

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

TATIANE ALEXANDRE DE ARAÚJO

XENOMONITORAMENTO MOLECULAR COMO FERRAMENTA NA VIGILÂNCIA
APÓS TRATAMENTO COLETIVO EM PERNAMBUCO E NA VERIFICAÇÃO DA
TRANSMISSÃO DA FILARIOSE LINFÁTICA EM SÃO LUÍS - MA NO PERÍODO DE
2015 A 2019

RECIFE

2020

TATIANE ALEXANDRE DE ARAÚJO

XENOMONITORAMENTO MOLECULAR COMO FERRAMENTA NA VIGILÂNCIA
APÓS TRATAMENTO COLETIVO EM PERNAMBUCO E NA VERIFICAÇÃO DA
TRANSMISSÃO DA FILARIOSE LINFÁTICA EM SÃO LUÍS - MA NO PERÍODO DE
2015 A 2019

Tese apresentada ao curso de Doutorado em
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Biologia celular e
molecular básica e aplicada.

Orientadora: Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira

Coorientadoras: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes

Dra. Alessandra Lima de Albuquerque

RECIFE

2020

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

A663p Araújo, Tatiane Alexandre de.
Xenomonitoramento molecular como ferramenta na vigilância após tratamento coletivo em Pernambuco e na verificação da transmissão da filariose linfática em São Luís - MA no período de 2015 a 2019/ Tatiane Alexandre de Araújo. — Recife: [s.n.], 2020.
101 p. : il., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

Orientadora: Cláudia Maria Fontes de Oliveira; coorientadoras: Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes, Alessandra Lima de Albuquerque.

1. Filariose linfática. 2. Culex. 3. Wuchereria bancrofti. 4. Monitoramento epidemiológico. 5. Reação em Cadeia da Polimerase. I. Oliveira, Cláudia Maria Fontes de. II. Lopes, Constância Flávia Junqueira Ayres. III. Albuquerque, Alessandra Lima de. IV. Título.

TATIANE ALEXANDRE DE ARAÚJO

XENOMONITORAMENTO MOLECULAR COMO FERRAMENTA NA VIGILÂNCIA
APÓS TRATAMENTO COLETIVO EM PERNAMBUCO E NA VERIFICAÇÃO DA
TRANSMISSÃO DA FILARIOSE LINFÁTICA EM SÃO LUÍS - MA NO PERÍODO DE
2015 A 2019

Tese apresentada ao curso de Doutorado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Data de aprovação: 30/10/2020

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (Orientadora)

Dra. Zulma Maria de Medeiros
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (Titular Interno)

Dra. Rosângela Maria Rodrigues Barbosa
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (Titular Interno)

Dra. Cristine Vieira do Bonfim
Fundação Joaquim Nabuco (Titular Externo)

Dr. Wheverton Ricardo Correia do Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco (Titular Externo)

Dedico esse trabalho à base da minha vida: a minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre dá forças positivas para acreditar nos meus sonhos.

À minha família (mãe, pai, irmãos e sobrinha) que incentivam em todos os momentos da minha vida, me faz procurar os melhores caminhos e estão sempre ao meu lado.

Aos meus tios e primos, que estão guardados dentro do meu coração e me proporcionam as melhores lembranças, em especial a minha tia-madrinha Rute Alexandre.

À minha orientadora Dra. Cláudia Fontes, que é um exemplo que quero seguir sempre, por ser uma pessoa muito humana e que incentiva a crescer. Transmitiu muitos ensinamentos profissionais e pessoais em toda minha caminhada de graduação e pós-graduação.

As minhas coorientadoras Dra. Alessandra Lima e Dra. Constância Ayres, pela caminhada traçada de muitos ensinamentos compartilhados.

A Ynayana Coelho pelo companheirismo e pelo incentivo durante toda essa jornada.

A todos os amigos, que ensinam o real sentido da palavra “amizade”, em especial aos meus amigos de infância (vizinhos).

A todos os amigos do departamento de Entomologia pelo apoio, pela convivência, pelas risadas, choros e conhecimentos compartilhados.

Às amigas Irassandra Uchôa e Verônica Gomes, pela amizade construída e por toda a força durante esse período.

Ao Núcleo de Geoprocessamento e Estatística pela colaboração que foi fundamental.

Às Secretárias de Saúde dos municípios que forneceram o material indispensável para o desenvolvimento do projeto.

À Fiocruz pelo auxílio financeiro para execução do projeto.

Ao Instituto Aggeu Magalhães e Fundação Oswaldo Cruz, pela infraestrutura concedida.

Ao Serviço de Referência no Controle de Culicídeos Vetores, pela colaboração do departamento de Entomologia.

A todos que contribuíram para o desenvolvimento da tese e aos que me auxiliam, diariamente, no meu crescimento pessoal e profissional. Meus sinceros agradecimentos!

*A gratidão é a flor mais bela que brota da alma.
Henry Wardy*

ARAÚJO, Tatiane Alexandre de. **Xenomonitoramento molecular como ferramenta na vigilância após tratamento coletivo em Pernambuco e na verificação da transmissão da filariose linfática em São Luís - MA no período de 2015 a 2019**. 2020. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

RESUMO

A filariose linfática é uma parasitose endêmica em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo e no Brasil é causada pelo verme *Wuchereria bancrofti*, transmitido pelo mosquito *Culex quinquefasciatus*. A Organização Mundial de Saúde estabeleceu um Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL) que tem como um dos pilares a eliminação da transmissão através do tratamento em massa da população humana com filaricidas. Nesse contexto, a Região Metropolitana do Recife (RMR) é a única área considerada endêmica no Brasil, e atualmente, está em fase de vigilância para verificar a interrupção do ciclo de transmissão ou a ressurgência de novos casos. O objetivo desse estudo foi avaliar por xenomonitoramento molecular (XM) o *status* da transmissão da filariose em municípios endêmicos da RMR e no município do São Luís (SL) - Maranhão para inquérito de avaliação da transmissão. Imagens de satélite e software de sistemas do ArcGIS 10.2 foram usados para marcar os pontos de coletas de mosquitos e foi desenvolvido um fluxograma de amostras para vigilância entomológica. Para análise dos dados utilizou-se o modelo *Poolscreen* que detecta a taxa de infecção vetorial (TIV). Um total de 20.833 fêmeas de *C. quinquefasciatus* foram avaliadas, sendo 3.929 em 11 áreas/SL e 16.904 em 15 áreas/RMR. Nos focos tratados da RMR a TIV foi nula (0%). Porém, áreas não tratadas da RMR, apresentaram TIV entre 0,08% e 2,34% em Nova Descoberta e Vila Popular, respectivamente. Assim como, em SL, onde obtivemos TIV de 0,13% e 0,98% nas amostras dos respectivos bairros Monte Castelo e Coreia de Baixo, demonstrando que há circulação de *W. bancrofti* nesses locais. Os resultados revelam que não há evidências de transmissão ativa de microfilárias nas áreas tratadas da RMR, diferente daquelas não tratadas e focos extintos, nas quais há necessidade de vigilância epidemiológica e entomológica para subsidiar o PGEFL. Sendo assim, o XM revelou-se um importante indicador da circulação de *W. bancrofti* em áreas sob investigação de transmissão, em razão de sua elevada sensibilidade para detectar o verme no mosquito vetor.

Palavras-chaves: Filariose linfática. *Culex*. *Wuchereria bancrofti*. Inquérito epidemiológico. Reação em Cadeia da Polimerase.

ARAÚJO, Tatiane Alexandre de. **Molecular xenomonitoring as a tool in surveillance after collective treatment in Pernambuco and in verification the transmission of lymphatic filariasis in São Luís - MA in the period of 2015 to 2019**. 2020. Thesis (PhD in Bioscience and Biotechnology in Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

ABSTRACT

Lymphatic filariasis is an endemic parasitosis in several tropical and subtropical regions of the world and in Brazil is caused by the *Wuchereria bancrofti* worm, transmitted by the *Culex quinquefasciatus* mosquito. The World Health Organization has established a Global Lymphatic Filariasis Elimination Program (GLFEP) through mass treatment of the human population with filaricides. In this context, the Metropolitan Region of Recife (MRR) is the only area considered endemic in Brazil which is currently under surveillance to monitor the interruption of the transmission cycle or the resurgence of new cases. The objective of this study was to evaluate by molecular xenomonitoring (MX) the status of the transmission of filariasis in endemic municipalities of MRR and in the municipality of São Luís (SL) - Maranhão for a transmission evaluation survey. Satellite images and ArcGIS 10.2 systems software were used to mark mosquito collection points and a flowchart of samples for entomological surveillance was developed. For data analysis, the Poolscreen software was used to estimate the vector infection rate (VIR). A total of 20,833 *C. quinquefasciatus* females were evaluated by PCR, with 3,929 from 11 areas/SL and 16,904 from 15 areas /MRR. In the treated foci of MRR, the VIR was zero (0%). On the other side, untreated areas of MRR, displayed VIR between 0.08% and 2.34%, in Nova Descoberta and Vila Popular, respectively. Likewise, in SL, we obtained VIR of 0.13% and 0.98% in the samples from the Monte Castelo and Coreia de Baixo neighborhoods, respectively, demonstrating that *W. bancrofti* circulation occurs at those sites. The results show that there is no evidence of active microfilaria transmission in the treated areas of MRR, differently from untreated areas and extinct foci, there is a need for epidemiological and entomological surveillance to supplement GLFEP. Therefore, MX is an important indicator of the circulation of *W. bancrofti* in areas where transmission is being monitored, due to its high sensitivity in detecting the worm in the mosquito vector.

Keywords: Lymphatic filariasis. *Culex*. *Wuchereria bancrofti*. Epidemiological survey. Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Microfilárias de <i>Wuchereria bancrofti</i> e outros filarídeos.....	22
Figura 2 - Larva L3 na probóscide do mosquito vetor.....	23
Figura 3 - Ciclo de transmissão de <i>Wuchereria bancrofti</i> em dois hospedeiros: vertebrado (homem) e invertebrado (mosquito).....	23
Figura 4 - Criadouros potenciais de <i>Culex quinquefasciatus</i>	24
Figura 5 - Ciclo biológico de <i>Culex quinquefasciatus</i> (10 a 12 dias).....	25
Figura 6 - Os dois pilares do Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática.....	27
Figura 7 - Distribuição geográfica da filariose linfática, segundo o tratamento, países e territórios endêmicos, 2019.....	29
Figura 8 - Medidas de controle para filariose, segundo o risco ambiental e nível de endemicidade.....	31
Figura 9 - Número de exames de gota espessa e prevalência da filariose Pernambuco, 2011 a 2017.....	32
Figura 10 - Testes diagnósticos de filariose linfática na população humana.....	34
Quadro 1 - Ferramentas de diagnóstico recomendadas para diferentes fases de um programa de eliminação de filariose linfática.....	35
Figura 11 - Construção dos mapas de coleta de mosquitos com base no histórico de casos de FL indicados pelo mapa.....	45
Figura 12 - Mapas para coleta de mosquitos.....	46
Figura 13 - Treinamentos dos Agentes de Controle de Endemias para metodologia de coleta de insetos vetores.....	47
Quadro 2 - Descrição das sequências de <i>primers</i> usados na reação de PCR <i>duplex</i>	49
Quadro 3 - Descrição das sequências de <i>primers</i> usados na reação de RT - PCR <i>multiplex</i>	50
Figura 14 - Fluxograma do xenomonitoramento molecular para determinação das taxas de infecção e infectividade por <i>Wuchereria bancrofti</i> em fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	51

Figura 15 - Densidade populacional de culicídeos coletados em SL - MA, por espécie, meses de coleta, média de mosquito por casa e pluviometria.....	55
Figura 16 - Densidade populacional de culicídeos coletados em Jaboatão dos Guararapes - PE, por espécies, média de mosquito por casa e pluviometria.....	57
Figura 17 - Densidade populacional de culicídeos coletados em Olinda - PE, por espécies, média de mosquito por casa e pluviometria.....	57
Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose 2%, reações de PCR <i>duplex</i>	58
Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 2%, reações de PCR <i>duplex</i>	59
Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose 2%, reações de PCR <i>duplex</i>	59
Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose 2%, reações de PCR <i>duplex</i>	60
Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose 3%, reações de RT - PCR <i>multiplex</i> ...	61
Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose 3%, reações de RT - PCR <i>multiplex</i> ...	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Inquéritos hemoscópicos para filariose linfática realizados em unidades da federação durante as campanhas de 1956 a 1965.....	20
Tabela 2 - Áreas de estudo, com localização geográfica, população estimada, densidade demográfica e esgotamento sanitário.....	42
Tabela 3 - Áreas para coleta de mosquitos na Região Metropolitana do Recife (Pernambuco), o período de coleta (2015-2019) e as áreas Pós-TC/Circunvizinha ao TC.....	43
Tabela 4 - Áreas para coleta de mosquitos em São Luís – Maranhão (focos extintos) e o período de coleta (2016 – 2017).....	44
Tabela 5 - Espécies de culicídeos coletados em SL - MA, separados por sexo, condição alimentar e reprodutiva das fêmeas.....	54
Tabela 6 - Espécies de culicídeos coletados na RMR - PE, separados por sexo, condição alimentar e reprodutiva das fêmeas.....	56
Tabela 7 - Taxa de infecção comparativa no xenomonitoramento molecular da filariose linfática.....	60
Tabela 8 - Diagnóstico de infecção vetorial por <i>Wuchereria bancrofti</i> em amostras de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletados em Jaboatão dos Guararapes.....	61
Tabela 9 - Diagnóstico de infecção vetorial por <i>Wuchereria bancrofti</i> em amostras de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletados em Olinda.....	62
Tabela 10 - Diagnóstico de infecção vetorial por <i>Wuchereria bancrofti</i> em amostras de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletados em Recife.....	63
Tabela 11 - Diagnóstico de infecção vetorial por <i>Wuchereria bancrofti</i> em amostras de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletados em SL - MA.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	Agente de controle de endemias
ACF	Antígeno circulante filarial
AL	Alagoas
AM	Amazonas
BA	Bahia
CHBC	<i>Community Home-Based Care</i>
CK	Concentração de Knott
CMDE	Coordenação Municipal de Doenças Endêmicas
DEC	Dietilcarbamazina
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FL	Filariose linfática
FMP	Filtração em Membrana de Policarbonato
FTS	<i>Filariasis test strip</i>
GE	Gota espessa
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
ICT	<i>Immunochromatographic Card Test</i>
L3	Larva infectante de 3º estágio
LACEN	Laboratório Central de Saúde
MA	Maranhão
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan - Americana de Saúde
PA	Pará
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Pernambuco
PGEFL	Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática
PNEFL	Programa Nacional de Eliminação da Filariose Linfática
PÓS - TC	Após o tratamento coletivo
RS	Rio Grande do Sul
RT – PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>

SC	Santa Catarina
SRCCV	Serviço de Referência no Controle de Culicídeos Vetores
TAS	<i>Transmission assessment survey</i>
TC	Tratamento coletivo
VNO	Vírus do Nilo Ocidental
XM	Xenomonitoramento molecular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL.....	19
2.1 Filariose linfática.....	19
2.2 <i>Wuchereria bancrofti</i>: o verme causador da filariose bancroftiana.....	21
2.3 <i>Culex quinquefasciatus</i> SAY, 1823 (Diptera: Culicidae) - Biologia e ecologia..	24
2.3.1 Importância epidemiológica.....	25
2.4 Plano Global de Eliminação da Filariose Linfática.....	26
2.5 Plano Nacional de Eliminação da Filariose Linfática.....	29
2.5.1 Ações de controle na Região Metropolitana do Recife.....	30
2.6 Diagnósticos da filariose linfática.....	32
2.6.1 Xenomonitoramento molecular.....	35
3 JUSTIFICATIVA.....	38
4 PERGUNTA CONDUTORA.....	39
5 HIPÓTESE.....	40
6 OBJETIVO GERAL.....	41
6.1 Objetivos específicos.....	41
7 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
7.1 Área de estudo.....	42
7.1.1 Região Metropolitana do Recife.....	42
7.1.2 São Luís.....	44
7.2 Desenho e população do estudo.....	44
7.3 Amostragem.....	45
7.4 Metodologia de coleta.....	46

7.5 Obtenção da <i>Wuchereria bancrofti</i> para o controle positivo.....	47
7.6 Preparação do extrato de mosquitos.....	47
7.7 Extração de DNA e otimização da PCR <i>duplex</i> para infecção vetorial.....	48
7.8 Extração de RNA e otimização da RT - PCR <i>multiplex</i> (Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase <i>multiplex</i>) para infectividade.....	49
7.9 Fluxograma de xenomonitoramento molecular para infecção e infectividade.....	51
7.10 Análise dos dados.....	52
8 ASPECTOS ÉTICOS.....	53
9 RESULTADOS.....	54
9.1 Densidade populacional de culicídeos em SL - MA.....	54
9.2 Densidade populacional de culicídeos na RMR - PE.....	55
9.3 Reações de PCR <i>duplex</i> para a taxa de infecção vetorial.....	58
9.4 Reações de RT – <i>Multiplex</i> para a taxa de infectividade.....	60
9.5 Taxa de infecção vetorial de <i>C. quinquefasciatus</i> por <i>W. bancrofti</i> na RMR - PE..	61
9.6 Taxa de infecção vetorial de <i>C. quinquefasciatus</i> por <i>W. bancrofti</i> em SL - MA..	63
9.7 Taxa de infectividade de <i>C. quinquefasciatus</i> por <i>W. bancrofti</i> nas área avaliadas.....	64
10 DISCUSSÃO.....	65
11 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS	73
APÊNDICE A – Artigo publicado.....	86
APÊNDICE B – Artigo publicado em formato de livro.....	93

1 INTRODUÇÃO

A filariose linfática (FL) é uma endemia parasitária causada por agentes etiológicos das espécies *Brugia timori*, *Brugia malayi* ou *Wuchereria bancrofti*. Essa última utiliza vários mosquitos como hospedeiros intermediários, a exemplo da espécie *Culex quinquefasciatus*. Porém o seu único hospedeiro vertebrado é o ser humano (DREYER et al., 2009; MACIEL et al., 1994). Os vermes em fase de microfilárias são encontrados na circulação periférica e na sua forma adulta se alojam nos vasos linfáticos, podendo acarretar ao indivíduo alterações crônicas como hidrocele, linfedema e quilúria (HAWKING et al., 1981; PAILY et al., 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a FL é uma enfermidade debilitante e cerca de 800 milhões de pessoas no mundo residem em áreas de risco de contrair a infecção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020). Portanto, a OMS propôs um Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL), com dois objetivos principais para eliminar a doença como um problema de saúde pública: 1) o tratamento em massa da população humana com drogas filaricidas (em inglês, *Mass Drug Administration* - MDA), com o intuito de interromper o ciclo de transmissão do parasito e 2) o controle da morbidade, por meio da prevenção de incapacidade para pessoas já acometidas pela endemia (OTTESEN et al., 1997; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

O Brasil tornou-se signatário do PGEFL e criou um plano nacional de eliminação, cuja a administração da droga dietilcarbamazina foi denominada de tratamento coletivo (TC). Esse TC foi preconizado por um período de 4 a 6 anos, em áreas onde a prevalência de infecção filarial na população humana é $\geq 1\%$, com informação obtida por técnicas diagnósticas de gota espessa, teste ICT (teste imunocromatográfico em cartão, do inglês *immunochromatographic card test*) ou FTS (teste rápido de filariose, do inglês *filariasis test strip*) (ROCHA et al., 2010). Além disso, o programa implementou em áreas endêmicas o controle vetorial para reduzir a densidade populacional do mosquito *C. quinquefasciatus* (BRASIL, 2017; ROCHA et al., 2010).

O país já apresentou vários focos endêmicos de FL, entre eles as cidades de Maceió (Alagoas) e Belém (Pará). Entretanto, a transmissão da *W. bancrofti* foi considerada interrompida nessas localidades e a população humana permanece constantemente em observação (FREITAS et al., 2008; FONTES et al., 2012). Em contrapartida, a Região Metropolitana do Recife, em Pernambuco, ainda é considerada o único foco endêmico de FL (BRASIL, 2018). O plano nacional buscou reduzir a prevalência da infecção humana para níveis inferiores a 1%, e assim, dificultar o ciclo de transmissão do parasita pelo mosquito.

A OMS recomenda o inquérito de avaliação da transmissão (do inglês, *Transmission Assesment Survey* - TAS), para conhecer os níveis de infecção e guiar o reconhecimento oficial de eliminação da doença em programas nacionais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015). Com isso, existe a necessidade de ferramentas de diagnósticos para auxiliar o TAS, sendo o xenomonitoramento molecular (XM) uma metodologia que pode fornecer um diagnóstico de infecção por *W. bancrofti* no mosquito e auxiliar na vigilância do ciclo de transmissão em áreas submetidas ao TC. Por ser um método não invasivo na população humana, além de não requerer horários de risco para a coleta dos mosquitos, o XM pode ser empregado em áreas onde ocorreu o TC, pois fornecerá dados sobre a infecção natural dos mosquitos vetores e é um indicativo da prevalência de parasitas no humano (WEIL; RAMZY, 2006).

Tradicionalmente, a detecção de *W. bancrofti* em insetos vetores têm sido baseada na dissecação de milhares de fêmeas de mosquito capturadas em campo, preparação de lâminas e posterior análise em microscópio óptico. A dissecação é uma metodologia útil, porém demorada e laboriosa para ser empregada em inquéritos epidemiológicos, pois os mosquitos são analisados individualmente (BOCKARIE et al., 2007). Além disso, à medida que a prevalência de microfilária é reduzida na população humana é necessário aumentar o número de mosquitos analisados para confirmar ausência de transmissão pelo vetor. Neste sentido, com o intuito de resolver essa limitação imposta pela técnica de dissecação, o XM tem sido utilizado para detecção de parasita filarial em mosquitos utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (em inglês, *Polymerase Chain Reaction* - PCR) (DERUA et al., 2017; FURTADO et al., 1997; OWUSU et al., 2015; SUBRAMANIAN et al., 2020).

O XM tem o potencial de identificar baixos níveis de infecção no mosquito, é específico e sensível e permite analisar um grande número de mosquitos em *pools* (agrupamento de mosquitos em microtubo). Adicionalmente, por meio do XM é possível verificar a taxa de infecção vetorial (porcentagem de mosquitos infectados por qualquer estágio larvário da *W. bancrofti*) e taxa de infectividade (porcentagem de mosquitos albergando as larvas infectantes - L3 da *W. bancrofti*), para inferir a transmissão de *W. bancrofti* (BRASIL, 2009). Com isso, o emprego do XM como uma ferramenta a mais para o TAS é um elemento para potencializar o acompanhamento das ações de eliminação da filariose linfática no PGEFL. Portanto, este estudo se propõe a avaliar, no âmbito do TAS, a transmissão da *W. bancrofti* através do xenomonitoramento molecular, no período de 2015 a 2019, em focos endêmicos na Região Metropolitana do Recife (RMR -PE) e em antigos focos em São Luís (SL - MA), cuja a infecção pelo parasita não é registrada desde a década de 1970.

2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

A seguir serão descritos alguns tópicos que contemplam a temática da tese.

2.1 Filariose linfática

A filariose linfática (FL) é uma doença negligenciada e a segunda causa de incapacidade física no mundo, que gera um grande impacto socioeconômico aos países endêmicos. Esta endemia acomete, sobretudo, populações de baixa renda, residentes em áreas desprovidas de infraestrutura urbana e com potenciais criadouros para mosquitos (ALBUQUERQUE et al., 2013; MOTT et al., 1990). A Organização Mundial de Saúde (OMS) contabiliza que 893 milhões de pessoas em 49 países, residem em áreas de riscos de contrair a endemia. Os principais agentes etiológicos são os helmintos das espécies *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori*, transmitidos por insetos vetores. A *W. bancrofti* é responsável por 90% dos casos de FL no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020).

Os vermes de *W. bancrofti* se alojam no sistema linfático e podem acarretar danos aos membros do indivíduo. A presença de helmintos adultos (macho e fêmea) em um vaso linfático resulta na produção de microfírias, as quais circulam na corrente sanguínea, acarretando manifestações subclínicas (assintomáticas) ou clínicas (agudas ou crônicas). Na fase crônica podem surgir lesões irreversíveis, como hidrocele, edema linfático e as síndromes de fistulização linfática (DREYER et al., 1989, 2009). Estudos realizados em Guiana e na Índia observaram a diminuição anual de produtividade das atividades econômicas em até 32% de pessoas com a doença crônica, além da estigmatização psicossocial (GEDGE et al., 2018; NOORTEDENDE et al., 2020; RAMAIAH et al., 2000; TYRELL, 2013).

A FL é uma doença com registros de casos remotos, descritos desde a Grécia e Roma antiga, em esculturas africanas apresentando a hidrocele. Entretanto, o primeiro registro de microfírias em humanos foi feito no ano de 1863 por Demarquay em um indivíduo com hidrocele, e em 1866, por Otto Wucherer que identificou embriões de filárias na urina de indivíduo com hematoquilúria (WUCHERER, 1868). Nas Américas, a FL provavelmente foi introduzida pelo tráfico de escravos da África (ORIHHEL, 1985) e relatada posteriormente na Costa Rica, Suriname, Trinidad-Tobago, Haiti, Guiana, Brasil e República Dominicana. Entre esses países, o foco de transmissão com maior concentração de infecção filarial é encontrado no Haiti (92%), seguido por Guiana (6.8%), República Dominicana (1%) e Brasil (0,2%) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017).

No Brasil, inquéritos epidemiológicos, durante os anos de 1940 e 1950 em Belém (região Norte) e Recife (região Nordeste) resultaram em taxas de microfilaremia de 10,8% e 9,7%, respectivamente, caracterizando-as como áreas endêmicas de filariose no país (AZEVEDO; DOBBIN, 1952; CAUSEY et al., 1945). Fundamentado nesses dados e em outros estudos, o Ministério da Saúde (MS), em 1951, lançou uma campanha nacional para controlar a doença que foi inicialmente coordenada pelo Serviço Nacional de Malária (entre 1951 - 1955) e posteriormente passou para a coordenação do Departamento de Endemias Rurais (1956 - 1970). A partir de 1951, inquéritos hemoscópicos e entomológicos (dissecção de mosquitos e análise em microscópio óptico) em 24 Unidades da Federação e 538 municípios (Tabela 1) revelaram a distribuição autóctone de filariose em 11 municípios: São José da Ponta Grossa (SC), Belém (PA), Barra de Laguna (SC), Recife (PE), Castro Alves (BA), Florianópolis (SC), São Luís (MA), Salvador (BA), Maceió (AL), Manaus (AM) e Porto Alegre (RS). Os índices variaram de 0,1% em Porto Alegre a 14,5% em Ponta Grossa (FRANCO; LIMA, 1967; RACHOU, 1957, 1960).

Tabela 1 - Inquéritos hemoscópicos para filariose linfática realizados em unidades de federação durante 1956 a 1965.

Unidades da Federação	Nº de Localidades	Pessoas examinadas	Pessoas infectadas (%)
Rondônia	13	6.833	0,12
Acre	15	6.438	0,03
Amazonas	104	45.538	0,09
Roraima	5	1.534	0
Pará	96	98.955	1,62
Amapá	24	44.686	0,42
Maranhão	25	22.910	0,24
Piauí	14	9.805	0
Ceará	2	16.504	0
Rio Grande do Norte	10	14.455	0,01
Paraíba	16	32.326	0,02
Pernambuco	36	66.280	2,66
Alagoas	10	15.809	0,12
Fernando de Noronha	1	809	0
Sergipe	35	26.003	0,01
Bahia	56	66.258	0,30
Espírito Santo	42	31.114	0
Rio de Janeiro	1	3	0
Paraná	28	13.289	0
Santa Catarina	178	167.310	0,23
Rio Grande do Sul	60	102.950	0,03
Mato Grosso	45	6.568	0,01
Goiás	35	15.662	0
Distrito Federal	1	1.247	0,16
Total	852	811.361	0,53

Fonte: Franco e Silva Lima (1967).

Os focos com casos autóctones foram mapeados e o controle foi realizado prioritariamente no tratamento de indivíduos diagnosticados nos inquéritos (MEDEIROS et al. 2003). Trabalhos desenvolvidos entre 1979 a 1983 mostraram que a filariose estava sendo controlada de forma satisfatória e o Brasil foi considerado com o *status* de controle eminente da doença. Porém, estudos em Maceió, Recife e Belém questionavam a presença de focos endêmicos nas cidades. Em Feitosa, Jacintinho e Pitanguinha (bairros localizados em Maceió) foram encontrados indivíduos parasitados pela *W. bancrofti*, assim como, a ocorrência de 174 casos autóctones em militares residentes no Recife (MEDEIROS et al., 1999; ROCHA et al., 2000). Em Belém, na década de 1970, foram encontrados 26.945 (0,7%) microfilarêmicos e na década seguinte, 1980 a 1989, foram realizados 3.470.807 exames de sangue, dos quais 5.703 (0,16%) foram positivos (FONTES et al. 2005).

De 1989 a 1991 no Recife, as prevalências variavam entre microrregiões de 0,6% a 14,9% com média geral de 6,5% (MACIEL et al., 1996). A endemia em Pernambuco foi então considerada restrita ao Recife durante décadas, contudo um estudo realizado por Medeiros et al. (1992) identificou casos autóctones de infectados e infectividade vetorial, em outros municípios da RMR-PE: Olinda e Jaboatão dos Guararapes. O último caso notificado em Belém ocorreu em 2001, e em 2004 houve o último registro em Maceió. A partir de 2005, a área endêmica brasileira ficou restrita à RMR-PE, com população em risco estimada em 385 mil habitantes (BRASIL, 2018).

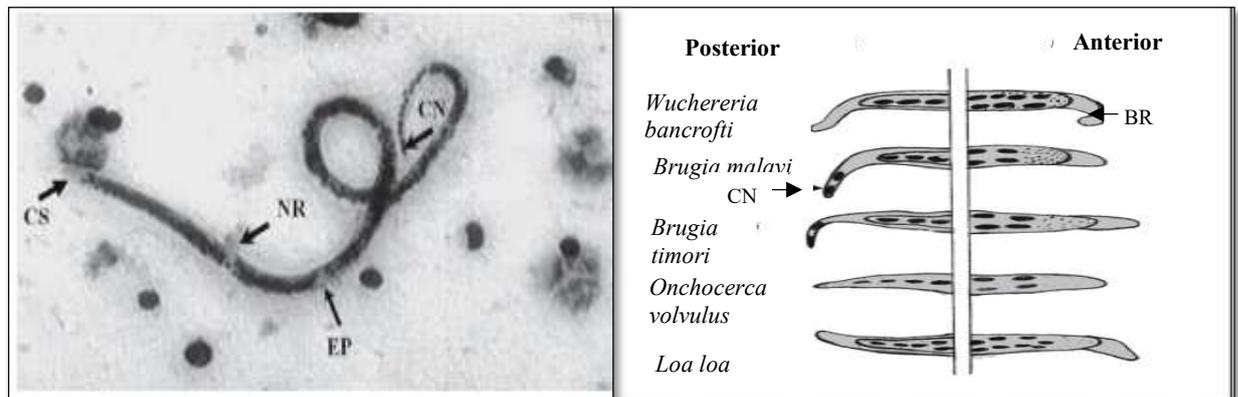
2.2 *Wuchereria bancrofti*: o verme causador da filariose bancroftiana

A espécie *Wuchereria bancrofti* pertence ao filo Nematoda, ordem Spirurida, família Onchocercidae e gênero *Wuchereria*; e é transmitida por potenciais vetores dos gêneros *Anopheles*, *Culex* (Ásia e Américas), *Aedes*, *Mansonia* e *Ochlerotatus*, dependendo da localização geográfica (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

O ciclo biológico da *W. bancrofti* é do tipo heteroxeno que necessita de um estágio de maturação em artrópodes (hospedeiros intermediários) e no homem, seu único hospedeiro definitivo, onde completa o desenvolvimento e tem atividade reprodutora. Os vermes adultos se instalam no sistema linfático do indivíduo, local no qual permanecem vivos e enovelados por cerca de 4 a 8 anos (BRASIL, 2009). Por meio do acasalamento desses vermes adultos, fêmea e macho no mesmo vaso linfático, ocorre a produção de milhares de microfilárias ou minúsculas larvas que medem de 250 a 300 µm de comprimento e apresentam membrana de revestimento

(bainha), núcleos caudais em fila única e espaço cefálico, sendo estas características que diferenciam a espécie de outros filarídeos (Figura 1) (BRASIL, 2009; PAILY, et al. 2009; REY, 1991).

Figura 1 - Microfilárias de *Wuchereria bancrofti* e outros filarídeos.



Fonte: Adaptado de Paily et al. (2009).

Legenda: Siglas em inglês - CS: Espaço cefálico; CN: Núcleos Caudais; EP: Poro excretor; NR: Anel nervoso; BR: Bainha de revestimento.

As formas larvais desse parasita se desenvolvem no mosquito transmissor. A partir de um repasto sanguíneo de uma fêmea do mosquito, em uma pessoa microfilarêmica, as microfilárias ingeridas perdem sua bainha de revestimento, atravessam a parede do estômago do mosquito, alojam-se em seus músculos torácicos e se transformam em larvas de primeiro estágio (L1) ou salsichóides. Após seis a 10 dias, ocorre a segunda muda, transformando-se em L2 ou larva pré-infectante (nesse estágio o tamanho é duas vezes maior que a L1) e entre 10 e 15 dias sofre a terceira muda assumindo a forma infectante L3, que migra para a probóscide do inseto (Figura 2). Em um novo repasto sanguíneo, as L3 são liberadas e por movimentos ativos penetram na pele do homem migrando para os linfonodos mais próximos. A L3 se desenvolve até a forma adulta e ao encontrar, no mesmo vaso linfático, um verme do sexo oposto ocorre a cópula e a produção de novas microfilárias (Figura 3). O ciclo evolutivo da *W. bancrofti* no mosquito dura em média de 15 a 20 dias, tornando-se adulto e com maturidade sexual no hospedeiro definitivo em aproximadamente um ano (BRASIL, 2009; FONTE; ROCHA, 2005).

Uma característica peculiar da *W. bancrofti*, verificada na maioria das regiões tropicais e subtropicais é a periodicidade noturna da microfilária, ou seja, durante o dia essas formas se localizam em capilares profundos do hospedeiro, principalmente nos pulmões; e durante a noite migram para o sangue periférico, apresentando o pico da microfilaremia em torno da meia-noite, decrescendo até o final da madrugada (HAWKING et al, 1966).

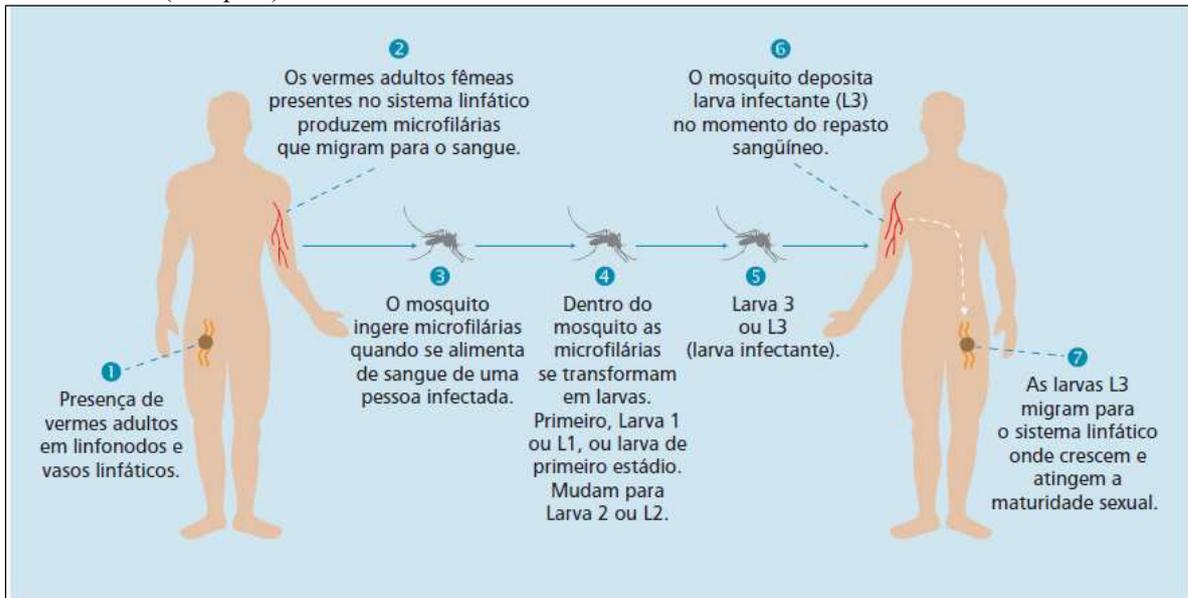
Figura 2 - Larva L3 na probóscide do mosquito vetor.



Fonte: Fontes e Rocha (2005).

No Brasil, na cidade de Maceió, foi realizado um estudo que encontrou o pico de concentração das microfilárias na corrente sanguínea periférica dos hospedeiros entre 23:00h e 1:00h em 80% das pessoas examinadas (ROCHA, 2000). Em outros países também se observa a sincronicidade das larvas; e um estudo realizado na Índia mostrou a periodicidade noturna entre 22:30h e 02:30h, com pico às 00h da densidade de microfilárias no sangue periférico do hospedeiro (KHAN et al., 2015).

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



Fonte: Brasil (2009).

2.3 *Culex quinquefasciatus* SAY, 1823 (Diptera: Culicidae) – Biologia e ecologia

A família Culicidae engloba insetos de importância médica e veterinária, cujos nomes populares variam entre as diferentes regiões do Brasil, sendo esses denominados de carapanãs, mosquitos e pernilongos. Os mosquitos pertencem a subordem Nematocera e estão agrupados em três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae. A subfamília culicinae é a maior entre elas e reúne cerca de 3.000 espécies distribuídas em 34 gêneros, dos quais 18 ocorrem no Brasil. Possui espécies de importância epidemiológica na transmissão de doenças, como *C. quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (FORATTINI, 2002). Nessa subfamília, as fêmeas apresentam palpos curtos que são menores que a probóscide, também os ovos desprovidos de flutuadores e as suas larvas possuem espiráculos implantados na extremidade do sifão (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

A espécie *C. quinquefasciatus*, conhecida como mosquito comum ou muriçoca, apresenta distribuição cosmopolita, pois se estabelece facilmente no ambiente urbano compartilhando o espaço antrópico. A atividade humana resulta na formação de múltiplas coleções de água, no nível do solo, ricas em matéria orgânica e detritos, como esgoto a céu aberto, fossas, córregos e valetas que são criadouros preferenciais da espécie em ambientes urbanizados (BRASIL, 2011) (Figura 4). As mudanças climáticas também influenciam no desenvolvimento da espécie, que apresenta um ciclo biológico curto com duração média de 10 a 12 dias, desde eclosão do ovo até a transformação em mosquito adulto. Regis et al. (1995) registrou densidades elevadas de *C. quinquefasciatus* em ambiente domiciliado, variando entre 20 e 60 adultos por quarto por noite. Em complemento, Oliveira (1996) verificou que o número de mosquitos *C. quinquefasciatus*, encontrado no interior do domicílio, depende da disponibilidade de criadouros, nas proximidades e no intradomicílio.

Figura 4 - Criadouros potenciais de *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: Brasil (2016, 2017, 2019).

Nota: Criadouros com elevada matéria orgânica.

As fêmeas adultas realizam repasto sanguíneo em uma grande variedade de animais para maturação dos ovos, incluindo o homem. Após a alimentação sanguínea, a fêmea ingurgitada tem o peso corporal aumentado e redução da atividade de voo, buscando abrigo em locais úmidos e escuros, para digerir o sangue até completar a maturação dos óvulos. Depois de dois a três dias do repasto sanguíneo, a fêmea está apta para a oviposição e nessa fase é orientada por estímulos atrativos das coleções hídricas a depositar um agrupamento de ovos, em forma de uma jangada, diretamente na lâmina d'água dos criadouros (BRASIL, 2011). Em aproximadamente 48h após a oviposição, as larvas de primeiro estágio (L1) eclodem sofrendo sucessivas mudas e atingem os outros estádios larvais (L2, L3 e L4). Essas larvas se alimentam por filtração, na camada mais superficial do criadouro, para acúmulo de reservas energéticas e, assim, passar para as fases seguintes: pupa, cuja alimentação é suspensa e dura cerca de 48 horas; e mosquito adulto que após a emergência, permanece próximo à lâmina d'água até que ocorra o endurecimento das asas, possibilitando-o voar e copular (Figura 5). As fêmeas vivem em média 45 dias e podem realizar aproximadamente quatro oviposições, cada uma contendo cerca de 150 a 280 ovos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994, RAMIAH et al., 1992).

Figura 5 - Ciclo biológico de *Culex quinquefasciatus* (10 a 12 dias).



Fonte: Melo (2013).

Nota: Após o acasalamento e a alimentação sanguínea, as fêmeas (1) depositam na água ovos agrupados sob a forma de jangadas (2), as larvas eclodem e passam por quatro estádios (3) e em seguida é atingido o estágio de pupa (4), que dará origem aos adultos (5).

2.3.1 Importância epidemiológica

A espécie *C. quinquefasciatus* faz parte do complexo *C. pipiens* e juntamente com as espécies *C. pipiens*, *C. australicus* e *C. globocoxitus* desempenham papéis importantes na transmissão de vários agentes patogênicos que infectam seres humanos, incluindo vermes filariais, Vírus do Nilo Ocidental (VNO) e Vírus da encefalite de St. Louis. Ambas as doenças virais são principalmente enzoóticas entre os pássaros, tendo os seres humanos e os equídeos como hospedeiros acidentais (CHANCEY et al., 2014; FARAJOLLAHI et al. 2011; MEULEN et al., 2005). Estima-se que 39 mil pessoas foram infectadas com o VNO nos Estados Unidos

desde a sua introdução, em 1999, resultando em 1.667 casos fatais e 41% dos indivíduos apresentando doença neuroinvasiva, a forma mais severa da infecção (CHANCEY et al., 2014). No Brasil, em 2003, com base nas recomendações da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e da OMS foi criado o Sistema Nacional de Vigilância da Febre do Nilo Ocidental. A partir da criação desse sistema, em 2014 foi registrado o primeiro caso humano de encefalite VNO no estado do Piauí, sendo relatado em 2017 outro caso em humano no mesmo estado. Além disso, evidências sorológicas do vírus em equídeos foram detectadas em 2018 no Espírito Santo (MS) (BRASIL, 2014, 2019; VIEIRA et al., 2015).

C. quinquefasciatus é vetor secundário do vírus Oropouche que causou epidemias em Rondônia no ano de 1991 e também vetor do vírus da encefalite Venezuelana (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Além dessas enfermidades, a espécie foi sugerida como potencial vetor do vírus Zika, sendo detectada naturalmente com o vírus (AYRES et al., 2019; GUEDES et al., 2017; GUO et al., 2016; MORALES et al., 2020). O Zika foi notificado no Brasil em 2015, através de surtos, e permanece até hoje como problema de saúde pública (BRASIL, 2019).

De acordo com a OMS, *C. quinquefasciatus* é vetor exclusivo da filariose bancroftiana nas Américas. A transmissão do parasita *W. bancrofti* é favorecida por características do mosquito que possui hábito alimentar preferencialmente noturno; e do parasito, que tem periodicidade noturna para a circulação de microfilárias no sangue periférico humano. Tais características facilitam o contato do mosquito com o parasito e viabilizam as infecções por *W. bancrofti* (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011).

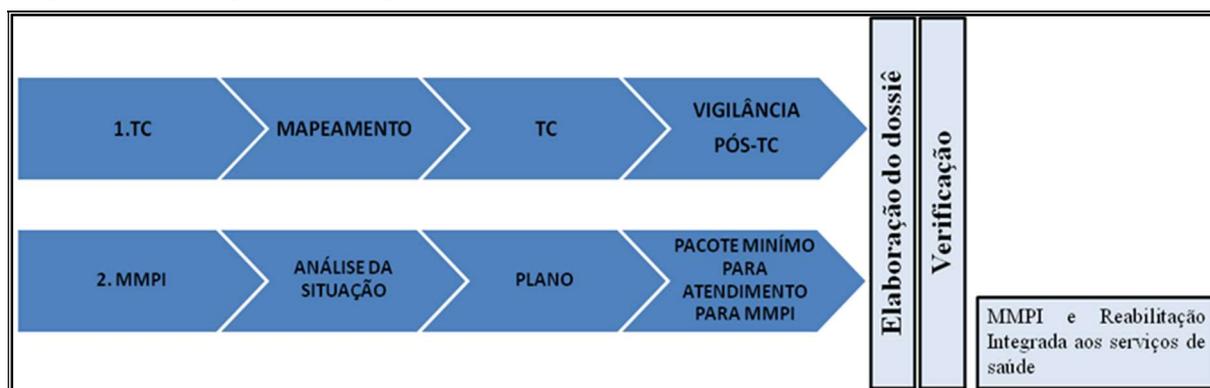
O papel dessa espécie como vetor de agentes infecciosos tem sido investigado e estabelecido em vários estudos (CARDOSO et al., 2015; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994), além de seu papel como causador de processos alérgicos e dermatites que são desencadeados pelas suas incômodas picadas (BRASIL, 2011), geralmente em áreas urbanas, onde suas densidades populacionais são bastante elevadas (REGIS et al., 1995).

2.4 Plano Global de Eliminação da Filariose Linfática

Em 1993, o Grupo de Trabalho Internacional para Erradicação de Doenças identificou a FL como uma entre seis doenças infecciosas consideradas erradicáveis ou potencialmente erradicáveis (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1993). Com isso, no ano 1997, a OMS lançou um Plano Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL) na 5ª Assembleia Mundial da Saúde (resolução WHA 50.29), fundamentado em dois pilares

principais: 1) interrupção da transmissão da filariose com o tratamento em massa (em inglês, *Mass Drug Administration* - MDA) da população com medicamentos filarídeos (Dietilcarbamazina - DEC, Albendazol ou Ivermectina, sozinhos ou combinados) e 2) o alívio do sofrimento e prevenção de incapacidades dos portadores de morbidade (Figura 6).

Figura 6 - Os dois pilares do Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática.



Fonte: Adaptado da Organização Mundial de Saúde (2013).

Legenda: 1. TC: Tratamento coletivo; 2. MMPI: Manejo de morbidade e prevenção de incapacidade.

Foram recomendados pelo PGEFL os seguintes esquemas de uso das drogas filarídeos: 6 mg/kg de citrato de DEC com sal de cozinha fortificado; ou 400 mg de albendazol + 6 mg/kg DEC; ou 150 µg/kg de Ivermectina + 400 mg de Albendazol (co administrados em áreas que são endêmicas para filariose e oncocercose); ou 400 mg de albendazol (em áreas que também são endêmicas para *Loa loa*). Esses medicamentos reduzem as microfílarias da corrente sanguínea e impedem a propagação dessas larvas aos mosquitos (OTTESEN et al., 1997). Em alguns países endêmicos, além do MDA, que no Brasil foi chamado tratamento coletivo (TC), realiza-se o controle do mosquito vetor, ao longo dos anos, como por exemplo, em áreas onde a transmissão dos patógenos causadores da filariose e da malária ocorre pela mesma espécie de vetor (gênero *Anopheles*). Intervenções voltadas para o controle da malária, tais como a distribuição de mosquiteiros impregnados com inseticidas e a pulverização residual, têm um impacto sobre a filariose. Em Papua-Nova Guiné, Ilhas Salomão e Índia, a gestão ambiental e o controle da densidade de mosquitos auxiliaram na redução da transmissão e prevalência da microfíliose (BERG et al., 2013).

Para o controle da morbidade, alguns países endêmicos adotaram o programa *Community Home-Based Care* para fornecer assistência aos portadores crônicos da filariose em domicílios (ou clínicas), seguindo o protocolo de gerenciamento de linfedema descrito por Dreyer et al. (2001). O protocolo possui cinco componentes: higiene, prevenção/cura de lesões, exercícios,

elevação de membros afetados e proteção desses membros. Com esse gerenciamento de linfedema, estudos realizados em Madagascar, Sri Lanka e Zanzibar mostraram uma diminuição de episódios agudos da doença e melhoria de qualidade de vida dos microfilarêmicos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2004; JOSEPH et al., 2004).

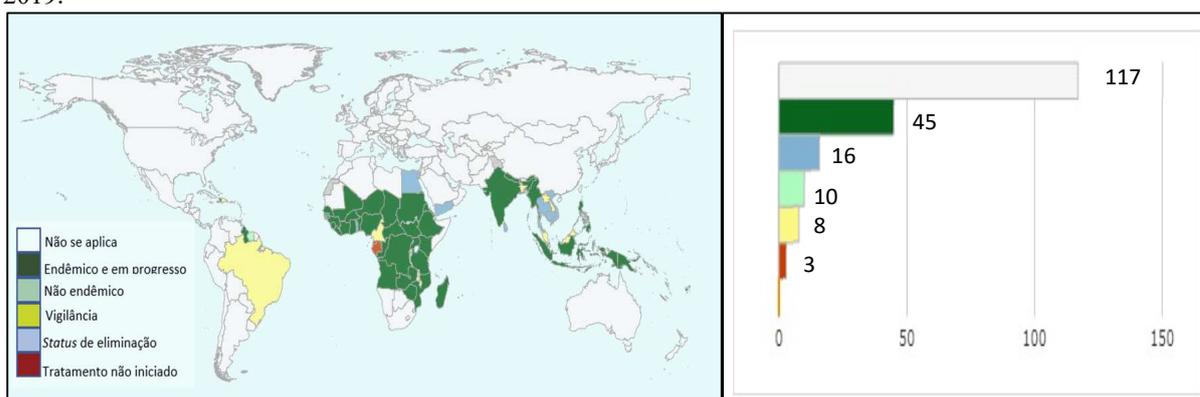
O PGEFL elencou 72 países endêmicos em regiões tropicais e subtropicais do mundo e uma estimativa inicial de 1,46 bilhão de pessoas residentes em áreas sob riscos de contrair a enfermidade. A estratégia inicial do plano foi mapear a distribuição geográfica da população para receber o MDA e distribuir os medicamentos em toda a população com cobertura mínima de 65%. Como estratégia intermediária, adotou-se a vigilância após o tratamento e o monitoramento da quebra do ciclo de transmissão em focos endêmicos. Por último momento, a verificação do *status* de eliminação de filariose até 2020 e elaboração de dossiê certificando o controle da filariose no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020) (Figura 6). Mais recentemente, por meio de uma resolução (CD55.R9) foi aprovado o Plano de Ação para a Eliminação de Doenças Infecciosas Negligenciadas e Medidas Pós-Eliminação (2016-2022), incluindo a eliminação da FL nas Américas até 2022 (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2016).

O plano global foi iniciado em 2000, e durante os oito primeiros anos, a OMS distribuiu mais de 1,9 bilhão de tratamentos em 48 países (570 milhões de indivíduos tratados) (OTTESEN et al., 2008). Em 2012, a implementação passou para 4,4 bilhão de medicamentos, reduzindo a população de risco de 1,46 bilhão para 789 milhões (HOPPER et al., 2014). A partir de 2016, a quimioterapia preventiva foi considerada necessária em 53 dos 72 países endêmicos e devido a atuação dos programas nacionais, mais de 6,7 bilhão de tratamentos foram distribuídos. Com isso, vinte e três países reduziram a prevalência de infecção para os níveis em que a transmissão é considerada baixa ($\leq 1\%$ na população humana) e dezesseis desses países já foram reconhecidos com a eliminação da filariose como um problema de saúde pública (Figura 7). Entre esses países, incluem-se Camboja, Malásia, Vietnã, Maldivas, Sri Lanka, Tailândia, Iêmen, Togo e Egito. Porém, o medicamento filaricida ainda é necessário em 49 países, devido à ausência de cobertura em todo território endêmico (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020).

Na vigilância após o MDA, a OMS estabeleceu uma metodologia padrão, o inquérito de avaliação da transmissão (*Transmission Assessment Survey - TAS*) que apresenta o objetivo de verificar a ausência de transmissibilidade e orientar o reconhecimento oficial para decidir sobre a continuidade ou finalização do MDA em um programa nacional (ORGANIZAÇÃO

MUNDIAL DE SAÚDE, 2015). As pesquisas são realizadas após o término do tratamento e devem ser repetidas ao menos duas vezes por ano com intervalos de dois a três anos, para assegurar que a recrudescência da doença não tenha ocorrido e que a transmissão possa ser considerada interrompida. A população alvo da pesquisa é composta por crianças entre seis e sete anos de idade pelo fato de supostamente terem sido protegidas de infecção caso o MDA tenha sido bem-sucedido na interrupção da transmissão. Portanto, neste grupo etário, os testes com resultados positivos normalmente indicam infecções recentes. Porém para o TAS, se faz necessário futuras abordagens à vigilância pós - MDA embasadas em instrumentos diagnósticos que serão padronizados e complementar para verificação de eliminação da transmissão (WEIL; RAMZY, 2006; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015).

Figura 7 - Distribuição geográfica da filariose linfática, segundo o tratamento, países e territórios endêmicos, 2019.



Fonte: Adaptado de Organização Mundial de Saúde (2019).

2.5 Plano Nacional de Eliminação da Filariose Linfática

Diante da problemática de filariose linfática no Brasil e a necessidade da criação do PGEFL, o MS lançou um Plano Nacional de Eliminação da Filariose Linfática (PNEFL), cuja ação prioritária foi o TC com a DEC, medicação disponibilizada gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A DEC é um derivado da piperazina com rápida absorção e baixa toxicidade, empregada na forma de comprimido com 50 mg do princípio ativo. A dose preconizada é de 6 mg/kg em dose única anual, repetida por quatro a seis anos, para a população de crianças maiores de seis anos e adultos até 65 anos de idade. Gestantes, mulheres no período de lactação e portadores de doenças crônicas (renais crônicas e cardiopatas) não recebem a medicação. Além da administração de medicamentos, o MS destacou a importância do manejo da morbidade e prevenção de incapacidade (MMPI), visando reduzir o sofrimento e melhorar a

qualidade de vida das pessoas acometidas pela doença. Para tanto, implementou medidas terapêuticas (no caso de infecções microbianas oportunistas), medidas fisioterápicas, medidas psicológicas e tratamento cirúrgico em casos mais avançados (BRASIL, 2017; ROCHA et al., 2010).

No Brasil, a maior parte dos focos endêmicos foi extinta a partir de 1950 e após a implementação do PNEFL, as cidades de Belém (PA) e Maceió (AL) que estavam entre os maiores focos epidemiológicos no passado, estão atualmente com controle eminente de filariose, o que indica eliminação da transmissão local (FREITAS et al., 2008; FONTES et al., 2012). Em São Luís (MA) os últimos casos notificados foram em 1977, descobertos através de levantamentos hemoscópicos que resultaram em 49 casos de filariose (BRASIL, 2015).

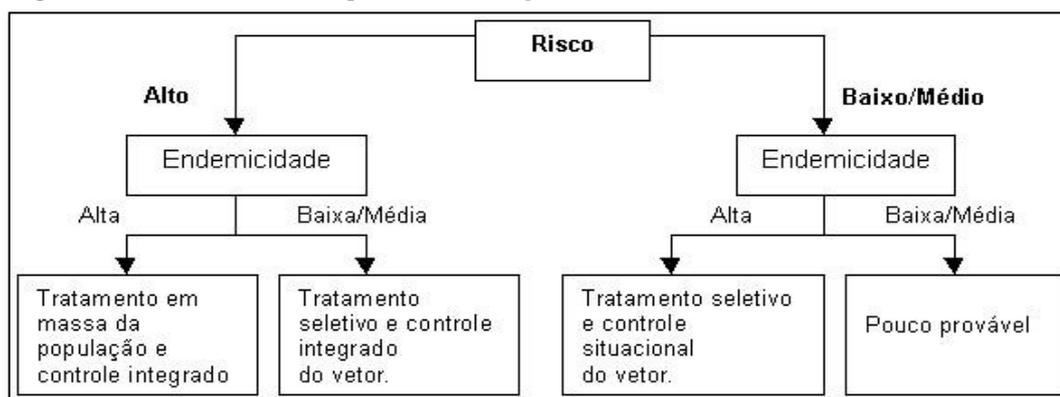
2.5.1 Ações de controle na Região Metropolitana do Recife

Na Região Metropolitana do Recife, o TC teve início em 2003 no bairro Alto de Santa Terezinha, no Recife, onde a população tratada foi de 22.657 pessoas (96% de cobertura de tratamento) (LIMA et al., 2007). O sucesso do tratamento ocorreu pela mobilização da comunidade e instalação de postos de medicação em vários pontos no bairro. No município de Olinda o TC iniciou em 2005 no bairro Alto do Sol Nascente, com uma população elegível de 5.088 e cobertura de 90% (4.579 indivíduos tratados) (ROCHA et al., 2010). Em Jaboatão dos Guararapes a administração coletiva de DEC foi iniciada em 2006 no bairro de Cavaleiro, com população existente de 9.395 pessoas, sendo de 4.579 pessoas a população alvo (cobertura de 57,50%) (SANTOS NETO, 2012). Nas áreas de alto risco ambiental de transmissão, além do tratamento antiparasitário, instituíram-se estratégias de controle vetorial para reduzir a densidade populacional vetores (REGIS et al, 1996).

Em Olinda, as áreas para TC foram divididas em transmissibilidade local (prevalência ≥ 1 de microfilaremia) e em risco socioambiental (percentual de domicílios sem esgotamento sanitário, sem destinação correta de resíduos e média de habitantes por dormitório). As áreas foram separadas 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 8) (BRAGA et al., 2001; ROCHA et al., 2010). As áreas de prioridade 1 foram observadas em 14 bairros: Alto da Bondade, Alto da Conquista, Sapucaia, Águas Compridas, Salgadinho, Área Rural, Alto Sol Nascente, São Benedito, Peixinhos, Caixa

d'Água, Aguazinha, Sítio Novo, Varadouro e Passarinho. Com isso, no ano de 2007, foi criada em Olinda a Coordenação Municipal de Doenças Endêmicas (CMDE), com o intuito de planejar as ações de controle, vigilância e monitoramento de filariose, tuberculose, dengue e hanseníase; e no âmbito da CMDE, as ações buscaram reduzir as taxas de microfilaremia para menos de 1% da população, principalmente em áreas de prioridade 1 (ROCHA et al., 2010).

Figura 8 - Medidas de controle para filariose, segundo o risco ambiental e nível de endemicidade.



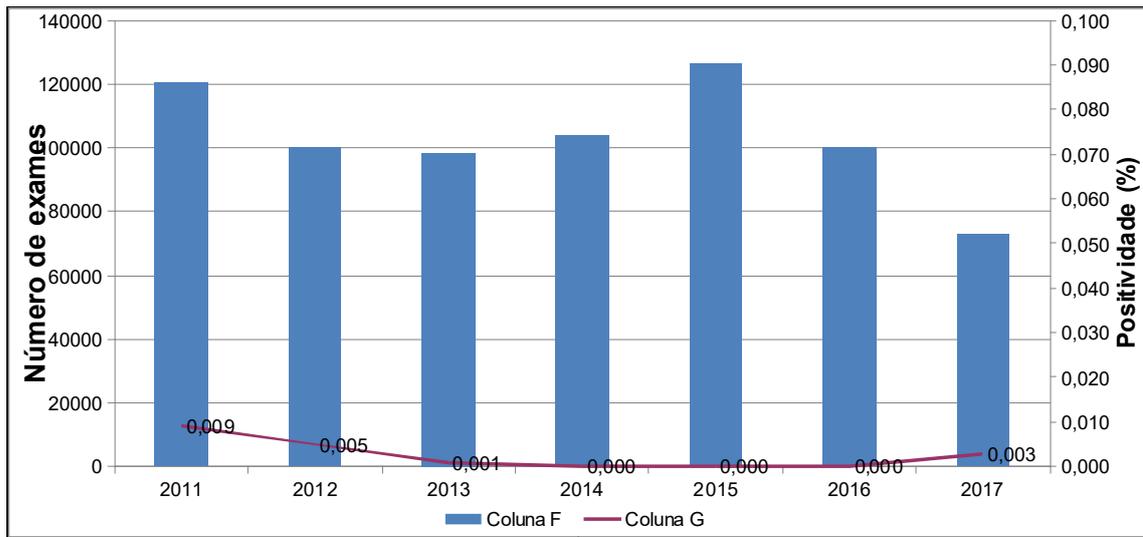
Fonte: Braga (2001).

O programa de Controle no Recife foi iniciado no ano de 2003 nos bairros de maior prevalência 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. Dados entre 2003 e 2014 provenientes da Secretaria de Saúde apontaram êxitos importantes no sobre o declínio de filariose linfática no Recife, não observando mais casos positivos durante esse período (ALBUQUERQUE et al., 2013; BRASIL, 2016).

No município de Jaboatão dos Guararapes, as áreas denominadas de alta/média/baixa endemicidade foram avaliadas inicialmente de acordo com o inquérito por gota espessa realizado pelo Instituto Aggeu Magalhães (entre 1999-2001) nos diferentes distritos do município (SANTOS NETO, 2012). Posteriormente, foi realizado um inquérito epidemiológico no qual foram examinadas 23.673 pessoas, identificando-se 323 casos de microfilaremia (1,4%) (BONFIM et al., 2009). No distrito de Cavaleiro foram avaliados 9.520 residentes em 12 bairros, detectando 213 microfilarêmicos (2,2%) (BONFIM et al., 2003). Para operacionalizar o Programa Municipal de Controle da Filariose foram incluídas 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).

Atualmente, os municípios de Jaboatão dos Guararapes, Recife, Olinda e Paulista são considerados endêmicos e nesses municípios, exceto Paulista, foram realizados mais de cinco anos de TC nas localidades com prevalência $\geq 1\%$ e os resultados atuais na população humana sugerem o início de interrupção da transmissão, estando os municípios na fase de TAS. O programa de Enfrentamento às doenças negligenciadas (SANAR) criado em Pernambuco (2011) em cooperação com a OPAS/OMS, relata inquéritos realizados nos municípios os quais indicaram que em 2004 foram examinadas cerca de 190 mil pessoas e diagnosticados 1.339 casos (0,69%) reduzindo para 0,009% em 2011 e 0% em 2016. Porém, em 2017, foram detectados 11 casos de filariose no bairro de Nova Descoberta (Recife/PE) examinados pelo governo federal e estadual, relatando a necessidade de vigilância periódica em áreas não tratadas (Figura 9) (Secretaria de Saúde do Recife, comunicação pessoal, 2017). Já em 2018, o número de examinados foi de 73.364 pessoas, sem positivos diagnosticados (BRASIL, 2019).

Figura 9 - Número de exames de gota espessa e prevalência da filariose. Pernambuco, 2011 a 2017.



Fonte: Secretaria de Saúde, comunicação pessoal (2017).

Legenda: Coluna F: Número de exames em PE, coluna G: Positividade de microfilarêmicos em PE.

2.6 Diagnósticos da filariose linfática

O diagnóstico da filariose se baseia principalmente no diagnóstico clínico e apresenta dificuldades em grande parte pela diversidade de manifestações, que são dependentes de fatores relacionados ao parasita e pela resposta imunológica do indivíduo, e devido à semelhança das alterações provocadas pela *W. bancrofti* com aquelas produzidas por outros agentes etiológicos. Sendo assim, para confirmação do diagnóstico na população humana é necessária uma análise

laboratorial através de métodos atuais que se baseiam em diferentes técnicas parasitológicas, imunológicas, por imagem e moleculares (SILVA et al., 2008).

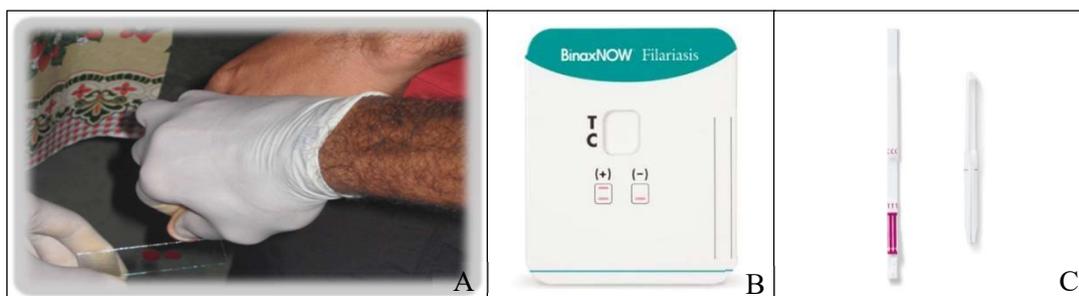
A pesquisa parasitológica tem como princípio a identificação direta de microfilárias em sangue periférico ou venoso de acordo com a periodicidade do parasita. Esse método é realizado por meio das técnicas de Gota Espessa (GE), Concentração de Knott (CK) e Filtração em Membrana de Policarbonato (FMP). A GE é a abordagem padrão de diagnósticos parasitológicos e apresenta vantagem pela boa especificidade e baixo custo. Porém, a principal desvantagem é a baixa sensibilidade, que apenas é sensível em níveis de infecções com densidades microfilarêmica acima de 30 microfilárias por ml. Além disso, microfilárias de *W. bancrofti* são encontradas no sangue periférico no horário de pico entre 22h e 02h, tornando difícil ao acesso à população de residentes em áreas endêmicas. O princípio desse teste é colher aproximadamente 60µl de sangue do parasitado e colocar em uma lâmina. Após 12-15 horas, realiza a desmoglobinização (retirada da hemoglobina, propiciando uma melhor visualização da microfilária) e a coloração com Giemsa para análise no microscópio óptico (Figura 10a). A CK e FMP são técnicas que apresentam maior sensibilidade em relação a GE, contudo são testes mais laboriosos e demorados. A CK consiste em diluir 1 ml de sangue venoso em 9 ml de formalina a 2 %, que posteriormente é centrifugado e o sedimento é removido para preparação da lâmina e análise em microscopia, já a FMP consiste em filtrar o sangue diluído em solução tamponada através de membrana de policarbonato (poros 3 ou 5 µm de diâmetro) que permite a passagem de hemácias, mas retém as microfilárias existentes para analisá-las em microscópio óptico (LOURENS et al., 2019; MEDEIROS et al., 2010; ROCHA; FONTES, 2000).

Os testes imunológicos atualmente utilizados são os antígenos circulante filarial (Og4C3-ELISA e ICT) e anticorpos antifilariais (Bm14, PanLF, Urine SXP) que representam um importante avanço no diagnóstico da filariose no PGEFL, pois permitem a detecção da infecção mesmo na ausência da microfilaremia e podem ser realizados com sangue coletado sem precisar observar a periodicidade noturna do parasita (MORE; COPEMAN, 1990; WEIL et al., 1997). Gass et al. (2012) avaliando as ferramentas sorológicas e imunológicas em 5 países (Sri Lanka, Polinésia Francesa, Zanzibar, Haiti e Tuvalu) observaram que o ICT é uma ferramenta recomendada para a tomada de decisões na interrupção de TC, por apresentar baixo custo, não requer equipamentos de laboratório, ter sensibilidade e especificidade satisfatória e poder ser processada em 10 minutos (Figura 10b). Porém, a desvantagem do ICT é o prazo de validade curto (3 meses) e a necessidade de armazenamento a frio (LOURENS et al., 2019). Para tratar as limitações do ICT, foi adicionado ao programa global o teste de filariose em tira, o *Filarisis*

Test Strip (FTS), utilizado para a detecção qualitativa de antígeno de *W. bancrofti*, em amostras de sangue humano coletadas por punção no dedo do indivíduo. É uma metodologia rápida, de vida útil mais longa, melhor estabilidade de temperatura e redução de custo (Figura 10c) (CHESNAIS et al., 2017; LOURENS et al., 2019).

Outro método utilizado no diagnóstico da filariose é o por imagem que possui a potencialidade de detectar indivíduos infectados com formas adultas vivas em vaso linfático, possibilitando encontrar durante todo o dia vermes adultos com movimentos ativos e interromptos denominados “sinal de dança filarial”, mesmo que os testes laboratoriais acima citados sejam negativos, sendo denominados esses casos como “infecção oculta” (AMARAL et al., 1994; DIETRICH et al., 2019).

Figura 10 - Testes diagnósticos de filariose linfática na população humana.



Fonte: Brasil (2009); Neglected Tropical Diseases (2016).
Legenda: A: gota espessa, B: ICT card test, C: FTS.

Os diagnósticos moleculares são testes altamente sensíveis e específicos para detectar o DNA do parasito (*W. bancrofti* ou espécies de *Brugia*) no homem e no vetor. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) consiste em uma técnica de amplificação (criação de múltiplas cópias) *in vitro* de ácidos nucléicos. 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 (CHAMBERS et al., 2009; FURTADO et al., 1997; MOUSTAFA et al., 2017; RAO et al., 2017) nos tecidos biológicos incluídos em parafina (MCCARTHY et al., 1996) e em amostras de urina (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 ele é constituído principalmente por cerca de 80% de pares de bases do tipo timina-adenina. Essas sequências são distribuídas de forma altamente repetitiva e enfileirada (em tandem), sendo designadas de “famílias 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. A partir dessa sequência, foi possível o desenho de *primers* (denominados NV1 e NV2) que permite uma alta sensibilidade e especificidade na detecção do DNA do gênero *Wuchereria* (ZHONG et al., 1996).

2.6.1 Xenomonitoramento molecular

Atualmente, a necessidade de desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico que avaliem a eficácia de medidas de controle é considerada crescente, para fornecer evidências de que o tratamento coletivo em uma determinada comunidade poderá ou não ser encerrado. Além disso, a redução na prevalência de infecção nas comunidades resultará na detecção de níveis baixos de infecção e com isso a necessidade de inúmeros diagnósticos para confirmar a ausência de transmissão em programas nacionais (WEIL; RAMZY, 2006).

A ferramenta de diagnóstico denominada xenomonitoramento molecular (XM) é um método não invasivo para a população humana que detecta a presença de parasitas em organismos, incluindo insetos vetores, através de técnicas moleculares (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013). Portanto, é um método promissor, útil e de empregabilidade imediata em programas de eliminação da filariose linfática, para mensurar indiretamente a presença de microfírias circulantes na população e a recorrência de novas infecções. Podendo ser utilizado desde o período anterior ao tratamento coletivo até a verificação do *status* de eliminação da doença (Quadro 1). A redução nas taxas de infecção em vetores oferece uma valiosa demonstração de que está havendo diminuição de transmissão em uma área endêmica (OWUSU et al., 2015).

Quadro 1 - Ferramentas de diagnóstico recomendadas para diferentes fases de um programa de eliminação de filariose linfática.

Ferramentas	Mapeamento	Impacto do TC	Finalização do TC	Vigilância e Verificação
Ferramentas primárias	ACF, Mf	ACF, Mf	ACF, Mf	AB, XM
Ferramentas Secundárias	AB, XM, PCR-sangue	AB, XM, PCR-sangue	AB, XM	Nenhuma

Fonte: Adaptado de Weil e Ramzy (2006).

Legenda: abreviaturas – AB: testes de anticorpos de populações sentinelas, especialmente crianças; PCR-sangue: detecção de DNA filarial em sangue humano; ACF: testes de antígenos circulantes filariais; Mf: teste de microfíria; XM: Xenomonitoramento Molecular.

A OMS recomenda o XM como alternativa para o PGEFL e o método revelou-se um indicador potencialmente útil de infecções humanas com diferentes espécies de mosquitos em diversas configurações, incluindo Samoa Americana (SHMAEDICK et al., 2014), Polinésia Francesa (PLICHART et al., 2006), Sri Lanka (RAO et al., 2014), Serra Leoa (SOUZA et al., 2015), Índia (SUBRAMANIAN et al., 2020), Gana (OWUSU et al., 2015) e Bangladesh (IRISH et al., 2018). Em países de alta endemicidade como o Togo observou-se a ausência de transmissão por XM e tornou-se o primeiro país da África subsaariana a receber a validação da OMS de eliminação da filariose (DORKENOO et al., 2018).

No XM, a detecção da infecção vetorial por vermes filariais é tradicionalmente realizada pela dissecação da fêmea do mosquito e análise em microscópio óptico, para assim, observar a presença de larvas (MEHTA et al., 2018; SIMONSEN et al., 2010; SOUZA et al., 2018). Essa metodologia é eficaz no monitoramento de infecção em mosquitos vetores, porém é um procedimento considerado laborioso e requer muito treinamento, pois a distinção específica de *W. bancrofti* é difícil em áreas onde outras espécies de filarídeos são prevalentes. Chambers et al. (2009) comparando as técnicas de PCR e dissecação, mostram que ambos os métodos foram efetivos na detecção de *W. bancrofti* e *D. immitis* em mosquitos, sendo a PCR mais sensível na detecção de ambas as espécies, como foi relatado a sensibilidade dessa técnica em outros estudos de diagnóstico (BOCKARIE et al., 2007; MOUSTAFA et al., 2017; OKORIE; SOUZA, 2016; PLICHART et al., 2006; WILLIAMS et al., 2002).

A PCR tem sido empregada para detectar pelo menos uma larva de *W. bancrofti* em lotes (*pools*) de até 50 mosquitos (PLICHART et al., 2006) e é possível verificar a taxa de infecção vetorial (porcentagem de mosquitos infectados por qualquer estágio larvário da *W. bancrofti*) e a taxa de infectividade (porcentagem de mosquitos albergando larvas infectantes-L3 da *W. bancrofti*) mensurando a transmissibilidade local (BRASIL, 2009).

Nos últimos anos, estes ensaios moleculares vêm sendo aprimorados para o diagnóstico de *W. bancrofti*, porém a eficiência dos ensaios pode variar entre amostras, dependendo da qualidade das preparações de DNA e da presença de inibidores da reação, como por exemplo, moléculas não eliminadas durante a extração, como hemoglobinas, lactoferrina, imunoglobina G, que são encontradas em fêmeas alimentadas de sangue humano (AL-SOUD et al 2000, 2001). Portanto, na tentativa de eliminar os resultados falsos-negativos, a utilização de controle endógeno para mosquitos reduz esses resultados e acarreta mais confiabilidade ao teste molecular (STALEY et al., 2010). Além disso, a distinção entre as larvas de qualquer estágio e L3 presentes no mosquito vetor, estabelecem a presença de novas infecções em seres

humanos, ao albergar a L3. Essa abordagem foi relatada por Vasuki et al. (2008) e Laney et al. (2010) para genes ativados na fase específica L3 de *W.bancrofti* em mosquitos de laboratório. Contudo, é necessária a abordagem para mosquitos coletados em campo.

Em síntese, nesse estudo, utilizamos o xenomonitoramento molecular em localidades com focos recentes e extintos de FL, e em áreas adjacentes aos focos, para o inquérito de avaliação de transmissão da filariose no país.

3 JUSTIFICATIVA

No Brasil, dados recentes apontam para a interrupção do ciclo de transmissão de *Wuchereria bancrofti* em importantes focos endêmicos da filariose linfática (FL), como as cidades de Maceió (AL) e Belém (PA). Outros focos endêmicos, como Castro Alves (BA), Florianópolis (SC) e São Luís (MA) não registram mais a transmissão ativa do nematoide causador da doença. Em São Luís, desde 1970 não há mais transmissão. No entanto, na Região Metropolitana do Recife (RMR), em Pernambuco, ainda há municípios com áreas consideradas endêmicas para FL (Recife, Olinda, Jaboatão dos Guararapes e Paulista). Com exceção de Paulista, os demais municípios, onde as prevalências de infecção foram superiores a 1%, receberam o tratamento coletivo (TC). Como resultado das intervenções do Plano Nacional de Eliminação da Filariose Linfática (PNEFL), no período de 2003 a 2018, observou-se uma importante redução da prevalência, o que sugere a interrupção da transmissão do parasita nessas localidades. No entanto, a tendência de redução deve ser mantida até que haja a comprovação da quebra do ciclo de transmissão no país. A certificação de eliminação da FL no Brasil, precisa ser comprovada em todo território nacional onde havia focos endêmicos. Assim, o diagnóstico de infecção vetorial, por xenomonitoramento molecular (XM), será uma ferramenta importante para auxiliar na verificação do *status* de interrupção da transmissão, seja nos municípios que participaram do TC ou em outros focos que não há mais registros de pessoas com microfilaremia. Para isso, é necessário fazer um inquérito de avaliação da transmissão (em inglês, *Transmission Assesment Survey* - TAS). Neste estudo, o TAS teve uma abordagem vetorial, cuja detecção do parasito na população do mosquito *Culex quinquefasciatus* das áreas sob investigação será o indicador de transmissão ativa na área, além de indicar o local que deverá receber ações de bloqueio para evitar a expansão da doença.

4 PERGUNTA CONDUTORA

O xenomonitoramento molecular é capaz de identificar, através das taxas de infecção vetorial, a circulação de *Wuchereria bancrofti* em áreas que receberam TC, áreas circunvizinhas ao TC e em antigos focos endêmicos de FL?

5 HIPÓTESE

O xenomonitoramento molecular é capaz de detectar reduzidas taxas de infecção em mosquitos de áreas com baixa prevalência da doença, identificando focos residuais de transmissão da FL em áreas circunvizinhas ao TC e em focos endêmicos de FL, atualmente considerados extintos.

6 OBJETIVO GERAL

Avaliar por xenomonitoramento molecular o *status* da transmissão da filariose linfática em municípios endêmicos da Região Metropolitana do Recife (Pernambuco) e no município São Luís (Maranhão) para inquérito de avaliação da transmissão.

6.1 Objetivos específicos

- a) Estimar a densidade populacional do mosquito *C. quinquefasciatus* nas diferentes áreas de estudo;
- b) Aperfeiçoar a técnica de xenomonitoramento molecular para detectar as taxas de infecção vetorial e infectividade de *Culex quinquefasciatus* por *Wuchereria bancrofti*;
- c) Determinar as taxas de infecção vetorial de *C. quinquefasciatus* por *W. bancrofti* em focos endêmicos que finalizaram o tratamento coletivo (TC) e áreas próximas geograficamente aos focos, mas que não realizaram o TC;
- d) Avaliar a taxa de infecção vetorial de *C. quinquefasciatus* por *W. bancrofti* em antigos focos endêmicos no município de São Luís – MA.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

Serão abordados os aspectos metodológicos para realização da pesquisa.

7.1 Área de estudo

O estudo foi realizado na Região Metropolitana do Recife, em Pernambuco (RMR - PE) que se encontra sob as coordenadas geográficas de latitude 8° 04' 03'' Sul e longitude 34° 55' 00'' Oeste e no município de São Luís, no Maranhão (SL - MA) com coordenadas 02° 31' 48" S 44° 18' 10" O (Tabela 2). Na RMR, foram selecionados 14 bairros para a coleta de mosquitos. Essa escolha foi guiada por dados epidemiológicos da região, incluindo inquéritos hemoscópicos de indivíduos residentes em áreas endêmicas para filariose e com a anuência dos gestores presentes na “3ª Reunião interna do Brasil para discussão sobre possibilidades, necessidades e próximas ações referentes à Filariose Linfática” (2016). Adicionalmente, no ano de 2017, o bairro de Nova Descoberta (Recife - PE) foi incluído no estudo devido à presença de indivíduos microfilarêmicos na área (Secretaria de Saúde, comunicação pessoal, 2017). Em SL, a Secretaria de Saúde e Laboratório de Endemias do Laboratório Central do Maranhão (LABEND/ LACEN - MA) selecionaram 11 bairros para a coleta de mosquitos em áreas onde no passado havia uma concentração de pacientes microfilarêmicos.

Tabela 2 - Áreas de estudo, com localização geográfica, população estimada, densidade demográfica e esgotamento sanitário.

Municípios	Localização geográfica (latitude/longitude)	População estimada	Densidade demográfica (hab./km ²)	Índice de atendimento u urbano de esgoto (%)*
Recife (PE)	08° 03' 14" S 34° 52' 51" O	1.645.727	7.039,64	43,54
Olinda (PE)	08° 00' 32" S 34° 51' 19" W	392.482	9.063,58	45,17
Jaboatão dos Guararapes (PE)	08° 06' 46" S 35° 00' 54" O	702.298	2.491,82	19,22
São Luís (MA)	02° 31' 48" S 44° 18' 10" O	1.101.884	1.215,69	48,26

Fonte: Ibge (2010, 2019); Brasil (2020).

Nota: *Indicador de atendimento de esgoto.

7.1.1 Região Metropolitana do Recife

A RMR apresenta uma extensão territorial de 3.216,662 km², onde residem aproximadamente 4.054,866 habitantes distribuídos em 15 municípios (IBGE, 2018). As coletas de mosquitos ocorreram, entre 2015 e 2019, nos três municípios considerados endêmicos para filariose: Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes (Tabela 3). Nesse último, as coletas foram realizadas nos bairros de Floriano e Cavaleiro. O clima do município é caracterizado como tropical-úmido, assim como para os municípios de Recife e Olinda (BRASIL, 2019). A temperatura média é de 25.3 °C e a pluviosidade anual é 1660 mm. Já em Recife, área pertencente a mesorregião metropolitana, com temperatura média anual de 25.8 °C e pluviometria média de 1804 mm, foram estudados quatro bairros. Em Olinda, nove bairros foram incluídos, onde a população total é estimada em 391.835 habitantes, o que representa uma densidade demográfica de 9.063,58 hab./km² (Tabela 3). O clima da região é caracterizado como quente e úmido com a temperatura média anual de 26.0 °C e pluviometria média anual de aproximadamente 2000 mm (BRASIL, 2019). As condições climáticas dos municípios favorecem a presença de *C. quinquefasciatus*, além de precárias infraestruturas urbana que favorecem criadouros potenciais para o desenvolvimento de mosquitos, incluindo áreas com piores índices de esgotamento sanitário (Tabela 3) (OLIVEIRA, 1996; BRASIL, 2019).

Tabela 3 - Áreas para coleta de mosquitos na Região Metropolitana do Recife (Pernambuco), o período de coleta (2015-2019) e as áreas Pós-TC/Circunvizinha ao TC.

Municípios/Bairros da RMR-PE	Anos das coletas dos mosquitos	Área Pós-TC/Circunvizinha ao TC
Olinda	2015-2019	-
Sítio Novo	2015	Pós-TC
Bairro Novo	2015	Pós-TC
Passarinho	2015	Pós-TC
Vila Popular	2015/2016/2019	Circunvizinha ao TC
Varadouro	2016	Pós-TC
Peixinhos	2018/2019	Pós-TC
Sapucaia	2018/2019	Pós-TC
Alto da Bondade	2018	Pós-TC
Alto da Conquista	2019	Pós-TC
Recife	2017-2018	-
Nova Descoberta	2017/2018	Circunvizinha ao TC
Dois Unidos	2018	Pós-TC
Santo Amaro	2018	Pós-TC
Passarinho	2018	Pós-TC
Jaboatão dos Guararapes	2017-2019	-
Floriano	2017	Pós-TC
Cavaleiro	2018/2019	Pós-TC

Fonte: A autora.

7.1.2 São Luís

A cidade de São Luís, capital do estado do Maranhão, possui uma população de 1.094.667 habitantes resultando numa densidade demográfica de 1.215,69 hab./km² (Tabela 4). O clima regional é equatorial quente-úmido com temperatura média do ar de 28 °C e pluviometria média de 2.900 mm/ano. Os meses em que mais chove são fevereiro, março e abril e os mais quentes são outubro, novembro e dezembro (IBGE, 2018). O Município é cortado por diversos rios e estuários, entre eles pode-se citar Anil, Bacanga e Tibiri (IBGE, 2010). As precárias condições sanitárias, além do clima favorável e urbanização auxiliam na proliferação de mosquitos na cidade. Suas áreas selecionadas para FL foram bairros com focos extintos e suas coletas ocorreram entre os anos de 2016 e 2017 (Tabela 4).

Tabela 4 - Áreas para coleta de mosquitos em São Luís - Maranhão (focos extintos) e o período de coleta (2016-2017).

Bairros em SL-MA	Anos das coletas dos mosquitos
-	2016-2017
Areinha	2016
Coréia de Baixo	2016
Vila Passos	2016
Monte Castelo	2016/2017
Fátima	2017
Lira	2017
Centro + Belira	2017
Liberdade	2017
Camboa + Floresta	2017
Canto do Fabril	2017
Coroadinho	2017

Fonte: A autora.

Nota: As regiões, Belira e Floresta, são oficialmente parte de outros bairros, Centro e Camboa, respectivamente.

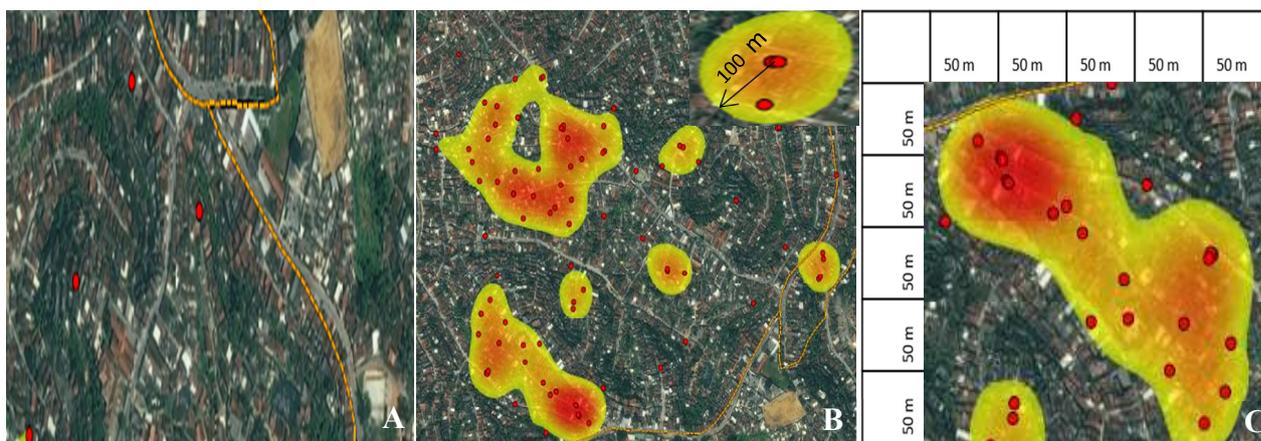
7.2 Desenho e população do estudo

Este é um estudo transversal, realizado para estimar a taxa de infecção e infectividade por *W. bancrofti* em áreas endêmicas de filariose, após ciclos de TC com a DEC, em áreas adjacentes as tratadas e em antigos focos endêmicos. A população do estudo foi constituída por culicídeos coletados em residências dos municípios de Olinda, Recife, Jaboatão dos Guararapes - PE e em São Luís - MA.

7.3 Amostragem

Os pontos de coleta de mosquitos foram estabelecidos com base no histórico da enfermidade através de inquéritos hemoscópicos, fornecidos pelas Secretarias de Saúde, para observar a distribuição espacial de pacientes com microfilaremia antes do TC e identificar áreas de maior risco. A partir desses endereços, o Núcleo de Estatística e Geoprocessamento (NEG) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), auxiliou no georreferenciamento dos pontos, utilizando-se a plataforma QGIS. Os pontos de coletas foram marcados através de imagens de satélite e software de sistemas de informação geográficas (GIS). Em um mapa, foi possível observar concentrações de endereços, formando focos endêmicos. Após a estimativa da análise de Kernel, para localização dos *hotspot* foi traçado um raio de 100 m ao seu redor. A fusão desses pontos quentes criou uma malha cuja área foi dividida em quadrantes de 50x50 m para indicar os pontos de coletas dos mosquitos. Esses mapas com os traçados dos quadrantes foram disponibilizados para os gestores de cada área avaliada (Figuras 11 e 12).

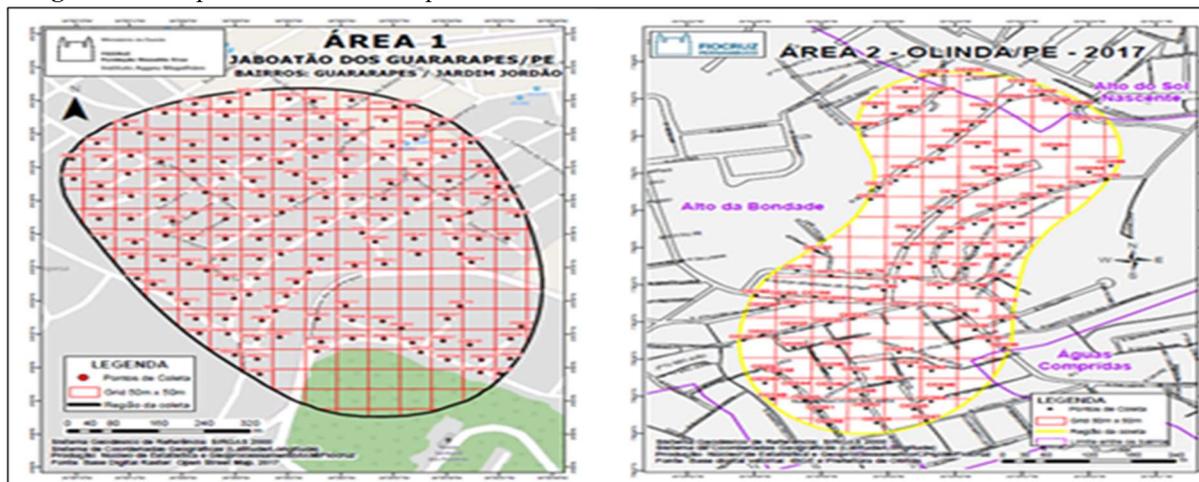
Figura 11 - Construção dos mapas de coleta de mosquitos com base no histórico de casos de FL indicados pelo mapa.



Fonte: A autora.

Legenda: A. Pontos vermelhos indicam histórico de casos de FL. B. Fusão de Polígonos de densidade de Kernel com um raio de 100 m do caso de FL. C. Quadrantes de 50x50 m para definição de pontos de coleta.

Figura 12 - Mapas de coleta de mosquitos.



Fonte: A autora.

7.4 Metodologia de coleta

Em todas as áreas de estudo, as coletas foram feitas pelos Agentes de Controle de Endemias (ACE). Eles receberam treinamentos para realizar a coleta de mosquitos adultos utilizando o aspirador entomológico, e em seguida, foram capacitados para realizar a preservação das amostras. Para isso, receberam aulas teóricas e práticas de identificação, separação, sexagem e acondicionamento adequado de fêmeas de *C. quinquefasciatus* (Figura 13). Após as orientações e treinamentos foram iniciadas as coletas dos mosquitos em campo através do aspirador entomológico, fabricado no Brasil pela empresa Horst Armadilhas. Este equipamento é composto por um tubo PVC, um motor à bateria de 12 volts e um ventilador invertido para sugar os mosquitos que ficam aprisionados em um saco coletor (tecido) (CLARK et al., 1994).

Os culicídeos foram coletados no intradomicílio, com duração média de 15 minutos por residência, sempre no período da manhã (entre 08:00 e 12:00h). Dentro da moradia, os quartos foram obrigatoriamente visitados, bem como embaixo de móveis e atrás de cortinas que são locais onde o inseto-alvo costuma repousar (NUNES, 2013). Na Secretaria de Saúde de cada município, as amostras coletadas foram colocadas em freezer a -20°C para imobilização e morte dos mosquitos; e sob condição de resfriamento em placa de Petri foi estimada a densidade populacional de culicídeos através de contagem, sexagem, identificação de espécies não-alvo, além da estimativa pontual da densidade de mosquitos coletados em cada localidade. Em seguida, as fêmeas de *C. quinquefasciatus* ingurgitadas com sangue ou grávidas foram selecionadas e acondicionadas em microtubos do tipo *ependorf*, formando *pools* de até 10

fêmeas, onde foi acrescentado o reagente *RNA later*® (Invitrogen) para manter a integridade do RNA do parasito. Os *pools* de mosquitos foram encaminhados ao Serviço de Referência em Controle de Culicídeos Vetores (SRCCV) do Departamento de Entomologia no Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ/PE e armazenados em freezer a -80 °C.

Figura 13 - Treinamento dos Agentes de Controle de Endemias para metodologia de coleta de insetos vetores.



Fonte: A autora.

Legenda: A e B: Treinamento da metodologia de coleta na Região Metropolitana do Recife; C e D: Treinamento da metodologia de coleta em São Luís, Maranhão.

7.5 Obtenção da *Wuchereria bancrofti* para o controle positivo

O controle positivo para todos os estádios larvais de *W. bancrofti* (DNA genômico do nematódeo filarial) foi obtido a partir de um banco de DNA mantido no Departamento de Entomologia do IAM. Enquanto a obtenção do estágio infectante do verme (L3) foi feita a partir de uma análise *in silico* de um fragmento da sequência de RNAm da cuticulina específica para L3 descrita por Laney et al. (2010). Eles utilizaram o programa de alinhamento SPLIGN (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi>) para genes candidatos e selecionaram o gene da cuticulina para o diagnóstico de L3. Neste estudo, esse fragmento foi sintetizado artificialmente, clonado pela empresa IDT e utilizado como controle positivo nas reações de RT-PCR *multiplex*.

7.6 Preparação do extrato de mosquitos

Após o recebimento das amostras pelo SRCCV, os *pools* de mosquitos seguiram para a etapa de remoção do *RNA later*® (Invitrogen) com água ultrapura livre de RNase. Em seguida, as amostras foram maceradas com pistilos autoclavados e foi acrescentado um volume de 400

μL de água ultrapura livre de RNase para preparação do extrato de mosquito. O homogenato preparado foi separado em dois microtubos de 2 ml (200 μL em cada), no qual as alíquotas para as etapas de extração de DNA (infecção vetorial) e extração de RNA (infectividade) foram armazenados em freezer -20°C e freezer a -80° , respectivamente.

7.7 Extração de DNA e otimização da PCR *duplex* para infecção vetorial

A extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo de Ayres et al. (2002) com modificações. Os *pools* (até 10 fêmeas) foram homogenizados em 400 μL de tampão de lise (NaCl 5 M, EDTA 0,5 M, Tris 1 M e água MiliQ), 7 μL de Proteinase K (10 mg/mL) e 72 μL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS 10%). Após a homogeneização e incubação a 65°C durante a noite (acima de 8 horas) 420 μL de NaCl foram adicionados à suspensão. A mistura foi agitada em vortéx durante 1 minuto, seguido de centrifugação a 14.000 rpm durante 20 minutos. O DNA foi precipitado pela adição de um volume de 700 μL de álcool isopropílico e as amostras foram incubadas durante 1 hora. Em seguida, foram centrifugadas a 14.000 rpm e o pellet formado foi lavado com etanol 70% e suspenso em 300 μL de TE estéril (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Após a extração, realizou-se a análise de concentração e pureza de DNA por espectrofotômetro (*Thermo Scientific Nanodrop*TM 2000).

A detecção da taxa infecção vetorial para qualquer estágio de *W. bancrofti* foi realizada através de uma PCR *duplex* com modificações, na qual foram utilizados *primers* específicos para *W. bancrofti* e *primers* para espécies de mosquitos (gene de actina) como controle endógeno na reação (Quadro 2). Esse controle foi utilizado a fim de determinar se a amostra deve ser excluída em virtude da não amplificação desse alvo. Diferentes parâmetros foram testados para otimizar os ensaios de PCR, incluindo adjuvantes de PCR, a albumina de soro bovino – BSA ® (Sigma) ou Dimetilsulfóxido – DMSO ® (Sigma) 5%. Além disso, foram investigados a sensibilidade da detecção em diferentes quantidades do DNA de *W. bancrofti* e a competição entre o DNA do parasita e do mosquito. Para isso foi utilizado o DNA do *C. quinquefasciatus* com diferentes concentrações da *W. bancrofti* (10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg). O ensaio foi aperfeiçoado para um volume final de 30 μL : 20 μL de Master Mix 2X ® (Promega) 0,3 μL de act2F/8R (0,12 μM), 0,5 μL de NV1/NV2 (0,17 μM) 6 μL de BSA (2 mg/mL), 0,2 μL de H₂O ultrapura, 1,2 MgCl₂ (3 mM) e 1 μL de DNA de fêmeas de *C. quinquefasciatus* (9,9 ng/ μL – 300 ng/ μL).

Os testes de PCR *duplex* foram realizados em um termociclador (Mastercycler EppendorfTM), sob os seguintes parâmetros de ciclagem: 94°C durante 3 min, seguido de 35

ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°- 66° durante 45 segundos, 72°C durante 45 segundos e uma extensão final de 10 min a 72°C. Para verificar possíveis contaminações foram utilizados controles negativos contendo todos os reagentes exceto o DNA do vetor, que foi substituído por 1 µL de H₂O ultrapura. Os controles positivos foram compostos por todos os reagentes e acrescentado o DNA de *W. bancrofti*. Os produtos de PCR e o marcador de peso molecular foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão de corrida TBE (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM pH 8,0), corados com brometo de etídio e visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta.

Quadro 2 - Descrição das sequências de *primers* usados na reação de PCR *duplex*.

<i>Primers</i>		Sequências (5'-3')	Alvo	Amplicon (pb)
A	FORWARD act-2F	ATGGTCCGGYATGGGNCAGAAGGACTC	Actina	683
	REVERSE act-8R	GATCCATACCCAGGAAGGADGG		
B	FORWARD NV1	5'CGTGATGGCATCAAAGTAGCG 3'	<i>Ssp I</i>	188
	REVERSE NV2	5'CCCTCACTTACCAAAGTAGCG 3'		

Fonte: A- Staley et al. (2010); B: Zhong et al. (1996).

7.8 Extração de RNA e otimização da RT - PCR *multiplex* (Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase *multiplex*) para infectividade

A extração de RNA das amostras foi realizada usando o protocolo TRIzol® (Invitrogen), de acordo com o fabricante. Os homogenatos de mosquitos mantidos no freezer – 80° C foram transferidos para um novo microtubo de 1,5 mL contendo 200 µL de Trizol® (Invitrogen) e após a homogeneização deste material por 15 segundos e incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, acrescentou-se ao microtubo 100 µL de clorofórmio® (Sigma). A mistura foi novamente homogeneizada e incubada em temperatura ambiente por 3 minutos e os microtubos foram centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo onde foram adicionados 250 µL de isopropanol para precipitação do RNA. Os tubos homogeneizados foram incubados por 10 minutos e foi novamente centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado com 300 µL de etanol 75% e, após centrifugação de 5 minutos a 12000 rpm, o etanol foi descartado e o microtubo foi levado à estufa a 37 °C durante 15 a 20 minutos para secagem do material. O RNA então foi ressuspensionado em 30 uL de água livre de RNases. Após a extração, os RNAs foram tratados com DNase (Turbo DNase, *ThermoScientific*), seguindo as recomendações do fabricante, com a finalidade de evitar contaminação com DNA genômico

e posteriormente, estocados em freezer -80°C. A concentração e pureza do RNA foram medidas por espectrofotômetro (*ThermoScientific Nanodrop™ 2000*).

A PCR *multiplex* com transcrição Reversa em um único tubo (RT-PCR *one-step multiplex*) foi testada com *primers*-específicos de cuticulina para a larva infectante de 3º estágio de *W. bancrofti* descritos por Laney et al. (2010) com modificações, acrescentando *primers* de actina para mosquitos como controle endógeno a fim de verificar a qualidade do RNA. O ensaio de RT-PCR de diagnóstico L3 foi combinado com o alvo *tph-1* constitutivamente expresso para a detecção simultânea de parasitas de estágio infeccioso e parasitas de qualquer estágio (LANEY et al. 2010) (Quadro 3). A primeira etapa realizada foi a síntese do cDNA, a partir do RNA total extraído, usando a enzima AMV transcriptase reversa conforme descrição do protocolo do fabricante (Cloned AMV Reverse Transcriptase, Invitrogen®). A reação de amplificação foi aprimorada em um volume final de 25 µL, usando a seguinte mistura: 12,5 µL de PCR Master mix (Promega®), 0,25 µL DTT (1 M), 0,07 RT-AMV (15 U/ µL), 4 µl RNase OUT (Invitrogen), 0,3 - 0,5 µL de cada *primer* (Forward e Reverse), 2 µL do mRNA e H₂O para completar 25 µl da reação. Essa reação foi amplificada em um termociclador (Mastercycler Eppendorf™) programado para 1 ciclo a 50° C por 30 minutos, 95° C por 15 minuto e 55° C por 45 segundos, seguindo de 72° C por 45 segundos e 40 ciclos a 95° C por 45 segundos, 55° C por 45 segundos, 72° C por 45 segundos e um ciclo final a 72° C por 10 minutos. Os produtos da RT-PCR *multiplex* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3% em tampão TBE (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) e corado com brometo de etídio. Após a eletroforese de 70 min a 120 V, os géis foram fotografados em um transiluminador de ultravioleta.

Quadro 3 - Descrição das sequências de *primers* usados na reação de RT – PCR *multiplex*.

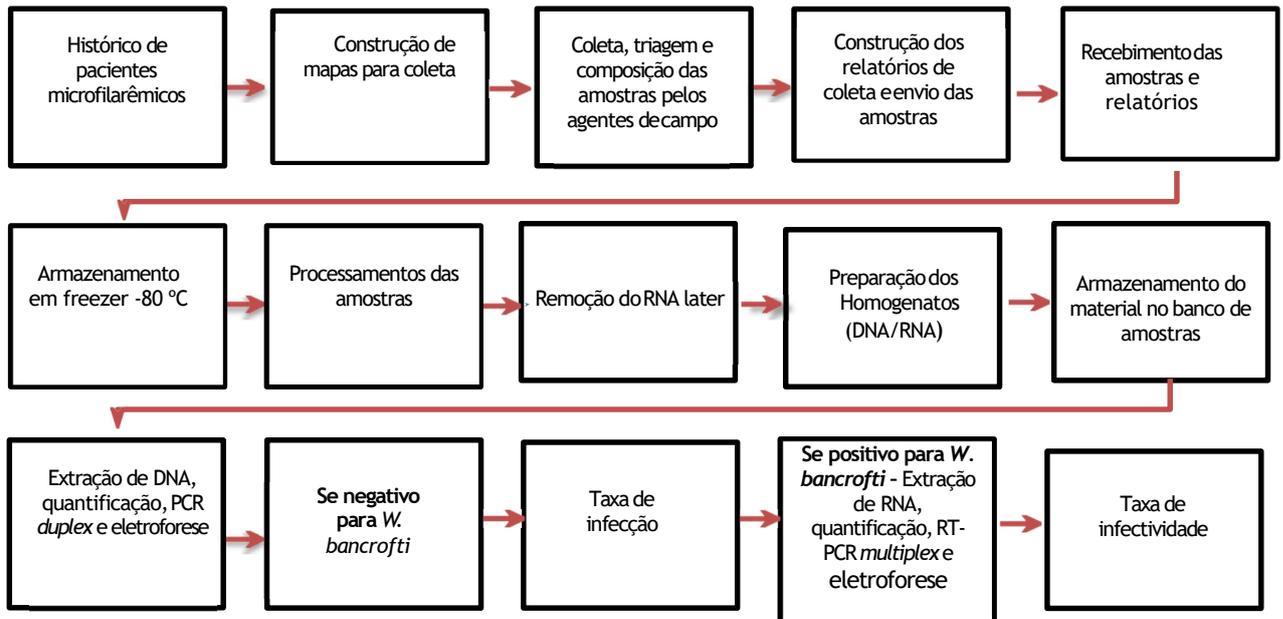
Primer		Sequências (5'-3')	Alvo	Amplicon (pb)
A	FORWARD act-2F	ATGGTCGGYATGGGNCAGAAGGACTC	Actina	683
	REVERSE act-8R	GATTCCATACCCAGGAAGGADGG		
B	FORWARD cut – 1.2(1938)	AAATGAAGAGTTTACCTCAT	L3 infectante	123
	REVERSE cut – 1.2 (1939)	CCGTTATTGACATACATA		
C	FORWARD <i>tph</i> – 1 (1054)	AAGGACGGCAAGTAGTAAGGA	Qualquer estágio	153
	REVERSE <i>tph</i> – 1 (1059)	AACAATTCATTTCTGTAGC		

Fonte: A: Staley et al. (2010); B e C: Laney et al. (2010).

7.9 Fluxograma de xenomonitoramento molecular para infecção e infectividade

Foi estabelecido um fluxograma de processamento de amostras para ensaios de análise de RNA e DNA para o mesmo *pool* de mosquitos (Figura 14).

Figura 14 - Fluxograma do xenomonitoramento molecular para determinação das taxas de infecção e infectividade por *Wuchereria bancrofti* em fêmeas de *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: A autora.

7.10 Análise dos dados

As taxas de infecção vetorial e de infectividade foram determinadas pelo modelo estatístico *Pool-screen* (KATHOLI et al., 1995) que observa o número de *pools* analisados e o número total de *pools* positivos para *W. bancrofti*, com intervalo de confiança ao nível de 95%. Para as densidades de mosquitos adultos, calculamos a média entre o número total da espécie coletada e o número de logradouros visitados.

8 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo não tem implicações éticas, sendo assim não se fez necessário obter o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) ou Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

9 RESULTADOS

Nesse tópico serão apresentados os resultados da tese.

9.1 Densidade populacional de culicídeos em SL - MA

Entre as diversas espécies de culicídeos coletadas em 11 bairros de SL, 40% de 10.465 mosquitos correspondiam a fêmeas de *C. quinquefasciatus* ingurgitadas ou grávidas e um total de 85,2% da espécie (Tabela 5). Ao longo do ano, a média de *C. quinquefasciatus* variou entre 0,21 e 51,5 mosquitos por casa, sendo os meses de agosto a dezembro aqueles com maiores densidades da espécie, além disso, esse período se caracterizou pela menor precipitação de chuvas e aumento da temperatura (Figura 15). Adicionalmente, foram encontradas as espécies *Aedes aegypti* (12%), *Aedes albopictus* (0,1%) e *Aedes taeniorhynchus* (2,7%) nas áreas estudadas, porém em menor densidade quando comparadas ao *Culex*.

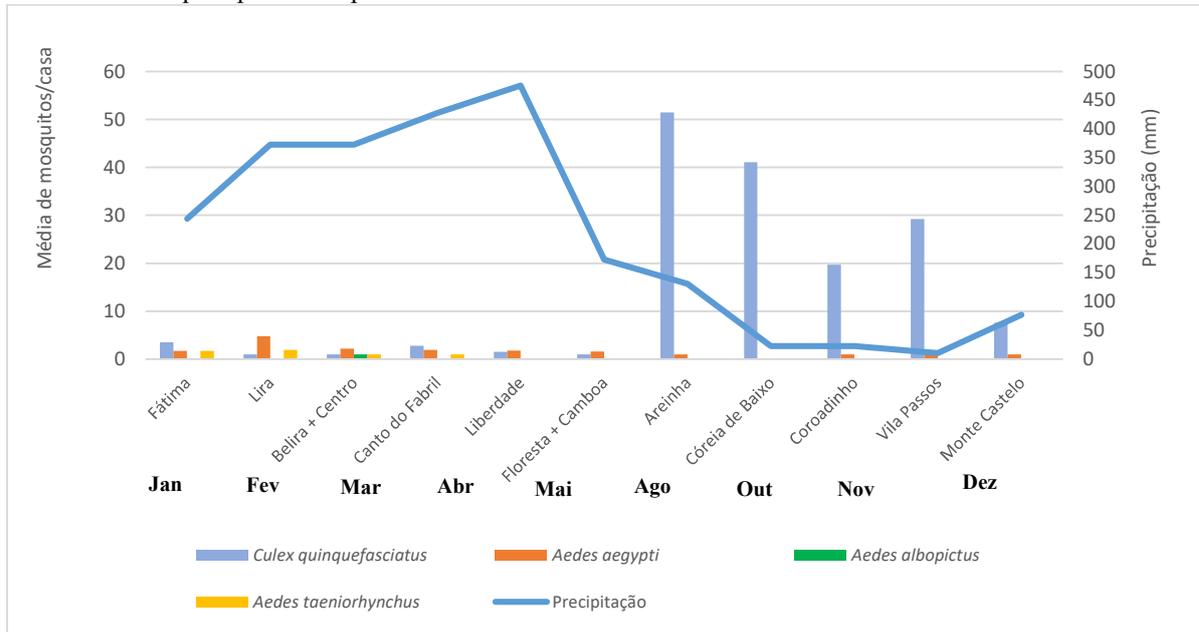
Tabela 5 - Espécies de culicídeos coletados em SL - MA, separados por sexo, condição alimentar e reprodutiva das fêmeas.

Bairro	Espécie											
	<i>Aedes aegypti</i>			<i>Aedes albopictus</i>			<i>Culex quinquefasciatus</i>			<i>Aedes taeniorhynchus</i>		
	Macho	Fêmea	Fêmea A/G	Macho	Fêmea	Fêmea A/G	Macho	Fêmea	Fêmea A/G	Macho	Fêmea	Fêmea A/G
Areinha	2	4	7	0	0	0	600	200	591	0	0	0
Coreia de Baixo	0	0	2	0	0	0	625	290	633	0	0	0
Vila Passos	0	5	2	0	0	1	691	338	753	0	0	0
Monte Castelo	73	21	146	2	0	4	856	229	1016	0	0	0
Fátima	15	8	75	0	0	0	70	7	122	2	0	97
Lira	102	8	140	0	0	0	5	1	30	43	0	58
Belira + Centro	82	8	199	2	0	0	15	10	31	3	4	65
Liberdade	46	1	48	0	0	0	32	6	36	0	0	0
Camboa + Floresta	43	1	34	0	0	0	12	0	16	0	0	0
Canto do Fabril	44	3	124	0	0	0	90	10	144	0	0	10
Coroadinho	4	0	7	0	0	0	519	220	717	0	0	0
Total	411	59	784	9	0	5	3515	1311	4089	48	4	230

Fonte: A autora.

Legenda: A- Alimentada (ingurgitada- abdômen distendido pela alimentação sanguínea); G- Grávida.

Figura 15 - Densidade populacional de culicídeos coletados em SL - MA, por espécie, meses de coleta, média de mosquito por casa e pluviometria.



Fonte: A autora.

Nota: Coletas de mosquitos em 11 bairros de SL - MA entre os meses de janeiro e dezembro.

9.2 Densidade populacional de culicídeos na RMR - PE

Foram coletados 29.632 culicídeos na RMR, desse total, aproximadamente 59% correspondem as fêmeas de *C. quinquefasciatus* ingurgitadas ou grávidas (Tabela 6). Nas localidades de Sítio Novo, Alto da Bondade, Bairro Novo e Passarinho (em Olinda) foram enviados apenas fêmeas de *C. quinquefasciatus* ingurgitadas ou grávidas, não sendo registrados, portanto, os demais culicídeos, machos e as fêmeas nulíparas de *C. quinquefasciatus*. Outras espécies encontradas nos bairros foram do gênero *Aedes*, incluindo 2.929 *Aedes aegypti* e 127 *Aedes albopictus*.

A média mensal da espécie *C. quinquefasciatus* por casa e por coleta observada no município de Jaboatão dos Guararapes foi de 2,7 e 43,66 mosquitos, sendo as maiores médias observadas nos meses mais secos entre setembro e dezembro (Figura 16).

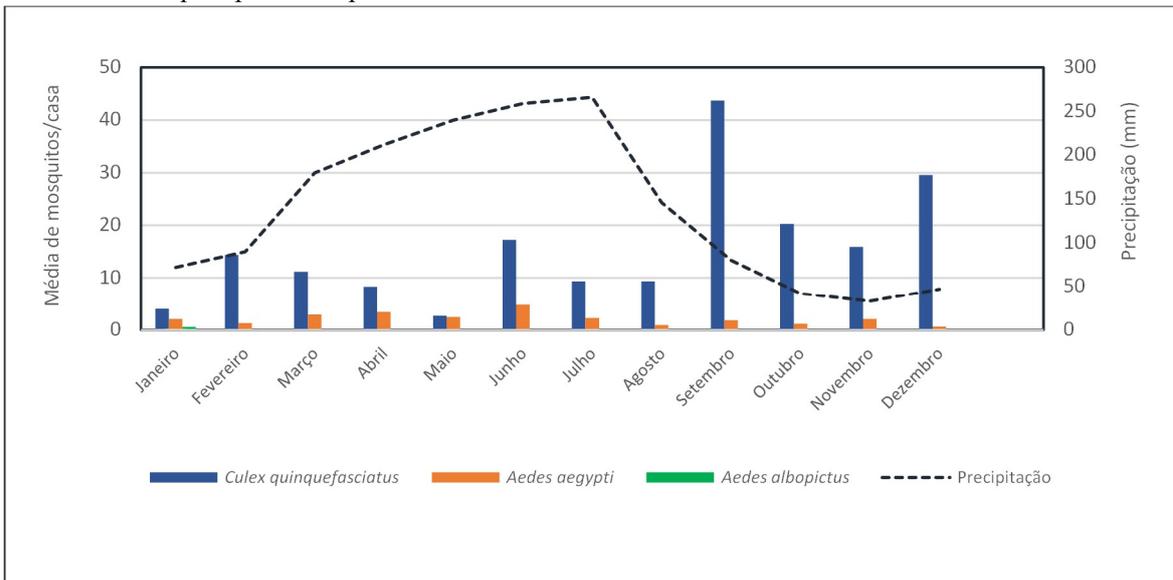
Tabela 6 - Espécies de culicídeos coletados na RMR - PE, separados por sexo, condição alimentar e reprodutiva das fêmeas.

Bairro	<i>Aedes aegypti</i>			<i>Aedes albopictus</i>			<i>Culex quinquefasciatus</i>		
	Macho	Fêmea	Fêmea A/G	Macho	Fêmea	Fêmea A/G	Macho	Fêmea	Fêmea A/G
Varadouro	16	22	27	0	0	0	29	36	2.005
Peixinhos	216	263	211	0	0	0	590	700	1.037
Sapucaia	107	132	120	0	0	0	330	413	918
Alto da Conquista	51	81	76	0	0	0	254	357	969
Alto da Bondade	0	0	0	0	0	0	0	0	572
Passarinho (Olinda)	0	0	0	0	0	0	0	0	191
Vila Popular	18	26	28	0	0	0	37	46	3522
Bairro Novo	0	0	0	0	0	0	0	0	53
Sítio Novo	0	0	0	0	0	0	0	0	614
Nova Descoberta	115	104	18	0	0	0	1862	453	3501
Passarinho (Recife)	10	13	7	0	0	0	145	1	212
Santo Amaro	18	14	1	0	0	0	53	0	91
Dois Unidos	12	29	12	0	0	0	395	5	424
Floriano	26	17	17	23	12	49	897	382	845
Cavaleiro	386	175	561	15	12	16	1.619	570	2.455
Total	975	876	1.078	38	24	65	6.204	2.963	17.409

Fonte: A autora.

Nota: A- Alimentada (ingurgitada- abdômen distendido pela alimentação sanguínea); G- Grávida.

Figura 16 - Densidade populacional de culicídeos coletados em Jaboatão dos Guararapes - PE, por espécies, média de mosquito por casa e pluviometria.

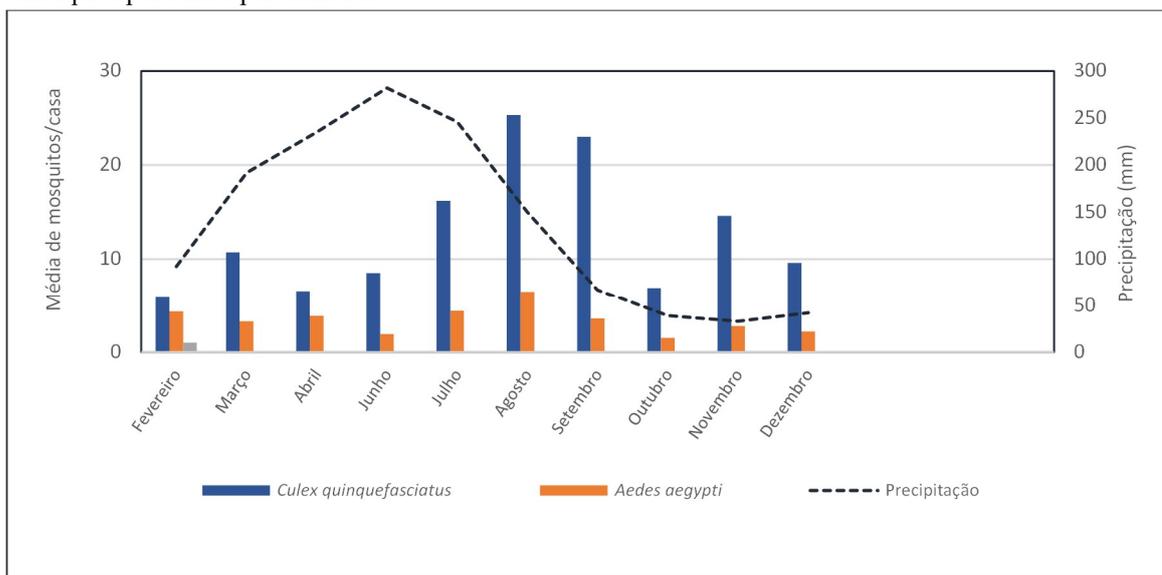


Fonte: A autora.

Nota: Coletas de mosquitos entre os meses de janeiro e dezembro.

A espécie *C. quinquefasciatus* foi observada em Recife variando entre 4,36 e 23,77 por casa, onde as coletas ocorreram apenas entre os meses de outubro e novembro. Já no município de Olinda, a média mensal de *C. quinquefasciatus* por casa, teve variação de 5,87 e 25,33 de mosquito entre os meses de fevereiro e dezembro, com maiores densidades entre agosto e setembro (Figura 17).

Figura 17 - Densidade populacional de culicídeos coletados em Olinda - PE, por espécies, média de mosquito por casa e pluviometria.



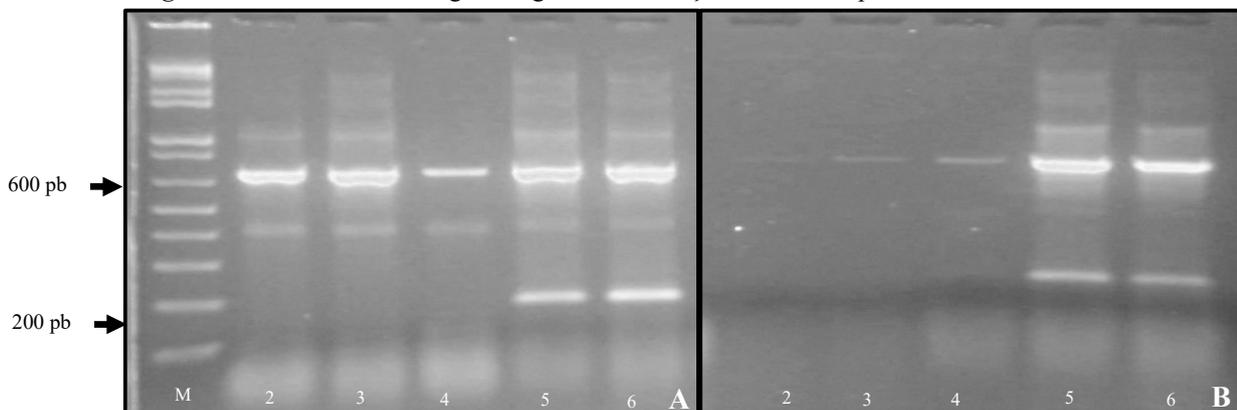
Fonte: A autora.

Nota: Coletas de mosquitos entre os meses de fevereiro e dezembro.

9.3 Reações de PCR *duplex* para a taxa de infecção vetorial

Na otimização do diagnóstico de infecção vetorial foi acrescentado à PCR *duplex* um controle endógeno para detecção do DNA do mosquito a fim de se verificar a qualidade da amostra. Sendo assim, a PCR passou a ter dois alvos, uma região do genoma do vetor através do controle endógeno, e a outra região do genoma do verme filarial pela sequência específica (*Ssp I*) de *W. bancrofti*. Também foi acrescentado ao ensaio adjuvantes (DMSO ou BSA), o que possibilitou observar o aumento da intensidade das bandas para ambos os genes actina e *Ssp I* em amostras de campo (Figura 18).

Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose 2%, reações de PCR *duplex*.



Fonte: A autora.

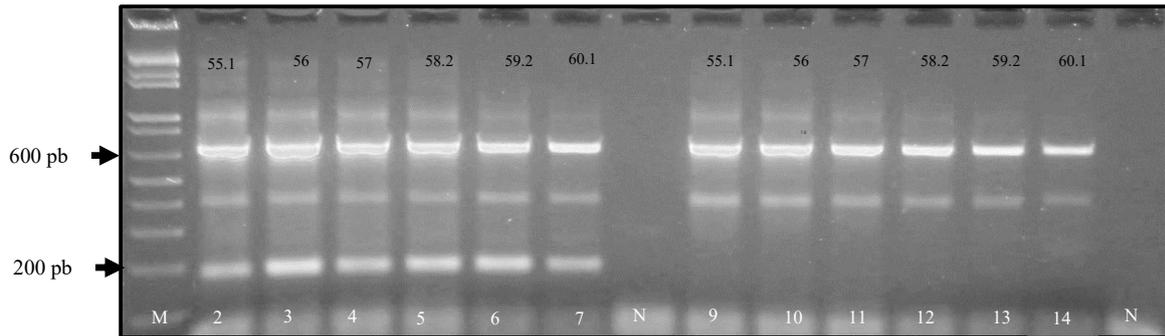
Nota: A: Utilização de adjuvante DMSO 5%. B: Sem adjuvante.

Legenda: Marcador de peso molecular (1Kb plus Ladder). Os poços 2-4: Amostras negativas de *C. quinquefasciatus* para *W. bancrofti* e válidas apenas para o gene actina (683 pb). Poços 5 e 6: Amostras positivas para *W. bancrofti* (188 pb) e válidas para o gene actina.

Paralelamente, foi realizado um ajuste na temperatura de anelamento dos *primers* de 55 °C para 59 °C o que resultou na redução de bandas inespecíficas (cerca de 400 pb e 1000 pb) (Figura 19).

Para determinar o limite mais baixo de detecção do DNA de *W. bancrofti*, foram realizadas seis diluições seriadas de controle positivo de *W. bancrofti* (de 10 pg a 0,1 fg) sem o DNA de mosquito, resultando amplificação em todas as concentrações (Figura 20). Entretanto, na PCR *duplex*, a competição entre o DNA do parasita e do mosquito, mostrou a amplificação do fragmento de actina em todas as amostras testadas, mas o DNA *W. bancrofti* foi detectado até a diluição de 10 fg (Figura 21).

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 2%, reações de PCR *duplex*.

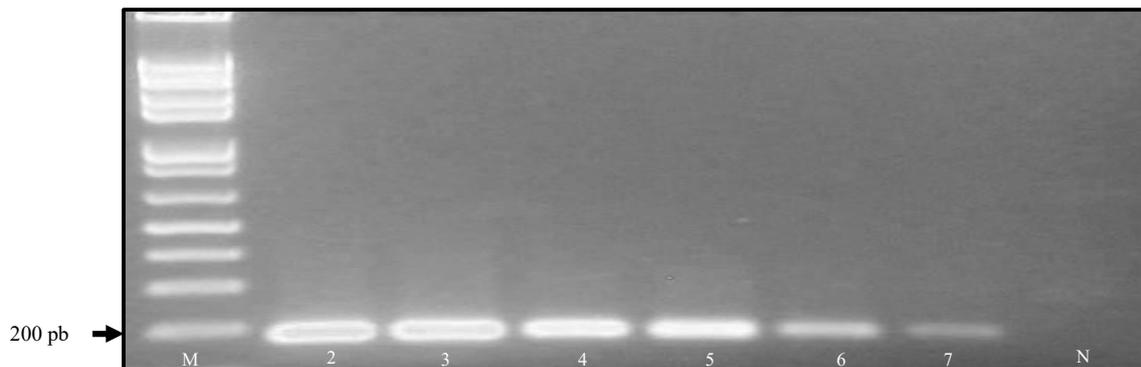


Fonte: A autora.

Nota: Temperatura de anelamento de 55.1 °C a 60.1 °C.

Legenda: Marcador de peso molecular (1Kb plus Ladder). Poços 2-7: Amostras positivas de *C. quinquefasciatus* para *W. bancrofti*. Poços 9-14: Amostras negativas de *C. quinquefasciatus* para *W. bancrofti*. N: Controle negativo.

Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose 2%, reações de PCR *duplex*.

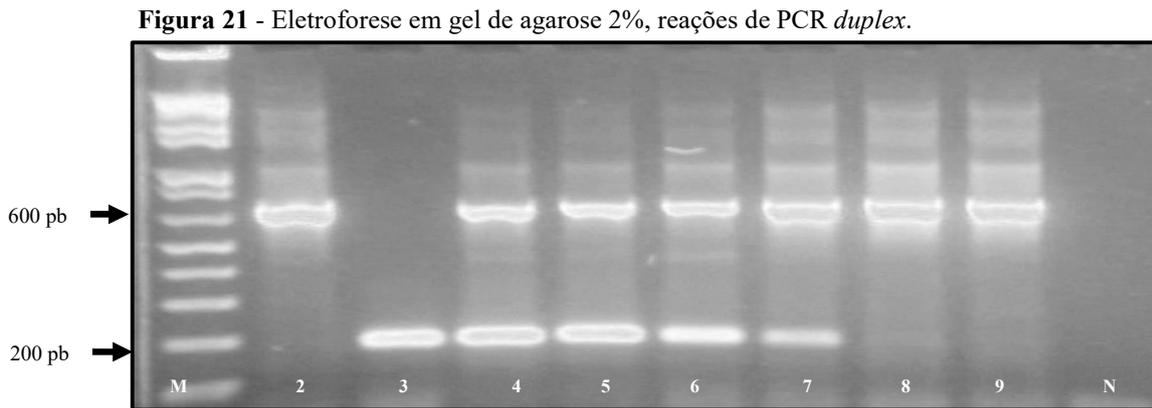


Fonte: A autora.

Nota: Diluição seriada.

Legenda: M: Marcador de peso molecular (1Kb plus Ladder). Poço 2: 10 pg; Poço 3: 1 pg; Poço 4: 100 fg; Poço 5: 10 fg; Poço 6: 1 fg; Poço 7: 0,1 fg; N: Controle negativo.

A partir da otimização da PCR *duplex* foi testado um lote de 100 *pools*, dessas apenas 5% não amplificaram o controle endógeno e, portanto, foram excluídas do cálculo da taxa de infecção vetorial (TIV). Sendo assim, 95% dos *pools* de mosquitos foram considerados para a análise estatística através do *Poolscreen* e a TIV foi maior em relação ao cálculo que considerou 100% das amostras para estimativa dessa taxa (Tabela 7).



Fonte: A autora.

Legenda: M: Marcador de peso molecular (1Kb plus Ladder). Poço 2: DNA de *C. quinquefasciatus* sem DNA do parasita. Poço 3: DNA do parasita. Poços 4-9: Diluição seriada de *C. quinquefasciatus* com *W. bancrofti* (4: 10 pg; 5: 1pg; 6: 100 fg; 7: 10 fg; 8: 1 fg; 9: 0,1 fg). N: Controle negativo.

Tabela 7 - Taxa de infecção comparativa no xenomonitoramento molecular da filariose linfática.

	XM sem o controle endógeno – PCR <i>single</i>	XM com o controle endógeno – PCR <i>duplex</i>
Número de <i>pools</i>	100	95
<i>Ssp I</i> positivo	20	20
Cx – actina	-	95
TIV	2.21% (CI: 1.53-3.59%)	2.34% (CI: 1.62-3.79%)

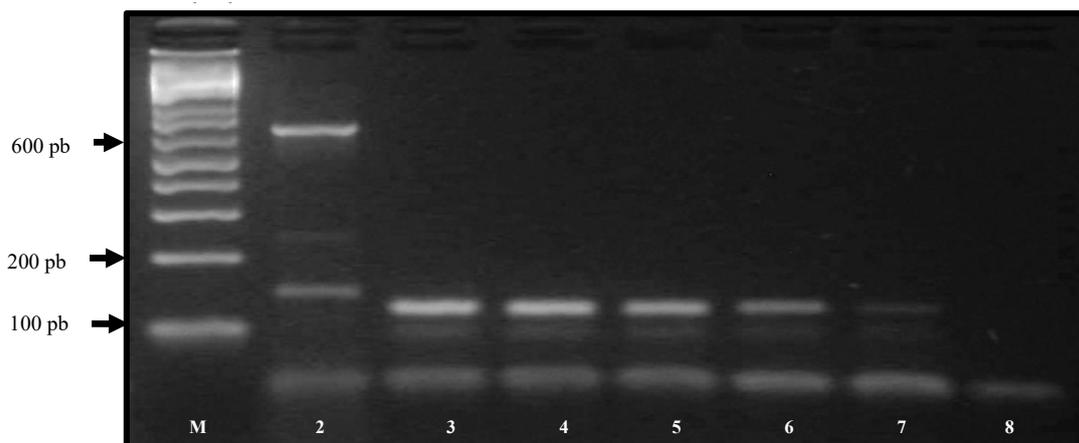
Fonte: A autora.

Nota: Cx: *Culex quinquefasciatus*; TIV: taxa de infecção vetorial.

9.4 Reações de RT - PCR *multiplex* para a taxa de infectividade

Na otimização da RT - PCR *multiplex* foi acrescentado um controle endógeno para detecção do RNA do mosquito e verificar a qualidade da amostra. Na reação, obtivemos amplificação dos 3 alvos de interesse (actina, estágio L3 de *W. bancrofti* e qualquer estágio de *W. bancrofti*). Além disso, o limiar de detecção de L3 foi de até 1 pg (Figura 22).

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose 3%, reações de RT – PCR *multiplex*.



Fonte: A autora.

Legenda: M: Marcador de peso molecular (1Kb plus Ladder), 2: Amostra positiva de *C. quinquefasciatus* para *W. bancrofti* qualquer estágio; 3 a 7: Diluições do controle positivo para L3 para *W. bancrofti* até 1pg; 8: Controle negativo.

9.5 Taxa de infecção vetorial de *C. quinquefasciatus* por *W. bancrofti* na RMR - PE

Neste estudo, a avaliação da transmissão da FL foi realizada através do XM, utilizando fêmeas de mosquito *C. quinquefasciatus* e os resultados foram obtidos a partir da TIV. No município de Jaboatão dos Guararapes, a TIV foi de 0% para *W. bancrofti* dentre as 3.160 fêmeas de mosquitos (633 *pools*) coletadas nos bairros de Floriano e Cavaleiro durante os anos 2017, 2018 e 2019 (Tabela 8).

Tabela 8 - Diagnóstico de infecção vetorial por *Wuchereria bancrofti* em amostras de *Culex quinquefasciatus* coletados em Jaboatão dos Guararapes.

Jaboatão dos Guararapes/PE	Ano de coleta	Fêmeas analisadas	<i>Pools</i> analisados	Taxa de infecção vetorial (%)
Floriano	2017	845	116	0
Cavaleiro	2018	1.585	323	0
Cavaleiro	2019	730	194	0
Total	-	3.160	633	-

Fonte: A autora.

Em Olinda, foram avaliadas por PCR, 9.634 fêmeas de *C. quinquefasciatus* de nove bairros coletadas entre os anos de 2015 e 2019. Em oito deles, a TIV foi de 0%, porém para os

pools de mosquitos coletados no bairro de Vila Popular, no ano de 2015, a TIV foi de 2,34% (intervalo de confiança entre 1,62% e 3,79%) (Tabela 9).

Tabela 9 - Diagnóstico de infecção vetorial por *Wuchereria bancrofti* em amostras de *Culex quinquefasciatus* coletados em Olinda.

Olinda/PE	Ano de coleta	Fêmeas analisadas	Pool analisados	Taxa de infecção vetorial (%)
Sítio Novo	2015	614	123	0
Vila Popular	2015	819	95	2,34
Passarinho	2015	191	41	0
Bairro Novo	2015	53	11	0
Vila Popular	2016	2.422	214	0
Alto da Bondade	2016	572	56	0
Varadouro	2016	1.963	215	0
Sapucaia	2016	324	42	0
Peixinhos	2017	140	25	0
Peixinhos	2018	864	122	0
Sapucaia	2018	544	95	0
Vila Popular	2019	214	31	0
Alto da Conquista	2019	914	111	0
Total	-	9.634	1.181	-

Fonte: A autora.

No município do Recife, a coleta de mosquitos ocorreu em quatro bairros, durante os anos de 2017 a 2018, período em que o TC já havia sido finalizado (TAS). Nos bairros de Passarinho, Dois Unidos e Santo Amaro, a TIV foi de 0%. Porém, para os mosquitos coletados em uma área não tratada pelo medicamento filaricida, no bairro de Nova Descoberta, foram detectados *pools* positivos de fêmeas infectadas nos dois anos em que foram avaliados (2017 e 2018) obtendo TIV de 0,08% (intervalo de confiança entre 0,05% e 1,19%) e 0,24% (intervalo de confiança entre 0,15% e 0,54%), respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10 - Diagnóstico de infecção vetorial por *Wuchereria bancrofti* em amostras de *Culex quinquefasciatus* coletados em Recife.

Recife/PE	Ano de coleta	Fêmeas analisadas	Pools analisados	Taxa de infecção vetorial (%)
Nova Descoberta	2017	851	131	0,08
Nova Descoberta	2018	2.532	386	0,24
Passarinho	2018	212	22	0
Dois Unidos	2018	424	44	0
Santo Amaro	2018	91	10	0
Total	-	4.110	593	-

Fonte: A autora.

9.6 Taxa de infecção vetorial de *C. quinquefasciatus* por *W. bancrofti* em SL - MA

Em São Luís, foram investigados mosquitos provenientes de treze bairros, sendo detectadas amostras positivas para *W. bancrofti* em dois deles, Coreia de Baixo e Monte Castelo, cuja TIV foi de 0,98% (intervalo de confiança entre 0,6% e 2,43%) e 0,13% (intervalo de confiança entre 0,12% e 0,95%), respectivamente. Os demais bairros tiveram TIV nula (0%) (Tabela 11).

Tabela 11 - Diagnóstico de infecção vetorial por *Wuchereria bancrofti* em amostras de *Culex quinquefasciatus* coletados em SL - MA.

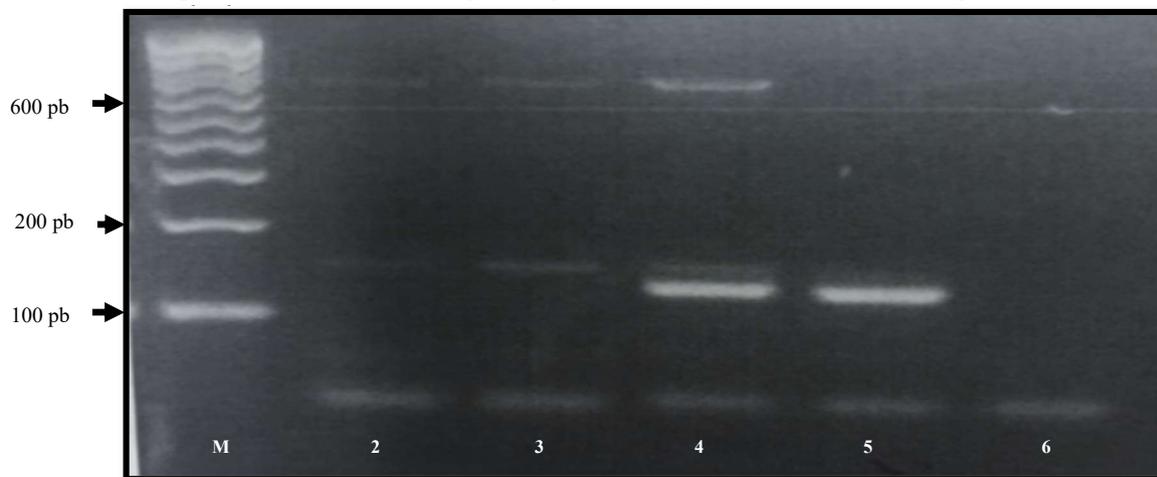
São Luís/MA	Ano de coleta	Fêmeas válidas	Pools validados	Taxa de infecção vetorial (%)
Areinha	2016	516	65	0
Coreia de Baixo	2016	576	75	0,98
Vila Passos	2016	753	105	0
Monte Castelo	2016/2017	1016	231	0,13
Fátima	2017	122	36	0
Lira	2017	29	21	0
Belira + Centro	2017	23	18	0
Liberdade	2017	34	21	0
Camboa + Floresta	2017	16	12	0
Canto do Fabril	2017	131	41	0
Coroadinho	2017	713	105	0
Total	-	3.929	730	-

Fonte: A autora.

9.7 Taxa de infectividade de *C. quinquefasciatus* por *W. bancrofti* nas áreas avaliadas

Foram investigados 20 homogenatos das amostras positivas (TIV) provenientes da RMR - PE e SL - MA e dessas, 13 *pools* amplificaram o controle endógeno (actina) e foram confirmados como positivos para *W. bancrofti* em qualquer estágio através da RT - PCR *one step*. Porém todos negativos para o estágio específico L3 (Figura 23). Os *pools* que não amplificaram o controle endógeno foram excluídos das análises.

Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose 3%, reações de RT - PCR *multiplex*.



Fonte: A autora.

Legenda: M: Marcador de peso molecular (1Kb plus Ladder), 2 e 3: amostra positiva e válida de *C. quinquefasciatus* para *W. bancrofti* (qualquer estágio); 4: Controle da reação - amostra válida de *C. quinquefasciatus* com controle positivo L3 e qualquer estágio; 5: Controle da reação - amostra não válida pelo ausência DNA de *C. quinquefasciatus* (acrécimo do controle positivo *W. bancrofti* e qualquer estágio); 6: Controle negativo.

10 DISCUSSÃO

A OMS reconheceu que a FL não configura mais como um problema de saúde pública em 16 países e um território (Camboja, Ilhas Cook, Egito, Kiribati, Maldivas, Ilhas Marshall, Niue, Palau, Sri Lanka, Tailândia, Togo, Tonga, Vanuatu, Vietnã, Wallis, Futuna e Iêmen). Enquanto outros setes países, inclusive o Brasil, ainda estão em processo de vigilância do *status* da transmissão para comprovar a eliminação da doença (WHO, 2020). Nessa fase, seguindo recomendações da OMS, realizamos a vigilância entomológica nos municípios endêmicos de Pernambuco e em São Luís no Maranhão, um antigo foco endêmico. Para isso, detectamos a necessidade de aprimorar o protocolo para xenomonitoramento molecular (XM) da FL. O XM destaca-se por ser uma ferramenta não invasiva para o homem capaz de indicar a presença de indivíduos microfilarêmicos na área sem haver a necessidade da coleta de sangue na população humana. Além disso, recolhe grande quantidade de potenciais vetores do interior das casas, minimizando o contato homem-vetor.

Embora o método padrão para a detecção de *W. bancrofti* em mosquitos vetores tenha sido a dissecação de fêmeas capturadas em campo, é considerado uma abordagem trabalhosa e demorada em grandes pesquisas epidemiológicas, uma vez que milhares de mosquitos devem ser dissecados a fim de demonstrar a prevalência da infecção (BOCKARIE, 2007). Além disso, a metodologia requer muito treinamento, pois a distinção específica de *W. bancrofti* é difícil em áreas onde outras espécies de filarídeos são prevalentes (SILVA et al. 2008). Portanto, para superar essas limitações, os ensaios de XM por PCR têm sido propostos como um método de detecção altamente específico, sensível e facilmente implantado na rastreabilidade de um grande número de mosquitos (WHO, 2009).

Um parâmetro crítico em protocolos da PCR foi observado durante o desenvolvimento do ensaio pelo nosso grupo de pesquisa. Verificou-se que 10 fêmeas por *pool* apresentou a intensidade da coloração e espessura das bandas de DNA, em média, três vezes maiores que as amostras contendo 25 mosquitos por *pool* (ALBUQUERQUE et al., 2020). Os dados estão de acordo com Vasuki et al. (2008), os quais observaram um aumento no rendimento dos fragmentos alvo em *pool* de 10 mosquitos, enquanto, em *pool* de 25 mosquitos houve uma redução. Outros estudos relatam que a técnica produz bons resultados, mesmo com mais mosquitos por *pool*: 25, 50 ou 100 (CHANTEAU et al., 1994; FURTADO et al., 1997, VASUKI et al., 2012). Entretanto a eficiência da amplificação pode diminuir com o aumento da quantidade de mosquitos na amostra, além disso, a presença de inibidores (como compostos

heme, lactoferrina e imunoglobulina G) encontrados em fêmeas alimentadas com sangue, alvos da vigilância de FL, podem interferir na amplificação do alvo (AKANE et al., 1994; AL-SOUD et al., 2000, 2001).

Nesse trabalho, propomos uma versão aprimorada do protocolo de Zhong et al. (1996) em que um controle endógeno foi adicionado a reação de PCR, correspondente ao gene da actina de uma variedade de gêneros de mosquito (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Deinocerites*, *Mansonia*, *Psophora*, *Toxorhynchites* e *Wyeomyia*) (STALEY et al., 2010). A presença desse controle endógeno permitiu determinar a viabilidade das amostras, e assim, refinar o resultado pela exclusão das amostras que não amplificaram o alvo da actina. Sendo assim, apenas as amostras válidas fizeram parte do cálculo da taxa de infecção vetorial (TIV), nesse estudo. Nesse contexto, o estudo demonstrou a capacidade de detectar pelo menos 5% de falsos negativos nas amostras de campo analisadas, a TIV foi 0,13% maior (2,34%) quando comparada com as amostras nas quais o alvo do mosquito não foi amplificado (TIV de 2,21%). Essa taxa é crítica para a tomada de decisões em um programa de controle da FL, uma vez que verifica a alta ou baixa transmissão (WHO, 2011).

Em relação à sensibilidade para detectar o DNA *W. bancrofti*, a PCR, descrita no trabalho, foi mais sensível que o protocolo retratado por Fisher et al. (1999), que mostraram detecção de apenas até 10 fg do fragmento *Ssp I*. Por outro lado, usando o protocolo, conseguimos amplificar o DNA de *W. bancrofti* usando apenas 0,1 fg.

No estudo, observou-se que mais DNA do mosquito em relação ao DNA do parasita, pode provocar uma competição por reagentes (dNTP, magnésio e enzima) no processo de amplificação. Para superar esse problema, vários parâmetros foram testados e otimizados (adição de adjuvantes, mudanças na temperatura de anelamento e ajustes na proporção entre *primers* do parasita e vetor). As otimizações incorporadas a este protocolo, conferiram a sensibilidade de detectar até 10 fg de *Ssp I* em um *pool* de 10 fêmeas, o que equivale a menos de uma larva do parasita (FARID et al., 2007, XIMENES et al., 2014, ZHONG et al., 1996).

Além do uso de um controle endógeno o custo por reação da PCR *duplex* foi calculado em US \$ 1,84 comparado aos US \$ 4,11 estimados para RT-qPCR. Porém, nesse orçamento não se levou em consideração a plataforma de tecnologia do laboratório, que no último sistema, aumentaria ainda mais os custos. Seria, portanto, possível aperfeiçoar a relação custo-benefício para a detecção de *W. bancrofti* por XM na população vetorial, que é um fator determinante em programas de vigilância vetorial com recursos limitados, como as doenças tropicais negligenciadas (KELLY-HOPE et al., 2018). Outros estudos concluíram que para o XM a PCR

LAMP é o método ideal (DORKENOO et al., 2018; KOUASSI et al., 2015) e sugeriram sensibilidade e especificidade são equivalentes ao método PCR *Ssp* I para detecção de *W. bancrofti* (TAKAGI et al., 2011). No entanto, a PCR *duplex* melhorou a sensibilidade da detecção do controle endógeno do DNA do parasita e do mosquito em uma única reação, proporcionando assim um diagnóstico mais confiável.

Tradicionalmente a presença de larva infectante (L3), e assim, a taxa de infectividade, são observadas por dissecação de mosquitos e análise em microscópio óptico (SIMONSEN et al., 2010; SOUZA et al., 2018). Essa metodologia requer bastante tempo, pois os mosquitos são analisados individualmente e a detecção filarial precisa ser minuciosa para diferenciação de outros filarídeos presentes nas amostras. Além disso, há a diminuição da prevalência de FL após repetidas rodadas de MDA, e para suprir essa baixa taxa é necessário um grande número de mosquitos para serem dissecados (WHO, 2009). O sistema RT - PCR *multiplex*, proposto no estudo, reduz as limitações da dissecação de mosquito e o alto custo da RT - qPCR, pois utiliza *pool* de mosquitos e foi sensível e específico para detectar qualquer estágio de *W. bancrofti* e estágio específico L3 (até 1 pg). Além disso, verificou-se a qualidade do RNA extraído em amostras de campo pela da adição do controle endógeno, condição ainda mais crítica, pois a molécula de RNA é mais lábil que o DNA.

O histórico de transmissão de FL no Brasil, conduzido entre 1951 a 1958, analisou um total de 811.361 indivíduos e 120.399 espécimes de mosquitos que foram dissecados quanto a *W. bancrofti* (RACHOU, 1960). A transmissão foi confirmada em 11 cidades de diferentes estados e dados recentes apontam para a interrupção do ciclo de transmissão em importantes focos endêmicos, como as cidades de Maceió (AL) e Belém (PA) (FONTES et al., 2012). No entanto, na RMR-PE, ainda há municípios com áreas consideradas endêmicas e estão em fase de TAS.

Na RMR - PE, um inquérito entomológico, realizado na década de 90 relataram fêmeas infectadas com TIV variando entre 0,61% e 1,31% (MEDEIROS et al., 1992). Em Maceió (AL) foi verificado a ausência do verme filarial e controle iminente da FL pela OMS, através de dados da infecção humana (2005) e pela análise, por PCR, de um total de 2.583 fêmeas de *C. quinquefasciatus* (2005 a 2007) com nenhuma amostra positiva (ROCHA et al., 2005; FONTES et al., 2012). Nesse estudo, a TIV nula, com a obtenção de amostras negativas por XM nas áreas endêmicas da RMR - PE e em alguns bairros no SL - MA (focos extintos) mostram uma ausência de transmissibilidade do verme indicando redução ou até mesmo início da interrupção do ciclo de transmissão da parasitose. Semelhante ao que foi encontrado em Moustafa et al.

(2017) que auxiliou o TAS com o XM em duas áreas endêmicas do Egito, e não encontraram fêmeas do gênero *Culex* com *W. bancrofti*. Assim como, Irish et al. (2018) que verificaram a ausência na transmissão vetorial em Bangladesh após rodadas de tratamento em massa na população humana, e esse mesmo achado foi observado em Togo, um dos primeiros países a implementar o programa nacional (DORKENOO et al. 2018).

Em contrapartida, nesse estudo, áreas não tratadas da RMR, que estavam próximas geograficamente aos focos endêmicos, apresentaram TIV. Uma dessas áreas não tratada foi Vila Popular, localizado no município de Olinda, apresentou uma alta taxa de infecção (2,34%) comparadas ao limiar de 0,25% de *Culex* (WHO, 2009). Uma outra área não tratada está localizada em Recife, no bairro de Nova Descoberta, obteve baixa taxa de infecção por *W. bancrofti* em dois anos (2017 e 2018). Essas taxas sugerem a circulação do verme em áreas focais da RMR. Assim como observado em Kouassi et al. (2015), em uma área focalmente não tratada na capital de Guiné, obtiveram resultados de taxas de infecção variando entre 0,31% e 1,8% e com baixa microfilaremia em humano. Essas áreas não foram incluídas no PGEFL pelas recomendações da OMS na realização do MDA, pois é necessário que a prevalência de microfilaremia acima 1% na população humana. Esse estudo corrobora com Subramanian et al. (2020) quando correlaciona o XM como uma ferramenta potencial de vigilância para as fases pós-MDA, pois pode detectar locais com infecção residual e risco de ressurgimento da transmissão.

No presente estudo, SL - MA, apesar dos últimos casos notificados na década de 1970 e sem mais novas notificações desde esse período (BRASIL, 2015), foi observado fêmeas de *C. quinquefasciatus* infectadas com *W. bancrofti*, variando as taxas de infecção entre 0,13% e 0,98% em dois bairros, Monte Castelo e Coreia de Baixo, respectivamente, sendo o primeiro estudo a mostrar ciclo de transmissão após vários anos de notificações no município.

A taxa de infectividade encontrada no estudo foi nula, o que sugere baixa transmissibilidade do verme e observa a dificuldade de encontrar a L3 em poucos *pools* de mosquitos analisados, assim como foi observado em Chand et al. (2016) que analisaram 236 fêmeas e apenas seis fêmeas apresentaram taxas de infectividade (2,5%). Assim como, em outro estudo, a TIV em área endêmica de FL foi 0,025% e a taxa de infectividade foi baixa (0,006%) (PSI-BANSA et al., 2019). Adicionalmente, Derua et al. (2017) mostram que em grande lote de mosquitos analisados (7.936) e TIV de 0,25% foi possível detectar uma taxa de infectividade (0,08%). Portanto, sugere-se que a coleta em áreas com a presença de TIV tenha o número aumentado de mosquitos para possibilidade de encontrar a larva infectante.

Apesar de a filariose ser uma doença endêmica, a sua transmissão é considerada ineficiente na população humana, 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, no homem, 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 (REGIS et al., 1996). Em contrapartida, 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. (1996) 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. Portanto, apesar de baixas taxas encontradas em alguns bairros no estudo, a persistência de transmissão mostra a necessidade de um entendimento epidemiológico completo em comunidades com transmissão residual (SOUZA et al. 2018).

Além disso, um trabalho realizado em Maceió relatou que os maiores valores de eficiência das fêmeas de *C. quinquefasciatus*, assim como as melhores taxas de infecção vetorial foram obtidas em mosquitos alimentados em indivíduos com densidade média de microfilaremia (101-500 mf/ml de sangue), do que em insetos que receberam sangue de indivíduos com alta concentração de microfilárias (> 500 mf/ml de sangue) (BRITO et al., 1998). Assim, tal achado sugere que a presença de indivíduos com baixa microfilaremia ou assintomáticos pode manter ativa a infecção dos mosquitos, portanto, a transmissão de *W. bancrofti*.

No presente trabalho, a densidade populacional dos principais mosquitos encontrados nos diferentes municípios obteve como espécie mais predominante o *C. quinquefasciatus*, o único vetor de FL nas Américas (WHO, 2011). Esses dados estão de acordo com Medeiros et al. (1992) que demonstraram o *C. quinquefasciatus* como mosquito prevalente nos municípios de Recife, Jaboatão dos Guararapes e Olinda. A espécie também foi encontrada durante todo o ano, observando um aumento na densidade entre os meses mais secos e quentes, a qual corrobora com Barbosa e Regis (2011) no Recife, que mostram as densidades aumentadas da espécie entre julho a dezembro, ou seja, no final da estação chuvosa, sugerindo a existência de condições ambientais que favorecem o acúmulo e a persistência da água da chuva. A média de *C. quinquefasciatus* nos municípios estudados na RMR - PE variou entre 2,7 e 43,66

mosquitos/casa e em SL - MA entre 0,21 e 49,5 mosquitos/casa durante o ano. De acordo com Bonfim et al. (2009) sistemas precários de saneamento básico, incluindo falta de esgotamento sanitário adequado, abastecimento insuficiente de água e moradia inadequada, favorecem o aumento do número de criadouros e, conseqüentemente, contribuem para altas densidades populacionais. Esse achado corrobora com as altas densidades de mosquitos encontradas nas áreas estudadas. Com isso, as ações de controle do vetor são necessárias para auxilia na redução da espécie em áreas endêmicas, e serve como estratégia para evitar a exposição a parasitas que possam permanecer na população e potencialmente levar à recorrência da transmissão (ICHIMORI et al., 2014). Regis et al. (2008) afirmam que a captura ativa do vetor no intradomicílio, através de aspiradores entomológicos, pode ser utilizada como método de controle promovendo a redução local de mosquitos adultos. Nesse presente trabalho, adicionalmente, capturou-se um total de aproximadamente 40 mil espécimes, favorecendo a diminuição do contato homem-vetor nas áreas estudadas.

Em síntese, a integração de várias ações para eliminar a FL, incluindo a capacitação de gestores e da equipe para implementar as atividades de controle; a ampliação de cobertura de tratamento coletivo para 100%; o controle vetorial; o planejamento do TAS com os testes diagnósticos; instrumentos de vigilância pós - MDA; e intensificação do MMPI (Manejo de morbidade e prevenção de incapacidade) contribuirão para reduzir a microfilaremia em áreas endêmicas (BRADY, 2014). Além disso, a incorporação de técnicas de geoprocessamento constitui uma ferramenta importante no PGEFL (MEDEIROS et al., 2012). Durante o estudo, foram estabelecidos critérios para guiar as coletas de mosquitos, pela construção de mapas identificando zonas quentes com raio de 100 m do histórico da enfermidade, contribuindo para o planejamento e vigilância das ações de eliminação da FL. Assim como foi observado em trabalhos na África e Índia que caracterizam a análise espacial uma metodologia necessária para programas de controles da FL (GYAPONG et al., 2002; SABESAN et al., 2006).

Na Região Metropolitana do Recife, de acordo com o PNEFL, as atividades de intervenção e vigilância realizadas em áreas endêmicas incluem o treinamento de pessoal de campo e saúde, detecção de casos (ativo e passivo por exame microscópico de sangue e ICT), mapeamento de focos endêmicos, identificação da população em risco de infecção, levantamento entomológico, tratamento seletivo de portadores de microfilárias, TC desde 2003 e vigilância (epidemiológica e entomológica), que inclui o XM (FONTES et al., 2012).

Em consonância com o PNEFL, nesse estudo, o aperfeiçoamento do XM e a identificação da TIV tanto na RMR - PE quando em SL - MA mostraram-se fundamentais para

avaliar a eficiência das estratégias implementadas em áreas endêmicas e circunvizinhas, além de focos extintos, sendo um indicador de aferição do *status* de transmissão nas etapas de eliminação da FL no Brasil.

11 CONCLUSÕES

- a) O xenomonitoramento molecular aprimorado por PCR *duplex* é sensível para determinar reduzidas taxas de infecção vetorial de *Wuchereria bancrofti*;
- b) As taxas nulas de infecção vetorial nas áreas, sob TC, apontam para o controle da circulação de *W. bancrofti*; enquanto em áreas circunvizinhas aos focos tratados na RMR o ciclo de transmissão permanece ativo;
- c) A positividade na taxa de infecção vetorial em SL - MA, indica que há circulação de *W. bancrofti* em focos endêmicos de FL anteriormente considerados extintos;
- d) A elevada densidade de *C. quinquefasciatus* em todas as áreas estudadas sugere que em locais com a circulação de *W. bancrofti*, o risco de transmissão na população humana aumenta;
- e) O XM é uma ferramenta importante para verificar a eficiência das estratégias do PNEFL, até que seja possível obter a certificação da interrupção do ciclo de transmissão da filariose.

REFERÊNCIAS

- 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. Development of a molecular xenomonitoring protocol to assess filariasis transmission. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 215, p. 107918, 2020.
- 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 em: 20 jan. 2018.
- 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.
- AMARAL, F. et al. Live adult worms detected by ultrasonography in human bancroftian filariasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 50, n. 6, p. 753-757, 1994.
- AZEVEDO, R.; DOBBIN Jr., J. E. Filariose (*Wuchereria bancrofti*) no grupo residencial do IAPB no bairro de Afogados (Recife). **Publicações Avulsas do Instituto Aggeu Magalhães**, Recife, v. 1, n.13, p.157-192, 1952.
- AYRES C.F. J. et al. Zika virus detection, isolation and genome sequencing through Culicidae sampling during the epidemic in Vitória, Espírito Santo, Brazil. **Parasites Vectors**, London, v.12, n.1, p. 220, 2019.
- AYRES, C. F. J. 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.
- BARBOSA, R. M. R.; REGIS, L. N. Monitoring temporal fluctuations of *Culex quinquefasciatus* using oviposition traps containing attractant and larvicide in an urban environment in Recife, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 4, p. 451-455, 2011.
- BERG, H.V.D. et al. Malaria and lymphatic filariasis: the case for integrated vector management. **The Lancet Infectious diseases**, New York, v. 13, n. 1, 89-94, 2013.
- BOCKARIE, M. J. Molecular xenomonitoring of lymphatic filariasis. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 77 n. 4, p. 591-592, 2007.

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. et al. The occurrence and distribution of lymphatic filariasis in Greater Metropolitan Recife: the case of an endemic area in Jaboatao dos Guararapes, Pernambuco, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 5, p. 1497-1505, 2003.

BRADY, M.; GLOBAL ALLIANCE TO ELIMINATE LYMPHATIC, F. Seventh meeting of the Global Alliance to Eliminate Lymphatic Filariasis: reaching the vision by scaling up, scaling down, and reaching out. **Parasites & Vectors**, London, v. 7, p. 46, 2014. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-46>. Acesso em: 24 jul. 2019.

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. **Ranking do Saneamento Instituto Trata Brasil: 2019**. Disponível em: <http://www.tratabrasil.org.br/estudos/estudos-itb/itb/ranking-do-saneamento-2020>. acesso em: fev. 2020.

BRASIL. **Donos de terrenos com criadouros de mosquitos da dengue podem ser multados**. 2019. Disponível em: <https://www.passosmaia.sc.gov.br/noticias/index/ver/codMapaItem/13746/codNoticia/531709> Acesso: 11 jun. 2019.

BRASIL. **O que acontece quando não temos saneamento básico**. 2017. Disponível em: <http://www.tratabrasil.org.br/blog/2017/08/15/quando-nao-temos-saneamento/>. Acesso em: 04 fev. 2018.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**. 1. ed. atual. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. **Habitação, saneamento básico e a proliferação de Dengue, Zika e Chikungunya nas favelas**. 2016. Disponível em: <https://rededengue.fiocruz.br/noticias/524-habitacao-saneamento-basico-e-a-proliferao-de-dengue-zika-e-chikungunya-nas-favelas>. Acesso: 04 fev. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica da filariose linfática no Brasil**. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. V. 47, n. 9, 2016.

BRASIL. **Maranhão integra estudos nacionais para eliminação da filariose no país**. 2015. Disponível em: <http://www.saude.ma.gov.br/maranhao-integra-estudos-nacionais-para-eliminacao-da-filariose-no-pais/>. Acesso em: 20 jul. 2019.

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre do Nilo Ocidental**. 2014. Disponível em: http://portalms.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=11252&catid=685&Itemid=250. Acesso em: 24 jan 2018.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: **Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 50, n. 13, 2019.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: **Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 50, p. 32-33, 2019.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: **Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 49, 2018.

BRITO, A. C. et al. Bancroftian filariasis in Maceio, state of Alagoas, Brazil: Observations on *Culex quinquefasciatus* after blood feeding on individuals with different densities of microfilariae in the peripheral blood stream, Cleveland, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, n.4, p. 489-494, 1998.

CARDOSO, B. F. et al. Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 6, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Recommendations of the International Task Force for disease eradication. Morbidity and Mortality. **Weekly Report**. n. 42, p 1-38, 1993.

CAUSEY, O. R. et al. Studies on the incidence and transmission of filaria *Wuchereria bancrofti* in Belém, Brazil. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v. 41, n. 2, p. 143-149, 1945.

CHAMBERS, W. E. et al. Xenomonitoring of *Wuchereria bancrofti* and *Dirofilaria immitis* infections in mosquitoes from American Samoa: trapping considerations and a comparison of Polymerase Chain Reaction assays with Dissection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 80, n. 5, p. 774-781, 2009.

CHAND, G. et al. Mapping Is a Prerequisite for Elimination of Filariasis and Effective Targeting of Filarial 'Hot Spots'. **Pathogens and Global Health**, London, v.110, n. 4-5, p. 157-163, 2016.

CHANSEY, C. et al. The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. **BioMed Research International**, United States, 2014.

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.

- CHESNAIS, C. B. et al. A multi-center field study of two point-of-care tests for circulating *Wuchereria bancrofti* antigenemia in Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, 2017.
- 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.
- CLIMA TEMPO. São Paulo, 2019. Disponível em: <https://www.climatempo.com.br/>. Acesso: 24 jul. 2019.
- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. C. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.
- DERUA, Y. A. et al. Lymphatic Filariasis transmission on Mafia Islands, Tanzania: Evidence from xenomonitoring in mosquito vectors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 1, n.10, p. e0005938, 2017.
- DIETRICH, C. F. et al. Review of Dancing Parasites in Lymphatic Filariasis. **Ultrasound International Open**, Stuttgart, v. 5, n. 2, p. e65-e74, 2019.
- DISSANAYAKE, S.; PIESENS, W. F. Cloning and characterization of *Wuchereria bancrofti*-specific DNA sequence. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 39, p. 147-150, 1990.
- DREYER, G. et al. Mudanças de paradigmas na filariose bancroftiana. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 355-362, 2009.
- DREYER, G. et al. Lymphoedema Staff Manual. **Treatment and Prevention of Problems Associated with Lymphatic Filariasis**. World Health Organization, 2001.
- DREYER, G. et al. Manifestações clínicas da filariose linfática bancroftiana. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.35, n. 5, p. 189-196, 1989.
- DORKENOO, M. A. et al. Molecular xenomonitoring for post-validation surveillance of lymphatic filariasis in Togo: no evidence for active transmission. **Parasites & Vectors**, London, v. 11, n. 1, p. 52, 2018.
- FARID, H. A. et al. A critical appraisal of molecular xenomonitoring as a tool for assessing progress toward elimination of Lymphatic Filariasis. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 77, n. 4, p 593-600, 2007.
- FARAJOLLAHI, A. et al. “Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. **Infection, genetics and evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, Netherlands, v. 11, n. 7, p. 1577-1585, 2011.

- 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. 176-183, 1999.
- 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 em: 16 dez 2017.
- FONTES, G. et al. Filariose linfática em Belém, Estado do Pará, Norte do Brasil e a perspectiva de eliminação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 131-136, 2005.
- FONTES, G.; ROCHA, E. M. M. *Wuchereria bancrofti* – Filariose linfática. In: NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 299-307, 2005.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica**. São Paulo: Edusp, 2002.
- FRANCO, O; SILVA-LIMA, D. M. Alguns aspectos das atividades contra a filariose bancroftiana no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 73-89, 1967.
- 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.
- GASS, K. et al. A Multicenter Evaluation of Diagnostic Tools to Define Endpoints for Programs to Eliminate Bancroftian Filariasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 1, p. e1479, 2012.
- GEDGE, M. L. et al. Economic evaluations of lymphatic filariasis interventions: a systematic review and research needs. **Parasites & Vectors**, London: BioMed Central, v. 11, n.1, p. 75, 2018.
- GUEDES, D. R. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes & Infections**, United States, v. 6, n. 8, p. e69, 2017.
- GUO, X. X. et al. *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. **Emerging Microbes & Infections**, United States, v. 5, n. 9, p. e102, 2016.
- GYAPONG, J. O. et al. The use spatial analysis in mapping the distribution of bancroftian filariasis in four West African countries. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 96, n. 7, p. 695-705, 2002.
- HAWKING, F. et al. The mechanisms with affect the periodic cycle of Pacific *Wuchereria bancrofti* microfilariae. **Journal of Helminthology**, London, v.55, n.2, p. 95-100, 1981.

HAWKING, F. et al. The periodicity of microfilariae. XI. The effect of body temperature and other stimuli upon the cycles of *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. ceylonensis* and *Dirofilaria repens*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 60, n 4, p 497-513, 1966.

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, v. 8, n. 11, p. e3333, 2014.

ICHIMORI, K. et al. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: the processes underlying programme success. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. e3328, 2014.

INFORME [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, n. 1, jul. 2019. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/08/informe-febre-nilo-ocidental-n1-8jul19b.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2019.

IRISH, S. R. et al. Molecular xenomonitoring for *Wuchereria bancrofti* in *Culex quinquefasciatus* in two districts in Bangladesh supports transmission assessment survey findings. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 7, e0006574, 2018.

IBGE. **Censo Populacional 2019**. Rio de Janeiro: IBGE, 2019.

IBGE. **Censo Populacional 2018**. Rio de Janeiro: IBGE, 2018.

IBGE. **Censo Populacional 2010**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

JOSEPH, A. et al. The efficacies of affected-limb care with penicillin diethylcarbamazine, the combination of both drugs or antibiotic ointment, in the prevention of acute adenolymphangitis during bancroftian filariasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 98, n. 7, p. 685-696, 2004.

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.

KELLY-HOPE, L. A. et al. Molyneux Innovative surveillance strategies to support the elimination of filariasis in Africa. **Trends Parasitology**, Oxford, v.34, n. 8, p. 694-711, 2018.

KHAN, A. M. et al. Microfilarial periodicity of *Wuchereria bancrofti* in Assam, Northeast India. **Journal of vector borne diseases**, India, v. 52, n. 3, p. 208-212, 2015.

KOUASSI, B. L. et al. Assessing the presence of *Wuchereria bancrofti* in vector and human populations from urban communities in Conakry, Guinea. **Parasites & Vectors**, v.8, n.1, p. 492, 2015.

LANEY, J. S. et al. Detection of *Wuchereria bancrofti* L3 larvae in mosquitoes: a reverse transcriptase PCR assay evaluating infection and infectivity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 2, e602, 2010.

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).

LOURENS, G. B. et al. Lymphatic Filariasis. **Nursing Clinics of North America**, USA. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2019.02.007>. Acesso em: 20 nov. 2019.

LUCENA, W. A. et al. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction using urine and day blood samples from microfilaraemic patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 92, n.3, p. 290-293, 1998.

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.

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. Using kernel density estimates to investigate lymphatic filariasis in northeast Brazil. **Pathogens and Global Health**, v. 106, n. 2, p. 113-117, 2012.

MEDEIROS, J. F. Importância do método de gota espessa de sangue no diagnóstico de filárias simpátricas no Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, Amazônia, v. 40, n. 4, p. 779-780, 2010.

MEDEIROS, Z. et al. Control of lymphatic filariasis in Brazil, 1951 – 2000. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 12, n. 2, p. 77-86, 2003.

MEDEIROS, Z. et al. Screening of army soldiers for *Wuchereria bancrofti* infection in the metropolitan Recife region, Brazil: implications for epidemiological surveillance. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 4, n. 7, p. 499-505, 1999.

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**, Baltimore, v. 95, n. 3, p. 214-7, Jun 1992.

MELO, D. C. T. V. Avaliação do desempenho biológico de *Culex quinquefasciatus* (diptera: culicidae) resistente a *Bacillus sphaericus*. **Monografia** (Monografia em Universidade Federal de Pernambuco) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

MEHTA, P. K. et al. Microfilaria persistent foci during post MDA and the risk assessment of resurgence in India. **Tropical Medicine and Health**, Japão, v. 46, n. 1, 2018.

MEULEN, V. D K. M. et al. West Nile virus in the vertebrate world. **Archives of virology. Supplementum**, Austria, v. 150, n. 4, p. 637-57, 2005.

MOUSTAFA, M. A. Molecular Xenomonitoring (MX) and transmission assessment survey (TAS) of lymphatic filariasis elimination in two villages, Menoufyia Governorate, Egypt. **European Society of Clinical Microbiology**, Berlin: Springer, v. 36, n. 7, p. 1143-1150, 2017.

MORALES, F. C. et al. Surveillance for Zika in Mexico: naturally infected mosquitoes in urban and semi-urban áreas. **Pathogens and Global Health, London**, v. 113, n. 7, p. 309-314, 2020.

MORE S. J, COPEMAN D. B. A highly specific and sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating antigen in bancroftian filariasis. **Tropical medicine and parasitology**, Germany, v. 41, n. 4, p 403-406, 1990.

MOTT, K. E. et al. Parasitic diseases and urban development. **Bulletin of the World Health Organization**. Geneva: World Health Organization, v. 68, n.6, p. 691-698, 1990.

NOORDENDE V. T. A. et al. The impact of leprosy, podoconiosis and lymphatic filariasis on family quality of life: A qualitative study in Northwest Ethiopia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 14, n. 3, p. e0008173, 2020.

NEGLECTED TROPICAL DISEASES. 2016. Disponível em: <https://www.ntdsupport.org/resources/filariasis-test-strip-fts-bench-aid>. Acesso em: 01 ago. 2019.

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.

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.

OKORIE, P. N; DE SOUZA, D. K. Prospects, drawbacks and future needs of xenomonitoring for the endpoint evaluation of lymphatic filariasis elimination programs in Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 110, n. 2, p. 90-97, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Lymphatic filariasis**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/lymphatic-filariasis>. Acesso em: fev. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Lymphatic filariasis. Status of Mass Drug Administration**: 2019. Disponível em: https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/lf/lf.html. Acesso em: jan 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Lymphatic filariasis. The Weekly Epidemiological Record (WER)**. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/wer/en/>. Acesso em: 10 dez. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Treinamento em monitoramento e avaliação epidemiológica da intervenção com tratamentos coletivos para eliminação da filariose linfática: guia do participante - TAS**. Organização Mundial de Saúde, Genebra, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **16ª Reunião Regional de Gerentes do Programa para Eliminação da Filariose Linfática e 15º Grupo Regional de Análise do Programa para Eliminação da Filariose Linfática**. Fortalecimento da vigilância para alcançar e manter a eliminação da transmissão da filariose linfática e combater outras doenças infecciosas negligenciadas na Região das Américas. Organização Mundial de Saúde, Recife, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Lymphatic Filariasis: A Handbook of Practical Entomology for National Lymphatic Filariasis Elimination Programmes**. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2013.

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 MUNDIAL DE SAÚDE. **The Role of Polymerase Chain Reaction Techniques for Assessing Lymphatic Filariasis Transmission**. 2009. **WHO/HTM/NTD/PCT/2009**. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70255> acesso em: dez. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Lymphatic filariasis: Progress of disability prevention activities**. **Weekly epidemiological record**, Geneva, v. 79, p. 417–424, 2004.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **55ª Conselho Diretor - 68ª Sessão do Comitê Regional da OMS para as Américas**. Plano de Ação para a Eliminação de Doenças Infecciosas Negligenciadas e Ações Pós-eliminação 2016-2022. Washington, D. C., Organização Pan-Americana de Saúde, Organização Mundial de Saúde, 2016

ORIHHEL, T. C. Filariae. In: Beaver PC, Jung RC, organizadores. *Animals Agents and Vectors of Human Disease*. **Lea & Febiger**, Philadelphia, 1985.

OTTESEN, E. A. et al. The global programme to eliminate lymphatic filariasis: health impact after 8 years. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 10, p. e317, 2008.

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.

OWUSU, I. O. et al. Evaluation of Human and Mosquito Based Diagnostic Tools for Defining Endpoints for Elimination of Anopheles Transmitted Lymphatic Filariasis in Ghana. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 109, n. 10, p. 628-635, 2015.

PAILY, K. P. et al. A review of the complexity of biology of lymphatic filarial parasites. **Journal of Parasitic Diseases**, India, v. 33, n. 1-2, p. 3-12, 2009.

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: 22 jan. 2018.

PI-BANSA, S. et al. Assessing the Presence of *Wuchereria bancrofti* Infections in Vectors Using Xenomonitoring in Lymphatic Filariasis Endemic Districts in Ghana. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, Basel, v. 4, n. 1, p. 49, 2019.

RACHOU, R. G. 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.

RACHOU, R. G. Considerações sobre o combate à filariose bancroftiana no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 9, p. 527-536, 1957.

RAO, R. U. et al. Reassessment of areas with persistent Lymphatic Filariasis nine years after cessation of mass drug administration in Sri Lanka. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 10, e0006066, 2017.

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, v.8, n. 11, e3281, 2014.

RAMAIAH, K. D. et al. The impact of lymphatic filariasis on labour inputs in southern India: results of a multi-site study. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 94, n. 4, p. 353-64, 2000.

RAMIAH, K. D.; DAS, P. K. Seasonality of adult *Culex quinquefasciatus* and transmission of bancroftian filariasis in Pondicherry South India. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 50, p. 275-288, 1992.

REGIS, L. et al. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 1, p. 50-59, 2008.

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. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n.1, p. 115-119, 1995.

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

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 Filariose. **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, v. 39, n. 3, p. 233-249, 2010.

ROCHA, A. et al. Validation of tools for verification of elimination of transmission PCR and xenomonitoring results from Belém and Maceió. In: **6th Regional Lymphatic filariasis Program Manager's Meeting**. San Jose-Costa Rica: PAHO/WHO, 2005. p. 37-44.

ROCHA, E. M. et al. Bancroftian filariasis in urban areas of Alagoas State, Northeast Brazil: study in the general population. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 6, p. 545-51, 2000.

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

SABESAN, S. et al. Delimitation of lymphatic filariasis transmission risk areas: a geo-environmental approach. 2006. **Filaria Journal**. Disponível em: <http://www.filariajournal.com/content/pdf/1475-2883-5-12.pdf>. Acesso: jan 2020.

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.

SHAMAEDICK A. M., et al. Molecular Xenomonitoring Using Mosquitoes to Map Lymphatic Filariasis after Mass Drug Administration in America Samoa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, 2014.

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.

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.

SOUZA D. K. et al. Low Microfilaremia Levels in Three Districts in Coastal Ghana with at Least 16 Years of Mass Drug Administration and Persistent Transmission of Lymphatic Filariasis. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, Basel, v. 3, p. 4, 2018.

SOUZA, D. K. et al. The Impact of Residual Infections on Anopheles-Transmitted *Wuchereria Bancrofti* after Multiple Rounds of Mass Drug Administration. **Parasites & Vectors**, 2015.

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.

SUBRAMANIAN, S. et al. Molecular xenomonitoring as a post-MDA surveillance tool for global programme to eliminate lymphatic filariasis: Field validation in an evaluation unit in India. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 14, n. 1, p. e0007862, 2020.

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

TYRELL, E. Socioeconomic burden of lymphatic filariasis in Georgetown, Guyana. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.18, n. 2, p. 152-158, 2013.

VASUKI, V. et al. Use of a simple DNA extraction method for high-throughput detection of filarial parasite *Wuchereria bancrofti* in the vector mosquitoes. **Parasitology research**, Berlin, v. 111, n. 6, p. 2479-2481, 2012.

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.

VIEIRA, A. C. S. M, et al. Case Report: West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 93, n.2, p. 377-379, 2015.

XIMENES, C. B. et al. Detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in paired serum and urine samples using polymerase chain reaction-based systems, Rio de Janeiro, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 978-983, 2014.

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.

WEIL, G. J.; RAMZY, R. M. Diagnostic tools for filariasis elimination programs. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 23, n.2, p.78-82, 2006.

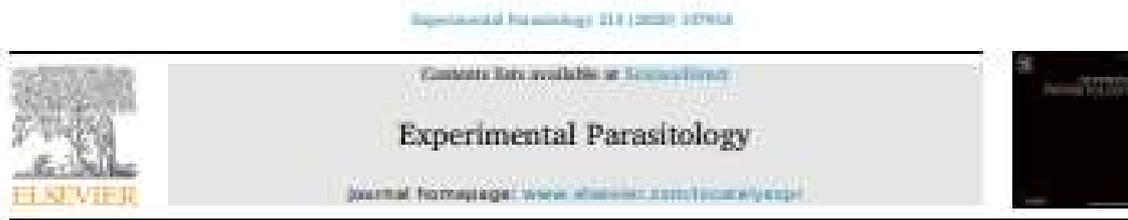
WEIL, G. J.; LAMMIE, P. J.; WEISS, N. The ICT filariasis test: A rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 13, p. 401-404, 1997.

WILLIAMS, S. A. 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.

WUCHERER, H. E. O. Preliminary Report on a Species of Worm, as Yet Undescribed, Found in the Urine of Patients with Tropical Hematuria in Brazil. **Tropical Medicine**, v. 1, p. 378, 1868.

APÊNDICE A – Artigo publicado



Development of a molecular xenomonitoring protocol to assess filariasis transmission

Alessandra Lima de Albuquerque^a, Tatiane Alexandre de Araújo^a,
 Danielle Cristina Tenório Varjal de Melo^a, Marcelo Henrique Santos Palma^{a,b},
 Fábio Lopes de Melo^c, Cláudia Maria Fontes de Oliveira^a, Constância Flávia Junqueira Ayres^{a,c}*

^aDepartamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Recife, Pernambuco, Brazil

^bDepartamento Federal de Parasitologia, Centro Acadêmico de Agreste, Caruaru, Pernambuco, Brazil

^cDepartamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Xenomonitoring
 Filariasis
 PCR
Calix galipagensis
Wuchereria bancrofti
 Molecular xenomonitoring

ABSTRACT

According to the World Health Organization, lymphatic filariasis (LF), a mosquito-borne neglected tropical disease (NTD), should be eliminated as a public health concern by the end of 2020. To this end, the goals of the Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis (GPELF) include interrupting transmission through mass drug administration (MDA). After two decades, several countries have implemented MDA and are now ready to confirm whether transmission has been interrupted. The method for detecting the parasite in mosquito vectors known as xenomonitoring is a non-invasive tool for assessing the current transmission status of the filarial nematode *Wuchereria bancrofti* (which is responsible for 90% of cases) by their vectors. There are several methods available for detection of the worm in mosquito samples, such as dissection or polymerase chain reaction (PCR). However, most of these techniques still produce a considerable number of false-negative results. The present study describes a new duplex PCR protocol, which is an improvement on the traditional PCR methodology, enhanced by introducing the *actin* gene as an endogenous control gene. After adjusting the mosquito pool size, DNA extraction, and MDA-PCR duplex design, we achieved a reliable and sensitive molecular xenomonitoring protocol. This assay was able to eliminate 9% of false-negative samples and detected less than one 6S larvae. This high sensitivity is particularly valuable after MDA, when prevalence declines. This new method could reduce the number of false-negative samples, which will enable us to improve our ability to generate accurate results and aid the monitoring strategies used by LF elimination programmes.

1. Introduction

Lymphatic filariasis (LF) is a parasitic disease endemic in 52 countries with 886 million people at risk of infection (WHO, 2019). *Wuchereria bancrofti* (WB) worms cause approximately 90% of LF cases, while the remaining infections are caused by *Brugia malayi* and *B. timori* filarial parasites (Taylor et al., 2010). These parasites are transmitted by female mosquitoes of the *Aedes*, *Anopheles*, *Culiseta*, *Mansonia*, and *Odontomyza* genera infected after ingesting blood from microfilaremic patients (de Souza et al., 2014). The Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis (GPELF) aims to eliminate LF as a public health

problem by the year 2020 (WHO, 2010) and was launched in 2000 by the World Health Organization (WHO). To achieve this goal, the WHO's strategy consists of large-scale treatment of the entire population at risk of infection (mass drug administration - MDA), morbidity management to alleviate human suffering and vector control as a complementary measure to reduce transmission of LF and consequently prevent new infections (WHO, 2012).

The main aim of the MDA approach is to significantly reduce the number of circulating parasites in endemic areas, and the WHO recommends implementing a surveillance programme to confirm the interruption of transmission from time to time (WHO, 2012). Recently,

*Abbreviations: LF, Lymphatic Filariasis; Li, third stage of *Wuchereria bancrofti*; infective larvae; TAI, Transmission Assessment Survey; MX, molecular xenomonitoring; WB, *Wuchereria bancrofti*; Cy, *Calix galipagensis*.

*Corresponding author.

E-mail addresses: alessandra.albuquerque@fiocruz.com.br (A.L.A. Albuquerque), tatiane.araujo@fiocruz.com.br (T.A.A. Araújo), danielle.varjal@fiocruz.com (D.C.T.V. de Melo), marcelo.palma@fiocruz.com (M.H.S. Palma), fabiolo@fiocruz.com (F.L.d. Melo), claudia@fiocruz.com (C.M.F. Oliveira), constancia@fiocruz.com (C.F.J. Ayres).

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107903>

Received 17 October 2019; Received in revised form 04 January 2020; Accepted 14 May 2020

Available online 26 May 2020

0890-8694/© 2020 The Author. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

forty-two countries have eliminated filariasis, but continued surveillance is crucial for maintenance of this condition (WHO, 2019). The WHO has therefore published a standard methodology, entitled Transmission Assessment Survey (TAS), which guides verification of LF elimination in national programmes and may result in official recognition of elimination (WHO, 2012). As a complementary tool to the TAS, immunoscreening has been used as a non-invasive method for detecting the presence of parasite in mosquito vector populations to indirectly monitor the progress of the LF control programme. In this approach, vector infection is used to diagnose whether HF transmission is currently occurring in humans, because these are the only known definitive vertebrate host (Baily-Hope et al., 2010; Paily et al., 2009; WHO, 2012; Williams et al., 2002).

Although the gold standard method for HF detection in mosquito vectors has been the inexpensive dissection of wild-caught female mosquitoes, this becomes inefficient when the prevalence declines below 1%, decreasing sensitivity, especially for detection of early larval stages (Gardner et al., 2003). The dissection approach is also laborious and time-consuming for large epidemiological surveys, since thousands of mosquitoes may be dissected in order to demonstrate the infection prevalence (Suckera, 2007). To overcome these limitations, molecular immunoscreening (MI) assays have been proposed as a method for the detection of filarial parasites in mosquito vectors (WHO, 2010). MI has the potential to identify low levels of WB infection (Zuo et al., 2003) and is also highly specific, sensitive and easily deployed to screen large numbers of mosquito samples (Lacey et al., 2008).

Common MI techniques for detecting HF DNA are based on Polymerase Chain Reaction (PCR). One of them is the *Sap I* PCR protocol developed by Zhang et al. (1999) to amplify a fragment of *Sap I* repeat DNA family, specific to the genus *Wuchereria*, in which this repeat is 195 bp long and contains a single *Sap I* restriction site for an endonuclease from *Sphaerulina* sp. However, the inhibition of PCR assays is a cause for concern and the presence of parasite could be masked, mimicking low prevalence data (Devolante and Fallos, 2013). The efficiency of PCR amplification may vary from sample to sample depending on the quality of DNA preparation and the presence of PCR inhibitors co-purified with DNA, such as haem components, lactoferrin, and immunoglobulin G, found in blood-fed potentially infected females (Khan et al., 1994; Al-Soufi et al., 2000; Al-Soufi and Isikoff, 2001). Nakamura and Fallos (2012) have further demonstrated that the head of the *Culex pipiens* mosquito is an important source of inhibitors that may produce false-negative PCR results, and proved that mosquito decapitation is able to restore the reliability of the reactions. Unfortunately, this cannot be done in surveys for parasite detection because it is expected to find parasites in the head. All these factors could interfere with PCR and produce false negative results. The use of a PCR system with ELISA has also been suggested, but this increases the cost of diagnosis (Fischer et al., 2000; Goodwin et al., 2007). As a way of overcoming these difficulties, we describe a more reliable assay for screening pools of mosquitoes for the presence of WB, which is able to detect the parasite and evaluate the sample quality in the same reaction. This new PCR protocol includes primers to amplify the actin gene as an endogenous control in a variety of mosquito genera (*Anopheles*, *Culex*, *Delmecaria*, *Mansonia*, *Protophara*, *Toxorhynchites*, and *Wyeomyia*) (Lacey et al., 2008) to prevent false negative results.

2. Materials and methods

2.1. *Culex quinquefasciatus* colony

The *Culex quinquefasciatus* colony used in this study, called CapLab (Anonim et al., 2013), has been kept at the laboratory of the Department of Entomology, Agripa Nigullien Institute/Oswaldo Cruz Foundation (IAM-INOCCO) since 2009 under standard conditions (26 ± 1 °C, 70% relative humidity and photoperiod of 12:12 h light/darkness). Enlarged adult females were placed in pools in 1.5 ml microtubes, and

stored at -20 °C. The number of females per pool varied according to the proposed experiment: 10, 25, 50, or 75 individuals per microtube.

2.2. *Cx. quinquefasciatus* pool DNA extraction

DNA was extracted from mosquito pools using a protocol described in (Aron et al., 2002) with minor modifications. For pools containing 50 and 75 females, twice the amount of lysis buffer was used, owing to the large amount of macerated tissue. The final vacuum-dried DNA pellet was re-suspended in 100 µl of sterile TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA). The DNA concentration and purity were measured using a spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop® 2000, Wilmington, USA).

2.3. Preparation of WB controls

Considering the difficulty finding humans with sufficient micro-filaraemia to infect *Cx. quinquefasciatus* artificially, a fragment of 188 bp of the *Sap I* repeat family was inserted into a plasmid using a pGEM-T Easy® (Promega, Madison, USA), and this plasmid was used as a positive control in all PCR reactions. After measuring DNA concentration in a NanoDrop® 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific), a serial dilution was carried out from 0.1 ng to 10 µg of plasmid DNA containing the WB fragment to test the sensitivity of detection of parasite DNA. Mosquito infection simulation was then performed by the addition of different quantities of cloned WB DNA to the genomic DNA (gDNA) of the mosquito pools.

2.4. Duplex PCR design and optimization

The duplex PCR protocol designed here was named WBc PCR, referring to the target DNA fragments from the parasite *Wuchereria bancrofti* (WB) and the endogenous control from *Culex quinquefasciatus* (Cx). These assays were performed using two pairs of primers already described in the literature: a) MV-1 and MV-2 (Zhang et al., 1999) to amplify a fragment of 188 bp from WB-*Sap I*; b) act2F and act2R (Lacey et al., 2010) which target the actin gene of mosquitoes, amplifying a fragment of 660 bp, in which this gene is proposed as an internal control to check the quality of DNA present in the reaction.

The BLAST tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) was used to confirm where the actin primers, Act-2F, the forward degenerate primer (5'-ATGCTGGTATWGGGNCAGAAAGGCTC-3'), and Act-2R, the reverse degenerate primer (5'-GATTCATATCCAGAGLAAG-GAAGG-3'), align to the sequence deposited in GenBank database and the Splice tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/wash/splice/) was used to align transcripts (mRNA) to genomic showing information about exon-intron boundaries.

Different parameters tested to optimize the PCR assays are described in Table 1. Different PCR adjuvants, such as DMSO, BSA and betaine were used only with *Cx. quinquefasciatus* field-caught to overcome the lack of homogeneity of the samples. The duplex WBc PCR tests were performed using Taq DNA polymerase (Promega) on a Nucleo G82 Mastercycler® (AppliedBios, Hamburg, Germany), under the following cycling conditions: 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 45 s, 55–66 °C (temperature gradient test) for 45 s, 72 °C for 45 s, and a final 10 min extension at 72 °C. The PCR products were analysed by electrophoresis on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide, same bands were compared and semi-quantified using ImageJ software (1.52a, US National Cancer National Institutes of Health: Bethesda, MD, USA) (<http://imagej.nih.gov/1/ij/index.html>).

2.5. Evaluation of WBc PCR assays

To test the influence of PCR inhibitors on the amplification process, assays were carried out with the DNA from 10, 25, 50, and 75 female mosquitoes combined with four different HF (cloned *Sap I*) DNA concentrations (10 µg, 1 µg, 100 ng and 10 ng) (Fig. 1). Each sample was

Table 1
Methicological parameters tested using WbCr duplex PCR.

Primer set / PC ^a usage (µM)	Annealing temperature	ACTV ^b IC ₅₀ (µg/ml) ^c	MgCl ₂ PC ^d (mM) ^e	DMSO PC ^f (%) ^g	BSA PC ^h (µg/ml) ⁱ	Rescue PC ^j (M) ^k
Act-29/38 Soley et al., 2002 NW-0922 Song et al., 1998	52.0–53.0	50.00 °C	200–400	1.0–3	0.0–30 ^l	0.0

- ^a IC₅₀ = final concentration.
^b PCR Inhibitor kit-2X (Pierce, Madison, USA).
^c Dimethylsulfoxide (Sigma, Saint Louis, USA).
^d Bovine Serum Albumin (Sigma, Saint Louis, USA).
^e Rescue (ATPase) (500^m, Santa Clara, USA).
^f Adjusted and only with mosquito field-catch.

tested with two different profiles, non-diluted and diluted tenfold (Table 1). Additional tests were performed with DNA obtained from 10 females, and two dilutions (two- and four-fold).

The detection limit of the WbCr PCR protocol for detecting Wb DNA was tested using the dilution curve of pGEM T Easy-Sp 1 (0.1 fg to 10 µg) as a template without mosquito DNA. This gradient was chosen taking into account the amount of Sp-1, 60 fg, estimated for a C1 (Clancy et al., 1994). Thus, were used concentrations of DNA around of what should be an infection with multiple Wb or less than one single parasite. Besides this choice were done to identify a lower detection than 10 fg found by Fisher et al. (1999). A simulated competition between DNA of Wb at different concentrations (10 µg, 1 µg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, and 0.1 fg) and *Cx. quinquefasciatus* (10 females four-fold diluted) was also tested (Table 1).

2.6. Comparison of WbCr PCR system and common singleplex PCR for Wb detection

To evaluate the proposed duplex PCR developed here, we compared the performance of mosquito DNA diagnosis in one hundred pools containing up to ten *Cx. quinquefasciatus* field-catched and blood-fed, semi-gravid, or gravid females (856 individuals in total). These mosquitoes were collected in Olinda (8°09'44.7" S 34°51'55.0" W), a city located in the Metropolitan Region of Recife. The samples were then processed as described above and the Wb infection rates were estimated using PoolScreen v 2.0.2 software (Kochal et al., 1995) both with the endogenous control for mosquitoes (duplex) and without (as a singleplex PCR).

3. Results

BLAST and SPLICER searches showed that Act-29 and Act-38 align to nucleotides 133–158 and 793–815, respectively, inside of the exon 2 of the actin rDNA sequence (XM_001069326.1). Considering the *Cx. quinquefasciatus* genome (NW_061887498.1), the Act-29 and Act-38 align to nucleotides 14676–14691 and 15416–15394, respectively.

To establish the most viable sample size for the vector infection, diagnostic groups of 10, 25, 50, and 75 mosquitoes per pool with Wb DNA were analyzed, and no amplification was detected with DNA samples diluted only once. When the pools were 10-fold diluted, both targets from Wb and mosquitoes were amplified with 10 (50 ng) and 25 (100 ng) mosquitoes, but the intensity of the bands was stronger with 10 mosquitoes and Wb DNA was detected up to the 10 fg dilution (Fig. 2A). In light of these results, we followed up with tests using pools of 10 mosquitoes, and reactions with 4-fold diluted samples showed intense amplification of the targets (Fig. 2C).

To determine the lowest detection limit of Wb DNA using the WbCr PCR, six serial dilutions of pGEM T Easy-Sp 1 (from 10 µg to 0.1 fg) were tested without mosquito DNA. The WbCr PCR was able to amplify the Wb fragment at all concentrations (Fig. 2B). On the other hand,

when the WbCr PCR was performed with both DNA samples (mosquito and Wb), the actin fragment was amplified in all samples, but the Wb DNA was only detected up to the 10 fg dilution (Fig. 2C).

It was also possible to observe that the use of adjuncts in PCR increased the intensity of bands (actin gene and Sp 1), in the presence of DMSO or BSA with field-samples. On the other hand, the Rescue concentration tested did not change the amplification results. In addition to the use of the adjuncts, the segment at annealing temperature from 52 °C to 53 °C resulted in a reduction of nonspecific bands (Fig. 3). An increment of primer concentration targeting the parasite resulted in a higher intensity of the Wb band in relation to the endogenous control. The WbCr PCR was then optimized to include 0.17 µM of each Wb primer and 0.12 µM of each mosquito actin primer, 1 µL of complete DNA dilution series from 10 fg to 284 ng) and 20 µL of PCR Inhibitor kit-2X (Pierce), this last component being incrementated with more MgCl₂ for the final concentration of 3 mM (Table 1). The reaction with field-catch mosquitoes included a 2 µg/ml bovine serum albumin (BSA) (Sigma) adjunct (Figs. 3 and 4).

Finally, it was possible to detect both positive and negative samples when the WbCr PCR duplex assay was carried out using field-catch mosquitoes (Fig. 4). More than 60% of pools had 10 females per pool and the range of mosquito gDNA (two-fold diluted) used as a template per assay was 4.5–346 ng. Twenty pools tested positive for Wb and the endogenous control was detected in 95% of samples (10–346 ng). The estimated prevalence of infection in mosquitoes was then compared, both with all 100 samples as a singleplex (Wb target), and with the endogenous control (duplex) to validate the samples. The infection rate was higher when calculated with Wb pools without 5% of false negatives detected by the duplex PCR (4.5–10 ng) (Table 1).

4. Discussion

A critical PCR protocol parameter considered during the development of the WbCr duplex assay was the mosquito pool size. Our tests showed the intensity of staining and thickness of DNA bands was at least three times greater in samples with 10 mosquitoes than in those with 25. It was found that 10 females per pool produced the best quantity of DNA to be used in PCR assays, considering the variation in mosquito size. Our data are in accordance with Vazaki et al. (2008), who also observed that pools of 10 mosquitoes resulted in an increased yield of the target fragment, while pools of 25 mosquitoes led to a decreased yield of PCR bands. Although Field et al. (2007) considered pools containing less than 10 mosquitoes a suboptimal number for large-scale screening, this number provides a better quality PCR template.

Several studies have noted that Wb PCR provides good results, even with more mosquitoes per pool: 25, 50 or 100 (Chenais et al., 1994; Ferrais et al., 1997; Vazaki et al., 2012). However, authors have used non-engorged mosquitoes from the laboratory, raised under controlled environment conditions. To simulate the use of field mosquitoes, we

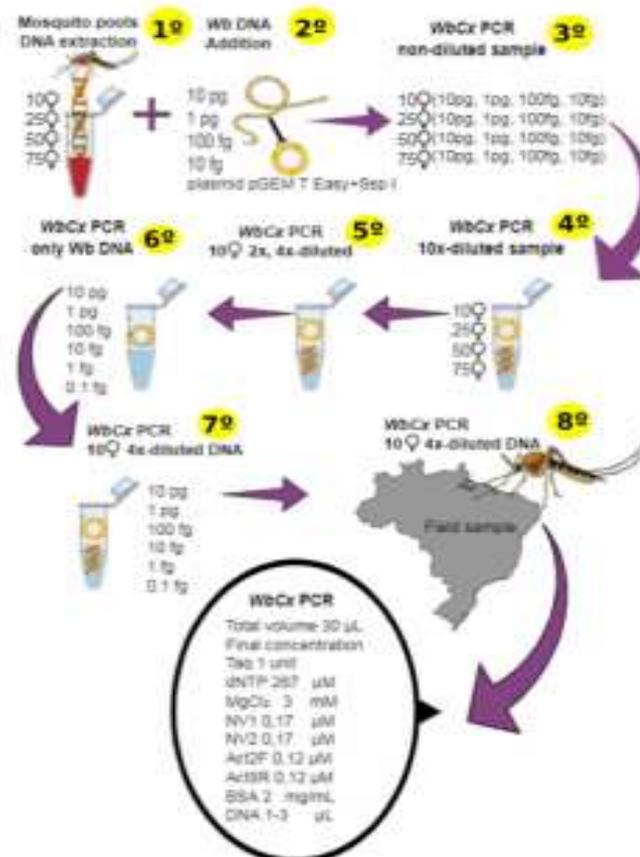


Fig. 1. Overview of the development of a new molecular seroscreening protocol – Flowchart of sample processing, evaluation assays and WbCr duplex PCR optimization.

Table 2
 DNA concentrations and purity of samples used in WbCr duplex PCR trials.

Mosquitoes per pool tested	WGA (ng)	200/200 Non-diluted	200/200 (ng) 10x-diluted	200/200 (ng) 4x-diluted
50	947	2.0x	3.38 (37 ng)	2.02 (209 ng)
25	1826	1.99	2.96 (3.83 ng)	-
10	4726	1.94	2.55 (380 ng)	-
5	7933	2.87	2.25 (633 ng)	-

Table 3
Steps of WICr duplex PCR optimization.

Step	Process	Goal
1	<i>Cs. guberosus</i> plus DNA extraction	Have the best template DNA for WICr
2	Adjustment of primer 5' and 3' ends to the target plus DNA	Obtain correct amplification of target plus DNA
3	WICr PCR with non-diluted mosquito plus DNA with four WICr DNA concentrations	Obtain the best size of pool and dilution to WICr
4	WICr PCR with 10-fold diluted sample	Define the suitable dilution to WICr
5	WICr PCR with two females <i>Cs. guberosus</i> plus DNA	Test the sensitivity of detection of parasite WICr
6	WICr PCR using only the dilution series of pGEM 7 Easy-Tag (0.1 fg to 10 pg) as template	Standardize a competition between DNA of WICr at different concentrations of pGEM 7 Easy-Tag 1 as template
7	WICr PCR using <i>Cs. guberosus</i> (10 females, four fold diluted) and the dilution series of pGEM 7 Easy-Tag 1 as template	Standardize a competition between DNA of WICr at different concentrations of pGEM 7 Easy-Tag 1 as template
8	WICr PCR system with fold sample	Evaluate the performance of WICr PCR with heterogenous sample

have tested our WICr PCR system with pools of 10, 25, 50, and 75 engorged females. The results show that the DNA extraction method needed adjustment, as the number of engorged mosquitoes per sample increased, probably due to the saturation of reagents against a higher quantity of inhibitor. Although the use of 10 mosquitoes/pool leads to an increase in the number of samples to be processed in post-PCR assays, 10 females per pool has proved to be a critical parameter for avoiding false negatives or rendering the sample non-viable.

Regarding the sensitivity to detect WB DNA, WICr PCR was more sensitive than the protocol described by Fisher et al. (1999), who showed detection of only up to 10 fg of the Sp1 fragment. On the other hand, using the WICr PCR protocol, we were able to amplify WB DNA using only 0.1 fg.

Using the WICr PCR protocol, it could be observed that more mosquito DNA, compared to larval DNA, generated a competition for reagents (dNTP, magnesium and enzyme) in the amplification process. Several parameters were tested and optimized as a way of resolving this issue (including DNA dilution, addition of additives, changes in annealing temperature, and adjustments in the proportion between parasite and vector primers). Such adjustments provided the final WICr PCR protocol described here, which is capable of detecting the presence

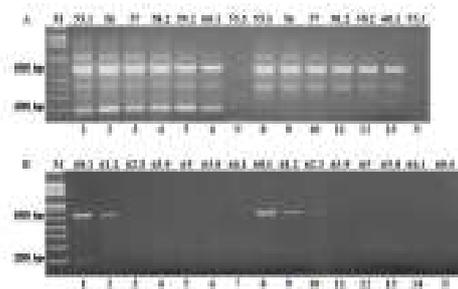


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis showing WICr PCR temperature gradient testing with *Cs. guberosus* plus DNA (10 females 4-fold diluted) and pGEM 7s adjacent. A. Annealing temperatures from 55.1°C to 66.1°C - M - 1 kb plus ladder; Lanes 1 to 6: field positive samples; Lanes 7 to 8: 10-fold negative samples; 9: Negative control. B. Annealing temperatures from 65.1°C to 66.1°C - M - 1 kb plus ladder; Lanes 1 to 7: field positive samples; Lanes 8 to 9: 10-fold negative samples; 9: Negative control.

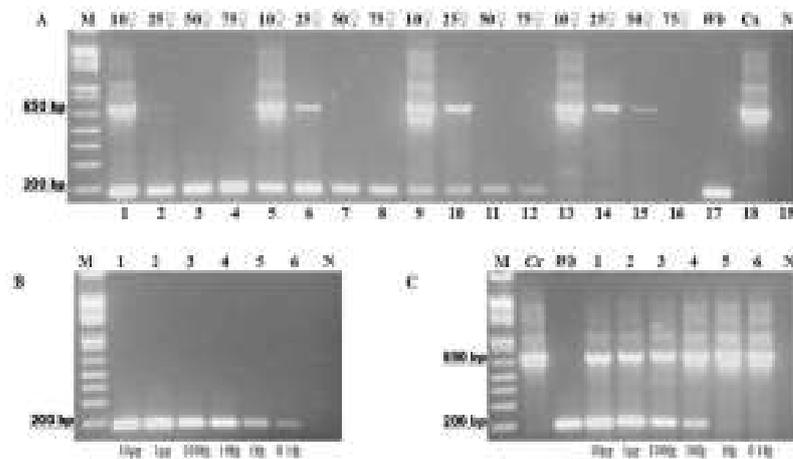


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis showing A - PCR using different dilutions of DNA extracted from pools of mosquitoes plus pGEM 7 Easy-Tag 1. M - 1 kb plus ladder. Final DNA concentration of Sp1 - 100 fg after dilution - Lanes 1 to 4: 1 fg; Lanes 5 to 8: 100 fg; Lanes 9 to 12: 10 fg; Lanes 13 to 16: 1 fg; PF - positive control - Sp1 - 100 bp; Cs - positive control, *actin* gene - 683 bp (mosquito DNA) and N - Negative control. B - Detection limit of duplex PCR for *W. bancrofti* DNA. M - 1 kb plus ladder; Lanes 1 to 6 - Serial dilutions of Sp1 - 100 bp and N - Negative control. C - Competition to detect *W. bancrofti* versus *Cs. guberosus* plus DNA (10 females 4-fold diluted) by WICr PCR. M - 1 kb plus ladder; Cs - *Cs. guberosus* DNA without parasite DNA, 683 bp - *actin* gene; WB - 10 fg of only Sp1 - 100 bp; Lanes 1 to 6 - Serial dilutions of Sp1 with mosquitoes (683 bp and 100 bp bands) and N - Negative control.

Table 4
Final WbCr parameters and cycling conditions.

Cycling Conditions	PCR Mix PC ^a
94 °C:15 min	Taq - 1 unit ^b
30 s	dNTP - 207 µM ^c
94 °C:30 s	MgCl ₂ - 1 mM ^d
94 °C:30 s	DNA 2 ng/µl ^e
72 °C:30 s	0.17 µM PFI/1002 each
72 °C:30 min	0.12 µM Acc 20-30 each

^a IC - final concentration for 50 µl of PCR.

^b PCR Master Mix 2X (Promega, Madison, USA).

^c Magnesium Chloride Solution (Promega, Madison, USA).

^d Bovine Serum Albumin (Sigma, Saint Louis, USA).

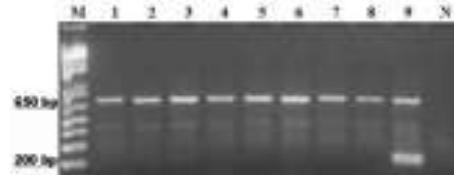


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis showing molecular monitoring by WbCr PCR with field samples and BSA 2 µg/µl as adjuvant. M: 1 kb plus ladder; Lanes 1 to 9: 10 females +60d old; Lanes 1 to 8: negative samples, 300 bp - actin gene (mosquito DNA); Lane 9: Wb positive sample (300 bp and 300 bp bands); N: Negative control.

of Wb DNA in mosquito pools even when only one mosquito female is infected by a single L3 parasite; since we detected up to 10 fg of Ssp I in pools of 10 females, equivalent to less than one larva of the parasite (Farid et al., 2007; Kironis et al., 2014; Zhang et al., 1996). If the Ssp I repeat is equivalent to 0.66% of Wb genome and one mf has ~100 pg (Blucher et al., 1998; Zhang et al., 1996), then one L3 has approximately 60 fg of Ssp I. In this case, WbCr PCR can detect six times less than a single L3.

The WbCr PCR duplex proposed here was able to detect 5% of false negatives in the field samples analyzed. This kind of error cannot be detected when compared to usual protocols without endogenous control (Zhang et al., 1996). In the present study, we propose a new PCR protocol - WbCr PCR - an improved version of the Zhang et al. (1996) method, by adding an endogenous control, which produces more consistent results. To validate the WbCr PCR assay, samples that did not amplify the actin target of the mosquito were excluded from the calculation of vector infection rate (IR). The IR was then calculated accurately and indicated higher prevalence in the study area (2.34% compared to 2.21%). Underestimation of the prevalence of infection may be critical for decision-making in an LF control program, since there is a threshold below which transmission is no longer sustainable. In addition to the use of an endogenous control, we should note the cost of the WbCr PCR duplex, which was US 1.84 per reaction, compared to US 4.11 estimated for RT-qPCR. This budget does not take into account the laboratory technology platform, which, in the latter system, would increase costs even further. It would thus be possible to optimize the

cost-benefit ratio for MX detection of Wb in the vector population, which is a determining factor in vector surveillance programs with limited resources, such as the NTD (Kelly-Hope et al., 2018). Other studies have concluded that the PCR loop is ideal for MX (DeBorja et al., 2018; Kasari et al., 2015) and suggested that the sensitivity and specificity are equivalent to the Ssp I PCR method for the detection of *W. bancrofti* (Takagi et al., 2011). However, WbCr PCR improved the sensitivity of detection of the parasite and mosquito DNA endogenous control in a single reaction, thereby providing a more reliable diagnosis.

After MDA, there is a reduction in microfilaremia in the human population and more mosquitoes will be less negative in a survey. Thus, without an endogenous control in MX-PCR, there is a risk of not detecting false-negative and the presence of Wb could be masked. This may consequently contribute to the persistence of LF. MX therefore requires increasing the number of mosquitoes processed in large areas and the use a sensitive and reliable tool for the monitoring of LF control. These actions may contribute to a better understanding of the relationship between human microfilaremia and the vector infection rate. This difficulty is noted in various studies in which the microfilaria rate in the human population is not associated with the Wb prevalence found in mosquitoes (Kochhar, 2007; Farid et al., 2007; Schwanitz et al., 2014). The MX available for Wb tests are usually unable to prevent false negative results, owing to several factors, including PCR inhibitors and poor quality DNA templates. Beckmann and Fallon (2012) found PCR inhibitors in more than 30% of the samples known to be infected with *Wuchereria*. Therefore, it is important for countries to use MX with endogenous control for the TAG before confirming that LF has been eliminated.

5. Conclusions

We recommend the application of the duplex WbCr PCR system as a tool for facilitating surveillance of filariasis, tracking the suppression of microfilariaemia and maintaining the interruption of transmission. The WbCr PCR system is a sensitive, efficient and reliable method for determining the active transmission of Wb. MX has a higher acceptance by both local communities and filariasis control programs personnel, because it is non-invasive compared to blood collection in the human population. It also removes reproductive females and their possible offspring from endemic areas, complementing vector control activities.

Funding

This study received support from Fundação de Amparo à Pesquisa e Tecnologia do Estado de Pernambuco, FAPES/PE [grant number APQ-0216-2.12/12]; Programa de Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde - PPSUS-REDE - 13/2012 [grant number APQ-2132-4.06/12]; and Fundação Oswaldo Cruz/Vice-Presidência de Pesquisa e Laboratório de Referência/Serviço de Referência para Controle de Calorização Venosa/Instituto Aggeu Magalhães-PE (FIOCRUZ/VPRQ/SRCCV/10M-PE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES/ Brasil Sem Miséria - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde.

Table 5
Comparative infection rate in molecular monitoring of LF in (f)hds.

PCR	No. Pools (mosquitoes)	Pool size mean (range)	C _q - actin detection	Wb - Ssp I positive pools (%)	Wb DNA rates (MEP/L ¹ in C _q (CI)
Singleplex Wb	307 (306)	8.96 (3-12)	-	28 (23%)	2.21% (1.46-3.28)
Duplex WbCr	97 (179)	8.62 (3-12)	99	28 (27%)	2.34% (1.32-4.42)

^a Maximum likelihood estimates and 95% confidence intervals using Poissonize.

^b False-negative pools were excluded.

CRediT authorship contribution statement

Alexandra Lima de Albuquerque: Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision. Tatiana Azevedo de Araujo: Data curation, Writing - original draft, Formal analysis, Validation, Investigation. Danielle Cristina Yamêdo Varjal de Melo: Investigation. Marcelo Henrique Santos Paula: Visualization, Writing - review & editing. Fábio Lopes do Melo: Validation, Resources, Writing - review & editing. Cláudia Maria Fontes de Oliveira: Project administration, Resources, Writing - review & editing, Funding acquisition. Constância Flávia Junqueira Ayres: Conceptualization, Resources, Funding acquisition.

Acknowledgments

The authors wish to thank the IAM-PROJET institution team for technical support and the field teams from the Municipality of Olinda for *Cy. quitapifanina* sampling.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.agp.2020.107918>.

References

Almeida, A., Sakahara, K., Nakamura, H., Takahashi, K., Sano, S., 1994. Identification of the lower respiratory tract with deoxyribonucleic acid (DNA) base substitution as a marker molecule of poliovirus strain variation (1950–1960s). *J. Hygiene Soc.* 113, 367–372.

Alford, S.A., Jensen, L.J., Eastman, S., 2002. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major indicator of dengue fever. *J. Clin. Microbiol.* 40, 205–208.

Alford, S.A., Eastman, S., 2003. Prevalence and characterization of IgG antibody responses to blood with *J. Clin. Microbiol.* 41, 430–433.

Assis, L.R., Ribeiro, K. de (Dantas, L.M., Ayres, C.F., 2013. Susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) populations to the chemical insecticide pyrethrin in Pernambuco, Brazil. *Front. Microbiol.* 4, 1107–1114.

Ayres, C.F., Santos, T.P., Melo-Ramos, W.R., Furtado, R.P., 2012. Genetic diversity in Brazilian populations of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Genet. Mol. Biol.* 37, 375–379.

Bachmann, J.P., Vallin, A.B., 2012. Serological response detection of *Salicicula* sp. juvenis (*Salicicula* sp.) in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes by the polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* 84, 1100–1104.

Bakker, M.J., 2007. Molecular serotyping of lymphatic filariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 891–894.

Barlow, S., Li, F., Sullivan, K.B., Williams, S.A., 1994. Detection of *Wuchereria bancrofti* larvae in pools of mosquitoes by the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 489–490.

Chen, X.L., Wang, M., Robinson, S.E., Sengco, W.E., Jackson, S.M., Hironaka, M., Parker, P.J., Gao, K., Guadalupe de Pineda, M., Miranda-Soto, L., Kofron, D., Lemons, J.J., Hwang, S.M., McIntyre, T.J., Swindle, S., Gibb, Horta, I., Hwang, S.J., Verbeke, J., Hwang, S., Kim, H.J., Samanidou, S., Schwanck, M.A., Ichikawachi, S., Saito, P.H., Sasaki, T., Yabu, S., Taira, M., Hsu, G.J., Wu, K.P., 2013. Transmission surveillance surveys (TSS) to define strategies for lymphatic filariasis mass drug administration in a transmission elimination. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 7, e2394.

de Sáez, S.B., Sáy, S., Neves, D.L., Antonino, D., Smith, C.A., Gallo, S., Ishida, M.J., Soares, R.P., Escamez, J.E., Silva, S.E., Barber, E.A., Buckton, H.J., 2011. An evidence for lymphatic filariasis transmission by dog bites offered by a field entomological vector surveillance in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85, 427–430.

DeSouza, M.A., de Saes, S.B., Apolinário, Y., Ghislati, R., Ishida, M., Shalun, M., Simioni, L., Soares, S., Silva, J.L., Ishida, Y., Barber, E.A., Barber, E.A., 2010. Molecular serotyping for pre-elimination surveillance of lymphatic filariasis in Tapes: an evidence for vector transmission. *Parasitol. Found.* 11, 52.

Dodd, W.A., Wang, S.Z., Wang, M., Sauer, S.M., Hironaka, M., Wu, G.J., 2007. A

critical aspect of molecular serotyping as a tool for tracking transmission of lymphatic filariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 935–939.

Harber, T., Liu, X., Linton-Waterski, W., Kaur, L.S., Hwang, S.M., Williams, S.A., 1999. Development of a quantitative, competitive polymerase chain reaction assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* DNA. *Parasitol.* 129, 179–183.

Jacobson, S., Sengco, W., Eastman, S., Jensen, L., 2002. Development of a method of molecular genetic typing using 16S rDNA and the blood samples by a polymerase chain reaction (PCR)-based method using an internal control DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67, 290–296.

Leal, R.P., Smith, C.A., Wang, L., Santos, T.M., Santos, M.R., Furtado, R.B., Ribeiro, K., Almeida, L.J., Barber, E., 1997. Importance and application of a polymerase chain reaction system for detection of *Wuchereria bancrofti* in *Culex quinquefasciatus* and human blood samples. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92, 83–86.

Monteiro, D.J., Gordon, J.B., Roberts, J.M., Lammont, P.J., Smith, T.J., 2002. PCR and sequence diversity as tools to monitor filarial infections from differing mass treatment. *Parasit.* 124, 2–11.

Rachak, G.R., Tan, J., Mwanuzi, A., Denny, T.R., 1993. Determining the prevalence of *Wuchereria bancrofti* infection in mosquito populations by polymerase chain reaction screening of pools of blood feeds. *J. Infect. Dis.* 167, 1414–1417.

Riley-Singer, L.A., Blument, H.J., MacIntyre, C.J., Walpole, D.B., 2015. Serological surveillance strategies to support the elimination of *Wuchereria bancrofti*. *Trends Parasitol.* 34, 579–581.

Santos, T.P., de Saes, S.B., Sengco, W., Smith, C.A., Wang, S.Z., Hironaka, M.J., Barber, E., Barber, E.A., Barber, E.A., Hwang, S., Buckton, H.J., Buckton, H.J., 2013. Assessing the potential of *Wuchereria bancrofti* in vector and human populations from urban communities in Tumbira, Tapes. *Parasitol. Found.* 14, 392.

Satoh, S., Nakano, T., Watanabe, S., Fukui, Y., Satoh, S., Hsu, G.J., Williams, S.A., 2010. A reverse transcription-PCR assay for detecting *Wuchereria bancrofti* larvae in mosquitoes. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 4, e2320.

Saty, S.P., Hsu, G.J., Wu, G.J., 2009. A review of the seroprevalence of lymphatic filarial parasites. *J. Parasit.* 95, 9–12.

Schwanck, M.A., Sengco, W., Smith, C., Santos, M., Williams, S.A., Ishida, M.J., Lammont, P.J., Tan, K.C., 2003. Molecular serotyping using seroprevalence to map lymphatic filariasis after mass drug administration in American Samoa. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 7, e2397.

Silva, M., Santos, T.P., Barallobrron, L.C., Furtado, R.B., de Sáez, S.B., Soares, S., Wu, G.J., Garcia-Ramos, J.E., Santos-Junior, S., Simioni, L.J., 2019. Molecular genetic diversity and seroprevalence analysis of *Culex quinquefasciatus* in a dengue endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 101, 225–231.

Tillett, D., Ish, M., Kaur, S., Vaidyanathan, T.C., Srinivasan, M.G., Sauer, S., 2011. Development of loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Wuchereria bancrofti* DNA in human blood and vector mosquitoes. *Parasitol.* 141, 892–897.

Verbeke, J., Hironaka, M., Robinson, M., 2010. Lymphatic filariasis and autochthonous. *Lancet* 376, 1170–1180.

Wang, S., Hsu, G.J., Wang, S.P., 2006. RT-PCR assay for the detection of sensitive L3/3 larvae of lymphatic filarial parasite, *Wuchereria bancrofti*, in vector mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J. Vector Borne Dis.* 19, 207–210.

Wang, S., Robinson, M., Hsu, G.J., Zambalipora, P., 2012. Use of a simple DNA serotyping method for high throughput detection of larval genetic *Wuchereria bancrofti* in the vector mosquitoes. *Parasitol.* 141, 2478–2484.

WHO, 2013. Progress Report 2002–2009 and Strategic Plan 2010–2020 of the Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs201303/en/>.

WHO, 2012. Transmission surveillance surveys in the global programme to eliminate lymphatic filariasis (WG2) progress document. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 47, 978–982.

WHO, 2011. Lymphatic Filariasis: a Handbook of Practical Serology for Global Lymphatic Filariasis Elimination Programme. World Health Organization, Geneva.

WHO, 2010. Lymphatic Filariasis, Fact Sheet. Department of Neglected Diseases WHO, Geneva, pp. 8.

Williams, S.A., Lamy, S.J., Roberts, C.A., Buckton, L.J., Barber, E.A., Parker, P., Simioni, L., DeSilva, H., Hsu, G.J., Vuolo, L., Lammont, P.J., Ishida, C., Sauer, S.M., Denny, T.R., 2002. Development and standardisation of a rapid, PCR based method for the detection of *Wuchereria bancrofti* in mosquitoes: the serotyping detection prevalence of *Wuchereria bancrofti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66 (Suppl. 5), 943–946.

Zambalipora, P., Simioni, L., Ghislati, R., Gallo, A., Wang, S., Robinson, S., Apolinário, A., Santos, T., Wu, C., Sengco, W., Cavallini, L., Hsu, G.J., 2014. Detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in pooled human and vector samples using polymerase chain reaction based systems. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 978–983.

Zhang, M., McCarthy, J., Roberts, L., Linton-Waterski, M., Chantono, S., Santos, T.P., Santos, S.A., Williams, S.A., 1999. A polymerase chain reaction assay for detection of the parasite *Wuchereria bancrofti* in human blood samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 307–309.

APÊNDICE B – Artigo publicado em formato de livro

DETECÇÃO DE *Wuchereria bancrofti* POR XENOMONITORAMENTO MOLECULAR EM BAIRRO DO RECIFE

Tatiane Alexandre de Araújo

Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães,
Departamento de Entomologia, Recife-PE

Alessandra Lima de Albuquerque

Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães,
Departamento de Entomologia, Recife-PE

Danielle Cristina Tenório Varjal Melo

Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães,
Departamento de Entomologia, Recife-PE

Edeneide Maria Xavier

Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães,
Departamento de Entomologia, Recife-PE

Cláudia Maria Fontes de Oliveira

Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães,
Departamento de Entomologia, Recife-PE

RESUMO: A filariose linfática (FL) é uma infecção parasitária causada principalmente por *Wuchereria bancrofti*, um verme transmitido nas Américas pelo mosquito *Culex quinquefasciatus*. No Brasil, a distribuição da doença está restrita à Região Metropolitana do Recife (RMR) em Pernambuco, onde o tratamento coletivo (TC) da população humana foi realizado na maioria dos focos endêmicos. O objetivo desse estudo foi realizar o xenomonitoramento molecular (XM) para *W. bancrofti* em mosquitos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), método utilizado para detectar indiretamente se o parasita ainda está presente na população

humana. O estudo foi realizado com fêmeas de *C. quinquefasciatus* potencialmente infectadas, grávidas ou ingurgitadas. Então, o DNA foi extraído dos pools de mosquitos, em seguida a identificação molecular foi feita por PCR e a taxa de infecção vetorial foi determinada pelo modelo estatístico *Poolscreen*. Portanto, foram analisadas 2.347 fêmeas de *C. quinquefasciatus* coletadas em áreas endêmicas que finalizaram o TC e nenhuma infecção foi encontrada (0%). No entanto, quando foram analisadas apenas 813 fêmeas de mosquito coletadas em uma área não tratada do bairro de Nova Descoberta (Recife/PE), uma taxa de infecção de 0,08% foi detectada. Nossos resultados revelam que não há evidências de transmissão ativa de microfilárias nas áreas tratadas da RMR, diferente daquelas não tratadas, nas quais há necessidade de vigilância para subsidiar o programa nacional. Sendo assim, o XM, revela-se um importante indicador da circulação de *W. bancrofti* em áreas sob investigação de transmissão, em razão de sua elevada sensibilidade para detectar o verme no mosquito vetor.

PALAVRAS-CHAVE: Filariose linfática; Infecção vetorial; *Wuchereria bancrofti*.

Wuchereria bancrofti DETECTION BY MOLECULAR XENOMONITORING IN

NEIGHBORHOUSE OF RECIFE

ABSTRACT: Lymphatic filariasis (LF) is a parasitic infection mainly caused by *Wuchereria bancrofti*, a worm transmitted in the Americas by the *Culex quinquefasciatus* mosquito. In Brazil, the distribution of LF is restricted to Recife Metropolitan Region (RMR) in Pernambuco, where the mass drug administration (MDA) to human population was implemented in most endemic foci. The aim of this study was to perform the molecular xenomonitoring (MX) for *W. bancrofti* in mosquitoes by polymerase chain reaction (PCR), a method to indirectly detect whether the parasites is still present in the human population. The study was conducted on potentially infected *C. quinquefasciatus* females, gravid or engorged. Then, DNA was extracted from pooled mosquitoes, and the molecular identification was done by PCR, and the vector infection rate was measured by Pool screen method. Therefore, a total of 2,347 *C. quinquefasciatus* females collected from endemic areas in which the MDA was completed were analyzed and no infection was found (0%). However, when were analyzed only 813 female mosquitoes from an untreated area, Nova Descoberta neighborhood (Recife/PE), an infection rate of 0.08% were detected. Our results reveal that there is no evidence of active transmission of microfilariae in the RMR-treated areas, unlike untreated areas where surveillance is needed to subsidize the national program. Thus, MX is an important indicator of *W. bancrofti* distribution in areas under investigation of transmission, due to its high sensitivity of detection of the worm in the mosquito vector.

KEYWORDS: Lymphatic filariasis; Vector infection; *Wuchereria bancrofti*.

1 | INTRODUÇÃO

A filariose linfática (FL) dentre as filarioses que afetam o ser humano é a mais importante, devido a magnitude de pessoas mundialmente atingidas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), um total 886 milhões de pessoas em 52 países, residem em áreas de riscos de contrair a doença (WHO, 2019). A FL é causada por vermes nematoides das espécies *Wuchereria bancrofti*, *Brugia timori* e *B. Malayi*, transmitidos por várias espécies de mosquitos (WHO, 2019). Esta doença endêmica acomete, sobretudo, populações residentes em áreas desprovidas de infraestrutura urbana e com potenciais criadouros para mosquitos vetores (ALBUQUERQUE, 1993; MOTT, 1990).

No continente americano, a FL é causada pelo verme *W. bancrofti*, responsável pela maioria dos casos no mundo, inclusive no Brasil, onde o *Culex quinquefasciatus* é o *culicídeo transmissor*, sendo considerado o mais eficiente dentre outros mosquitos. Além de ser a espécie mais abundantemente encontrada no globo e extremamente adaptada às condições climáticas das regiões tropicais e subtropicais (BRASIL, 2009).

No contexto histórico da FL no Brasil, inquéritos epidemiológicos realizados na década de 1950 identificaram portadores de microfilárias (larvas imaturas do

verme), além de acompanhar os níveis de endemicidade no país (FRANCO E SILVA-LIMA, 1967). Das 852 localidades investigadas, onze apresentaram ocorrência de transmissão ativa, porém, Belém e Recife foram consideradas umas das cidades de maior importância médico-sanitária (RACHOU, 1957). Isso devido aos elevados índices de microfilaremia por *W. bancrofti* obtidos em inquéritos anteriores, 10,8 % em Belém (CAUSEY et al., 1945); e 9,2% em Recife (AZEVEDO; DOBIN, 1952).

Os altos índices de microfilaremia registrados em anos anteriores no Recife resultaram em uma grande demanda de pacientes com formas clínicas da doença, o que levou ao surgimento de um Programa de Filariose em Recife em 1985 pela FIOCRUZ/PE. Desde então, entre os anos de 1989 a 1999, foi realizada uma investigação epidemiológica em várias áreas do Recife, cuja prevalência média encontrada foi de 6,5% (MACIEL et al., 1996). Enquanto que, os inquéritos epidemiológicos também realizados em Olinda, cidade da Região Metropolitana do Recife, revelaram índices de microfilaremia ainda maiores que os de Recife, 12,3% de prevalência (MACIEL et al., 1994). Então, nesse período foi estabelecido no Brasil 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 microfilaremia ou antigenemia). Um dos principais objetivos do PNEFL é interromper a transmissão da infecção filarial, a partir de dose única anual por um período estimado de 4 a 6 anos com apenas uma droga filaricida, a Dietilcarbamazina. Além de promover o alívio do sofrimento da deficiência provocada pela doença, através de melhores condições de higiene oferecidas à população nas áreas afetadas (CDC 1993; OTTESEN; RAMACHANDRAN, 1995; WHO, 2005; ROCHA et al., 2010).

A partir de 2002, uma nova estratégia para eliminar a FL foi implementada, o controle da densidade populacional de *C. quinquefasciatus*. Para tal, passou-se a tratar os criadouros do mosquito vetor com o biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e seu controle foi associado aos outros pilares do PNEFL. Com o avanço do programa, a interrupção da transmissão de *W. bancrofti* já ocorreu nos estados das Alagoas, Bahia, Pará, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Porém, a vigilância epidemiológica permanece em constante alerta especialmente nos focos ainda considerados de transmissão ativa no estado de Pernambuco, que possivelmente como resultado das ações de tratamento e vigilância implementadas devem estar em vias de serem eliminados (BRASIL, 2017; FONTES, et al., 2012).

Para identificar se as infecções por *W. bancrofti* foram reduzidas e determinar a suspensão do TC, a OMS recomenda um inquérito de avaliação da transmissão (TAS - *transmission assesment survey*). O TAS é empregado como uma ferramenta de vigilância para conhecer os níveis de infecção na população humana e assim, guiar o reconhecimento oficial de cumprimento do objetivo de eliminação da filariose em programas nacionais (WHO, 2015). O xenomonitoramento molecular (XM), mostra-se como uma ferramenta complementar para fornecer o diagnóstico de infecção nos insetos vetores. Por ser um método que não necessita de coleta sanguínea é

considerado não invasivo e pode ser empregado em áreas onde ocorreu o TC, pois fornece dados sobre a infecção natural nos mosquitos vetores, sendo um indicador da transmissão vetorial de *W. bancrofti* na área sob investigação (WEIL; RAMZY, 2006). O emprego do XM como um complemento para o TAS é um elemento para potencializar o acompanhamento das ações de eliminação da filariose linfática no PNEFL. Portanto, o estudo se propôs a avaliar a transmissão da *W. bancrofti* em focos endêmicos na Região Metropolitana do Recife através do diagnóstico molecular de infecção vetorial.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho é um estudo transversal para estimar a taxa de infecção vetorial por *W. bancrofti* em áreas com tratamento coletivo nos municípios pernambucanos de Olinda e Jaboatão dos Guararapes; e em uma área de Recife sem o tratamento coletivo situada no bairro de Nova Descoberta. A população de estudo foi constituída por fêmeas do mosquito *C. quinquefasciatus* potencialmente infectadas, grávidas ou ingurgitadas que foram coletadas nas áreas estudadas.

Para estabelecer os pontos de coleta de mosquitos, o Núcleo de Estatística e Geoprocessamento (NEG) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), através da plataforma QGIS, georreferenciou os endereços dos pacientes com microfilaremia de focos endêmicos (RMR-PE). O geoprocessamento foi feito com base no histórico da enfermidade através de inquéritos hemoscópicos, fornecidos pelas Secretarias de Saúde, para observar a distribuição espacial de pacientes com microfilaremia antes do TC e identificar áreas de maior risco. Em um mapa, foi possível observar áreas com vários endereços próximos formando grandes concentrações de focos endêmicos. Após plotar a área de risco obtida a partir da estimativa da análise de Kernel, foi traçado um raio de 100 m ao redor das áreas que reuniam um maior número de pacientes com microfilaremia e que receberam TC. Dentro de cada raio de 100 m foram feitos quadrantes de 50x50m para indicar os pontos para as coletas de mosquitos, a partir do traçado dos quadrantes os mapas foram disponibilizados para os gestores de cada área estudada (Figura 01).



Figura 1. Mapas de localidades situadas nos municípios de Jaboatão dos Guararapes (A) e Olinda-PE (B) nos quais a população humana recebeu o tratamento coletivo, mostrando os quadrantes, onde estão marcados os pontos de coleta de mosquitos, com base na concentração de endereços de pessoas que apresentaram microfilaremia antes do tratamento coletivo.

Para obtenção das amostras de mosquitos foi realizado um treinamento com os técnicos, de cada município (Figura 02) sobre práticas de metodologia de coleta, manuseio correto do aspirador entomológico nos cômodos visitados, a importância do acondicionamento das amostras, para isso receberam também o treinamento sobre identificação, separação, sexagem e acondicionamento adequado de fêmeas de *C. quinquefasciatus* até que estes fossem encaminhados ao laboratório de Controle de Vetores do Departamento de Entomologia no Instituto Aggeu Magalhães (IAM).



Figura 2. Treinamentos teórico-prático de equipes de Agentes de Saúde em coleta e acondicionamento de mosquitos.

No Laboratório de Controle de Vetores as amostras foram armazenadas até a extração de DNA de 536 grupos (*pools*) de mosquitos (3.198 fêmeas), seguindo o protocolo de Ayres et al. (2002). Em seguida, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (em inglês, Polymerase Chain Reaction - PCR) em todos os 536 *pools*

e calculado a taxa de infecção vetorial de *C. quinquefasciatus* por *W. bancrofti* pelo modelo estatístico *Poolscreen*, ao nível de confiança de 95%.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 2.347 fêmeas de *C. quinquefasciatus* coletadas em áreas endêmicas que finalizaram o tratamento coletivo. Para essa amostra de mosquitos a taxa de infecção vetorial foi nula (0%). No entanto, em uma outra amostragem com apenas 813 fêmeas do mosquito coletadas em uma área não tratada, no bairro de Nova Descoberta (Recife/PE), o XM foi capaz de detectar a presença de DNA do verme com uma taxa de infecção vetorial de 0,08% (Tabela 1).

Nesse estudo, utilizamos o XM, que consistiu no uso de fêmeas ingurgitadas ou grávidas de *C. quinquefasciatus* para a possibilidade de obter a presença de *W. bancrofti* após a alimentação sanguínea do vetor. O surgimento de novas ferramentas para sinalizar a infecção por *W. bancrofti* na população humana, como a busca por evidências da presença do DNA filarial em insetos vetores, apresentam-se como um diagnóstico alternativo e sensível. 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.

RMR/PE	Período de Coleta	Fêmeas Analisadas	Pool Analisados	Taxa de infecção Vetorial (0%)
Sítio Novo	2015	614	123	0
Varadouro	2016	285	30	0
Nova Descoberta	2017	851	131	0,08
Floriano	2017	793	110	0
Cavaleiro	2018	655	142	0
Total	-	3.198	536	-

Tabela 1. Diagnóstico de infecção vetorial por *Wuchereria bancrofti* em amostras de *Culex quinquefasciatus* coletadas na RMR/PE.

A detecção de amostras de mosquitos negativas por XM oriundas das áreas endêmicas que receberam o TC da RMR-PE, demonstram ausência de transmissibilidade do verme indicando interrupção do ciclo de transmissão. Semelhante ao que foi encontrado em Moustafa et al. (2017) que através do XM empregado em duas áreas endêmicas do Egito auxiliou o TAS naquele país, pois não encontrou *W. bancrofti* em fêmeas do gênero *Culex*. Assim como, Irish et al. (2018) que verificaram a ausência da transmissão do verme filarial em Bangladesh após rodadas de tratamento em massa, e esse mesmo achado foi observado em

Togo, um dos primeiros países a implementar o programa nacional (DORKENOO et al. 2018).

Em contrapartida, uma área que não recebeu o TC na RMR, apesar de geograficamente próxima a focos endêmicos tratados, teve uma taxa de infecção vetorial positiva. Nesse estudo, a área não tratada em Nova Descoberta, localizado no município de Recife, apresentou uma taxa de infecção 0,08%. Essa taxa sugere uma baixa circulação do verme. Assim como foi observado por Kouassi et al. (2015) em área focalmente não tratada na capital de Guiné, com resultados de taxas de infecção vetorial variando entre 0,31% e 1,8%.

Pelas recomendações da OMS para realizar o TC em determinada área é necessário que a prevalência na população humana esteja acima 1%, sendo assim, aquelas áreas que apresentam prevalência um pouco menor que 1% não receberá o tratamento e não são incluídas no programa de FL (KOUASSI et al., 2015). Um baixo nível de microfilaremia em mosquitos também foi relatado em Souza et al. (2018) que forneceu informações sobre a transmissão persistente de FL em três distritos de Gana.

A integração de várias ações para eliminar a FL, 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-TC; e intensificação do manejo de morbidade e prevenção de incapacidade, contribuirão para reduzir a microfilaremia em áreas endêmicas (BRADY, 2014). Além disso, o presente trabalho mostrou que o XM é uma ferramenta importante e foi útil para avaliar a eficiência das estratégias do PNEFL em áreas endêmicas e circunvizinhas, sendo um indicador de aferição de transmissão nas etapas do TAS. Nossos resultados indicam a importância do TAS incluir as áreas vizinhas àquelas que receberam o TC, por cumprirem os critérios de inclusão do programa. Visto que a positividade de infecção vetorial em áreas próximas, apesar de baixa, necessita de uma atenção especial para não vir a retardar o processo de eliminação da FL.

4 | CONCLUSÕES

Através do diagnóstico molecular de infecção vetorial foi possível identificar que o ciclo de transmissão da *Wuchereria bancrofti* permanece ativo no município de Recife/PE em uma área que não havia sido elencada para receber o tratamento. Sendo assim, o XM é uma ferramenta importante para avaliar a eficiência das estratégias do PNEFL para a certificação da interrupção do ciclo de transmissão da filariose e sobretudo mostrou-se sensível ao identificar o status atual da presença do parasita mesmo em localidades de baixa prevalência, qualidade de grande valia no processo de vigilância da FL.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. F. M. et al. **Filariose no Recife: indicador de pobreza e desigualdade social urbana**. Recife, 2013. Disponível em: <<http://dssbr.org/site/opinicoes/filariose-no-recife-indicador-de-pobreza-e-desigualdade-social-urbana/>>.

AZEVEDO, R., DOBBIN Jr. J. E., 1952. **Filariose (*Wuchereria bancrofti*) no grupo residencial do IAPB no bairro de Afogados (Recife)**. Publicações Avulsas do Instituto Aggeu Magalhães, Recife, v. 1, n.13, p.157-192, 1952.

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.

BRADY, M.; GLOBAL ALLIANCE TO ELIMINATE LYMPHATIC, F. **Seventh meeting of the Global Alliance to Eliminate Lymphatic Filariasis: reaching the vision by scaling up, scaling down, and reaching out**. Parasites & Vectors, London, v. 7, p. 46, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde: volume 3 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços**. – 1. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

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

BRADY, M.; GLOBAL ALLIANCE TO ELIMINATE LYMPHATIC, F. **Seventh meeting of the Global Alliance to Eliminate Lymphatic Filariasis: reaching the vision by scaling up, scaling down, and reaching out**. Parasites & Vectors, London, v. 7, p. 46, 2014.

CAUSEY O. R., et al. **Studies on the incidence and transmission of filaria *Wuchereria bancrofti* in Belém, Brazil**. American Journal of Hygiene, Baltimore, v. 41, n. 2, p. 143-149, 1945.

CDC. **Recommendations of the International Task Force for disease eradication**. Morbidity and Mortality Weekly Report. n. 42, p 1-38, 1993.

DORKENOO, M. A. et al. **Molecular xenomonitoring for post-validation surveillance of lymphatic filariasis in Togo: no evidence for active transmission**. Parasites & Vectors, London, v. 11, n. 1, p. 52, 2018.

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>>.

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

FRANCO, O. & SILVA-LIMA, D. M. **Alguns aspectos das atividades contra a filariose bancroftiana no Brasil**. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais, Rio de Janeiro, v. 19, p. 73-89, 1967.

IRISH, S. R. et al. **Molecular xenomonitoring for *Wuchereria bancrofti* in *Culex quinquefasciatus* in two districts in Bangladesh supports transmission assessment survey findings**. PLOS Neglected Tropical Diseases. v. 12, n. 7, e0008574, 2018.

KOUASSI, B. L. et al. **Assessing the presence of *Wuchereria bancrofti* in vector and human**

- populations from urban communities in Conakry, Guinea. *Parasites & Vectors* v.8, n.1, p. 492, 2015.
- 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.
- MACIEL, A.; ROCHA, A.; CARVALHO, A. B.; SOUZA, W. & FURTADO, A. F. **Epidemiology of *Wuchereria bancrofti* in Recife, Northeast of Brazil.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, n. 91, p. 449-456, 1996.
- MOUSTAFA, M. A. **Molecular Xenomonitoring (MX) and transmission assessment survey (TAS) of lymphatic filariasis elimination in two villages, Menoufya Governorate, Egypt.** *European Society of Clinical Microbiology*, Berlin: Springer, v. 36, n. 7, p. 1143-1150, 2017.
- MOTT, K. E. et al. **Parasitic diseases and urban development.** *Bulletin of the World Health Organization*. Geneva: World Health Organization, 1990.
- OTTESEN, E. A.; RAMACHANDRAN, C. P. **Lymphatic filariasis, infection and disease: control strategies.** *Parasitology Today*. v.11, n.4, p.129-131, 1995.
- RACHOU, R. G. **Considerações sobre o combate à filarose bancroftiana no Brasil.** *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 9, p. 527-536, 1957.
- ROCHA, A., MARCODES, M., NUNES, J.R.V., MIRANDA, T., VEIGA, J., ARAÚJO, P., TENÓRIO, W., SANTOS, A.A. **Programa de controle e eliminação da filarose linfática: Uma parceria da Secretária de Saúde de Olinda/PE, Brasil, com o Serviço de Referência Nacional em Filariose.** *Revista de Patologia Tropical* v.39, n. 3, p. 233-249, 2010.
- ROCHA, E. M. M.; FONTES, G. **Diagnóstico da filarose linfática bancroftiana.** *Revista de Patologia Tropical*, Goiás, v. 29, n. 2, p. 161-173, 2000.
- SOUZA, D. K. de et al. **Low Microfilaræmia Levels in Three Districts in Coastal Ghana with at Least 16 Years of Mass Drug Administration and Persistent Transmission of Lymphatic Filariasis.** *Tropical Medicine and Infectious Disease*. v. 3, n. 4, p. 105, 2018.
- WEIL, G. J.; RAMZY, R. M. **Diagnostic tools for filariasis elimination programs.** *Trends in Parasitology*, Oxford, v. 23, n.2, p.78-82, 2006.
- WHO. **Lymphatic filariasis. Status of Mass Drug Administration: 2019.** Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/lymphatic-filariasis>> 2019.
- WHO. **Treinamento em monitoramento e avaliação epidemiológica da intervenção com tratamentos coletivos para eliminação da filarose linfática: guia do participante - TAS.** Organização Mundial de Saúde, Genebra, 2015.
- WHO. **Monitoring and epidemiological assessment of the programme to eliminate lymphatic filariasis at implementation unit level.** WHO/CDS/CPE/CEE/2005.50. 2005.
- 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.