



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE- PGCS

**USO DO XENOMONITORAMENTO COMO FERRAMENTA
PARA AVALIAÇÃO DA INTERRUPÇÃO DA TRANSMISSÃO
DA FILARIOSE LINFÁTICA NAS CIDADES DE BELÉM (PA)
E MACEIÓ (AL).**

Dissertação de Mestrado

Wendell Alexandre Pinheiro de Almeida

Maceió-AL
Junho de 2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE- PGCS

USO DO XENOMONITORAMENTO COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DA INTERRUPÇÃO DA TRANSMISSÃO DA FILARIOSE LINFÁTICA NAS CIDADES DE BELÉM (PA) E MACEIÓ (AL).

Wendell Alexandre Pinheiro de Almeida

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade Federal de Alagoas,
como pré-requisito para a obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliana Maria Maurício da Rocha

Maceió-AL
Junho de 2008

A447

ALMEIDA, Wendell Alexandre Pinheiro de

Uso do xenomonitoramento como ferramenta para avaliação da interrupção da transmissão da filariose linfática nas cidades de Belém (PA) e Maceió (AL).
[manuscrito] / Wendell Alexandre Pinheiro de Almeida. - 2008.

71f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alagoas. Inst. De Ciências Biológicas e de Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Orientação: Prof^a Dra. Eliana Maria Maurício da Rocha

1. *Wuchereria bancrofti*. 2. Xenomonitoramento –filariose I. Título II. Autor

CDU 616.4

“Homens fracos acreditam na sorte. Homens fortes acreditam em causa e efeito”

Ralph Waldo Emerson

*Dedico essa vitória a minha
esposa Darni e minha filha
Ingrid, que me ensinaram a
amar plenamente.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aécio e Mabel, que moldaram minha índole e caráter, que me fizeram quem sou hoje.

As minhas irmãs Kilma, Karla e Katherine, por sempre estarem presentes nos momentos de dificuldades.

A Ivete Chaves Rocha, pessoa que de tanto me “perseguir” no laboratório, acabou me levando para sua família. Mulher de garra, competência e honestidade sem igual.

In memoriam

A Profª Drª. Eliana Maria Maurício da Rocha, pela orientação e por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, pela excelente convivência por todos estes anos e principalmente por ter me aceito como filho científico.

Ao Profº Dr. Gilberto Fontes, pelas orientações, ensinamentos e amizade. Também pelas broncas e puxões de orelha que só hoje sou maduro o suficiente para compreender, agradecer e tomar como exemplo para o resto da vida.

Ao Profº Dr. Luís Antônio, que apesar da sua falta de tempo se mostrou paciente e acessível, passando ensinamentos indispensáveis.

Aos professores que lecionaram disciplinas no mestrado, e de forma direta ou indireta tiveram participação em meu crescimento.

Agradecimento especial a Profª Iracilda Lima, pelos conhecimentos passados com tamanha paciência e delicadeza.

Aos professores que fizeram parte da banca de qualificação.

A FCBS nas pessoas do diretor Mauro Guilherme de Barros Quirino Martins e vice-diretora Waléria Dantas Pereira, por abrirem as portas da instituição de forma gentil e agradável e me oferecerem condições de afastamento quando necessário.

Aos amigos de longa data Cláudia Calheiros, Elza Duarte e Márcio Vila Nova. Pela amizade, incentivo e sobrecarga de trabalho devido as minhas freqüentes ausências.

Aos amigos Guga e Manu, pelo incentivo e vários momentos que proporcionaram uma trégua ao cansaço e ao stress, tão presentes ao longo desta jornada.

Ao amigo Elizeu Libório, por suas palavras de incentivo e sua presença nos momentos de descontração.

Um agradecimento em especial ao amigo Rafael Vital dos Santos, por ter me acompanhado e muito ajudado durante este trabalho.

Ao meu amigo de trabalho e na vida Eurivan Ribeiro de Melo, que participou e ajudou de várias formas em minha formação.

A todos os ex, atuais e futuros LAPEVIANOS, minha segunda família durante 13 anos.

Aos colegas de mestrado: Ana Raquel, Anderson Brandão, André Bernadino, Iede, Fernando Wagner, Socorro Alécio, Paulo, Alane Cabral, Herbert Charles, Fabiano “Timbó”, Acácia e Andréa Aragão. Pessoas que ao meu lado foram fortes, corajosas e determinadas. Um sempre ajudando ao outro.

Ao amigo Benízio filho pelos esclarecimentos e concorrência no mestrado por um título não muito desejado.

Aos mestrandos das turmas posteriores nas quais fiz belas amizades.

A todos os outros colegas, amigos e docentes que não foram citados aqui, mais sempre estarão em minha mente e coração.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	IV
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1 Histórico.....	12
2.2 O Parasito.....	13
2.3 Ciclo Evolutivo da <i>Wuchereria bancrofti</i>	15
2.4 Vetores da Bancroftose e Fatores de Interferência na Transmissão da Doença.....	16
2.5 Distribuição Geográfica da Filariose Linfática.....	17
2.6 Bancroftose no Brasil.....	18
2.7 Bancroftose em Maceió – Alagoas.....	20
2.8 Bancroftose em Belém – Pará.....	21
2.9 Diagnóstico da Infecção Vetorial.....	21
2.10 Pesquisa de DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	22
2.10.1 Princípios e Aplicações da Técnica.....	22
2.11 Diagnóstico Molecular da Infecção pela <i>Wuchereria bancrofti</i>	24
2.12 Diagnóstico Molecular da Infecção Vetorial	25
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1. Área Estudada e Coleta de Insetos: Maceió – Alagoas.....	29
4.2. Área Estudada e Coleta de Insetos: Belém – Pará.....	32
4.3. Classificação Entomológica.....	34
4.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	34
4.4.1. Padronização e Otimização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	34
4.4.2. Ensaio de Especificidade e Sensibilidade da PCR.....	36
4.4.3. Otimização do Tamanho do Lote (<i>Pool</i>) de Mosquitos.....	36
4.4.4. Visualização do Produto Amplificado	36

5. RESULTADOS.....	38
5.1. Xenomonitoramento dos Mosquitos Capturados em Maceió-AL.....	43
5.2. Xenomonitoramento dos Mosquitos Capturados em Belém-PA.....	44
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÕES	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
APÊNDICE.....	68

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µL	Microlitro
DEC	Citrato de dietilcarbamazina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNERu	Departamento Nacional de Endemias Rurais
dNTP	Deoxinucleotídeos
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GPELF	Programa Global para Eliminação da Filariose Linfática
HCl	Ácido clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICT	Imunocromatografia
IMPAR	Instituto Municipal de Planejamento e Ação Regional
KCl	Cloreto de Potássio
L₁	Larva de primeiro estágio
L₂	Larva de segundo estágio
L₃	Larva de terceiro estágio
MDA	Tratamento em massa
mf	Microfilária
mg	miligrama
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
MPM	Marcador de peso molecular
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
PAHO	Organização Pan Americana de Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pg	Picograma
PM	Peso molecular
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SMS	Secretaria Municipal de Saúde
SUCAM	Superintendência de Campanhas de Saúde Pública
TBE	Tris/Borato/EDTA
TE	Tris/EDTA
Tris	Hidroximetil aminometano
WHA	Assembléia Mundial de Saúde
WHO	Organização Mundial de Saúde

RESUMO

A filariose linfática é uma infecção causada nas Américas por helmintos da espécie *Wuchereria bancrofti*. O parasito infecta exclusivamente seres humanos, que são as únicas fontes da infecção para os mosquitos vetores da espécie *Culex quinquefasciatus*. No Brasil um programa nacional para eliminação da bancroftose foi implementado, e atualmente a distribuição da parasitose está praticamente restrita à Recife e sua região metropolitana, em Pernambuco. Em Maceió-Alagoas, e Belém-Pará, a transmissão está em vias de ser considerada eliminada. Como parte da avaliação da eficácia das estratégias de controle adotadas nestas duas cidades, utilizou-se o xenomonitoramento molecular a fim de verificar a interrupção da transmissão da *Wuchereria*. O xenomonitoramento é um método baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR), para detecção de *W. bancrofti* em mosquitos. Esta técnica consiste na captura e exame pela PCR de fêmeas de mosquitos recém ingurgitados provenientes de uma área endêmica. O xenomonitoramento é um marcador sensível e útil para estimar os níveis de infecção natural em mosquitos. É igualmente uma ferramenta que permite avaliar indiretamente a prevalência da infecção humana, porque revela a presença de microfilárias recém ingeridas pelos insetos. Mosquitos capturados, preferencialmente através de xenomonitoramento, em Maceió e em Belém, duas áreas sob controle no Brasil, foram processados pela PCR para detecção da infecção. Um método simples e rápido para extração do DNA foi padronizado. A identificação do parasito foi baseada na amplificação de um fragmento gênico repetitivo de *W. bancrofti SspI*, utilizando os iniciadores espécie-específicos NV1 e NV2. Foram submetidos a análise pela PCR 2.583 mosquitos provenientes dos três bairros endêmicos para filariose linfática na cidade de Maceió, e 59.126 mosquitos, provenientes de todos os oito distritos administrativos da cidade de Belém. Não foi encontrado DNA de *W. bancrofti* em nenhum dos mosquitos investigados. A infecção natural negativa dos insetos sugere a interrupção da transmissão de *W. bancrofti* nas áreas trabalhadas. É objetivo da Organização Mundial de Saúde (OMS) a eliminação da filariose linfática como problema de saúde pública no mundo até 2020. O Brasil está entre os países que se juntaram aos esforços da OMS. Baseado nos dados obtidos, Belém e Maceió atingirão essa meta antes da data programada. No entanto, para manter esta tendência medidas de vigilância devem ser conduzidas a fim de detectar e tratar precocemente pacientes, para evitar o risco de ressurgimento de focos, aparentemente já controlados.

Palavras-chaves: *Culex quinquefasciatus*, PCR, Maceió, Belém, *Wuchereria bancrofti*.

ABSTRACT

Lymphatic filariasis is an infection caused in the Americas by the helminth species *Wuchereria bancrofti*. This parasite exclusively infects humans, the only source of infection for the mosquito vector *Culex quinquefasciatus*. In Brazil a national programme to eliminate Bancroftian filariasis was implemented and currently distribution of the infection is almost restricted to Recife and its Greater Metropolitan area, in Pernambuco State. In Maceió-Alagoas, and Belém-Pará, lymphatic filariasis transmission are about to be eliminated. As part of the assessment of the effectiveness of control strategies for filariasis in these two cities, molecular xenomonitoring was conducted in order to verify interruption of *Wuchereria* transmission. Xenomonitoring is polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of *W. bancrofti* in mosquitoes. This technique detects parasite DNA by PCR in blood engorged female mosquitoes collected in an endemic area. Xenomonitoring is a useful and sensitive marker to estimate natural infection with filarial larvae in the vector mosquitoes. It is also a tool for assessing indirectly filariasis prevalence in the human population because it reveals blood microfilariae recently ingested by the insect. Field collected mosquitoes, mainly through the xenomonitoring, from Maceió and Belém, two areas under the filariasis control programme in Brazil, were processed by PCR assay for the detection of infection. A simple and rapid DNA extraction method was standardized. Identification of the parasite was based on amplification of the *SspI* repeat DNA sequence to *W. bancrofti*, using species specific NV1 and NV2 primers. A total of 2,583 mosquitoes from the three city sectors endemic for lymphatic filariasis in Maceió, and 59,583 from the eight administrative districts of Belém, were submitted to PCR analysis. No *W. bancrofti*-infected mosquitoes were found, suggesting an interruption of filariasis transmission in the studied areas. The objective of the World Health Organization (WHO) is to eliminate filariasis as a public health problem in the world by the year 2020. Brazil is among the countries that joined the WHO global efforts. According to the present data, Belém and Maceió will achieve that goal antecipating WHO target date for the global elimination. Nevertheless, to maintain this trend, surveillance measures must be conducted in order to detect and promptly treat patients, to prevent the risk of resurgence of foci apparently under control.

Palavras-chaves: *Culex quinquefasciatus*, PCR, Maceió, Belém, *Wuchereria bancrofti*

1. INTRODUÇÃO

A *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877) é um parasito nematódeo da família Onchocercidae, transmitido por mosquitos fêmeas da espécie *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823). Os parasitos, ao serem ingeridos na forma de microfilárias durante o repasto sangüíneo no ser humano, passam por três fases de desenvolvimento até alcançar o estágio infectante (larva L₃).

O parasito infecta exclusivamente seres humanos, que são as únicas fontes da infecção para os mosquitos vetores. (HAWKING *et al.*, 1981).

Uma característica da *W. bancrofti*, na maioria das regiões onde é endêmica, inclusive em Maceió, é que as microfilárias são encontradas durante o dia nos capilares profundos e à noite no sangue periférico, a este fenômeno dá-se a denominação de periodicidade noturna (HAWKING *et al.*, 1981; FONTES *et al.*, 2000). A periodicidade das microfilárias no sangue periférico do hospedeiro influencia diretamente a dinâmica da transmissão, pois, o período do pico da microfilaremia coincide com o pico de atividade hematofágica do principal vetor em uma determinada área geográfica (PIESSENS & PARTONO, 1980).

Desde que a Resolução 50.29 da Organização Mundial de Saúde, publicada em 1997, estabeleceu para o ano 2020: “A eliminação da filariose linfática como um problema de saúde pública”, em vários locais do mundo os órgãos de saúde têm se empenhado para que esta meta seja atingida no prazo previsto (WHA, 1997). No Brasil as duas cidades mais próximas deste objetivo são Belém no estado do Pará e Maceió no estado de Alagoas, que nos últimos anos vêm apresentando índices decrescentes de prevalência de portadores de microfilárias. Em Belém, onde inquéritos hemoscópicos têm sido feitos com amostras de moradores de todos os 71 bairros da cidade, nenhum caso novo tem sido detectado desde 1999 (FONTES *et al.*, 2005a). Em Maceió, como parte do Programa Global para Eliminação da Filariose Linfática (GPELF), um Programa de eliminação da bancroftose foi posto em prática a partir de 1999 em uma ação conjunta da Secretaria Municipal de Saúde, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Pan Americana de Saúde (OPAS). Desde então, a prevalência de microfilarêmicos no foco da endemia na cidade que em 1995 era igual a 5,8%, vem sendo reduzida significativamente, caindo para 0,74% em 1999, 0,54% em 2000, 0,49% em 2001, 0,10% em 2002, e 0,0% em 2005 (FONTES *et al.*, 2005b).

Ferramentas vêm sendo desenvolvidas e testadas em campo, para que se possa verificar a eficácia das ações de controle na interrupção da transmissão nos focos da parasitose. A verificação da infecção vetorial juntamente com a busca ativa e tratamento de portadores da infecção, são os pilares fundamentais da vigilância epidemiológica das áreas

sob intervenção, permitindo a determinação do perfil endêmico da parasitose. Os resultados obtidos são de grande valia na adequação das estratégias de monitoramento e controle nos focos de bancroftose, principalmente aqueles de baixa endemicidade, como é o caso de Maceió, como também na delimitação das áreas de ocorrência da transmissão.

Trabalhos têm mostrado que a manutenção da endemia depende da ocorrência de altas taxas de infecção natural nos mosquitos (HAIRSTON & DEMEILLON, 1968; SOUTHGATE, 1984). No entanto, não existe uma estimativa que seja consenso entre os pesquisadores a respeito da quantidade de picadas de mosquitos infectados com larvas infectantes (L_3), para o aparecimento de um novo caso humano com microfilaremia patente (WITT & OTTESEN, 2001). Em locais onde houve diminuição da densidade de vetores em potencial, através de métodos diretos de combate ao mosquito, como uso de inseticidas, ou indireto com melhoria do nível de saneamento ambiental, o risco de transmissão diminuiu, chegando a haver interrupção da transmissão (WEBBER & SOUTHGATE, 1981; CHERNIN, 1987; FONTES *et al.*, 2005a).

Os métodos tradicionais de detecção de larvas de *W. bancrofti* em mosquitos, baseados na dissecação individual dos insetos e identificação microscópica do parasito, são ainda hoje empregados e úteis para determinação dos índices de infecção natural dos vetores. No entanto, eles são laboriosos, cansativos, e consomem um tempo razoável para sua realização. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem-se mostrado como uma alternativa às técnicas convencionais de diagnóstico da infecção filarial não só em sangue, para diagnóstico da infecção em seres humanos, como também em mosquitos (DISSANAYAKE *et al.*, 1991; SIRIDEWA *et al.*, 1994; ZHONG *et al.*, 1996; NICOLAS *et al.*, 1996; FURTADO *et al.*, 1997).

Como parte da avaliação entomológica, tem-se recomendado o xenomonitoramento, que consiste na captura e exame pela PCR de mosquitos recém ingurgitados provenientes de uma área endêmica (CHADEE *et al.*, 2002; WILLIAMS *et al.*, 2002). O xenomonitoramento é um marcador sensível para estimar a endemicidade da filariose, além de fornecer dados sobre a infecção natural dos vetores, é um indicativo indireto da prevalência da infecção humana, uma vez que, verifica não apenas a presença de larvas do parasito em desenvolvimento, como também a presença de microfilárias recém ingeridas pelos vetores, conferindo subsídios para verificação da interrupção da transmissão (WHO, 2002a).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histórico

A filariose linfática humana ou bancroftose é uma doença séria e debilitante, causada por helmintos Nematoda das espécies *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877), *Brugia malayi* (Bucley & Edeson, 1950) e *B. timori* (Partono, 1977). Ambos os gêneros pertencem ao Filo Nematelminthes, Classe Nematoda e Família Onchocercidae. Também conhecida como elefantíase, devido a uma de suas manifestações na fase crônica, tem no *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) seu principal transmissor nas Américas.

Relatos de 600 a.C. indicam que a filariose linfática, já era conhecida pelos hindus e persas (ORIHIL, 1985). Segundo Laurence (1968), ela teria se originado na Polinésia e existem evidências de que foi introduzida mais tarde na China e outras regiões da Ásia, chegando em seguida ao continente Africano. Foi introduzida nas Américas, principalmente nas Antilhas e norte da América do Sul, através do tráfico de escravos provenientes da África (ORIHIL, 1985).

O primeiro a encontrar formas embrionárias da *W. bancrofti* em líquido de hidrocele de um paciente procedente de Havana, Cuba foi Dermaquay em Paris no ano de 1863 (WENK, 1990; COX, 2002). No estado da Bahia, Brasil, no ano de 1866, Otto Wucherer observou microfilárias na urina de um paciente com quilúria e, Timothy Richards Lewis, na Índia, em 1872 identificou microfilárias no sangue periférico de um paciente e as denominou *Filaria sanguinis hominis* (WENK, 1990). O primeiro a observar vermes adultos fêmeas foi Joseph Bancroft em 1876, e em seguida Bourne descreveu adultos machos em 1877, extraídos de abscessos linfáticos de pacientes oriundos da Austrália. O parasito foi então classificado como *Filaria bancrofti* por Cobbold em 1877 (FEIJÓ *et al.*, 1986; WENK, 1990). Neste mesmo ano, Silva Araújo, no Brasil, descreveu o gênero e denominou a espécie como *Wuchereria bancrofti* em homenagem a Otto Wucherer e a Joseph Bancroft (FRANCO & SILVA-LIMA, 1967).

Na China em 1878, acreditava-se que a transmissão ocorria pela ingestão de água contaminada com mosquitos mortos que albergavam o parasito. Após várias observações Manson em 1899 concluiu que a transmissão ocorria por meio de picadas de mosquitos (COOK, 1993). O fenômeno da periodicidade noturna das microfilárias no sangue periférico humano foi observado pela primeira vez por Manson, em 1879 (ORIHIL, 1985). A demonstração de que a transmissão da parasitose ocorre através de picadas de mosquitos infectados foi demonstrada por Bancroft, em 1899 na Austrália, e por Low, em 1900, na Inglaterra (SERVICE, 1978).

2.2. O Parasito

Os vermes adultos são brancos leitosos, cilíndricos e apresentam superfície cuticular lisa e boca sem lábios (FIGUEREDO-SILVA *et al.*, 1993). A fêmea grávida produz uma forma embrionária denominada microfilaria, com bainha de revestimento (Figura 1), medindo de 262 a 329 μm de comprimento por 5,3 a 9,2 μm de diâmetro, sendo encontrada no sangue humano (CARVALHO, 1955). A presença da bainha é um parâmetro para diferenciação das microfílias de *W. bancrofti* das de outros filarídeos, uma vez que, algumas espécies não possuem tal característica (FONTES & ROCHA, 2005).

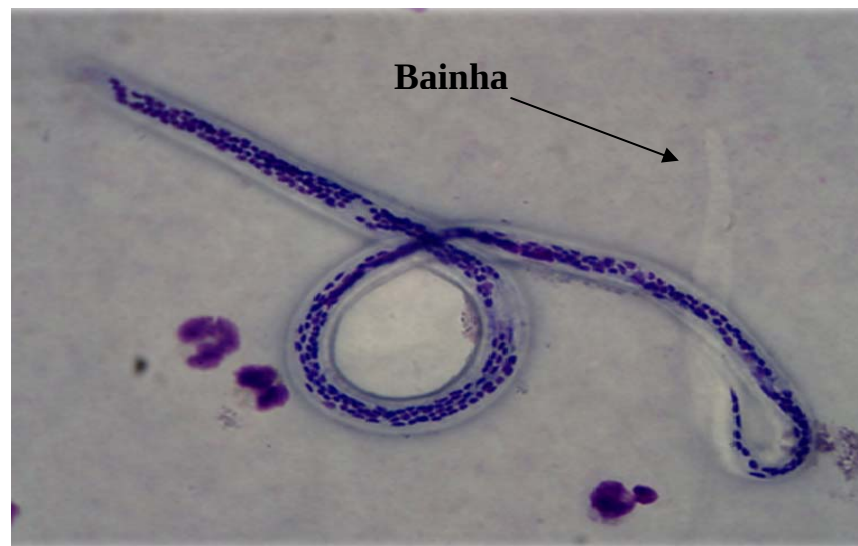


Figura 1 – Microfilaria de *W. bancrofti* (detalhe da bainha)

Uma particularidade deste parasito na maioria das regiões onde é encontrado é a periodicidade noturna das microfílias no sangue periférico do hospedeiro humano. Durante o dia essas formas se localizam nos capilares profundos, principalmente nos pulmões e, durante a noite aparecem no sangue periférico do paciente, apresentando o pico de microfíliemia em torno de meia-noite, decrescendo no final da madrugada (HAWKING *et al.*, 1981; FONTES *et al.*, 2000).

O pico da microfíliemia periférica coincide, na maioria das regiões endêmicas, com o horário de hematofagismo do principal inseto transmissor na área. No Pacífico Sul e Sudeste da Ásia, onde o vetor é o *Aedes polynesiensis*, que exerce a hematofagia durante o dia, as microfílias podem ser detectadas no sangue periférico humano a qualquer hora, com maior concentração em torno das 16 horas (WHITE, 1989; WHO, 1992). Talvez esta coincidência reflita a adaptação evolutiva do parasito aos hábitos alimentares do vetor, aumentando assim

as chances de transmissão e, conseqüentemente garantindo a sobrevivência da espécie (FREEDMAN & NUTMAN, 1989).

De acordo com a periodicidade de suas microfilárias a *W. bancrofti* pode ser classificada em forma periódica noturna, que é cosmopolita, amplamente distribuída nas zonas endêmicas tropicais e subtropicais, e com pico de microfilaremia em torno de meia-noite. Na forma não periódica ou subperiódica diurna o pico de microfilaremia ocorre em torno de 16h00, e na forma subperiódica noturna o pico de microfilaremia é torno de 20h30 (HARINASUTA *et al.*, 1970a; 1970b; WHO, 1992, FONTES *et al.*, 2000).

As larvas do parasito se desenvolvem no inseto vetor a partir das microfilárias ingeridas por ocasião do repasto sangüíneo em um indivíduo infectado. A larva de primeiro estágio mede em torno de 300 µm de comprimento e é originária da transformação da microfilária. Essa larva se diferencia em larva de segundo estágio (duas a três vezes maior) e sofre nova muda originando a larva infectante (Figura 2), que tem entre 1,5 a 2,0 mm de comprimento (FONTES & ROCHA, 2005).



Figura 2 – Foto em microscopia ótica (400x) de Larvas infectantes (L₃) de *W. bancrofti* em probócida de *C. quinquefasciatus*.

2.3. Ciclo Evolutivo da *Wuchereria bancrofti*

A *W. bancrofti* é transmitida por mosquitos fêmeas, principalmente do gênero *Culex*, nos quais as microfilárias ingeridas durante o repasto sangüíneo no ser humano irão passar por três estádios de desenvolvimento até alcançar a forma larval infectante. As microfilárias ingeridas pelos mosquitos perdem a sua bainha entre duas a seis horas e, após penetração na parede do estômago do vetor, migram para os músculos torácicos e se tornam mais curtas e largas. Essa forma, denominada de L₁ ou salsichóide, possui movimentos lentos e tem uma cutícula que forma uma fina cauda. Entre seis a dez dias ocorre a primeira muda, surgindo a larva L₂. Entre 10-15 dias ocorre a segunda muda, surgindo larvas L₃ ou infectantes, que possuem três papilas globosas na extremidade posterior e apresentam grande motilidade. Essas larvas migram para a cavidade geral, cabeça e probóscida do mosquito. Todo processo dura de 14 a 21 dias, dependendo principalmente da temperatura e umidade local. As larvas L₃, presentes na probóscida do mosquito, perfuram a extremidade anterior do lábio do inseto e são depositadas na pele do homem no momento da picada, podendo penetrar pelo orifício da picada ou por outra solução de continuidade, e chegam aos linfáticos onde se tornam vermes adultos (Figura 3) (REY, 2001). As fases de desenvolvimento da larva infectante no ser humano não são conhecidas completamente, porém sabe-se que a maturação dos vermes é lenta e o período pré-patente é longo, entre sete a nove meses após infecção (NAPIER, 1944; MEYERS *et al.*, 1976; WHO, 1984).

É estimado em seis semanas até 12 meses o tempo de vida das microfilárias no sangue (NARASIMHAM *et al.*, 1984; ORIHEL, 1985; OTTESEN, 1985). A longevidade do parasito adulto no hospedeiro definitivo é cerca de oito anos (ORIHEL, 1985).

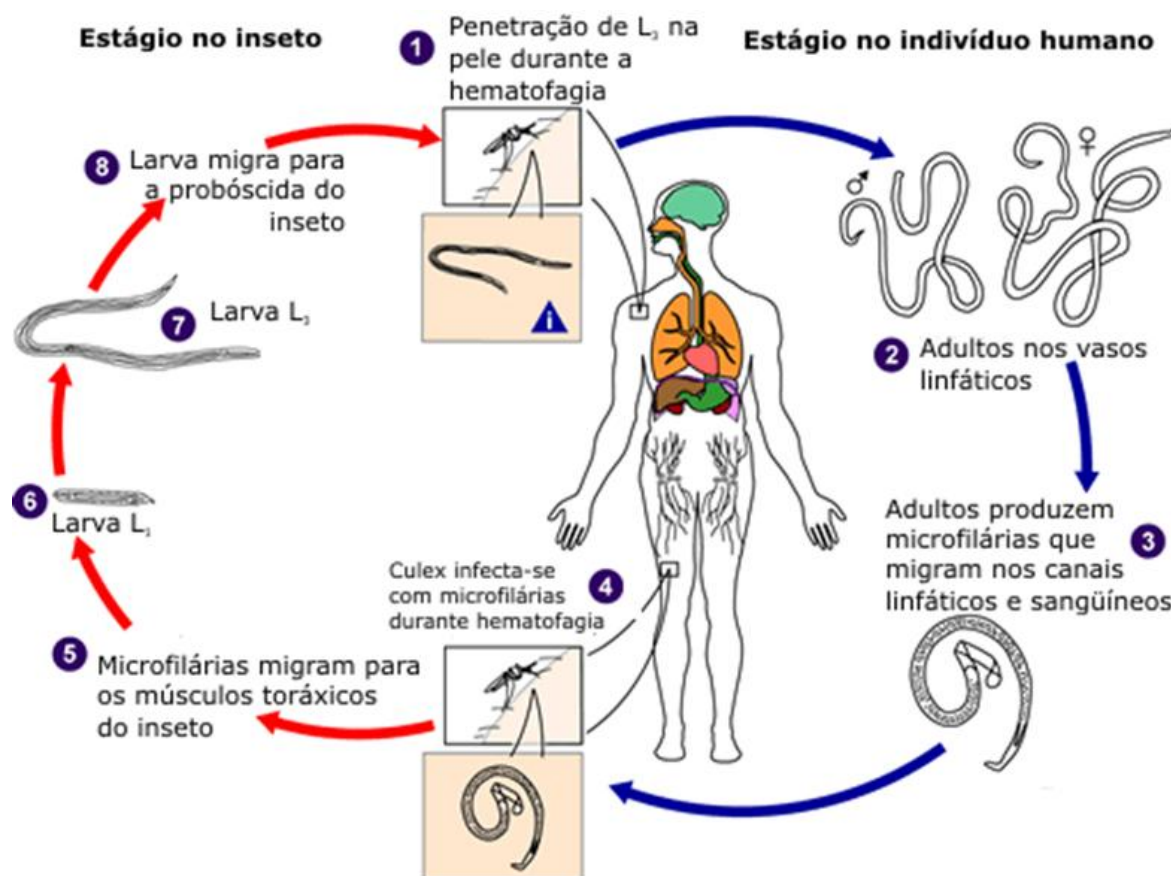


Figura 3 – Ciclo Biológico da *W. bancrofti* (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/filariasis.htm>)

2.4. Vetores da Bancroftose e Fatores de Interferência na Transmissão da Doença

O *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* Say, 1823, anteriormente identificado como *Culex pipiens fatigans* (BELKIN, 1977; SIRIVANAKARN & WHITE, 1978), considerado um mosquito cosmopolita, é o principal transmissor em todas as áreas onde ocorre a forma periódica noturna da bancroftose (WHITE, 1989). No Brasil, sua ocorrência é abrangente e sua distribuição e abundância são influenciadas pela presença do homem. Elevadas densidades desses mosquitos são encontradas junto a aglomerados humanos, em áreas urbanas, se tornando menos freqüente à medida que as habitações se distanciam. É a espécie de mosquito encontrado com maior freqüência no interior das moradias (FORATTINI *et al.*, 1993).

O *C. quinquefasciatus* apresenta alta susceptibilidade à *W. bancrofti* e o seu tempo de vida é superior ao tempo de desenvolvimento das larvas para alcançarem a forma infectante, permitindo a transmissão. Seus criadouros preferenciais são os depósitos artificiais, com água rica em matéria orgânica em decomposição e detritos. Os recipientes artificiais transitórios para oviposição em geral são vasilhames de diversos tamanhos, preferencialmente sombreados. Porém, as águas estagnadas e poluídas no solo, como valetas, fossas, ralos,

poços, cisternas, tonéis e pneus. Estas áreas de criação estão sempre próximas às habitações humanas, onde o desenvolvimento das larvas e pupas é beneficiado pelo ambiente peridomiciliar (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

Os mosquitos são extremamente sensíveis às variações climáticas e sua densidade populacional está ligada à temperatura. A faixa ideal de temperatura para o desenvolvimento do *C. quinquefasciatus* varia entre 20°C e 30°C. A temperatura influencia nas ótimas condições à proliferação do *Culex* durante o ano, uma vez que interfere na duração do desenvolvimento embrionário e pós-embrionário (COSTA *et al.*, 1994).

O aumento sazonal da população adulta de mosquitos depende da disponibilidade de habitat larval durante e imediatamente depois do período das chuvas, no Brasil assim como em outros países (KLEIN *et al.*, 1990). A abundante precipitação pluviométrica certamente contribui para o aumento das áreas de criação de mosquitos, o que favorece o desenvolvimento de suas formas aquáticas e conseqüentemente a emergência de adultos.

Entre os fatores que interferem na epidemiologia da *W. bancrofti* em nosso meio, destacam-se: a presença do mosquito doméstico *C. quinquefasciatus*; o ser humano que é a única fonte de transmissão; a temperatura ambiente elevada (25 a 30°C); a umidade relativa do ar entre 80 a 90%, alta o suficiente para o desenvolvimento das larvas no mosquito e penetração das mesmas na pele do hospedeiro; a pluviosidade mínima que deve estar em cerca de 1.300mm³ por ano; a altitude baixa; e o tempo de residência do ser humano na área endêmica que deve ser longo (FONTES, 1996).

2.5. Distribuição Geográfica da Filariose Linfática

É estimada em um bilhão a população global que vive em áreas de risco de contrair a infecção, e em 120 milhões o número de parasitados. Destes, aproximadamente 112 milhões são portadores de *W. bancrofti* e oito milhões são portadores de *Brugia malayi* ou *B. timori* (WHO, 2002b).

A bancroftose é endêmica em várias regiões tropicais, sendo as maiores prevalências registradas na China, Indonésia e Índia (onde se localizam cerca de 65% do total de pessoas infectadas), mas é também encontrada em outras nações da Ásia, África e Américas (OTTESEN & RAMACHANDRAN, 1995; WHO, 2002b) (Figura 4). No continente americano é considerada endêmica no Haiti, República Dominicana, Guiana e no Nordeste do Brasil, e em vias de eliminação na Costa Rica, Suriname e Trinidad & Tobago (RAWLINS *et al.*, 2000; PAHO/WHO, 2002; FONTES & ROCHA, 2005).

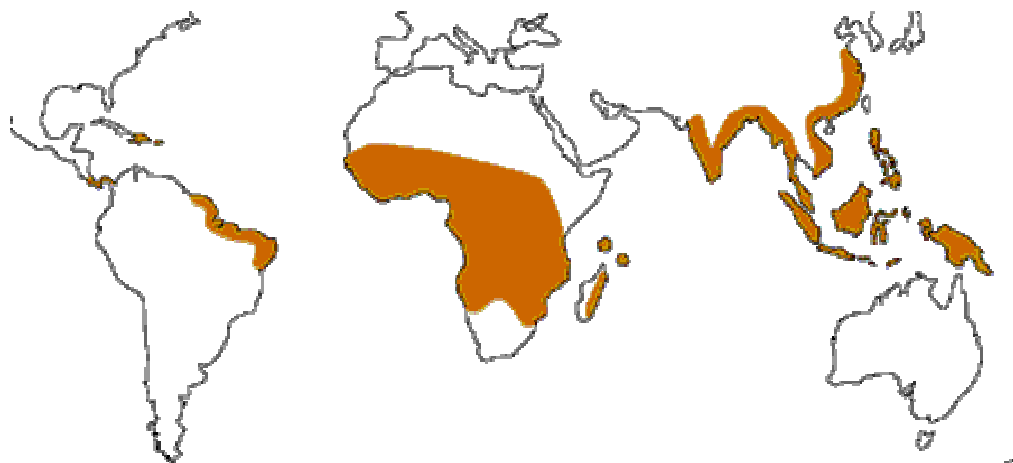


Figura 4 – Distribuição geográfica aproximada da filariose linfática no mundo.

Fonte: http://www.asnom.org/en/444_filarioses.html (Acesso em 06/03/2008)

2.6. Bancroftose no Brasil

Atualmente no Brasil a parasitose apresenta distribuição urbana, sendo considerados focos ativos da endemia as cidades de Recife, Paulista, Olinda e Jaboatão dos Guararapes no estado de Pernambuco, e Maceió no estado de Alagoas (FONTES & ROCHA, 2005). O vetor do parasito no país é o *C. quinquefasciatus* (FONTES *et al.*, 1994; CALHEIROS *et al.*, 1998) embora raros exemplares de mosquitos de outras espécies tenham sido encontrados naturalmente infectados com larvas de *W. bancrofti* como o *Anopheles darlingi* (Root, 1926) e *Anopheles aquasalis* (Curry, 1932) no Pará (DAVIS, 1931; CAUSEY *et al.*, 1945), e o *Aedes scapularis* (Rondani, 1848) em Santa Catarina (RACHOU *et al.*, 1954), nenhum deles é considerado de importância na transmissão da bancroftose no país (RACHOU, 1957).

Mesmo tendo Wucherer descrito as microfilárias de *W. bancrofti* no Brasil em 1866, os primeiros estudos de distribuição e prevalência da bancroftose só foram realizados a partir de 1942 (CAUSEY *et al.*, 1945).

Pouco se sabia sobre a parasitose no país até o início de 1950, a não ser a existência de casos de elefantíase em várias localidades e referências a alguns inquéritos isolados de prevalência, que indicavam cidades como Salvador (BA) e Belém (PA) como importantes focos de transmissão (FRANCO & SILVA-LIMA, 1967).

No período de 1951 a 1958 foram realizados vários inquéritos hemoscópicos e entomológicos para se conhecer a distribuição da bancroftose no Brasil. Nesta época, foram pesquisadas 852 localidades de 24 Unidades da Federação, totalizando 811.361 pessoas examinadas. Nestes inquéritos foram encontrados portadores de *W. bancrofti* em 89 localidades de oito diferentes Unidades da Federação. Em paralelo, foram realizados inquéritos entomológicos em vários estados do Brasil, sendo examinados 90.171 exemplares

de *C. quinquefasciatus*. Destes, foram encontrados 2.621 (2,9%) exemplares infectados com *W. bancrofti*, e 241 com larvas infectantes L₃ (0,3%) (RACHOU, 1956). Com base nestes resultados, considerando que a transmissão autóctone da filariose bancroftiana ocorria nos locais onde simultaneamente foram detectados seres humanos e mosquitos infectados, as seguintes cidades, com suas respectivas prevalências, foram consideradas focos da endemia: São José da Ponta Grossa (SC), 13,9%; Belém (PA), 9,8%; Barra de Laguna (SC), 9,4%; Recife (PE), 6,9%; Castro Alves (BA), 5,9%; Florianópolis (SC), 1,4%; São Luís (MA), 0,6%; Salvador (BA), 0,4%; Maceió (AL), 0,3%; Manaus (AM), 0,2% e Porto Alegre (RS), 0,1% (RACHOU, 1960).

A partir desse conhecimento, foi criado o Programa Nacional de Controle da Filariose, com o estabelecimento de medidas de controle empreendidas primeiramente pelo Serviço Nacional de Malária, que com a unificação dos serviços nacionais de combate às endemias, foi assumido pelo Departamento Nacional de Endemias Rurais (DNERu), precursor da Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM). O Programa tinha como meta erradicar ou controlar a bancroftose nas áreas endêmicas baseado em dois pilares: tratamento dos indivíduos parasitados com o medicamento citrato de dietilcarbamazina, e combate às formas adultas e larvárias dos insetos vetores com a eliminação de criadouros através de obras de saneamento (FRANCO & SILVA-LIMA, 1967; SCAFF & GUEIROS, 1967). Em algumas áreas endêmicas com população menor, como Barra de Laguna (SC), foi feito o tratamento em massa da população (SCHLEMPER Jr. & FERREIRA-NETO, 1985). Embora nenhum inquérito nacional tenha sido realizado para avaliação das ações de controle executadas à época (1960, 1970 e 1980), a endemia foi considerada limitada exclusivamente às cidades de Recife (PE) e Belém (PA) (MS, 1985; MEDEIROS *et al.*, 2000). No entanto, a partir da identificação de casos autóctones da infecção em Maceió (AL) em 1990 (DREYER *et al.*, 1991), o Ministério da Saúde reavaliou a distribuição da filariose no país, incluindo esta cidade como foco de transmissão ativa da infecção no país (OPAS, 1997).

Atualmente a filariose apresenta distribuição urbana e focal, sendo detectada na região metropolitana de Recife (PE), especialmente Olinda (MEDEIROS *et al.*, 2000), Jaboatão e Paulista, com índices de microfilarêmicos variando de 2% a 15% em comunidades de baixo nível sócio-econômico (MACIEL *et al.*, 1996), e na cidade de Maceió (AL) (ROCHA *et al.*, 2000). Em Belém, no Pará, o índice de lâminas positivas apresentou ao longo dos anos um franco declínio: 9,8% em 1951, 4,3% em 1961, 0,87% em 1971, 0,26% em 1981, 0,02% em 1991 e, 0% a partir de 1999, e possivelmente se tornou uma área livre de transmissão (FONTES *et al.*, 2005a).

2.7. Bancroftose em Maceió-Alagoas

Em Maceió, Deane e cols. (1953) realizaram um inquérito hemoscópico, sendo examinadas 6.052 pessoas (6% da população da área urbana), e encontraram 18 portadores de microfilárias de *W. bancrofti* (0,3%). Em cinco dos 11 bairros investigados foram diagnosticados indivíduos infectados com microfilárias, com a maior prevalência observada no bairro do Farol (67%), indicando uma distribuição focal da bancroftose na cidade. Para comprovar a transmissão ativa do parasito, os autores dissecaram 4.975 exemplares fêmeas de *C. quinquefasciatus*, sendo encontrados cinco (0,1%) com larvas de *W. bancrofti*, mas somente um exemplar (0,02%) com larva infectante. Embora não tivesse sido realizado nesta cidade um novo inquérito epidemiológico, o Ministério da Saúde considerou como extinto o foco de bancroftose em Maceió (MS, 1985). Somente em 1990 foi realizado na cidade um inquérito hemoscópico na população de soldados do 59º Batalhão de Infantaria do Exército, quando dois militares foram diagnosticados com a parasitose (DREYER *et al.*, 1991). Ambos os casos foram, após investigação, considerados autóctones de Maceió. O resultado deste trabalho aliado à existência do mosquito transmissor *C. quinquefasciatus* na região, indicou a necessidade de uma reavaliação epidemiológica da parasitose na cidade. Entre os anos de 1991 e 1995 foram avaliados, através de inquéritos hemoscópicos, escolares de 1º e 2º graus da rede pública de ensino. Foram examinados 10.857 (36,7%) escolares dos 33 diferentes bairros da cidade existentes então, sendo detectados 73 (0,7%) parasitados por *W. bancrofti*, todos provenientes de três dos bairros contíguos: Feitosa, Pitanguinha e Jacintinho, com prevalências de 5,3%, 3,5% e 1,2%, respectivamente (FONTES, 1996; FONTES *et al.*, 1998). Posteriormente, o inquérito foi estendido à população geral dessas três áreas, com exame por busca ativa de 8.726 indivíduos de todas as faixas etárias. Nesta investigação foram detectados 226 microfilarêmicos, com prevalências nos bairros variando de 1,1% (Jacintinho) a 5,4% (Feitosa) (ROCHA *et al.*, 2000). Este amplo estudo epidemiológico evidenciou que Maceió ainda se constituía uma área endêmica de filariose linfática, com distribuição limitada a uma região da cidade. O conhecimento da situação levou ao planejamento de condutas profiláticas para conter a expansão da doença.

Em inquéritos entomológicos para verificação da transmissão ativa, no período de 2000 e 2001 foram examinadas, por dissecação e microscopia óptica, fêmeas de *C. quinquefasciatus*, com obtenção de índices de infecção e infectividade de 3,1% e 0,15%, respectivamente (LIMA *et al.*, 2007).

2.8. Bancroftose em Belém-Pará

A capital do Pará foi alvo do primeiro inquérito realizado no Brasil para determinação da prevalência da bancroftose. Durante os anos de 1942 e 1943 foram examinadas 5.000 pessoas, encontrando-se 10,8% de microfilarêmicos (CAUSEY *et al.*, 1945).

Belém foi um dos poucos locais em que o programa de controle da endemia ficou ativo, com determinação anual da prevalência da parasitose pelo Serviço Nacional de Malária, e posteriormente, pelos órgãos que o sucederam: DNERu e SUCAM. Com a extinção da SUCAM, a Secretaria Estadual de Saúde do Pará assumiu e deu continuidade ao programa. Os dados obtidos por estes órgãos atestam que a prevalência da filariose na cidade foi progressivamente diminuindo ao longo dos anos, como descrito a seguir. No período de 1951 a 1959, em toda a cidade de Belém foram diagnosticados 70.637 (8,2%) microfilarêmicos; de 1960 a 1969 foram encontrados 62.863 (2,6%) infectados entre 2.450.511 indivíduos examinados. A partir de 1970 após assumir as campanhas de combate a filariose em Belém, a SUCAM realizou em uma década 3.684.208 exames por gota espessa na população, registrando 26.945 (0,73%) microfilarêmicos; na década seguinte, de 1980 a 1989, foram realizados 3.470.807 exames de sangue dos quais 5.703 (0,16%) apresentaram-se positivos. Entre 1990 e 1994 foram realizados 1.062.945 exames, encontrando-se 180 (0,017%) microfilarêmicos; entre 1995 e 2003, foram examinados 1.116.525 indivíduos e encontrados 29 (0,0026%) microfilarêmicos; e a partir de 1999 não mais foram diagnosticados casos de microfilarêmicos na cidade (FONTES *et al.*, 2005a).

Os dados dos inquéritos hemoscópicos sugerem a interrupção da transmissão da bancroftose em Belém. Mas para sua confirmação, há necessidade de complementação com dados entomológicos, para verificar a situação da infecção vetorial na área.

2.9. Diagnóstico da Infecção Vetorial

O método tradicional de detecção de larvas de filarídeos em mosquitos é baseado na dissecação individual dos insetos e na identificação microscópica do parasito (RAMACHANDRAN, 1970). Na dissecação são retiradas asas e pernas, em seguida separados em cabeça, tórax e abdome para posterior maceração sobre lâminas de microscopia ótica. A fim de evitar ressecamento e facilitar a leitura são colocadas gotas de solução salina tamponada nas lâminas de microscopia com o material preparado. A leitura das lâminas é feita em microscópio óptico usando objetiva de 10x (aumento de 100x) e utilizando maior ampliação (400x) para uma melhor visualização e identificação do estágio de desenvolvimento larval.

A pesquisa de larvas de *W. bancrofti* no vetor, além de requerer uma considerável mão-de-obra e tempo, pode subestimar ou superestimar os índices de infecção e infectividade. Isto ocorre porque larvas imaturas podem escapar à observação pelo seu tamanho reduzido, ou tecidos macerados do vetor podem encobrir as larvas mascarando a sua presença, ou, ao contrário, larvas de outras espécies de filárias, como *Dirofilaria immitis*, podem estar presentes e serem confundidas com aquelas de *Wuchereria*. Portanto, deve-se estar atento para distinção morfológica entre ambas, uma vez que larvas de *D. immitis* já foram detectadas em nossa região (BRITO *et al.*, 2000).

Mais recentemente, o método de dissecação tem sido substituído pela reação em cadeia da polimerase, que é bastante sensível e específica para detectar DNA de *W. bancrofti* em insetos, no sangue, na urina e até na saliva de pacientes, inclusive em áreas onde co-existem outros filarídeos (FISCHER *et al.*, 2003).

2.10. Pesquisa de DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

2.10.1. Princípios e Aplicações da Técnica

A reação em cadeia da polimerase foi desenvolvida no ano de 1983 por Kary Mullis, com a finalidade de copiar e amplificar segmentos específicos do DNA. Para obtenção de fitas derivadas de um DNA molde, é necessário proceder a uma seqüência de etapas. A primeira etapa da reação de síntese consiste na desnaturação do DNA dupla hélice em fitas simples. Em seguida há o anelamento ou hibridização de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (*primers*) que delimitam o segmento a ser reproduzido no DNA, e finalmente ocorre a extensão para produção de cópias da nova seqüência. Cada uma destas etapas é temperatura dependente: para a desnaturação a temperatura deve ser elevada para 90-94°C, em seguida deve-se resfriar o tubo para que ocorra o anelamento dos oligonucleotídeos pela ação enzimática da DNA polimerase com as regiões que flanqueiam as seqüências alvo (32–55°C), e por fim a temperatura deve ser novamente elevada para ativação do processo de extensão (70-72°C) (Figura 5). Para amplificação do DNA este ciclo deve ser repetido por cerca de 30 a 40 vezes, resultando na produção de milhões de cópias da região alvo do DNA original (MULLIS, 1990).

A DNA polimerase, que atua como catalisador da reação na etapa de extensão era originalmente preparada a partir de *Escherichia coli* (ERLICH, 1989). Como esta enzima é desnaturada a temperaturas elevadas, era necessária sua reposição a cada ciclo de amplificação dificultando sua realização (SAIKI *et al.*, 1985, MULLIS & FALOONA, 1987). Devido à necessidade de adição da mesma a cada ciclo, apenas a amplificação de pequenos

fragmentos de DNA era realizada satisfatoriamente (NEWTON & GRAHAM, 1994). O isolamento de uma DNA polimerase termoestável, oriunda da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA polimerase), que possui atividade ótima a 70–72 °C e permanece ativa durante um longo período a temperatura de 92°C, facilitou tecnicamente a realização da PCR (SAIKI *et al.*, 1988).

A técnica de PCR pode gerar a partir de uma única fita molde após cerca de 30 ciclos de amplificação, algo em torno de 100 bilhões de cópias em um intervalo de aproximadamente três horas (MULLIS, 1990). O conhecimento e aperfeiçoamento desta técnica têm se mostrado útil em várias áreas das ciências da saúde.

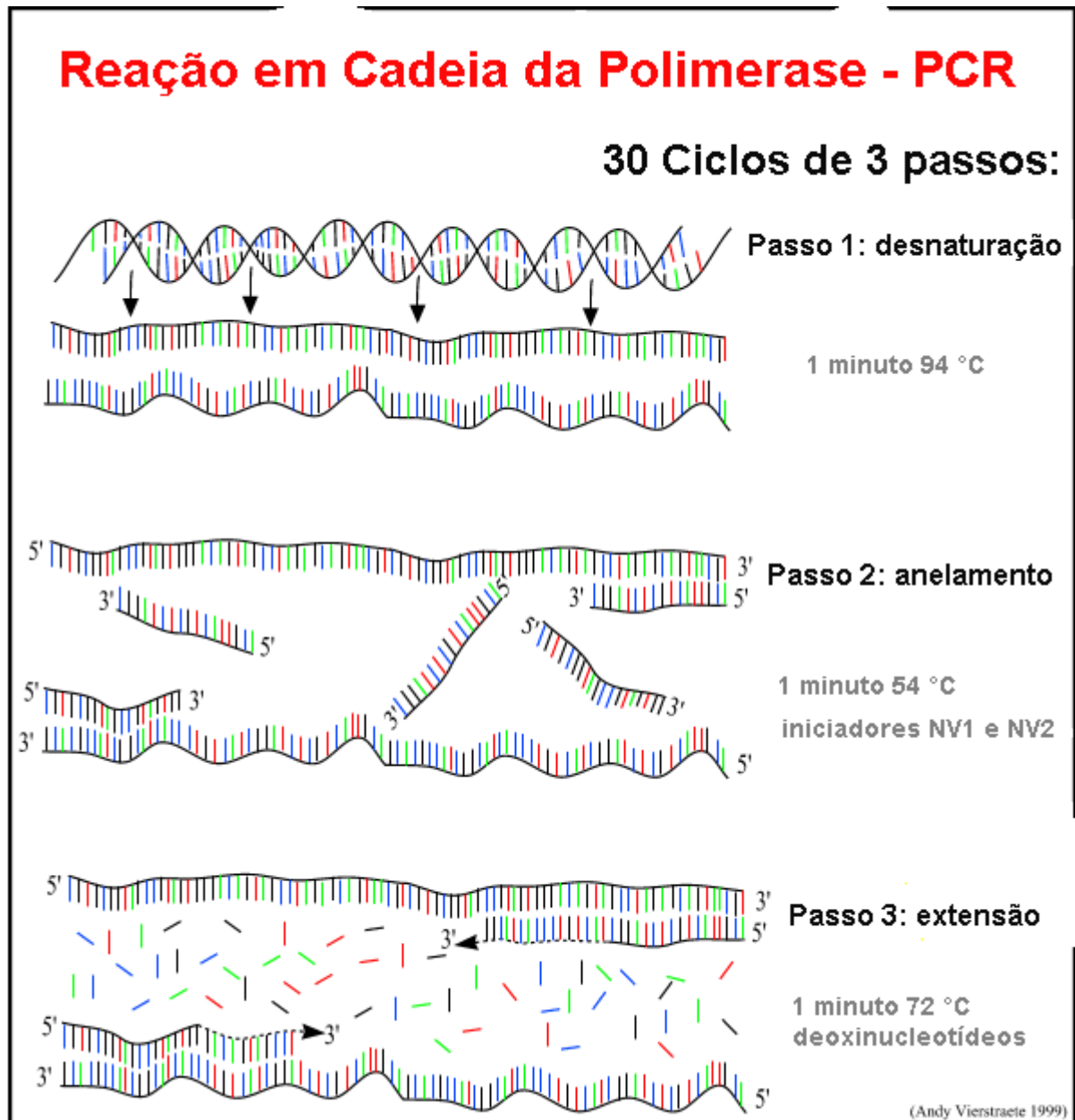


Figura 5 – Etapas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para amplificação de uma sequência específica de DNA genômico.

Fonte: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> (acesso em 14/11/2007)

2.11. Diagnóstico Molecular da Infecção pela *Wuchereria bancrofti*

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular para diagnóstico da filariose permitiu a obtenção de sondas de DNA a partir de sequências repetitivas *Hha* I para diagnóstico de *Brugia malayi* (POOLE & WILLIAMS, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1993). Existem cerca 30.000 cópias deste tipo de sequência no genoma desse parasito somando aproximadamente 12% do DNA total (MCREYNOLDS *et al.*, 1993). Esta característica tornou possível o desenvolvimento de uma técnica de diagnóstico baseada na PCR (LIZOTTE *et al.*, 1994).

Os primeiros iniciadores desenvolvidos para detecção de DNA de *W. bancrofti* foram F2, R4 e R5 que geravam fragmentos de 380 pares de base (pb) (F2 x R4) e 650 pb (F2 x R5), respectivamente (SIRIDEWA *et al.*, 1994). O DNA do parasito era detectado por hibridização com sondas de DNA específicas marcadas com biotina (IWb 67). A detecção do produto amplificado era feita pela formação de cor, com a adição de avidina marcada com fosfatase e um substrato quimioluminescente AMPPD. Esta técnica foi considerada insatisfatória devido ao custo elevado e difícil execução (DISSANAYAKE, 1991). Posteriormente, a partir do fragmento EMBL3Wb34, que apresentava reação cruzada com DNA de *Brugia malayi* e *B. pahangi*, chegou-se ao subclone designado pWb12. Esta sequência com tamanho de 969 pb e que aparece repetida no genoma 450 a 700 vezes, é composta de 66% de AT, e hibridiza apenas com o DNA de *W. bancrofti*. O pWb12 foi utilizado com sucesso na detecção de DNA de *W. bancrofti* em amostras de sangue coletadas à noite, em mosquitos infectados da espécie *C. quinquefasciatus* e em amostras de fluido de hidrocele (SIRIDEWA *et al.*, 1994).

Outros iniciadores foram desenvolvidos, como o Wb19, obtido a partir de uma sequência repetitiva, que amplificado revelava um fragmento de 393 pb em exudato pulmonar após esforço físico de pacientes microfilarêmicos (ABBASI *et al.*, 1999).

Atualmente, os iniciadores mais frequentemente utilizados para detecção de DNA de *W. bancrofti*, foram obtidos a partir da clonagem e caracterização de uma sequência repetitiva (SspI) com 195 pb, 77% de ligações adenina e timina (AT), e apresentando 300 cópias por genoma do parasito. O desenho de iniciadores derivados da sequência SspI, NV1 e NV2, tem permitido a detecção do parasito em diferentes materiais biológicos provenientes de pacientes infectados, e em mosquitos (ZHONG *et al.*, 1996).

2.12. Diagnóstico Molecular da Infecção Vetorial

A PCR é tão sensível quanto à dissecação para determinação da infecção vetorial e é espécie-específica, sendo considerada uma ferramenta valiosa na avaliação da intensidade de mosquitos infectados em áreas endêmicas (BOCKARIE *et al.*, 2000; THANOMSUB *et al.*, 2000).

A PCR para detecção da infecção vetorial tem sido mais utilizada que para diagnóstico da infecção humana. Isto ocorre pela possibilidade do exame de lotes (*pools*) de mosquitos, ao invés do processamento individual, o que diminui o custo do exame. Assim, pode-se processar um número razoável de amostras em um curto espaço de tempo.

A PCR tem sido empregada para detectar pelo menos uma larva de *Wuchereria* em lotes de 1 a 100 mosquitos (WILLIAMS *et al.*, 2002; FURTADO *et al.*, 1997; ZHONG *et al.*,

1996; RAMZY *et al.*, 1997). A sensibilidade do método depende em parte da pureza do DNA extraído do material. O custo é tanto menor quanto maior a sensibilidade em detectar uma menor quantidade de DNA em um maior lote de mosquitos.

A fim de otimizar a pesquisa de infecção vetorial recomenda-se o xenomonitoramento molecular, que consiste na coleta em uma área endêmica de mosquitos recém ingurgitados, e seu exame pela PCR (CHADEE *et al.*, 2002; WILLIAMS *et al.*, 2002). O xenomonitoramento além de fornecer dados sobre a infecção natural dos vetores é um indicativo indireto da ocorrência da infecção humana, pois verifica não apenas a presença de larvas, mas também a presença de microfilárias em mosquitos recém alimentados, uma vez que, a detecção de DNA através da técnica de PCR é espécie-específica e não estágio-específica, sendo possível detectar DNA em todas as fases de desenvolvimento do parasito. Conferindo meios para verificação da interrupção da transmissão (WHO, 2002a).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Utilizar a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliar, através de xenomonitoramento, a infecção natural do *Culex quinquefasciatus* em áreas endêmicas de filariose linfática nas cidades de Maceió-AL e Belém-PA.

3.2. Objetivos Específicos

- Padronizar a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Determinar a sensibilidade da PCR para diagnóstico da *W. bancrofti*;
- Otimizar o tamanho do lote (*pool*) de mosquitos para extração do DNA alvo;
- Verificar especificidade da PCR para detecção de *W. bancrofti* em mosquitos;
- Determinar as taxas de infecção de *C. quinquefasciatus* naturalmente infectados pela *W. bancrofti* em áreas endêmicas para filariose linfática em Maceió-AL;
- Determinar as taxas de infecção de *C. quinquefasciatus* naturalmente infectados pela *W. bancrofti* em áreas endêmicas para filariose linfática em Belém-PA;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Área Estudada e Coleta de Insetos: Maceió - Alagoas

Maceió capital do Estado de Alagoas está situada no litoral médio do estado entre os meridianos 35° 44' W e 35° 56' W e os paralelos 9° 35' e 9° 24' S. A cidade é constituída por uma área urbana de 208 Km² com uma população de 896.965 habitantes (IBGE, 2007). A capital apresenta clima quente e úmido praticamente todo o ano, com períodos de chuvas de março a agosto, sendo a precipitação média anual entre 1.500 mm a 2.000 mm. A temperatura média mensal varia de 20°C a 30°C e a umidade de 60% a 80% (IMPAR, 1995). A área urbana é composta por 50 bairros, divididos em sete distritos sanitários (SMS, 2005).

Neste estudo foram coletados mosquitos na área da cidade que representa o foco endêmico de filariose linfática descrito anteriormente (FONTES *et al.*, 1998). A região fica às margens do canal do Reginaldo (Figura 6), correspondendo à parte dos bairros contíguos Feitosa, Jacintinho e Pitanguinha (Figura 7). Nos locais estudados, inquéritos hemoscópicos foram realizados em paralelo para diagnóstico de casos de infecção humana com microfilaremia.



Figura 6 - Região endêmica de filariose linfática em Maceió. Em destaque o canal do Reginaldo.
Fonte: Prof^a Eliana M. Mauricio da Rocha e Prof. Gilberto Fontes

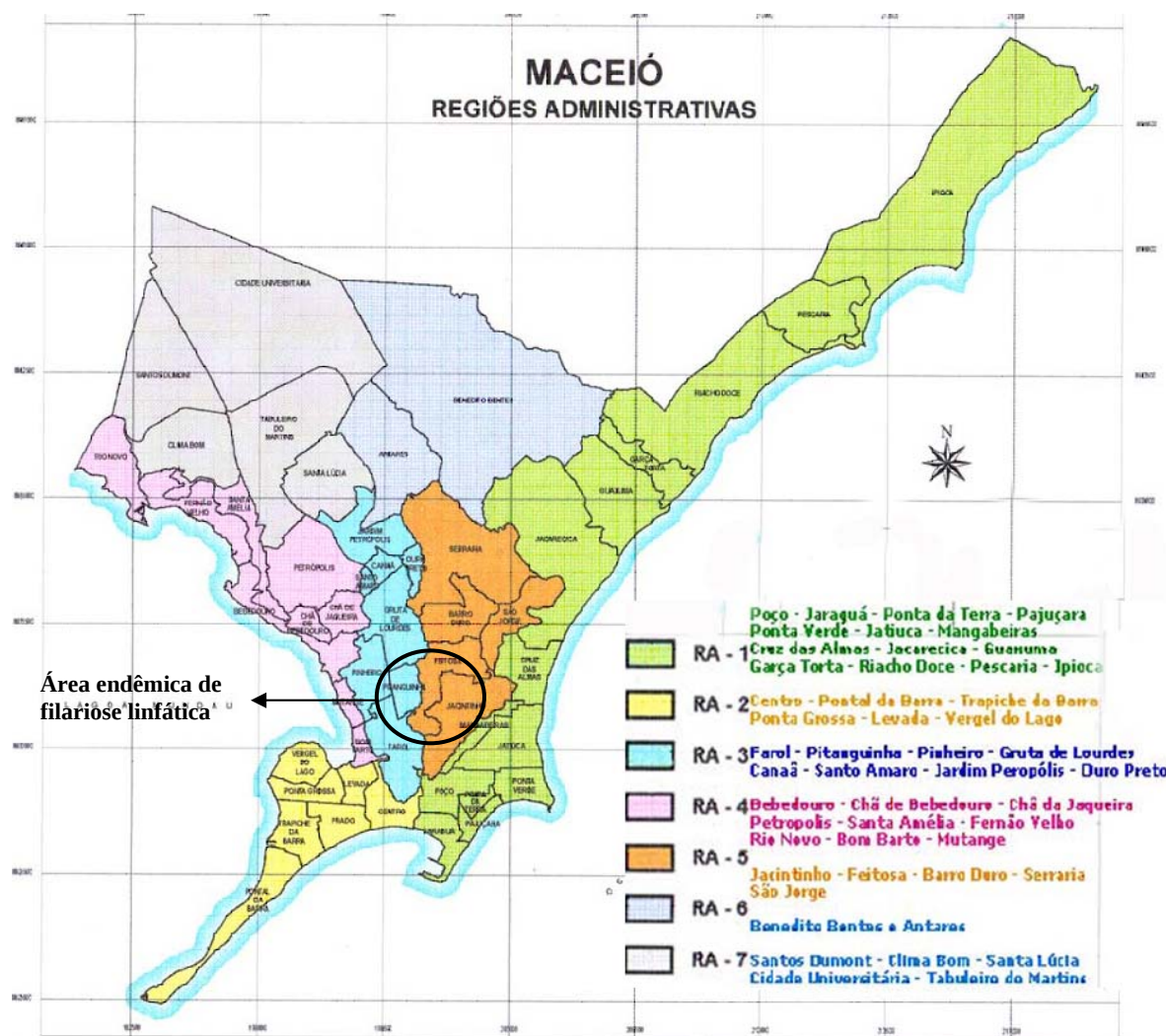


Figura 7 - Área urbana do município de Maceió (AL), dividida em sete regiões administrativas com 50 bairros. Destaque bairros endêmicos para filariose linfática.

Fonte: <http://www.bairrosdemaceio.net/site/index.php?Canal=Mapa%20dos%20Bairros>

Mosquitos foram capturados nas casas de indivíduos microfilarêmicos diagnosticados em um inquérito hemoscópico realizado previamente (denominadas casas referenciais), e nas casas dos vizinhos destas no horário de 8h00 as 9h00, nas áreas endêmicas de filariose linfática em Maceió (FONTES *et al.*, 1998; ROCHA *et al.*, 2000). Foram também realizadas coletas com armadilhas luminosas em casas escolhidas aleatoriamente no foco endêmico. Foram consideradas vizinhas casas encontradas 20 metros à esquerda e 20 metros à direita da casa referencial (peridomicílio da casa referencial).

Os mosquitos foram coletados vivos no intradomicílio, com capturadores manuais de sucção labial (capturador de Castro), colocados em recipientes apropriados com malha fina e separados de acordo com o local da coleta. Para o xenomonitoramento os mosquitos eram coletados ingurgitados, uma vez que estes poderiam albergar além dos estádios larvais (L_1 , L_2 e L_3) as formas embrionárias (microfilárias) presentes no sangue humano recém-ingerido.

4.2. Área Estudada e Coleta de Insetos: Belém – Pará

Belém capital do Estado do Pará fica localizada geograficamente a 1° 27' 21" de latitude Sul e 4° 30' 15" de longitude Oeste. A cidade é constituída por uma área urbana de 1.070 Km² e possui uma população urbana de 1.408.847 habitantes (IBGE, 2007). A capital apresenta clima quente e úmido praticamente todo o ano e longos períodos de fortes chuvas que ocorrem de dezembro a maio. A área é urbana composta por 71 bairros, divididos em oito distritos administrativos (Figura 8).

A análise dos dados de prevalência de filariose dos últimos dez anos de Belém-PA mostrou que, os indivíduos microfilarêmicos encontrados a partir de 1995 estavam concentrados nos distritos administrativos do Guamá e de Sacramento, que incluem os bairros de maior endemicidade na década de 1950 (Guamá, Terra Firme, Telégrafo, Sacramento e Pedreira). Nos bairros historicamente endêmicos como Guamá, Fátima, Pedreira, Sacramento e Telégrafo, e no distrito de Icoaraci, que no passado também fazia parte da área endêmica, os últimos casos foram detectados entre os anos de 1996 e 1999 (FONTES *et al.*, 2005a). Nestes locais a Secretaria Municipal de Saúde (SMS) de Belém mantém um programa de busca ativa de casos, utilizando para isto a técnica da gota espessa de sangue. Insetos vetores foram capturados nestas áreas da cidade onde inquéritos hemoscópicos da população, pelo exame da gota espessa, estavam sendo realizados. Os mosquitos foram capturados também na região da cidade onde a prevalência da parasitose estava sendo avaliada através da pesquisa de antígenos no sangue pela técnica de imunocromatografia rápida em cartão. Nestas áreas foram coletados mosquitos seguindo os mesmos padrões de coleta de Maceió-AL.

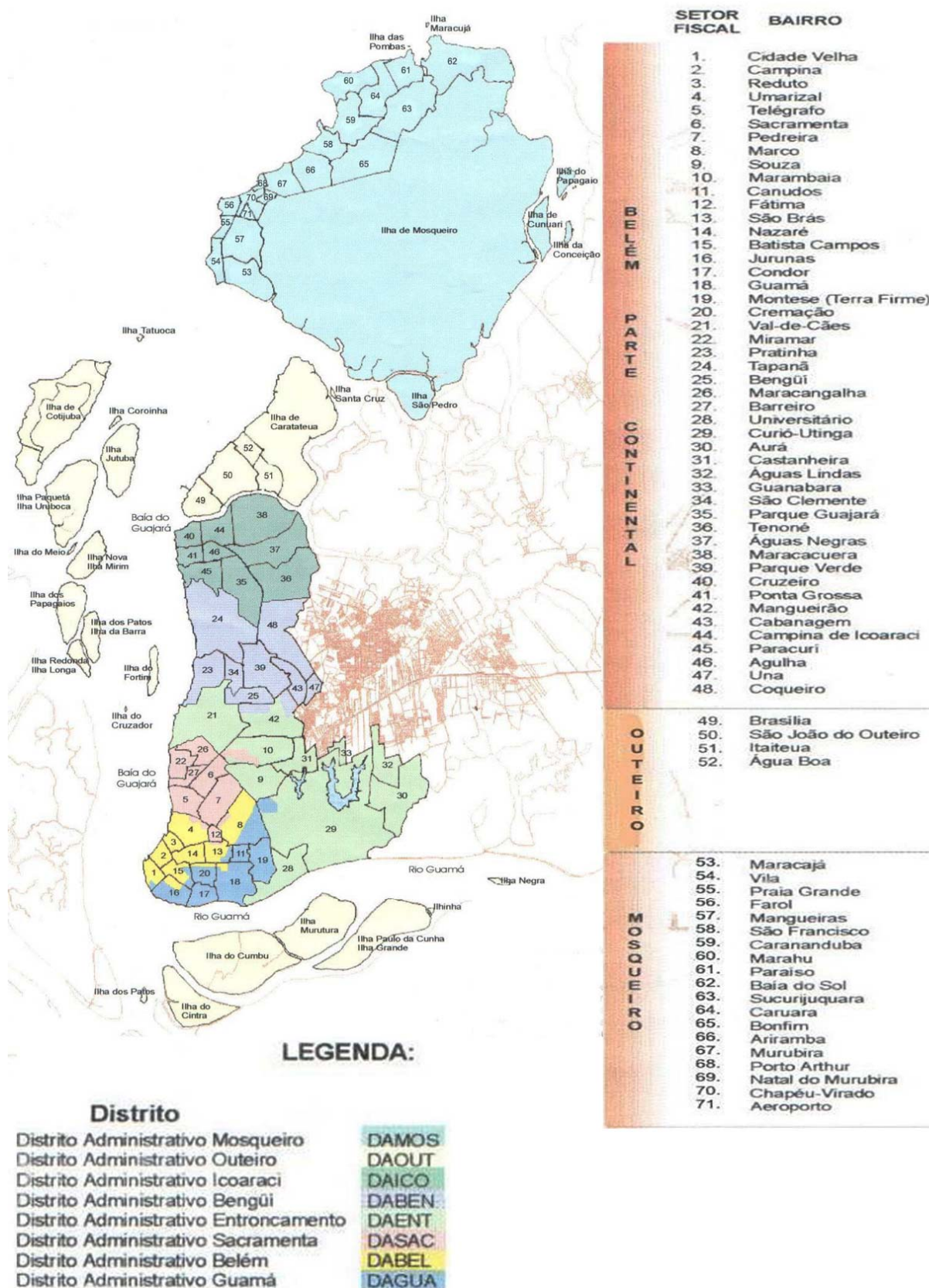


Figura 8 - Área urbana do município de Belém, PA, dividida em oito distritos administrativos com 71 bairros.

4.3. Classificação Entomológica

Os insetos coletados em Maceió eram colocados em gaiolas especiais com malha fina, separados de acordo com o local e data da coleta. Após a coleta, os espécimes eram levados ao laboratório, separados por sexo, pois apenas as fêmeas são hematófagas, e identificados usando-se chaves dicotômicas entomológicas. Os insetos eram então separados, armazenados em tubos de microcentrífuga e congelados para posterior pesquisa de larvas de *W. bancrofti* pela técnica da PCR.

Os mosquitos capturados em Belém, após separação por sexo e identificação específica, eram mantidos congelados. No momento do seu envio para análise no laboratório de Filariose do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, eram acondicionados em caixas térmicas, com gelo seco para manutenção da temperatura e então despachados para Maceió por via aérea.

4.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O sistema de PCR utilizado para identificação das larvas do parasito porventura existentes nos mosquitos foi baseado na amplificação de um fragmento gênico repetitivo de *W. bancrofti*, denominado SspI (ZHONG *et al.*, 1996; NICOLAS *et al.* 1996; HOTI *et al.*, 2001). Neste sistema são utilizados dois iniciadores espécie-específicos: NV1 (5'-CGTGATGGCATCAAAGTAGCG-3') e NV2 (5'-CCCTCACTTACCATAAGACAA-3'), desenhados a partir da clonagem e caracterização da sequência SspI.

Para se evitar contaminação com amplicons, todo o procedimento de pré-amplificação era executado em local previamente esterilizado com luz ultravioleta.

4.4.1 Padronização e Otimização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Uma vez que não existe um método padronizado da PCR para diagnóstico da *W. bancrofti* em mosquitos foi necessária sua otimização para realização da reação em nossas condições de laboratório.

Para avaliar diferentes métodos de extração de DNA, foram utilizados como controles positivos mosquitos experimentalmente infectados em laboratório obtidos através de xenodiagnóstico e microfilárias isoladas de sangue de pacientes. Como controles negativos foram utilizados mosquitos negativos oriundos de criação no insetário do próprio laboratório. Todas as amostras eram mantidas a - 20°C até o uso.

Foram testados cinco diferentes métodos para extração do DNA dos parasitos, a saber: fervura a 90°C durante 5 minutos (VASUKI *et al.*, 2001; 2003) com o uso adicional de

Proteinase K (100 µg/ml); fervura a 100°C durante 10 minutos; Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, USA), de acordo com as instruções do fabricante; técnica descrita por Nicolas e colaboradores (1996) (Apêndice). O DNA extraído por estes diferentes protocolos foi sempre concentrado usando-se membrana Microcon (YM-100, Millipore®), e utilizado como molde (*template*) na reação da PCR. Os resultados obtidos foram comparados com a técnica considerada padrão do Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1987).

Foram igualmente testadas, para otimização da reação, diferentes concentrações dos reagentes para amplificação (Pré-mix) e dos iniciadores (10, 20, 200, 400 pM), e programações do termociclador.

Tabela 1

Volumes dos reagentes testados para amplificação de DNA de *Wuchereria bancrofti* na reação em cadeia da polimerase (PCR).

Reagentes	Pré-Mix 1 (µL)	Pré-Mix 2 (µL)	Pré-Mix 3 (µL)	Pré-Mix 4 (µL)	Pré-Mix 5 (µL)
Tampão	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
DNTP	1,5	0,5	2,5	1,0	0,2
NV1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
NV2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
MgCl ₂	1,0	1,0	1,5	0,75	0,75
DNA	2,0	2,0	1,0	2,0	2,0
Taq	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3
H ₂ O	15,5	14,5	15,0	16,25	17,25
Volume Final	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0

Uma vez padronizada, a PCR foi realizada numa mistura de KCl 50 mM, Tris HCl 10mM/pH 8,4, MgCl₂ 1,5 mM, nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a 200 µM, iniciadores NV1 e NV2 na concentração de 20 pM cada, H₂O milli-Q autoclavada, Taq DNA polimerase à 1,5 U/µL e 4µL de extrato de DNA (volume final de 25 µL/tubo). Como controle positivo foi utilizado DNA previamente extraído de mosquitos experimentalmente infectados com *W. bancrofti*, e como controle negativo foi adicionado ao tubo, DNA de mosquitos não infectados.

A programação do termociclador (PCR Express ThermoHybaid, UK) consistiu em 35 ciclos a 92°C durante um minuto para desnaturação, 55°C por um minuto para anelamento e 72°C por um minuto para extensão.

4.4.2 Ensaio de Especificidade e Sensibilidade da PCR

Uma vez que na área estudada existem mosquitos da espécie *C. quinquefasciatus* infectados com o filarídeo de cães *Dirofilaria immitis* (BRITO *et al.*, 2000), foi necessário verificar a especificidade dos iniciadores utilizados para amplificação do DNA de *W. bancrofti*, para se avaliar a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas. Para isto, amostras de DNA extraído de *W. bancrofti* e de *D. immitis* foram submetidos à PCR usando os iniciadores específicos para *W. bancrofti* NV1 e NV2. Em todas as reações realizadas foram sempre incluídos controles positivo e negativo.

A sensibilidade dos métodos de extração foi determinada em termos da concentração de DNA do parasito (12ng, 1200pg, 120pg, 12pg, 1,2pg e 12pg) e quantidade de microfilárias detectadas pela reação (100 mf, 50 mf, 10 mf, 5 mf e 1 mf).

4.4.3 Otimização do Tamanho do Lote (*pool*) de Mosquitos.

Não existe na literatura consenso com relação ao tamanho do lote de mosquitos usado para extração de DNA. É necessário se estabelecer o número mínimo de insetos a serem examinados em conjunto, sem que se altere a sensibilidade do método. Para tal foram utilizados lotes de cinco, dez, 15, 20, 25, 30 e 35 mosquitos naturalmente infectados.

4.4.4 Visualização do Produto Amplificado

A análise dos produtos amplificados pela PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, impregnado com 3,0 µL de brometo de etídio (4 mg/µL). Para aplicação no gel foram utilizados 9,0 µL de produto de amplificação e 1,0 µL de tampão de amostra (BlueJuice™ Gel Loading buffer, Invitrogen Corporation, USA), e os marcadores de peso molecular Phi X 174 RF (Invitrogen Corporation, USA) e 100 bp DNA Ladder (Invitrogen Corporation, USA). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida TBE 1x (Tris Base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 0,5 M – pH 8,0-H₂O milli-Q autoclavada) durante uma hora a 5V/cm. Após a corrida o gel de agarose foi visualizado sob transluminador ultravioleta (Vilber Lourmat TFX-20.M), sendo fotodocumentado (Vilber Lourmat DP-001 FDC) e analisado com o auxílio de um programa de computação (PhotoCaptMW for Windows ver 10.01, Vilber Lourmat).

Para revelar o produto da PCR nos experimentos realizados para avaliação da especificidade e sensibilidade da PCR foi utilizado gel de poliacrilamida 6% corado pela prata (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Foram consideradas positivas as amostras do produto da PCR que apresentaram o fragmento de 188 pb amplificado.

5. RESULTADOS

Entre as diferentes concentrações dos iniciadores testadas (10, 20, 200, 400 pM), aquelas capazes de amplificar o DNA do parasito em nossas condições foram as de 10 e 20 pM. Nas concentrações mais altas testadas (200 e 400 pM) não houve amplificação da sequência específica (Figura 9).

Considerando a técnica do Fenol-Clorofórmio como padrão ouro, das demais técnicas de extração de DNA testadas (Apêndice) o método que se mostrou mais simples de extração do DNA de *W. bancrofti* foi aquele realizado sob fervura a 100°C por 10 minutos (Figura 10).

Devido ao baixo rendimento ou dificuldade de execução da técnica ou ainda a baixa reprodutibilidade, os demais métodos de extração foram considerados ineficientes em nossas condições de laboratório.

Entre as diferentes concentrações dos reagentes para amplificação do DNA testadas, a que apresentou os melhores resultados foi o pré-mix de número 5 (Tabela 1) devido a melhor visualização das bandas diagnóstico (Figuras 11 e 12)

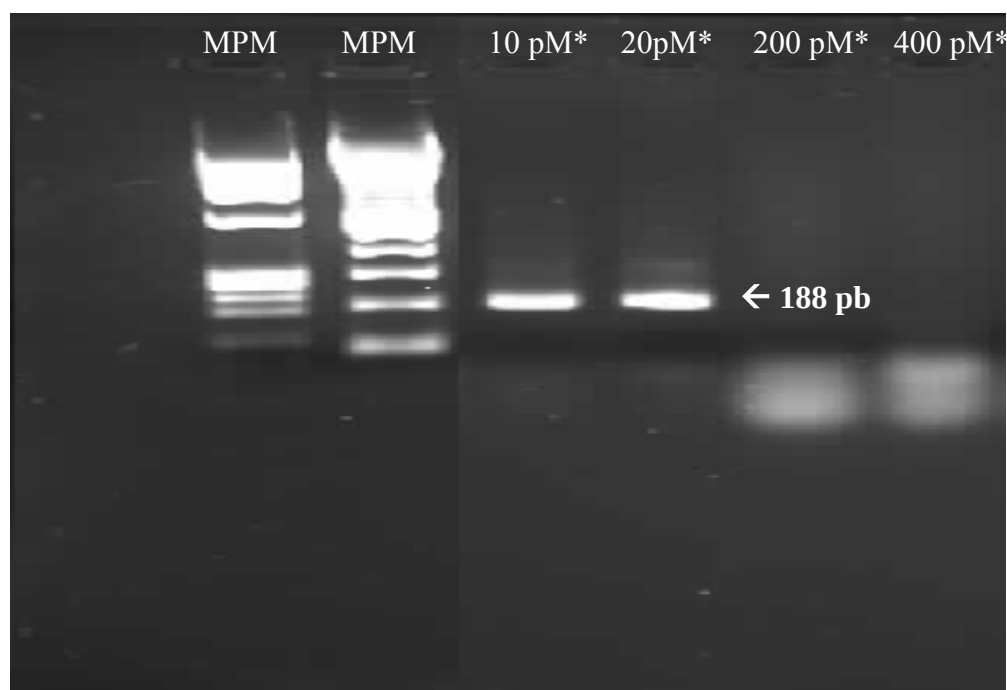


Figura 9 - Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz UV. Produto da amplificação de DNA extraído de microfilárias puras isoladas pela técnica de Fervura, através da PCR realizada com diferentes concentrações dos iniciadores (*Concentração do iniciador)

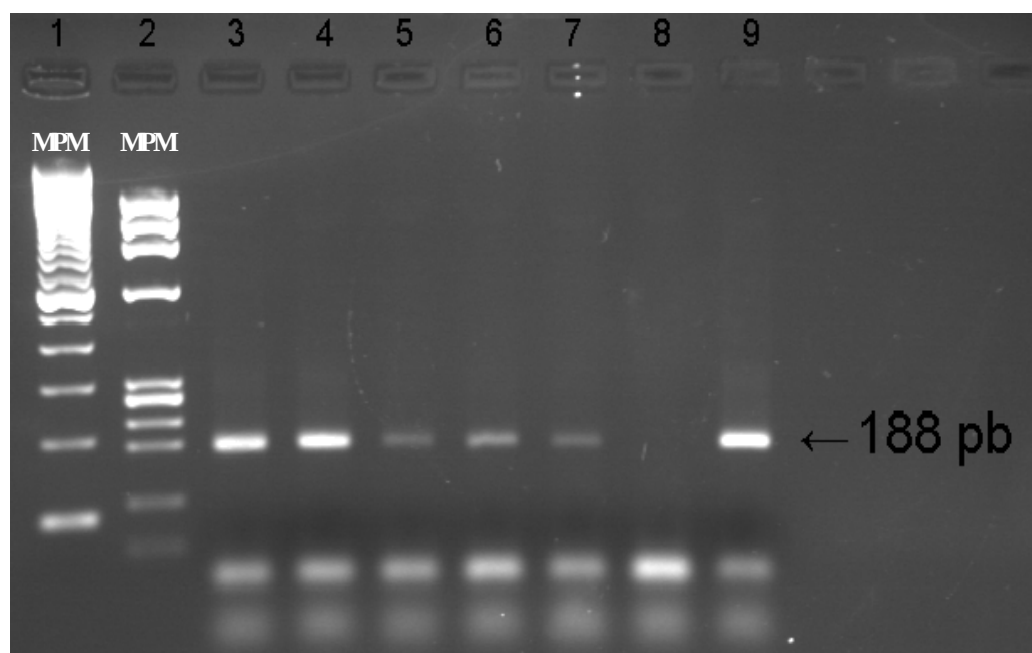


Figura 10 - Comparação entre a técnica da Fervura e a técnica do Fenol-Clorofórmio para extração de DNA de *Wuchereria bancrofti*. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz UV. Poço 1: Padrão de peso molecular 100 pb; Poço 2: Padrão de peso molecular (ϕ X 174 RF); Poços 3 e 4: 5 mosquitos (*Fervura*); Poços 5 e 6: 10 mosquitos (*Fervura*). Poços 7 e 8: 5 mosquitos (*Fenol-Clorofórmio*); Poço 9: 10 mosquitos (*Fenol-Clorofórmio*).

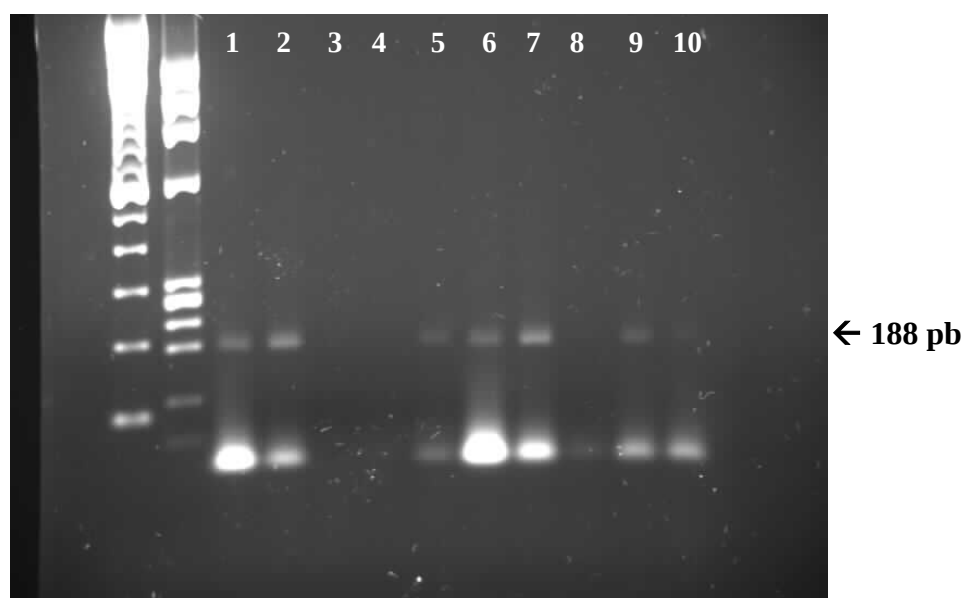


Figura 11 - Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz UV. Amostras de 1-5 (100 mf, 50 mf, 10 mf, 5 mf e 1 mf respectivamente) pré-mix 1; amostras de 6-10 (100 mf, 50 mf, 10 mf, 5 mf e 1 mf respectivamente) pré-mix 2.

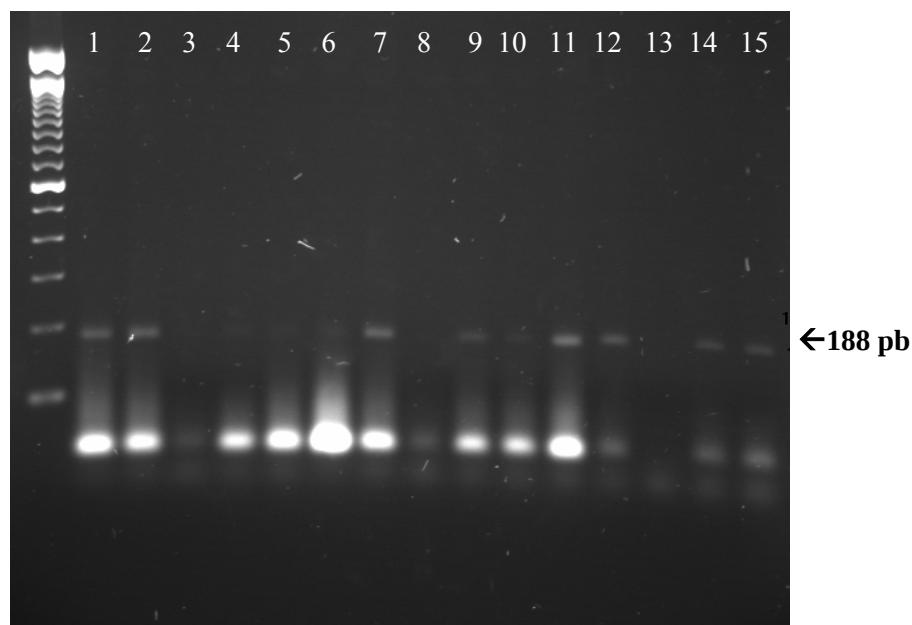


Figura 12 - Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz UV. Amostras de 1-5 (100 mf, 50 mf, 10 mf, 5 mf e 1 mf respectivamente) pré-mix 3; amostras de 6-10 (100 mf, 50 mf, 10 mf, 5 mf e 1 mf respectivamente) pré-mix 4; amostras de 11-15 (100 mf, 50 mf, 10 mf, 5 mf e 1 mf respectivamente) pré-mix 5.

A sensibilidade dos métodos de extração foi determinada em termos da concentração de DNA revelada e quantidade de parasitos detectados pela técnica. A detecção de DNA pela PCR se mostrou sensível o suficiente para detectar apenas uma microfilária na amostra (Figura 13) ou revelar DNA de *W. bancrofti* até uma concentração de 1,2 pg de DNA (Figura 14)

A especificidade da técnica foi demonstrada utilizando-se os iniciadores NV1 e NV2, que amplificaram somente o DNA extraído de microfilárias de *W. bancrofti*, mas não o extraído de filárias de *D. immitis* (Figura 14). Este resultado mostra que larvas de *D. immitis* porventura existentes no vetor não serão reveladas com os iniciadores selecionados, assegurando a especificidade da reação.

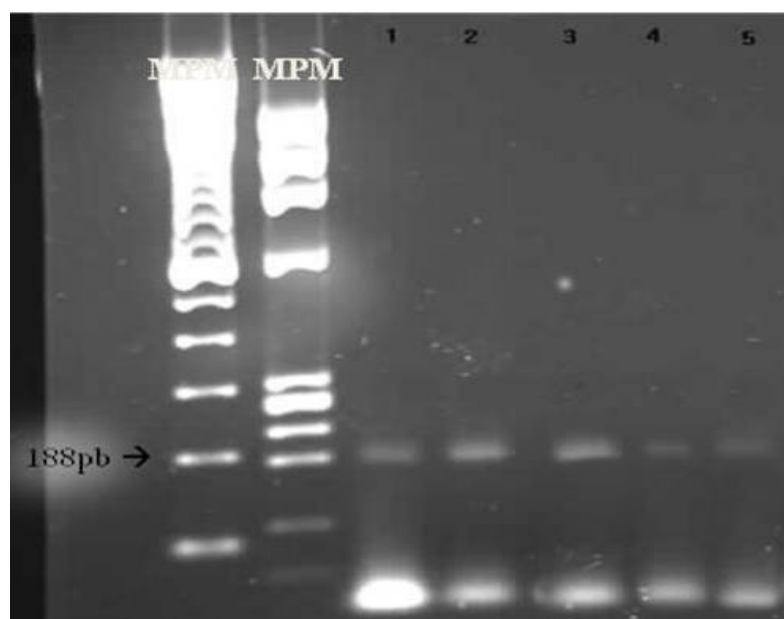


Figura 13 – Produtos amplificação obtidos através da PCR, utilizando os iniciadores NV1 e NV2 de DNA extraído pela técnica de Fervura de diferentes quantidades de microfilárias de *Wuchereria bancrofti*. Padrão de peso molecular 100 pb e Padrão de peso molecular (ϕ X 174RF). Poço 1: 100 microfilárias; Poço 2: 50 mf; Poço 3: 10 mf; Poço 4: 5 mf; Poço 5: 1 mf

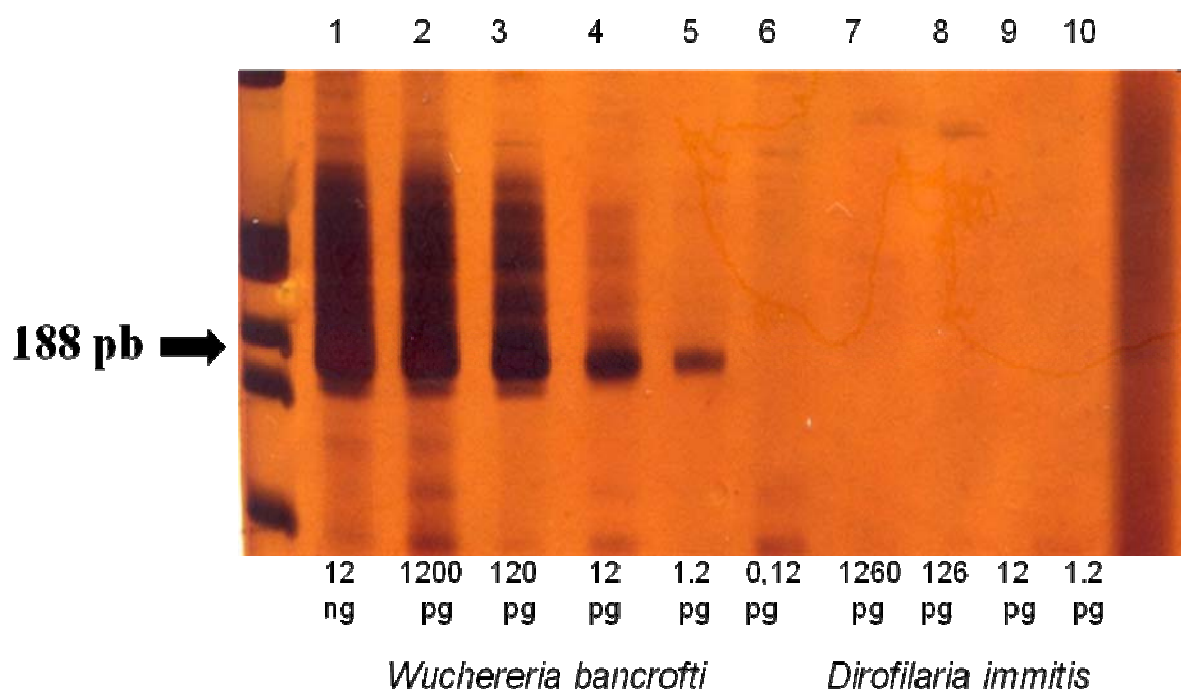


Figura 14 - Amplificação de diferentes concentrações de DNA de *Wuchereria bancrofti* e *Dirofilaria immitis* com os iniciadores específicos NV1 e NV2, revelados em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata. Poços 1-6: 12ng, 1.200pg, 120pg, 12pg, 1.2pg e 0,12 pg de DNA de *Wuchereria bancrofti*, respectivamente; Poços 7-10 12ng, 1.200pg, 120pg, 12pg, 1.2pg e 0,12pg de DNA de *Dirofilaria immitis* respectivamente.

A extração de DNA de *W. bancrofti* se mostrou mais eficiente quando lotes de cinco, dez e 15 mosquitos foram utilizados. Para assegurar a sensibilidade e reprodutibilidade da técnica o tamanho escolhido para o restante dos experimentos foi o de cinco mosquitos (Figura 15).

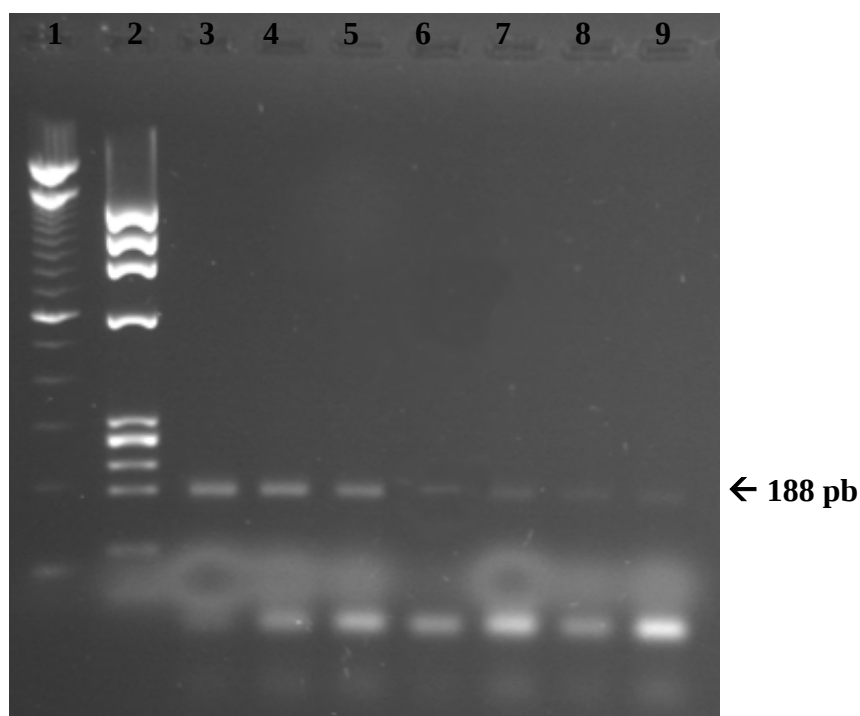


Figura 15 - Gel de Agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz UV para revelar DNA extraído de mosquitos infectados. Poço 1: Padrão de peso molecular 100 pb; Poço 2: Padrão de peso molecular (ϕ X 174 RF); Poço 3: 5 mosquitos; Poço 4: 10 mosquitos; Poço 5: 15 mosquitos ; Poço 6: 20 mosquitos; poço 7: 25 mosquitos; poço 8: 30 mosquitos e poço 9: 35 mosquitos.

5.1. Xenomonitoramento dos mosquitos capturados em Maceió-AL

Foram examinados 2.618 mosquitos fêmeas provenientes dos bairros considerados endêmicos para filariose linfática na cidade de Maceió-AL. Destes, 1.500 mosquitos foram capturados no período de 2004-2005. De 2005-2006 foram coletados 384 insetos e o restante 699 mosquitos foram obtidos no período de 2006-2007. Em inquéritos hemoscópicos realizados em paralelo nos moradores destas áreas, não foram encontrados microfilarêmicos (FONTES *et al.*, 2005b). Dos mosquitos examinados, 2.136 (82,7%) estavam ingurgitados e 447 (17,3%) não ingurgitados.

Em nenhum dos mosquitos investigados através da técnica de PCR, provenientes da área endêmica de filariose linfática em Maceió, foi amplificada a sequência gênica específica do DNA de *W. bancrofti*.

5.2. Xenomonitoramento dos mosquitos capturados em Belém-PA

Foram examinados 58.926 mosquitos, provenientes de todos os oito distritos administrativos da cidade de Belém-PA. Destes, 9.100 (15,44%) foram coletados na mesma área onde foi realizado inquérito hemoscópico da população pelo método de gota espessa, e examinados sem informação de como se procedeu a coleta com relação ao xenomonitoramento (Tabela 2).

Tabela 2

Mosquitos capturados em Belém-PA e processados pela PCR para avaliação da infecção natural por *Wuchereria bancrofti*.

Distrito ^a	Localidade	Nº de mosquitos processados	Amostras positivas
DAICO	Campina	600	0
DAICO	Cruzeiro	50	0
DAICO	Ponta Grossa	300	0
DAICO	Paracuri	250	0
DAMOS	Baía do Sol	800	0
DAMOS	Carananduba	200	0
DAMOS	Murubira	50	0
DAMOS	Vila	50	0
DAMOS	Maracajá	50	0
DAOUT	Fidélis	100	0
DAOUT	Água Boa	50	0
DAOUT	Brasília	100	0
DAOUT	Itaiteuá	50	0
DABEN	Cabanagem	900	0
DABEN	Una	300	0
DABEN	Coqueiro	50	0
DABEN	Tapanã	1.100	0
DAENT	Guanabara	150	0
DAENT	Águas Lindas	450	0
DAENT	Marambaia	1.100	0
DAENT	Castanheira	50	0
DASAC	Sacramenta	1.900	0
DASAC	Telégrafo	150	0
DASAC	Pedreira	300	0
TOTAL		9.100	0

^a Distritos administrativos de Belém-PA. Vide mapa (Figura 8)

De 29.094 mosquitos capturados na mesma área da cidade onde em paralelo se realizou um inquérito hemoscópico da população pelo exame da gota espessa, 25.793 (88,65%) estavam ingurgitados e 3.301 (11,35%) não ingurgitados (Tabela 3).

Tabela 3

Mosquitos capturados em Belém-PA e processados pela PCR para avaliação da infecção natural pela *Wuchereria bancrofti*.

Distrito ^a	Localidade	Número de mosquitos processados			Amostras positivas
		Ingurgitados	Não Ingurgitados	Total	
DAICO	Paracuri	2.215	-	2.215	0
DAICO	Maracacuera	2.815	-	2.815	0
DAICO	Campina	1.004	303	1.307	0
DAGUA	Guamá	6.587	800	7.387	0
DAGUA	Condor	1.750	670	2.420	0
DAGUA	Cremação	2.174	635	2.809	0
DAGUA	Jurunas	4.903	664	5.567	0
DABEL	Marco	4.032	229	4.261	0
DAICO	Águas Negras	313	-	313	0
TOTAL		25.793	3.301	29.094	0

^a Distritos administrativos de Belém-PA. Vide mapa (Figura 8)

Foram estudados também 20.732 mosquitos, dos quais 17.073 (82,35%) estavam ingurgitados e 3.659 (17,65%) não ingurgitados (Tabela 4), coletados em áreas nas quais a população havia sido submetida ao exame de sangue para pesquisa de antígeno solúvel no sangue pelo método da imunocromatografia rápida (*ICT card*).

Tabela 4

Mosquitos capturados em Belém-PA e processados pela PCR para avaliação da infecção natural pela *Wuchereria bancrofti*.

Distrito ^a	Localidade	Número de mosquitos processados			Amostras positivas
		Ingurgitados	Não ingurgitados	Total	
DAICO	Campina	2.537	303	2.840	0
DAICO	Agulha	1.466	450	1.916	0
DAICO	Ponta Grossa	1.748	469	2.217	0
DAGUA	Terra Firme	1.383	195	1.578	0
DAGUA	Jurunas	1.983	264	2.247	0
DAGUA	Guamá	4.046	1.137	5.183	0
DABEN	Tapanã	1.449	245	1.694	0
DASAC	Pedreira	2.461	596	3.057	0
TOTAL		17.073	3.659	20.732	0

^a Distritos administrativos de Belém-PA. Vide mapa (Figura 8)

Nenhum indivíduo microfilarêmico ou antígeno-positivo foi detectado nas áreas de Belém relacionadas nas tabelas 2, 3 e 4 (ROCHA *et al.*, 2005). Igualmente não foi amplificado DNA de *W. bancrofti* nos mosquitos investigados através da técnica de PCR nestas mesmas áreas, ou seja, não havia na amostra de mosquitos capturados em Belém exemplares naturalmente infectados com o parasito. A Figura 16 mostra um gel de agarose feito com material extraído de mosquitos provenientes da cidade de Belém, para ilustrar um resultado da amplificação do DNA extraído dos mesmos.

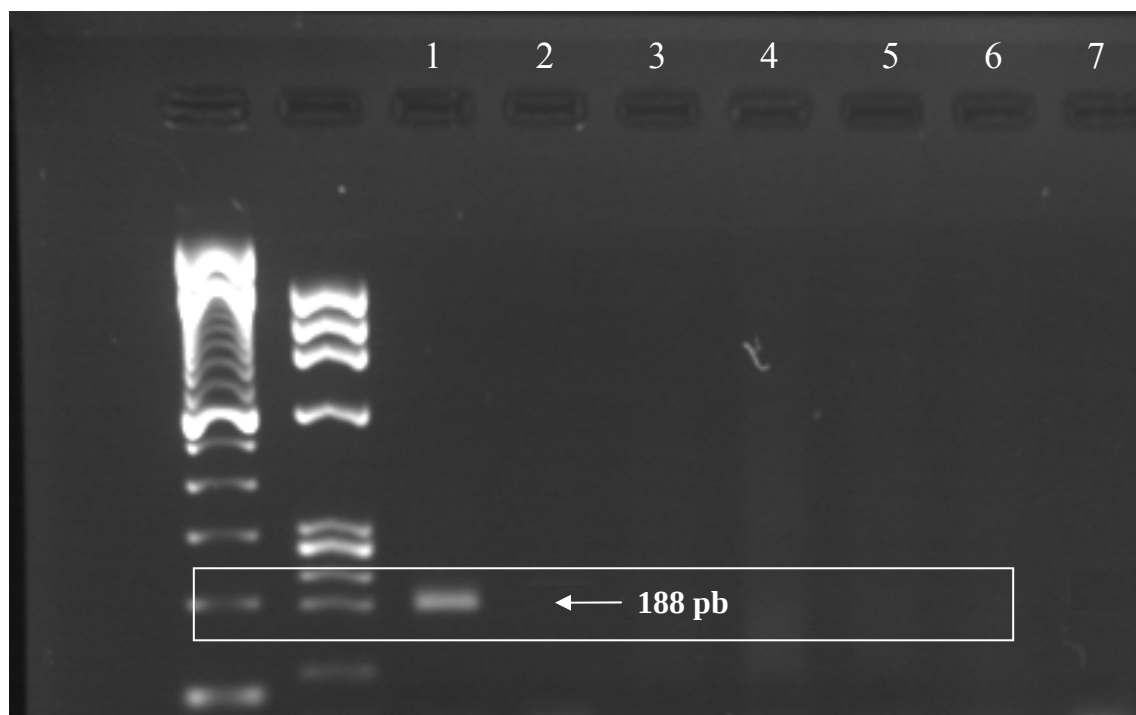


Figura 16 – Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz UV para detecção de fragmento gênico SspI de *W. bancrofti* em mosquitos coletados em Belém-PA. Poço 1: Padrão de peso molecular (ϕ X 174 RF). Poço 2: Padrão de peso molecular 100pb; Poço 3: Controle positivo (DNA extraído de mosquitos experimentalmente infectados com microfilárias de *W. bancrofti* isoladas de sangue de paciente); Poço 4: Controle negativo (mosquitos não infectados); Poços 5 a 7: DNA extraído de mosquitos capturados em distritos da cidade de Belém-PA.

6. DISCUSSÃO

O Programa Global para Eliminação da Filariose Linfática (GPELF) (WHO, 2000), lançado após a resolução 50.29 da Assembléia Mundial de Saúde (WHA 50.29), foi adotado pela maioria dos países nos quais a bancroftose é endêmica (GYAPONG & TWUM-DANSO, 2006). Após uma primeira etapa que consistiu no mapeamento e determinação da prevalência da filariose nas áreas endêmicas, programas regionais de controle foram postos em prática. A principal estratégia adotada para atingir a eliminação da transmissão da endemia foi a administração de repetidos ciclos de tratamento em massa com a utilização da dietilcarbamazina (DEC) (GYAPONG *et al.*, 2005; LAMMIE *et al.*, 2007). No entanto, algumas áreas endêmicas optaram por uma variante do tratamento em massa com distribuição de sal enriquecido com DEC ou, como no caso de Maceió e Belém, pela busca ativa e tratamento seletivo dos parasitados (HOUSTON, 2000; FREITAS, 2004; FONTES *et al.*, 2005a; LAMMIE *et al.*, 2007).

Na fase seguinte, com as medidas de controle em andamento, a preocupação tem sido determinar quais as ferramentas para diagnóstico da infecção humana e no vetor que melhor traduzem a eficácia das medidas adotadas, e que permitam monitorar o progresso dos programas. As opções de diagnóstico existentes, que poderiam ser utilizadas como ferramentas para verificação da eliminação da transmissão estão listadas nos itens a seguir (WEIL & RAMZY, 2006):

- Determinação clínica da prevalência de doença aguda ou crônica (hidrocele, linfedema e elefantíase). No entanto, este não é um indicador sensível de transmissão ativa pois na fase aguda da infecção os parasitados são frequentemente assintomáticos, o que dificulta seu diagnóstico. Além disso, o diagnóstico diferencial das manifestações crônicas pode ser difícil, pois outras patologias podem apresentar quadros semelhantes. Apesar disto, o aparecimento de casos de adenolinfangite já foi sugerido como indicador para detecção de transmissão residual em Ilhas do Pacífico (DURRHEIM *et al.*, 2003).
- Determinação da prevalência de parasitos sangüíneos na população pela técnica da gota espessa. É um indicador muito utilizado. No entanto, em algumas áreas endêmicas é dificultado pela periodicidade noturna das microfilárias, com a necessidade de colheita de sangue à noite, o que frequentemente traz riscos à segurança dos técnicos. A gota espessa de sangue tem também a desvantagem de ser pouco sensível para detecção de indivíduos com baixa microfilaremia (<10mf/ml de sangue) (FONTES, 1996). Também não é útil para o diagnóstico de infecções

recentes, uma vez que o período pré-patente da bancroftose é longo, e o método é incapaz de detectar infecções durante este período.

- Verificação da antigenemia por métodos imunológicos (imunocromatografia ou ensaio imunoenzimático). É um método muito sensível e específico, e com a vantagem de poder colher o material a qualquer hora do dia. No entanto, tem a desvantagem de permanecer positivo por no mínimo um ano após a eliminação dos parasitos sanguíneos (MALLA *et al.*, 2007). O custo elevado destes exames também inviabiliza o uso em larga escala.
- Detecção de anticorpos circulantes. É pouco específico, e não é capaz de distinguir infecções novas de passadas (ROCHA & FONTES, 2000). Testes, mais recentemente desenvolvidos, baseados na pesquisa de anticorpos contra antígenos recombinantes, têm demonstrado maior especificidade (LAMMIE *et al.*, 2004). No entanto, ainda não estão disponíveis comercialmente.
- Pesquisa de larvas do parasito nos insetos vetores da infecção. Pode ser feito através do método tradicional baseado na dissecação e microscopia, ou pela técnica da PCR. Ambas as técnicas são capazes de estimar em tempo real e de forma pontual a situação epidemiológica da filariose em uma determinada área. Apesar da dissecação de mosquitos fornecer o índice de infecção e de infectividade, é bastante laboriosa e sujeita a falhas humanas. Existe também a possibilidade de infecção do vetor por outros filarídeos, o que pode dificultar o diagnóstico. Por estas razões, esta técnica vem sendo substituída pela PCR, principalmente quando a prevalência e densidade de microfilárias são baixas. A PCR além de maior sensibilidade nestes casos tem a vantagem prática de permitir o processamento de vários exemplares de mosquitos de uma só vez (RAMZY *et al.*, 1997; CHADEE *et al.*, 2002; WILLIAMS *et al.*, 2002).

Os métodos acima descritos têm sido avaliados em áreas com diferentes situações epidemiológicas, mas ainda não há um consenso, tampouco recomendação da OMS daquele mais adequado para avaliar os Programas de Eliminação. Além disso, na maioria das áreas endêmicas estudadas a prevalência da infecção era elevada antes da intervenção, o que contrasta com a situação existente em Maceió ou Belém que no momento da execução das medidas de controle já apresentavam índices de prevalência da parasitose considerados baixos. Neste estudo, portanto, pretendeu-se avaliar a PCR como ferramenta epidemiológica para a verificação do impacto das medidas de controle na transmissão e infecção por *W. bancrofti* em áreas de baixa endemicidade. Em geral esta técnica é usada para avaliação do efeito da administração de drogas em massa (MDA) em áreas com prevalências elevadas de

filariose, onde em geral os indivíduos positivos apresentam alta microfilaremia (FARID *et al.*, 2007; BOCKARIE, 2007).

Aliado a ausência de uma metodologia padronizada para condução do acompanhamento epidemiológico dos programas de controle, não existe também acordo com relação ao mínimo de prevalência de infecção humana ou vetorial, abaixo do qual a endemia não se mantém.

Vários são os fatores que podem influenciar a transmissão da parasitose. A depender da densidade de microfilárias no sangue do hospedeiro, a eficiência do vetor para transmitir a *W. bancrofti* pode variar. Um trabalho conduzido em Maceió mostrou que os maiores valores de eficiência do *Culex*, 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 (> 500 mf/ml de sangue) ou baixa (1-100 mf/ml de sangue) microfilaremia (BRITO *et al.*, 1998).

Um outro parâmetro que pode determinar a manutenção da transmissão e que ainda não está esclarecido é a quantidade de picadas de mosquitos com larvas infectantes necessária para o surgimento de um novo caso (HAIRSTON & DEMEILLON, 1968; SOUTHGATE, 1984). No entanto, existe uma estimativa de que seriam necessárias de 2.000 ou até mais de 100.000 picadas de mosquitos com larvas infectantes por indivíduo, para que houvesse a transmissão da bancroftose. Segundo alguns autores, um número de picadas abaixo desta faixa não sustentaria a filariose linfática como uma doença endêmica (WITT & OTTESEN, 2001).

Tendo em vista o exposto, a conduta adotada em Maceió e em Belém para determinar o ponto no qual as medidas de controle poderiam ser interrompidas, foi a negatificação dos índices de prevalência humana e vetorial. Daí em diante as intervenções para alcançar a interrupção da transmissão seriam substituídas pela vigilância epidemiológica.

No presente estudo optou-se pela utilização de um ensaio molecular como PCR, pela sua especificidade e possibilidade de processamento de um grande número de amostras em curto espaço de tempo. A PCR é mais sensível e menos laboriosa que a dissecção para diagnóstico da infecção vetorial (DISSANAYAKE *et al.*, 1991; SIRIDEWA *et al.*, 1994; ZHONG *et al.*, 1996). Pelo exame de mosquitos através da PCR é possível localizar uma área endêmica e verificar a existência de transmissão.

A técnica de xenomonitoramento utilizada para coleta dos mosquitos foi escolhida, pois deste modo obtém-se uma medida direta, em tempo real, do potencial de transmissão vetorial na área de coleta, e da ocorrência de microfilaremia da população. Na prática, a

maioria do DNA de *W. bancrofti* encontrado nos mosquitos a partir de xenomonitoramento é proveniente de microfilárias recém ingeridas ou de estádios pré-infectantes (larvas de 1º e 2º estádios) do parasito. Desta forma, o xenomonitoramento pode ser utilizado como um meio de amostrar populações endêmicas para a presença de microfilárias, mas não como uma medida de infectividade do vetor, ou seja, os níveis de transmissão do parasito (WEIL & RAMZY, 2006).

Estudos em laboratório baseados na adição de números conhecidos de larvas de *W. bancrofti* em mosquitos não infectados, mostraram que a técnica de PCR baseada no fragmento gênico SspI é sensível o bastante para detectar 0,1 pg de DNA genômico de *W. bancrofti* (CHANTEOU *et al.*, 1994; ZHONG *et al.*, 1996). Entretanto, em nossas condições de laboratório só foi possível a detecção a partir de 1,2 pg de DNA do parasito. Esta diferença de sensibilidade, no entanto, não altera a capacidade de detectar o parasito no vetor, uma vez que uma microfilária tem aproximadamente 100 pg de DNA. Desta forma a presença de uma única microfilária oferece material genético suficiente para detecção do DNA do parasito (LIZZOTE *et al.*, 1994).

Apesar do largo uso da técnica da PCR ainda existe a necessidade de padronização metodológica, uma vez que, os protocolos utilizados nem sempre são reprodutíveis (WILLIAMS *et al.*, 2002). Diferentes pesquisadores usam métodos de extração e amplificação distintos, havendo divergências quanto, por exemplo, a sensibilidade da técnica e número de mosquitos utilizados por lote para extração e detecção do DNA (ZHONG *et al.*, 1996; FURTADO *et al.*, 1997; WILLIAMS *et al.*, 2002). Isto dificulta a comparação de resultados produzidos pelos diferentes laboratórios.

Apesar do protocolo de extração de DNA com fenol-clorofórmio ser o padrão ouro por extrair de forma limpa e íntegra uma maior quantidade de DNA, apresenta a desvantagem de ser trabalhoso, exigindo um tempo longo para sua execução, além de envolver a manipulação de compostos tóxicos. Assim, a escolha da técnica da fervura, descrita por Vasuki e colaboradores (2003) se deu devido a fatores como: baixo custo, simplicidade e velocidade de execução, e de extração de DNA suficientes para detecção pela PCR.

A otimização das condições da PCR, mostrou que é possível utilizar uma menor concentração e volume dos componentes da reação (iniciadores, deoxinucleotídeos, e Taq), mantendo sua capacidade de amplificação e reduzindo os custos do exame.

Embora as amostras de mosquitos possam conter substâncias inibidoras à enzima Taq polimerase, no presente estudo esta inibição não foi evidenciada. O método utilizado foi

apropriado para purificar o DNA molde, não sofrendo a ação de possíveis substâncias inibidoras como restos celulares (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

A escolha do par de iniciadores, e conseqüentemente da sequência a ser amplificada, levou em consideração seu uso consagrado pela maioria dos autores (WILLIAMS *et al.*, 2002; FURTADO *et al.*, 1997; ZHONG *et al.*, 1996). No entanto, havia a necessidade de determinar a possibilidade de reação cruzada com *Dirofilaria immitis*, um filarídeo de cães existente nas áreas endêmicas estudadas, e que pode também ser transmitido por mosquitos da espécie *C. quinquefasciatus*. Este é o primeiro relato que demonstra que os iniciadores NV1 e NV2 não se ligam a DNA de *D. immitis*.

A quantidade de larvas de *W. bancrofti* porventura existentes nos mosquitos capturados poderia ser muito pequena, portanto, outra variável padronizada para utilização da técnica de PCR como ferramenta molecular de verificação de transmissão da bancroftose, foi o tamanho do lote (*pool*) de mosquitos a ser utilizado. Apenas o lote de cinco mosquitos se mostrou confiável quanto à reprodutibilidade e sensibilidade, sendo então escolhido como tamanho padrão. Na literatura existe uma grande variação quanto ao tamanho do lote de mosquitos a ser examinado. Em trabalhos publicados nos anos de 1990 o tamanho do lote variava de 50 a 100 mosquitos (NICOLAS *et al.*, 1996; ZHONG *et al.*, 1996; FURTADO *et al.*, 1997). Atualmente os autores têm optado por lotes de 4 a 25 mosquitos (CHADEE *et al.*, 2002; FARID *et al.*, 2007). A evidente redução na quantidade de mosquitos utilizados se deu, provavelmente, pela necessidade de aumentar a sensibilidade da técnica e garantir a reprodutibilidade da mesma, embora seja difícil comparar os resultados obtidos por diferentes autores, pois há diferenças em relação aos protocolos de extração de DNA utilizados.

A obtenção de índices negativos de infecção natural de vetores nas cidades de Maceió e Belém se deveu, provavelmente, às medidas de controle adotadas, fundamentadas basicamente na busca ativa de casos, com imediata intervenção pelo tratamento, e acompanhamento dos microfilarêmicos até que houvesse negatificação dos exames de sangue. Na cidade de Maceió este trabalho vem sendo realizado desde 1999 sem interrupção (LIMA, 2007).

O Plano de Eliminação da Filariose Linfática em andamento atualmente no Brasil inclui exames de gotas espessas de sangue da população geral, com subsequente tratamento das pessoas encontradas infectadas (FREITAS, 2004). Sempre que possível são utilizados também métodos mais sensíveis como filtração de sangue em membrana de policarbonato, e métodos imunológicos para pesquisa de antígenos como a imunocromatografia rápida (*ICT card test*) e o ensaio imunoenzimático (FONTES *et al.*, 1998; BRAUN, 2002; 2003; FONTES

et al., 2005 a). Em algumas áreas de Recife, de maior prevalência da doença, o tratamento em massa com a DEC também tem sido feito (LYRA, 2005).

É objetivo da Organização Mundial de Saúde, a eliminação da filariose linfática como problema de saúde pública no mundo até 2020 (WHO, 2000). Baseado nos dados atuais, Belém e Maceió atingirão essa meta antes da data programada. Para tal, devem ser mantidas as medidas de vigilância, com inquéritos hemoscópicos e entomológicos, a fim de detectar e tratar precocemente pacientes, para evitar o risco de ressurgimento de focos aparentemente já controlados.

Em Maceió, após o início do programa de controle, no inquérito entomológico feito pelo método de dissecação, o nível de infecção de mosquitos diminuiu de 0,07% em 1996 para 0,03% em 2001 (SILVA *et al.*, 2002). Paralelamente, a prevalência da infecção humana caiu de 2,5% de 1996, para 0,74% em 1999, 0,54% em 2000, 0,49% em 2001, 0,10% em 2002, 0,08% em 2003, 0,06% em 2004, e para 0,0% em 2005 (FONTES, 1996; FONTES *et al.*, 2005b). Na cidade de Belém-PA o índice de infecção humana decresceu ao longo das décadas de 0,017% em 1994 para 0,0% em 1999. Em 2002 e 2003, inquéritos hemoscópicos e entomológicos realizados simultaneamente na capital paraense não detectaram indivíduos microfilarêmicos ou mosquitos infectados (FONTES *et al.*, 2005a). Estes dados foram ratificados pelo uso atual do xenomonitoramento, que de maneira indireta avalia a ocorrência da infecção humana em áreas onde os insetos vetores foram coletados.

Uma vez que Maceió e Belém atualmente apresentam índices negativos de infecção humana e mosquitos, considera-se, com boa margem de certeza, que não está ocorrendo transmissão da filariose nestas cidades.

7. CONCLUSÕES

- A otimização da PCR permitiu tanto a redução no tempo necessário para realização da técnica como no custo do exame.
- Os iniciadores utilizados para determinação da infecção vetorial por *W. bancrofti* pela técnica da PCR são específicos, descartando a possibilidade de obtenção de reações cruzadas com a *Dirofilaria immitis*.
- Com o uso do xenomonitoramento, indiretamente, é possível inferir que não há microfilarêmicos nas áreas onde foram coletados os insetos vetores.
- A infecção natural negativa dos mosquitos vetores sugere a interrupção da transmissão de *Wuchereria bancrofti* em Belém –PA e Maceió-AL.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, I.; GITHURE, J.; OCHOLA, J.J.; AGURE, R.; KOECH, D.K.; RAMZY, R.M.; WILLIAMS, S.A.; HAMBURGER, J. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polimerase chain reaction employing patient's sputum. *Parasitology Research*, v. 85, p.844-849, 1999.

BELKIN, J.N. *Quinquefasciatus* or *fatigans* for the tropical. (Southern) house mosquito (Diptera: Culicidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, v.79, n.1, p.45-52, 1977.

BOCKARIE, M.J. Molecular xenomonitoring of lymphatic filariasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.77, n.4, p. 591–592, 2007.

BOCKARIE, M.J.; FISCHER, P.; WILLIAMS, S.A.; ZIMMERMAN, P.A.; GRIFFIN, L.; ALPERS, M.P.; KAZURA, J.W. Application of a polymerase chain reaction-ELISA to detect *Wuchereria bancrofti* in pools of wild-caught *Anopheles punctulatus* in filariasis control area in Papua New Guinea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.62, n.3 p.363-367, 2000.

BONFIM, C.V.; LESSA, F.; MEDEIROS, Z.; OLIVEIRA, C.M.; NETTO, M.J.E.; COSTA, J.; SANTO, M.E.E.; MEIRELES, E. Situação da filariose bancroftiana na Região Metropolitana do Recife: estudo de uma area endêmica no município de Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v.19, n.5, p. 1497-1505, 2003.

BRAUN, R.F. Eliminando a Filariose em Belém, Pará, Brasil. *Boletim RPRG das Américas – Eliminação da Filariose linfática*. Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde, OPAS/OMS, Brasília, Brasil, v. 1, n° 2, p. 1, 2003.

BRAUN, R.F. *Plano de trabalho para a eliminação da Filariose linfática*. Em Belém, Estado do Pará, Brasil. Secretaria Municipal de Saúde de Belém, Pará, impresso, 38 p., 2002.

BRITO, A.C.; FONTES, G.; WILLIAMS, P.; ROCHA, E.M.M. 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.58, n.4, p. 489-494, 1998.

BRITO, A.C.; VIANA, L.S.; DUARTE, E.M.; ROCHA, E.M.M.; FONTES, G.; REGIS, L.N. *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Maceió, Alagoas, northeast region of Brazil. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, p.210-211, 2000.

CALHEIROS, C.M.L.; FONTES, G.; WILLIAMS, P.; ROCHA, E.M.M. Experimental infection of *Culex (Culex) quinquefasciatus* and *Aedes (Stegomyia) aegypti* with *Wuchereria bancrofti*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.93, p.855-860, 1998.

CARVALHO, G. Variações morfológicas em microfilárias sanguícolas. *Revista Brasileira de Medicina*, v.12, n.4, p.209-212, 1955.

CAUSEY, O.R.; DEANE, M.P.; COSTA, O.; DEANE, L.M. Studies on the incidence and transmission of filaria, *Wuchereria bancrofti*, in Belem, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.41, n.2, p.143-149, 1945.

CHADEE, D.D.; WILLIAMS, S.A.; OTTESEN, E.A. Xenomonitoring of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes as a guide for detecting the presence or absence of lymphatic filariasis: a preliminary protocol for mosquito sampling. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.96, (Supl.2) p.S47-S53, 2002.

CHANTEAU, S., MOULIA – PELAT, J.P., GLAZIOU, P., NGUYEN, N.L., LUQUIAUD, P., PLICHART, C., MARTIN, P.M.V., CARTEL, J.L. Og4C3 circulating antigen: a marker of infection and adult worm burden in *Wuchereria bancrofti* filariasis. *The Journal of Infectious Diseases*, v.170, p.247-250, 1994.

CHERNIN, E. The Disappearance of Bancroftian Filariasis from Charleston, South Carolina. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.37, n.1, p.111-114, 1987.

CONSOLI, R.A.G.B.; de OLIVEIRA, R.L. Classificação e Principais Espécies de Importância Sanitária. In: *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*. 1ª reimp., Rio de Janeiro, Ed. Fiocruz, cap. 3, p.57-154, 1998.

COOK, G.C. History of infectious diseases: lymphatic filariasis and elephantiasis. *Journal of Infection*, v.27, p. 325-333, 1993.

COSTA, P.R.P.; VIANNA, E.E.S.; SILVEIRA JR, P.; RIBEIRO, P.B. Influência da temperatura na longevidade e viabilidade do ciclo aquático do *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 3, p.87-92, 1994.

COX, F.E.G. History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*. v.15, n.4, p.595–612, 2002.

DAVIS, N.C. A note on the malaria carrying anophelines in Belém, Pará and in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. *Revista de Malariologia*, v.10, n.1, p.54-58, 1931.

DEANE, L.M.; ROSA, D.; RACHOU, R.G.; MARTINS, J.S.; COSTA, A.; GOMES, H.; CARVALHO, M.E. A filariose bancroftiana em Maceió-AL: Resultado de um inquérito realizado em 1952. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v.5, p.17-22, 1953.

DISSANAYAKE, S.; MIN, X.; PIESSENS, W.F. Detection of amplified *Wuchereria bancrofti* DNA in mosquitoes with a nonradioactive probe. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.45, p.49-56, 1991.

DREYER, G., MEDEIROS, Z., BÉLIZ, F., VERGETTI, G., VERGETTI, A., CAFÉ, T., FONTES, G. Autochthonous *Wuchereria bancrofti* microfilaremia in the city of Maceió-Alagoas-Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.86, n.4, p.495-496, 1991.

DURRHEIM, D.N.; NELESONE, T.; SPEARE, R.; MELROSE, W. Certifying lymphatic filariasis elimination in the Pacific-the need for new tools. *Pacific Health Dialog*, v.10, n.2, p.149-54, 2003.

ERLICH, H.A. PCR technology: principles and applications for DNA amplifications. *Stockton Press*. p. 246, 1989.

FARID, H.A.; MORSY, Z.S.; HELMY, H.; RAMZY, R.M.R.; SETOUHY, M.E.; WEIL, G. A Critical appraisal of molecular xenomonitoring as a tool for assessing progress toward elimination of lymphatic filariasis. *American Journal Tropical of Medicine and of Hygiene*, v.77, n.4, p. 593-600, 2007.

FEIJÓ, R.B.; KURILENKO, N.K.; FIORI, A.M. Filariose: uma doença tropical ainda em expansão. *Revista Goiana de Medicina*, v.32, p. 79-91, 1986.

FIGUEREDO-SILVA, J.; ARAÚJO, A.; SOUTO-PADRON, T.; DREYER, G.; DE SOUZA, W. *Wuchereria bancrofti* adult filariae. In: *Anais do XIV Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica*, Caxambu, MG, v.2, p.575-576, 1993.

FISCHER, P.; BOAKYE, D.; HAMBURGER, J. Polymerase chain reaction-based detection of lymphatic filariasis. *Medical and Microbiology Immunology*, v.192, n.1, p.3-7, 2003.

FONTES, G. Aspectos epidemiológicos da filariose linfática causada pela *Wucheria bancrofti* no Estado de Alagoas. Belo Horizonte, Minas Gerais, *Tese de Doutorado* – Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, 181p. 1996.

FONTES, G.; ROCHA, E.M.M. Filaridea: *Wuchereria bancrofti* - Filariose linfática. In: NEVES D. P.; MELO A. L.; GENARO O.; LINARDI P. M. *Parasitologia Humana*. 11^a ed., Rio de Janeiro, Ed. Atheneu, cap. 35, p.299-307, 2005.

FONTES, G.; BRAUN, R.F.; FRAIHA-NETO, H.; VIEIRA, J.B.F.; PADILHA, S.S.; ROCHA, R.C.; ROCHA, E. M. M. Filariose linfática em Belém, Estado do Pará, norte do Brasil e a perspectiva de eliminação. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasil*, v. 38, n. 2, p.131-136, 2005a.

FONTES, G.; BRITO, A.C.; CALHEIROS, C.M.L.; ANTUNES, C.M.F.; ROCHA, E.M.M. Situação atual da filariose bancroftiana na cidade de Maceió, Estado de Alagoas-Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v.10, Supl 2, p.293-300, 1994.

FONTES, G.; ROCHA, E.M.M.; BRITO, A.C.; ANTUNES, C.M.F. Lymphatic Filariasis in Brazilian Urban Area (Maceió, Alagoas). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.93, n.6, p.705-710, 1998.

FONTES, G.; ROCHA, E.M.M.; BRITO, A.C.; FIREMAN, A.T.; ANTUNES, C.M.F. The microfilarial periodicity of *Wuchereria bancrofti* in northeastern Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.94, n.4, p.373-379, 2000.

FONTES, G.; ROCHA, E.M.M.; BRITO, L.M.; BARROS, H.C.S.; LIMA, A.D.S.; CAVALCANTE, A.L. Situação atual da Filariose linfática por *Wuchereria bancrofti* (COBBOLD, 1877) em áreas endêmicas definidas de Maceió – AL. *Livro de Resumos do XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia*, p.148, 2003.

FONTES, G.; ROCHA, E.M.M.; MELO, E.R.; LIMA, A.R.V. ; LEITE, A.B. ; SILVA, V.A. N. ; BARROS, H.C.S. ; FREITAS, H. . Análise epidemiológica atual da filariose linfática bancroftiana na área endêmica da cidade de Maceió-AL. In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2005, Porto Alegre-RS. *Revista de Patologia Tropical*, v. 34, 2005b.

FORATTINI, O.P; KARITANI, I.; MASSAD, E.; MARUCCI, D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 4-Survey of resting adults and synanthropic behaviour in South-Eastern, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v.27 p.398-411, 1993.

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

FREEDMAN, D.O.; NUTMAN, T.B. Filariasis. In: BULOWS, E. *Laboratory Diagnosis of Infections Diseases. Principles and Practice*. Philadelphia: Sawders, cap.91, p.863-871, 1989.

FREITAS, H. Brazil. The filariasis program: current status, challenges, validation of tools, and roads to the future. Lymphatic Filariasis Elimination in the Americas. 5th Regional Program Manager's Meeting and 4th Regional Program Review Group Meeting, v.1, p.13-18, 2004.

FURTADO, A.F.; ABATH, F.G.C.; RÉGIS, L.; GOMES, Y.M.; LUCENA, W.A.; FURTADO, P.B.; DHALIA, R.; MIRANDA, J.C.; NICOLAS, N. 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*, v.92, n.1, p.85-86, 1997.

GYAPONG, J.O.; TWUM-DANSO, N.A. Global elimination of lymphatic filariasis: fact or fantasy? *Tropical Medicine and International Health*, v.11, n.2, p.125-8, 2006.

GYAPONG, J.O.; KUMARASWAMI, V.; BISWAS, G.; OTTESEN, E.A. Treatment strategies underpinning the global programme to eliminate lymphatic filariasis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v.6, n.2, p.179-200, 2005.

HAIRSTON, N.G.; DEMEILLON, B. On the inefficiency of transmission of *Wuchereria bancrofti* from mosquito to human host. *Bulletin of the World Health Organization*, v.39, p.935-941, 1968.

HARINASUTA, C.; SUCHARIT, S.; DEESIN, T.; SURATHIN, K.; VUTIKES, S. Studies on the nocturnally subperiodic strain of *Wuchereria bancrofti* from West Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v.1, p.152-158, 1970a.

HARINASUTA, C.; SUCHARIT, S.; DEESIN, T.; SURATHIN, K.; VUTIKES, S. Bancroftian filariasis in Thailand, a new endemic area. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v.1, p.233- 239, 1970b.

HAWKING, F.; JENNINGS, T.; LOUIS, F.J.; TUIRA, E. The mechanisms with affect the periodic cycle of Pacific *Wuchereria bancrofti* microfilariae. *Journal of Helminthology*, v.55, p.95-100, 1981.

- HOTI, S.L.; VASUKI, V.; PATRA, K.P.; HARITHS, V.R.; RAVI, G.; SUSHMA, S. Laboratory evaluation of SspI PCR assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* infection in *Culex quinquefasciatus*. *Indian Journal of Medical Research*, v.114, p.59-64, 2001.
- HOUSTON, R. Saltfortied with diethylcarbamazine (DEC) as an effective intervention for lymphatic filariasis, with lessons learned from salt iodization programmes. *Parasitology*, v.121, p.162-173, 2000.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – 2007 – Material disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1> - Acesso em: 20/03/2008.
- IMPAR - Instituto Municipal de Planejamento e Ação Regional - Prefeitura Municipal de Maceió, mimeog., 1995.
- KLEIN, T.A.; LIMA, J.B.P.; TODA-TANG, A. Colonization and maintenace of *Anopheles deaneorum* in Brazil. *Journal American Mosquito Control Association*, v.6, p. 510-513, 1990.
- LAMMIE, P., MILNER, T.; HOUSTON, R. Unfulfilled potential: using diethylcarbamazine-fortified salt to eliminate lymphatic filariasis. *Bulletin of the World Health Organization*, v.85, n.7, p.545-549, 2007.
- LAMMIE, P.J.; WEIL, G.; NOORDIN, R.; KALIRAJ, P.; STEEL, C.; GOODMAN, D.; LAKSHMIKANTHAN, V.B.; OTTESSEN, E. Recombinant antigen-based antibody assays for the diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis – a multicenter trial. *Filaria Journal*. v.3: 9. 2004. (<http://www.filariajournal.com/content/3/1/9>)
- LAURENCE, B.R. Elephantiasis and Polynesian origins. *Nature*, v.219, p. 561-563, 1968.
- LIMA, A.R.V. Situação epidemiológica da Filariose linfática no foco endêmico de Maceió-Alagoas após a implantação do programa de eliminação. 110 p. *Dissertação* (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade Federal de Alagoas, 2007.
- LIMA, A.R.V; LEITE, A.B; BARROS, H.C.S; LEITE, R.B; ROCHA, E.M.M; FONTES, G. Perspectiva de eliminação da Filariose linfática em Maceió-Alagoas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.40 (Suppl 1), p.168, 2007.
- LIZOTTE, M.R.; SUPALI, T.; PARTONO, F.; WILLIAMS, S.A. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Brugia malayi* in blood. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.51, n.3, p.314-321, 1994.
- LYRA, T. MDA upscaling in Recife. Lymphatic Filariasis Elimination in the Americas: 6th Regional Program Managers' Meeting, 5th Regional Program Review Group Meeting, San José, Costa Rica, 25–27 October 2005, v.1, p. 55-61, 2005.
- MACIEL, A.; ROCHA A.; MARZOCHI, K.B.F.; MEDEIROS, Z.; CARVALHO, A.B.; REGIS, L.; SOUZA, W.; LAPA, T.; FURTADO, A. Epidemiological study of Bancroftian filariasis in Recife, Northeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.91, p. 449-455, 1996.

MALLA, N.; ELANGO, A.; PANI, S.P.; MAHAJAN, R.C. Kinetics of microfilaraemia & antigenaemia status by Og₄C₃ ELISA in Bancroftian filariasis. *Indian Journal Medicine Residence*, v.126, p. 567-574, 2007.

MCREYNOLDS, L.A.; POOLE, C.; HONG, Y.; WILLIAMS, S.A.; PARTONO, F.; BRADLEY, J. Recent advances in the application of molecular biology in filariasis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health*, v.24, n.2, p.55-65, 1993.

MEDEIROS, Z.; CESSÉ, E. P.; MENEZES, J. A.; LESSA, F. Controle da filariose linfática no Brasil, 1951-2000. *Revista do Sistema Único de Saúde do Brasil*, v.12, n.2, p.77-86, 2000.

MEYERS, W.M.; NEAFIE, R.C.; CONNOR, D.H. Diseases caused by filarial nematodes: Bancroftian and Malayan filariasis. In: BINFORD, C.H., CONNOR, D.H. *Pathology of Tropical and Extraordinary Disease*. Washington D.C., Armed Forces Institute of Pathology, v.2, cap.1, p.340-555, 1976.

MS. Ministério da Saúde. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. *O Controle das endemias no Brasil (de 1979 a 1984)*. Brasília: Sucam; 1985.

MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, v. 262, n. 4, p. 56-61, 1990.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, v.155, p.335-50, 1987.

NAPIER, L.E. Filariasis due to *Wuchereria bancrofti*. *Medicine*, v.23, p.149-179, 1944.

NARASIMHAM, M.V.V.L.; RAMALINGESWARA, R.K.; VENKATANARAYANA, P.; VISWANATHANAM, P. Longevity of *Wuchereria bancrofti* microfilaria. *Journal of Communicable Diseases*, v.16, p.326-327, 1984.

NEWTON, G.R.; GRAHAM, A. PCR-polymerase chain reaction. Introduction to biotechniques. *Bio Scientific Publishers*. 2nd ed., 176 p., 1994.

NICOLAS, L.; LUQUIAUD, P.; LARDEUX, F.; MERCER, D.R. A polymerase chain reaction assay to determine infection of *Aedes polynesiensis* by *Wuchereria bancrofti*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 90, p. 136-139, 1996.

OPAS. Organización Panamericana de la Salud. Lymphatic filariasis in the Americas. *Epidemiological Bulletin of the Pan American Health Organization*, v.18, n.4, p.6-7, 1997.

ORIHÉL, T.C. Filariae. In: BEAVER P C & JUNG R C. *Animals Agents and Vectors of Human Disease*, 5^a ed., Philadelphia, Lea & Febiger, cap.12, p.171-191, 1985.

OTTESEN, E.A. Efficacy of Dietilcarbamazina in eradicating infection with lymphatic-dwelling filariasis in humans. *Reviews of Infectious Diseases*, v.7, n.3, p. 341-356, 1985.

OTTESEN, E.A.; RAMACHANDRAN, C.P. Lymphatic filariasis, Infection and Disease: Control strategies. *Parasitology Today*, v.11, n.4, p.129-131, 1995.

PAHO/WHO – *III International Meeting of Lymphatic Filariasis Elimination Program Managers in the Americas*, 3., 2002. Puerto Príncipe, Anais. Puerto Príncipe: Pan American Health Organization: World Health Organization, 2002.

PIESSENS, W.F.; PARTONO, F. Host-vector-parasite relationships in Human Filariasis. In: WEINSTEIN L.; FIELDS B.N. *Seminars in Infectious Diseases*. New York, Thieme-Stratton Inc., v.III, p.131-152, 1980.

POOLE, C.B.; WILLIAMS, S.A. A rapid DNA assay for species-specific detection and quantification of *Brugia* in blood samples. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.40, p.129-136, 1990.

RACHOU, R.G. Transmissores da filariose bancroftiana no Brasil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v.8, p.267-268, 1956.

RACHOU, R.G. Distribuição geográfica das filarioses humanas no Brasil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v.9, p.79-100, 1957.

RACHOU, R.G. Conceito e programa de profilaxia da filariose bancroftiana no Brasil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v.12 p.11-40, 1960.

RACHOU, R.G.; LIMA, M.M.; NETO, J.A.F.; MARTINS, C.M. *Aedes scapularis*, novo transmissor comprovado da filariose bancroftiana no sul do Brasil (nota prévia). *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v.6, n.1, p.145, 1954.

RAMACHANDRAN, C.P. A guide to methods and techniques in filariasis investigations. Filariasis Research Officer. *Institute for Medical Research Kuala Lumpur*, bul. n.15, p.1-39, 1970.

RAMZY, R.M.R.; FARID, H.A.; KAMAL, I.H.; IBRAHIM, G.H.; MORSY, Z.S.; FARIS, R.; WEIL, G.J.; WILLIAMS, S.A; GAD, A.M. A Polymerase Chain Reaction-based assay for detection of *Wuchereria bancrofti* in human blood and *Culex pipiens*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.91, p.156-160, 1997.

RAWLINS, S.C.; LAMMIE, P.; TIWARI, T.; PONS, P.; CHADEE, D.D.; OOSTBURG, B.F.; BABOOLAL, S. Lymphatic filariasis in the Caribbean region: the opportunity for its elimination and certification. *Revista Panamericana de Salud Publica*, v.7, n.5, p. 319-24, 2000.

REY, L.; Nematelmintos: *Wuchereria bancrofti* e filariase linfática. In: *Parasitologia*. 3ª ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, cap. 50, p.627-638, 2001.

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

ROCHA, A.; BRAUN, R.F.; QUARESMA, J.; COSTA, J.; AGUIAR-SANTOS, A.; FREITAS, H.; BONFIM, C.; DIAS, L.; OLIVEIRA, C.; AULT, S.; MEDEIROS, Z. Inquérito antígeno da filariose bancroftiana em Belém do Pará. Verificação da ausência de infecção por *Wuchereria bancrofti*? O caso Belém do Pará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38 (Supl. I), p.475-476, 2005.

ROCHA, E.M.M.; FONTES, G.; BRITO, A.C.; SILVA, T.R.C.; MEDEIROS, Z.; ANTUNES, C.M.F. Filariose bancroftiana em áreas urbanas do estado de Alagoas, Nordeste do Brasil: Estudo em população geral. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.33 n.6, p.545-551, 2000.

SAIKI, R.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v.230, p. 1350-1354, 1985.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, p. 487-491, 1988.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA, 1987.

SAMBROOK, R.; RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, v.3, 2001.

SCAFF, L.M.; GUEIROS, Z.M. Prevalência e controle da filariose no Pará: estado atual. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v.19, p. 245-252, 1967.

SCHLEMPER Jr., B.R., FERREIRA-NETO, J.A. Doenças parasitárias endêmicas em Santa Catarina: I - Filariose. *Arquivos Catarinenses de Medicina*, v.14, p. 107-14, 1985.

SERVICE, M.W. Patrick Manson and the history of bancroftian filariasis. In: MEDICAL ENTOMOLOGY CENTENARY, Symposium proceedings, London, *The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, p.11-14, 1978.

SILVA, A.S.; ROCHA, E.M.M.; FONTES, G.; ALMEIDA, W.A.P. Índices de infecção natural de vetores em áreas endêmicas definidas de Filariose linfática em Maceió. *Anais do XII Encontro de Iniciação Científica da Universidade Federal de Alagoas*, p. 85, 2002.

SIRIDEWA, K., KARUNANAYAKE, E.H., CHANDRASEKHARAN, N.V., ABEYWICKREME, W., FRANZEN, L., ASLUND, L., PETTERSSON, U. Cloning and characterization of a repetitive DNA sequence specific for *Wuchereria bancrofti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.51, p.495-500, 1994.

SIRIVANAKARN, S.; WHITE, G. B. Neotype designation of *Culex quinquefasciatus* Say. (Diptera: Culicidae). *Proceeding of the Entomological Society of Washington*, v.80, p.360, 1978.

SMS – Secretaria Municipal de Saúde – *Manual para endereçamento do SUS*, 2005

SOUTHGATE, B.A. Recent advances in the epidemiology and control of filarial infections including entomological aspects of transmission. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.78, p.19-28, 1984.

THANOMSUB, B.W., CHANSIRI, K., SARATAPHAN, N., PHANTANA, S. Differential diagnosis of human lymphatic filariasis using PCR-RFLP. *Molecular and Cellular Probes*, v.14, p. 41-46, 2000.

VASUKI, V., PATRA, K.P., HOTI, S.L. A rapid and simplified method of DNA extraction for the detection of *Brugia malayi* infection in mosquitoes by PCR assay. *Acta Tropica*, v.79, p.245-248, 2001.

VASUKI, V.; HOTI, S.L.; SADANANDANE, C.; JAMBULINGAM, P. A simple and rapid DNA extraction method for the detection of *Wuchereria bancrofti* infection in the vector mosquito *Culex quinquefasciatus* by SspI PCR assay. *Acta Tropica*, v.86, p.109-114, 2003.

WEBBER R.H; SOUTHGATE, B.A. The maximum density of anopheline mosquitoes that can be permitted in the absence of continuing transmission of filariasis. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.75, n.4, p.499-506, 1981

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

WENK, P. Filariasis Discovery. *Parasitology Today*, v.6, n.5, p.153, 1990.

WHA 50.29 - World Health Assembly: Resolution of the Executive Board of the WHO: Elimination of Lymphatic Filariasis as a Public Health Problem. Fiftieth World Health Assembly, Geneva 13 May 1997.

WHITE, G.B. Lymphatic Filariasis. WHO. Geographical distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors. WHO-Vector Biology and control division.p.23-34, 1989.

WHO - World Health Organization – Defining the roles of vector control and xenomonitoring in the Global Programme to Eliminate Lymphatic filariasis. *WHO/CDS/PVC* 2003.2. 42 pp, 2002a.

WHO – World Health Organization. Preparing and Implementing a National Plan to Eliminate Lymphatic Filariasis: A guideline for Programme Managers. Technical reports series WHO/CDS/CPE/CEE/2000.15, Geneva, 65 p., 2000

WHO - World Health Organization - Filariasis linfática: Cuarto informe del Comité de Expertos de la OMS en Filariasis. Ginebra. *Serie de Informes Técnicos*, n. 702, 121p., 1984.

WHO - World Health Organization - Lymphatic filariasis: the disease and its control. Fifth report of the WHO Expert committee on filariasis. Geneva. *Technical reports series*, n. 821, p 75., 1992.

WHO – World Health Organization. *Report of the Second Meeting of the Global Alliance to Eliminate Lymphatic Filariasis*. p 81, 2002b.

WILLIAMS, S.A.; LANEY, S.J.; BIERWERT, L.A.; SAUNDERS, L.J.; BOAKYE, D.A.; FISCHER, P.; GOODMAN, D.; HELMY, H.; HOTI, S.L.; VASUKI, V.; LAMMIE, P.J.; PLICHART, C.; RAMZY, R.M.; OTTESEN, E.A. 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*, v. 96 (Suppl 2), p.S41-S46, 2002.

WILLIAMS, S.A.; POOLE, C.B.; LANDRY, D.; GLOVER, J.; MCREYNOLDS, L.A. *Brugia malayi* and *Brugia pahangi*: synthetic biotin labeling of oligonucleotide probes for use in species-specific detection assays. *Experimental Parasitology*, v.77, n.2, p.135-245, 1993.

WITT, C.; OTTESEN, E.A. Lymphatic filariasis: an infection of childhood. *Tropical Medicine and International Health*, v. 6, p.582-606, 2001.

ZHONG, M.; MCCARTHY, J.; BIERWERT, L.; LIZOTTE-WANIEWSKI, M.; CHANTEAU, S.; NUTMAN, T.B.; OTTESEN, E.; WILLIAMS, S.A. A polymerase chain reaction assay for detection of the parasite *Wuchereria bancrofti* in human blood samples. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.54, n.4, p.357-363, 1996.

TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA TESTADAS

O material biológico utilizado para os procedimentos de extração de DNA era constituído por mosquitos secos em estufa à 90 °C durante três horas. O DNA extraído pelos diferentes protocolos descritos a seguir, foi sempre concentrado usando-se membrana Microcon (YM-100, Millipore®), e utilizado como molde (*template*) na reação da PCR.

FENOL-CLOROFÓRMIO (SAMBROOK *et al.*, 1987)

Acrescentar ao material biológico teste o dobro do volume de tampão de extração de SDS (10 mM de Tris-pH 8,0, 0,5% de SDS, 100 mM de NaCl, 10 mM de EDTA), e macerar bem. Acrescentar 5 µl de Proteinase K e incubar a 56°C/1 hora. Adicionar 300 µl de fenol-clorofórmio, e agitar bem a amostra. Centrifugar por 3 min a 13.000 rpm. Retirar a fase aquosa e colocar em novo tubo. Adicionar novamente 300 µl de fenol-clorofórmio e centrifugar por 3 min a 13.000 rpm. Colocar a fase aquosa em coluna de concentração de DNA e centrifugar a 4.000 rpm por 6 min. (verificar se todo o material foi filtrado, caso contrário centrifugar novamente). Adicionar 350 µl de água e centrifugar a 4.000 rpm por 6 min. repetindo este processo duas vezes. Após terminar, inverter a coluna e acrescentar 40 µl de T.E. centrifugando a 13.000 rpm por 1min. Após a extração congelar a amostra de DNA.

FERVURA A 100 °C DURANTE 10 MINUTOS (VASUKI *et al.*, 2001; 2003)

Triturar os mosquitos secos em tubos de microcentrífuga com auxílio de um pistilo e 60µL tampão T.E. (10mM Tris, 1mM EDTA), e homogeneizar com auxílio de agitador de tubos tipo vórtex. Incubar a 100 °C em banho seco (bloco térmico) durante 10 minutos, e posteriormente centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos. Retirar todo o sobrenadante, colocar em coluna de concentração de DNA (Microcon YM – 100 Millipore®) e centrifugar a 8.000 rpm durante 6 minutos, acrescentar 350 µL de água e centrifugar como no passo anterior. Adicionar 40 µL de tampão TE, inverter a coluna e centrifugar a 14.000 rpm durante um minuto. Após o procedimento todo o material (extrato de DNA) deve ser congelado a -20 °C até uso.

FERVURA A 90°C DURANTE 5 MINUTOS (VASUKI, *et al.*, 2001; 2003) COM O USO ADICIONAL DE PROTEINASE K (100 µG/ML)

Triturar os mosquitos secos em tubos de microcentrífuga com auxílio de um pistilo e 30µL tampão T.E. (10mM Tris, 1mM EDTA) e lavar o pistilo com 30µL. Homogeneizar com auxílio de agitador de tubos, tipo vórtex. Acrescentar Proteinase K (100 µg/ml) e incubar a 100 °C em banho seco (bloco térmico) durante 10 minutos. Centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos. Após o procedimento acima, o sobrenadante é estocado a -20°C até uso.

WIZARD® GENOMIC DNA PURIFICATION KIT (PROMEGA)

Adicionar 600µl da solução de lise nuclear em tubo de 1,5ml e resfriar no gelo. Logo após adicionar 10-20mg do material biológico na solução de lise e homogeneizar por 10s usando bastão de vidro. Incubar a solução à 65°C por 15-30 min. Adicionar 17,5µl de Proteinase K e incubar por 3h a 55°C. Adicionar 3µl da solução de RNase e misturar a amostra invertendo o tubo 2-5 vezes. Incubar por 15-30 min à 37°C. Resfriar a amostra a temperatura ambiente por 5min após o procedimento. Adicionar 200µl da solução de precipitação de proteína e agitar no agitador tipo Vórtex vigorosamente em alta velocidade por 20 seg. resfriar a amostra no gelo por 5min e posterior centrifugação por 4min a 13.000-16.000g. Transferir o sobrenadante para um tubo de 1,5ml contendo 600µl de isopropanol à temperatura ambiente. Mexer a solução por inversão até que a linha branca de DNA forme uma massa visível. Centrifugar por 1min à 13000-16000g à temperatura ambiente. Adicionar 600µl de etanol 70% a temperatura ambiente ao precipitado e inverter o tubo várias vezes para lavagem do DNA. Centrifugar por 1min à 15000g (temperatura ambiente). Aspirar o etanol. Inverter o tubo em papel absorvente e deixar o precipitado ao ar livre por 10-15min, e logo após adicionar 100µl da solução de hidratação de DNA. Incubar o DNA à 65°C por 1h. e periodicamente mexer a solução com leves pancadas no tubo. Armazenar o material obtido a -20°C até uso.

TÉCNICA DESCRITA POR NICOLAS E COLABORADORES (1996)

Aos mosquitos secos e macerados adicionar 500 µl de tampão NIB (0,1M NaCl, 30 mM Tris-HCl / pH 7,8; 30 mM de EDTA, 10 mM de β-mercaptoetanol e 0,5% de NP40 10%) e repetir a maceração. Completar o volume para 1 ml de NIB e homogeneizar em agitador tipo vórtex por 1min; centrifugar 14000g durante 2 min. Desprezar o sobrenadante. Completar novamente o volume para 1 ml de NIB e homogeneizar em agitador de tubos tipo vórtex 1min. Centrifugar (14000 g) durante 2 min e desprezar o sobrenadante. Acrescentar 200 µl de tampão de lise (0,1 M de NaOH; 0,2% de SDS) e homogeneizar em vórtex durante 5 min. Incubar 1h à 37 °C. Neutralizar o pH com 100 µl de HCl 2M. e centrifugar (14000 g) durante 3 min. Recuperar o sobrenadante. Adicionar 1000 µl de iodeto de sódio (NaI) 4,5 M. Adicionar 10 µl de sílica, homogeneizar e incubar no gelo durante 30 min. Centrifugar (14000 g) rapidamente e desprezar o sobrenadante com NaI. Ressuspender a sílica com 500 µl de solução Geneclean gelada (Etanol 70%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM/pH 7,5). Centrifugar (14000 g) rapidamente e desprezar o sobrenadante (remover totalmente o líquido). Ressuspender o precipitado em 100 µl de água milli-Q autoclavada, incubar à 42 °C durante 10min. Centrifugar (14000 g) rapidamente e recuperar cuidadosamente o sobrenadante em um novo tubo de 1,5 ml. Estocar o material obtido a -20 °C até uso.