

# Estudos epidemiológicos entre populações indígenas da Amazônia.

## II. Prevalências da microfilaremia de *Mansonella ozzardi*: comparação de dois métodos de diagnóstico (\*)

Dale N. Lawrence (1), Bernardo Erdtmann (2), Jennifer W. Peet (3), José A. Nunes de Mello (4), George R. Healy (3), James V. Neel, M.D. (5) e Francisco M. Salzano (5)

### Resumo

Foi determinada a prevalência de microfilaremia em uma amostra representativa de adolescentes e adultos, em 13 aldeias, de índios amazônicos brasileiros em julho-agosto de 1976. Através de esfregaço de sangue periférico corados com Giemsa e de preparações de culturas de linfócitos de sangue periférico, ou ambas, foram testadas 533 pessoas com idade acima de 10 anos e 68 crianças com menos de 10 anos. A *Mansonella ozzardi* foi a única espécie de microfilaria encontrada. A prevalência foi altamente aldeia-específica. Em quatro (4) das 13 aldeias, houve casos de não detecção de microfilaremia pelos métodos usados. Em quatro (4) outras aldeias, as prevalências encontradas para os residentes de 10 anos e mais velhos foram em excesso de 60% para cada método utilizado. Em aldeias onde a microfilaremia foi documentada, apenas cinco (13%) do total de 38 crianças testadas foram positivas. Houve uma tendência geral da prevalência aumentar com o aumento da idade. A razão de prevalência de microfilaremia entre homens e mulheres foi de aproximadamente 1,4:1 para o teste de esfregaço de sangue periférico e exatamente 1:1 para o outro. Em cada 5 aldeões com microfilaremia-positiva testados com ambos os métodos, detectamos uma mais alta prevalência da microfilaremia com as preparações feitas de cultura de linfócitos.

### INTRODUÇÃO

Intenso interesse se desenvolveu sobre a distribuição de espécies de filárias que parasitam populações indígenas amazônicas da Colômbia, Venezuela, Guiana e Brasil (Marinkelle & German, 1970; Hernandez Pieretti, 1955;

Orihel, 1967; Moraes & Chaves, 1974). Uma expedição de pesquisa genética e médica para os Estados do Amazonas e Acre, Brasil, durante os meses de julho-agosto de 1976 proporcionou uma oportunidade de maiores estudos de distribuição e prevalência das espécies microfilarêmicas em várias aldeias indígenas amplamente espalhadas com teste em amostras demograficamente representativas em cada aldeia. A expedição, dentre vários propósitos, permitiu também à equipe de pesquisadores comparar as relativas habilidades no diagnóstico da microfilaremia em esfregaços sangüíneos corados pelo Giemsa, do modo convencional e em preparações feitas de culturas de linfócitos de sangue periférico. Foi numa expedição anterior para o sul da Venezuela que se descobriu acidentalmente que a microfilaremia poderia ser diagnosticada sob estas condições.

### MÉTODOS

As aldeias representativas utilizadas no estudo estão localizadas no setor demarcado entre 64° e 73°W de longitude e 2°N e 9°S de latitude (Fig. 1). As aldeias foram visitadas por nossas equipes médicas durante um período de quatro semanas no meio da estação seca. Um representante da Fundação Nacional do Índio (FUNAI) brasileira ou uma família de missionários residentes nas aldeias

(\*) — Este trabalho foi financiado, em parte, pela National Science Foundation sob o número BMS-74-11823, a qual agradecemos também pelas facilidades de utilização do Barco de Pesquisas ALPHA HELIX, durante os meses de julho e agosto de 1976. Agradecimento especial aos Drs. William Oliver e Richard Spielman pela coleta de sangue periférico e feitura dos esfregaços em lâmina.

(1) — Department of Health, Education, and Welfare, Atlanta, GA. E. Unidos.

(2) — Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

(3) — General Parasitology Branch, Parasitology Division, Bureau of Laboratories, CDC, E. Unidos.

(4) — Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus

(5) — Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI. E. Unidos.

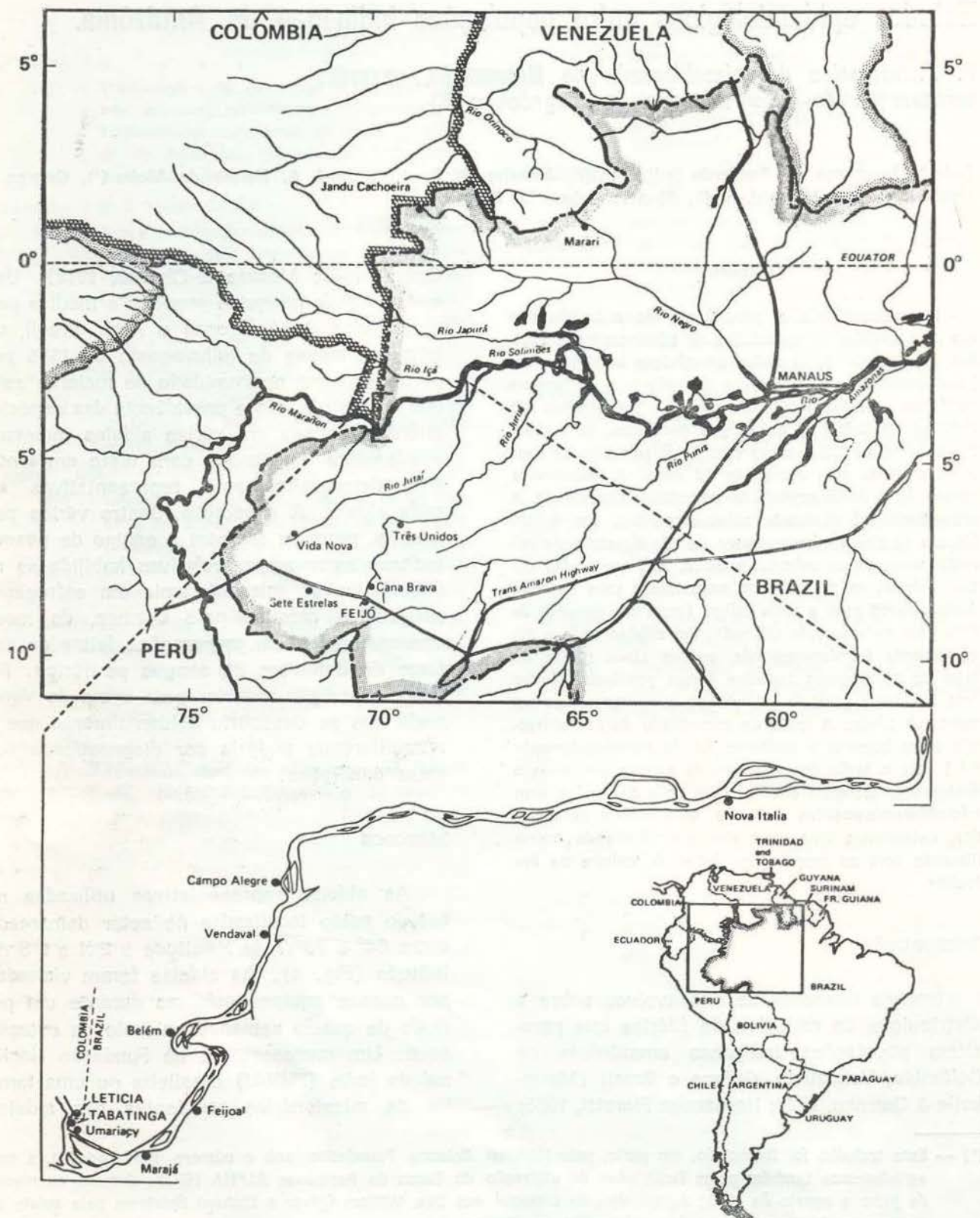


Fig. 1 — Localização geográfica das aldeias indígenas

encrajavam uma assistência voluntária à nossa temporária clínica médica. Informações básicas tais como: nome, idade e sexo foram registradas. O atendimento clínico foi feito em grupos de famílias. Duas amostras separadas ao acaso dos registrados em cada aldeia foram selecionadas para serem testadas pelos dois métodos. Ocasionalmente, especialmente em aldeias menores, espécimes sangüíneos de várias pessoas foram testadas por ambos os métodos. Crianças com menos de 10 anos foram testadas com menos freqüência que as pessoas de outros grupos etários. Todos os espécimes foram coletados entre 9:30 e 16:00 horas, hora local. Não foram feitas coletas seriadas.

Esfregaços convencionais finos e em gota espessa foram preparados com sangue obtido de punção do dedo ou da gota terminal da agulha do vacutainer; após fixação com metanol absoluto os esfregaços foram corados com Giemsa em solução tamponada pH 7,2. De cada pessoa do grupo-amostra foi preparada uma gota espessa de sangue corada pelo Giemsa e quando o resultado era negativo, examinava-se também o esfregaço correspondente.

As culturas de linfócitos foram feitas para estudos cromossômicos e foram preparadas com a adição de aproximadamente 0,15 ml (4 gotas) de sangue periférico heparinizado (de cada pessoa testada) em cubas individuais de cultura celular de 4-ml (TC Chromosome Microtest Media, Difco) (1) as quais foram incubadas por 3 dias a 37°C. Após adição de colchicina ( $2 \times 10^{-6}$ M, por 3 horas) e tratamento hipotônico com KCl (0,075 M, por 10 minutos), o material foi fixado em 4 ml de uma mistura de 3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético. Todo o sedimento, livre das células vermelhas do sangue, foi usado na preparação de cerca de 7 lâminas pelo método de secagem ao ar. Uma lâmina não corada foi então examinada para a presença de microfilária; se nenhuma microfilária fosse encontrada uma segunda lâmina era examinada. O parasita sempre foi fácil de ser evidenciado nos espécimes infectados.

## CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES ESTUDADAS

Trinta aldeias indígenas localizadas nos Estados do Amazonas e Acre, Brasil, foram estudadas quanto à microfilaremia (Fig. 1). Seis delas eram habitadas por índios Tikúna e as demais, por 7 tribos diferentes (Tabela 1). As tribos Baniwa e Yanomama que viviam nas 2 aldeias mais setentrionalmente estudadas, Jandu Cachoeira e Marari, respectivamente, têm um contato muito limitado com a cultura ocidental. As seis aldeias Tikúna em estudo, as quais foram localizadas ao longo do rio Solimões (Alto rio Amazonas do Brasil), cada uma possui entre 200 e 1.250 habitantes. Migração de comunidades pequenas do interior para aldeias novas ou estabelecidas ao longo do Solimões proporcionou, nos últimos anos, um aumento destas populações para muitas vezes o tamanho dos estabelecimentos tradicionais dos Tikúna. Seu contato com outros Tikúna e com a cultura brasileira em geral, aumentou muito ultimamente.

O estabelecimento Kaxináwa (Canã Brava/Paredão) situado em um tributário do rio Juruá, localizado 8 km rio abaixo da cidade brasileira de Feijó, a qual é uma junção na Rodovia Transamazônica em construção.

Três Unidos habitada pelos Kanamarí está localizada aproximadamente a 25 milhas aéreas a leste da cidade de Eirunepé e, deste modo, está relativamente isolada. Os Jamináwa de Sete Estrelas tiveram um contato moderado com o exterior, especialmente com seringueiros durante o "boom" da borracha, mas como é típico da maioria dos indígenas relatados aqui, mostram pouca evidência de mistura genética. Os Marúbo de Vila Nova são talvez, o grupo menos aculturado nas aldeias do interior estudadas para o sul. Esta última tribo e os Kaxináwa e Jamináwa são geralmente agrupados em os Pano Central.

## RESULTADOS

As taxas de prevalência para microfilaremia foram determinadas por esfregaços de sangue periférico corados e preparações de

(1) — O uso de nomes comerciais é apenas para identificação e não possui endossamento do Serviço de Saúde Pública ou do "U.S. Department of Health, Education and Welfare".

culturas de linfócitos em 6 das aldeias; um único método foi utilizado nas 7 restantes (Tabela 1). Exceto pelo fato de as coletas feitas de crianças de 5-9 anos de idade serem em, relativamente, menor número, a proporção de pessoas de 10 anos de idade e mais velhas testadas foi grosseiramente compatível com o perfil da população em cada aldeia. Os resultados são, portanto, representativos para cada comunidade.

Esfregaços convencionais grossos e finos foram preparados de espécimes de sangue periférico obtido de 307 pessoas de mais de 10 anos em 10 aldeias. Destas pessoas, 125 (41%) eram do sexo masculino. Em cada aldeia, foram coletados entre 11 e 82 espécimes (média de 22). Entre 6%, em algumas aldeias maiores e 89%, em outras menores, dos residentes participaram no estudo. Dos residentes de 10 anos e mais velhos, participou uma média de 16%. Esfregaços de residentes em 4 aldeias foram negativos para microfilária. Nas 6 aldeias, nas quais, pelo menos, um esfregaço convencional foi positivo, a prevalência aumentou de 1% a 63% (média de 15,5%). Todos estes espécimes positivos foram obtidos de indígenas de 10 anos de idade e mais velhos.

Lâminas de sedimento de cultura de linfócitos foram preparadas de espécimes de sangue periférico obtidos de 282 pessoas de 10 anos de idade e mais velhos, em nove (9) aldeias. Dentre estes indivíduos estudados, 132 (47%) eram do sexo masculino. O número de pessoas testado por aldeia com o método de cultura de linfócitos aumentou de 13 para 87 (média de 29). A proporção da população registrada, de 10 anos de idade para cima, de cada aldeia testada desta maneira aumentou de 6% para 64% (média de 13%). Residentes de uma das aldeias (Morada Nova) cujos espécimes foram microfilaremia-negativa com a técnica convencional de esfregaço também tiveram espécimes negativos com o método de cultura de linfócitos. A prevalência aldeia-específica da microfilaremia, excluindo Morada Nova, aumentou de 20% para 93% (média de 68%). A aldeia dos Tikúna de Feijoal tem a mais alta prevalência, seguida pela comunidade dos Baniwa de Jandu Cachoeira. As outras aldeias Tikúna ao longo do rio Solimões geralmente apresentaram valores intermediários. A aldeia meridional Kanamarí, Três Unidos, tem uma prevalência baixa de microfilaremia. Houve uma tendência geral da

TABELA 1 — Esquema das aldeias examinadas para microfilaremia

Tribo	Aldeia	Esfregaços convencionais			Prevalência (%)	Cultura de linfócitos		
		N.º regis- trados*	N.º tes- tados	N.º de positivos		N.º de testados	N.º de positivos	Prevalên- cia (%)
Baniwa	Jandu Cachoeira	337	24	15	63	24	21	87
Yanomama	Maratí	NA**	11	0	0	—	—	—
Tikuna	Umariacu	342	20	2	10	87	49	56
	Marajá	78	—	—	—	13	6	46
	Feijoal	116	—	—	—	15	14	93
	Vendaval	311	19	4	21	30	20	67
	Campo Alegre	383	37	13	35	24	14	58
	Nova Itália	136	—	—	—	29	20	69
Kanamarí	Três Unidos	103	82	1	1	30	6	20
Jaminawa	Sete Estrelas	92	15	0	0	—	—	—
Marubo	Vida Nova	110	20	1	5	—	—	—
Kashinawa	Cana Brava/Paredão	86	37	0	0	—	—	—
Katukina	Morada Nova	47	42	0	0	30	0	0
Total			307	36	Intermediário 15,5	282	150	intermediário 68

(\* ) — Pessoas de mais de 10 anos, cujo sangue foi coletado para estudo genético e outros tipos de investigação.

(\*\* ) — Não utilizáveis. Apenas estudos biomédicos especializados foram conduzidos nesta população.

prevalência aumentar nos grupos etários mais velhos. Isto foi verdade com ambos os métodos para diagnóstico de microfilaremia (Tabela 2).

Não considerando as aldeias em que todos os espécimes foram negativos para microfilaremia e duas aldeias nas quais o sexo das pessoas amostradas não foi registrado, a razão de prevalência de microfilaremia entre homens e mulheres foi de 1,4:1 pelos resultados de esfregaço, e 1:1 pelos dados de preparação de cultura de linfócitos.

**TABELA 2 — Prevalência de *Mansonella ozzardi* grupo-específica para idade em três tribos indígenas brasileiras. †**

		Intervalo de idade						
		5-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	≥60
Baniwa	(N)*	6	7	5	7	3	0	2
	(+)**	3	5	5	6	3	0	2
	(%)	50	71	100	86	100	—	100
Tikuna	(N)	5	31	63	48	27	17	12
	(+)	2	16	31	31	21	15	9
	(%)	40	52	49	65	78	88	75
Kanamarí	(N)	0	8	8	4	5	2	3
	(+)	0	1	2	1	0	0	2
	(%)	—	12	25	25	0	0	67

(†) — Baseado no método de cultura de linfócitos; grupos incluem machos e fêmeas.

(\*) — N = Número de testados.

(\*\*) — + = Número de positivos.

Cinco aldeias, cujos espécimes foram microfilaremia-positiva e nas quais ambos os testes foram usados, proporcionaram dados pelos quais se comparam as prevalências calculadas dos resultados dos dois métodos (Tabela 3). Os resultados do teste cultura de linfócitos mostrou mais alta prevalência em todas as cinco aldeias. Em geral, quanto mais baixa a prevalência determinada pelos esfregaços convencionais, mais alta era a habilidade relativa do método de cultura de linfócitos para determinar o mínimo de microfíliarias circulantes.

Em Jandu Cachoeira, espécimes de sangue das mesmas 30 pessoas, incluindo 6 crianças com menos de 10 anos de idade, foram testa-

**TABELA 3 — Taxa de Prevalência Comparativas para Microfilaremia.**

	A	B	Relação A/B
	Taxa pela Cultura de Linfócitos	Taxa pelos Esfregaços de Sangue Periférico	
Jandu Cachoeira	87	63	1.4
Umariçu	56	10	5.6
Vendaval	67	21	3.2
Campo Alegre	58	35	1.7
Três Unidos	20	1	20.0

(\*) — Expresso em porcentagem de indivíduos testados com idade acima de 10 anos.

dos por ambos os métodos. A média de idade de pessoas cujos espécimes foram negativos por ambos os métodos foi de 10,5 anos, e que para as pessoas, cujos espécimes foram positivos por ambos os métodos, foi de 32 anos. Nove pessoas (idade média 17 anos) foram consideradas microfilaremia-positiva apenas com a técnica cultura de linfócitos. Além disso, das 6 crianças testadas, três (de 7 anos de idade) foram positivas apenas com as preparações de cultura de linfócitos.

## DISCUSSÃO

Desde que foi inicialmente reconhecido como um parasito do Novo Mundo, aparentemente não-patogênico (Manson, 1897), a *Mansonella ozzardi* foi encontrado quase exclusivamente em ameríndios (Ozzard, 1897). Residentes não-aborígenes de regiões interioranas endêmicas da América Central e do Sul foram raramente encontrados altamente parasitados (Orihel, 1967). Apesar de a *M. ozzardi* poder ser a única espécie microfilarêmica encontrada entre ameríndios, um aspecto interessante foi a sua freqüente associação com *Dipetalonema (Acanthocheilonema) perstans*. Sob tais circunstâncias, o *D. perstans* é geralmente mais prevalente na população, a espécie mais numerosa encontrada em esfregaços de sangue de microfilaremia-positiva e pode ser detectada em pessoas mais jovens (Orihel, 1967). A coexistência destas filárias foi comumente

observada na maioria das aldeias indígenas estudadas na Colômbia (Marinkelle & German, 1970), Venezuela (Hernandez Pieretti, 1955 & Beaver, *et al*, 1967) e Guiana (Orihel, 1967). A porção ocidental do Estado do Amazonas foi virtualmente a única em relato de microfilaremia causada apenas por *M. ozzardi*, especialmente entre índios (Rachou, 1957).

Nenhuma consideração de prevalência de microfilaremia ou espécies causadoras foi publicada para, pelo menos, 10 das 13 aldeias relatadas aqui. A consideração de Rachou em observação extensiva de 1952-55 mostra que ele visitou Umariçu (chamada Maria Açu) e sugere que ele também visitou Campo Grande (listada como Santa Rita do Weil). Comparações precisas não podem ser feitas entre nossos resultados e os dele porque ele não tabelou a distribuição da idade e do sexo das pessoas no seu exame. Com tudo isso, a prevalência de microfilaremia de *M. ozzardi* relatada para estas aldeias Tikúna é comparável à nossa e ele não relatou ter achado nenhuma outra espécie neste estudo dos Tikúna.

Rachou também notou a completa ausência de microfilaremia em Feijó. Apesar de seu relato indubitavelmente lidar com nacionais brasileiros residindo em Feijó, a ausência de *M. ozzardi* em duas aldeias indígenas próximas, Morada Nova e Cana Brava/Paredão, foi um interessante achado no nosso exame da região, 22 anos depois.

A extraordinariamente alta prevalência de microfilaremia de *M. ozzardi* em Feijó e Jandu Cachoeira é extremamente semelhante à relatada entre os indígenas da região oriental da Colômbia (Marinkelle & German, 1970) na qual *M. ozzardi* foi mais uma vez a única espécie de microfilária encontrada. Em contraste, a aldeia Yanomama do Marari diferiu de outras aldeias Yanomama na Venezuela meridional, na qual ambas *D. perstans* e *M. ozzardi* foram encontradas em expedições anteriores (Beaver *et al*, 1967). O aumento da idade do grupo específico em prevalência de microfilaremia (Tabela 2) está de acordo com observações de outrem (Marinkelle & German, 1970; Sasa, 1976).

Resultados de estudos de microfilaremia causada por *Wuchereria bancrofti*, *Brugia ma-*

*layi* e *Onchocerca volvulus* (Sasa, 1976) têm todos mostrado uma mais alta prevalência estatisticamente em adultos do sexo masculino do que em adultos do sexo feminino. Esta discrepância associada ao sexo não tem sido tão proeminente durante os anos de pré-puberdade e logo após a reprodução. Nossos resultados sugerem que talvez a discrepância observada entre as prevalências associadas ao sexo com as outras espécies de filárias reflita uma diferença quantitativa na intensidade da microfilaremia circulante.

Em recentes pesquisas de campo sobre microfilaremia, a tendência tem sido pegar amostras de sangue maiores para conseguir detectar níveis mais baixos de microfilaremia (Knott, 1939; Kessel, 1937; Desowitz, 1974). Estes métodos de concentração, os quais requerem pelo menos 1 ml de sangue periférico, podem parecer exagerados, mas realmente permitem uma quantificação. Apesar de não havermos apresentado dados de quantificação avaliáveis de nosso estudo, a pronta visibilidade das microfilárias sob baixo poder do microscópio permite que esta quantificação seja facilmente alcançável.

Os procedimentos de cultura de linfócitos descritos aqui foram feitos em condições de laboratório, mas os passos essenciais para diagnóstico de microfilárias poderiam ser consideravelmente abreviados e feitos sob condições de campo. Aqueles passos incluíram a lise hipotônica das células vermelhas do sangue e fixação de resíduos. As condições estéreis, temperatura de incubação e meio de cultura preciso que nós usamos foram ditados pelos requisitos para estudos cromossômicos dos linfócitos.

Esfregaços convencionais de sangue periférico são de grande valor para o malariologista e o nutricionista tropical. Pesquisas de campo com fins específicos para estudar filariose, entretanto, estão relatando cada vez mais a utilização de técnicas de concentração. Nossa estimativa do método alternado descrito aqui inclui vários fatores positivos. Ele requer apenas cerca de quatro vezes a quantidade de sangue de um esfregaço grosso convencional. Com o uso de apenas uma ou duas das várias lâminas úteis, dos resíduos da cultura, conse-

guimos detectar a microfilaremia em níveis, até 20 vezes mais baixos que os encontrados com esfregaços convencionais. Isto pode ter um valor especial em áreas de baixa ou nula prevalência. Além disso, após exame de lâminas não coradas, as positivas podem então ser seletivamente coradas para confirmação das espécies.

Neste trabalho, apresentamos achados representativos demograficamente, os quais podem servir como base para documentação futura de tentativas seculares em filarioses entre indígenas residentes nas aldeias brasileiras estudadas. Os achados demonstraram o valor potencial de um método alternado para diagnóstico da microfilaremia em trabalho no campo e sustentam o múltiplo propósito do uso de espécimes sanguíneos coletados em áreas endêmicas de filária.

#### SUMMARY

The prevalence of microfilaremia among a representative sample of the adolescents and adults in 13 Brazilian Amazon Indian villages was determined for July-August, 1976. With Giemsa-stained peripheral blood smears, preparations from peripheral blood lymphocyte cultures, or both, 533 persons aged 10 years and older and 68 children below age 10 were tested. *Mansonella ozzardi* was the only blood-borne microfilarial species found. Prevalence was highly village-specific. In four of 13 villages persons tested had no detectable microfilaremia by the methods used. In four other villages the overall prevalences for residents aged 10 years and older were in excess of 60% by one of the methods used. In villages where microfilaremia was documented only five (13%) of the total 38 children tested were positive. There was a general trend for prevalence to rise with increasing age. The ratio of the prevalence of microfilaremia among males to that among females was approximately 1.4:1 with peripheral blood smear test results but exactly 1:1 with the other method. In each of the five microfilaremia-positive villages tested using both methods, we detected a higher prevalence of microfilaremia with the preparations made from the lymphocyte culture studies.

#### BIBLIOGRAFIA

BEAVER, P.C.; NEEL, J.V. & ORIHIEL, T.C.

- 1967 — *Dipetalonema perstans* and *Mansonella ozzardi* in Indians of southern Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 25 : 263-265.

DESOWITZ, R.S.

- 1974 — The application of a membrane filter concentration method in filariasis surveys in the South Pacific area. WHO/FIL/74.131, 12 pp. (mimeogr.).

HERNANDEZ PIERETTI, O.

- 1955 — Nuevo foco filariano comprobado en Venezuela entre indios Uniquinas y Guarunos del Territorio Federal Delta Amacuro-nuevos casos de infestacion por *Mansonella ozzardi* y primeros casos de Acanthocheilonemiasis senalados en Venezuela. *Gac. Med. Caracas*, 62 : 39-51.

KESSEL, J.F.

- 1957 — An effective programme for the control of filariasis in Tahiti. *Bull. World Health Org.*, 16 : 633-664.

KNOTT, J.

- 1939 — A method for making microfilarial surveys on day blood. *Trans. Roy. Soc. Trop. M. Hyg.* 33 : 191-196.

MANSON, P.

- 1897 — On certain new species of nematode haematozoa occurring in America. *Brit. Med. J.*, 2 : 1837-1838.

MARINKELLE, C.J. & GERMAN, E.

- 1970 — Mansonelliasis in the Comisaria del Vaupes of Colombia. *Trop. Geog. Med.*, 22 : 101-111.

MORAES, M.A.P. & CHAVES, G.M.

- 1974 — Onchocerciasis in Brazil: New findings among the Yanomama Indians. *Bull. Pan Am. Health Org.*, 8 : 95-99.

ORIHIEL, T.C.

- 1967 — Infections with *Dipetalonema perstans* and *Mansonella ozzardi* in the aboriginal Indians of Guyana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 16 : 628-635.

OZZARD, A.J.

- 1897 — A supposed new species of *Filaria anguinis hominis* found in the interior of British Guiana. *Brit. Guiana M. Ann.*, 9 : 24-27.

RACHOU, R.G.

- 1957 — Distribuição geográfica das filarioses humanas no Brasil. *Rev. Brasil Malariol. D. Trop.*, 9 : 79-100.

SASA, M.

- 1976 — *Human Filariasis*. Baltimore. University Park Press, p. 670-673.

(Aceito para publicação em 30/3/79)