

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Roberto Torquato Rocha

**Padronização da Reação de PCR para Detecção de *Dirofilaria immitis*
(Leidy, 1856) e Determinação da Taxa de Infecção em Mosquitos Coletados
na Ilha de Santa Catarina**

Florianópolis, 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Roberto Torquato Rocha

**Padronização da Reação de PCR para Detecção de *Dirofilaria immitis*
(Leidy, 1856) e Determinação da Taxa de Infecção em Mosquitos Coletados
na Ilha de Santa Catarina**

Florianópolis, 2007

Roberto Torquato Rocha

**Padronização da Reação de PCR para Detecção de *Dirofilaria immitis*
(Leidy, 1856) e Determinação da Taxa de Infecção em Mosquitos Coletados
na Ilha de Santa Catarina**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre, no Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Carlos José de Carvalho Pinto

Florianópolis, 2007

Ficha catalográfica

Rocha, Roberto Torquato.
Padronização da Reação de PCR para Detecção de
Dirofilaria immitis (Leidy, 1856) e Determinação da Taxa de
Infecção em Mosquitos Coletados na Ilha de Santa Catarina /
Roberto Torquato Rocha. – 2007.
62: il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa
Catarina, Florianópolis, 2007.
Inclui Bibliografia.

1. Dirofilariose Canina. 2.PCR. 3. Mosquitos.

*Dedico este trabalho:
Aos meus pais com amor.*

Somos todos prisioneiros, mas alguns de nós estão em celas com janelas, e outros sem. (Khalil Gibran.)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo milagre da vida.

A minha família por todo o apoio, amor e carinho, sempre me dando forças para seguir em frente.

Ao Prof. Carlos José de Carvalho Pinto, pela orientação na condução da pesquisa, pelo seu carisma e entusiasmo como pesquisador, além da amizade inestimável manifestada na liberdade.

Ao Prof. Mário Steindel pela coorientação e sugestões neste trabalho, por assumir toda a responsabilidade de me orientar quando foi necessário. Pelo incentivo na busca pelas questões biológicas e pelos provérbios sempre originais.

Ao Prof. Edmundo Grisard pelo exemplo como pessoa, por permitir que realizasse o estágio de docência na Biologia Parasitária, para mim um aprendizado e tanto, e também por permitir que utilizasse de todos os equipamentos e reagentes de que necessitei para realizar os experimentos, pelos ensinamentos de biologia molecular e de como proceder dentro de um laboratório.

Aos Professores Carlos Zanetti e Aguinaldo, pelas muitas conversas agradáveis e apoio no mestrado.

Professores Orlando e Nery pela amizade e pelas amostras “preciosas”.

Marília Sirianni me ajudar em diversos momentos do mestrado, pelas sugestões no trabalho, por e por aceitar compor a Banca de avaliação deste trabalho.

A Prof^ª Norma Labathe pelo conjunto da obra, a qual me basei e por ceder os iniciadores que foram tão importantes para o início deste trabalho. Muito Obrigado!

Ao pessoal do LTH. A Cecília e pelo convívio e pela descontração no laboratório. Ao pessoal da Proto e Bioinformática pelo convívio, piadas e auxílio. A Paty “queridona”, Ize e

Dani, “ruiva” por me terem “salvado” diversas vezes nos experimentos e estarem sempre presentes. Ao Glauber, Diogo, Zé , Ethel, Anita, Rebeca, Gianina, Maiza, Dani “Morena”, Letícia, Ane, Thaís, Lise e Ju pelas agradáveis tardes de conversas científicas, na “salinha dos estudantes” Abraço a todos.

Aos meus inseparáveis amigos, Thiago, Ângelo, Willian, Rodrigo ajudando a aliviar a tensão do dia-a-dia.

Enfim, gostaria de agradecer não só aqueles que estiveram envolvidos diretamente na minha vida acadêmica, como também aqueles que tornaram e tornam os meus dias mais agradáveis.

RESUMO

ROCHA, Torquato Rocha. Padronização da Reação de PCR para detecção de *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) no Vetor e Determinação da Taxa de Infecção em Mosquitos Coletados na Ilha de Santa Catarina. 2007. 62p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

A *Dirofilaria immitis* é o agente etiológico da dirofilariose cardiovascular canina ou doença do coração dos cães. Esse nematódeo da família Onchocercidae está amplamente distribuído pelo mundo e pode infectar cães, gatos, canídeos selvagens e eventualmente o homem. O ciclo de vida do parasito se alterna entre os canídeos e os mosquitos vetores. A transmissão do parasito para o cão, seu principal hospedeiro, se dá por diversas espécies de mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Mansonia*. A detecção do parasito no vetor é feita usualmente pela observação de microfíliarias ao microscópio e no cão pelo método do Knott modificado, onde é possível observar a presença ou ausência de microfíliarias liberadas pelo verme adulto na corrente sangüínea. No entanto, estes métodos são passíveis de erro, uma vez que larvas de outras espécies de filárias podem ser encontradas infectando o cão e os vetores e serem confundidas com *D. immitis*. Para um diagnóstico mais preciso desta parasitose, técnicas de biologia molecular baseadas na reação de PCR vêm sendo desenvolvidas para contornar as dificuldades usuais. Neste trabalho padronizamos a técnica de PCR para detecção de *D. immitis* e realizamos um levantamento da taxa de infecção em mosquitos coletados na Ilha de Santa Catarina. Para tanto, foram utilizados iniciadores dirigidos contra um segmento de um gene que codifica para um antígeno de superfície de *D. immitis*. Na etapa de padronização foram utilizadas diferentes concentrações de DNA extraído de *D. immitis*, DNA obtido do sangue de cão infectado e não infectado com *D. immitis* e DNA de mosquito. Como resultado, conseguimos amplificar um segmento de 378 pares de bases, a partir do DNA extraído do sangue de cão infectado, que foi confirmado por seqüenciamento. A sensibilidade da reação permite a amplificação do segmento alvo em uma faixa que varia de 100 ng a 1 pg, sugerindo ser possível amplificar uma quantidade mínima de DNA do parasito na circulação sangüínea do cão e mosquito. Um excesso de 60ng/ μ L de DNA extraído do sangue do cão e 80 ng/ μ L de DNA do vetor não inibe a amplificação da banda específica do parasito. No ensaio de especificidade não observamos o aparecimento de bandas inespecíficas, quando utilizado DNA de outros vermes nematódeos e platelmintos que infectam o cão. Na etapa de aplicação no campo, um total de 400 mosquitos de diferentes espécies, foram capturados na região Norte e Central da Ilha de Santa Catarina e testados por PCR. O DNA da filaria foi encontrado em 2,3%(1/44) dos pools de mosquitos testados. Esses resultados provam que *Oc. scapularis* é um vetor natural de *D. immitis* na Ilha de Santa Catarina e indicam a existência de um foco isolado da doença na localidade da praia do Forte. Acreditamos que a padronização desta técnica será de grande importância para determinação do diagnóstico espécie-específico e monitoramento da dirofilariose canina no campo.

Palavras-chave: *D. immitis*. Doença do Coração dos Cães Dirofilariose Canina. PCR. Mosquitos.

ABSTRACT

ROCHA, Roberto Torquato. Polimerase Chain Reaction for Detection of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) and Determination of Infection Rates in Mosquitoes in Santa Catarina's Island. 2007. 62pg. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Biotechnology Graduate Program of Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

Dirofilaria immitis is the ethiological agent of canine cardiovascular dirofilariosis or heartworm disease. This onchocercid nematode is widespread among dogs, cats, wild canids and eventually infected the human. The life cycle of parasite alternates between canids vertebrate hosts and mosquito vector. The parasite's transmission to the dog, its main host, takes place through several mosquitoes species from the gender *Culex*, *Aedes*, *Mansonia*. The parasite's detection at the vector is usually done by observation through the microscope and in the dog by the modified Knott's method, where it is possible to observe the presence or absence of microfilarias released by the adult worm within the blood stream. However, these methods set space for errors once other kinds of worms from other filarias species might be found infecting the dog and the vector and they could be taken as *D. immitis*. For a more precise diagnose to this disease, techniques from molecular biology based on PCR are being developed in order to cope with the usual difficulties. In the present research we have used as a pattern the PCR for detection *D. immitis*, and we realized a survey of infection rates in mosquitos captured in Santa Catarina Island's. For such, we have used the primers driven against gene, that transcribe for a surface antigene's gene segment from the *D. immitis*. At the patternizing stage we used different DNA amounts withdrawn from *D. immitis* worm, DNA from an infected and uninfected dog blood. We've amplified one DNA segment of 378pb of genome's parasite with DNA extracted from Blood an infected dog. The primers sensibility allows the target segment's amplification in a range which varies from 100 ng to 1 pg, such result points out the possibility of amplifying a minimum amount of the parasites' DNA at the dog's blood stream and in the host. A DNA excess of 60 ng/ul extracted of dog's blood and 80ng/ul DNA extracted the vector's DNA does not inhibit the specific band's amplification of the parasite. At the specificity session we did not observe the merge of unspecified bands when DNA of other kinds of nematodes and platelmints that infect dog's. At the application's stage in Field, a total of 400 mosquitoes of diferents species, were caught in the north and central region of Santa Catarina Island's and tested by PCR. Filarial DNA was found in 2,3% (1/44) of pools tested. These results prove that *Oc scapularis* is a natural vector of *D. immitis* in and indicating the existence of the disease at that specific locality Fort's Beach. We believe that this techniques used as a pattern will be of great value to the diagnosis's species-specific determination as well as to the canine dirofilariosis actual monitoring.

Keywords: *D.immitis*. Heartworm Disease. Dirofilariosis.PCR. Mosquitoes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do nematóide <i>Dirofilaria immitis</i> (http://www.mosquito.org/images/heartworm.jpg).....	6
Figura 2: Distribuição geográfica mundial do nematóide <i>Dirofilaria immitis</i> . (http://cal.vet.upenn.edu/.../images/worldcolorF.gif).....	9
Figura 3: Mapa da Ilha de Santa Catarina, onde foi realizado o presente trabalho. (http://www.terravista.pt/FerNoronha/2907/capital.html).....	28
Figura 4: Gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR ensaio de variação do gradiente de temperatura utilizando os iniciadores DIRO-F e DIRO-R e o tampão 3.....	32
Figura 5: Gel de agarose a 1,5 % corado pelo Brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR de um ensaio de reconstituição com DNA de mosquito.....	33
Figura 6: Gel de agarose a 1,5 % corado pelo Brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR de um ensaio de reconstituição com DNA de cão.....	34
Figura 7: Gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR de um ensaio de sensibilidade utilizando os iniciadores DIRO-F e DIRO-R e o tampão 3.....	35
Figura 8: Gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR de um ensaio de especificidade dos iniciadores DIRO-R e DIRO-F.....	36
Figura 9: Resultado do sequenciamento dos fragmentos de PCR de 378pb amplificados pelos indicadores DIRO-R e DIRO-F.....	37
Figura 10: Gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR do experimento teste realizado com os mosquitos coletados em campo da localidade Cachoeira do Bom Jesus para diagnóstico de dirofilariose no vetor.....	39
Figura 11: Gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR do experimento teste realizado com os mosquitos coletados em campo da localidade da Praia do Forte para diagnóstico de dirofilariose no vetor.....	39
Figura 12: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado pela prata para confirmação do resultado positivo do Pool 23 (coleta Praia do Forte)	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Matriz utilizada na formulação dos 12 diferentes tampões utilizados na padronização das reações de PCR	23
Tabela 2: Frequência de mosquitos coletados na Norte da Ilha de Santa Catarina utilizados nas reações de PCR.....	38
Tabela 3: Detecção de <i>D. immitis</i> por PCR em <i>pools</i> de mosquitos coletados na Ilha de Santa Catarina.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius	ng – nanograma
DNA – Ácido Desoxirribonucléico do inglês Desoxiribonucleic Acid	pb – pares de bases
dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatados	PCR - Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético	pg – picograma
ELISA – Ensaio imunoenzimático, do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>	pH – potencial hidrogeniônico
Fg - femtograma	RNAse – ribonuclease
g – força da gravidade	RPM – Rotações por minuto
M – molar	Taq – DNA polimerase extraída de <i>Thermus aquaticus</i>
µg – micrograma	TBE – Tampão Tris - Borato / EDTA
µl – microlitro	TE – Tampão Tris- EDTA
mA – miliamper	Tris – Tris (hidroximetil) amino metano
ml – mililitro	UV – Ultra violeta
mM –milimolar	V – Volt
	OMS - Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1. Mosquitos e aspectos gerais da dirofilariose.....	1
1.2. Epidemiologia e diagnóstico molecular.....	9
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivos Gerais.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Amostras utilizadas para a padronização da reação de PCR.....	17
3.1.1. Criação de <i>Ae. albopictus</i> em laboratório para obtenção dos controles negativos das reações.....	17
3.2. Extração de DNA.....	18
3.2.1. Extração de DNA de amostras sanguíneas e de <i>D. immitis</i> adultos (protocolo 1).....	18
3.2.2. Extração de DNA de mosquitos (protocolo 2).....	19
3.3. Dosagem e avaliação da quantidade de DNA extraído.....	21
3.4. Reação da polimerase em cadeia.....	21
3.4.1. Detecção do DNA de <i>D. immitis</i> em mosquitos e no sangue de cães através da Reação da PCR.....	21
3.4.2. Teste dos 12 tampões.....	22
3.4.3. Avaliação da capacidade de detecção de DNA de <i>D. immitis</i> através da Reação de PCR na presença de DNA de mosquito e sangue de cão.....	23
3.4.4. Ensaio de variação do gradiente de temperatura de ligação dos iniciadores	

DIRO-F e DIRO-R.....	24
3.4.5. Ensaios de sensibilidade dos iniciadores DIRO-F e DIRO-R.....	24
3.4.6. Ensaios de especificidade dos iniciadores DIRO-F e DIRO-R.....	24
3.5. Purificação dos produtos de PCR.....	25
3.6. Eletforese em geis de agarose.....	25
3.7. Seqüenciamento do fragmento do gene específico da cutícula de <i>D. immitis</i>	26
3.8. Análise das seqüências obtidas.....	27
3.9. Coletas de mosquitos de campo.....	27
3.10. Cálculo da Taxa de infecção em mosquitos capturados em campo.....	29
4.RESULTADOS	30
4.1. Extração de DNA.....	30
4.2. Padronização da técnica de PCR.....	30
4.2.1. Determinação das condições térmicas da reação em cadeia da polimerase para a amplificação do fragmento de 378pb utilizando os iniciadores DIRO-F e DIRO-R	31
4.2.2. Determinação do tampão ideal para PCR.....	31
4.2.3. Teste de variação do gradiente de temperatura de ligação dos iniciadores DIRO-F e DIRO-R	32
4.2.4. Avaliação da capacidade de detecção de DNA de <i>D. immitis</i> através da Reação de PCR na presença de DNA de mosquito e sangue de cão	33
4.2.5. Teste de sensibilidade dos iniciadores DIRO-F e DIRO-R	34
4.2.6. Teste de especificidade dos iniciadores DIRO-F e DIRO-R	35
4.3. Seqüenciamento do gene específico da cutícula de <i>D.immitis</i>	36
4.4. Aplicação da técnica de PCR para detecção do parasito no vetor.....	37

4.4.1. Coletas de mosquitos e taxa de infecção por <i>D. immitis</i>	37
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mosquitos e Aspectos Gerais da *Dirofilariose*

Os mosquitos pertencem à Família Culicidae sendo conhecidas cerca de 3.500 espécies agrupadas em 3 subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae (LOZOVEI, 2001). Esses insetos apresentam distribuição mundial, desde o Ártico até os mais remotos oásis em desertos. Podem ser encontrados em altitudes acima de 5.500 metros e somente é notada sua ausência na Antártica e em algumas ilhas isoladas. Podem ser encontrados em diferentes habitats silvestres, rurais e urbanos, onde freqüentam domicílios humanos e anexos domiciliares, como abrigos de animais domésticos (LOZOVEI, 2001).

Somente os mosquitos adultos fêmeas são hematófagos. O sangue é necessário para o desenvolvimento dos ovos, pois os nutrientes do sangue são convertidos em substâncias protéicas integrantes do vitelo (FORATTINI, 1965; 2002).

O hematofagismo é precedido pela inoculação de saliva do inseto com substâncias que podem desencadear reações alérgicas leves ou intensas no hospedeiro, dependendo do estado de susceptibilidade do indivíduo. É por ocasião das picadas que as fêmeas atuam como transmissoras de organismos patogênicos, que determinam as enfermidades (LOZOVEI, 2001). Entre as principais doenças cujos agentes são transmitidos por mosquitos pode-se se citar: malária, febre amarela, dengue, diversas arboviroses, filariose bancroftiana e a dirofilariose canina (REY, 1999).

O papel dos mosquitos é relevante como vetor de parasitas, pelo grande número de espécies envolvidas na veiculação de agentes patogênicos. Mudanças na atividade de culicídeos em

conseqüência de processos envolvendo intervenção humana no ambiente já foram observadas em várias espécies, destacando-se *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *Ochlerotatus scapularis* (Rondani, 1848), todas consideradas como potenciais vetores de *Dirofilaria immitis* no Brasil (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; DEANE, 1995; MACEDO; LABARTHE; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998; SERRÃO; LABARTHE; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1999; LEITE, 2005).

A dirofilariose canina é uma zoonose de grande importância veterinária causada pelo nematóide filarídeo, *D. immitis* Leidy, 1856 (Spirurida: Onchocercidae) sua transmissão depende de três fatores de maior importância: (1) a presença de um mosquito vetor competente, (2) uma ampla e acessível população de canídeos susceptíveis (3) condições climáticas apropriadas. Muitas espécies mosquitos podem ser vetores de *D. immitis* onde exista uma grande e acessível população de cães, contudo a temperatura parece ser o fator mais importante na transmissão de *D. immitis*. Estudos têm revelado que o desenvolvimento das microfilárias até o terceiro estágio larval (estágio infectivo L3) pode levar de 8 a 29 dias dependendo da temperatura e umidade do ambiente na qual o mosquito está exposto (WATTS; COURTENY; REDDY, 1999).

O parasito é também conhecido como verme do coração dos cães e é transmitido por algumas espécies de mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Ochlerotatus*, *Mansonia*, *Psorophora* e *Coquillettidia* (LOFTIN et al., 1995; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & DEANE, 1995; LABARTHE, 1997; LABARTHE et al., 1998a; ALVES et al., 1999; AHID; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1999; SERRÃO; LABARTHE; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2001). Lok e colaboradores (2000) listaram 26 espécies de mosquitos que são vetores de dirofilária em diferentes regiões dos EUA. A maioria destes vetores pertencem aos gêneros: *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Mansonia*, *Anopheles* e *Culex*. Estes autores identificaram ainda que, em algumas áreas, espécies de mosquitos nativos tornam-se vetores de filárias após a introdução de cães

infectados. Em outras situações, a invasão de mosquitos exóticos susceptíveis à infecção pode colaborar na transmissão. Na Califórnia, uma espécie nativa de *Ae. sierrenses* tornou-se um importante vetor de *D. immitis* após a introdução de cães infectados. Na América do Norte, a invasão do mosquito exótico *Aedes albopictus* foi acompanhada do envolvimento desta espécie na transmissão de *D. immitis*, particularmente na parte Sudeste dos EUA em estados como Louisiana e Florida (NAYAR; KNITT, 1999; LOK; WALKER; SCOLES, 2000).

Dentre as 22 espécies de mosquitos que foram encontradas naturalmente infectadas com *D. immitis* na América do Norte, somente 8 (*Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), *Ochlerotatus (Ochlerotatus) canadensis* (Theobald), *Ochlerotatus (Ochlerotatus) sollicitans* (Walker), *Ochlerotatus (Protomacleaya) triseriatus* (Say), *Ochlerotatus (Ochlerotatus) trivittatus* (Coquillett), *Aedes (Aedimorphus) vexans* (Meigen), *Anopheles (Anopheles) punctipennis* (Say) e *Anopheles (Anopheles) quadrimaculatus* (Say)) mostraram-se capazes de transmitir o parasito para cães não infectados em laboratório (APPERSON; ENGBER; LEVINE, 1989; LOK; WALKER; SCOLES, 2000).

O mosquito *Ae. albopictus* popularmente chamado de mosquito tigre, é conhecido pela sua agressividade e por ter o hábito diurno, vivendo próximo ao ambiente peridomiciliar e recebe atenção por ser incriminado como vetor de diversas doenças. Já foi demonstrado naturalmente e experimentalmente que o mosquito é vetor de alguns arbovírus, agente etiológico de doenças infecciosas como a dengue, febre amarela e uma série de encefalites. Além disso, estudos experimentais mostram que *Ae. albopictus* pode ser vetor de filarídeos como *Dirofilaria repens* e *D.immitis* (APPERSON; ENGBER; LEVINE, 1989; CANCRINI et al., 2003a,b).

Macêdo e colaboradores (1998) destacam a grande competência vetorial de *Oc. scapularis* (Diptera: Culicidae) na transmissão de *D. immitis*. Esta espécie silvestre é considerada muito

abundante no Brasil e apresenta capacidade de colonização do ambiente doméstico e peridoméstico, podendo utilizar uma grande amplitude de tipos de criadouros (SANTOS, 1996). As fêmeas de *Oc. scapularis* são muito vorazes, insistentes em obter sangue, oportunistas e apresentam um pico de atividade no crepúsculo vespertino, podendo, no entanto, atacar indiscriminadamente, de dia ou à noite. *Oc. scapularis* foi considerado vetor local da *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877), em inquéritos realizados em Santa Catarina (Praia do Forte), na década de 1950 (RACHOU, 1956). Neste trabalho o autor comenta que exemplares desta espécie foram encontrados albergando larvas infectivas deste helminto, mas tratava-se de uma área de elevada endemicidade desta filariose mantida à custa do seu vetor primário o *Cx. quinquefasciatus*. *Oc. scapularis* deve ter se infectado apenas de forma ocasional e deve ser um vetor muito extraordinário do patógeno. Outra hipótese mais provável seria que as larvas de *W. bancrofti* foram confundidas com larvas de *D. immitis*, haja visto que era realizada apenas a identificação visual das larvas.

Segundo Ahid & Lourenço-de-Oliveira (1999) ainda são desconhecidas as espécies de culicídeos vetores de *D. immitis* em grande parte dos estados brasileiros. Este fato sinaliza a necessidade do preenchimento das lacunas do conhecimento neste importante grupo de Dípteros. Implicações sociais, médicas e veterinárias começaram a ter destaque a partir de 1990, sendo atualmente a dirofilariose reconhecida como zoonose ainda não estudada satisfatoriamente (LEITE, 2005).

Os cães são considerados os hospedeiros naturais do parasito, no entanto, outras espécies de mamíferos de diferentes ordens já foram encontrados infectados, dentre os quais podemos citar o lobo, coio, raposa, urso, leão-marinho, lontra, macaco, quati, cavalo, veado, gato doméstico e até o homem (KETTLE, 1995).

De acordo com a classificação sistemática proposta por Anderson (2000), *D. immitis* pertence ao Reino Animalia, Filo Nematelminthes, Classe Nematoda, Ordem Spirurida, Superfamília Filarioidea (Weinland, 1858) Stiles, 1907, Família Onchocercidae (Leiper, 1911), Subfamília Dirofilarinae Sandground, 1921, Gênero *Dirofilaria* Railliet & Henry, 1911, espécie *D.immitis* (Leidy, 1856) Railliet & Henry, 1911.

Os adultos de *D. immitis* são vermes filiformes e esbranquiçados. O nome científico do gênero significa a expressão latina “fio cruel” e apresentam acentuado dimorfismo sexual. Os machos medem de 12 a 20 cm de comprimento, possuem sua extremidade posterior afilada em espiral com a presença de pequenas asas caudais, cinco pares de papilas pré-anais e seis pós-anais, espiráculos desiguais e ausência de bolsa ou gubernáculo. As fêmeas podem medir de 25 a 31 cm de comprimento, possuem a extremidade posterior obtusa e a vulva está localizada perto da região posterior do esôfago (FLYNN, 1973; BENIRSCHKE; GARNER; JONES, 1978; KETTLE, 1995).

O ciclo evolutivo do parasito está mostrado na figura 1. As fêmeas de *D. immitis* são ovovivíparas e liberam microfírias (220 - 340 µm de comprimento) na circulação sanguínea, onde podem circular por cerca de 2,5 anos ou até que sejam sugadas do sangue periférico por mosquitos. Após duas semanas da ingestão aproximadamente, as microfírias realizam duas mudas dentro do mosquito. Do intestino médio, elas migram para a hemocele e depois para a luz dos túbulos de Malpighi, onde penetram nas células primárias e ficam alojadas em seu citoplasma. Após o sexto dia de infecção, as larvas saem destas células e realizam duas mudas na luz dos túbulos chegando até o estágio infectivo L3. As larvas L3 migram então para os espaços cefálicos e para a probóscide do inseto e, quando o mosquito pica um hospedeiro em potencial, as larvas infectivas passam ativamente pela probóscide e penetram na pele. Estas larvas

permanecem no tecido subcutâneo e em três dias realizam outra muda, passando para o quarto estágio. Migram então para outros tecidos subcutâneos, adiposos e musculares, onde mudam novamente para o quinto estágio larval. Após 70 a 110 dias aproximadamente, a larva L5 completa a migração somática dentro do tórax do hospedeiro chegando ao estágio adulto, entrando no sistema vascular e perfurando as veias periféricas, chegando até as artérias pulmonares, preferencialmente ficando no interior dos lóbulos do pulmão. Dentro de três meses os adultos se tornam maduros sexualmente (190 dias após a infecção) e, após a cópula, as fêmeas começam a liberar microfilárias na circulação do hospedeiro vertebrado (FLYNN, 1973; BENIRSCHKE; GARNER; JONES, 1978; KETTLE, 1995; SCHREY; TRAUTVETTER, 1998; LOK; WALKER; SCOLES, 2000).

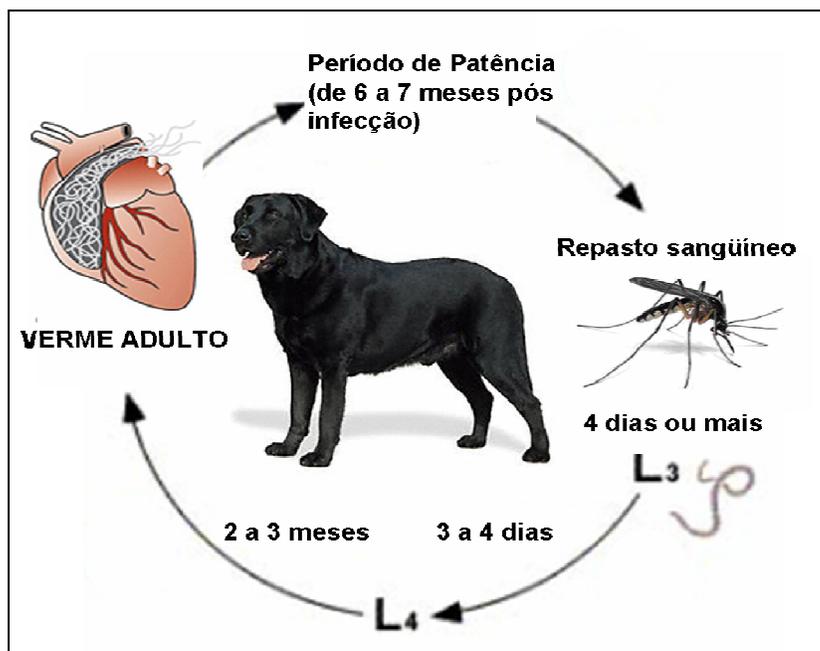


Figura 1. Ciclo de vida do nematóide *D. immitis*.

(Fonte: www.mosquito.org/images/heartworm.jpg. - modificado).

A quantidade de microfilárias no sangue periférico de cães infectados com vermes adultos varia de zero a 100.000 microfilárias por mililitro. A microfílemia varia durante o dia, como

resultado do movimento das microfilárias entre os tecidos profundos e a circulação periférica e provavelmente é uma adaptação para facilitar que os mosquitos se infectem durante o repasto sanguíneo (LOK; WALKER ; SCOLES, 2000). Ambiente, temperatura, luz e tensão de oxigênio nos pequenos vasos e nos pulmões controlam o movimento das microfilárias. Alguns cães podem apresentar vermes adultos no coração e artéria pulmonar, porém não são encontradas microfilárias na circulação. Esse fenômeno é chamado de infecção oculta que pode ser consequência de parasitas de um único sexo, resposta imune do hospedeiro, resultando na redução de fertilidade do parasito ou infecção prepatente (LOK; WALKER; SCOLES, 2000). Filhotes nascidos de cadelas que albergam alta porcentagem de microfilárias podem infectar-se via transplacentária e apresentar uma microfilaremia de caráter transitório que não resultará em infecção por parasitos adultos e normalmente desaparece após dois meses (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

Nos cães, os efeitos patogênicos primários causados pelos vermes são principalmente devidos à interferência no fluxo sanguíneo e na redução da função de bombeamento cardíaco, especialmente pelo fechamento das válvulas do coração. Os sinais variam com o tempo de infecção e a resistência do verme no corpo do hospedeiro e incluem cansaço físico, ascite e anorexia, entre outros. Os vermes, dentro do ventrículo direito e da artéria pulmonar, podem causar endoarterite, hipertrofia do músculo do coração e endocardite crônicas. Secundariamente, em infecções crônicas, pode ocorrer congestão passiva crônica dos pulmões, fígado e baço. Quando os vermes adultos são levados pelo sangue e frequentemente obstruem os vasos produzindo trombos ou servindo de êmbolo no pulmão, podendo causar infarto e embolia. As alterações sistêmicas mais comuns são: o aumento total de proteínas do soro, beta globulinas e

número total de leucócitos (FLYNN, 1973; BENIRSCHKE; GARNER; JONES, 1978; SCHREY; TRAUTVETTER, 1998).

A quimioterapia utilizada nos cães infectados é feita com selamectina, milbemicina, moxidectina e ivermectina como microfilaricidas e a eliminação dos vermes adultos é mais difícil. Entre as complicações da terapia microfilaricida estão às reações anafiláticas do organismo contra os antígenos liberados após a morte das microfilárias. O risco destas reações anafiláticas é maior em pequenos cães (<16kg) com alta densidade de microfilárias (>10,000 microfilárias/ml de sangue). Para prevenir estas reações anafiláticas, o mensuramento da densidade de microfilárias antes do tratamento e o fracionamento das doses de ivermectina em vários dias são recomendados. A terapia adulticida pode ser feita com arsênico trivalente ou com melarsamina dihidroclorido. Estas drogas são as mais eficazes (cerca de 95%) e melhor toleradas do que outras drogas utilizadas. A melarsamina é administrada dentro do músculo lombar e, em comparação com outros agentes adulticidas, é menos hepato-tóxica e nefro-tóxica. Uma das complicações que podem ocorrer após o tratamento adulticida é a tromboembolia, especialmente quando a carga de vermes é alta (SCHREY; TRAUTVETTER, 1998). Por tudo isso, a administração profilática de drogas como ivermectina é a melhor maneira para prevenir a infecção que devem ser administradas durante e depois a temporada dos mosquitos (LOK; WALKER; SCOLES, 2000).

1.2 Epidemiologia e Diagnóstico Molecular

A doença apresenta uma distribuição geográfica muito ampla e sua maior incidência ocorre nas regiões tropicais, subtropicais e focalmente em determinadas áreas de regiões temperadas (SCHREY; TRAUTVETTER., 1998) (Figura 2).

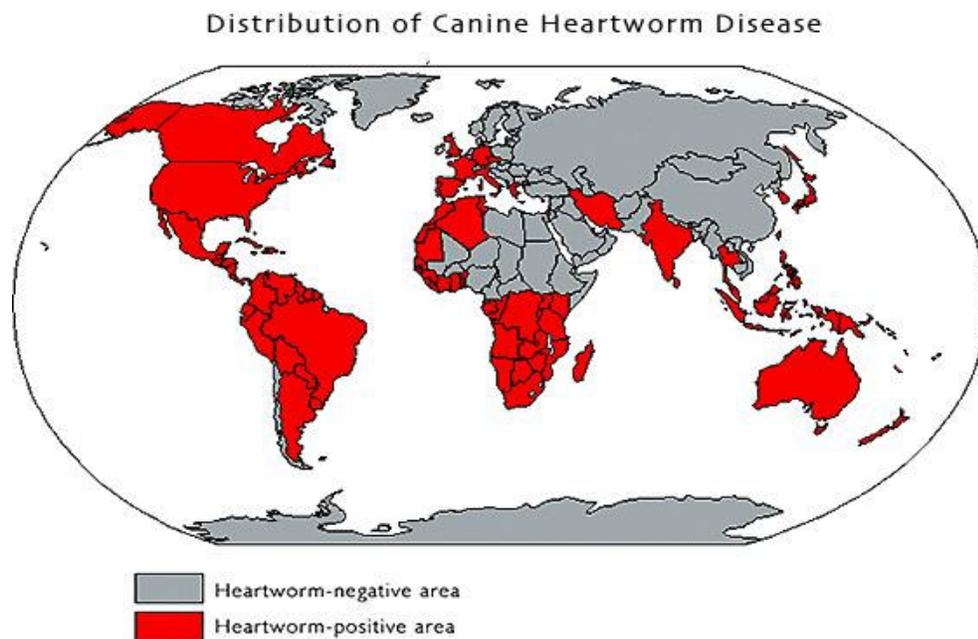


Figura 2: Distribuição geográfica mundial do nematóide *D. immitis*. O parasita ocorre em todas as áreas em vermelho, e não há relatos de sua ocorrência nas áreas em cinza.

(Fonte: cal.vet.upenn.edu/.../images/worldcolorF.gif.)

A dirofilariose é endêmica nos países do sul da Europa, destacando-se em Portugal, Espanha, Grécia, sul da França e Itália, nas Américas, Austrália, Ásia e África. Foi registrada pela primeira vez na Nova Zelândia em 1913 (McKENNA, 2000).

O primeiro pesquisador a relatar a presença de *D. immitis* em um cão foi Osborne (1847). Este helminto foi descrito nos Estados Unidos da América em 1856 como *Filaria immitis* (Leidy,

1856) e mais tarde novamente classificada no gênero *Dirofilaria*. De acordo com Pinto & Luz (1936 apud LEITE, 2005) o primeiro registro de *D.immitis* no Brasil foi de Silva Araújo (1878), descrevendo o achado de quatro exemplares machos na artéria pulmonar, átrio e ventrículo direitos de um cão durante necropsia. Travassos (1921 apud LEITE, 2005) relatou pela primeira vez no Brasil e no mundo a infecção em gatos.

A dirofilariose humana é raramente relatada na literatura científica, principalmente devido à sua difícil diagnose, apresenta-se usualmente como um nódulo pulmonar solitário que mimetiza câncer de pulmão. O primeiro registro de dirofilariose humana no Brasil foi realizado em 1887 por Magalhães no Rio de Janeiro. Desde então, mais de 200 casos de dirofilariose pulmonar humana foram relatados em todo o mundo (MACÊDO; LABARTHE; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998). No Brasil foram descritos 17 casos segundo uma revisão de Rodrigues-Silva et al. (1995), sendo que a cada ano são relatados três novos casos da doença. Em Florianópolis segundo Cavallazzi e colaboradores (2002) já foram relatados sete casos.

Existem poucas informações na literatura, sobre a real situação da distribuição e ocorrência da dirofilariose na América do Sul. Somente em 5 dos 13 países Sul-Americanos têm relatos de prevalência da infecção. No México, a taxa de prevalência parece permanecer estável nos últimos 10 anos (7,3-7,5%). Na Argentina, esta taxa varia de 3,5-12,7%, sendo porém maiores em algumas regiões como Buenos Aires (17,7% - 23,5%). Em Lima, no Peru, a prevalência é de 4,35% e na Colômbia estimou-se entre 3,8-4,8% a taxa de cães infectados. No Chile, de 1056 cães pesquisados nenhum foi encontrado infectado. No Brasil, a prevalência tem diminuído de 7,9% em 1988 para 2% em 2001 (LABARTHE; GUERRERO, 2005).

No Brasil a ocorrência da dirofilariose varia bastante conforme a região devido à extensão territorial e à variação climática. A prevalência estimada é de 1,1% no Rio Grande do

Sul; 12% em Santa Catarina; 21,3% no Rio de Janeiro, 12,4% na Paraíba, 8,8% no Pará, 12,5% em Alagoas e chegando a 75% na Ilha de Marajó. Esses índices podem ser maiores principalmente regiões próximas ao litoral (LABARTHE et al., 1997, 1998b; GARCEZ et al., 2006). Segundo Ahid & Lourenço-de-Oliveira (1999) a prevalência para todo o Brasil é de 9,2%.

Dados significativos sobre esta parasitose no estado de Santa Catarina são escassos. No ano de 2000 foi realizado um inquérito sobre dirofilariose canina na localidade da Lagoa da Conceição, no Município de Florianópolis, utilizando-se o método de Knott e a positividade foi de 15% (ARAÚJO et al., 2003).

O diagnóstico de dirofilariose em cães pode ser feito através de observações morfológicas de microfilárias em amostras de sangue, coradas por métodos histoquímicos (método da fosfatase ácida), imuno-histoquímicos, detecção de antígenos, (PERIBÁÑEZ et al., 2001) e por métodos moleculares. A identificação morfológica de microfilárias não é fácil por várias razões: (1) requer experiência técnica para distinguir diferenças morfológicas sutis em diferentes espécies, (2) em cães tratados incorretamente com drogas preventivas, as microfilárias podem sofrer alterações morfológicas e (3) é muito difícil detectar infecções múltiplas com mais de uma espécie de filária. O que ocorre muitas vezes é que outras espécies de filárias são confundidas com *D. immitis*, superestimando a real prevalência desta infecção (SCOLES; KAMBAMPHATI 1995; LOK; WALKER; SCOLES, 2000).

A diferenciação de microfilárias de *D. immitis* de outras espécies do gênero *Dirofilaria* ou de espécies do gênero *Acanthocheilonema* também é possível pelo método da fosfatase ácida (CHALIFOUX; HUNT, 1971). Mais recentemente, diversos métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos para discriminar entre nematódeos filarióides de cães, baseados na técnica de PCR

espécie específica (FAVIA et al., 1996; MAR et al., 2002; CASIRAGHI et al., 2006; RISHNIW et al., 2006).

Testes imunoenzimáticos (ELISA) são recomendáveis principalmente como uma técnica complementar no diagnóstico da infecção canina, tanto para confirmar a identificação das microfilárias, quanto no diagnóstico dos casos de amicrofilarêmicos que, de acordo com Rawlings et al. (1982), pode ser de até 30%. Porém, existe o problema do aumento dos custos do estudo, mesmo utilizando os testes comerciais, que na sua grande maioria são importados. Contudo, estes testes de ELISA permitem conclusões semiquantitativas sobre a carga parasitária e muitas vezes não detectam a infecção quando o cão apresenta infecção por vermes fêmeas jovens, vermes machos ou infecção causada por um único verme (SCHREY; TRAUTVETTER, 1998).

Representantes de diversos gêneros de nematódeos filarídeos podem ser encontrados nas populações de mosquitos em campo como: *Aproctella*, *Breinlia*, *Brugia*, *Cardiofilaria*, *Conspicuum*, *Deraiphoronema*, *Dirofilaria*, *Foleyella*, *Loiana*, *Molinema*, *Oswaldofilaria*, *Saurositus*, *Waltonella*, *Wuchereria* entre outros. No entanto, distinguir entre espécies próximas destes nematódeos é difícil devido à extrema semelhança entre as larvas infectivas L₃ e têm sido um problema para os pesquisadores. Diversos autores têm construído chaves de taxonômicas para identificar as larvas L₃, incluindo *D. immitis*, no entanto, diferenciá-las não é simples, levando a uma identificação errônea da filaria (SCOLES; KAMBHAMPATI, 1995; LOK; WALKER; SCOLES, 2000; VEZZANI; EIRAS; WISKIVESKY, 2005).

As características morfológicas de 3^o estágio destes filarídeos têm sido a forma mais usual na identificação e reconhecimento das filárias encontradas nos mosquitos, no entanto, neste estágio, as filárias apresentam características que são muitas vezes variáveis entre as espécies

(ex: papila anal) e muitas vezes estas características não são facilmente observadas. Além disso, as técnicas de fixação acabam por alterar a largura e a forma da larva que são características requeridas na maioria das chaves de identificação (LOK; WALKER; SCOLES, 2000).

O tamanho do verme pode ser utilizado na identificação e é utilizado para identificar algumas espécies de *Setelaria* e de *D. immitis*, por exemplo. No entanto, o tamanho desta larva L₃ pode variar ainda com o tamanho do mosquito, com o número de filárias infectando o mosquito, bem como os métodos que são usados para conservar as larvas. Sendo assim, a identificação definitiva pelo tamanho também não é segura (LOK; WALKER; SCOLES, 2000).

A técnica de PCR para o diagnóstico de *D. immitis* no vetor e no hospedeiro definitivo vem sendo atualmente desenvolvida para tentar contornar as dificuldades das técnicas usuais (TAKAHASHI et al., 1996; REDDY; WATTS; COURTENEY, 1999; VAKALIS et al., 1999; LOK; WALKER; SCOLES, 2000, FAVIA et al., 2000, MAR et al., 2002; CASIRAGHI et al., 2006).

A identificação de espécies baseada na detecção por PCR já vem sendo utilizada para *W. bancrofti* em mosquitos (NICOLAS; SCOLES 1997; RAMZY et al 1997; BOCKARE et al., 2000; FARID et al., 2001; GOODMAN et al., 2003; VASULI et al., 2003), *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893) em simulídeos (GUEVARA et al., 2003) e *D. immitis* em mosquitos (SCOLES; KAMBAMPHATI 1995, CANCRINI et al., 2003a). O DNA genômico do parasito pode ser detectado a partir do DNA extraído tanto individualmente ou de *pools* de mosquitos e submetido à técnica de PCR. Usando esta técnica, Nicolas e Scoles (1997) conseguiram detectar filárias de *W. bancrofti* e *D. immitis* em *pools* de *Aedes (Stegomyia) polynesiensis* (Marks) coletados na Polinésia Francesa, indicando que esse mosquito pode servir como vetor destas duas espécies de filárias.

Entre as metodologias existentes, a reação de PCR-RFLP para amplificação de regiões de intergênicas ITS1 e ITS2, localizadas entre o gene 5,8S rRNA podem servir para diferenciar *D. immitis* de *D. reconditum* e têm sido usadas como alvo para análise filogenética pela variabilidade apresentada por essas porções do DNA (NUCHPRAYOON et al., 2006). Ainda, pode-se amplificar regiões gênicas que transcrevem RNA ribossômicos, como por exemplo a região 16S. Os genes para RNA ribossômicos são bons alvos para um ensaio espécie-específico, porque apresentam um número múltiplo de cópias no genoma de uma célula eucariótica e contém regiões únicas de oligonucleotídeos para cada espécie, separadas por regiões conservadas dentro do gênero ou em nível de ordem (ALBERTS et al., 1997; REDDY; WATTS; COURTENEY, 1999; FAVIA et al., 2000; MAR et al., 2002). Outros autores como Casiraghi et al., (2006) utilizaram PCR para amplificar porções do DNA mitocondrial (12S rDNA a *coxI*) com iniciadores gerais para filárias, seguido por digestão por enzimas de restrição. Isto gera um polimorfismo de bandas onde é possível discriminar claramente entre três espécies de filárias (*D. immitis*, *D. repens* e *Dipetalonema reconditum*). Segundo Reddy e colaboradores (1999) é possível amplificar uma quantidade de até 10 pg de DNA genômico de *D. immitis*, em 1µg de DNA de mosquito, que equivale ao encontrar o DNA de uma larva de 3º instar em um “pool” de 29 mosquitos. Recentemente Rishniw e colaboradores desenvolveram uma metodologia por PCR Multiplex, que permite discriminar e diferenciar entre diversas espécies de filarídeos da família Onchocercidae que podem infectar cães como *D. immitis*, *A. reconditum*, *D. repens*, *A. dracunculoides*, *B. pahangi* e *B. malayi* (RISHNIW et al., 2006).

Como já demonstrado para a filariose bancroftiana, o sucesso de um programa de eliminação de filárias de uma área endêmica depende dos cuidados e do monitoramento dos níveis de infecção de reservatórios bem como do vetor e a posterior utilização de medidas de

controle vetorial (NICOLAS; SCOLES 1997; RAMZY et al., 1997; GOODMAN et al., 2003; VASULI et al., 2003).

Neste trabalho, padronizamos a técnica de PCR para detecção da dirofilariose no vetor e nos hospedeiros vertebrados além de aplicar esta metodologia para determinação da taxa de infecção em mosquitos capturados na Ilha de Santa Catarina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Padronização da técnica de PCR para detecção da dirofilariose em mosquitos e em cães e sua aplicação em campo para determinação da prevalência da infecção nos vetores.

2.2. Objetivos específicos

- Padronizar a reação de PCR para diagnóstico de *D. immitis* em mosquitos e cães
- Realizar o seqüenciamento do fragmento do gene da dirofilária amplificado para sua confirmação.
- Testar esta metodologia em algumas áreas da Ilha de Santa Catarina para detecção do parasito em mosquitos.
- Verificar quais espécies de mosquitos apresentam-se como portadores de dirofilária na Ilha de Santa Catarina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras utilizadas na padronização da técnica de PCR

Para a realização da padronização da técnica de PCR no vetor e no hospedeiro definitivo, foram utilizadas amostras de vermes adultos de *D. immitis* que estavam conservadas em álcool e amostras sanguíneas de cães sabidamente infectados, gentilmente cedidos pela Dr^a Maria Lúcia Serrão. Os vermes *Dipylidium caninum*, *Ascaris lumbricoides* e *Taenia sp*, foram obtidos junto a coleção de helmintos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC (MIP). Os mosquitos *Ae. albopictus* utilizados como controles negativos das reações foram criados em insetário do MIP.

3.1.1. Criação de *Ae. albopictus* em laboratório para obtenção dos controles negativos da técnica de PCR.

Exemplares de *Ae. albopictus* capturados junto ao MIP-UFSC, foram mantidos em insetário, dentro de gaiolas de madeira e tela com 50 x 50 x 50 cm. Como alimentação foi oferecido uma solução 10% de açúcar comum. Dentro da gaiola era colocado um frasco forrado com papel filtro para a oviposição das fêmeas. Posteriormente, o papel com os ovos era colocado para secar em estufa 37°C por 24 horas (U.75%). Os ovos obtidos eram submersos em água para eclosão das formas imaturas. As formas imaturas foram transferidas para recipientes plásticos contendo cerca de 1 litro de água dechlorada, substituída duas vezes por semana e alimentadas diariamente com ração para peixes (Tetramin®) até alcançar o estágio de pupa. As pupas então, mantidas na água, foram transferidas para as gaiolas dos adultos para posterior emergência .

3.2. Extração de DNA

As amostras de vermes, de mosquitos e de sangue de cães, tanto dos controles positivos e negativos das reações, foram submetidas a dois protocolos de extração de DNA: o método do fenol/clorofórmio, descrito por Sambrook et al., (2001) e o método de lise alcalina descrito por Collins et al.(1987). Foram realizados experimentos prévios para comparar a qualidade de DNA obtido a partir dos diferentes tipos de amostras e posteriormente decidiu-se optar pelo primeiro protocolo para a extração de DNA de vermes e de sangue de cães e o do segundo protocolo para extrair o DNA dos mosquitos.

3.2.1. Extração de DNA do sangue de cães e de *d. immitis* adultos (protocolo 1)

O DNA dos vermes utilizados nos experimentos e do sangue dos cães foi extraído pelo método do fenol/clorofórmio (SAMBROOK et al., 2001). As amostras foram retiradas do álcool 70% e homogeneizadas com auxílio de um pistilo estéril em 250 µl/µl tampão de extração (10mM Tris pH 7, 4, 10mM NaCl, 25 mM EDTA e 1% SDS), acrescido com 20 µl/µl de proteinase K e incubado à 42°C por 12 horas. Após sucessivos passos de extração com fenol, fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo ao qual se acrescentou 1/10 do volume total de uma solução 3M de acetato de sódio pH 5,2 e 2,5 vezes o volume total de etanol P.A. gelado para precipitação dos ácidos nucléicos. Após incubação por 15 min a 4°C, o material foi centrifugado por 40 min a 14.000 x g, o sobrenadante foi descartado

e o DNA lavado duas vezes com 500 µl de etanol 70% gelado, através de centrifugação por 10 min a 14.000 x g em temperatura ambiente. O DNA foi então resuspenso em 50µl de tampão TE (50mM Tris-HCL, 10mM EDTA), tratado com 2 µl de RNase (10 µg/ml) por 2 horas a 37°C e dosado em espectrofotômetro Biophotometer[®] (Eppendorf, Hamburg), onde a pureza das amostras determinada pela relação da absorbância a 260/280nm. As amostras de DNA não utilizadas nos ensaios foram armazenadas a -20°C para posterior utilização (SCOLES; KAMBHAMPATI, 1995, VAKALIS et al 1999).

3.2.2. Extração do DNA total dos mosquitos (Protocolo 2)

O DNA dos mosquitos foi extraído conforme a técnica descrita por Collins et al.(1987). Os mosquitos coletados em campo foram retirados do etanol 70% para a retirada das patas e das asas, foram em seguida, agrupados em *pools* de dez espécimes por tubo em média e colocados em frascos de microcentrifuga (Eppendorf[®]) rotulados, juntamente com 250µl de tampão de maceração (0,08 M NaCl, 0,16 M sacarose, 0,06 M EDTA, 0,1 M Tris-HCl pH 9,0 e 0,5% Sódio-Duodecil-Sulfato- SDS). Esta solução era filtrada em um filtro de 0,2µm, aquecida por 1 hora a 65°C e acrescida de proteinase K na concentração final de 100µg/ml. Os mosquitos foram então macerados, com auxílio de um bastão de polipropileno acoplado a um macerador automático (KONTES[®]), até que não houvessem mais partes identificáveis dos mosquitos. Durante a maceração, adicionou-se mais 250µl de tampão de maceração. Toda a maceração era realizada em banho de gelo. Os tubos eram centrifugados por alguns segundos, para que nada ficasse preso às suas paredes. Os frascos eram então colocados em banho-maria a 65°C por 30 min para a digestão das proteínas.

Enquanto os frascos ainda estavam quentes, adicionava-se 65µl a 100µl de uma solução de 8M de acetato de potássio até alcançar a concentração final de 1M e procedia-se uma leve agitação no tubo. Posteriormente o material era incubado em gelo por 30 min. O sal promove a precipitação das partes não lisadas dos mosquitos e outros materiais insolúveis, assim como as proteínas desnaturadas.

Os tubos eram então centrifugados a 14.000 x g por 15 min e, com auxílio de uma pipeta, o sobrenadante era transferido para outros frascos de microcentrífuga previamente rotulados, cuidando para não transferir o precipitado. Adicionava-se então 200µl de etanol 100% gelado, misturava-se invertendo os frascos repetidas vezes e incubava-se posteriormente à temperatura ambiente por 15 min para a precipitação do DNA.

Os tubos eram novamente centrifugados a 14.000 x g por 20 min em centrífuga refrigerada a 4°C. Instantaneamente após a centrifugação, com auxílio de uma pipeta, descartava-se cuidadosamente o sobrenadante. O DNA nesta fase apresentava-se como um precipitado escuro no fundo do frasco. Adicionava-se 200µl de etanol 70% e centrifugava-se por 5 min à 14.000 x g para lavar o precipitado. Retirava-se em seguida o sobrenadante e adicionava-se novamente 200µl de etanol a 100%. Centrifugávamos novamente a 14.000 x g por 5 min e, após retirar todo o sobrenadante, os tubos eram colocados virados com a boca para baixo sobre uma toalha de papel por cerca de 30 min para a completa evaporação do álcool.

Após secos, o DNA era dissolvido em 200µl de tampão TE (100 Tris-HCl pH 8,0 e 10mM EDTA pH 8,0), adicionávamos 1 unidade de RNase livre de DNases no frasco, agitava-se gentilmente o frasco para dissolver o precipitado era incubado em gelo por 15 min ou até a completa dissolução do DNA no tampão.

3.3. Dosagem e avaliação da quantidade do DNA extraído

A pureza e quantidade do DNA extraído, tanto pelo método do fenol clorofórmio como pelo método de Collins et al. (1987), foi determinada por espectrofotometria em um aparelho Biophotometer[®] (Eppendorf, Hamburg), observando-se a absorvância em 260 e 280 nm, bem como a relação 260/280, conforme descrito por Sambrook e colaboradores (2001). O DNA extraído foi também quantificado por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE-1X. Após a diluição das amostras de DNA extraído em tampão de aplicação (xilenocianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25% e ficol 15%), as amostras foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese por aproximadamente 40 min a 100V (60mA) em TBE 1X(45mM Tris-borato, 1mM EDTA). Após a eletroforese, o gel foi corado em uma solução a 0,01% de brometo de etídio e revelado por exposição à luz UV em um transiluminador MacroVue UV20[®] (Hofer, San Francisco), sendo os resultados documentados na forma digital (SAMBROOK et al., 2001).

3.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

3.4.1. Detecção do DNA de *D. immitis* em mosquitos e no sangue de cães através da Técnica da PCR

A detecção de DNA de *D. immitis* nos mosquitos e no sangue de cães, foi realizada utilizando-se os iniciadores espécie-específicos descritos por Scoles & Kambhampati (1995), Diro-Forward (5'-ACGTATCTGAGCTGGCTCAC-3') e Diro-Reverse (5'-

ATGATCATTCCGCTTACGCC-3') (OPERON, Alameda. CA), O tamanho do produto amplificado, esperado com estes iniciadores, é de 378 pares de bases e são dirigidos contra um gene de antígeno de superfície da cutícula do parasito.

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 20 µl contendo 200mM de uma mistura de dNTPs (dTTP, dATP, dCTP, dGTP) (Gibco Life Technologies), 25 pmol de cada iniciador, uma unidade de Taq DNA polimerase (Cenbiot, Porto Alegre) e 1-3µl de DNA obtido do *pool* de mosquitos. Como controle positivo, 10 pmol de DNA de *D. immitis* obtido de verme adulto foi adicionado à reação e como controles negativos, DNA extraído de mosquitos *Ae. albopictus* não infectado ou água.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf modelo “Mastercycler Gradient” seguindo o seguinte perfil de amplificação: desnaturação inicial de 4 min a 95°C, ligação dos iniciadores a 55°C/1 min, extensão a 72°C/1 min, seguido de 25 ciclos 95°C/1 min, 55°C/1 min, extensão a 72°C/1 min e um ciclo final de extensão a 72°C/5 min (SCOLES; KAMBHAMPATI, 1995; RABINOW 1997; VAKALIS et al., 1999; SAMBROOK et al., 2001).

3.4.2. Teste dos 12 tampões

Durante a padronização da reação da reação da PCR foram definidas as concentrações ideais de cloreto de potássio (KCl), Cloreto de magnésio (MgCl₂) e do pH do tampão a ser utilizado na reação. Para tanto, foram utilizados 12 tampões, cujas formulações estão demonstradas na Tabela 1. Nestes experimentos, utilizou-se de uma quantidade de 30 ng de DNA extraído de um verme adulto de *D. immitis*.

Tabela 1: Formulação dos 12 diferentes tampões utilizados nas otimizações da técnica de PCR para amplificação do gene da *Dirofilária*.

Tampão	Tris-HCl pH 8,3	Tris-HCl pH8,8	Tris Hcl pH 9,2	Mg Cl ₂	KCl
1	100mM	-	-	15mM	250mM
2	100mM	-	-	15mM	750mM
3	100mM	-	-	35mM	250mM
4	100mM	-	-	35mM	750mM
5	-	100mM	-	15mM	250mM
6	-	100mM	-	15mM	750mM
7	-	100mM	-	35mM	250mM
8	-	100mM	-	35mM	750mM
9	-	-	100mM	15mM	250mM
10	-	-	100mM	15mM	750mM
11	-	-	100mM	35mM	250mM
12	-	-	100mM	35mM	750mM

(adaptado do kit Opti-Prime®-Stratagene, La Jolla).

3.4.3. Avaliação da capacidade de detecção de DNA de *D. immitis* através da técnica de PCR na presença de DNA de mosquito e de sangue de cão.

Neste ensaio foi utilizado DNA extraído de vermes adultos de *D. immitis*, DNA de sangue de cão não infectado, DNA de mosquito *Ae. albopictus* não infectados e visou avaliar a capacidade de detecção do gene da dirofilária na presença de excesso de DNA de mosquito e de cão. Diferentes quantidades de DNA de mosquito e de sangue de cão, ambos não infectados foram misturadas com DNA de *D. immitis* e procedeu-se a técnica de PCR conforme descrito anteriormente.

3.4.4. Ensaio de variação do gradiente de temperatura de ligação dos iniciadores DIRO-F e DIRO-R

Este ensaio foi realizado com a finalidade de verificar a melhor temperatura de ligação dos iniciadores. Para tanto, foi utilizada uma quantidade fixa de 10pg de DNA de dirofilária nas reações de PCR, onde a temperatura de ligação dos indicadores variou de 50°C a 60°C.

3.4.5. Ensaio de sensibilidade dos iniciadores DIRO-F e DIRO-R

No ensaio de sensibilidade foram utilizadas concentrações decrescentes de DNA de dirofilária de 1 ng até 100fg, para avaliar a sensibilidade máxima dos iniciadores DIRO-R e DIRO-F na amplificação do gene do parasito.

3.4.6. Ensaio de especificidade dos iniciadores DIRO-F e DIRO-R

Neste experimento, utilizou-se DNA de diferentes espécies de vermes e mosquitos que tiveram seu DNA extraído e utilizado na técnicas de PCR, para verificar a ocorrência de bandas inespecíficas.

3.5. Purificação dos produtos de PCR

Iniciadores e DNTP's não incorporados foram eliminados dos produtos de amplificação utilizando-se inicialmente numa precipitação com isopropanol 70% e centrifugação a 9000 x g por 45 min a 4°C, seguido de lavagem com etanol 70% gelado e centrifugação a 9000 x g por 20 min a 4°C. O produto de PCR purificado foi reidratado em 13µl de água purificada. A perda no processo de purificação foi avaliada pela análise dos produtos de PCR em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizado em transluminador MacroVue UV[®] (Hoefer, San Francisco), sendo os resultados documentados na formadigital.

3.6. Eletroforese em géis de agarose

Alíquotas de 3µl de cada amostra amplificada foram misturadas a 3µl do tampão de amostra 2X (azul de Bromofenol a 0,25%, ficol a 15% p/v em água ultrapurificada) e aplicadas em gel de agarose 1,5% e submetidas à eletroforese (100V/90min) em tampão Tris-Borato-EDTA 1X (TBE, tris-HCL 0,09M, ácido bórico 0,09M e EDTA 0,002M). A seguir o gel foi corado em Brometo de Etídeo e as bandas visualizadas em transiluminador MacroVue UV 20[®] (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco), fotodocumentado e analisado para presença ou ausência de bandas.

3.7. Seqüenciamento do fragmento do gene específico da cutícula de *D.immitis*

O seqüenciamento dos produtos de PCR (378pb) foi realizado em um equipamento *Megabace*[®] *DNA analylis System* (GE/ Amersham Bioscience Inc., Uppsala), utilizando-se a reação de seqüenciamento com o *Kit DYEnamic*[®] *ET Dye Terminator* (GE/Amersham Biosciences), conforme especificações do fabricante. Utilizou-se uma concentração entre 50ng a 200ng do produto de PCR como DNA molde, 5,0 pmol de iniciador específico DIRO-F e respectivamente, 4,2 µl *DYEnamic*[®] *ET terminator reagent premix*, em reações de volume final de 10µl em microplacas de 96 orifícios. As condições empregadas na amplificação para a marcação das seqüências foram: 95°C por 25 seg de desnaturação inicial, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg 55°C por 30 seg e extensão a 60°C por 120 seg.

Após a reação de seqüenciamento realizou-se a purificação dos produtos a fim de retirar os dideoxynucleotídeos, deoxynucleotídeos e iniciadores não incorporados. Para tanto foi utilizado isopropanol 70% com posterior centrifugação a 9000 X g por 45 min em temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 150µl de etanol 70% gelado, seguindo-se nova centrifugação a 9000 x g por 15 min a 4°C. Após a centrifugação, descartou-se novamente o sobrenadante e realizou-se uma centrifugação com placa invertida em papel absorvente até que se atingisse a rotação de 450 x g para retirar o excesso de etanol. Após a incubação da placa em estufa a 37°C por 15 min para evaporação de resíduos de etanol, as amostras foram diluídas em 8µl de tampão de aplicação contendo 70% formamida e EDTA 1mM. As amostras foram eletroinjetadas a 2KV por 120 seg e eletrodiluídas 9kV por 1-2 horas. Após eletroforese as seqüências geradas foram analisadas conforme descrito no item 3.9.

3.8. Análise das seqüências obtidas

As amostras foram seqüenciadas em triplicata e as seqüências obtidas foram analisadas no Laboratório de Bioinformática (MIP/CCB/UFSC). A qualidade dos cromatogramas gerados foi analisada através do pacote Phred/Phrap/Consed® sendo consideradas válidas apenas as seqüências com qualidade Phred igual ou superior a 20 (EWING et al., 1998).

O programa Phrap forneceu a seqüência consenso entre os diferentes seqüenciamentos do mesmo produto através da análise da qualidade de cada nucleotídeo aumentando assim a confiabilidade da seqüência obtida. As seqüências consenso geradas foram então comparadas com seqüências disponíveis no banco de dados do Gene Bank, utilizando-se o programa BLAST (ALTSCHUL, GISH, MILLER, et al., 1990, LOS ALAMOS NATIONAL LABORATORY, 2005) para a comprovação da identidade das seqüências obtidas.

3.9. Coletas de mosquitos de campo

Diferentes espécies de mosquitos foram capturados durante o período de março de 2006 à janeiro de 2007 em cinco diferentes localidades da Ilha de Santa Catarina (Figura 3). Os locais de coleta foram: Cachoeira do Bom Jesus, Praia do Forte, Praia dos Ingleses, Jurerê (Olandi) e Horto Botânico da UFSC. Estas localidades foram escolhidas por apresentarem características propícias ao desenvolvimento desta infecção, isto é, população de cães e mosquitos convivendo no mesmo ambiente, temperatura e umidade favoráveis. As coletas foram realizadas no crepúsculo matutino e vespertino, com auxílio de isca humana, isca luminosa e um capturador de castro e fixados em etanol 70%. Os mosquitos, posteriormente foram levados para o

Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC (MIP) para serem identificados com auxílio de uma chave de identificação (CONSOLI; LOURENÇO de OLIVEIRA, 1994). Os exemplares pertencentes a espécies diferentes eram separados em grupos de 10 em média e colocados em frascos de microcentrífuga. O DNA do *pool* de mosquitos foi extraído e a presença de DNA de *D. immitis* foi verificada através da técnica de PCR conforme descrito no item 3.4.

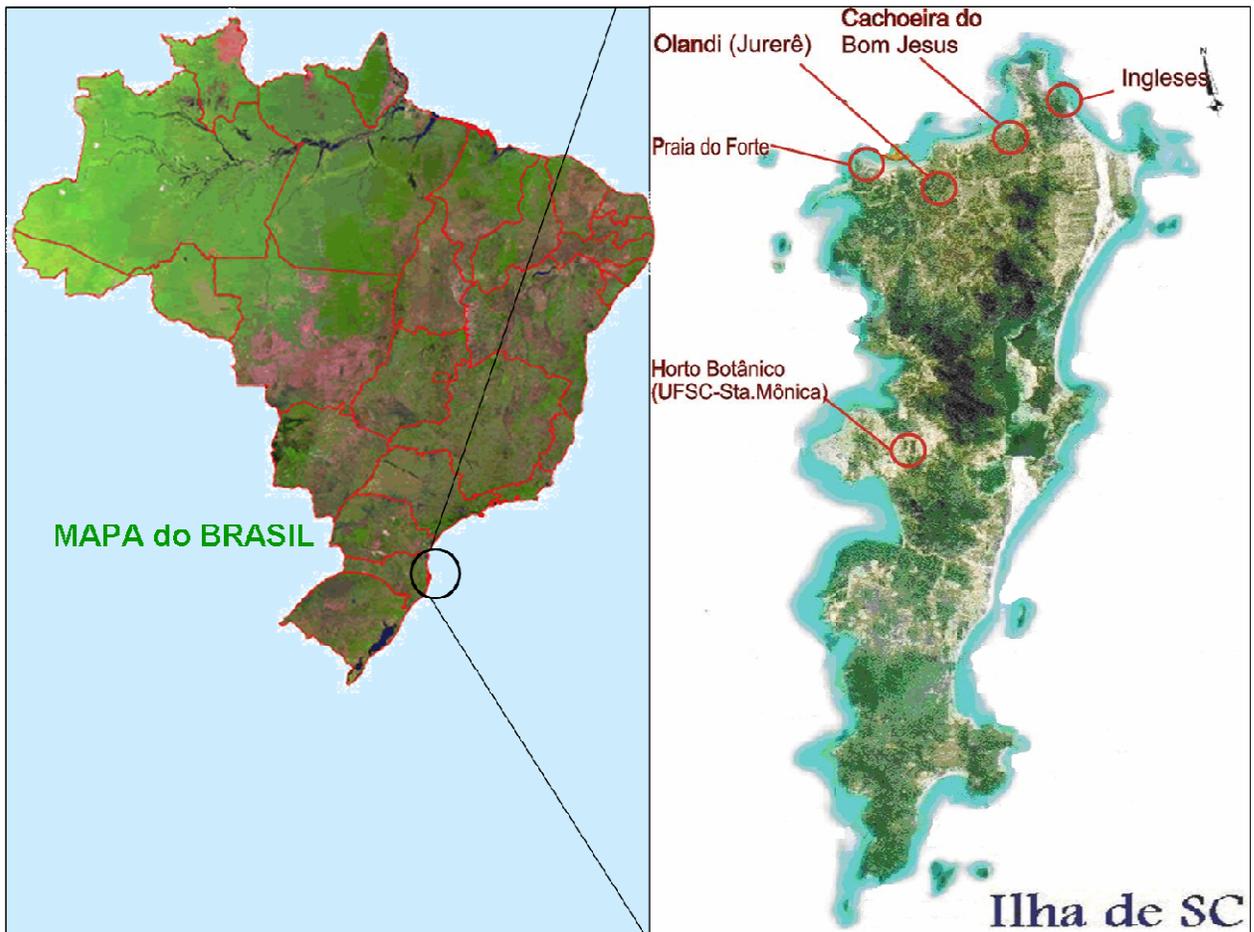


Figura 3: Mapa do Brasil e a da Ilha de Santa Catarina mostrando as localidades onde foram coletados os exemplares de mosquitos. (Fonte: <http://www.terravista.pt/FerNoronha/2907/capital.html> - modificado).

3.10. Cálculo da Taxa de infecção em mosquitos capturados de campo

Por estarem em sua maioria acondicionados em *pool*, calculamos a taxa mínima de infecção dos mosquitos (MIRs- Minimum Infection Rates) que foi obtida pela fórmula: (número de *pools* de mosquitos positivos) / (Número total de mosquitos testados) X 100, esta taxa representa a qual a probabilidade de se encontrar um único mosquito infectado dentre todos os *pools* de mosquitos testados. A taxa esperada de infecção (P) foi obtida pela fórmula; $P: 1 - \sqrt[k]{n/N}$, onde n é o número de *pools* negativos, N o número de *pools* testados e K é o número médio de 10 espécimes em cada *pool* (CINCO et al., 1998; CANCRINI et al., 2003a).

4. RESULTADOS

4.1 Extração de DNA

No protocolo 1 de extração de DNA pelo fenol clorofórmio, utilizado para as amostras de sangue de cão, verme adulto de dirofilária e outros vermes, possibilitou a obtenção de concentrações de DNA de 100ng/ μ l a 1 μ g/ μ l e com grau de pureza de 1.8 a 2.0. de acordo com a leitura em espectrofotometria da relação 260/280 nm. No protocolo 2, utilizado para extração de DNA de mosquitos, as quantidades de DNA chegaram 1 μ g/ μ l com pureza considerada boa, observado a relação de absorbância de 260/280 nm que chegou a 1.8 e 2.

4.2 Padronização da técnica de PCR

4.2.1 Determinação das condições térmicas da reação em cadeia da polimerase para a amplificação do fragmento de 378pb utilizando os iniciadores DIRO-F e DIRO-R

Ao iniciarmos o processo de padronização foram utilizadas as temperaturas propostas por Scoles & Kambhampati (1995). O ciclo de amplificação consistia em uma desnaturação inicial de 94° C por 4 min, seguida por 90° por 1 min Após a desnaturação, a temperatura de ligação dos iniciadores à fita de DNA proposta foi de 55°C por 1 min. Seguida de uma temperatura de extensão de 72°C por 1 min A repetição deste ciclo foi de 40 vezes, sendo acrescentado uma extensão final de 72°C por 5 min.

Todavia, os resultados obtidos inicialmente não estavam de acordo com o esperado. A amplificação e visualização de bandas no gel de agarose, não era possível ou eram de intensidade

muito fraca. Resolve-se então realizar uma alteração no perfil de amplificação com a finalidade de melhorar a especificidade e a qualidade da reação. Este novo perfil consistiu de um passo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguidos por 55°C por 1 minuto (para a ligação dos iniciadores) e temperatura de 72°C por 1 minuto para a extensão das novas fitas de DNA. Em seguida procedeu-se a repetição da desnaturação por 1 min e das temperaturas de ligação e extensão das fitas de DNA por 35 vezes, seguidos de extensão final de 72°C por 5 min. Aumentando o tempo de desnaturação inicial em 1 min, maior quantidade de DNA genômico se desnatura e maior é a probabilidade de que os iniciadores possam se ligar ao segmento alvo no passo seguinte.

Os resultados obtidos com este novo esquema de amplificação se mostraram superiores àqueles obtidos anteriormente com o perfil sugerido por Scoles & Kambhampati (1995). Com este novo perfil utilizado, pode-se obter uma boa visualização das bandas em gel de agarose coradas com Brometo de Etídio.

4.2.2 – Determinação do tampão ideal para PCR

Foram testados vários tampões modificando-se a concentração de MgCl₂, KCl e pH. (Tabela 1). Dentre os tampões, a PCR apresentou a melhor visualização das bandas com o tampões 3 e 4. No presente trabalho, optamos por utilizar o tampão 3 como padrão nas reações.

4.2.3 Teste de variação do gradiente de temperatura de ligação dos iniciadores DIRO-F e DIRO-R

Este ensaio foi realizado com a finalidade de avaliar a temperatura ideal de ligação dos iniciadores. Para tanto foi utilizada uma quantidade fixa de 10 pg de DNA de *D.immitis* nas reações. A temperatura inicial de ligação de 50°C e final de 60°C (Figura 4). Foi observado que em todas as canaletas ocorreu a amplificação do fragmento do gene do parasito. No entanto, resolvemos adotar a temperatura de 55°C como padrão de ligação dos iniciadores em todos os experimentos posteriores, pois foi a temperatura média entre as utilizadas.

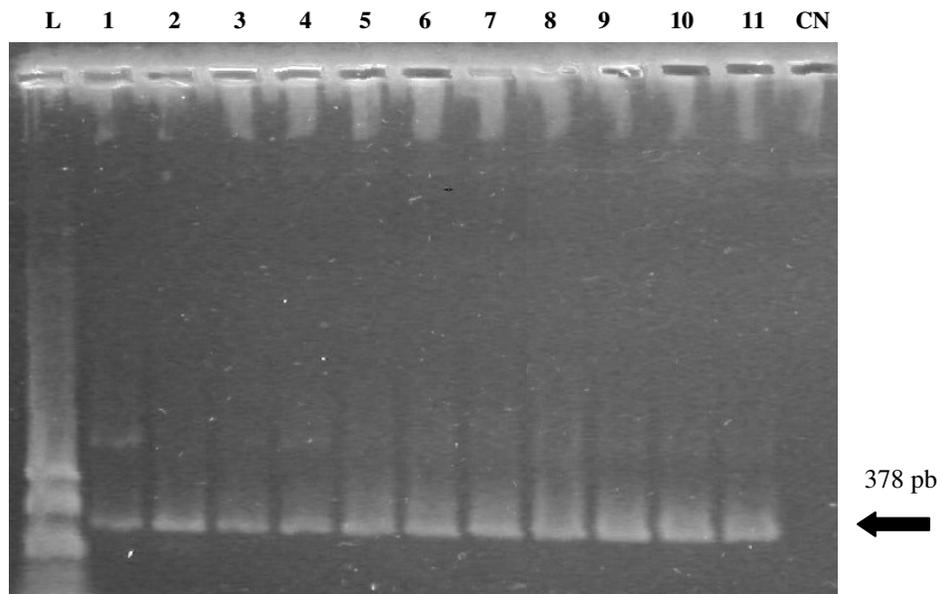


Figura 4– Gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR ensaio de variação do gradiente de temperatura utilizando os iniciadores DIRO-F e DIRO-R e o tampão 3. L-Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido pela HaeIII). **Canaleta-1** DNA de *D. immitis* a 10pg/μl com temperatura de ligação dos iniciadores de 50,0°C. 2- 50,2 °C. 3- 50,7 °C. 4- 51,6 °C. 5- 52,7°C. 6- 54,0 °C. 7- 55,4°C. 8- 56,8 °C. 9- 58,1 °C. 10- 59,2°C. 11- 60°C, CN – Controle negativo (sem adição de DNA).

4.2.4 - Avaliação da capacidade de detecção de DNA de *D. immitis* através da técnica de PCR na presença de DNA de mosquito e de sangue de cão

Os ensaios de reconstituição foram realizados com a finalidade de avaliar a capacidade de detecção do gene do parasito na presença de excesso de DNA do vetor. A partir da realização destes ensaios foi possível visualizar que a técnica de PCR consegue detectar até 10pg/μl de DNA de dirofilária em um excesso de 80ng/μl de DNA de mosquito (Figura 5) e em um excesso de 60ng/μl de DNA de sangue de cão (Figura 6).

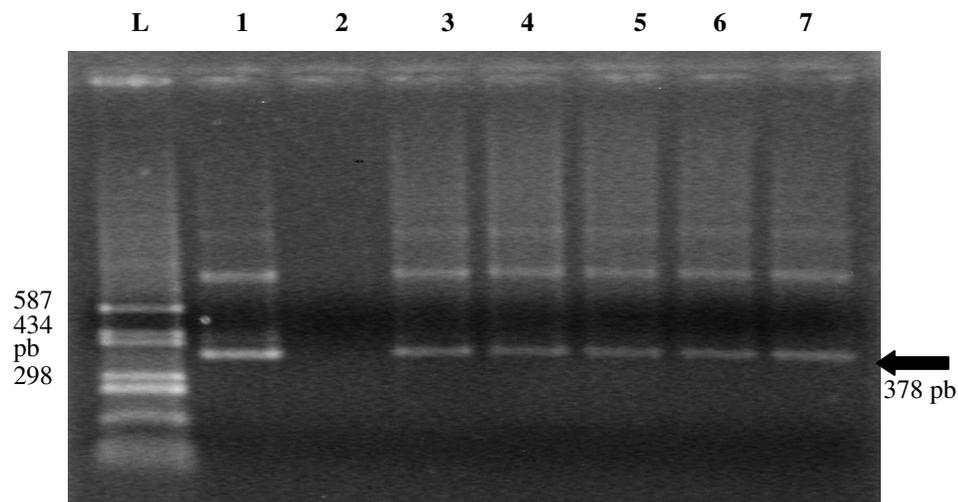


Figura 5- Gel de agarose a 1,5 % corado pelo Brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR de um ensaio de reconstituição com DNA de mosquito. **L** - Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido pela HaeIII).. **Canaleta 1** – DNA de *D. immitis* a 10pg/μl, **2** – Controle Negativo (H₂O). **3** - DNA de *D. immitis* a 10pg/μl acrescido com 10ng/μl de DNA de mosquito *Ae. albopictus* não infectado, **4** - DNA de *D. immitis* a 10pg/μl acrescido com 20ng de DNA de *Ae. albopictus* não infectado, **5**- DNA de *D. immitis* 10pg/μl acrescido com 30ng/μl de DNA de *Ae. albopictus* não infectado, **6** - DNA de *D. immitis* 10pg/μl acrescido com 60ng/μl de DNA de *Ae. albopictus* não infectado, **7** – DNA de *D. immitis* 10pg/μl acrescido com 80ng/μl de DNA de *Ae. albopictus* não infectado .

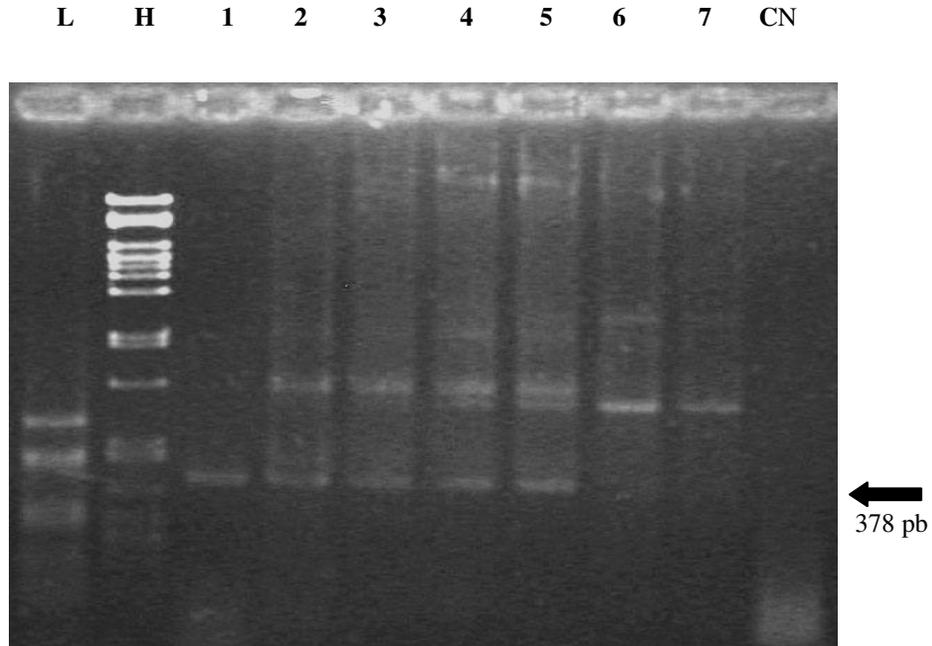


Figura 6 Gel de agarose a 1,5 % corado pelo Brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR de um ensaio de reconstituição com DNA de cão. **L** - Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido pela *HaeIII*). **H** - Padrão de tamanho molecular (fago lambda por *Pst I*). **Canaleta 1** – DNA de *D. immitis* a 10pg/μl, **2** - DNA de *D. immitis* a 10pg/μl acrescido com 10ng/μl de DNA de cão não infectado, **3** - DNA de *D. immitis* a 10pg/μl acrescido com 20ng de DNA de cão não infectado, **4**- DNA de *D. immitis* 10ng/μl acrescido com 30ng/μl de DNA de cão não infectado, **5** - DNA de *D. immitis* 10pg/μl acrescido com 60ng/μl de DNA de cão não infectado, **6** – Controle Positivo- DNA de cão não infectado a 60ng/μl, **7** - Controle positivo- DNA de cão não infectado **8** - CN – Controle negativo (H₂O).

4.2.5 Teste de sensibilidade dos iniciadores DIRO-F e DIRO-R

Para os testes de sensibilidade, amostras de DNA de *D. immitis* foram utilizadas nas reações de PCR em concentrações de 1ng a 100fg. Todas as alíquotas utilizadas, exceto a de 100fg, apresentaram a banda esperada de 378 pb, além de uma banda acessória de aproximadamente 700 pb (Figura 7). Sendo, portanto, o limite de detecção destes iniciadores de 1 pg de DNA do parasito.

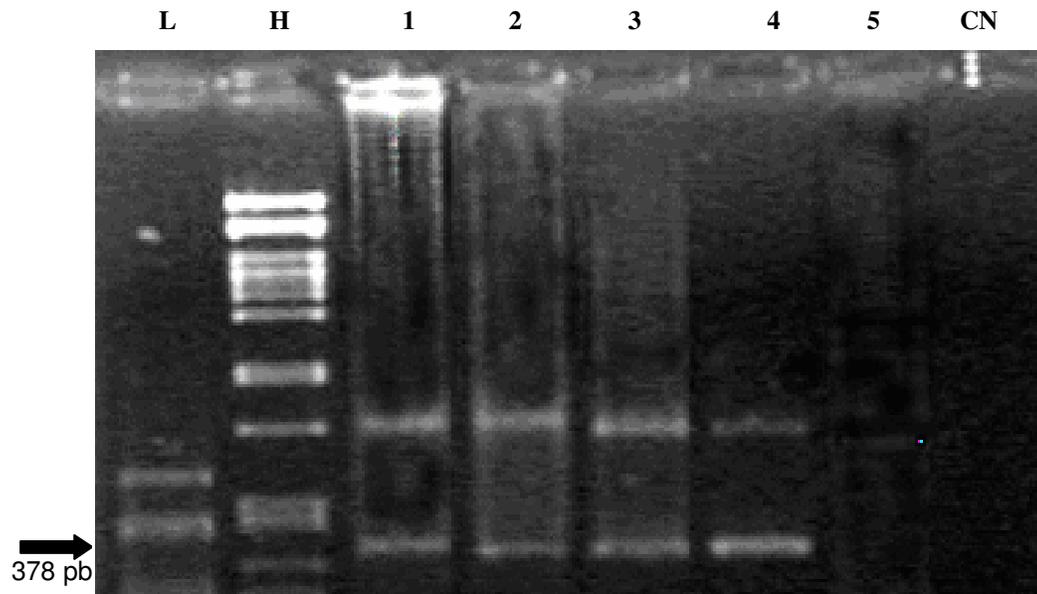


Figura 7– Gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR utilizando os iniciadores DIRO-F e DIRO-R e o tampão 3. **L**-Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido pela HaeIII). **H**-Padrão de tamanho molecular (fago lambda digerido por *Pst* I). **Canaleta 1** – DNA de *D. immitis* a 1ng. **2**- DNA de *D. immitis* a 100pg. **3** - DNA de *D. immitis* a 10pg. **4** – DNA de *D. immitis* a 1pg. **5** – DNA de *D. immitis* a 100fg, **CN** – Controle negativo (sem adição de DNA).

4.2.6 Teste de especificidade dos iniciadores DIRO-F e DIRO-R

Na figura 8, está representado o resultado do teste de especificidade dos iniciadores DIRO-F e DIRO-R, quando utilizado diferentes concentrações de DNA extraídos dos helmintos *D. immitis*, *A. lumbricoides*, *D. caninum* e *Taenia sp.*, além de DNA de mosquitos e de sangue de cão não infectados. Neste ensaio foi possível perceber que a amplificação do gene da dirofilária ocorreu somente na canaleta 7 (DNA de *D. immitis* acrescido de DNA de mosquito) e não houve amplificação de bandas inespecíficas dos outros parasitas testados (canaletas 2-6), comprovando a especificidade dos iniciadores.

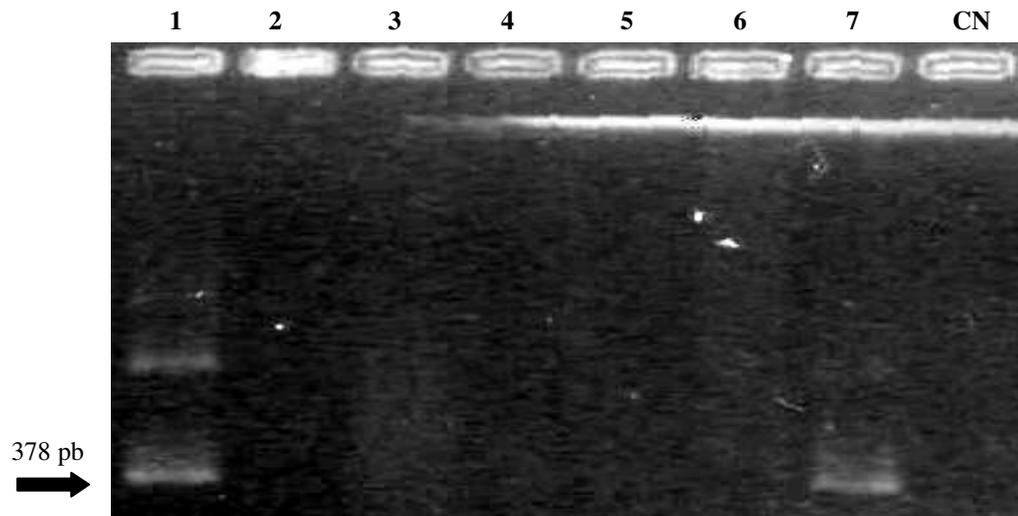


Figura 8 – Gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR de um ensaio de especificidade dos iniciadores DIRO-R e DIRO-F. L- Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido pela HaeIII). **Canaleta 1** – Controle positivo DNA de *D. immitis* a 1ng. **2**- DNA de *Tenia sp.* de cão. a 1ng **3** - DNA *Ascaris lumbricoides* a 1ng/μl. **4** – DNA de *Dipillidium caninum* 10ng/μl. **5**- DNA de mosquito *Aedes sp.* a 10ng/μl. **6**- DNA de cão não infectado por *D. immitis* a 10ng/μl. **7** – DNA de mosquito *Aedes sp.* a 10ng/μl adicionado a 10pg/μl de DNA de *D. immitis*. **CN** – controle negativo sem adição de DNA (H₂O).

4.3. Seqüenciamento do fragmento do gene específico da cutícula de *D. immitis*

Para a realização do seqüenciamento direto dos produtos de PCR foi necessária a purificação prévia das amostras, através da precipitação com isopropanol 70% e etanol 70%. A eficiência do seqüenciamento automatizado de produtos purificados de PCR, utilizando-se os mesmo iniciadores da reação de amplificação, foi considerada satisfatória. Todas as amostras de DNA purificadas puderam ser amplificadas e seqüenciadas.

O resultado o do seqüenciamento do fragmento de PCR de 378 pb gerado está mostrado da figura 9. Na primeira parte da figura está demonstrada a seqüência de nucleotídeos parcial do gene de *D. immitis*. Na parte inferior da figura estão representados os resultados dos

alinhamentos significativos encontrados em comparação com o banco de dados, realizado pelo programa BLASTn.

Seqüenciamento: produto PCR

Contigs:

>6715521.fasta.screen. Contig1

```
TTGAAAGCGAGATACATCAAAATGGATATTCAACCCAACCGTTTTGGTATTATTTGAAAGTTTGACAGGTGAT
AAAAAGAAAAGGCTGCAGAAGAACTTCAACAAGGTTGCTGAATGGCTCTCAGAGAAATCGTTGGGTGATGACA
AGATGCTTGATGTTGAAGGAGCATGAAAGATTCAAGGCGCTGATCCAGAACAAATCAGCATGAAAGTCGAAGATA
TGTGAAACATGTCGTTGACAAGGAATAAAGCAGAACAAGAATTGATGAATATGCTCCTGTATGCCGTA AAAATT
TATGCGGCGATGACTGAACGGCGTAAGCGGAATGATCATAAAACGCC
```

Resultado BLASTn

Sequences producing significant alignments:

gi|1663727|gb|U52967.1|DIU52967 *Dirofilaria immitis* polyprote antigen (dipa) mRNA, partial cds -
Score 385; eValue 6e-104.

gi|156704|gb|M82811.1|DIRHIA *Dirofilaria immitis* cDNA for a highly immunoreactive antigen, partial
sequence- Score 385; eValue 6e-104.

gi|156702|gb|M95173.1|DIRANTTAN *Dirofilaria immitis* cuticular antigen tandem repeats mRNA,

Figura 9: Resultado do seqüenciamento dos fragmentos de PCR de 378pb amplificados pelos iniciadores DIRO-R e DIRO-F. Acima a seqüência gerada delimitada pelos iniciadores DIRO-R e DIRO-F. Abaixo a análise da seqüência encontradas, utilizando o programa BLASTn (portal NCBI) para confirmar a similaridade com outras seqüências de *D. immitis* depositadas no banco de dados.

4.4. Aplicação da técnica de PCR para detecção de *D. immitis* no vetor

4.4.1 Coleta de Mosquitos e taxa de infecção por *D. immitis*

No total foram coletados 400 mosquitos fêmeas de cinco diferentes localidades da Ilha de Santa Catarina, resultado que está representado na Tabela 2. Na localidade da Cachoeira do Bom Jesus foram capturados 136 mosquitos das espécies *Culex melanoconium*, *Mansonia sp.*, *Ae.*

albopictus e *Oc. scapularis*, que foram separados em 10 *pools* por espécie. Na localidade da Praia do Forte, foram capturados: 97 mosquitos das espécie *Oc. scapularis* e somente 1 exemplar de *Ae. albopictus*. Na localidade Ingleses foram capturados 100 mosquitos da espécie *Ae. fulvitorax*. e 7 *Oc. scapularis*. O período de coleta se estendeu de Março de 2006 a Janeiro de 2007, sendo os meses de Outubro, Novembro e Dezembro onde foram capturados o maior número de insetos.

Tabela 2. Número de mosquitos capturados em 5 localidades da Ilha de Santa Catarina

Espécie\Localidade	Praia do Forte	Cachoeira do Bom Jesus	Jurerê (Olandi)	Ingleses	Horto Botânico-UFSC
<i>Oc. scapularis</i>	97	18	10	7	0
<i>Ae. albopictus</i>	1	5	0	0	40
<i>Ae. fulvitorax</i>	0	0	0	100	0
<i>Cx. (Melanoconion)</i>	0	103	0	0	0
<i>Mansonia sp.</i>	0	10	0	0	0
<i>Outras espécies</i>	0	0	9	0	0

A figura 10 representa o resultado do experimento realizado com mosquitos coletados na localidade Cachoeira do Bom Jesus para diagnóstico de dirofilariose. Neste local, assim como nas localidades da praia dos Ingleses, Olandi (Jurerê) e Horto botânico da UFSC, todos os *pools* de mosquitos se mostraram negativos.

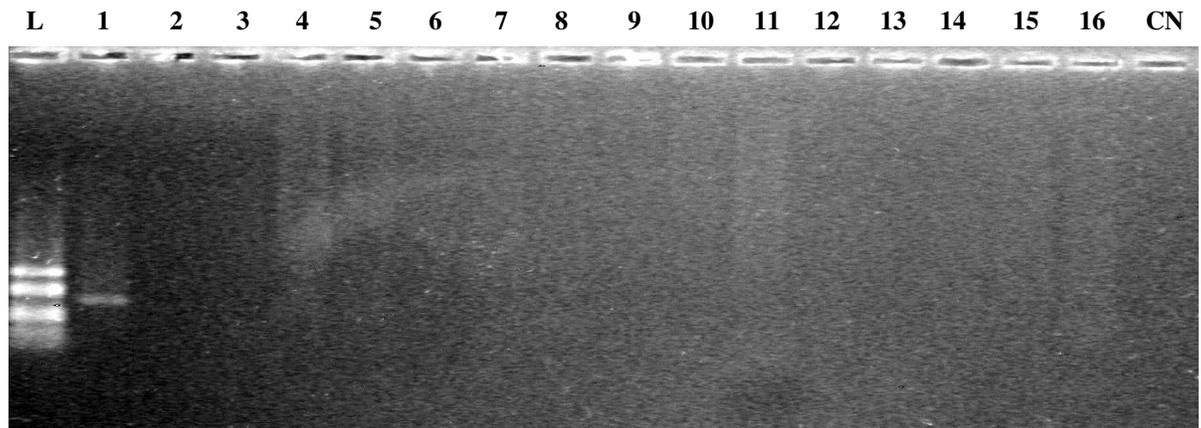


Figura 10. Gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR do experimento teste realizado com os mosquitos coletados em campo da localidade Cachoeira do Bom Jesus para diagnóstico de dirofilariose no vetor. **L** - Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido pela HaeIII) **1**- Controle positivo com DNA de dirofilária a 10 pg. **2-16** Amostra 1-15 (*pool* de mosquitos de 1-15)). **CN**- Controle negativo sem DNA (H₂O).

Na localidade Praia do Forte, um *pool* de mosquitos *Oc. scapularis* se mostrou positivo para *D. immitis* (figura 11).

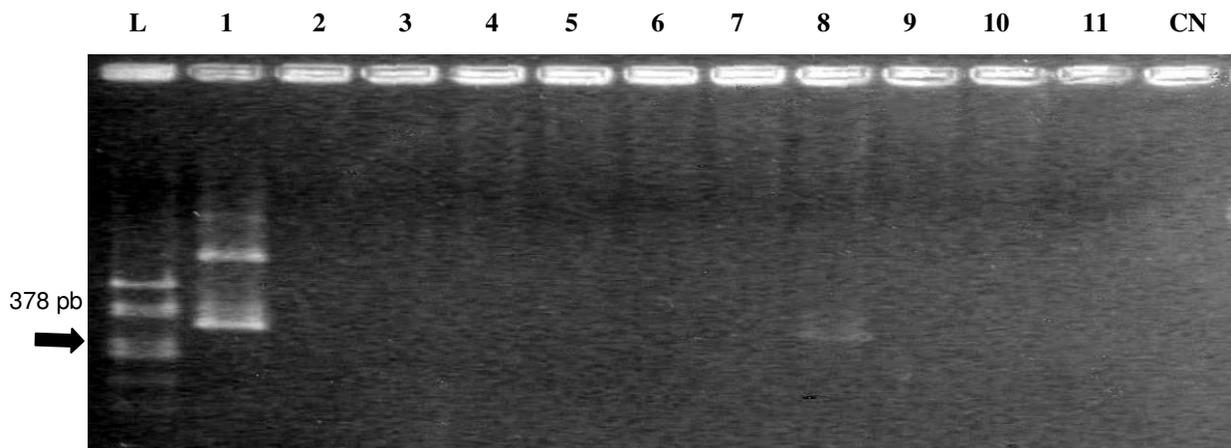


Figura 11. Gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR do experimento teste realizado com os mosquitos coletados em campo da localidade Praia do Forte para diagnóstico de dirofilariose no vetor. **L** - Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido pela HaeIII). **Canaleta 1-Controle positivo** com 10 ng DNA de dirofilária. **2-11**- Amostra de mosquitos 17- 26 (Pool de mosquitos 17-26) coletados na Localidade da Praia do Forte. **CN** - Controle negativo (mosquito *Ae. albopictus* não infectado, criado em insetário).

Com o intuito de confirmar a positividade da amostra 23 da Praia do forte (Figura 11- canaleta 8), os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% corados pela prata, utilizando-se uma concentração de DNA cinco vezes maior que a utilizada no teste inicial (figura 11). A figura 12 apresenta o padrão de bandas obtido para a amostra de um *pool* de mosquitos *Oc. scapularis* da localidade da Praia do Forte considerado positivo. Podemos observar claramente a presença da banda diagnóstica de *D. immitis* na canaleta 3.

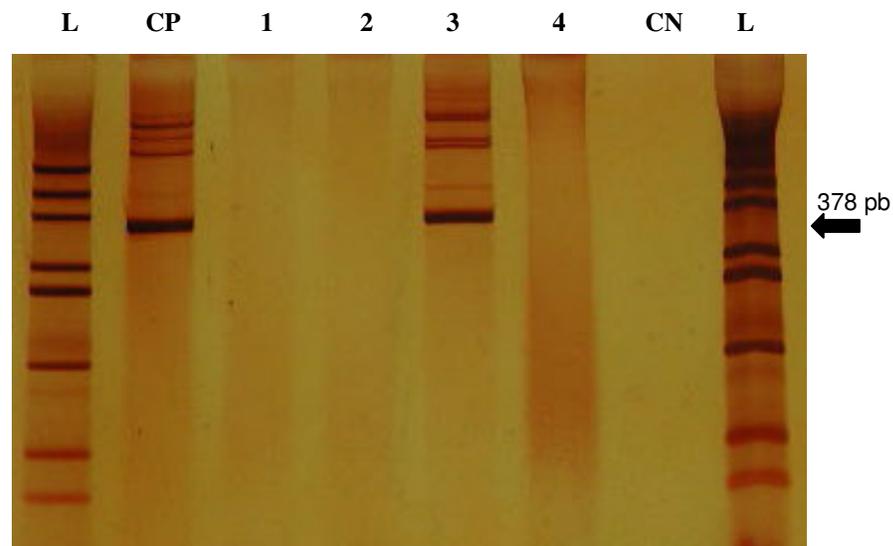


Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado pela prata para confirmação do resultado positivo do Pool 23 (coleta Praia do Forte). **L** - Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido pela HaeIII) **CP**- Controles positivos com DNA de dirofilária a 30 pg. **1**- Amostra 19 (*pool* de mosquitos *Oc.scapularis*). **2** - Amostra 20 (*pool* de mosquitos *Oc.scapularis*) . **3**- Amostra 23 (mosquito *Oc.scapularis*).**4**- Controle negativo DNA de *Aedes albopictus* a 60 ng. **CN**- Controle negativo sem DNA (H₂O). **L** - Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido pela HaeIII) .

A taxa de infecção mínima nos mosquitos (MIRs- Minimum Infection Rates) e a taxa de infecção esperada P ($P < 0,05 = P < 0,01$) foram calculadas de acordo com o item 3.10. Estes valores foram de 0,25 e 0,23% respectivamente. A tabela 3 representa o resultado dos *pools* testados e *pools* positivos para *D. immitis*.

Tabela 3. Detecção de *D. immitis* por PCR em *pools* de mosquitos coletados na Ilha de Santa Catarina

Espécie\Localidade	<i>Pools</i> testados por PCR	Número de <i>Pools</i> positivos	Porcentagem de <i>Pools</i> positivos por localidade
Cachoeira do Bom Jesus	18	0	0
Inglese	11	0	0
Forte	8	1	12,5%
Jurerê (Olandi)	4	0	0
Horto Botânico	3	0	0

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico parasitológico tanto no vetor como no hospedeiro vertebrado apresenta inúmeras dificuldades técnicas, entre elas: a baixa parasitemia, as larvas podem ser confundidas com a de outros filarídeos, além de ser um processo minucioso que necessita de experiência técnica para a identificação das filárias.

O diagnóstico através da técnica de PCR já vem sendo amplamente utilizado no monitoramento da infecção por filariose bancroftiana em áreas endêmicas, em programas globais para a erradicação da elefantíase (BOCKARE et al., 2006; FARID et al., 2001; GOODMAN et al., 2003; VASULI et al., 2003). Diversos trabalhos têm demonstrado que a avaliação da taxa de infecção de filariose em mosquitos através da reação de PCR é um processo mais prático, menos trabalhoso e menos invasivo para os moradores das áreas endêmicas, representando uma nova arma contra esta doença. Além disso, com monitoramento da infecção em mosquitos é possível avaliar a prevalência da infecção e mudanças na transmissão de filariose em períodos relativamente curtos, quando comparado ao período de tempo que é necessário entre a exposição do hospedeiro vertebrado, estabelecimento da infecção e desenvolvimento da doença crônica (NICOLAS; SCOLES 1997; RAMZY et al., 1997; GOODMAN et al., 2003; VASULI et al., 2003).

No presente trabalho, foi padronizado a reação de PCR para a detecção de *D. immitis* em cães e em mosquitos, utilizando iniciadores descritos previamente por Scoles & Kambampathi 1995, onde foi possível detectar um segmento gênico de 378 pb correspondente a um gene de antígeno de superfície deste nematódeo e que foi confirmado pelo seqüenciamento de DNA .

Em uma primeira etapa, diferentes protocolos de extração de DNA foram utilizados e comparados. O método do fenol/clorofórmio proposto por Sambrook et al. (2001) foi mais eficiente para extrair de DNA do sangue de cães e dos vermes, e o método da extração alcalina proposto por Colins et al. (1987) foi mais eficiente para extração do DNA dos mosquitos. Estes dois protocolos mostraram rendimento quali-quantitativamente satisfatório, possibilitando a obtenção de concentrações de DNA de 100ng/ μ l a 1 μ g/ μ l e com grau de pureza 260/280 nm de 1,8 a 2,0. No processo de purificação do DNA a partir do sangue de cão foram encontradas algumas dificuldades técnicas. Muitas vezes obtinha-se uma quantidade elevada de proteína nas amostras e resolveu-se então aumentar o tempo de ação da enzima proteinase K(12 μ g/ μ g) de 12 para 24 horas. Com esta modificação as amostras apresentaram uma boa qualidade para a amplificação por PCR.

Primariamente utilizamos o método do fenol/clorofórmio para extrair o DNA de mosquitos individualmente, no entanto as quantidades de DNA obtidas não ultrapassavam 100ng/ μ l e a relação de pureza de ácidos nucleicos ficava muito abaixo de 1.8. Resolve-se então, partir para o método proposto por Colins et al.(1987). Neste, utilizou-se um tampão de maceração específico para degradação dos mosquitos, conseguindo processar um número maior de espécimes de mosquitos por etapa. As quantidades de DNA por este método chegaram a 1 μ g/ μ l e com grau de pureza 260/280 nm de 1,8 a 2,0, considerado excelente. Este método se mostrou mais vantajoso na extração das amostras de mosquitos, pois além de ser um método mais rápido e prático, não se utilizou fenol, substância química bastante tóxica que inibe a reação de PCR mesmo em quantidades mínimas.

No processo de padronização da técnica de PCR foram realizadas pequenas alterações no perfil de amplificação proposto por Scoles & Kambhampati (1995), que incluíram desde a

mudança da marca das enzimas utilizadas, bem como a metodologia de extração de DNA para mosquitos. Estas alterações visaram melhorar a amplificação das bandas, pois estas estavam fracas e tornando a visualização difícil. No ensaio de gradiente de temperatura dos iniciadores (Figura 4), foi possível observar que a melhor amplificação do gene da dirofilária, ocorreu entre as canaletas 6 e 7, respectivamente 54°C e 55,4 °C. A partir desse momento, resolvemos adotar a temperatura de 55 °C como padrão de ligação dos iniciadores.

Nos ensaios visando avaliar a capacidade de detecção do gene da *D.immitis* nos vetores e nos cães (figuras 5 e 6) pudemos constatar que quantidades de DNA em excesso tanto do vetor quando do hospedeiro definitivo, em concentrações que variaram de 10ng a 60ng de DNA canino e de 10ng a 80ng de DNA de mosquito, não inibem o aparecimento da banda diagnóstica do parasito.

Com a finalidade de testar a sensibilidade dos iniciadores DIRO-R e DIRO-F, foram utilizadas concentrações decrescentes de DNA do parasito que variaram de 100ng a 100fg de DNA (Fig. 7). A sensibilidade máxima foi de 1pg de DNA. Esse resultado sugere que será possível detectar o parasito na corrente sanguínea do cão ou no vetor, mesmo quando presente em número muito reduzido.

A especificidade da reação de amplificação foi testada com o intuito de avaliar a possibilidade de amplificação de bandas aleatórias de outros vermes que podem infectar os cães e também na presença de DNA de cão e de mosquito, o que poderia alterar a eficiência do diagnóstico. Em nossos resultados observamos a presença da banda diagnóstica (378 pb) ao amplificarmos DNA de *D. immitis* na presença de DNA de cão e DNA de mosquito e não observamos bandas quando somente DNA de cão e de mosquito foram utilizados (figura 8). Também não foi possível detectar bandas em outras espécies de vermes utilizados. Entre eles,

Tenia sp. de cão, *A. lumbricoides*, *D. caninum* mostrando a especificidade dos iniciadores. Quando necessário, o DNA de cada amostra foi diluído 1/10 vezes e 1/100 vezes, afim confirmar resultados e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para realização do seqüenciamento, foi necessária a realização inicial da técnica de amplificação do fragmento do gene da dirofilária de interesse através da PCR. No entanto, para que este processo fosse concluído, fez-se necessária a adequação dos protocolos padrões da reação à seqüência alvo a ser amplificada, dos iniciadores e dos tampões utilizados (INNIS; GELFAND; SNINSKY, 1999). Com o intuito de confirmar se o fragmento de 378pb de DNA obtido era específico de *D. immitis*, foi realizado o seqüenciamento dos produtos de amplificação por PCR com equipamento *Megabace® DNA analylis System* (GE/ Amesham Bioscience Inc., Uppsala). As seqüências consenso geradas foram então comparadas com seqüências disponíveis no banco de dados do Gene Bank, utilizando-se o programa BLAST (ALTSCHUL; GISH, MILLER, 1990). A figura 9 representa o resultado do seqüenciamento. A seqüência por nós encontrada apresentou uma similaridade bastante alta com três seqüências depositadas anteriormente (CULPEPPER et al., 1992; POOLE et al., 1992, 1996), sendo que todas correspondem a uma região que codifica para um antígeno de superfície da cutícula de *D. immitis*, confirmado pelos valores de *score* e *e-value*.

Após a padronização da reação de PCR no cão e no vetor, iniciou-se a aplicação da técnica em mosquitos capturados em campo. As áreas litorâneas tropicais e subtropicais podem apresentar alta prevalência de dirofilariose canina. A Ilha de Santa Catarina, em particular apresenta um cenário propício pra o desenvolvimento desta zoonose, isto é, apresenta condições climáticas favoráveis, uma população abundante de mosquitos e de cães convivendo no mesmo ambiente. Araújo et al. (2003) realizando estudos na localidade da Lagoa da Conceição,

examinaram o sangue de 120 cães provenientes Ilha de Santa Catarina e no Canil da Polícia Militar em São José, com as técnicas de Gota Espessa e Teste de Knott modificado, encontrando 12 (10,0%) dos animais positivos para *D. immitis*. Com a intenção de verificar a atual situação da dirofilariose canina na Ilha de Santa Catarina, diferentes localidade foram selecionada para fazer parte do presente estudo por apresentarem condições ao desenvolvimento da doença, citados anteriormente (figura3).

Durante o projeto foram realizados alguns esforços de coleta na localidade da Lagoa da Conceição do período de dezembro de 2007 à janeiro de 2007, no entanto o número de espécimes coletados foi muito baixo, talvez devido à ação do vento que era forte em todos os dias de coleta e por esse motivo resolvemos excluir essa localidade do estudo.

Nas cinco áreas investigadas foi possível detectar na hora das coletas a presença de um número expressivo de espécies de culicídeos, que pode ser explicada por serem localidades com muitas áreas de mata com pouca influência antrópica. Dentre as espécies encontradas, um grande número de mosquitos Sabetíneos, que foram excluídas da pesquisa por serem mosquitos de hábito estritamente silvestres e com pouca importância em saúde pública. Outras Todavia, apresentam relevância maior em saúde pública por serem transmissores de patógenos para o homem e animais, sendo portanto o foco da pesquisa.

Na localidade da Praia da Cachoeira do Bom Jesus, os mosquitos foram capturados junto a um pequeno bosque de mata quaternária, de um colégio municipal. Este ambiente apresentava uma grande área alagada pelas chuvas, havendo também grande predominância de Bromeliáceas que são excelentes criadouros de mosquitos. Foram capturados no total 136 mosquitos e a espécie de mais abundante foi *Culex (Melanoconion)* (Theobald, 1903) com 103 espécimes capturados, 18 *Oc. scapularis*, 5 *Ae. albopictus* e 10 *Mansonia sp.* Os mosquitos do subgênero

Melanoconion, têm sido alvo de atenção de muitos investigadores, pois algumas de suas espécies apresentaram-se parasitadas, especialmente por arbovírus causadores de doenças febris e de encefalites, tanto no Brasil como em outros países. Os *Cx.(Melanoconion)* criam-se em locais muito diversificados (preferencialmente sem salinidade), desde recipientes naturais (como Bromélias) a grandes coleções líquidas no solo (como bolsões de rios, charcos, alagados e lagos) (CONSOLI; LOURENÇO de OLIVEIRA, 1994). Em nossa investigação, no entanto, não foram encontrados mosquitos deste subgênero naturalmente infectados. Na literatura também não existem registros dessa espécie como vetor de *D. immitis* o que é corroborado pelos nossos resultados.

Na localidade da Praia dos Ingleses os mosquitos foram capturados na Rua das Gaivotas, junto a um pequeno córrego e terrenos baldios. Num total foram coletados 107 mosquitos, sendo 100 da espécie *Ae. fulvitorax* e 7 da espécie *Oc. scapularis*.

Ae. albopictus foi capturado em reduzido número em todas as localidades trabalhadas, exceto no Horto botânico da UFSC, onde um morador relatou ter perdido um cão em decorrência da infecção, no entanto nenhum exemplar foi encontrado infectado pelo parasito.

Ae. albopictus é o mosquito vetor de arbovírus, também conhecido como “tigre asiático” devido a sua origem no continente asiático. Apresenta-se como uma espécie exótica no continente americano, na Oceania, na região aleártica e no hemisfério oriental, porém o comércio marítimo de pneus usados permitiu que a espécie fosse disseminada pelo mundo (BORGES, 2001). Na Itália *Ae. albopictus* foi infectado experimentalmente com microfilárias e posteriormente através de análises moleculares foi comprovada a eficiência desta espécie na transmissão natural da *D. immitis* (CANCRINI et al., 2003a).

Outra espécie de mosquito que capturamos em pequeno número nas localidades pesquisadas, provavelmente pelo horário de realização das coletas (7:00-9:00am e das 6:00-8:30pm) e resolvemos excluir do estudo, foi *Cx. quinquefasciatus*. Ahid e colaboradores (2000) estudaram cinco diferentes populações de *Cx. quinquefasciatus*, nas quais a *D. immitis* desenvolveu-se até o estágio infectante, porém a baixa eficiência vetorial associada ao pequeno número de larvas infectantes obtidas demonstrou ser esta espécie ainda considerada como vetor secundário do parasito. No município de Guaratuba (PR), Leite (2005) dissecou 818 de exemplares fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* e não encontrou infecção natural por *D. immitis*. Todavia, em regiões cuja prevalência da doença é alta este processo adaptativo de contato constante do mosquito com animais infectados poderá evoluir para torná-lo vetor efetivo da filária em questão (LEITE, 2005).

No presente estudo, um *pool* de mosquitos *Oc. scapularis* da localidade da Praia do Forte se mostrou positivo pelo exame de PCR (figura 11 e Figura 12). Totalizando uma taxa de 2,3% de *pools* positivos na Ilha de Florianópolis. Se considerada isolada, a localidade da praia do Forte apresenta uma taxa considerada alta de 12,5% de positividade por *pool*. A taxa mínima de infecção (MIRs- Minimum infection Rates) foi de 0,25 e a taxa esperada de infecção (*P*) foi de 0,23%. Nossos achados sugerem que este vetor têm importância primária na transmissão desta parasitose na Ilha de Santa Catarina e suspeita-se que dirofilariose canina deve apresentar focos isolados em algumas localidades da Ilha e/ou deve ter uma variação sazonal muito pronunciada. Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados por Leite (2005), no litoral do Paraná, que encontrou 3 exemplares de *Oc. Scapularis*, infectados naturalmente dentre 982 dissecados (0,3%) com larvas de *D. immitis* no peridomicílio do Bairro COHAPAR II configurando o primeiro

registro desta natureza para o município de Guaratuba, bem como para a região litorânea do Estado do Paraná.

Nas Américas espécies de mosquitos do subgênero *Ochlerotatus* são considerados os melhores vetores desta parasitose (LOFTIN et al., 1995). Conforme Forattini et al. (1995), dentre os culicídeos a espécie *Oc. scapularis* é a que tem demonstrado clara adaptação ao ambiente antrópico, com grande tendência à endofilia e domiciliação. Suas formas imaturas podem desenvolver-se em uma variedade de criadouros temporários ou semipermanentes, sujeitos à regime alternante de inundação e dessecação. São exemplos as valas de drenagem e irrigação, poças de alagamento de rios, terrenos alagadiços, margens de brejos, buracos, impressões no solo deixadas por rodas de veículos e pegadas de animais domésticos. A densidade populacional também pode sofrer acentuada influência de chuvas. Ocasionalmente latas e recipientes plásticos, caixas d'água, vasilhas de água para animais podem ser utilizados como eventuais criadouros. Esta espécie ocorre com maior frequência entre os meses de verão, apresentando atividade hematofágica diurna e noturna, sendo mais intensa durante a noite, e essa atividade pode variar ainda conforme a fase da lua (FORATINI et al 1986, SANT'ANA; LOZOVEI, 2001).

Oc. scapularis demonstrou a sua capacidade vetora e competência veiculadora de *D. immitis* ao ser encontrado naturalmente infectado em algumas regiões do Estado do Rio de Janeiro e em ensaios laboratoriais (LABARTHE et al., 1998a,b). Segundo Labarthe et al. (1998), *Oc. scapularis* é um importante vetor de *D. immitis* no Rio de Janeiro pois, em um inquérito realizado de 1995 a 1996, este mosquito foi considerado melhor vetor do parasito em comparação com *Ae. taeniorhynchus* e *Cx. quinquefasciatus* quando comparou-se densidade populacional, frequência de picadas e distribuição através do ano. GOMES et al. (2003) relataram que este mosquito apresenta preferência alimentar por cães e bovinos, quando comparados com

alimentação em seres humanos e aves. Já Forattini et al. (1989; 1990; 1995) relata que esta espécie tem notada preferência por mamíferos de grande porte, principalmente bovinos e eqüinos, sendo que o próprio homem pode servir como fonte de repasto.

Muitos fatores extrínsecos influenciam diretamente o ciclo de *D. immitis*. As larvas necessitam da umidade para penetrarem ativamente na pele do hospedeiro vertebrado e a população de mosquitos pode mudar sazonalmente. Além disso, alguns estudos mostraram que em algumas ocasiões mesmo onde a densidade da população do vetor era baixa, a taxa de prevalência em cães estava elevada, indicando a complexidade do ciclo de vida deste parasito.

Mosquitos que se alimentam de cães com moderado número de microfilárias na corrente sanguínea frequentemente morrem (LABARTHE et al., 1998b). Para que um mosquito seja considerado melhor vetor dentre outras espécies, primeiramente necessitam sobreviver à infecção pelo verme de modo a suportar o desenvolvimento intrínscico do parasito até o estágio infectivo L3. Barreiras intrínscicas podem evitar o desenvolvimento do parasito no vetor. Estas incluem: o dano que a larva pode causar a armadura cibarial, a presença de cristais de oxihemoglobina formados no intestino médio durante o repasto sanguíneo, aprisionamento da larva em sangue coagulado no intestino médio do mosquito, lise da cutícula da larva pelas células hemocitárias do hospedeiro invertebrado entre outras respostas imunes como a melanização e encapsulamento da larva nos túbulos de malphighi. A melanização da larva parece ser a reação que ocorre em algumas espécies de *Aedes sp.* contra a infecção por *D. immitis* (LABARTHE et al., 1998b).

Araújo comenta em seu trabalho (2003), que no verão, a Ilha de Santa Catarina recebe muitos turistas argentinos que vêm de férias transportando junto seus cães. Existe grande possibilidade de circulação do parasito entre ambas as regiões no verão, pois em algumas localidades próximas a Buenos Aires a taxa de prevalência em cães pode chegar a 60%. Na

região litorânea do Paraná Refuir et al (2004) examinaram 256 amostras de sangue de cães através das técnicas de Exame Direto, Teste de Knott modificado, Teste de Filtração e Teste de ELISA, comprovando a existência de *D. immitis* em 14 cães de 11 regiões do litoral paranaense. Todavia a prevalência não está uniformemente distribuída através da costa e em geral a prevalência é baixa (5,47%), existindo alguns locais onde a prevalência é elevada como: Guaraqueçaba (20,6%) e Ilha das Peças (15,0%).

No Brasil, nos últimos 14 anos a prevalência nacional parece ter declinado de 7,9% em 1988 para 2% em 2001. Muitas investigações têm sido realizadas regionalmente através do país, evidenciando variações de um lugar para outro e constataram uma redução da prevalência de dirofilariose no estado do Rio de Janeiro de 21,34% em 1990 para 3,8% em 2003, bem como na região de Itacoatiara e Niterói com diminuição de 37% para 15% e 43,4% para apenas 0,6% respectivamente (LABARTHE; GUERRERO, 2005). Machado (2005), na região da grande Florianópolis, relatou que obteve 100% de negatividade ao examinar 138 cães pelo método Knott modificado. Entre as causas que são apontadas para o declínio na prevalência estão: o decréscimo da população de mosquitos devido a melhores programas de controle e o uso indiscriminado de ivermectina injetável de formulações para bovinos que são amplamente utilizados pelos veterinários e donos dos cães. Acredita-se que estas injeções periódicas de tetraciclina apresentam ação preventiva contra a dirofilariose, por causarem a redução da capacidade reprodutiva e sobrevivência dos vermes adultos. Contudo, esse uso abusivo de ivermectina parece eliminar as microfírias em todos os cães infectados que recebem a droga, assim sendo contribui para a redução do número de cães microfilarêmicos e para a taxa de infecção das populações de mosquitos (LABARTHE; GUERRERO 2005).

Nós acreditamos que a utilização desta técnica para detecção de dirofilariose em mosquitos de campo e em cães, aliados aos métodos tradicionais, serão de grande importância para o monitoramento da infecção em programas de controle epidemiológico desta parasitose.

6. CONCLUSÕES

- O mosquito *Oc. scapularis* pode ser o principal responsável na transmissão de dirofilariose na Ilha de Santa Catarina, pois na localidade da Praia do Forte foi encontrado um *pool* de mosquitos positivo, dentre oito testados (12,5% de *pools* positivos). Indicando que nesta localidade pode existir um foco localizado da doença.
- Nós acreditamos que a utilização desta técnica para detecção de dirofilariose em mosquitos de campo e em cães, aliados aos métodos tradicionais, serão de grande importância para o monitoramento da infecção em programas de controle epidemiológico desta parasitose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHID, S. M. M. & LOURENÇO-OLIVEIRA R. Mosquitos vetores potenciais da dirofilariose canina no Nordeste do Brasil. **Rev. Saúde Pub.** v. 33, 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*. State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 95,n.6, p. 769-775, 2000.
- ALBERTS B. BRAY D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J. Tecnologia de DNA recombinante *In. Biologia Molecular da Célula.* 3a edição, Ed. Artes Médicas, Porto Alegre-RS, 1997.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W.; LIPMAN, D.J. Basis local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n.3, p. 403-410, 1990.
- ALVES, L.C., ALMEIDA SILVA, L.V., FAUSTINO, M A. G., MCCALL, J.W., SUPAKONDERJ, P. LABARTHE, N.W., SANCHEZ, M. & CAIRES, O. Survey of Canine Heartworm in the City of Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.95,n.5, p. 587-590, 1999.
- ANDERSON, R. C. **Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission.** CAB International . Second Ed. Wallingford, U.K. 2000.650 pp.
- 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.
- ARAÚJO, R. T., MARCONDES, B. C., BASTOS, L.C. & SARTOR, D.C. Canine dirofilariosis in the region of Conceição Lagoon, Florianópolis, and in the Military Police Kennel, São José, State of Santa Catarina, Brazil. **Veterinary Parasitology.** v. 113, p.239-242, 2003.
- BENIRSCHKE, K., GARNER, F.M & JONES, T.C. **Pathology of animals. Vol. II.** New York: Springer-Verlag. 2171, 1978.

- BOCKARE, M.J., FISHER, P. WILLIAN, S. A., ZIMMERMAN, P.A., GRIFFIN, L., ALPER, M.P., KAZURA, J.W. Application of polymerase chain reaction-ELISA to detect *Wuchereria bancrofti* in pools of wild-caught *Anopheles punctulatus* in a filariasis control area in Papua New Guinea. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.63, p. 363-367, 2000.
- BORGES, S. M. A. A. Importância epidemiológica do *Aedes albopictus* nas Américas. São Paulo, **Faculdade de Saúde Pública da USP** (Dissertação). 2001.
- CANCRINI, G., FRANGIPANE DI REGALBONO, A., RICCI, I., TESSARIN, C., GRABIELLI, S., PIETROBELLI, M. *Aedes albopictus* is natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. **Veterinary Parasitology**. v. 118, n.3-4, p. 195-202 ,October 2003(a).
- CANCRINI, G., ROMI, R., GABRIELLI S., TOMA, L., DI PAOLO, M., SCARAMOZZINO, P. First finding of *Dirofilaria repens* in a natural population of *Aedes albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**. v.17, p.448-453,2003(b).
- CASIRAGHI, M., BAZZOCCHI, C., MORTARINO, M. OTTINA, E., GENCHI, C. A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*) **Veterinary Parasitology**. v.141, p.368-372, 2006.
- CAVALLAZZI, RS., CAVALAZZI, AC., SOUZA, I.V., CARDOSO, J. JD. *Dirofilaria immitis* pulmonar humana: relato de sete casos. **J Pneumol**. v. 28(2), p.100-102, 2002.
- CHALIFOUX, L., HUND, R.D., Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*. **Jornal American Veterinary Medical Association**. v.5, p.601-602, 1971.
- CINCO, M., PADOVAN, D., MURGIA, R., FRUSTERI, L., MAROLI, M., VAN DE POL, I., VERBEEK-DE KRUIF, N., RIJPKEMA, S., TAGGI, F. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodides ricinus* in central Italy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis**. v.17, p.249-250. 1998.
- COLLINS, F.H., MENDEZ, M.A., RASMUSSEN, M.O., MEHAFFEY, P.C. BESANSKY, N.J., FINNERTY, N. A ribosomal RNA gene probe differentiates member of the *Anopheles gambiae* complex. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** USA v.37, p.37-41.1987.

- CONSOLI, R. A. G. B. & LOURÊNÇO DE OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro.1994.225pp.
- CULPEPPER, J., GRIEVE, R. B., FRIEDMAN, L., MIKO-GRIEVE, M.,FRANK,G.R. DALE, B.Molecular characterization of *Dirofilaria immitis* cDNA encoding a highly immunoreactive antigen. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.54, n.1,p. 51-62. 1992.
- EWING, B., GREEN, P. Base Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res**, v.8, n.3, 175-185, 1998.
- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M. C., GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assesement. **Genome Res**, v.8, n.3, p. 175-185, 1998.
- ETTINGER, S.J., FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Veterinária**. Editora Guanabara Koogan. Quinta Ed. RJ Brasil. v.1, 2004. 1038 p.
- FARID, A. H., HAMMAD, R. E., HASSAN, M. M., MORAY, Z. S., KAMAL, I. H., WEIL, G. J., RAMZY, R. M.D. Detection of *Wucherreria bancrofti* in mosquitoes by the polymerase chain reaction: a potentially useful tool for a large-scale control programmes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, p.29-32, 2001.
- FAVIA, G., LANFRANCOTTI, A., DELLA TORRE, A., CANCRINI, G., COLUZZI, M. Polimerase chain reaction-identification of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. **Parasitology**, v.133, p.567-571, 1996.
- FAVIA, G., CANCRINI, G., RICCI, I., BAZZOCCHI, C., MAGI, M., PIETROBELLI, M., GENCHI, C. & BANDI, C. 5 S ribossomal spacer sequences of filarial parasites comparative analysis and diagnostical applications. **Molecular and Cellular Probes**, v.14,p. 285-290, 2000.
- FORATTINI, O. P.; **Entomologia Médica**. Editora da Universidade de São Paulo, 2º Volume Culicini: Culex, Aedes e Psorophora. 1965.506pp.
- FORATTINI, O.P.; **Culicidiologia Médica**. São Paulo: Edusp, 2002. 860p.

- FORATTINI, O. P.; KAKITANI, I.; MASSAD, E.; MARUCCI, D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 9- Synanthropy and epidemiological vector role of *Aedes scapularis* in South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública.** v.29, n.3, p.199-207, 1995.
- FORATTINI, O. P.; GOMES, A. C.; SANTOS, J. L.; GALATI, E. A.; RABELLO, E. X. & NATAL, D. Observações sobre a atividade de mosquitos Culicidae em Mata Residual no Vale Riberita, São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pub.** v.15, p.557-586, 1986.
- FLYNN, R.J. **Parasites of Laboratory animals. Vol. I.** Ames: The Iowa State University Press, 442p., 1973.
- GARCEZ, M.A., SOUZA, N.F., MOTA, E.F., DICKSON, LA. J., ABREU. W.U., CAALCANTI, V.F.N., GOMES, P.A.F., Focos de dirofilariose canina na Ilha do Marajó: um fator de risco para a saúde humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 39(4):p. 333-336, 2006.
- GOODMAN, D.S., ORELUS, J-N., ROBERTS, J.M. LAMMIE, P.J., STREIT, T. G., PCR and mosquito dissection as tools to monitor filarial infection levels following mass treatment, **Filaria Journal.** v. 2(11) p.1-9, 2003.
- GOMES, A. C., SILVA, N. N.; MARQUES, G. R. A. BRITO, M. Host-feeding patterns of potential human disease vectors in the Paraíba Valley Region, State of São Paulo, Brazil. **Journal of Vector Ecology.** 28(1):74-78. 2003.
- GUEVARA, A.G., VIEIRA, J.C., LILLEY, B.G., LOPEZ, A., VIEIRA, N., RUMBEA, J., COLLINS, R., KATHOLI, C.R., UNNASCH, T.R., Entomological evaluation by pool screen polymerase chain reaction of *Onchocerca volvulus* transmission in Ecuador following mass Mectizan distribution. **Am J Trop Med Hyg.** 68(2):P.222-7.2003.
- HEARTWORM.JPG Acessado em: 20 de março de 2006. Disponível em: www.mosquito.org/images/heartworm.jpg
- INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSHY, J. J. **PCR applications.** San Diego: Academic Press, 1999.

- KETTLE, D. S. **Medical and Veterinary Entomology**. 2a ed. Wellingsfors: CAB International, 725p, 1995.
- LABARTHE, N. Dirofilariose Canina: diagnóstico, prevenção e tratamento adulticida. **Clínica Veterinária**, v. 2, n.10, p. 10-16, 1997.
- LABARTHE, N., GUERRERO, J., Epidemiology of heartworm: What is happening in South América and México? **Veterinary Parasitology**. v. 133, n.2-3, p.149-156, 2005.
- LABARTHE, N., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. & SERRÃO, M. L. A transmissão da *Dirofilaria immitis* no Rio de Janeiro. **Vetores & Pragmas**,v. 2, n.5, p. 20-25, 1999.
- LABARTHE, N., ALMOSNY, N., GUERRERO, J., DUQUE-ARAÚJO, AM. 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., SERRÃO, M. L., MELO, Y. F., OLIVEIRA, S. J. de & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Mosquito Frequency and Feeding Habits in na Enzootic Canine Dirofilariasis Área in Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.93 n.2, p.145-154, 1998(a).
- LABARTHE, N., SERRÃO, M. L., MELO, Y. F., OLIVEIRA, S. J. de & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Potencial 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, 1998(b).
- LEITE, L. C. Mosquitos(Díptera, Culicidae) Potenciais Vetores de *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) em Guaratuba, Paraná. **Universidade Federal do Paraná**. Tese de Doutorado, 2005. 110 pp.
- 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. Assoc.** v.11, p.90-93, 1995.
- LOK, J. B., WALKER, E.D., SCOLES, G. A., Filariasis, *In*. **Medical Entomology**: EDMAN, J. D. & ELDRIDGE, B. F. A Textbook on Public Health and Veterinary Problems Caused by Arthropods. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht/ Boston/ London, p. 299-375, 2000.

- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. & DEANE, L. Presumed *Dirofilaria immitis* infections in wild-caught *Aedes taeniorhynchus* and *Aedes scapularis* in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.90, p.387-388, 1995.
- LOZOVEI, A.L. Culicídeos (mosquitos). P.59-103. *In*: MARCONDES, C.B. Entomologia Médica e veterinária. São Paulo: Editora Atheneu. 2001. 432p.
- MACÊDO, F. C., LABARTHE N. & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Susceptibility of *Ae. Scapularis* (Rondani, 1848) to *Dirofilaria immitis*, an emerging zoonosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.93, p.435-437.1998.
- MACHADO, E. S., Aspectos Epidemiológicos de Dirofilariose Canina e Humana, no Município de Florianópolis -SC, Brasil. Perfil de uma Zoonose. Universidade Federal de Santa Catarina, Tese de Mestrado, 2005, 63pp.
- MAGALHÃES, P.S., Descrição de uma espécie de filarias encontradas no coração humano. **Rev Cursos Prát Theor Fac Méd Rio de Janeiro**, v.3, p. 129-215, 1887.
- MAR, P-H., YANG I-C., CHANG, G-N. & FEI, A.C-Y. Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region (ITS2). **Veterinary Parasitology**, v. 106, n.3 , p. 243-252, 2002.
- McKENNA, P. B.. *Dirofilaria* infections in New Zealand. **Surveillance**.v. 27,n.4, p.13-14. 2000.
- NAYAR, J. K., KNIGHT, J.W., *Aedes albopictus* (Díptera: Culicídae): an experimental and natural host of *Dirofilaria immitis* (Filarioidea: Onchocercidae) in Florida, USA. **Journal of Medical Entomology**, v.36, p. 441-448,1999. Abstrat.
- NICOLAS, L. & SCOLES, G. A., Multiplex polymerase chain reaction for detection of *Dirofilaria immitis* (Filarioidea: Onchocercidae) and *Wuchereria bancrofti* (Filarioidea: Dipetalonematidae) in their common vector *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicídae). **Medical Entomology**. v. 34, n.6, p.741-742.1997.

- NUCHPRAYOON, S., JUNPEE, A., SUWANNE, N., CHUNGPIVAT, S., SUVANNADABBA, POOVORAWAN, Y. Detection of filarial parasites in domestic cats by PCR-RFLP of ITS 1. **Veterinary Parasitology**, 3589; 7 pp., 2006.
- PERIBÁÑEZ, M.A., LUCIENTES, J., ARCE, S., MORALES, M., CASTELLO, J.A., GRAZIA, M.J. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial Kit, Leucognost-SP®. **Veterinary Parasitology**. v.102, p.173-175. 2001.
- POOLE, C.B., GRANDEA, A. G.3rd, MAINA, C.V., JENKINS, R.E., SELKIRK, M.E, MACREYNOLDS, L.A., Cloning of a cuticular antigen that contains multiple tandem repeats from filarial parasite *Dirofilaria immitis*. **Proceedings of the National Acadademy of Sciences of the United States of America**. v.89, n.13, p.5986-5990, 1992.
- POOLE, C.B., HORNSTRA, L.J., BENNER, J.S., FINK, J. R., MCREYNOLDS, L.A., Carboxy-terminal sequence divergence and processing of polyprotein antigen from *Dirofilária immitis*. **Mol Biochem. Parasitol**. v.82, n.1,p. 51-56, 1996.
- RABINOW, P. Making PCR: a story of biotechnology. **University of Chicago Press**, 1997, 190p.
- RACHOU, R.G., Transmissores de filariose bancroftiana no Brasil. **Rev. Bras. Malariol. D. Trop**. v.8, p. 267-279, 1956.
- RAMZY, R.M.R., FARID, H.A.,KAMAL, L.H.,IBRAHIM, G.H., MORSY, Z.S., FARIS,R., WEIL,G.J., WILIAMS, S.A., A Polymerase chain reaction-based assay for detection of *Wucherreria bancrofti* in human blood and *Culex pipiens*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**. v.91, p. 156-160. 1997.
- REDDY, G.R., WATTS, K.J. & COURTNEY, C. H., Development of a PCR- and probe-based test for the sensitive and specific detection of the Dog Heartworm, *D. immitis*, in its mosquitos intermediate host. **Molecular and Cellular Probes**. v.14, p.425-430, 1999.
- REIFUR, L. THOMAZ-SOCCOL, V. & MONTIANI-FERREIRA, F., Epidemiological aspests of filariosis in dogs on the coast of Paraná state, Brazil: with emphasis on *Dirofilária immitis*. **Veterinary Parasitology**. v. 122, p. 273-286, 2004.

- REY, L. **Parasitologia**. 2a Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 1999. 731 p.
- RISHNIW, M., BARR, S.C., SIMPSON, K.W., FRONGILLO, M. F., FRANZ, M., DOMINGUEZ ALPIZAR, JL. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. **Veterinary parasitology**, v. 135, p. 303-314, 2006.
- RODRIGUES-SILVA, R., MOURA, H., DREYER, G. & REY, L. Human pulmonary dirofilariasis: a review. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.37, n.6, p. 523-530, 1995.
- SANT'ANA, A. L. & LOZOVEI, A. L. 2001. Influência do ciclo lunar na captura de *Aedes scapularis* (Diptera-Culicidae) na Mata Atlântica do Paraná. **Iheringia, Ser. Zool**, v.90, p.175-182,2001.
- SAMBROOK, J. FRITCH, E. F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. V. 3 2nd edition. New York; Cold Spring Harbor, 2001.
- SANTOS, R. C., Observações sobre a sinantropia de *Aedes scapularis* (Díptera: Culicidae) no Sudeste do Brasil. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo. 1996. 71p.
- SCHREY, C. F. & TRAUTVETTER, E. Canine and feline heartworm disease - diagnosis and therapy. **Waltham focus**, v.8, n.2, p.23-30, 1998.
- SCOLES, G.A. & KAMBHAMPATI, S. Polymerase chain reaction-based method for the detection of canine heartworm (Filaridea: Onchocercidae) in mosquitoes (Diptera: Culicidae) and vertebrate hosts. **J. Med. Entomol.** v.32, 2ed. 864-869, 1995.
- 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, Rio de Janeiro**, v. 96, n.5,July, p.593-598, 2001.
- TAKAHASHI, Y., NAGANO, I., WU, Z. & NAKAYAMA, M. A Simple method to design PCR primer to detect genomic DNA of Parasites and its application to *Dirofilaria immitis*. **Molecular and Cellular Probes**, v.10, p. 423-425, 1996.

- VAKALIS, N., SPANAKOS, G., PATSOULA, E. & VAMVAKOPOULOS, N.C., Improve Detection of *Dirofilaria repens* DNA by direct polymerase chain reaction. **Parasitology International**, v.48, p.145-150, 1999.
- VASULI, V. HOTI, S.L., SADANANDANE, JAMBULINGAM, P. A Simple and rapid DNA extraction method for the detection of *Wuchereria bancrofti* infection in the vector mosquito, *Culex quinquefasciatus* by *Ssp I* PCR assay. **Acta Tropica**. v. 83, p.109-114, 2003.
- VEZZANI, D., EIRAS D. F., WISNIVESKY, C., Dirofilaris in Argentina: Historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in natural mosquito population. **Veterinary parasitology**, 3387, 15p., 2005.
- WAATS, K.J.; COURTENEY, C. H.; REDDY, G. R. 1999. Development of a PCR and probe-based test for the sensitive and specific detection of Dog heart worm *Dirofilaria immitis*, in its mosquito intermediate host. **Molecular and Cellular Probes**, v.14, p. 425-430. 1999.
- WORLDOLOR.GIF Acesso em: dia 01 de julho de 2006. Disponível em: cal.vet.upenn.edu/merial/hrtworm/hw_3.htm.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)