

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DO *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) COM *Dirofilaria immitis* (NEMATODA: FILARIDAE)

[*Experimental infection of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) with Dirofilaria immitis (Nematoda: Filaridae)*]

Arina Santos Ribeiro¹, Edwin Alberto Pile², Silvia Maria Mendes Ahid^{3,*}

¹Laboro - Excelência em Pós-Graduação / Estácio de Sá, São Luiz, MA, Brasil.

²Instituto Nacional de Investigação e Desenvolvimento Agrário, Depto de Agricultura e Pecuária, São Lourenço dos Órgãos, Santiago, Cabo Verde.

³Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brasil.

RESUMO - A ocorrência da *Dirofilaria immitis* no Brasil tem sido registrada nos vários Estados, com índices de prevalência variados. As informações recentes sobre os vetores incriminaram *Aedes scapularis* e *A. taeniorhynchus* como primários e confirmada a participação de *Culex quinquefasciatus* como secundário na transmissão da *D. immitis*. A captura de *A. aegypti* em ambiente peridomiciliar durante um estudo entomológico levou-nos questionar sobre a competência vetorial desse inseto em transmitir o agente da dirofilariose. A avaliação revelou que grupos distintos dessa espécie possuem alta competência vetorial para *D. immitis*.

Palavras-Chave: Competência vetorial, vetor, microfilária.

ABSTRACT - The occurrence of the *Dirofilaria immitis* in Brazil has been registered in several States, with indexes of varied prevalence. The recent information on the vectors incriminated *Aedes scapularis* and *A. taeniorhynchus* as primary and confirmed the participation of *Culex quinquefasciatus* as secondary in the transmission of the *D. immitis*. The capture of *A. aegypti* in peridomiciliar environment during observations entomology took to question on us the vectorial competence of that insect in transmitting the agent of dirofilariosis. The evaluation revealed that groups different from that species possess high vectorial competence for *D. immitis*.

Keywords: Vector competence, vector, microfilariae.

INTRODUÇÃO

O nematóide *Dirofilaria immitis*, foi primeiramente descrito por Leidy (1856). Quando adultos são vermes finos, alongados e esbranquiçados com acentuado dimorfismo sexual. (Rodrigues-Silva et al, 1995). A *D. immitis* é transmitida por insetos hematófagos da família Culicidae, as larvas de terceiro estágio são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado, quando deixam os túbulos de Malpighi, migrando por entre os órgãos e indo se localizar no espaço cefálico e probóscida do mosquito (Abraham, 1998), e ao realizarem o repasto sanguíneo, estas larvas migram ativamente para a pele do mamífero, penetram através do orifício produzido pela picada e permanecem, temporariamente, no tecido subcutâneo, quando iniciam a migração somática em direção ao tórax do animal. Três meses depois de instalado na artéria

pulmonar ou no ventrículo direito de cães, gatos e outros animais, atingem a maturidade sexual e o ciclo se completa, com a liberação de microfilárias na circulação (Knight, 1987).

A dirofilariose humana tem sido descrita nos últimos anos como uma zoonose emergencial. No homem o parasita se aloja principalmente no pulmão, formando um nódulo quase sempre fornecendo imagem radiográfica semelhante a uma tumoração sem, contudo, permitir a maturidade do verme (Rodrigues-Silva et al., 1995).

No Brasil a ocorrência da *D. immitis* em cães tem sido assinalada em vários Estados, sendo que os índices variam conforme a região (Freitas & Costa, 1970) de 2% a 52% (Guerrero et al, 1992; Ahid et al., 1999). As principais espécies de mosquitos transmissores de *D. immitis* no Brasil foram descritas

* Autor para correspondência. E-mail: ahid@ufersa.edu.br.

recentemente na região Sudeste e no Nordeste Lourenço-de-Oliveira & Deane (1995) dentre os quais *Aedes taeniorhynchus* e *A. scapularis* (Ahid & Lourenço-de-Oliveira, 1999; Lima & Ahid, 2004). Essas espécies são consideradas oportunistas já que normalmente se alimentam em uma variedade de animais domésticos, além do homem (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Consideradas como vetores primários e *Cx. quinquefasciatus* como secundário da dirofilariose canina (Ahid et al, 2000). O presente trabalho teve objetivo de avaliar a competência vetorial da espécie *A. aegypti* na transmissão da *D. immitis*, em circunstâncias experimentais.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a identificação da fauna culicidiana naturalmente infectada, foram promovidas 18 capturas manuais, sendo três repetições a cada mês, em ambiente peridomiciliar de uma área autóctone da dirofilariose canina (Ahid et al., 1999). As capturas foram realizadas sobre isca animal, naturalmente infectado pela *D. immitis*, e humana, sempre em uma hora diurna e uma hora noturna, com início sempre trinta minutos antes do ocaso do sol (Ahid & Lourenço-de-Oliveira, 1999). O recolhimento dos culicídeos capturados até sua identificação e dessecação seguiu-se os procedimentos recomendados por Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994).

Para a avaliação da competência vetorial do *A. aegypti* utilizou-se dois grupos dessa espécie: um padrão Rockefeller doado pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) e outra nativa obtida a partir de ovos coletados em ovitampas distribuídas no município de São Luis.

Para a manutenção da colônia foi utilizado método padronizado para os dois grupos, cujas desovas foram submersas a água desclorada até a emergência das larvas, e mantidas com ração triturada para gato (Gatsy®) até o aparecimento das pupas. À medida que estas emergiam eram transferidas em cubas para uma gaiola telada até o surgimento dos adultos. Estes, por sua vez, foram mantidos com solução aquosa de glicose a 10%, até 24 horas antes do repasto sangüíneo infectante. A temperatura média do ambiente entomológico, durante o experimento, foi de 28°C e Umidade Relativa 70%. Estes dados foram coletados através de um termohigrômetro instalado no local durante toda a manutenção da colônia, até a finalização da infecção experimental.

Para a infecção experimental utilizou-se um cão

(Collie, fêmea, 10 anos) naturalmente infectado pela *D. immitis* com microfilaremia em torno de 30 microfilárias circulante (mcf) por 20 μ l de sangue. Como controle utilizou-se um cão negativo para mcf pelo teste de Knott modificado (Newton & Wright, 1956).

Foram expostos 280 exemplares de cada grupo (testado e controle) em gaiolas de xenodiagnóstico sobre a região ventral dos animais correspondentes, durante 30 minutos, tempo suficiente para o total ingurgitamento das fêmeas. As fêmeas totalmente ingurgitadas, segundo seu grupo, foram mantidas em gaiolas cilíndricas, nas mesmas condições da colônia original até a dissecação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante as 18 capturas realizadas, no período de setembro de 2000 a janeiro de 2001, permitiram a identificação de exemplares de culicídeos das espécies *A. aegypti*, *A. taeniorhynchus* e *Cx. quinquefasciatus*, os dois últimos já incriminados como vetores primários e secundário da Dirofilariose em São Luís por Ahid & Lourenço-de-Oliveira (1999). Embora não tenha sido encontrado, na ocasião, nenhum espécime naturalmente infectado para a *D. immitis*, o convívio direto de animais positivos com vetores potenciais e a presença do *A. aegypti* em ambiente peridomiciliar, levou-nos a promover a infecção experimental para avaliar a eficiência dessa espécie como vetor da *D. immitis*.

As populações de *A. aegypti* utilizadas neste estudo permitiram o desenvolvimento das larvas de *D. immitis*, tendo sido encontradas larvas de terceiro estagio (Figura 1), na nativa a partir do 11º dia e no padrão Rockefeller 12º dia (Tabela 1), período esse similares aos estudos experimentais realizados com a mesma espécie por Mendonça et al, (1998) e Taylor (1960) quando encontraram larvas infectantes à partir do 12º dia com as populações Rock, Vero Beach, Black-Eye, Liverpool. A diversidade genética de populações de ambos *A. aegypti* pode explicar esta variação no desenvolvimento do parasita *D. immitis* no vetor. A temperatura e umidade relativa (27°C e 80%) que poderiam ter tido influência nesta variação, conforme já descrito por Christensen (1978), foram semelhantes a esse estudo.

O número reduzido de larvas (L₁, L₂ e L₃) encontradas, na porção distal dos túbulos de Malpighi após a infecção (Figura 2), quando comparado ao número de mcf ingeridas (Tabela 2), mostram que a grande maioria não se desenvolveu



Figura 1 - Presença de larva infectante L3 na probóscida do *Aedes aegypti* no 11º dia de infecção experimental.

Tabela 1 - Acompanhamento do desenvolvimento de larvas de *Dirofilaria immitis*, no período de 14 dias entre as duas populações de *Aedes aegypti*, quando alimentadas sobre o cão naturalmente infectado (~30mcf/20µl).

Grupos avaliados	Nº de Larvas encontradas / Nº de mosquitos dissecados			
	1h	2 - 6 dias	7 - 11 dias	12 - 14 dias
Nativa	22 / 5 (4,4)	34 / 4 (8,5)	30 / 5 (06)	433 / 122 (3,5)
Padrão	42 / 5 (8,4)	16 / 5 (3,2)	11 / 6 (1,8)	30 / 45 (0,6)

Nº = Número; h = hora.

Tabela 2 - Percentual de mosquitos infectados e infectantes, número de microfilaria (mcf) ingerida nas populações de *Aedes aegypti* avaliadas em condições experimentais.

Grupos avaliados	Mcf ingeridas	Mosquitos com L ₃ (larva infectante) entre o 11º e 15º dia de observação ^a			
	mosq.infectado/ dissecado (%)	X mcf / mosq. Dissecado	mosq.infectado / dissecado (%)	X L ₃ /mosq. dissecado	X L ₃ / mosq. Infectado
Nativa	5 / 5 (100%)	4,4	92 / 122 (75%)	398 / 122 (3,2)	398 / 92 (4,3)
Padrão	5 / 5 (100%)	8,4	16 / 45 (35,5%)	18 / 45 (0,4)	18 / 16 (1,1)

Nº = Número; mosq = mosquitos; mcf = microfilarias; X = média; a = todas as L₃ nos túbulos de Malpighi, cabeça e peças bucais.

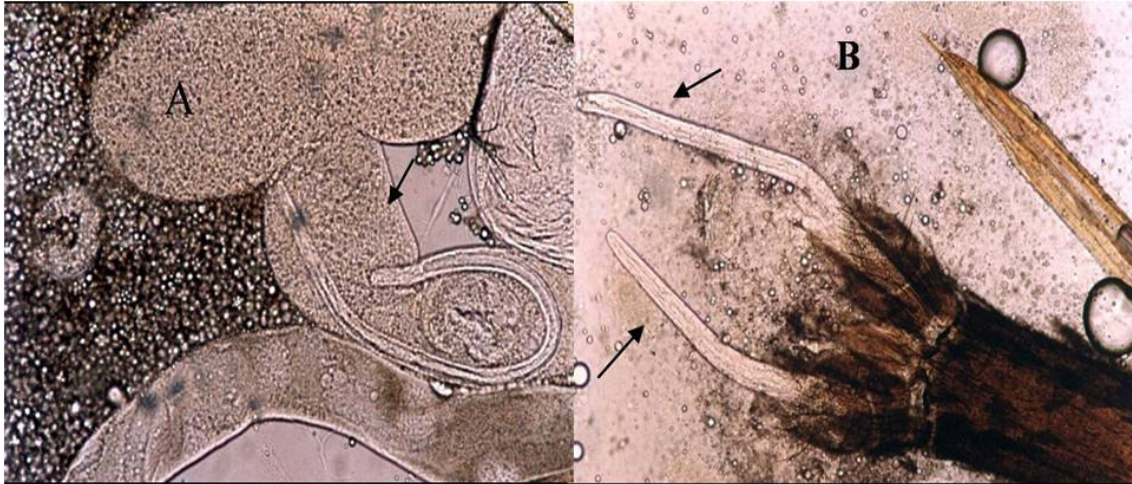


Figura 2 - A - Presença da larva de terceiro estágio (L3) de *D. immitis* na região proximal dos túbulos de Malpighi; B - Liberação de larvas infectantes (L3) na probóscida após leve compressão manual.

ou morreu antes que pudesse completar o desenvolvimento. Bradley & Nayar (1987) sugerem que as mcf que não se alojam nos túbulos de Malpighi são excretadas pelo vetor e que, dentre aquelas que invadem as células dos túbulos, algumas não se desenvolvem devido a um mecanismo de defesa ativado por estas células, a exemplo do encapsulamento.

Esta interrupção no desenvolvimento das larvas é um dos mecanismos responsáveis pela refratariedade dos mosquitos em graus variados à infecção por *D. immitis*, além do encapsulamento e mielinização das larvas e encapsulamento dos parasitos no estômago do hospedeiro invertebrados (Nayar & Sauerman, 1975). Para Buxton & Mullen (1981), uma espécie é considerada susceptível à *D. immitis* quando é capaz de suportar o desenvolvimento de um ou mais estágios larvares. No presente estudo, não foi encontrado larvas melanizadas, mas com desenvolvimento tardio na população Padrão Rockefeller, mesmo assim permitiu que o parasito completasse seu ciclo de desenvolvimento, confirmando que o *A. aegypti* é susceptível a *D. immitis*.

O índice de eficiência vetorial, que esta relacionada com o número de larvas infectantes desenvolvidas em função do número de microfilárias ingeridas foi alto na Nativa com 66% e baixo no padrão com 3,5% (Tabela 3). Kartman (1953) & Sulaiman (1983) encontraram valores menores em linhagens

diferentes da mesma espécie. Lowrie (1991) e Russel & Geary (1996) encontraram outras espécies de mosquitos do mesmo gênero com melhor eficácia vetorial (*A. vexans* e *A. notoscriptus*). Embora a literatura seja abundante em relação da susceptibilidade de diferentes populações de *A. aegypti* à *D. immitis*, o critério utilizado para caracterizar a refratariedade ou susceptibilidade de uma espécie varia de estudo para outro. No entanto, todos mostram que nas populações susceptíveis como Liverpool e Black-Eye, maior número de larvas de terceiro estágio chegam à cabeça e probóscida do vetor (Figuras 2A, 2B), como observada na Nativa, enquanto nas populações pouco susceptíveis como Rock e Vero Beach, poucas larvas infectantes são recuperadas nas peças bucais o que foi evidenciado em nosso experimento.

Considerando os resultados obtidos neste experimento, a espécie *A. aegypti* deve ser considerada um vetor potencial da *D. immitis* uma vez que, as duas populações avaliadas permitiram o desenvolvimento das larvas de *D. immitis* até a forma infectante. A intensidade de infecção para o grupo Nativa foi de 91% mais intenso que o Rockefeller (85%). A Nativa revelou melhor capacidade de desenvolvimento uma vez que se obteve uma média de 3,2 de L₃ por mosquito dissecado em relação à média de 0,4 L₃ por mosquito dissecado quando era o grupo Rockefeller, e houve um alto nível de sobrevivência da Nativa 54% contra 33% da Rockefeller.

Tabela 3 - Índice da infecção por *D. immitis* nas populações de *Aedes aegypti*, alimentado sobre cão microfilarêmico (~30 mcf/20µl)

grupos avaliados	Índices (%)		
	Intensidade de infecção ^a	Taxa de sobrevivência ^b	Eficiência vetorial ^c IEV
nativa	366 / 398 (91%)	122 / 226 (54%)	2,9 / 4,4 (66%)
padrão (rockfeller)	18 / 21 (85%)	45 / 136 (33%)	0,3 / 8,4 (3,5%)

a = N° de mosq. Com L₃ na Proboscída/N° de mosq. Com L₃; b = N° de mosq. Ingurgitado; c = X N° L₃ x 100/ X N° mcf ingerida, entre os dissecados (Kartman, 1954).

CONCLUSÕES

Embora não tenha sido encontrado nenhum culicídeo naturalmente infectado, foram capturados os vetores potenciais da *Dirofilaria immitis* na área objeto de estudo. A espécie *Aedes aegypti* foi capaz de promover o desenvolvimento da *D. immitis* até a fase infectante. A população de *A. aegypti* Nativa de São Luís apresentou um alto índice de eficiência vetorial e foi mais susceptível que a Padrão Rockfeller. A intensidade de infecção encontrada nas duas populações revela capacidade de transmissão das larvas infectantes da *D. immitis*.

REFERÊNCIAS

- Abraham D. 1998. Biology of *Dirofilaria immitis*, p. 29-46. In: *Dirofilariasis*. CRC Press Florida.
- Ahid S.M.M., Vasconcelos S.P. & Oliveira R.L. 2000. Vector competence of *Culex quinquefasciatus* say from different regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95:769-775.
- Ahid S.M.M., Lourenço-de-Oliveira R. & Saraiva L.Q. 1999. *Dirofilariose* canina na Ilha de São Luís, Nordeste do Brasil: Uma Zoonose Potencial. Cad. Saúde Públ. 15:405-412.
- Ahid S.M.M. & Lourenço-de-Oliveira R. 1999. Mosquitos vetores potenciais da *Dirofilariose* canina, uma zoonose potencial em São Luís, Nordeste do Brasil (Díptera: Culicidae). Rev. Saúde Públ. 33:560-565.
- Bradley T.J. & Nayar J.K. 1987. Na ultrastructural study of *Dirofilaria immitis* infection in the Malpighian tubules of *Anopheles quadrimaculatus*. J. Parasitol. 53:1035-1043.
- Buxton B.A. & Mullen G.R. 1981. Comparative susceptibility of four strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection with *Dirofilaria immitis*. J. Med. Entomol. 18:434-440.
- Christensen B.M. 1978. *Dirofilaria immitis*: effect on the longevity of *Aedes trivittatus*. Exp. Parasitol. 44:116-123.
- Consoli R.A.G.B. & Lourenço-de-Oliveira R. 1994. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p.225.
- Freitas M.G. & Costa H.M.A. 1970. Lista de helmintos parasitas dos animais domésticos do Brasil. Arq. Esc. Vet. UFMG 22:33-94.
- Guerrero, J.; Ducos de Lahitte, J.; Genchi, C. 1992. Update on the distribution of *Dirofilaria immitis* in dogs from Southern Europe and Latin America. Proceedings of the Heartworm Symposium, Austin, 1992. Annals... Austin, TX., 92: 31-37.
- Kartman L. 1953. Factors influencing infection of the mosquitos with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). Exp. Parasitol. 2:27-78.
- Knight D.H. 1987. Heartworm infection. Vet. Clin. North Am. Small An. Pract. 17:1463-1517.
- Leidy J.A. 1856. Synopsis of entozoan and some of their ectocongeners observed by the author. Proc. Assoc. Natl. Sc. Philadelphia 8:43-59.
- Lima P.M. & Ahid S.M.M. 2004. Vetor natural da *Dirofilaria immitis* (Nematoda) em Mossoró-RN. Caantiga 17:109-114.
- Lourenço-de-Oliveira R. & Deane L.M. 1995. Presumed *Dirofilaria immitis* infection in Wildcaught *A. taeniorhynchus* and *A. scapularis* in Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 90: 387-388.
- Lowrie RC. 1991. Poor vector efficiency of *Culex quinquefasciatus* following infection with *Dirofilaria immitis*. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 7: 30-36.
- Nayar J.K. & Sauerman D.M. Jr. 1975. Physiological basis of host susceptibility of Florida mosquitos to *Dirofilaria immitis*. J. Insect. Physiol. 21:1965-1975.
- Newton W.L. & Wright, W.H. 1956. The occurrence of a dog filariidae other than *Dirofilaria immitis* in the United States. J. Parasitol. 42: 246-258.
- Rodrigues-Silva, R.; Moura, H., Dreyer, G. & Rey, L. 1995. Human pulmonary dirofilariasis: a review. Mem. do Inst. Med. Trop. 37:523-530.
- Russeau R.C. & Geary M.J. 1996. The influence of microfilarial density of dog heartworm *Dirofilaria immitis* on infection rate and survival of *Aedes notoscriptus* and *Culex annulirostris* from Australia. Med. Vet. Entomol. 10:29-34.
- Sulaiman I. 1983. Susceptibility of *Aedes aegypti* to infections and *Dirofilaria repens*. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 74:635-646.
- Taylor E.R.A. 1960. The development of *Dirofilaria immitis* in the mosquito *Aedes aegypti*. J. Helminthol. 34: 27.