilariasis is a serious dog health problem in many parts of the world and various species of mosquitoes have been identified as the potential vector of this disease (Ludlam *et al.*, 1970). Despite many efforts, it must be pointed that in many areas of the world the vector species involved, the vector competence and also the prevalence of the disease remain unknown, making the understanding of the prime aspects of the vector-parasite interaction essential for the rational development of control measures (Albuquerque *et al.*, 1999). Beside the regular use of dogs as a model to study *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856), transmission of pathogens by mosquitoes has been assessed by a number of artificial feeding systems and methodologies proposed (Rutledge *et al.*, 1964; Mellor, 1971; Blumberg, *et al.*, 1973; McCall, 1981; Ahid *et al.*, 2000). These include some membranes from animals (e.g. cotton rat, tail white rat and chicken skin, or bovine and pig intestine), as well as parafilm membrane feeders. The aim of this study was to evaluate the use of a quail skin membrane as a tool to continuously study of *D. immitis* in mosquitoes.

Culex quinquefasciatus Say, 1823 strains were established from field collections in Recife. The larvae were daily fed with powdered commercial dog food and the adult mosquitoes were maintained in screened boxes (30 X 25 X 25 cm) at 27-30°C and 80% of humidity in light/dark cycle.

A *D. immitis* strain was obtained from the blood of a domestic dog, found in the metropolitan region of Recife. Heparin treated syringes was used for the blood samples

and the obtained material was immediately refrigerated at 4°C for transportation. The density of microfilariae was determined by the modified Knott test (Newton & Wrigth, 1956) for 20 µl samples of blood.

Female mosquitoes were fed (2:20 hours) with the infected blood in order to achieve vector infection. Artificial apparatus used in this study was the same as described by Rutledge *et al.* (1964), McCall (1981) and Mendonça *et al.* (1998), and it was mounted with the quail skin as a membrane. Engorged females were maintained in the screened boxes at 27 – 30°C. Three individual mosquitoes were removed each time from the boxes and immobilized by low temperatures (4°C). Mosquitoes were dissected daily during 14 days. The head, thorax and abdomen were dissected and examined for developmental larval stages of *D. immitis*. The mortality rate and percentage of engorged females were also recorded.

The mean number of microfilariae assessed in the blood offered to the mosquitoes was 2,558 microfilariae/ml by Knott test. From a total of 52 mosquitoes, 92.3% of engorged females was observed. Brito *et al.* (1999) reported 65.6% of *Cx. quinquefasciatus* engorged females after feeding through the same apparatus and only 34.4% on dogs. Ahid *et al.* (2000) reported a variable percentage ranging from 40 to 98% of engorged females, for different *Cx. quinquefasciatus* populations, by the use of an infected dog as the microfilariae source. Considering that *Cx. quinquefasciatus* is an ornitophilic species (Cônoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994), it could be argued that the quail skin probably produces an additional attractive to mosquitoes. The highest mortality occurred in the second day after the experimental infection and the final mortality (8.9%) observed was considered high. Ahid *et al.* (2000) reported mortality rates from 1.46% to 7.06%. Larval stage of *D. immitis* have been observed only in 57.8% (26/45) of the engorged females. The periods of detection of the larval stage in mosquitos was similar are those found by Taylor (1960) and Mendonça *et al.* (1998) for *Aedes aegypti*. The

present data support the hypothesis that a quail skin membrane facilitates to the experimental infection of *Cx. quinquefasciatus* with *D. immitis*

References

Ahid, S.M.M ; Vasconcelos, P.S.S & Lourenço-de-Oliveira,R., 2000. Vector competence of *Culex quinquefasciatus* Say from different regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **95**:769-775.

Albuquerque,C.M.R.; Cacalcanti,V.M.S.; Melo, A.A.V.; Vercosa,P.; Regis,L. & Hurd,H., 1999. Blood meal microfilariae density and the uptake and establishment of *Wuchereria bancrofti* infections in *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **94**:591-596.

Blumberg, B.S.; Wills,W. & Millan, I., 1973. Australia antigen in mosquitoes. Feeding experiments and fields studies. **Chem. Pathol. Pharmacol.** **6**:719-732.

Brito,A.C.; Fontes, G.; Rocha,E.M.M.; Rocha, D.A.M. & Regis, L., 1999. Development of *Dirofilaria immitis* (Leidy) in *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) from Maceió, Alagoas, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **94**:575-576.

Cônsoli, R.A.G.B. & Lourenço-de-Oliveira, R.L., 1994. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, 228 p.

Ludlam, K.W.; Jachowski, L.A. & Otto, G.F., 1970. Potential vectors of *Dirofilaria immitis*. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** **157**:1354-1359.

- McCall, J.W., 1981. The role of Arthropods in the development of animal models for filariasis research. **J. Georgia Entomol. Soc.** **16** Supl.:283-293.
- Mellor, P.S., 1971. A membrane feeding technique for the infection of *Culicoides nubeculosus* Mg. *Culicoides variipennis sonorensis* Coq. Wuth *Onchocerca cervicalis* Raillet and Henry. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **65**:199-201.
- Mendonça, I.L.; Alves, L.C.; McCall, J.W.; Faustino, M.A.G. & Supakonderj, P., 1998. Porcentual de Infecção por *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) em *Aedes aegypti* (Linnaeus) através da utilização de membrana artificial. **Ciencia Vet. Trop.** **1**:30-32.
- Newton, W.L. & Wrigth, W.H., 1956. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. **J. Parasitol.** **42**:246-258.
- Rutledge, L.C.; Ward, R.A. & Gould, D.J., 1964. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. **Mosquito News.** **24**: 407-419.
- Taylor, A.E.R., 1960. The development of *Dirofilaria immitis* the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Helminthol.** **34**:27-38.