

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

TATIANE ALEXANDRE DE ARAÚJO

XENOMONITORAMENTO MOLECULAR PARA AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO  
VETORIAL POR *Wuchereria bancrofti* EM ÁREAS ENDÊMICAS DE FILARIOSE  
LINFÁTICA NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE/PE

RECIFE  
2015

Tatiane Alexandre de Araújo

XENOMONITORAMENTO MOLECULAR PARA AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO  
VETORIAL POR *Wuchereria bancrofti* EM ÁREAS ENDÊMICAS DE FILARIOSE  
LINFÁTICA NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE/PE

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado  
em Biociências e Biotecnologia em Saúde do  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães,  
Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do  
título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira  
Coorientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

RECIFE  
2015

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

- A663x Araújo, Tatiane Alexandre de.  
Xenomonitoramento molecular para avaliação da infecção vetorial por *Wuchereria bancrofti* em áreas endêmicas de filariose linfática na Região Metropolitana do Recife/PE / Tatiane Alexandre de Araújo. - Recife: [s.n.], 2015.  
72 p. : il., graf, tab.
- Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.  
Orientadora: Cláudia Maria Fontes de Oliveira.  
Coorientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres.
1. Filariose linfática - diagnóstico. 2. Reação em Cadeia da Polimerase - métodos. 3. *Culex*-parasitologia. 4. *Wuchereria bancrofti*. I. Oliveira, Cláudia Maria Fontes de. II. Ayres, Constância Flávia Junqueira. III. Título.

---

CDU 616.995.132


Tatiane Alexandre de Araújo

XENOMONITORAMENTO MOLECULAR PARA AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO  
VETORIAL POR *Wuchereria bancrofti* EM ÁREAS ENDÊMICAS DE FILARIOSE  
LINFÁTICA NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE/PE

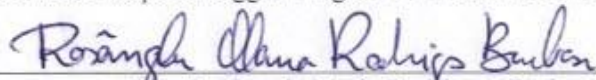
Dissertação apresentada ao curso de Mestrado  
em Biociências e Biotecnologia em Saúde do  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães,  
Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do  
título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 28/08/2015

BANCA EXAMINADORA:



\_\_\_\_\_  
Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- FIOCRUZ/PE (Orientadora)



\_\_\_\_\_  
Dra. Rosângela Maria Rodrigues Barbosa  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- FIOCRUZ/PE (Titular Interno)

\_\_\_\_\_  
Dr. Fábio Lopes de Melo  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- FIOCRUZ/PE (Titular Externo)

*À base da minha vida  
Minha família*

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha família, Mãe, Pai, Irmãos e sobrinha.

Às minhas avós que estão brilhando no céu.

Aos meus tios, tias e primos; presentes no meu dia a dia.

Às minhas orientadoras Dra. Cláudia Fontes e Dra. Constância Ayres, por todos os ensinamentos concedidos desde a iniciação científica, por estarem presentes na minha vida e por serem um exemplo a ser seguido;

A todos os amigos, que me ensinam o real sentido da palavra “amizade”;

A todos que fazem parte do Depto. de Entomologia, pela convivência, auxílio nos experimentos, risadas e conhecimentos compartilhados;

À banca por ter aceitado participar de minha defesa;

À Secretária de Saúde que forneceu o material indispensável para o desenvolvimento do projeto;

À Facepe pelo auxílio financeiro para execução do projeto;

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e Fundação Oswaldo Cruz, pela infra-estrutura concebida;

Ao Serviço de Referência de Controle de Culicídeos Vetores, pelas amostras e dados fornecidos;

A todos que contribuíram para o desenvolvimento do projeto e aos que me auxiliam, diariamente, no meu crescimento pessoal e profissional. Muito Obrigada!

ARAÚJO, Tatiane Alexandre. Xenomonitoramento molecular para avaliação da infecção vetorial por *Wuchereria bancrofti* em áreas endêmicas de filariose linfática na Região Metropolitana do Recife/PE. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

## RESUMO

A filariose linfática (FL) ou bancroftiana é uma doença parasitária causada por *Wuchereria bancrofti*, um verme filarial transmitido no Brasil pelo mosquito *Culex quinquefasciatus*. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) esta doença afeta 120 milhões de pessoas em 58 países. Portanto, para enfrentar a FL, a OMS lançou um programa global para eliminá-la até 2020 e o Brasil tornou signatário dessa proposta criando o Plano Nacional de Eliminação da Filariose Linfática (PNEFL). Atualmente, a Região Metropolitana do Recife (RMR) é uma área de importante transmissibilidade e, assim, foi preconizado o Tratamento Coletivo (TC) da população com o medicamento Dietilcarbamazina (DEC) e o controle vetorial para reduzir a transmissão da doença. Como ferramenta complementar, desde a vigilância até a verificação da eliminação, o xenomonitoramento molecular (baseado na PCR para detecção de *W. bancrofti* em mosquitos) é um importante método não invasivo para monitorar indiretamente se a transmissão de larvas de *W. bancrofti* está ocorrendo na população humana. A fim de verificar a taxa de infecção vetorial no mosquito *C. quinquefasciatus* pela *W. bancrofti* foram coletadas 43.981 fêmeas do mosquito em doze localidades na RMR. Além disso, foi desenvolvido um novo protocolo (PCR duplex) para o diagnóstico de infecção vetorial e o número ideal de fêmeas por *pools* foi estabelecido. Os resultados mostraram que Linha do Tiro (Recife), uma área com alto índice de microfilaremia na população humana, apresentou *status* de transmissão durante o TC com uma taxa de infecção vetorial de 0,80%, diferente das outras localidades com transmissão reduzida não foram detectados *pools* positivos. Portanto, observa-se que onde o TC é conduzido a taxa de infecção vetorial tende a ser reduzida. O xenomonitoramento molecular é um indicador importante para avaliação da eficiência das estratégias do PGEFL implantado em áreas endêmicas, até que ocorra a certificação da interrupção do ciclo de transmissão da filariose.

Palavras-chaves: Filariose, Reação em Cadeia da Polimerase, *Culex*, *Wuchereria bancrofti*, diagnósticos moleculares.

ARAÚJO, Tatiane Alexandre. Molecular xenomonitoring for the evaluation of vector infection rate by *Wuchereria bancrofti* in endemic areas for lymphatic filariasis in Metropolitan Region of Recife/PE. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

### ABSTRACT

Lymphatic filariasis (LF) or bancroftian filariasis is a parasitic disease caused by *Wuchereria bancrofti* which is a filarial worm transmitted in Brazil by *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. According to the World Health Organization (WHO), this disease affects 120 million people in 58 countries. In order to interrupt FL's transmission, WHO launched a global program with the purpose to eliminate the disease by 2020, and Brazil has signed this proposal by creating the National Plan for Elimination of Lymphatic Filariasis (NPELF). Currently, the Metropolitan Region of Recife (MRR) is an area with a significant transmissibility of lymphatic filariasis, and to reduce the transmission of this disease it was necessary both implement the Collective Treatment (CT) in the population with diethylcarbamazine (DEC) and control the vector responsible for its transmission. As a complementary tool, from the monitoring to the certification of disease's elimination, the use of molecular xenomonitoring which is based in PCR for detection of *W. bancrofti* in mosquitoes is an important non-invasive method to monitor indirectly the transmission of *W. bancrofti* larvae in human population. In order to evaluate the vector infection rate in *C. quinquefasciatus* samples by *W. bancrofti*, a total of 43.981 female mosquitoes were collected in twelve locations at the MRR. In addition, a new protocol (duplex PCR) was developed to assay for vectorial infection, and estimate the ideal number of females per pool. The results showed that Linha do Tiro (Recife) an area with high microfilaraemia rate in the human population displayed a vector infection rate of 0.80% during collective treatment, which is different from other places with limited transmission where no positive pools were detected. Therefore, it was observed that where CT is active, the vector infection rate tends to be reduced. In summary, the molecular xenomonitoring is an important tool to evaluate the efficiency of GPELF strategies employed in endemic areas, so this technique should be continued until the certification of the interruption of filariasis transmission.

Keywords: Filariasis, Polymerase Chain Reaction, *Culex*, *Wuchereria bancrofti*, molecular diagnostics.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Distribuição global da Filariose Linfática.	19
<b>Figura 2</b> - <i>Wuchereria bancrofti</i> : na forma de microfilária e de verme adulto.	21
<b>Figura 3</b> - Ciclo de transmissão da <i>Wuchereria bancrofti</i> em dois hospedeiros: vertebrado (homem) e invertebrado (mosquito).	22
<b>Figura 4</b> - Ciclo biológico de <i>Culex quinquefasciatus</i> (10-12 dias).	23
<b>Figura 5</b> - Os dois pilares do Programa Global para Eliminar a Filariose Linfática: interrupção da transmissão e manejo da morbidade e prevenção da incapacidade entre os portadores.	26
<b>Figura 6</b> - Medidas de controle para filariose, segundo o risco de ambiental e nível de endemicidade.	28
<b>Figura 7</b> - Configuração das Regionais por bairros em Jaboatão dos Guararapes .	29
<b>Figura 8</b> - Número de casos e taxa de detecção da filariose (100.000 hab) – Recife, 2003-2010.	31
<b>Figura 9</b> - Número de exames realizados e percentual de positividade de filariose. Pernambuco, 2009-2012.	32
<b>Figura 10</b> - Ferramentas de diagnóstico na vigilância pós-Tratamento.	35
<b>Figura 11</b> - Aspirador mecânico.	42
<b>Figura 12</b> - Separação, acondicionamento e registros das amostras de <i>Culex quinquefasciatus</i>	44
<b>Figura 13</b> – Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz UV para desenvolvimento da PCR duplex (Acequin/B1246).	49
<b>Figura 14</b> – Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz UV para desenvolvimento da PCR duplex (Act-2F/Act-8R).	50
<b>Figura 15</b> – Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz UV para revelar bandas diagnósticas em diferentes <i>pools</i> .	51
<b>Figura 16</b> – Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz UV para revelar bandas diagnósticas em <i>pools</i> diluídos (1:10).	51
<b>Figura 17</b> – Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz UV para revelar o limite de detecção de <i>W. bancrofti</i> através da PCR duplex.	52

- Figura 18** – Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz UV para revelar o limite de detecção de *W. bancrofti* através da PCR duplex. 53
- Figura 19** - Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz UV para revelar a presença de *W. bancrofti* em *C. quinquefasciatus* em Linha do Tiro (Recife). 54
- Figura 20** - Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz UV para revelar a ausência de *W. bancrofti* em amostras coletadas durante o TC. 54
- Figura 21** - Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz UV para revelar a ausência de *W. bancrofti* em amostras coletadas após o TC. 56

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Amostras coletadas durante o Tratamento Coletivo nos municípios de Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes.	43
<b>Quadro 2</b> - Amostras coletadas após o Tratamento Coletivo nos municípios de Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes.	43
<b>Quadro 3</b> - Descrição dos dois diferentes pares de <i>primers</i> testados na reação de PCR duplex.	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Índices de microfilaremia na população humana em áreas endêmicas na Região Metropolitana do Recife.	41
<b>Tabela 2</b> - Diagnóstico de infecção vetorial por <i>W. bancrofti</i> em amostras de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletadas na Região Metropolitana do Recife/PE durante o TC.	55
<b>Tabela 3</b> - Diagnóstico de infecção vetorial por <i>W. bancrofti</i> em amostras de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletadas na Região Metropolitana do Recife/PE após o TC.	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALB	Albendazol
ACS	Agente Comunitário de Saúde
ASA	Agentes de Saúde Ambiental
AOA	Agentes Operacionais de Apoio
AVA	Agente de Vigilância Ambiental
CMDE	Coordenação Municipal de Doenças Endêmicas
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DEC	Dietilcarbamazina
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
Fg	Fentograma
FL	Filariose Linfática
ICT CARD TEST	Teste Imunocromatográfico em Cartão
IVM	Ivermectina
L3	Larva Infectante (3º estágio)
Ls	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
MIV	Manejo Integrado de Vetores
MMPI	Manejo de Morbidade e Prevenção de Incapacidade
NASF	Núcleo de Apoio a Saúde à Família
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pará
PE	Pernambuco
Pb	Pares de bases

PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
pg	picogramas
PGEFG	Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática
PNEFL	Programa Nacional de Eliminação da Filariose Linfática
PSF	Programa de Saúde da Família
RMR	Região Metropolitana do Recife
SANAR	Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas
SRCCV	Serviço de Referência em Controle de Culicídeos Vetores
SRNF	Serviço de Referência Nacional em Filariose
SSO	Secretaria de Saúde de Olinda
TAS	Transmission Assessment Survey
TC	Tratamento Coletivo
TE	TRIS-EDTA
UV	Ultravioleta
VNO	Vírus do Nilo Ocidental
XM	Xenomonitoramento Molecular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL</b> .....	18
<b>2.1 Filariose linfática: Perfil epidemiológico e distribuição espacial</b> .....	18
<b>2.2 <i>Wuchereria bancrofti</i>: o verme causador da filariose linfática</b> .....	20
<b>2.3 <i>Culex quinquefasciatus</i></b> .....	22
2.3.1 Biologia.....	23
2.3.2 Importância na Saúde Pública.....	24
<b>2.4 Eliminação da Filariose Linfática</b> .....	25
2.4.1 Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL).....	25
2.4.2 Programa Nacional de Eliminação da Filariose Linfática (PNEFL).....	27
<b>2.5 Ações de Controle na Região Metropolitana do Recife</b> .....	27
2.5.1 Programa de Controle da Filariose em Olinda.....	28
2.5.2 Programa de Controle da Filariose em Jaboatão dos Guararapes.....	29
2.5.3 Programa de Controle da Filariose em Recife.....	30
<b>2.6 Programa de Enfrentamento às doenças negligenciadas (SANAR)</b> .....	31
<b>2.7 Diagnóstico da bancroftose</b> .....	32
2.7.1 Diagnóstico molecular.....	33
2.7.2 Diagnóstico vetorial.....	33
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	38
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	39
<b>4.1 Geral</b> .....	39
<b>4.2 Específicos</b> .....	39
<b>5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	40
<b>5.1 Áreas de estudo</b> .....	40

<b>5.2 Amostragem</b> .....	41
5.2.1 Amostras coletadas durante o Tratamento Coletivo (TC).....	42
5.2.2 Amostras coletadas após o Tratamento Coletivo (TC).....	43
<b>5.3 Separação, acondicionamento e registro das amostras de <i>C. quinquefasciatus</i></b> .....	44
<b>5.4 Otimização do tamanho do <i>pool</i> de mosquito</b> .....	44
<b>5.5 Extração de DNA total</b> .....	45
<b>5.6 Obtenção do DNA de <i>Wuchereria bancrofti</i></b> .....	45
<b>5.7 Desenvolvimento da PCR duplex</b> .....	46
<b>5.8 Ensaio de limiar de detecção duplex</b> .....	48
<b>5.9 Análise estatísticas dos dados</b> .....	48
<b>6 RESULTADOS</b> .....	49
<b>6.1 Desenvolvimento da PCR duplex</b> .....	49
<b>6.2 Otimização do tamanho do <i>pool</i> de mosquitos</b> .....	50
<b>6.3 Ensaio de limiar de detecção da PCR duplex</b> .....	52
<b>6.4 Xenomonitoramento dos mosquitos capturados na RMR</b> .....	53
6.4.1 Amostras coletadas durante o Tratamento Coletivo (TC).....	53
6.4.2 Amostras coletadas após o Tratamento Coletivo (TC).....	55
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	61
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62



## 1 INTRODUÇÃO

A filariose linfática (FL) é uma enfermidade endêmica em várias regiões tropicais do mundo causada por helmintos Nematoda das espécies *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori*. Estima-se que cerca de 789 milhões de pessoas habitem em áreas de risco de contrair a FL, e que existam 120 milhões de infectados no cenário mundial, sendo 90% por *W. bancrofti* (HOPPER et al., 2014; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015). Apesar do elevado número de pessoas atingidas, a FL é uma doença negligenciada no continente asiático, africano e americano em regiões notoriamente precárias em suas condições sanitárias e ambientais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006).

No continente americano, a filariose é causada especificamente pelo parasito *W. bancrofti* e tem como vetor primário o mosquito *Culex quinquefasciatus*, cujas características o torna mais eficiente que outros culicídeos (REGIS et al., 1996). É uma doença bastante antiga, já foi amplamente distribuída, mas a sua prevalência diminuiu gradativamente com o desenvolvimento e melhoria das condições sanitárias de vida, tornando-se restrita as comunidades carentes (BRASIL, 2009; MOLINARO et. al., 2012). A FL é reconhecida como doença negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Organização Pan-americana de Saúde (OPAS).

No Brasil, atualmente, cerca de 60 mil pessoas estão infectadas e aproximadamente três milhões de indivíduos residem em áreas consideradas de risco (MOLINARO et. al., 2012). Belém do Pará (Região Norte) e Maceió (Região Nordeste) são cidades brasileiras que recentemente deixaram de ser consideradas como focos ativos, através de dados atuais que mostram a interrupção da transmissão da parasitose. Porém, observa-se transmissão ativa em Recife, e em algumas cidades de sua região metropolitana, como Olinda, Jaboatão dos Guararapes e Paulista (BRASIL, 2009; ROCHA et al., 2010).

Em 1997, o Brasil estabeleceu o Plano Nacional de Eliminação da Filariose Linfática (PNEFL), cuja ação prioritária é o Tratamento Coletivo (TC) em áreas com prevalências da infecção > 1% (por microfílaemia ou antigenemia) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011). Na Região Metropolitana do Recife, a partir de 2002, foi implantado o controle da densidade populacional do mosquito vetor *C. quinquefasciatus* e em 2003 foi iniciado o TC. Até 2020, a OMS e a OPAS visam eliminar a FL como problema de saúde pública no mundo, visto que é uma doença potencialmente eliminável (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2001).

Ferramentas de monitoramento vêm sendo desenvolvidas e testadas em campo, para verificar a interrupção do ciclo de transmissão da filariose (ALMEIDA, 2008). A decisão sobre a continuidade ou finalização do TC nas áreas endêmicas é fundamental para os gestores dos programas. Se o tratamento coletivo for interrompido prematuramente, poderá ocorrer a recrudescência das infecções e introduzi-lo novamente pode ser extremamente difícil por razões logísticas e financeiras (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013; REBOLLO; BOCKARIE, 2013; WEIL; RANZY, 2007). Portanto, como parte da avaliação da OMS, tem-se recomendado o Xenomonitoramento Molecular (XM, a detecção de DNA filarial em mosquitos) que consiste em uma ferramenta sensível para fornecer dados sobre a infecção natural dos vetores e pode ser utilizada como indicativo indireto da prevalência de parasitas na população humana (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

A detecção da infecção vetorial por *W. bancrofti* é tradicionalmente feita pela dissecação do mosquito e posterior análise microscópica. Furtado et al. (1997) mostram que a reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma metodologia sensível, rápida e específica na detecção deste verme em amostras de *C. quinquefasciatus*. Chansiri e Phantana (2002) demonstraram que a PCR foi sensível para se detectar a presença de 10 pg de DNA de *W. bancrofti*. Nos ensaios de amplificação, podem-se utilizar diferentes alvos na mesma reação (PCR multiplex) para maior confiabilidade dos resultados. O DNA do mosquito como alvo na reação funciona como controle endógeno para provar a qualidade do material extraído e, assim minimizar os resultados falsos negativos. O método de diagnóstico molecular por PCR também é elencado nas avaliações entomológicas para a filariose pelo Plano Integrado de Ações Estratégicas 2011-2015 na análise de indicadores de monitoramento e avaliação para redução das cargas das doenças em eliminação (BRASIL, 2013).

O emprego do xenomonitoramento molecular como uma ferramenta complementar desde a vigilância até a verificação, traz mais um elemento para potencializar o acompanhamento das ações de eliminação da FL no Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL). Sendo assim, esse estudo teve como objetivo o uso do xenomonitoramento molecular para avaliar a infecção vetorial de *Culex quinquefasciatus* por *Wuchereria bancrofti* em áreas endêmicas de filariose na Região Metropolitana do Recife.

## 2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

### 2.1 Filariose Linfática: Perfil epidemiológico e distribuição espacial

A Filariose Linfática (FL) é uma infecção parasitária causada por helmintos da classe Nematoda das espécies *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori*. Desses três nematóides, a *W. bancrofti* é responsável por mais de 90% dos casos de infecção filarial no mundo. A FL destaca-se como um problema de saúde pública e em áreas endêmicas a prevalência da infecção aumenta continuamente. Isso ocorre principalmente pelo crescimento rápido e desordenado dos centros urbanos e pela criação de condições ideais para a multiplicação dos focos de mosquitos transmissores (DREYER et. al, 2005; SIMONSEN; MWAKITALU, 2013).

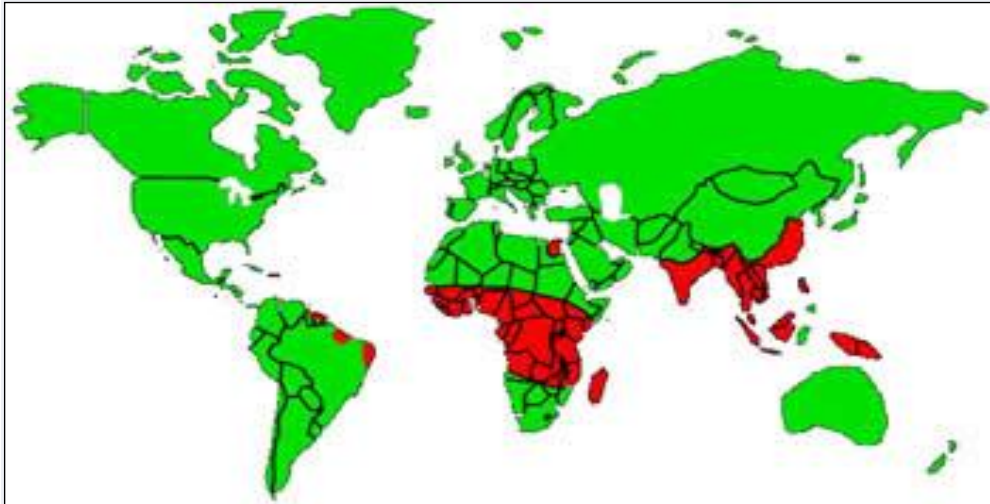
A Organização Mundial de Saúde (OMS) contabiliza que a filariose é umas das maiores causas de incapacidade físicas permanentes ou de longo prazo, com 120 milhões de pessoas infectadas no mundo (BRADY, 2014; MATTOS; DREYER, 2008). Ocorrem apresentações crônicas (hidrocele, linfedema, quilúria e mais raramente eosinofilia pulmonar tropical - EPT), agudas (linfadenite, linfangite, dentre outras) e assintomáticas (ADDIS; BRADY, 2007; BRASIL, 2009). Estima-se que de 15 a 20% dos indivíduos infectados possam evoluir para doença filarial (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1992). Aproximadamente 40 milhões de pessoas apresentam formas crônicas da doença, 25 milhões de homens sofrem de patologia genital (mais comumente hidrocele) e 15 milhões de pessoas (a maioria delas mulheres) têm linfedema ou elefantíase nos membros inferiores (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015).

A transmissão da filariose apresenta como características marcantes do seu ciclo evolutivo a obrigatoriedade de um estágio de maturação empregando artrópodes (hospedeiros intermediários) e também um período de desenvolvimento com atividade reprodutora no hospedeiro definitivo, o homem (presença de vermes adultos nos vasos linfáticos e microfilárias na circulação sanguínea) (BRASIL, 2009).

Atualmente, em torno de 789 milhões de indivíduos distribuídos em 58 países residem em regiões de risco de contrair a enfermidade (HOOPER et. al., 2014). Uma porcentagem de 65% das pessoas infectadas é encontrada no Sudeste da Ásia, 30% no continente africano e os 5% restantes em outras áreas tropicais (Figura 1). Entre os países de maior endemicidade, encontram-se Bangladesh, Costa do Marfim, República Democrática do Congo, Índia,

Indonésia, Myanmar, Nigéria, Nepal, Filipinas e República Unida da Tanzânia (BRADY, 2014; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015).

**Figura 1** - Distribuição global da Filariose linfática.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2013).

Legenda: Predominância de FL nas regiões tropicais e subtropicais (em vermelho).

Nas Américas, os focos de transmissão ativa são encontrados no Haiti, República Dominicana, Guiana e Brasil, já na Costa Rica, Suriname e Trindade-Tobago, áreas que historicamente apresentavam alto perfil de endemicidade, a transmissão foi considerada interrompida (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2014). Dentre estes países, o Haiti é o país com maior concentração de infecção filarial, com 80% da população total sob o risco de infecção, contribuindo com cerca de 70% da população total sob esse risco nas Américas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006, 2012).

No Brasil, durante a década de 50, foi realizado um inquérito hemoscópico em 24 estados brasileiros, alcançando 852 localidades num total de 811.361 pessoas e, paralelamente foi feito um inquérito entomológico através da dissecação de 120.399 diferentes espécies de mosquitos em 12 estados estudados. A distribuição ativa foi confirmada em 11 cidades ao longo de oito estados e essas áreas foram consideradas como “focos da filariose”: São José da Ponta Grossa-SC, (14,5%); Belém-PA, (9,8%); Barra de Laguna-SC, (9,4%); Recife-PE, (6,9%); Castro Alves-BA, (5,9%); Florianópolis-SC, (1,4%); São Luis-MA, (0,6%); Salvador-BA, (0,4%); Maceió-AL, (0,3%); Manaus-AM, (0,2%) e Porto Alegre-RS, (0,1%). (RACHOU, 1960; BRAUN, 2002). O mapeamento dos focos endêmicos e o tratamento de pessoas microfilarêmicas, na década de 1980, consideraram como extintos quase todos os focos de FL no Brasil, concluindo que a endemia estava sendo controlada de forma satisfatória.

Entretanto, estudos epidemiológicos realizados na cidade de Recife indicaram que a redução verificada pelo Ministério da Saúde na taxa média de prevalência da cidade, não se mantinha quando se analisava separadamente cada bairro (MORAIS, 1982). Bem como identificou falhas no processo de coleta quanto ao horário inadequado, à quantidade insuficiente e imprecisa das amostras de sangue utilizadas nas lâminas de gota espessa, o que poderiam ter contribuído para sub-dimensionar o problema da filariose na cidade. A imprecisão de informações sobre o percentual de adesão dos indivíduos microfilarêmicos ao tratamento e o largo intervalo entre os inquéritos trouxeram sérias limitações ao programa. O mesmo foi observado em um relatório do Comitê de Especialistas em Filariose da OMS, em 1983, quando foram identificadas falhas nos programas de controle desenvolvidos nos diversos países endêmicos e apontava a estrutura verticalizada como uma das causas da expansão da endemia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1984).

Um relatório epidemiológico, realizado pelo Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), em várias áreas do Recife entre os anos de 1989 e 1991, identificou valores de prevalência variando entre as microrregiões de 0,6% até 14,9%, e uma média geral da cidade de 6,5% (MACIEL et al., 1996), nível de endemicidade semelhante ao observado por Rachou, na década de 50. Em Olinda, os inquéritos revelaram índices de microfilaremia maiores que os de Recife, com 12,3% de prevalência (MACIEL et al., 1994).

Recentemente, no país, a transmissão ativa da filariose é restrita ao estado de Pernambuco, especificamente na Região Metropolitana do Recife (RMR) (Recife, Olinda, Jaboatão dos Guararapes e Paulista). As cidades Maceió (Alagoas) e Belém (Pará) com alta endemicidade no passado a transmissão foi considerada interrompida e a população permanece constantemente em observação (FONTES et al., 2012; FREITAS et al., 2008;).

## **2.2 *Wuchereria bancrofti*: o verme causador da filariose linfática**

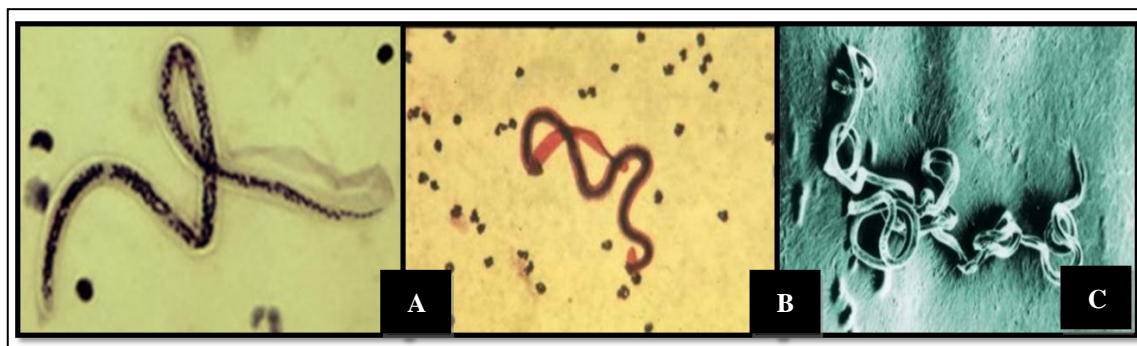
A espécie *Wuchereria bancrofti* pertence à classe Nematoda, superordem Spirurida, família Onchocercidae e gênero *Wuchereria*. Os potenciais vetores desse verme são os mosquitos do gênero *Culex* (principalmente na Ásia e Américas), *Anopheles* (em áreas rurais da África e em outras regiões) e *Aedes* (em ilhas do Pacífico) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015).

*Wuchereria bancrofti* apresenta ciclo evolutivo do tipo heteroxeno, que compreende um estágio de maturação no hospedeiro invertebrado (mosquito vetor) e um período de desenvolvimento com atividade reprodutora no hospedeiro vertebrado (homem). Esses

vermes na forma adulta apresentam um corpo cilíndrico, longo, branco translúcido e recoberto por uma delicada cutícula e se alojam no sistema linfático, onde são encontrados enrolados em novelos, provocando inflamações que dificultam a circulação da linfa (NEVES, 2005). Apresentam dois diferentes sexos: a fêmea, cujas dimensões são de 7 a 10 cm de comprimento com 0,3 mm de diâmetro e o macho que possui em média 4 cm de comprimento com 0,1 mm de diâmetro (Figura 2) (NEVES, 2005; REY, 1991).

Os helmintos se instalam no hospedeiro vertebrado principalmente na cavidade peritoneal, pélvica (pernas e escrotos), mamas, braços e no cordão espermático (REY, 1991; BRASIL, 2009). A longevidade do verme adulto é de 6 a 8 anos e através do acasalamento são produzidas milhares de larvas minúsculas (microfilárias) que circulam por movimentos ativos no sangue. As microfilárias (Figura 2) medem cerca de 250 a 300  $\mu\text{m}$  e se desenvolvem em mosquitos hematófagos, principalmente do gênero *Culex*, que funciona como hospedeiro intermediário. O inseto hematófago ao sugar o sangue do indivíduo parasitado ingere as larvas do estágio L1 e após alguns dias estas migram para os músculos torácicos e sofrem maturação até o estágio infectante (terceiro estágio - L3). Os mosquitos ao fazerem um novo repasto sanguíneo liberam as larvas L3 que por movimentos ativos penetram na pele do homem e migram para os linfonodos mais próximos. As larvas sofrem maturação até a forma adulta (Figura 2) e ao encontrar um verme do sexo oposto no mesmo vaso linfático copulam e produzem novas microfilárias. (Figura 3) (BRASIL, 2009). Geralmente as filárias são encontradas durante o dia nos capilares profundos e no período noturno no sangue periférico do hospedeiro vertebrado (entre 23:00h e 01:00h), característica denominada de periodicidade noturna e encontrada em regiões tropicais e subtropicais. Em outras localidades, como Tailândia e Ilhas do Pacífico Sul, o pico microfilarêmico ocorre próximo às 20:30 h e em torno das 16:00 h, respectivamente (BRASIL, 2009; HARINASUTA et al., 2000).

**Figura 2** - *Wuchereria bancrofti*: na forma de microfilária e de verme adulto.

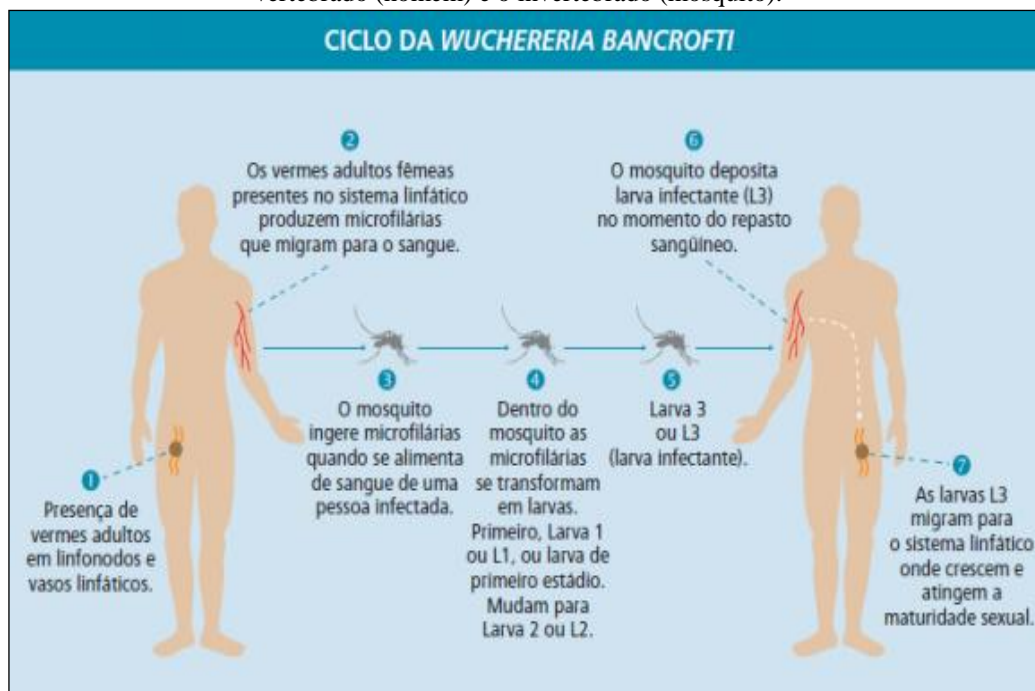


Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2013); REY (1999).

Legenda: A e B: microfilária em sangue humana; C: na forma adulta.

O ciclo completo do verme no mosquito é de 15 a 20 dias, já no homem tornam-se adultos entre 7 e 8 meses, atingindo a sua maturidade sexual em aproximadamente 1 ano (FONTES; ROCHA, 2005).

**Figura 3** - Ciclo de transmissão da *Wuchereria bancrofti* em dois hospedeiros: vertebrado (homem) e o invertebrado (mosquito).



Fonte: Brasil (2009).

### 2.3 *Culex quinquefasciatus*

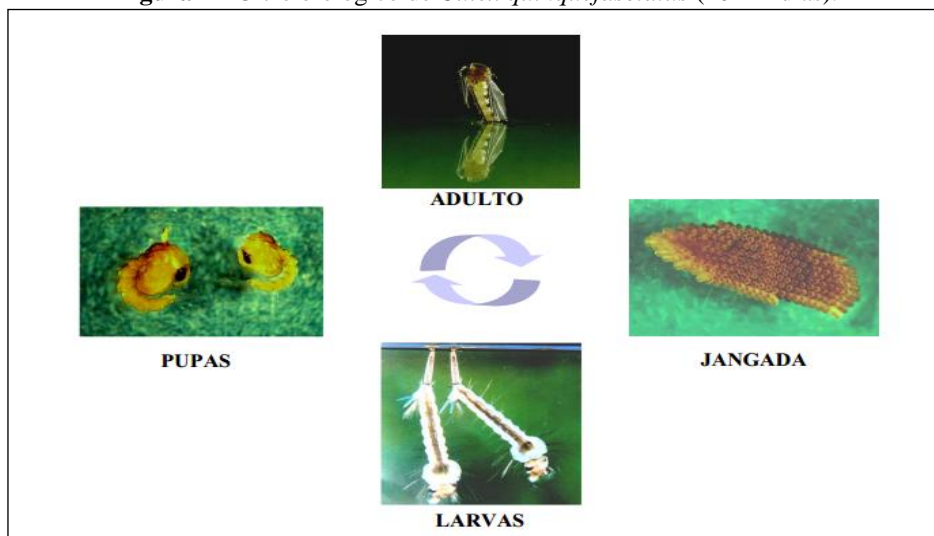
*Culex quinquefasciatus* é um inseto da ordem Diptera, pertencente à família Culicidae, com distribuição é considerada trópico-cosmopolita ocorrendo nas porções meridionais da Ásia, na África, nas Américas (do sul dos E.U.A ao norte da Argentina) e na Oceania. No Brasil, a sua ocorrência é ampla e, sua distribuição e abundância são influenciadas pela presença humana e urbanização (FORATTINI et al., 2002). *C. quinquefasciatus* é uma espécie de hábito endofílico que facilmente compartilha o espaço antrópico. Seu ciclo de vida é curto e apresenta elevada fecundidade em ambientes que o favorecem apresentar elevadas densidades populacionais (BEATY; MARQUARDT; OLIVEIRA, 1996). No Brasil, existem várias localidades com condições sanitárias bastante comprometidas, como são as favelas e os cotiços, onde são elevados os números de fossas e valetas a céu aberto, esse tipo de estrutura urbana desorganizada potencializa as áreas de preferenciais para sua criação e, consequentemente

eleva sua densidade populacional (ALBUQUERQUE, 1993; SIMONSEN; MWAKITALU, 2013).

### 2.3.1 Biologia

*Culex quinquefasciatus* apresenta um ciclo biológico com duração média de 10 a 12 dias, desde a eclosão das larvas até a emergência do adulto. Apresenta quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (Figura 4). Suas fêmeas necessitam fazer o repasto sanguíneo para realizar a postura de ovos, sendo preferencialmente antropofílicas, embora possam realizar a hematofagia em aves ou em outros animais. Vivem em áreas domiciliares durante o dia e à noite, são preferencialmente estimuladas para fazer o repasto sanguíneo entre às 23:00h e 01:00h. Após a alimentação sanguínea, a fêmea tem seu peso corporal aumentado o que reduz a atividade de vôo. Seus ovos são depositados diretamente na lâmina d'água dos criadouros. Em cada postura a fêmea pode ovipositar cerca de 150 ovos agrupados em forma de uma jangada. Aproximadamente 48h após a oviposição, ocorre à eclosão das larvas do 1º estágio (L1), as quais sofrem mudas passando para os demais estádios de larva (L2, L3 e L4). As pupas resultam da metamorfose sofrida pela L4 e nesta fase ocorrem profundas transformações que resultam na emergência domosquito (forma alada). A longevidade dos mosquitos adultos pode durar até dois meses, período em que a fêmea pode realizar entre 4 e 5 oviposições (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

**Figura 4** - Ciclo biológico de *Culex quinquefasciatus* (10 -12 dias).



Fonte: Barbosa (2007).

Legenda: Após a postura dos ovos em forma de jangada, as larvas eclodem e passam por quatro estádios transformam-se em pupas, formas que não se alimentam e, após 48h, ocorre a emergência do adulto.



A espécie *C. quinquefasciatus* tem grande importância na saúde pública, uma vez que, tem sua presença notificada em várias partes do mundo e pode ser vetor de agentes etiológicos de doenças humanas. Nas Américas, é o único mosquito reconhecidamente implicado na transmissão da bancroftose (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; REGIS et al., 1996). Sua predileção pelo sangue humano e sua hematofagia durante o período da noite facilitam o contato com a *W. bancrofti* (apresenta periodicidade noturna), tornando-o mais eficiente na transmissão desse filarídeo entre os culicídeos (BRASIL, 2009).

*Culex quinquefasciatus* também está incriminado na transmissão de arbovírus a hospedeiros humanos, a exemplo do vírus de Saint Louis, que circula nos Estados Unidos e o vírus do Oropouche, que ocorre no norte do Brasil (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). No Brasil, até o ano de 2005, foram identificados apenas três casos de encefalite St. Louis (dois na região Norte, na década de 70, e o terceiro no estado de São Paulo em 2004) (SÃO PAULO, 2006). Outro exemplo é a transmissão da encefalite causada pelo Vírus do Nilo Ocidental (VNO), um arbovírus da família Flaviviridae, que tem como reservatório principal algumas espécies de aves migratórias. A doença acomete humanos, aves, cavalos e outros mamíferos. Desde sua introdução na América do Norte em 1999, quase 36 mil casos humanos da infecção pelo vírus foram reportados nos Estados Unidos, resultando em mais de 1.400 casos fatais e aproximadamente 41% dos casos apresentaram doença neuroinvasiva, forma mais severa da infecção (BRASIL, 2005; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012; CORRÊA; VARELLA, 2008). O Brasil apresenta condições propícias para introdução e circulação do vírus no país, visto que *C. quinquefasciatus* é abundante, além de ser rota de uma grande quantidade de aves migratórias originárias de outros países das Américas (LUNA et al., 2003). Atualmente foi relatado um evento isolado de Febre do Nilo Ocidental em humanos, portanto é necessária a realização de inquéritos objetivando o fortalecimento da vigilância no país (BRASIL, 2014).

Além de seu papel como vetor de agentes etiológicos causadores de doenças ao homem, *C. quinquefasciatus* pode causar problemas à população, pois gera um forte incômodo causado pelas picadas e sons emitidos, contribuindo para a diminuição da qualidade de vida. Em situações de elevada exposição às picadas, alguns indivíduos são geralmente mais suscetíveis aos processos alérgicos, e podem apresentar ulcerações na pele ou dermatites (BRASIL, 2011).

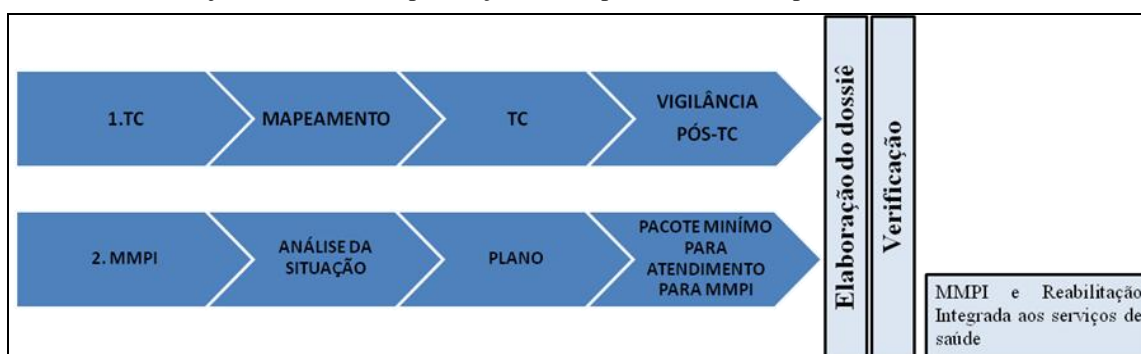
## 2.4 Eliminação da Filariose Linfática

### 2.4.1 Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL)

Em 1997, a Quinquagésima Assembléia Mundial da Saúde adotou uma resolução (nº50.90) para eliminar a filariose linfática como problema de saúde pública até o ano de 2020, por ser uma das enfermidades mais prevalentes, debilitante e com perfil de potencialmente ser eliminada (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010; OTTESEN et al., 1997). Em decorrência disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu o Programa Global para Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL) para ajudar os Estados membros a atingir esta meta. Os dois componentes pilares do PGEFL são: reduzir a prevalência de infecção para níveis em que, supostamente, não pode ser mantida a transmissão e manejar a morbidade e prevenir a incapacidade (Figura 5). O manejo da morbidade contribui para aliviar e reduzir o sofrimento e deficiência causada pela doença, através de melhores condições de higiene oferecidas à população nas áreas afetadas. As infecções bacterianas e fúngicas foram identificadas como determinantes primários na formação do linfedema e elefantíase (BRASIL, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2013), para eliminar a FL é recomendado o mapeamento da distribuição geográfica da doença, o Tratamento Coletivo (TC) da população humana com drogas anti-helmínticas, vigilância pós-TC e verificação da eliminação (Figura 5). O TC é preconizado com doses anuais ou semestrais de Dietilcarbamazina (DEC), Ivermectina (IVM) ou Albendazol (ALB) durante um período de 4 a 6 anos. O PGEFL, entre 2000-2012, distribuiu mais de 4,4 bilhões de tratamentos quimioterápicos para aproximadamente 900 milhões de indivíduos acometidos pela doença, reduzindo consideravelmente a transmissão em muitos lugares (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

**Figura 5** - Os dois pilares do Programa Global para Eliminar a Filariose Linfática: interrupção da transmissão e manejo da morbidade e prevenção da incapacidade entre os portadores.



Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2013.

Legenda: Tradução nossa. 1. TC: Tratamento Coletivo; 2. MMPI: Manejo de Morbidade e prevenção de incapacidade.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2013) em 2012, 56 dos 73 países endêmicos já tinham iniciado o tratamento em massa e 13 países já tinham completado, pelo menos, cinco rodadas de medicamentos. A OMS acredita que em 2017, 70% de todos os países endêmicos terão cumprido os critérios para cessar as intervenções e terá entrado na pós-intervenção (TC) ou fase de vigilância. Já em 2020, todos os países endêmicos terão sido verificados como livres da transmissão ou terá entrado na fase de vigilância.

De acordo com o regime estabelecido pela OMS, o monitoramento e avaliação efetiva após os tratamentos coletivos, são necessários para atingir a meta de eliminação da FL. Os programas devem avaliar se as medidas de controle reduziram a prevalência da infecção a um nível em que a transmissão provavelmente não será mais sustentável. Portanto, a OMS publicou uma metodologia padrão, sobre a pesquisa de avaliação da transmissão (*Transmission Assessment Survey* - TAS) que tem como objetivo orientar a verificação e o reconhecimento oficial para decidir sobre a continuidade ou finalização do TC em um programa nacional (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012). As pesquisas devem ser repetidas ao menos duas vezes por ano após os TCs, com intervalos de 2 a 3 anos, para assegurar que a recrudescência não tenha ocorrido e que a transmissão possa ser considerada interrompida. A população alvo da pesquisa são crianças entre 6 e 7 anos de idade pelo fato de supostamente terem sido protegidas de infecção caso o TC tenha sido sucedido na interrupção da transmissão. Portanto, neste grupo etário, os testes com resultados positivos normalmente indicam infecções recentes. Porém se faz necessário futuras abordagens à vigilância pós-TC embasadas em instrumentos diagnósticos que serão padronizados e complementar ao TAS para verificação de eliminação da transmissão (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015).

#### 2.4.2 Programa Nacional de Eliminação da Filariose Linfática (PNEFL)

Baseado no Plano Global, o Brasil estabeleceu um Plano Nacional de Eliminação da Filariose Linfática (PNEFL), cuja ação prioritária permaneceu o TC com a DEC na posologia de 6mg/Kg/dia durante 12 dias, em áreas onde as prevalências da infecção humana pelo verme é  $\geq 1\%$  por microfilaremia (pela técnica de gota espessa) ou antigenemia (pelo cartão ICT) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005). Essa ação tem o intuito de reduzir a prevalência de microfilarêmicos para um percentual inferior a 0,1%. O PNEFL tem sido realizado através de triagens dos pacientes casa a casa ou nas unidades de coleta nos bairros considerados endêmicos para detectar e tratar as pessoas com infecção ativa, que apresentam microfilárias e/ou vermes adultos (BRASIL, 2009). Em cada localidade, são definidas populações elegíveis e não elegíveis para TC. Consideram-se como população elegível os indivíduos a partir de 4 anos de idade de ambos os sexos e não elegíveis, os indivíduos menores de 4 anos e maiores de 65 anos de idade, gestantes, mulheres no período de lactação e portadores de doenças crônicas (cardiopatas e renais crônicos) (ROCHA et al., 2010).

#### 2.5 Ações de Controle na Região Metropolitana do Recife

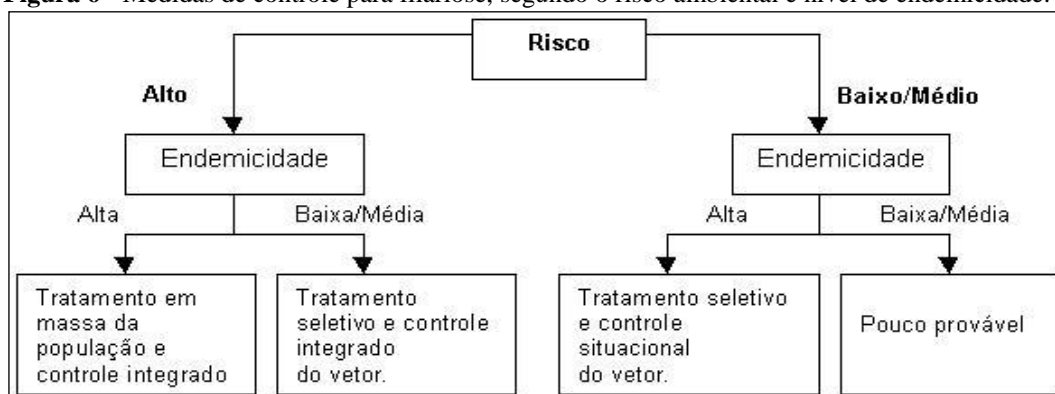
Na Região Metropolitana do Recife (RMR), o TC teve início no município de Recife no ano de 2003, no bairro de Santa Terezinha, com população elegível de 23.510 com cobertura de 96% que correspondeu a 22.567 pessoas tratadas (LIMA et al., 2007). No município de Olinda o TC iniciou em 2005 no bairro Alto do Sol Nascente, com população elegível de 5.088 e cobertura de 90% (4.579 indivíduos tratados) (ROCHA et. al., 2010). Em Jaboatão dos Guararapes a intervenção coletiva foi iniciada em 2006 nos bairros Alto e Baixo da Colina com a população existente de 9.395 e população alvo de 4.579 (cobertura de 57,50%) (SANTOS NETO, 2012). A administração em massa com a DEC é preconizada na RMR para as comunidades sob risco de transmissão da filariose residentes em áreas focais onde a prevalência de pessoas microfilarêmicas se situa acima de 1% (BRASIL, 2013). Nas áreas de alto risco ambiental de transmissão, além do tratamento antiparasitário, instituíram-se estratégias de controle vetorial. O Programa de Controle da Filariose estabeleceu um subprograma para o controle do vetor, através da utilização do controle biológico com larvicidas à base da bactéria entomopatogênica *Lysinibacillus sphaericus* nos criadouros de *Culex* que são agentes biológicos para o combate de culicídeos devido à eficácia da interação de suas toxinas com receptores encontrados na membrana apical do epitélio intestinal das

larvas, levando-as a morte (DE MELO et al., 2008). O subprograma teve início em 2003 nas localidades de Água Fria e do Alto Santa Terezinha (Recife) com cerca de 15.000 habitantes cada. As ações também foram ampliadas para outros focos endêmicos localizados nos municípios de Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes (PROGRAMA DE CONTROLE DA FILARIOSE NO RECIFE, 2002; SILVA-FILHA et al., 2008).

### 2.5.1 Programa de Controle da Filariose em Olinda

Em Olinda, no ano de 1999, baseados no modelo de intervenção elaborado por Albuquerque e Moraes (1997), foram realizados inquéritos de campo pelo CPqAM, FIOCRUZ e pela Secretaria Municipal de Saúde com o objetivo de determinar os níveis de endemicidade da FL nos diferentes estratos urbanos, segundo o risco ambiental. A partir destes inquéritos observou-se que a prevalência de microfilarêmicos variava de 0,2% (no Bairro Rio Doce) a 9,2% (no bairro Alto da Conquista) em diversos bairros do município e posterior a esses dados definiu as áreas de prioridade. As áreas foram divididas em quatro níveis: **prioridade 1** (alto/médio risco ambiental e de transmissão reconhecida); **prioridade 2** (médio/baixo risco ambiental e de transmissão reconhecida); **prioridade 3** (baixo risco ambiental e de transmissão não reconhecida) e **prioridade 4** (baixo risco e sem transmissão) (Figura 6) (BRAGA, 2001).

**Figura 6** - Medidas de controle para filariose, segundo o risco ambiental e nível de endemicidade.



Fonte: Braga (2001).

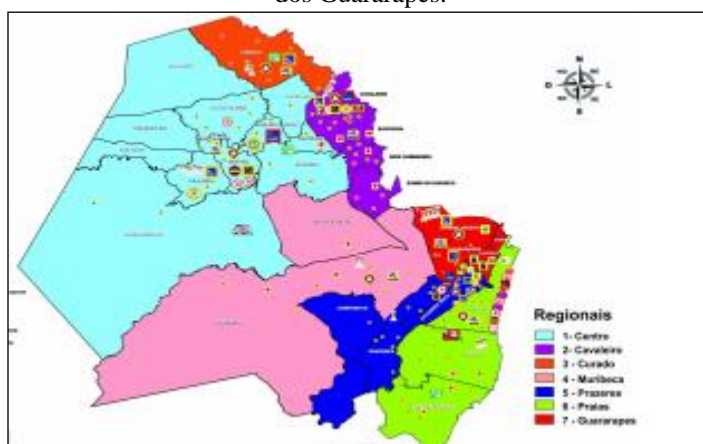
A situação de alto risco de transmissibilidade foi observada em 14 bairros: Alto da Bondade, Alto da Conquista, Sapucaia, Águas Compridas, Salgadoinho, Área Rural, Alto Sol Nascente, São Benedito, Peixinhos, Caixa d'Água, Aguazinha, Sítio Novo, Varadouro e Passarinho. No ano de 2007, foi criada em Olinda a Coordenação Municipal de Doenças

Endêmicas (CMDE), com a missão de planejar e operacionalizar as ações de controle, vigilância e monitoramento de filariose, tuberculose, dengue e hanseníase. No âmbito da CMDE, as ações de controle buscam reduzir as taxas de microfilaremia para menos de 1% da população nas áreas de prioridade 1, onde se encontra alto risco ambiental e elevada transmissibilidade (ROCHA et al., 2010).

### 2.5.2 Programa de Controle da Filariose em Jaboatão dos Guararapes

O município de Jaboatão dos Guararapes está dividido politicamente em sete Regionais (Figura 7), na qual a Regional Centro (I), Regional Cavaleiro (II), Regional Prazeres (V) e Regional Guararapes (VII) possuem áreas com focos de transmissão da doença, pacientes com morbidade, além de baixa cobertura de saneamento. Para operar o Programa Municipal de Controle da Filariose é incluído as atividades de busca ativa e passiva de pacientes através do método de gota espessa, TC em áreas endêmicas, controle vetorial, educação ambiental e acompanhamento dos casos de morbidade (SANTOS NETO, 2012).

**Figura 7** - Configuração das Regionais por bairros em Jaboatão dos Guararapes.



Fonte: Santos Neto (2012).

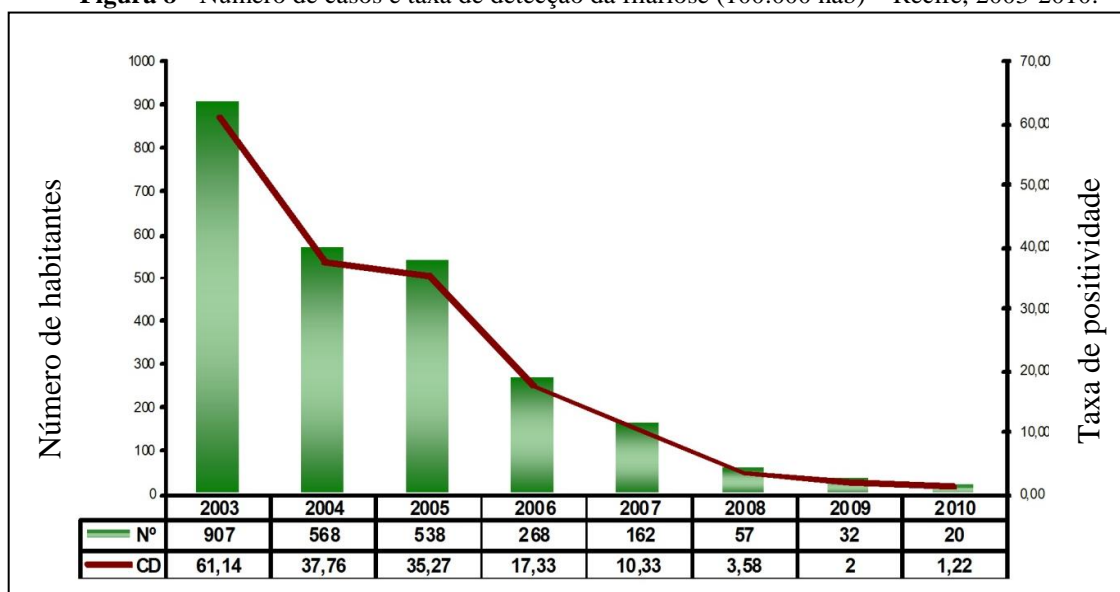
As áreas denominadas de alta/média/baixa endemicidade em Jaboatão dos Guararapes foram avaliadas inicialmente de acordo com o inquérito por gota espessa realizados pelo Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães entre os anos de 1999 e 2001 nos diferentes distritos do município (SANTOS NETO, 2012). Posteriormente foi realizado um inquérito epidemiológico na qual foram examinadas 23.673 pessoas, identificando-se 323 casos de microfilaremia (1,4%) (BONFIM et al., 2009). No distrito de Cavaleiro (atual Regional II) foram avaliados 9.520 residentes dos 12 bairros, detectando-se 213 microfilarêmicos (2,2%)

em 11 desses bairros (BONFIM et al., 2002). O primeiro Tratamento Coletivo foi realizado em 2006 nas localidades de Alto da Colina e Baixa da Colina, no bairro de Cavaleiro; ampliado em 2011 para Quintandinha, no bairro de Socorro e Retiro, no bairro de Sucupira (SANTOS NETO, 2012).

### 2.5.3 Programa de Controle da Filariose em Recife

A prefeitura do Recife, em 2001, priorizou as políticas públicas de intervenção sobre a FL através da Secretaria de Saúde e estabeleceu um Programa de Eliminação da Filariose Linfática com abordagem individual ou coletiva de acordo com o nível de prevalência da infecção na população. A partir de informações obtidas em um inquérito epidemiológico (1999-2000), que determinou a presença da FL e sua distribuição espacial no município, foram identificadas áreas com elevadas prevalências de infecção filarial, consideradas como núcleo de transmissão da doença no município e onde o TC foi implantado (RECIFE, 2002; SANTOS, 2005).

O programa de Controle em Recife foi iniciado em 2003 em bairros de maior prevalência, quando existia cerca de 910 casos da filariose no município. Primeiras localidades tratadas foram Água Fria, Alto Santa Teresinha, Campo Grande, Brejo de Beberibe, Passarinho e Alto José Bonifácio com a criação do Programa *Xô Filariose*. A Prefeitura do Recife expandiu o tratamento em massa em 2008 para outros bairros que apresentavam uma prevalência menor. Foram incluídos os seguintes bairros: Ilha de Joana Bezerra, Cabanga, Santo Amaro, Linha do Tiro, Mustardinha, Mangueira, Afogados e Nova Descoberta que foram tratados até 2012. Dados entre 2003 e 2010 provenientes da Secretaria de Saúde apontam êxitos importantes no que diz respeito ao declínio da endemicidade de filariose no Recife (Figura 8) (ALBUQUERQUE et al., 2013).

**Figura 8** - Número de casos e taxa de detecção da filariose (100.000 hab) – Recife, 2003-2010.

Fonte: Albuquerque et al. (2013).

Legenda: Nº: Número de casos positivos; CD: Percentual de infectados com microfilária de *W.bancrofti*.

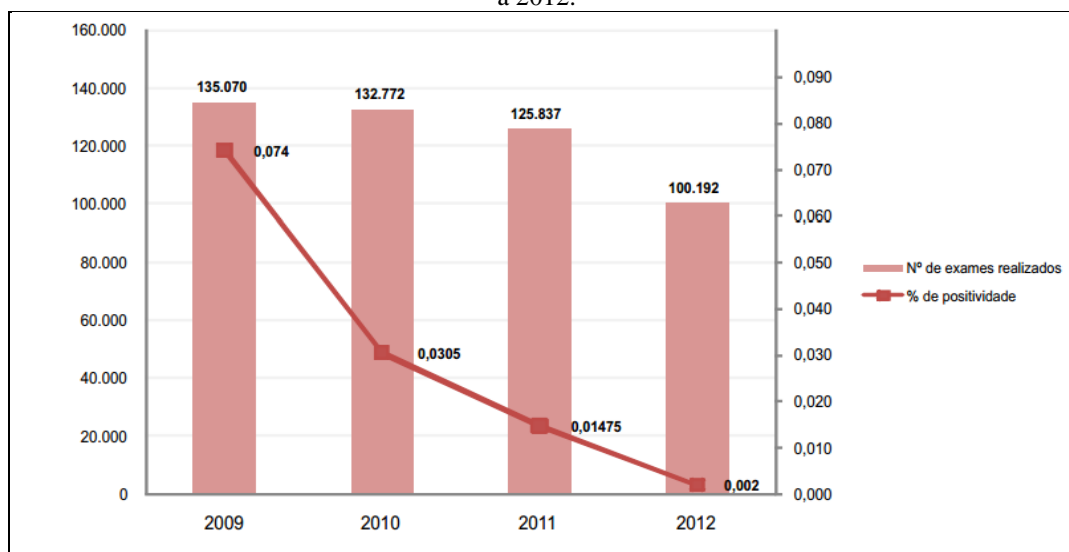
## 2.6 Programa de Enfrentamento às doenças negligenciadas (SANAR)

O Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas (SANAR) foi criado no ano de 2011 e constitui a estratégia do governo de Pernambuco para enfrentamento de doenças que utilizem ações de controle, através de intervenções que são tecnicamente viáveis e possam ser prevenidas ou eliminadas com medicamentos. Além disso, devem apresentar disponibilidade de diagnóstico e tratamento na rede de saúde pública. O SANAR estabeleceu como meta reduzir os níveis de transmissão da filariose a menos de 1% nos municípios endêmicos da RMR até 2014. Portanto foram definidas estratégias de ações de vigilância epidemiológica, vetorial e diagnóstico laboratorial; além de apoio de insumos e equipamentos para as áreas prioritárias (ALBUQUERQUE, 2013; PERNAMBUCO, 2013).

Segundo o SANAR ocorreu uma diminuição significativa no número de casos de filariose e no percentual de positividade no estado de Pernambuco. Em 2012, apenas cinco casos foram diagnosticados e o percentual de positividade chegou a 0,002% (Figura 9). Entretanto, considera-se importante a manutenção da vigilância para assegurar a inexistência de casos autóctones em áreas do país. Para o controle da endemia, o setor saúde necessita atuar para promover ações voltadas a melhoria das condições sanitárias de áreas com transmissão, além das ações de controle do vetor, tratamento coletivo e busca passiva e ativa em áreas não prioritárias e com baixa transmissão (ALBUQUERQUE et al., 2013).



**Figura 9** - Número de exames realizados e percentual de positividade de filariose. Pernambuco, 2009 a 2012.



Fonte: Pernambuco (2013).

## 2.7 Diagnóstico da bancroftose

O diagnóstico clínico da bancroftose é particularmente difícil, por existir uma grande quantidade de pessoas infectadas sem sintomas aparentes, além das mudanças provocadas pela *W. bancrofti* serem similar àsquelas produzidas por outros agentes etiológicos, necessitando de uma confirmação laboratorial (FONTES; ROCHA, 2005; SILVA et al., 2008). Sendo assim, o uso de ferramentas de diagnóstico apropriadas é importante para detectar indivíduos parasitados em investigações epidemiológicas, identificar possíveis focos e avaliar a situação filarial em áreas endêmicas. A escolha dos métodos para avaliar os programas nacionais deve se fundamentar na especificidade e sensibilidade dos testes, também na viabilidade de implementação em campo, habilidade técnica e custo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011).

O diagnóstico da FL pode ser realizado por diferentes técnicas parasitológicas, imunológicas, moleculares e por imagem (SILVA et al., 2008). A pesquisa parasitológica pode ser realizada através de técnicas como a gota espessa de sangue, concentração de Knott e filtração de sangue em membrana de policarbonato. Os três métodos citados só identificam as pessoas portadoras das formas embrionárias do verme (microfilárias), não identificando a presença de formas adultas. Além disso, a coleta do sangue deve ser feita no horário noturno entre 23 - 01 h, sendo este o período de maior densidade de *W.bancrofti* no sangue periférico (BRASIL, 2009). Já as técnicas imunológicas, se baseiam na pesquisa de antígenos filarial

circulantes, através de anticorpos monoclonais como o ensaio imunoenzimático (Og4C3-ELISA) e o teste de imunocromatografia rápida (ICT Card test-AD12). Os métodos imunológicos mostram sensibilidade e especificidade superior aos métodos parasitológicos (ROCHA, 2004) e são técnicas mais adequadas, pois não precisam acompanhar a periodicidade noturna das larvas de *W. bancrofti*, contudo são métodos de alto custo (LAMMIE, 1994; WEIL et al., 1997). O diagnóstico por imagem, através da ultra-sonografia, evidencia os vermes adultos em vasos linfáticos nas pessoas infectadas, observando a dilatação linfática produzida pelo verme. Essa técnica desenvolvida de forma correta possibilita observar diretamente a ação da droga sobre o parasito (SILVA et al., 2008).

### 2.7.1 Diagnóstico molecular

Os testes envolvendo marcadores de DNA são testes altamente sensíveis e específicos podendo detectar o DNA do parasito (*W. bancrofti* ou *Brugias*) tanto no vetor quanto no homem. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) consiste em uma técnica de amplificação (criação de múltiplas cópias) *in vitro* de ácidos nucleicos. É uma metodologia rápida capaz de produzir resultados em algumas horas. Estudos mostram o sucesso da PCR na identificação do DNA genômico nas amostras de sangue (WILLIAMS et al., 1996), em amostras de mosquitos (CHANTEAU et al., 1994; FURTADO et. al., 1997; NICOLAS et. al., 1997), nos tecidos biológicos incluídos em parafina (MCCARTHY et. al., 1996) e em amostras de urinas (LUCENA et al., 1998). A utilização da biologia molecular nos estudos da filariose teve início em 1980 quando pesquisadores desenvolveram procedimentos para isolar e caracterizar sequências de DNA filarial. Dissanayke e Piessens (1990), estudando o genoma de *W. bancrofti*, verificaram que o mesmo é constituído principalmente por sequências repetitivas. A sequência frequentemente utilizada como molde para pesquisa de DNA do verme é a *Ssp I* que se trata de uma sequência com 195 pares de base, encontrado no genoma do parasito em torno de 300 cópias. Através da PCR, a sequência é reconhecida e copiada de forma exponencial a partir de dois *primers* NV1(5'CGTGATGGCATCAAAGTAGCG3') e NV2 (5'CCCTCACTTACCAAAGTAGCG 3) descritos por Zhong et al. (1996).

### 2.7.2 Diagnóstico vetorial

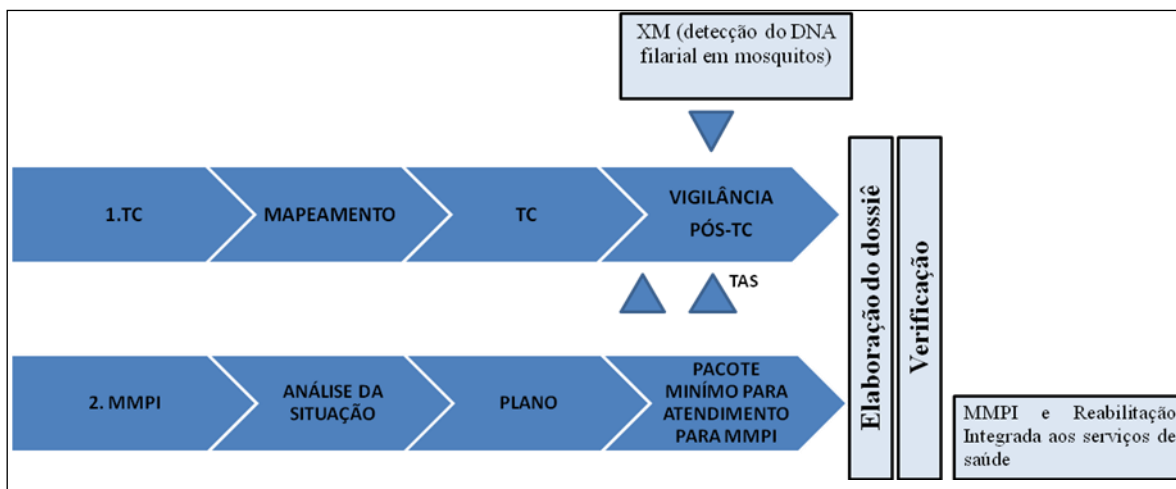
Existem duas técnicas empregadas para o diagnóstico de infecção vetorial por *W. bancrofti*: dissecação e PCR. A dissecação dos mosquitos e análise de filárias em microscopia é

um procedimento muito eficaz para monitorar prevalências de infecção em populações de vetores e utilizado como padrão em vários trabalhos epidemiológicos (CALHEIROS, 1996; FONTES et al., 2005; OKORIE et. al., 2015; RICHARDS et. al., 2011; SCHLEMPER et al., 2000; SIMONSEN et al., 2010), porém é considerada uma metodologia trabalhosa, demorada e que requer muito treinamento, uma vez que a distinção específica das larvas é difícil em áreas onde outras espécies de filarídeos são prevalentes (BRASIL, 2009).

O sucesso do tratamento coletivo diminuiu as taxas de infecção em populações endêmicas tornando difícil encontrar larvas durante a dissecação individual do vetor (LANEY et al., 2008). Portanto, a PCR é mais satisfatório quando as taxas de infecção na população humana são baixas e necessita de uma grande quantidade de mosquitos para análise, pois a técnica é capaz de detectar DNA de uma única microfilária em amostras (*pools*) contendo até 50 mosquitos (PLICHART et. al., 2006) e muito sensível para detectar a presença de 10 pg de DNA de *W. bancrofti* (CHANSIRI; PHANTANA, 2002). Além disso, a PCR também é capaz de amplificar genes de *W. bancrofti* em qualquer estágio evolutivo, enquanto o método tradicional de dissecação necessita de um analista experiente (HOTI et al., 2001). Broakye et al. (2007) avaliaram a infecção de *W. bancrofti* presente em mosquito do gênero *Anopheles*, através da dissecação e da PCR. Os autores relatam uma correlação no percentual de infecção vetorial entre as duas metodologias, concluindo a eficiência de utilizar os dois métodos.

A coleta de mosquitos recém-ingurgitados para verificar a infecção vetorial em uma área endêmica, além de fornecer dados sobre a infecção natural dos vetores é um indicativo indireto da ocorrência da infecção humana, pois verifica a presença de microfilárias recém-alimentadas pelo vetor. Essa abordagem chama-se Xenomonitoramento e auxilia na verificação da interrupção da transmissão através do diagnóstico de infecção vetorial e foi incluída pela OMS na vigilância pós-TC (Figura 10), preconizada nos pilares do plano global (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

**Figura 10** - Ferramentas de diagnósticos na vigilância pós-Tratamento.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2013).

Legenda: Tradução nossa. TC: Tratamento Coletivo; MMPI: Manejo de Morbidade e prevenção de incapacidade; XM: Xenomonitoramento Molecular.

As técnicas de xenomonitoramento mais amplamente utilizadas são baseadas na PCR para detectar *W. bancrofti*. A eficiência da amplificação da PCR pode variar entre amostras dependendo da qualidade das preparações de DNA e da presença de inibidores da reação, moléculas não eliminadas durante a extração, como hemoglobinas, lactoferrina, composto heme e imunoglobina G, especialmente encontradas nas fêmeas alimentadas (AKNE et al., 1994; AL-SOUD et al., 2000, 2001) Portanto, na tentativa de superar os resultados falsos negativos mal compreendidos, o sistema *Ssp I* tem sido modificado, incluindo novos métodos. Um destes tem um plasmídeo como padrão interno composto por um plasmídeo carregando a região *Ssp I* mutada com 34 nt maior com um sítio de hibridização. Cada tubo de PCR é adicionado do padrão interno para co-amplificação junto como o DNA alvo de *W. bancrofti* (*Ssp I* selvagem) usando o mesmo par de *primers* e os produtos de PCR têm tamanhos diferentes e podem ser visualizados tanto em gel de agarose quanto por combinação DNA-ELISA (NICHOLAS; PLICHART, 1997).

Semelhantemente, Fisher et al. (1999) desenvolveram um método quantitativo e competitivo de PCR-ELISA (QC-PCR-ELISA), o qual tem uma sequência competidora construída (plasmídeo com a *Ssp I* modificada com um sítio para uma sonda) adicionada a cada PCR para co-amplificação usando os mesmos pares de *primers*. Os produtos de PCR são detectados por ELISA, hibridizada a sondas específicas e semi-quantificadas, pois a eficiência da extração de DNA que pode ser variável. Contudo, em ambas as técnicas de PCR descritas, os controles internos, moléculas exógenas introduzidas, são amplificadas e detectadas até se o DNA da amostra estiver degradado, não funciona como um controle.

Na tentativa de melhorar a sensibilidade do XM, um ensaio de PCR em tempo real (qPCR) usando o sistema TaqMan foi desenhado para detectar o “DNA repetitivo longo” (LDR – compreende a região da *Ssp* I) de *W. bancrofti* e para testar um outro alvo, 16S DNAr, de *Wolbachia pipientis*, uma bactéria endossimbionte obrigatória presente em vermes filariais (detecção indireta). Devido a diferenças na estabilidade do DNA entre eucariotos e bactérias, o alvo da qPCR-LDR mostrou mais sensibilidade do que o 16S DNAr, contudo a PCR convencional permanece mais viável comparando com os custos da técnica de qPCR (RAO et al., 2006).

Com o objetivo de detectar infecções co-endêmicas as quais têm o mesmo vetor, a técnica PCR tem avançado para um ensaio *multiplex*. Por exemplo, *W. bancrofti* e *B. malayi* são detectadas respectivamente pelos sistemas de PCR *Ssp* I e *Hha*I em um mesmo tubo (MISHRA et al., 2005) ou como proposto em um novo ensaio, usando um iniciador consenso para ambos parasitas e dois iniciadores antisenso gênero específico diferentes (MISHRA et al., 2007). Enquanto que, Rao et al. (2009) uniram as duas últimas técnicas para desenhar um ensaio de qPCR multiplex para detectar DNA de *W. bancrofti*, *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* pelo menos de duas espécies ao mesmo tempo.

O repertório de PCR também conta com a detecção molecular de larvas infectantes de filaria (L3) em vetores; esta diferente estratégia abordada por Laney et al. (2008) é baseada na Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) para detectar transcritos gênicos ativados em L3 de *B. malayi*. Vasuki et al. (2008) também criaram um ensaio de RT-PCR para a detecção de L3 de *W. bancrofti* em *C. quinquefasciatus*. Porém, é preciso verificar a preservação do RNA filarial da L3 nos mosquitos no campo. Em opção a PCR, o método de amplificação isothermal mediada por *loop* (LAMP) foi desenvolvido para amplificar e detectar DNA de *W. bancrofti* com especificidade e sensibilidade usando um conjunto de quatro iniciadores especialmente desenhados para reconhecer seis regiões distintas no DNA alvo. Contudo é preciso avaliar a técnica LAMP em isolados de *W. bancrofti* de diferentes regiões endêmicas para checar se as sequências alvo não seriam variáveis (TAKAGI et al., 2011).

Recentemente, Pillotte et al. (2013) descreveram um método de PCR multiplex em tempo real baseada no sistema TaqMan para detectar *W. bancrofti* e *B. malayi* de amostras de sangue ou *pools* de mosquito vetores; a fim de garantir que as amostras negativas possuíam DNA, as amostras de mosquito foram checadas em outra PCR usando iniciadores para o DNA ribossomal ITS2 do complexo *An. crucians* (WILKERSON et al., 2004). Mesmo assim, nenhum dos métodos de XM acima tem como alvos, parasita e vetor na mesma PCR, neste

caso o DNA do mosquito funciona como um controle interno para verificar a qualidade do DNA.

Neste trabalho nós descrevemos um ensaio mais confiável e conveniente de xenomonitoramento molecular, através da utilização de controle endógeno (DNA do mosquito) na reação de PCR, para evitar os resultados falsos negativos, devido à má qualidade do DNA extraído ou presença de inibidores de reação, podendo assim, examinar *pools* de mosquito recém-alimentados para a presença de *W. bancrofti* em áreas endêmicas de FL (na Região Metropolitana do Recife).

### 3 JUSTIFICATIVA

Diante da problemática da filariose linfática exposta e da endemicidade encontrada na Região Metropolitana do Recife é de fundamental importância que o Plano Nacional de Eliminação da Filariose disponha de diferentes métodos para monitorar o efeito do Tratamento Coletivo (TC) realizado na população humana nessas áreas endêmicas. Os diagnósticos emitidos pelo Serviço de Referência Nacional de Filariose-FIOCRUZ/PE tem como atividade acompanhar as taxas de prevalência humana; enquanto que, nessa proposta, o Serviço de Referência em Controle de Culicídeos Vetores do Departamento de Entomologia da FIOCRUZ/PE busca monitorar simultaneamente ao TC a taxa de infecção vetorial, através do Xenomonitoramento Molecular (XM), como forma de fornecer o diagnóstico complementar para o diagnóstico de infecção humana. Visto que as fêmeas do mosquito vetor só serão infectadas se ainda houver pacientes nas áreas tratadas, com microfilárias em sua circulação periférica, então será possível acompanhar a prevalência de infecção no mosquito através de diagnósticos moleculares em áreas consideradas endêmicas e assim verificar o *status* de transmissão da bancroftose.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Avaliar o uso do xenomonitoramento molecular para verificar a infecção natural de *Culex quinquefasciatus* por *Wuchereria bancrofti*, em áreas endêmicas de filariose linfática na Região Metropolitana do Recife (Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes).

### 4.2 Específicos

- a) Desenvolver um novo sistema de PCR duplex através do aprimoramento da técnica para detecção de *W. bancrofti* pela adição de *primers* universais para mosquitos;
- b) Determinar o limiar de detecção da *W. bancrofti* em *C. quinquefasciatus* através de PCR duplex;
- c) Aperfeiçoar a extração de DNA quanto ao número de mosquito por *pool* para o diagnóstico molecular;
- d) Monitorar as taxas de infecção vetorial de *C. quinquefasciatus* por *W. bancrofti* durante e após o Tratamento Coletivo em localidades endêmicas dos municípios de Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes.



## 5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 5.1 Áreas de Estudo

Foram investigadas doze localidades dos municípios de Jaboatão dos Guararapes, Recife e Olinda, localizados na Região Metropolitana do Recife. Os índices de microfilaremia na população humana nessas localidades variaram de 0,04% a 4,96% (Tabela 1).

*Jaboatão dos Guararapes:* O município apresenta uma extensão territorial de aproximadamente 259 km<sup>2</sup> com população estimada em 680.943 habitantes e densidade demográfica corresponde a 2.493,06 hab./km<sup>2</sup> (IBGE, 2014). Está dividido politicamente em sete Regionais, onde a Regional Centro, Regional Cavaleiro, Regional Prazeres e Regional Guararapes apresentam focos de transmissão da doença, pacientes com morbidade, além de baixa cobertura de saneamento básico. Em 2006, foi realizado o primeiro Tratamento Coletivo (TC) da FL nas localidades de Alto da Colina e Baixa da Colina, no bairro de Cavaleiro; ampliado em 2011 para as localidades de Quitandinha (em Socorro) e Retiro (em Sucupira). Estima-se que cerca de 20.000 pessoas residem nessas áreas, sendo as localidades servidas de Equipes de Saúde da Família. No estudo, quatro áreas foram avaliadas por apresentarem pessoas microfilarêmicas (Alto da Colina, Baixo da Colina, Quintandinha e Retiro) (SANTOS NETO, 2012).

*Recife:* Município e capital do Estado de Pernambuco. Pertence à Mesorregião Metropolitana do Recife, com uma área de aproximadamente 218 km<sup>2</sup>, está localizado às margens do oceano Atlântico e possui uma população de 1.608.488 pessoas (IBGE, 2014). O município apresenta Agentes de Saúde Ambiental (ASA), Agentes Operacionais de Apoio (AOA) e supervisores do Programa de Saúde Ambiental (PSA) distribuídos de acordo com o mapa de risco da cidade e dados epidemiológicos (RECIFE, 2002). No estudo, três localidades do Recife foram investigadas: Linha do Tiro, Alto José Bonifácio e Coque, as quais apresentam elevada prevalência de microfilaremia, dados secundários coletados na Secretaria de Saúde do Recife.

*Olinda:* Localiza-se a uma distância de 6 km do Recife, ocupando uma área de aproximadamente 42 km<sup>2</sup> com uma população de 388.821 habitantes (IBGE, 2014). A rede pública de serviços de saúde onde é desenvolvido o programa municipal de eliminação da filariose é composta por equipes do Programa de Saúde da Família (PSF), equipes do Programa de Agentes Comunitários de Saúde (ACS) dois centros de Saúde e sete Equipes do Núcleo de Apoio a Saúde à Família (NASF). Além de Agentes de Combate a Endemias e

Agentes Redutores de Danos. A cidade está subdividida em 31 bairros, dentre os quais há áreas endêmicas de filariose. Foram avaliados os bairros Vila Popular, Varadouro, Sapucaia, Alto da Bondade e Alto da Conquista, localidades com alta taxa de microfilarêmicos (OLINDA, 2006).

**Tabela 1** - Índices de microfilaremia da população humana em áreas endêmicas na Região Metropolitana do Recife.

<b>Municípios</b>	<b>Localidades</b>	<b>Taxa de positividade (%) (microfilarêmicos) antes do tratamento coletivo</b>
<b>Olinda</b>	Alto da Conquista	0,7%
	Alto da Bondade	0,7%
	Vila Popular	4,1%
	Varadouro	3,6%
	Sapucaia	0,4%
<b>Recife</b>	Linha do Tiro	4,96%
	Alto José Bonifácio	2,22%
	Coque	2,44%
<b>Jaboatão dos Guararapes</b>	Socorros	0,09%
	Sucupira	0,56%
	Alto da Colina (Cavaleiro)	0,06%
	Baixo da Colina (Cavaleiro)	0,06%

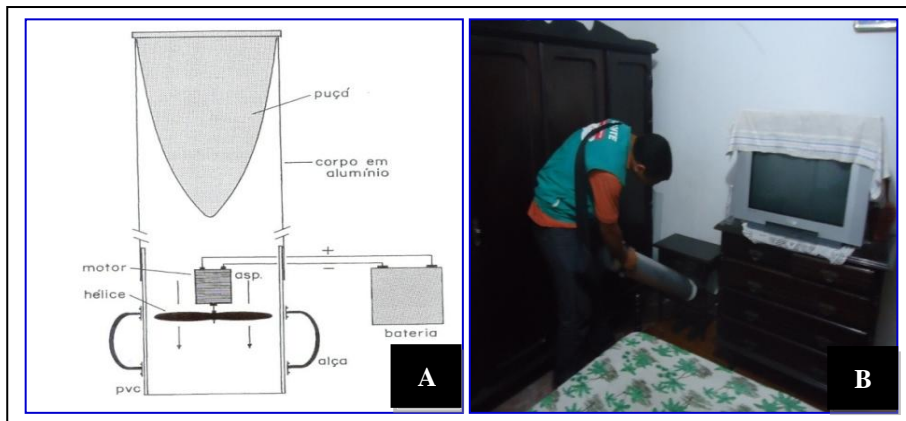
Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados secundários coletados na Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco.

## 5.2 Amostragem

A amostra pré-estabelecida foi de 2000 fêmeas de *Culex quinquefasciatus* durante o período de pré-tratamento coletivo (ARAÚJO, 2012) e no atual estudo foram coletadas, em cada localidade, aproximadamente 4.000 fêmeas de *C. quinquesfasciatus* durante e após o tratamento. Os mosquitos foram capturados pelos agentes de saúde ambiental (ASA) ou agentes de vigilância ambiental (AVA) de cada município. As coletas foram feitas com um aspirador mecânico adaptado de Nasci (HOST®) composto por tubo cilíndrico em alumínio, alças laterais, motor, hélice e cesto para apreensão dos mosquitos adultos (Figura 11), tendo seu funcionamento acionado por uma bateria de 12 volts recarregável construídos especialmente para a captura de insetos adultos (CLARCK et al.,1994). Foram realizadas coletas de forma randômica em um grupo de 50 a 100 imóveis em cada localidade no período da manhã, entre 08:00 e 09:30 h para investigação quanto à taxa de infecção vetorial por *W. bancrofti*. Os agentes de cada município, como parte das atividades incluídas no programa

nacional, coletaram os mosquitos em quartos, banheiros, por trás de cortinas e móveis ou embaixo deles, que são locais onde o inseto-alvo costuma repousar.

**Figura 11** – Aspirador mecânico.



Fonte: Forattine (2002); Nunes (2013).

Legenda: A: longitudinal do aspirador de Nasci. B: Agente de Saúde Ambiental em coleta com aspirador de Nasci.

### 5.2.1 Amostras coletadas durante o Tratamento Coletivo (TC)

Foram coletadas 24.406 fêmeas durante o TC da população humana com a DEC nos bairros: Alto da Conquista, Alto da Bondade, Sapucaia, Vila Popular e Varadouro, em Olinda; Coque e Linha do Tiro, em Recife; e Sucupira, Socorro, Alto da Colina e Baixo da Colina, em Jaboatão dos Guararapes (Quadro 1).

**Quadro 1** - Amostras coletadas durante o Tratamento Coletivo nos municípios de Olinda, Recife e Jaboatão dos Guararapes.

<b>Localidades</b>	<b>Início (1ºTC)-Término do tratamento (último TC)</b>	<b>Período de coleta</b>
<b>Alto da Conquista</b>	2007-2013	2012
<b>Alto da Bondade</b>	2007-2013	2012
<b>Sapucaia</b>	2011-2013	2012
<b>Vila Popular</b>	2012-2013	2013
<b>Varadouro</b>	2012-2013	2013
<b>Coque</b>	2008-2012	2011/2012
<b>Linha do Tiro</b>	2008-2012	2011/2012
<b>Sucupira</b>	2011-2013	2011
<b>Socorro</b>	2011-2013	2011
<b>Alto da Colina</b>	2006-2013	2012
<b>Baixo da Colina</b>	2006-2013	2012

Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados secundários coletados na Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco.

### 5.2.2 Amostras coletadas após o Tratamento Coletivo (TC)

Foram coletadas 19.575 fêmeas nos bairros de Alto José Bonifácio (Recife/PE), Linha do Tiro (Recife/PE), Coque (Recife/PE), Sapucaia (Olinda/PE), Varadouro (Olinda/PE) e Vila Popular após o término do TC (Quadro 2).

**Quadro 2** - Amostras coletadas após o Tratamento Coletivo nos municípios de Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes.

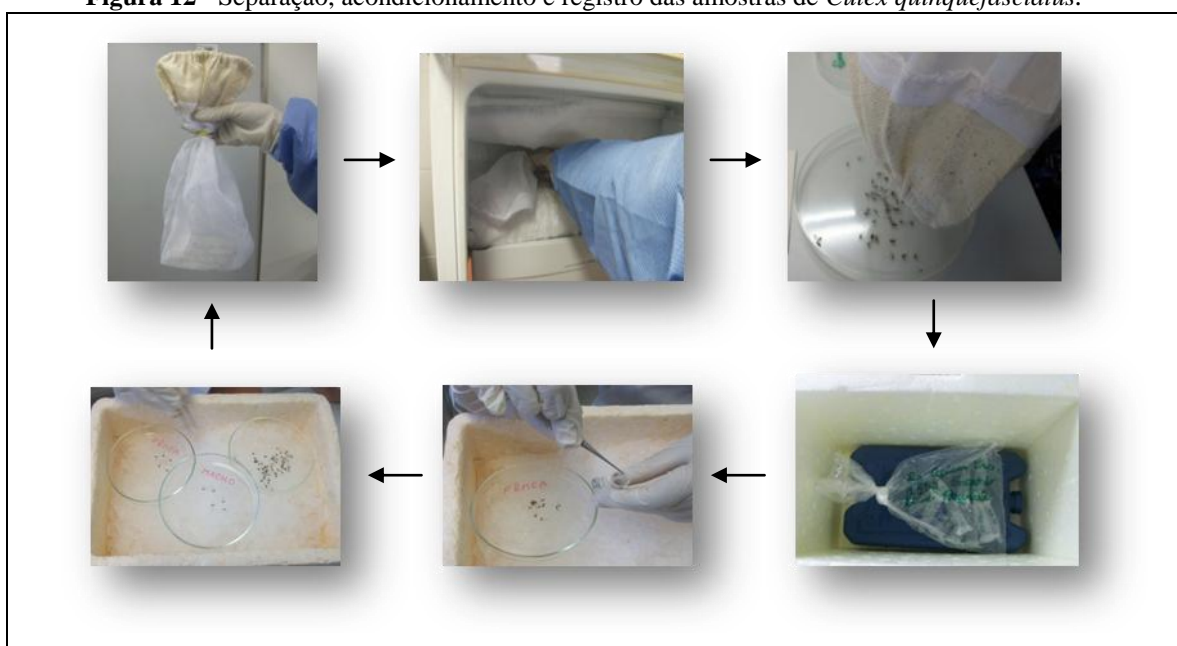
<b>Localidades Na RMR</b>	<b>Início (1ºTC)- Término do tratamento coletivo (último TC)</b>	<b>Período de coleta</b>
<b>Alto José Bonifácio</b>	2007-2010	2011/2012
<b>Linha do Tiro</b>	2008-2012	2013/2014
<b>Coque</b>	2008-2012	2013/2014
<b>Alto da Conquista</b>	2007-2013	2014
<b>Sapucaia</b>	2011-2013	2014
<b>Vila Popular</b>	2012-2013	2014

Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados secundários coletados na Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco.

### 5.3 Separação, acondicionamento e registro das amostras de *C. quinquefasciatus*

Na Secretaria de Saúde de cada município, as amostras de mosquitos foram colocadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para imobilização dos insetos. Em seguida, as fêmeas de *C. quinquefasciatus*, ainda sob condição de resfriamento em uma placa de Petri, foram colocadas em tubos *ependorf* formando *pools* de até 5 fêmeas. Essa quantidade de fêmeas foi estabelecida seguindo Araújo (2012). As amostras foram armazenadas em freezer e encaminhadas ao Serviço de Referência em Controle de Culicídeos Vetores do Departamento de Entomologia da FIOCRUZ/PE. No laboratório do Departamento de Entomologia foi verificado o acondicionamento correto das amostras e posteriormente o registro de entrada (Figura 12).

**Figura 12** - Separação, acondicionamento e registro das amostras de *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: A autora.

Legenda: Processo de morte por congelamento, separação e acondicionamento das amostras de mosquitos, realizado nas Secretarias de Saúde dos municípios, antes de serem encaminhadas ao Serviço de Referência em Controle de Culicídeos Vetores do Departamento de Entomologia (Fiocruz/PE), juntamente com um relatório de localização dos pontos de coleta dos mosquitos.

### 5.4 Otimização do tamanho do *pool* de mosquitos

Para estabelecer o tamanho ideal dos *pools* a serem formados foram feitos testes com diferentes quantidades de fêmeas por *pool*. Nestes testes foi utilizada uma colônia de mosquitos de laboratório (CqSLab), mantida no insetário do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ/PE (CPqAM-FIOCRUZ/PE). Os mosquitos

adultos (fêmeas e machos) foram mantidos em solução de sacarose 10% e as fêmeas também foram alimentadas com sangue de galinha (*Gallus gallus domesticus*). Para simular diferentes condições de amostras provenientes de campo pelo xenomonitoramento molecular, os insetos foram coletados entre 6h e 48h após o repasto sanguíneo e separados em *pools* com 10, 25, 50 e 75 indivíduos. A extração do DNA seguiu o protocolo de Ayres et al. (2002). Os *pools* foram homogeneizados em 400 µl de tampão de lise (NaCl 5M, EDTA 0,5M, Tris 1M e água mili-Q), 7 µl Proteinase K (10 mg/ml) e 72 µl Dodecil Sulfato de Sódio (SDS 10%). Os homogenatos foram incubados a 65 °C durante a noite (> 8 h) e, após incubação, 420 µl de NaCl 5M foram adicionados à suspensão. A mistura foi agitada em homogeneizador durante 1 min, seguido de centrifugação a 14.000 rpm durante 20 min. O DNA foi precipitado pela adição de um volume de 700 µl de álcool isopropílico e as amostras incubadas a -20°C durante 1 hora. Em seguida, foram centrifugadas a 14.000 rpm e o pellet formado foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em 300 µl de TE estéril (Tris 10mM, EDTA 1mM). A concentração de DNA e a pureza das amostras foram medidas por um espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop™ 2000). As amostras foram colocadas em alíquotas de 30 µl e armazenadas em freezer para os testes de PCR.

### 5.5 Extração de DNA total

O DNA dos mosquitos coletados nos bairros estudados foi extraído utilizando o método descrito acima. Foi extraído o DNA de 43.981 fêmeas de *Culex quinquefasciatus* quanto à presença de *W. bancrofti* (9.010 *pools*) coletadas durante e após o TC nos municípios de Olinda (11.395 fêmeas), Recife (19.795 fêmeas) e Jaboatão dos Guararapes (12.791 fêmeas).

### 5.6 Obtenção do DNA de *Wuchereria bancrofti*

Visando a obtenção de grandes quantidades do DNA de *Wuchereria bancrofti* para ser utilizado como controle positivo nas reações de PCR, um fragmento de 188 pb do verme foi clonado. Os nematóides foram cedidos pela Dra. Alessandra Lima de Albuquerque do Departamento de Entomologia em um projeto aprovado pelo Comitê de Ética (registro de número 0095.0.95.000-07). Nesse estudo o material genético da *W. bancrofti* foi adquirido através da punção venosa de paciente infectado. O sangue coletado foi filtrado em membrana

de policarbonato (Nucleopore Corporation, Pleasanton, CA, USA) com poros de 3µm de diâmetro e as membranas contendo as microfilárias foram armazenadas em microtubos a -20° C até serem processadas. O DNA de *W. bancrofti* foi extraído diretamente das membranas seguindo o mesmo protocolo usado para mosquitos, com redução de 30% nas quantidades de reagentes (ALBUQUERQUE, 2011). Posteriormente, para produzir clones da sequência diagnóstico *Ssp I* de *W. bancrofti*, o DNA extraído foi submetido as seguintes etapas: 1- PCR para produção do fragmento *Ssp I* utilizando os *primers* descritos por Zhong et al. (1996); 2- purificação do produto de PCR com o kit *QIAquick*® (Qiagen®) seguindo as recomendações do fabricante; 3- ligação do fragmento amplificado por PCR no vetor pGEM-T Easy® (Promega®) de acordo com as recomendações do kit e uso de células quimicamente competentes One Shot® TOP10 (Invitrogen®) para propagação dos clones; 4- checagem por PCR dos amplicons para confirmar a presença do DNA do parasito inserido; 5- O plasmídeo recombinante (vetor + inserto) foi purificado utilizando o kit *QIAprep*® Spin Miniprep (Qiagen®), conforme as recomendações do fabricante.

No presente estudo realizamos a quantificação da sequência diagnóstica *Ssp I* de *W. bancrofti* de 188 pb clonada no vetor pGEM-T Easy®, 3015 bp, para estabelecer o limite de detecção de DNA do parasito na PCR duplex. Primeiramente foi determinada por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop™ 2000) a concentração (ng/µl) do plasmídeo recombinante (3203pb), pGEM-T Easy-*Ssp I*. Em seguida foi realizado o cálculo do número de cópias do amplicon utilizando a seguinte fórmula:  $N^{\circ}$  de cópias de DNA = [massa (ng/µl) x  $6.022 \times 10^{23} / n^{\circ} (pb) \times 650 \times 10^9$ ] (O'HANLAN, 2014). Para determinar com maior precisão o cálculo ( $n^{\circ} (pb) \times 650$ ) correspondente a massa molar dos fragmentos de DNA (1946386 g/mol) foi utilizada a ferramenta “*Sequence=>Nucleic acid=>Nucleotide Composition*” do programa BioEdit (HALL, 1999). Com a obtenção do número das moléculas recombinantes e o número de pares de base conhecido, pudemos aplicar a mesma fórmula para determinar a concentração de cada elemento do pGEM-T Easy-*Ssp I* separadamente (inserto e vetor), por exemplo: a massa de *Ssp I* (ng/µl) =  $[9.65 \times 10^{10} \text{ cópias do clone} \times 113455 \text{ g/mol} \times 10^9] / 6.022 \times 10^{23}$ .

### 5.7 Desenvolvimento da PCR duplex

Para evitar o diagnóstico falso negativo de amostras foi desenvolvida uma PCR duplex com a presença simultânea de *primers* que amplificam o DNA do verme e do mosquito. Isto irá garantir que as amostras negativas não ocorram em decorrência da má qualidade do DNA

extraído, da presença de inibidores ou da ausência de DNA e sim da ausência do parasito. Dois diferentes pares de *primers* foram testados para amplificar o DNA do mosquito (Quadro 3), gerando um fragmento com tamanho diferente do amplicon produzido a partir do DNA de *W. bancrofti* (188 pb). Foram testados, como controle endógeno, iniciadores do gene *ace2* (ACEquin/B1246) descritos por Smith e Fonseca (2004), Bourguet et al. (1998) de *C. quinquefasciatus* que geram um fragmento de 274 pb e também foi utilizado iniciadores para o gene da actina (Act-2F/Act-8R) descritos por Staley et al. (2010) para o gênero *Culex* que geram um fragmento de 683 pb. De acordo com Staley et al.(2010) os *primers* act2F/Act8R podem amplificar o fragmento de actina em 30 espécies de 8 gêneros diferentes, como *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Deinocerites*, *Mansonia*, *Psophora*, *Toxorhynchites* e *Wyeomyia*, contemplando mais vetores da filariose. Já o gene *ace2* tem sido usado como marcador diagnóstico para as diferentes formas do complexo *Culex pipiens*, incluindo a espécie *C. quinquefasciatus* (SMITH; FONSECA, 2004; SANOGO et al., 2007).

**Quadro 3** - Descrição dos dois diferentes pares de *primers* testados na reação de PCR duplex

Primer	Sequência (5'-3')	Fonte bibliográfica	Amplicon (pb)	Gene de <i>C. quinquefasciatus</i>
<b>FOWARD act-2F</b>	ATGGTCGGYATGGGNCAGAAGGACTC	<b>Staley et al. (2010)</b>	683 pb	Actin-1 (Actina)
<b>REVERSE act-8R</b>	GATTCCATACCCAGGAAGGADGG			
<b>FOWARD ACEquin</b>	CCTTCTTGAATGGCTGTGGCA	<b>Smith e Fonseca (2004)</b>	274 pb	Ace 2 (Acetylcholinesterase)
<b>REVERSE B1246</b>	TGGAGCCTCCTCTTCACGGC	<b>Bourguet et al. (1998)</b>		

Fonte: A autora.

Para as reações de PCR duplex foram utilizados um par de *primers* espécie-específico para *Wuchereria bancrofti* (NV1/NV2) que geram um fragmento de 188 pb, e um par de *primers* universal para mosquito (Act-2F/Act-8R) que geram um fragmento de 683 pb. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl, utilizando a seguinte mistura de 25 µl: 12,5 µl de PCR Master Mix (contém Taq DNA polimerase, dNTPs e MgCl<sub>2</sub>) (Promega®, USA) , 1µl do *primer* NV1 (10 pmol) (5'CGTGATGGCATCAAAGTAGCG 3'), 1µl do *primer* NV2 (10 pmol) (5'CCCTCACTTACCAAAGTAGCG 3') descritos por Zhong et al. (1996) 1µl do *primer* Act-2F (10 pmol) (5'ATGGTCGGYATGGGNCAGAAGGACTC 3'), 1



$\mu\text{l}$  do *primer* Act-8R (10 pmol) (5' GATTCCATACCCAGGAAG-GADGG 3') descritos por Staley et al. (2010) 7,5  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O e 1  $\mu\text{l}$  de DNA de fêmeas de *C. quinquefasciatus*.

As amostras foram amplificadas em termociclador (Biometra®) e o programa de PCR consistiu em 35 ciclos a 94 ° C durante 45 seg, 55 ° C durante 1 min, 72 ° C durante 45 segundos, seguido de uma extensão final a 72 ° C durante 10 min. Para verificar possíveis contaminações foram utilizados controles negativos contendo todos os reagentes exceto o DNA do vetor, que foi substituído por 1  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O. Os controles positivos foram compostos por todos os reagentes, além de 0,5  $\mu\text{l}$  do DNA de *W. bancrofti*. Os produtos de PCR e o marcador de peso molecular foram analisados, durante 50 minutos, por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de corrida TBE (Tris 45mM, ácido bórico 45mM, EDTA 1 mM pH 8,0), corados com brometo de etídeo e visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta (UV).

### **5.8 Ensaio de limiar de detecção da PCR duplex**

A sensibilidade foi realizada através de diluições seriadas para obter uma curva de concentrações de 10 pg, 1 pg, 0.1 pg, 0.01 pg e 0.001 pg (1 fg) do alvo *Ssp I*. Também foi verificada a sensibilidade da técnica utilizando *pools* em diferentes concentrações de DNA do parasito.

### **5.9 Análise estatística dos dados**

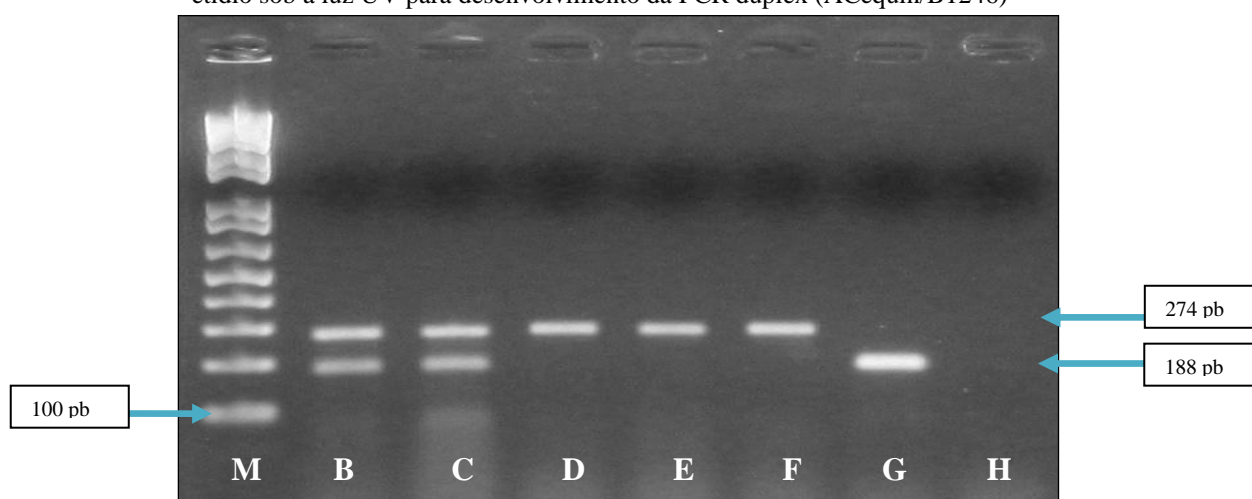
A taxa de infecção vetorial foi determinada pelo modelo estatístico *Pool screen* (KATHOLI et al., 1995), que observa o número de *pools* analisados e o total do número de mosquitos por *pool*, com intervalo de confiança ao nível de 95%.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Desenvolvimento da PCR duplex

Foi desenvolvida uma PCR duplex com a presença simultânea de diferentes pares *primers* que amplificam o DNA do verme e do mosquito na mesma reação. Foi utilizado iniciadores do gene *ace2* (ACEquin/B1246) como controle endógeno para *Culex quinquefasciatus* que geram um fragmento de 274 pb (Figura 13) e também foi utilizado iniciadores para actina (Act-2F/Act-8R) como controle endógeno que geram um fragmento de 683 pb (Figura 14). No estudo, foram selecionados os *primers* act2F/Act8R, pois amplificam o fragmento de actina em 8 gêneros de mosquitos e pode ser utilizado como *primer* universal para vetores.

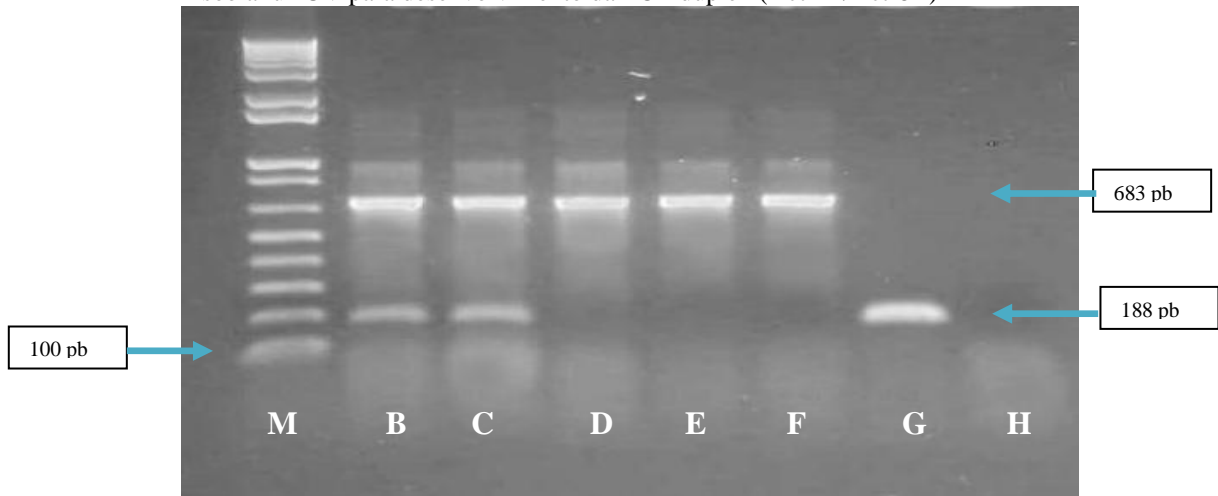
**Figura 13** – Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob a luz UV para desenvolvimento da PCR duplex (ACEquin/B1246)



Fonte: A autora.

Legenda: M: marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA ladder); Poços: B e C: Amostras de *Culex quinquefasciatus* (274 pb) positivas para *Wuchereria bancrofti* (188 pb); D, E e F: amostras negativas de *C. quinquefasciatus* para *W. bancrofti*; G e H: controle positivo e negativo, respectivamente.

**Figura 14** – Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob a luz UV para desenvolvimento da PCR duplex (Act-2F/Act-8R)



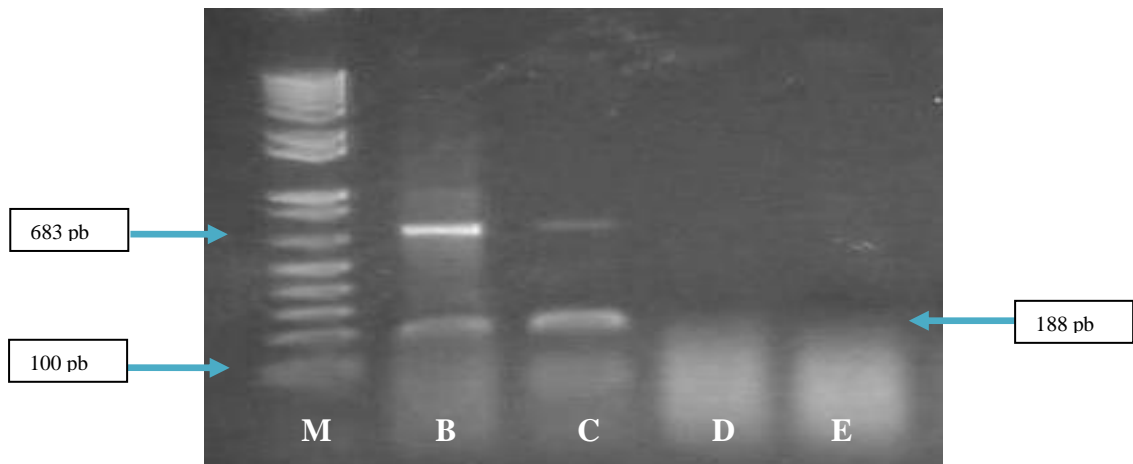
Fonte: A autora.

Legenda: M: marcador de peso molecular (1 kb plus DNA ladder); Poços: B e C: Amostras de *Culex quinquefasciatus* (274 pb) positivas para *Wuchereria bancrofti* (188 pb); D, E e F: amostras negativas de *C. quinquefasciatus* para *W. bancrofti*; G e H: controle positivo e negativo, respectivamente.

## 6.2 Otimização do tamanho do *pool* de mosquitos

Foram utilizadas amostras de 10, 25, 50 e 75 mosquitos por *pool*. A extração de DNA de *Culex quinquefasciatus* visualizada através da amplificação do fragmento de 683 pb (controle endógeno da reação) e presença do DNA de *Wuchereria bancrofti* visualizado através da amplificação do fragmento de 188 pb se mostraram mais eficientes em *pools* de 10 e 25 fêmeas (Figura 15). Os *pools* também foram diluídos em TE (TRIS/EDTA) (1:10) para verificar a diminuição da presença de inibidores da reação em *pools* de 50 e 75. Ainda assim, somente nos *pools* diluídos de 10 e 25 mosquitos foi possível observar, por eletroforese em gel de agarose, a banda de DNA do mosquito (Figura 16). A diluição de 1:10 não mostrou ser suficiente para diminuir a quantidade de inibidores da PCR nas amostras de 50 e 75 mosquitos. Portanto, para assegurar a sensibilidade e reprodutibilidade da técnica o tamanho selecionado para os experimentos foi de 10 fêmeas por *pool*, pois apresentou a banda revelada em gel de agarose a 1,5% (corado com brometo de etídio) com maior intensidade.

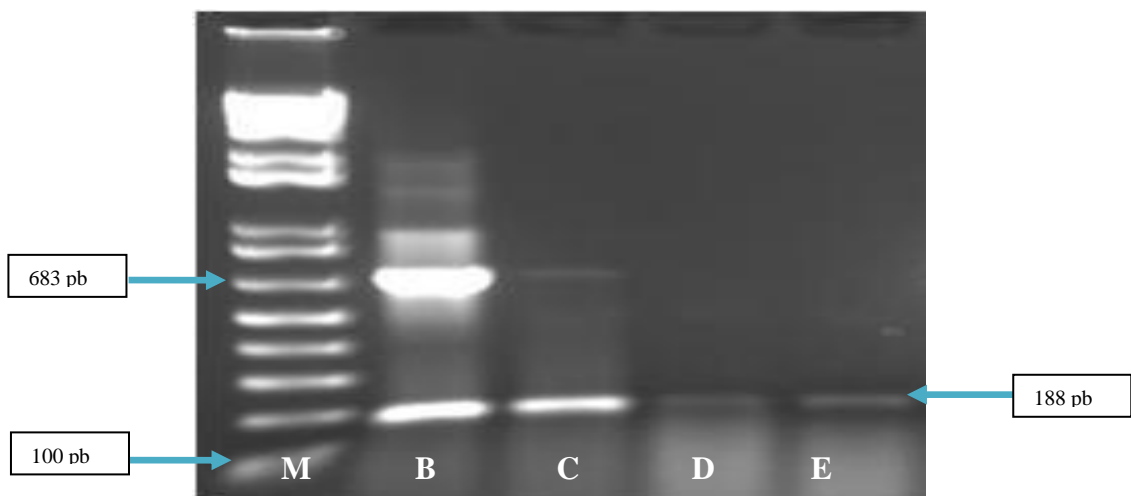
**Figura 15** - Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob a luz UV para revelar bandas diagnósticas em diferentes *pools*.



Fonte: A autora.

Legenda: M: marcador de peso molecular; Poços: B: *pool* de 10 fêmeas; C: *pool* de 25 fêmeas; D: *pool* de 50 fêmeas; E: *pool* de 75 fêmeas.

**Figura 16** - Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob a luz UV para revelar bandas diagnósticas em *pools* diluídos (1:10).



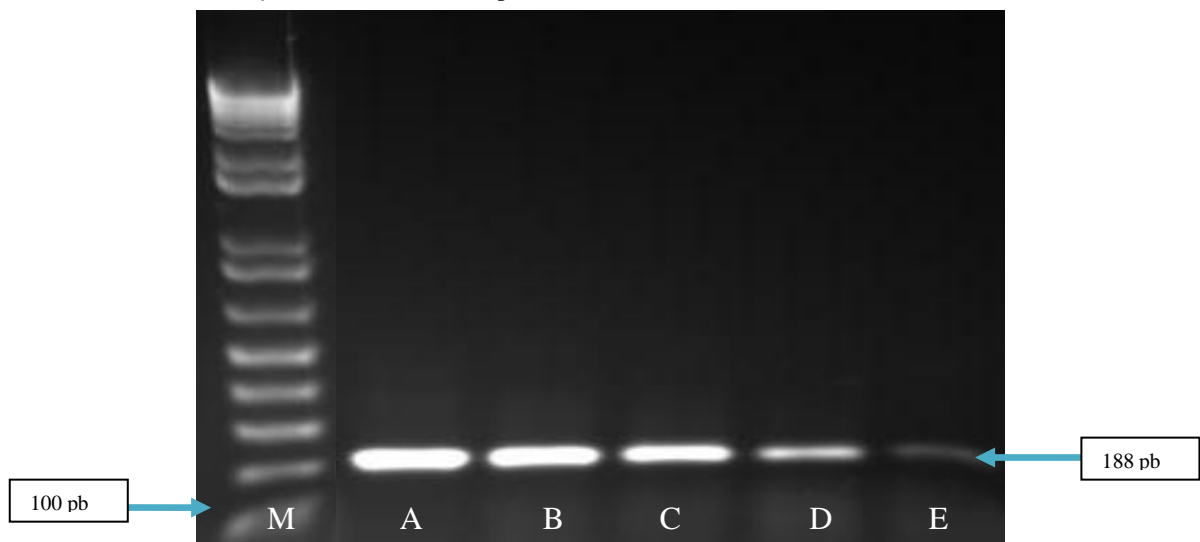
Fonte: A autora.

Legenda: M: marcador de peso molecular; Poços: B: *pool* de 10 fêmeas; C: *pool* de 25 fêmeas; D: *pool* de 50 fêmeas; E: *pool* de 75 fêmeas.

### 6.3 Ensaio de limiar de detecção da PCR duplex

O limiar de detecção da *Wucheria bancrofti* foi realizado através de diluições seriadas para obter uma curva de concentrações de 10 pg, 1 pg, 0,1 pg, 0,01 pg e 0,001 pg (1 fg) de DNA do parasito detectado pela técnica. A detecção de DNA pela PCR duplex se mostrou sensível o suficiente para revelar DNA de *W. bancrofti* até a concentração de 1 fg de DNA (Figura 17). Também foi verificada a sensibilidade da técnica utilizando *pool* de 10 e 25 fêmeas em diferentes concentrações de DNA do parasito, sendo possível detectar com maior definição nas amostras cuja concentração final do DNA *Ssp I* de *W. bancrofti* foi de 33 fg/ $\mu$ l e 3,3 fg/ $\mu$ l. Apesar de baixa qualidade de visualização, a amplificação do fragmento *Ssp I* foi notada ainda na concentração de 0,33 fg (Figura 18).

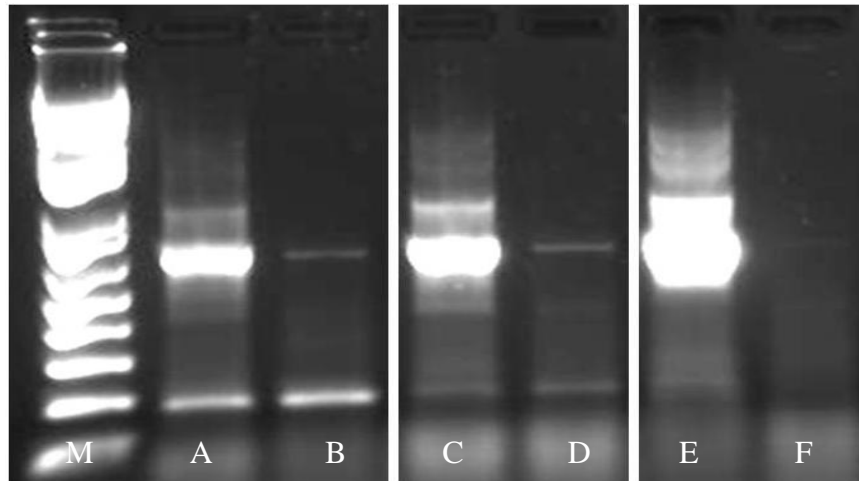
**Figura 17** – Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob a luz UV para revelar o limite de detecção do DNA de *W. bancrofti* através da PCR duplex.



Fonte: A autora.

Legenda: M: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder);  
Poços: A a E: Diluição seriada: A - 10 pg; B - 1 pg; C - 0,1 pg; D - 0,01 pg e E - 0,001 pg (1 fg) do alvo *Ssp I*.

**Figura 18** - Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob a luz UV para revelar o limite de detecção do DNA *W. bancrofti* através da PCR duplex



Fonte: A autora.

Legenda: M: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder); Poços: A, C e E: *pool* de 10 fêmeas; B, D e F: *pool* de 25 fêmeas; A e B: Concentração do DNA *Ssp* I: 33 fg/ $\mu$ l, C e D: 3,3 fg/ $\mu$ l, E e F: 0,33 fg/ $\mu$ l.

## 6.4 Xenomonitoramento dos mosquitos capturados na RMR

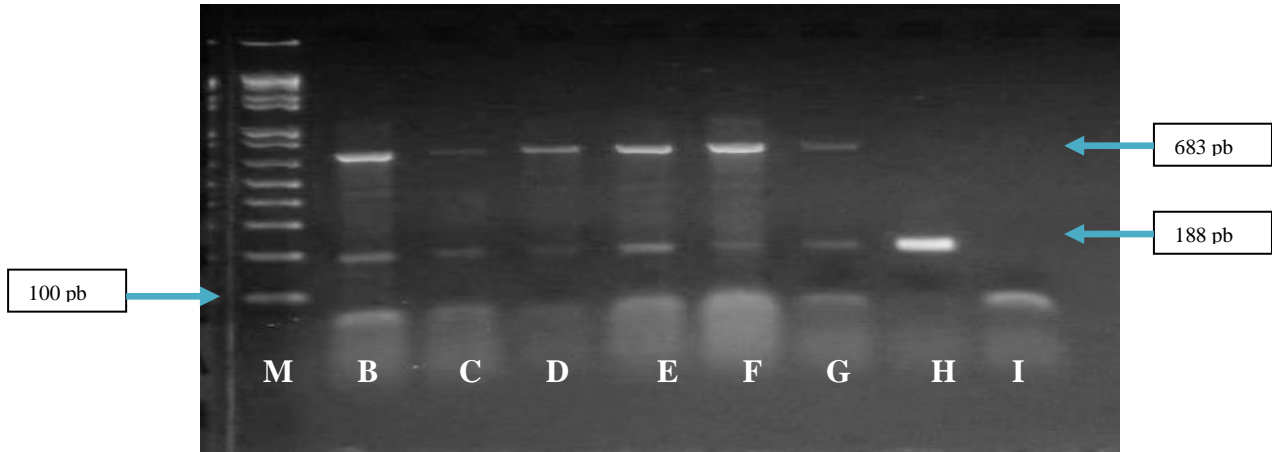
Após o aprimoramento da técnica de diagnóstico, esta foi utilizada para os mosquitos coletados em campo. Foi analisado, através da PCR duplex, um total de 9.010 *pools* correspondendo a 43.981 fêmeas de *Culex quinquefasciatus* quanto à presença da *Wuchereria bancrofti*. Foi observada a taxa de infecção vetorial em doze localidades de Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes todos considerados como prioridade 1, em dois períodos: durante e após o tratamento coletivo. Inicialmente as amostras foram analisadas em *pool* com até 5 fêmeas e após a otimização do lote passou a ser utilizado *pool* com até 10 fêmeas. Amostras negativas para o controle endógeno (683 pb), na reação de PCR duplex, foram excluídas das análises.

### 6.4.1 Amostras coletadas durante o Tratamento Coletivo (TC)

Para o período durante o TC foi extraído e analisado o DNA de 24.406 fêmeas de *C. quinquefasciatus* distribuídas em *pools* coletadas nos bairros de Alto da Bondade, Alto da Conquista, Varadouro, Sapucaia, Vila Popular, em Olinda; Coque e Linha do Tiro, em Recife; e Sucupira, Socorro, Alto da Colina e Baixo da Colina, em Jaboatão dos Guararapes. Essas coletas ocorreram nos anos 2011, 2012 e 2013. Em Linha do Tiro foram coletadas 731 fêmeas (152 *pools*) em 2011 e foram encontrados 6 *pools* positivos (Figura 19) e a taxa de infecção vetorial nessa localidade foi de 0,80% (com intervalo de confiança entre 0,49% e

2,25%). Nas outras localidades, não foram encontrados mosquitos infectados pela *W. bancrofti* (Figura 20) e a taxa de infecção vetorial foi 0% (Tabela 2).

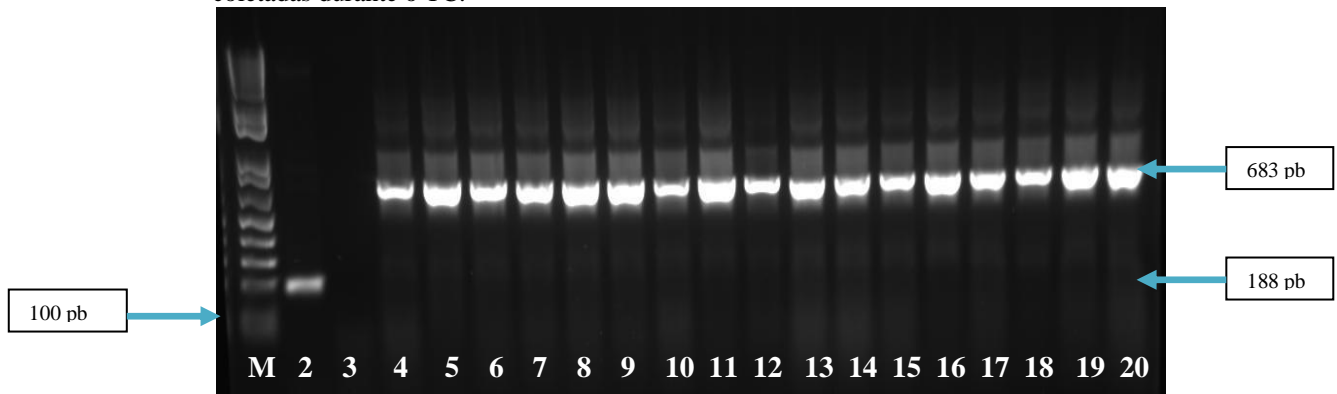
**Figura 19** - Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob a luz UV para revelar a presença de *W. bancrofti* em *Culex quinquefasciatus* em Linha do Tiro (Recife).



Fonte: A autora.

Legenda: M: marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA ladder); Poços: B a G: Amostras positivas de *Culex quinquefasciatus* (683 pb) para *Wuchereria bancrofti* (188 pb); H e I: Controle positivo e negativo, respectivamente.

**Figura 20** - Visualização d gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob a luz UV para revelar a ausência de *W. bancrofti* em *Culex quinquefasciatus* em amostras coletadas durante o TC.



Fonte: A autora.

Legenda: M: marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA ladder); Poços 2 e 3: Controle positivo e negativo, respectivamente; Poços 4-20: amostras negativas para *W. bancrofti*.

**Tabela 2** - Diagnóstico de infecção vetorial por *Wuchereria bancrofti* em amostras de *Culex quinquefasciatus* coletadas na Região Metropolitana do Recife/PE durante o TC.

Localidades/ ano da coleta	Fêmeas		Analisados	Pools	
	Coletadas	Processadas		Negativos	Positivos
Sapucaia (2012)	1.309	1.309	261	261	0
Vila Popular (2013)	464	464	98	98	0
Varadouro (2013)	1.238	1.238	259	259	0
Alto da Bondade (2012)	1.738	1.738	372	372	0
Alto da Conquista (2012)	1.241	1.241	248	248	0
Coque (2011)	1.095	1.095	223	223	0
Coque (2012)	1.457	1.457	206	206	0
<b>Linha do Tiro (2011)</b>	<b>731</b>	<b>731</b>	<b>152</b>	<b>146</b>	<b>6</b>
Linha do Tiro (2012)	2.342	2.342	506	506	0
Socorro (2011)	2.542	2.542	483	483	0
Socorro (2012)	2.025	2.025	481	481	0
Baixo da Colina (2012)	2.329	2.329	435	435	0
Alto da Colina (2012)	1.626	1.626	438	438	0
Sucupira (2012)	4.269	4.269	889	889	0

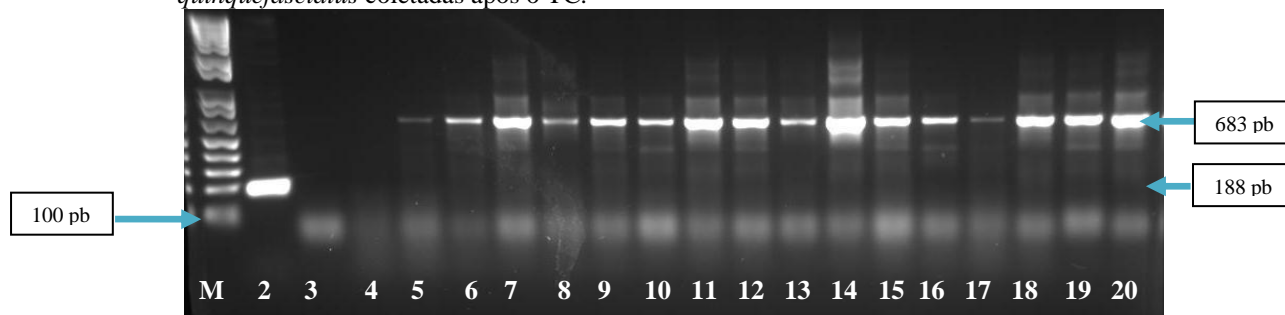
Fonte: A autora.

#### 6.4.2 Amostras coletadas após o Tratamento Coletivo (TC)

Para o período após o TC foi extraído DNA e analisado o total de 19.575 fêmeas (*pools*) nos bairros de Alto José Bonifácio, Linha do Tiro, Coque, Alto da Conquista, Vila Popular e Sapucaia. As coletas das amostras ocorreram entre 2011 e 2014. Nesses, não foram encontrados mosquitos infectados pela *W. bancrofti* (Figura 21) e a taxa de infecção vetorial foi 0% (Tabela 3).



**Figura 21** - Visualização do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob a luz UV para revelar a ausência de DNA de *Wuchereria bancrofti* em amostras de *Culex quinquefasciatus* coletadas após o TC.



Fonte: A autora.

Legenda: M: marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA ladder); Poços 2 e 3: Controle positivo e negativo, respectivamente; Poço 4: amostra negativa para o controle endógeno (683 pb); Poços 5-20: amostras negativas para *Wuchereria bancrofti*.

**Tabela 3** - Diagnóstico de infecção vetorial por *Wuchereria bancrofti* em amostras de *Culex quinquefasciatus* coletadas na Região Metropolitana do Recife/PE após o TC.

Localidades/ ano da coleta	Fêmeas		Pools		
	Coletadas	Processadas	Analisados	Negativos	Positivos
Alto José Bonifácio (2011)	1.046	1.046	236	236	0
Alto José Bonifácio (2012)	3.029	3.279	624	624	0
Alto José Bonifácio (2014)	1.627	1.627	331	331	0
Linha do Tiro (2013)	2.013	2.013	415	415	0
Linha do Tiro (2014)	2.155	2.155	349	349	0
Coque (2013)	2.114	2.114	427	427	0
Coque (2014)	2.186	2.186	448	448	0
Sapucaia (2014)	2.230	2.230	490	490	0
Alto da Conquista (2014)	2.054	2.054	419	419	0
Vila Popular (2014)	1.121	1.121	220	220	0

Fonte: A autora.

## 7 DISCUSSÃO

O Programa Global de Eliminação da Filariose linfática (PGEFL) lançado em 2000 através da Organização Mundial de Saúde (OMS) foi adotado pela maioria dos países nos quais a doença é endêmica. Na fase seguinte à implementação das estratégias de controle, a dificuldade tem sido em determinar ferramentas diagnósticos de infecção humana e no vetor do agente etiológico para monitorar o progresso dos programas em cada país, além da eficácia de medidas adotadas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

A presença de novas ferramentas para detecção da infecção por *W. bancrofti* na população humana, como pesquisa de microfíliarias em insetos vetores, abriram novas possibilidades e se apresentam como um diagnóstico alternativo. Segundo Rocha e Fontes (2000) o diagnóstico da infecção dos vetores é uma alternativa complementar importante em áreas onde programas de eliminação da filariose estão sendo implementados, pois juntamente com a determinação das taxas de prevalência da infecção humana, pode monitorar a eficácia das estratégias de controle da doença. Nesse trabalho utilizamos o xenomonitoramento molecular (XM), que consiste no uso de mosquitos recém-ingurgitados capturados em uma área endêmica para fornecer dados sobre a infecção natural dos vetores, através da utilização da PCR.

Farid et al. (2007) utilizaram o XM para avaliar o impacto do Tratamento Coletivo (TC) em duas áreas com alta (11,5%) e baixa prevalência (4,1%) de microfilarêmicos no Egito. E verificou-se uma redução de 93,8% (infecção vetorial de 3,07% para 0,19%) e 100% (4,37% para 0%) nas respectivas áreas, após cinco anos de TC. Rao et al. (2014), avaliaram o ciclo de transmissão em 3 áreas endêmicas de Sri Lanka, analisando cerca de 12.000 fêmeas (4.000 em cada localidade) e não encontraram mosquitos infectados após 6 anos de intervenção coletiva. Ayres et al. (2006) avaliando o impacto da DEC no bairro de Água Fria, localizado no município de Recife, com 6,21% de indivíduos microfilarêmicos e 2.418 fêmeas analisadas, obtiveram uma taxa de infecção vetorial de 0,65% no período de Pré-TC e 0% no período pós-TC (2.635 fêmeas analisadas).

Em um estudo anterior nosso grupo encontrou no bairro de Vila Popular, Olinda/PE uma infecção vetorial de 0,22% ao analisar 1.337 fêmeas de mosquitos da localidade que apresentava uma prevalência de 4,1% microfilarêmicos no período pré-TC (ARAÚJO, 2012). Nesta atual investigação, foram analisadas 1.121 fêmeas referentes ao período pós-TC, em Vila Popular, e não foram encontrados mosquitos infectados pelo verme filarial.

Apesar do largo uso da técnica de PCR ainda existe a necessidade de padronização metodológica para diagnóstico de infecção vetorial por filarídeos (WILLIAMS et al., 2002). As técnicas de XM através do ensaio de PCR para amplificar a família de DNA repetitivo *Ssp* I específico para o gênero *Wuchereria* pode variar entre amostras dependendo da qualidade das preparações de DNA e da presença de inibidores de PCR. Então no estudo foi desenvolvida uma PCR duplex (com controle endógeno) na tentativa de reduzir os resultados falsos negativos, provar a qualidade do DNA e, assim, o aprimorar o XM em áreas endêmicas.

Embora Vasuki et al. (2012) tenham observado DNA de *W. bancrofti* em *pools* de 25 mosquitos com duas microfilárias; Chanteau et al. (1994) e Plichart et al. (2006) em *pools* de 50 mosquito com uma L3; e Furtado et al. (1997) em *pools* de até 100 mosquitos de laboratório com uma única L3 adicionada, nenhum dos experimentos acima descreve o uso de mosquitos após repasto sanguíneo, condição que representa a realidade das amostras de campo do diagnóstico de infecção vetorial. A presença do repasto no mosquito torna mais difícil a extração de DNA e faz toda a diferença na sua qualidade, devido à maior quantidade de inibidores, tornando assim inviável o processamento de muitos mosquitos por *pool* após refeição sanguínea e o uso da quantidade de reagentes necessária para eliminar grande parte dos inibidores para tornar a reação possível. Portanto, no estudo, o *pool* de 10 fêmeas se mostrou confiável quanto à reprodutibilidade e sensibilidade, sendo escolhido como tamanho padrão.

Considerando que existam cerca de 300 cópias (haplóide) da *Ssp* I da região diagnóstica de 188pb (ZHONG et. al., 1996) e o genoma haploide de *W. bancrofti* possua 81,51 Mb (BROAD INSTITUTE OF HAVARD AND MIT, 2010), o montante de fragmentos da *Ssp* I representa menos que 0,1% do DNA de uma L3 do verme filarial. Assumindo também, de acordo com Chanteau e colaboradores que uma L3 tem 200pg, então a região *Ssp* I corresponde a 140 fg. Nosso ensaio duplex foi capaz de detectar com clareza 3,3 fg de *Ssp* I em *pools* de 10 fêmeas, o que representa 2,36% de uma L3. Tal achado significa que no estudo aqui proposto para detecção da *W. bancrofti* por PCR duplex, a amostra poderia ser diluída mais de 40 vezes (situação que simula as perdas de DNA no processo de extração) ou poderia haver apenas uma fêmea de mosquito infectada dentro do *pool* ou, ainda, a presença de larvas de *W. bancrofti* menores que uma L3 e, mesmo assim, o DNA do parasita pode ser detectado.

O histórico de transmissão no Brasil foi conduzido a partir de 1950, confirmando a presença da FL em 11 cidades nos diferentes estados. Após a década de 80, quase todos os focos foram considerados eliminados no país (FONTES et al., 2012). No momento atual, a

Região Metropolitana do Recife (RMR) – Recife, Olinda, Jaboatão dos Guararapes e Paulista –, em Pernambuco, ainda se apresenta como uma área de importante transmissibilidade. O município de Maceió (Alagoas) tem a infecção sob controle e o município de Belém (Pará) encontra-se em processo de reconhecimento da certificação de eliminação na OMS. Nessas localidades de controle iminente, além do inquérito sorológico e parasitológico, foi realizado o inquérito entomológico de 2.583 fêmeas e 50.863 fêmeas em Maceió e Belém, respectivamente, na qual confirmou a ausência de transmissão (FONTE et al., 2005; ROCHA et al., 2005).

Na RMR, o TC teve início em 2003, 2005 e 2006 nos municípios de Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes, respectivamente. O inquérito entomológico, através da dissecação dos mosquitos, realizado na década de 90 relataram fêmeas infectadas nos três municípios com taxa de infecção vetorial variando entre 0,61% e 1,31% (MEDEIROS et al., 1992). No presente estudo, foram analisadas 12 localidades em Olinda (Sapucaia, Alto da Bondade, Alto da Conquista, Vila Popular e Varadouro), Recife (Alto José Bonifácio, Linha do Tiro e Coque) e Jaboatão dos Guararapes (Socorros, Sucupira, Alto da Colina e Baixo da Colina) todos considerados como prioridade 1. A obtenção de amostras negativas em áreas de tratamento coletivo ou pós-TC mostra uma ausência de transmissibilidade do verme nas áreas, indicando redução ou até mesmo início da interrupção do ciclo de transmissão da parasitose. Em Linha do Tiro, localizado no Recife, com alta microfilaremia (4,96%) apresentou ciclo ativo durante o TC, sendo possível detectar transmissão durante a intervenção coletiva. Porém no período após o tratamento coletivo não foram encontrados *pools* positivos, verificando a eficácia do TC na área estudada. Assim como Well et al. (2008) utilizando o XM em Papua Nova Guiné verificaram uma taxa de infecção vetorial de 11,4% antes de iniciar o tratamento e presença de ciclo de transmissão durante o TC com 3,7% infecção vetorial no 1º tratamento; seguindo para 4,8% e 1,02%, no 2º e 3º tratamento, respectivamente.

Além de baixas taxas de prevalência de microfilaremia, existem algumas barreiras que podem dificultar o ciclo do verme filarial, segundo Regis et al. (1996) o mecanismo de transmissão da filariose é considerado ineficiente, devido à necessidade de intensa exposição a picadas do mosquito vetor e pela dificuldade de sobrevivência do verme até a forma adulta no hospedeiro humano. Esta última etapa é também considerada longa, pois a larva infectante (L3) liberada por penetração ativa através do repasto sanguíneo da fêmea, precisa se alojar em um vaso linfático e se desenvolver até a forma adulta, além da necessidade de encontrar no mesmo vaso outro verme adulto do sexo oposto para a reprodução. Em contraste, a ocorrência de baixa microfilaremia e indivíduos assintomáticos não devem ser negligenciados, pois

constitui um risco eminente para a instalação de novos focos endêmicos. De acordo com Regis et al. (2001) a relação vetor-parasita é do tipo “limitante” em *C. quinquefasciatus*, ou seja, à medida que diminui o número de microfilárias ingeridas pelo vetor, aumenta a possibilidade do verme atingir a forma infectante (L3) após ultrapassar as barreiras.

A integração de várias ações para eliminar a bancroftose, incluindo a capacitação de gestores e equipe para implementar e monitorar as atividades de controle; ampliação de cobertura de tratamento coletivo para 100%; controle vetorial; planejamento para o TAS, incluindo testes diagnósticos e instrumentos de vigilância pós-MDA; e intensificação do MMPP (Manejo de Morbidade e prevenção de incapacidade) contribuirão para reduzir a microfilaremia em áreas endêmicas (BRADY, 2014). O xenomonitoramento molecular é uma ferramenta importante e útil para avaliar a eficiência das estratégias do PGEFL em áreas endêmicas até 2020, sendo um indicador acatado pela OMS e OPAS como mais um método de aferição do *status* de transmissão nas etapas do TAS.

## 8 CONCLUSÕES

- a) No bairro de Linha do Tiro/Recife, durante o período de Tratamento Coletivo (TC) com DEC, ainda ocorria infecção vetorial do mosquito *Culex quiquefasciatus* pelo verme *Wuchereria bancrofti*;
- b) Não foi detectada infecção vetorial por *W. bancrofti* em mosquitos coletados nas demais localidades investigadas em diferentes períodos de TC nos municípios de Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes;
- c) A técnica de xenomonitoramento molecular desenvolvida por PCR duplex é altamente sensível, sendo capaz de detectar 3,3fg de *W. bancrofti*;
- d) A utilização de *pool* com 10 fêmeas de mosquitos para o xenomonitoramento molecular foi eficiente para um diagnóstico seguro de infecção vetorial;
- e) O novo protocolo de PCR duplex (com controle endógeno) é eficaz para aprimorar o método de diagnóstico de infecção vetorial, eliminando os resultados falsos negativos devido à má qualidade ou ausência de DNA;
- f) O xenomonitoramento molecular é um indicador importante para avaliação da eficiência das estratégias do PGEFL implantado em áreas endêmicas, até que seja possível obter a certificação da interrupção do ciclo de transmissão da bancroftose.

## REFERÊNCIAS

- ADDIS, D.; BRADY, M. A. Morbidity management in the Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: a review of the scientific literature. **Filaria Journal**, London, 2007. Disponível em: < <http://www.filariajournal.com/content/6/1/2>> Acesso: 10 jan. 2015.
- AKANE, A. et al. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. **Journal of Forensic Sciences**, Chicago, v.39, n. 2, p. 362-732, 1994.
- ALBUQUERQUE, A. L. et al. High prevalence and lack of diversity of *Wolbachia pipientis* in *Aedes albopictus* populations from Northeast Brazil. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 6, p. 773-776, 2011.
- ALBUQUERQUE, M. F. M. et al. **Filariose no Recife**: indicador de pobreza e desigualdade social urbana. Recife, 2013. Disponível em: <<http://dssbr.org/site/opinioes/filariose-no-recife-indicador-de-pobreza-e-desigualdade-social-urbana/>> Acesso: 13 jun. 2014.
- ALBUQUERQUE, M. F. M.; MORAIS H. M. M. Decentralization of endemic disease control: an intervention model for combating bacronftian filariasis. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 1, n.2, p. 155-163, 1997.
- ALBUQUERQUE, M. F. P. M. Urbanização, Favelas e Endemias: A Produção da Filariose no Recife, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 4, p. 487-497, 1993.
- ALMEIDA, W. A. P. **Uso do xenomonitoramento como ferramenta para avaliação da interrupção da transmissão da filariose linfática nas cidades de Belém (PA) e Maceió (AL)**. 2008. Dissertação (Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.
- AL-SOUD, W. A, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 39, n. 2, p. 485-493, 2001.
- AL-SOUD, W.A. et al. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 38, n. 1, p. 345-350, 2000.
- ARAÚJO, T. A. **Determinação da taxa de infecção vetorial no mosquito *Culex quinquefasciatus*, do município de Olinda/PE em área endêmica de filariose linfática**. 2012. Monografia (Monografia – Universidade Federal de Pernambuco) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.
- AYRES, C .F. et al. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 40, n. 4, p. 430-435, 2002.

AYRES, C. F. et al. **Evaluation of the impact of DEC Treatment on Vector Infection in the Program of Lymphatic Filariasis Control in Recife, Brazil**. Trabalho apresentado no 11<sup>th</sup> International Congress of Parasitology em Glasgow, 2006.

BARBOSA, R. M. R. **Aperfeiçoamento e avaliação de armadilha de oviposição BR-OVT para *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae)**. 2007. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2007.

BEATY, B. J.; MARQUARDT, W. C. **The Biology of Disease Vectors**. Boulder: University Press of Colorado, 1996.

BONFIM, C. et al. A socioenvironmental composite index as a tool for identifying urban areas at risk of lymphatic filariasis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 877-884, 2009.

BONFIM, C. **Filariose bancroftiana: a representação espacial das desigualdades sociais**. 2002. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2002.

BOURGUET, D. et al. The acetylcholinesterase gene Ace: a diagnostic marker for the Papiens and Quinquefasciatus forms of the *Culex pipiens* complex. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 14, n. 4, p. 390-396, 1998.

BRADY, M. Seventh meeting of the Global Alliance to Lymphatic Filariasis: reaching the vision by scaling up, scaling down, and reaching out. **Parasites & Vectors**, London, 2014. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/46>> Acesso: 10 may. 2015.

BRAGA, C. et al. Avaliação de Indicador sócio-ambiental utilizado no rastreamento de áreas de transmissão de filariose linfática em espaços urbanos. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 5, p. 1211-1218, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância e manejo do *Culex quinquefasciatus***. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde confirma primeiro caso de Febre do Nilo**. Portal da saúde, Brasília. 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/>>. Acesso: 21 jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: Plano de ação 2011-2015**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Secretária de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica e eliminação da filariose linfática**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.



BRAUN, R. F. **Plano de trabalho para a eliminação da filariose linfática em Belém, Estado do Pará, Brasil.** Pará: Secretaria Municipal de Saúde de Belém, 2002.

BROAD INSTITUTE OF HARVARD AND MIT. **The Genome Sequence of *Wuchereria bancrofti*.** 2010. Disponível em:

<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA\\_000180755.1/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_000180755.1/)> Acesso: 21 ago. 2014.

BROAKYE, D. A. et al. Monitoring lymphatic filariasis interventions: Adult mosquito sampling, and improved PCR – based pool screening method for *Wuchereria bancrofti* infection in *Anopheles* mosquitoes. **BioMed Central**, London, 2007. Disponível em:

<<http://www.filariajournal.com/content/6/1/13>> Acesso: 15 maio 2015.

CALHEIROS, C. M. L. **Transmissores em potencial e naturalmente infectados pela *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877) em Maceió - Alagoas.** 1996. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos).

**Epidemiology & Risk Factors.** Atlanta, 2013. Disponível em:

<<http://www.cdc.gov/parasites/lymphaticfilariasis/epi.html>> Acesso: 18 dez. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). **Vectors of Lymphatic Filariasis.** Atlanta, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). **West Nile Virus.** Atlanta, 2006. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/niosh/topics/westnile/>>. Acesso em: 11 jun. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). **West Nile Virus.** Atlanta, 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/niosh/topics/westnile/>>. Acesso em: 14 set. 2014.

CHANSIRI, K.; PHANTANA, S. A polymerase chain reaction assay for the survey of bancroftian filariasis. Southeast Asian. **Journal Tropical Medicine Public Health**, Bangkok, v. 33, n.3 p. 504-508, 2002.

CHANTEAU, S. et.al. Detection of *Wuchereria bancrofti* larvae in pools of mosquitoes by the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 88, n. 6, p. 665-666, 1994.

CLARK, G. C. et al. Use of the “CDC backpack aspirator” for surveillance of *Aedes aegypti* in San Juan, Puerto Rico. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 10, n.1, p. 119-124, 1994.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R.C. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

CORRÊA, A. P.; VARELLA, R. B. Aspectos epidemiológicos da Febre do Oeste do Nilo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 10, n. 3, p. 463-472, 2008.

DE MELO, J. V. et al. Cytopathological effects of *Bacillus sphaericus* Cry48Aa/Cry49Aa toxin on binary toxin-susceptible and -resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 75, n. 14, p. 4782-4789, 2008.

DISSANAYAKE, S. et al. Cloning and characterization of *Wuchereria bancrofti*-specific DNA sequence. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 39, p. 147-150, 1990.

DISSANAYAKE, S.; PIESSENS, W. F. Cloning and characterization of *Wuchereria bancrofti*-specific DNA sequence. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 39, n.1, p.147-149, 1990.

DREYER, G. et al. Filariose Bancroftiana. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infeciosas e Parasitárias**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 1087-1106.  
FARID, H. A. et al. A Critical appraisal of molecular xenomonitoring as a tool for assessing progress toward elimination of lymphatic filariasis. **American Journal Tropical of Medicine and of Hygiene**, Baltimore, v.77, n.4, p. 593-600, 2007.

FISCHER, P. et al. Development of a quantitative, competitive polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* DNA. **Parasitology research**, Berlin, v.85, n. 3, p. 76-83, 1999.

FONTES, G. et al. Filariose linfática em Belém, Estado do Pará, Norte do Brasil e perspectiva de eliminação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 131-136, 2005.

FONTES, G. et al. Lymphatic filariasis in Brazil: epidemiological situation and outlook for elimination. **Parasites & Vectors**, London, 2012. Disponível em:  
<<http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/272>> Acesso: 3 maio 2014.

FONTES, G.; ROCHA, E. M. M. *Wuchereria bancrofti* – Filariose linfática. In: NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. p. 299-307.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica**. São Paulo: Edusp, 2002.

FREITAS, H. et al. Workshop para avaliação da situação epidemiológica da filariose linfática no Município de Belém, Pará, norte do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 2, p. 212-216, 2008.

FURTADO, A. F. et al. Improvement and application of a polymerase chain reaction system for detection of *Wuchereria bancrofti* in *Culex quinquefasciatus* and human blood samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 1, p. 85-86, 1997.

HALL, T. **BioEdit**: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HARINASUTA, C. et al. The microfilarial periodicity of *Wuchereria bancrofti* in north-eastern Brazil. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 94, n. 4, p. 373-379, 2000.

- HOPPER, P. J. et al. Assessing Progress in Reducing the At-Risk Population after 13 Years of the Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, 2014. Disponível: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003333>> Acesso: 21 jan. 2015.
- HOTI, S. L. et al. Laboratory evaluation of SspI PCR assay for detection of *Wuchereria bancrofti* infection in the vector *Culex quinquefasciatus*. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 114, p. 59-64, 2001.
- IBGE. **Censo Populacional 2014**. Rio de Janeiro, 2014.
- KATHOLI, C. R. et al. Determining the Prevalence of *Onchocerca volvulus* Infection in Vector Populations by Polymerase Chain Reaction Screening of Pools of Black Flies. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 172, n. 5, p. 1414-1417, 1995.
- LAMMIE, P. J. et al. The age specific prevalence of antigenemia in a *Wuchereria bancrofti*-exposed population. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Atlanta, v. 51, p. 348-355, 1994.
- LANEY S. J. et al. A reverse transcriptase-PCR assay for detecting filarial infective larvae in mosquitoes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n.6, p. 251, 2008.
- LIMA, A. W. S. et al. Xô filariose: estratégia de intervenção para interrupção da transmissão da filariose linfática no Recife. In: EXPOEPI - MOSTRA NACIONAL DE EXPERIÊNCIAS BEM-SUCEDIDAS EM EPIDEMIOLOGIA, PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS, 7., 2007, Brasília. **Anais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. p. 71-72. (Série D. Reuniões e Conferências).
- LUCENA, W. A. et al. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction using urine and day blood samples from amicrofilaraemic patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 92, n.3, p. 290-293, 1998.
- LUNA, E. J. A. et al. Encefalite do Nilo Ocidental, nossa próxima epidemia? **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 12, n. 1, p. 7-19, 2003.
- MACIEL, A. et al. Epidemiological study of bancroftian filariasis in Recife, Northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 4, p. 449-455, 1996.
- MACIEL, A. et al. Estudo Comparativo de Áreas Endêmicas de Filariose Bancroftiana na Região Metropolitana do Recife, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 301-309, 1994.
- MATTOS, D.; DREYER, G. A. A complexidade do custo socioeconômico da filariose linfática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 399-403, 2008.
- MCCARTHY, J. et al. Evaluation of a polymerase chain reaction-based assay for diagnosis of *Wuchereria bancrofti*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 4, p. 1510-1514, 1996.

- MEDEIROS, Z. et al. *Wuchereria bancrofti* microfilarial density of autochthonous cases and natural *Culex* infectivity rates in Northeast Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 95, 214-217, 1992.
- MISHRA, K. Et al. Combined detection of *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti* using single PCR. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 93, n. 3, p. 233-237, 2005.
- MISHRA, K., et al. The development and evaluation of a single step multiplex PCR method for simultaneous detection of *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*. *Molecular and cellular probes*, london, v. 21, n. 5-6, p. 355-362, 2007.
- MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org.). **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV: IOC, FIOCRUZ, 2012. v. 5.
- MORAIS, H. M. **A filariose no Recife**: um estudo epidemiológico. 1982. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, USP, São Paulo, 1982.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- NICHOLAS, L. et al. A polymerase chain reaction assay to determine infection of *Aedes polynesiensis* by *Wuchereria bancrofti*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 90, n. 2, p. 136-139, 1996.
- NICOLAS, L.; PLICHART, C. A universally applicable internal standard for PCR detection of *Wuchereria bancrofti* in biological samples. **Parasite**, Paris, v. 4, n. 3, p. 253-257, 1997.
- NUNES, V. N. **Avaliação da metodologia de aspiração de mosquitos adultos para o monitoramento da infestação por *Aedes aegypti*, em áreas endêmicas de dengue em Recife, PE**. 2013. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.
- O'HANLON, K. **Basic Lab Skills & Know-how**. 2014. Disponível em: <<http://bitesizebio.com/20669/how-to-calculate-the-number-of-molecules-in-any-piece-of-dna>>. Acesso: 21 mar. 2015.
- OKORIE, P. N. et al. Lymphatic filariasis baseline survey in two sentinel sites of Ogun state, Nigeria. **Pan African Medical Journal**, Kampala, 2015. Disponível em: <<http://www.panafrican-med-journal.com/content/article/20/397/full/>> Acesso em: 10 maio 2014
- OLINDA. Secretaria Municipal de Saúde. **Programa de Saúde Ambiental-Subprograma de Controle da Filariose e Vigilância à Saúde**. Olinda, 2006.
- OLIVEIRA, C. M. F. **Condições ambientais e densidade populacional do *Culex quinquefasciatus* Say (Díptera: Culicidae), em áreas urbanas do Recife e Olinda**. 1996. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1996.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global programme to eliminate lymphatic filariasis. **Weekly epidemiological Record**, Geneva, v. 81, n. 22, p. 221-232, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global programme to eliminate lymphatic filariasis. **Weekly epidemiological Record**, Geneva, v.85, n. 38, p. 365-372, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Lymphatic filariasis: the disease and its control**. Fifth report of the WHO Expert Committee on Filariasis. Geneva, 1992.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis**. Annual Report on Lymphatic Filariasis. Geneva, 2001. Disponível em: <<http://www.filariasis.org>> Acesso: 10 jan. 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: progress report, 2011. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 87, n. 37, p. 346-356, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Lymphatic filariasis - 2015**. Disponível em: <[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/en/)> Acesso: 10 maio 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Lymphatic filariasis**. Geneva, 1984.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Lymphatic filariasis**. The disease and its epidemiology. 2007. Disponível em: <[http://www.who.int/lymphatic\\_filariasis/epidemiology/en/](http://www.who.int/lymphatic_filariasis/epidemiology/en/)>. Acesso em: 15 abr. 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Lymphatic filariasis: a handbook of practical entomology for national lymphatic filariasis elimination programmes**. Geneva, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Monitoring and epidemiological assessment of the programme to eliminate lymphatic filariasis at implementation unit level**. Geneva, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Monitoring and epidemiological assessment of mass drug administration in the global programme to eliminate lymphatic filariasis: a manual for national elimination programmes**. Geneva, 2011.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Eliminação de doenças negligenciadas e outras infecções relacionadas à pobreza**. Washington, 2014.

OTTESEN, E. et. al. Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariasis. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v.75, n. 6, p. 491-503, 1997.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Programa de Enfretamento das Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco SANAR-2011-2014**. Recife, 2013.

PILOTTE, N. et al. A TaqMan-based multiplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 189, n. 1-2, p. 33-37, 2013.

PLICHART, C. et al. PCR and dissection as tools to monitor filarial infection of *Aedes polynesiensis* mosquitoes in French Polynesia. **Filarial Journal**, London, 2006. Disponível em: <<http://www.filariajournal.com/content/5/1/2>> Acesso em: 15 jan. 2015.

PROGRAMA DE CONTROLE DA FILARIOSE NO RECIFE. **Intervenção-piloto para controle da Filariose Linfática**: Distrito Sanitário II: Microrregião 2.2 – bairros de Água Fria e Alto Santa Terezinha: manual de operacionalização. Recife: Diretoria de Epidemiologia, Secretaria Municipal de Saúde, 2002.

RACHOU, R. Conceito e programa de profilaxia da filariose bancroftiana no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, Rio de Janeiro, v. 12, p. 11- 39, 1960.

RAO R. U. et al. A comprehensive assessment of lymphatic filariasis in Sri Lanka six years after cessation of mass drug administration. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, 2014. Disponível: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003281>> Acesso em: 21 jan. 2015.

RAO, R. U. et al. A qPCR-based multiplex assay for the detection of *Wuchereria bancrofti*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* DNA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 103, n. 4, p. 365-370, 2009.

RAO, R. U. et al. A real-time PCR-based assay for detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in blood and mosquitoes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 74, n.5, p. 826-832, 2006.

REBOLLO, M. P.; BOCKARIE, M. J. Rapid Diagnostics for the Endgame in Lymphatic Filariasis Elimination. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 89, n. 1, p. 3-4, 2013.

RECIFE. Prefeitura Municipal. **PCR apresenta novas estratégias de controle da filariose**. Disponível em: <[http://www.recife.pe.gov.br/2008/10/31/pcr\\_apresenta\\_novas\\_estrategias\\_de\\_controle\\_da\\_filariose\\_164478.php](http://www.recife.pe.gov.br/2008/10/31/pcr_apresenta_novas_estrategias_de_controle_da_filariose_164478.php)>. Acesso em: 10 jun. 2014.

RECIFE. Secretaria Municipal de Saúde. **Cartilha PSA**. Recife, 2002.

REGIS, L. et al. Controle integrado do vetor da filariose com participação comunitária, em uma área urbana do Recife, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.12, n. 4, p. 473-482, 1996.

REGIS, L. et al. Efficacy of *Bacillus sphaericus* in control of the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Olinda, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 94, n. 5, p. 488-492, 2000.

REY, L. **Parasitologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

REY, L. **Parasitologia**: parasitas e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

RICHARDS, F. O. et al. Epidemiological and Entomological Evaluations after Six Years or More of Mass Drug Administration for Lymphatic Filariasis Elimination in Nigeria. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 10, p. e1346, 2011.

ROCHA, A. et al. Programa de controle e eliminação da filariose linfática: Uma parceria da Secretária de Saúde de Olinda/PE, Brasil, com o Serviço de Referência Nacional em Filarioses. **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, v. 39, n. 3, p. 233-249, 2010.

ROCHA, A. **Filariose Bancroftiana: Avaliação dos testes de diagnóstico disponíveis frente às diversas formas clínicas da bancroftose**. 2004. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Recife, 2004.

ROCHA, E. M. M. et al. Avaliação epidemiológica do foco de filariose linfática em Belém do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n.1, p. 476, 2005.

ROCHA, E. M. M; FONTES, G. Diagnóstico da filariose linfática bancroftiana. **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, v. 29, n. 2, p. 161-173, 2000.

SANOGO, Y. O. et al. A real-time TaqMan polymerase chain reaction for the identification of Culex vectors of West Nile and Saint Louis encephalitis viruses in North America. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 77, n. 1, p. 58-66, Jul 2007.

SANTOS NETO, J. H. **Plano de Integração da Vigilância em Saúde e Atenção Primária para Eliminação da Filariose Linfática em Jaboatão dos Guararapes – PE**. 2012. Monografia (Especialização em Gestão de Sistemas e Serviços em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

SANTOS, Z. C. **Tratamento coletivo da filariose com dose Única de dietilcarbamazina em residentes de área endêmica do Recife, Pernambuco: Um estudo antes e depois**. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância sobre Saúde) -Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, 2005.

SÃO PAULO. Secretaria de Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica **Proposta vigilância epidemiológica de encefalite de Saint Louis na Região de São José do Rio Preto**. São Paulo, 2006.

SCHLEMPER Jr., B.R. et al. Elimination of bancroftian filariasis (*Wuchereria bancrofti*) in Santa Catarina state Brazil. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v. 5, n. 12, p. 848-854, 2000.

SILVA, E. C. B. et al. Filariose Linfática: Avanços e Perspectivas do Diagnóstico Laboratorial- **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 40, n.3, p. 177-181, 2008.

SILVA-FILHA, M. H. N. L. et al. *Culex quinquefasciatus* populations submitted to *Bacillus sphaericus* treatments did not display high resistance levels. **Biological Control**, San Diego, v. 424, n. 2, p. 227-234, 2008.

SIMONSEN, P. E. et al. Lymphatic Filariasis Control in Tanzania: Effect of Repeated Mass Drug Administration with Ivermectin and Albendazole on Infection and Transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 6, p. 696, 2010.

SIMONSEN, P. E.; MWAKITALU, M. E. Urban lymphatic filariasis. **Parasitology research**, Berlin, v. 112, n. 1, p. 35-44, 2013.

SIRIDEWA, K. et al. Cloning and characterization of a repetitive DNA sequence specific for *Wuchereria bancrofti*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.51, p.495-500, 1994.

SMITH, J. L.; FONSECA, D. M. Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) pipiens complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: culicidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 70, n. 4, p. 339-345, 2004.

STALEY, M. et al. Universal primers for the amplification and sequence analysis of actin-1 from diverse mosquito species. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 26, n. 2, p. 214-218, 2010.

TAKAGI, H. et al. Development of loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Wuchereria bancrofti* DNA in human blood and vector mosquitoes. **Parasitology**, Amsterdam, v. 60, n. 4, p. 493-497, 2011.

VASUKI, V. et al. RT-PCR assay for the detection of infective (L3) larvae of lymphatic filarial parasite, *Wuchereria bancrofti*, in vector mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Vector Borne Diseases**, Delhi, v. 45, n. 3, p. 207-216, 2008.

WEIL, G. J. et al. The impact of repeated rounds of mass drug administration with diethylcarbamazine plus albendazole on bancroftian filariasis in Papua New Guinea. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, 2008. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000344>> Acesso: 15 jun. 2015.

WEIL, G. J.; LAMMIE, P. J.; WEISS, N. The ICT filariasis test: A rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 13, p. 401-404, 1997.

WEIL, G. J.; RAMZY, R. M. Diagnostic tools for filariasis elimination programs. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 23, n.2, p.78-82, 2007.

WILKERSON, R. C. et al. Ribosomal DNA ITS2 sequences differentiate six species in the *Anopheles crucians* complex (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 41, n. 3, p. 392-401, 2004.



WILLIAMS, S. Á. et al. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* in blood samples from French Polynesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 90, n. 40, p. 384-387, 1996.

WILLIAMS, S. A. et al. Development and standardization of a rapid, PCR-based method for the detection of *Wuchereria bancrofti* in mosquitoes, for xenomonitoring the human prevalence of Bancroftian filariasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 96, p.S41-S46, 2002.

ZHONG, M. et al. A polymerase chain reaction for detection of the parasite *Wuchereria bancrofti* in human blood samples. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 54, p. 357-363, 1996.