



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

PAULA FERNANDA ALCANTARA DE SOUZA MELO

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOS MARCADORES DE INFECÇÃO
FILARIAL EM INDIVÍDUOS MICROFILARÊMICOS, RESIDENTES EM ÁREAS
ENDÊMICAS DA REGIÃO METROPOLITANA DE RECIFE-PE SUBMETIDOS AO
TRATAMENTO EM MASSA**

Recife - PE
2018

PAULA FERNANDA ALCÂNTARA DE SOUZA MELO

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOS MARCADORES DE INFECÇÃO
FILARIAL EM INDIVÍDUOS MICROFILARÊMICOS, RESIDENTES EM ÁREAS
ENDÊMICAS DA REGIÃO METROPOLITANA DE RECIFE-PE SUBMETIDOS AO
TRATAMENTO EM MASSA**

Tese de Doutorado apresentada à banca avaliadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical

Orientadora

Prof^a. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Professora associada da Universidade Federal de Pernambuco CCS/UFPE

Coorientador

Prof. Dr. Abraham César de Brito Rocha

Prof. Pesquisador do Instituto Aggeu Magalhães–
FIOCRUZ-PE

Recife - PE

2018

M528a Melo, Paula Fernanda Alcântara de Souza.

Avaliação do comportamento dos marcadores de infecção filarial em indivíduos microfilarêmicos, residentes em áreas endêmicas da região metropolitana de Recife-PE, submetidos ao tratamento em massa / Paula Fernanda Alcântara de Souza Melo . – Recife: o autor, 2018.

124 f.; il.; 30 cm.

Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Medicina Tropical.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Filariose linfática. 2. Diagnóstico. 3. Anticorpo. 4. *Wuchereria Bancrofti*. I. Maciel, Maria Amélia Vieira (orientadora). II. Título.

616.988 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 189)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

PAULA FERNANDA ALCÂNTARA DE SOUZA MELO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO
UTILIZANDO O ANTÍGENO RECOMBINANTE Wb123 PARA VIGILÂNCIA DA
INFECÇÃO POR *Wuchereria bancrofti* EM ÁREAS ENDÊMICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Aprovada em: 21/02/2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (Examinador Interno)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Virginia Maria de Barros Lorena (Examinadora Interna)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

Prof. Dr. André de Lima Aires (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Cristine Vieira Bonfim (Examinadora Externa)
Fundação Joaquim Nabuco (FUNDAJ)

Prof^a. Dr^a. Silvana de Fátima Ferreira da Silva Caires (Examinadora Externa)
Universidade de Pernambuco (UPE)

“Ao meu marido e a minha mãe com todo o meu amor”

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, minha eterna gratidão por se fazer constante em minha vida, guiando-me e conduzindo-me a mais esta conquista. A cada dia tenho a certeza de que ele esta comigo todo o tempo, em todos os momentos, sendo minha rocha e minha fortaleza na qual posso confiar sempre.

Ao meu marido, **Leandro Felix de Melo** por acreditar que eu seria capaz de vencer mais este desafio e por mais uma vez, criar condições que me permitissem ingressar no doutorado e desenvolver esta tese. Obrigado pela paciência e compreensão.

A minha mãe **Josáurea Marques de Alcântara**, quem me deu a vida e me ensinou a vivê-la com honestidade, pela educação e pelo amor.

A minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Amélia Maciel** por ter aceitado o desafio de me orientar, pelos ensinamentos, pela força e pela paciência. Ao meu Co-Orientador **Prof^o. Dr. Abraham Rocha**, pela oportunidade que me foi dada desde a época do mestrado. Agradeço por todo apoio e aprendizado constantes. Muito Obrigada!

Ao **Dr. Eduardo Brandão** e a **Dr^a. Almerice Lopes** pela amizade, apoio, incentivo e colaboração na condução e conclusão desta tese.

Ao **Serviço de Referência Nacional em Filarioses (SRNF)**, localizado no Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE, que colaborou para a realização deste estudo, cedendo amostras biológicas, kits, insumos e seu laboratório. Agradeço a todos os colegas, pesquisadores, tecnologistas, técnicos que fazem parte do SRNF, em especial a: **Rosângela Grilis e Josué Araújo**, obrigado pela amizade e toda ajuda, também a aluna **Amanda Regueira**.

Aos meus amigos do Instituto Aggeu Magalhães, do departamento de Parasitologia, aos “marmiteiros” e em especial a: **Almerice Lopes** “Meri”, **Paula Oliveira** “Paula O”, **Priscila Castanha** “Pri”, **Socorro Alves** “Help”, **Solange Santos** “Sol”, **Cristiane Brito** “Cris”, **Leandro Wanderley** “Leo”, **Maria José** “Zezé”, **Virgínia Lorena** “Ví”. Aos **meus grandes e verdadeiros amigos**, com que convivi fora do ambiente acadêmico e aqueles que com quem tenho compartilhado muitas horas da minha vida no ambiente acadêmico e profissional, sobre os quais tenho consciência de que é impossível citar a todos e incluindo os citados; agradeço pela fidelidade, apoio e torcida para a concretização de mais esta etapa da minha vida.

Ao **Dr. George Diniz** pela competência e paciência em me facilitar a compreensão das análises estatísticas.

Ao **Walter Galindo** sempre muito prestativo para resolver os diversos assuntos acadêmicos da Pós-graduação em Medicina Tropical (MEDTROP).

A todos os amigos da turma 14ª turma de Doutorado da MEDTROP / UFPE, em especial a: **Armando Monteiro, Ayla Alves, Gerson Gomes, Evônio de Barros, Guacyra Pires, Liany Accioly, Paula Alexandra, Tarcio Pereira, Viviane Martha.**

RESUMO

A OMS considerou em 1997 a Filariose Linfática (FL) como uma doença potencialmente eliminável, lançando no ano 2000 o Plano Global de Eliminação da FL. Desde o início do PGEFL muitos avanços já foram alcançados. No entanto, novas demandas, como por exemplo o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas que sejam mais sensíveis e específicas para avaliar o impacto das ações sobre o controle e eliminação da parasitose, surgem como uma prioridade. Nos últimos anos, o diagnóstico da FL foi aperfeiçoado com as pesquisas de anticorpos utilizando antígenos recombinantes, aumentando a sensibilidade e a especificidade dos ensaios. Estes testes vêm sendo sugeridos como marcadores para monitoramento e vigilância da FL. Sendo assim, utilizamos o ensaio imunoenzimático (*Filaria Detect*TM IgG4 ELISA System “Wb123”), produzido a partir de um antígeno recombinante de larva infectante (L₃) de *Wuchereria bancrofti* -Wb123, para avaliar o comportamento de anticorpos antifilariais, juntamente com outros marcadores de diagnóstico da infecção filarial, em indivíduos microfilarêmicos, residentes em área endêmica submetidos ao tratamento em massa. Segundo recomendações do fabricante do ELISA-Wb123, é preciso que seja estabelecido previamente o ponto de corte ideal para cada região geográfica onde o teste será realizado. Assim, a princípio, foi realizado um estudo de avaliação de teste diagnóstico, onde a Curva ROC foi construída com amostras sorológicas brasileiras de infectados e não infectados por *W. bancrofti*, oriundas do banco de amostras biológicas do SRNF. O resultado evidenciou o melhor ponto de corte, da Densidade Ótica (DO) do Wb123, em 0,239DO, permitindo a discriminação de positivos e negativos. Em seguida, após definição do ponto de corte, para avaliar o comportamento dos marcadores, foi realizado um estudo de seguimento, envolvendo 63 indivíduos microfilarêmicos submetidos à AMM, residentes na RMR, Pernambuco – Brasil. Estes indivíduos foram selecionados a partir de inquéritos parasitológicos, realizados antes do início da AMM (pré-AMM) e acompanhados por cinco anos consecutivos pelo SRNF. Este grupo apresentou média de aproximadamente 201 microfilarías/mL de sangue, variando de 1 a 1834 na pré-AMM. Para o antígeno, pode-se observar uma positividade de 100% com uma média de 9.025UA. Com relação aos anticorpos, foi identificada uma positividade de 82,5% (52/63), com uma DO média de 2,6 e 95,2% (60/63) com uma DO média de 1,78, para o Wb123 e Bm14, respectivamente. Após cinco rounds de AMM, não foram identificados indivíduos microfilarêmicos e os níveis de antígeno e Wb123 reduziram 88,1% e 65,8, respectivamente ($p<0,05$). A análise do comportamento da microfilaremia, da antigenemia e dos anticorpos permitiu identificar que os quatro marcadores apresentaram perfil decrescente ao longo do tempo. No entanto, para os anticorpos anti-Bm14, este perfil de foi lento e sem diferença significativa no final da AMM. O ponto de corte de 0,239DO, para o Wb123, foi capaz de determinar com segurança infectados e não infectados nas amostras sorológicas do Brasil. Embora tenha havido redução, a persistência dos anticorpos anti-Wb123 após cinco anos de tratamento, revela a necessidade de um período maior de acompanhamento, para melhor compreensão e definição da sua contribuição para os programas de eliminação da FL.

Palavras-chave: Filariose Linfática. Diagnóstico. Anticorpo. *Wuchereria bancrofti*.

ABSTRACT

The WHO considered in 1997 the Lymphatic Filariasis (LF) as a potentially disease eliminable, launching in the year 2000 the Global Plan of Eliminating LF. Since the beginning of the GPEFL many advances have been achieved. However, new demands, such as the development of diagnostic tools that are more sensitive and specific to evaluate the impact of actions on the control and elimination of parasitosis, emerge as a priority. In recent years, the diagnosis of LF has been revolutionized by screening for antibodies using recombinant antigens, increasing the sensitivity and specificity of the assays. These tests have been suggested as markers for LF monitoring and surveillance. Therefore, we use the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA IgG4 Filaria Detect™ System "Wb123"), made from a recombinant antigen of infective larvae (L₃) of *Wuchereria bancrofti*-Wb123, to evaluate the behavior of antifilarial antibodies, along with other diagnostic markers of filarial infection in microfilaremic individuals residing in an endemic area submitted to mass treatment. According to manufacturer's recommendations of ELISA-Wb123, it must be established in advance the ideal cut point for each geographic region where the test will be performed. So, at first, we conducted a study of diagnostic test assessment, where the ROC curve was built with serological samples of infected and non-infected Brazilian for *W. bancrofti*, from the Bank of Biological Samples of NRSF. The result showed the best cut-off, Optical Density (OD) the Wb123, 0, 239OD, allowing the positive and negative discrimination. Then, after setting the cut-off, to evaluate the behavior of markers, we conducted a follow-up study, involving 63 microfilaremic individuals submitted to MDA, residents in the MRR, Pernambuco - Brazil. These individuals were selected from parasitological surveys carried out before the start of the MDA (pré-MDA) and followed for five consecutive years by the NRSF. It was possible to observe in this group an average of approximately 201 microfilariae / mL of blood, ranging from 1 to 1834 in pré-MDA. For the Antigen (Og4C3), one can observe a positivity to 100% with an average of 9,025 Antigens Units "AU". With regard to antibodies, was identified a positivity of 82.5% (52/63), with an average OD of 2.6 and 95.2% (60/63) with an average OD of 1.78, for the Wb123 and Bm14, respectively. After five rounds of MDA, were not identified individuals microfilaria and levels Og4C3 and Wb123 reduced 88.1% and 65.8, respectively ($p < 0.05$). The behavior analysis of microfilaremia, antigenemia and antibodies identified the four markers showed decreasing profile over time. However, for anti-Bm14, this profile was slow and no significant difference at the end of the MDA. The cut-off of 0, 239OD, to the Wb123, was able to determine safely infected and uninfected serological specimens from Brazil. Although there was a reduction, the persistence of antibodies to Wb123 after five years of treatment, reveals the need for a longer period of follow-up, for better understanding and definition of your contribution to the programmes for elimination of FL.

Keywords: Lymphatic Filariasis. Diagnosis. Antibody. *Wuchereria bancrofti*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Vermes adultos de <i>W. bancrofti</i> .	18
Figura 1	Curvas ROC padrão ouro (FMP) e CL para Wb123.	53
Figura 1	Comportamento dos marcadores: Wb123, Bm14, ACF e FMP das amostras avaliadas ao longo do tempo.	69
Figura 2	Microfilária de <i>W. bancrofti</i> corada com eosina-giemsa, seta indicando a presença da bainha, característica <i>sine qua non</i> da espécie.	19
Figura 3	Ciclo biológico da <i>W. bancrofti</i> .	20
Figura 4	Indivíduos com FL crônicos, apresentando linfedema nos membros inferiores	21
Figura 5	Mapa do município de Olinda ilustrando os bairros: Alto da Bondade (Verde) e Alto da Conquista (Azul), Olinda-PE.	38
Figura 6	Mapa do município de Recife, ilustrando o bairro Alto Santa Terezinha, área verde onde ocorreu a AMM, Recife – PE.	39
Figura 7	Fluxograma de seleção da amostra “ <i>follow-up</i> ”.	41

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1	Resumo dos testes disponíveis para o diagnóstico da FL.	30
Tabela 1	Categorização da idade	41
Tabela 1	Valores relativos à análise da Densidade Ótica (DO) de todos os pacientes e os mesmos estratificados pela positividade para a contagem da microfilárias	51
Tabela 1	Associação do sexo com o tratamento em cada momento (ano) e ao longo do tempo pelos marcadores, Wb123, Bm14, ACF e FMP nas cidades de Olinda (2007-2012) e Recife (2003-2009).	66
Tabela 2	Acurácia dos pontos de corte (<i>cut-off</i>) obtidos na curva do Wb123 padrão ouro (FMP).	52
Tabela 2	Idade categorizada da amostra avaliada para cada um dos marcadores a pré-AMM por mais 5 anos.	67
Tabela 3	Sensibilidade e especificidade observadas utilizando os dados de identificação dos positivos e negativos e os valores obtidos utilizando a curva ROC para os testes Wb123, Og4C3 e Bm14.	52
Tabela 3	Avaliação dos marcadores sobre o impacto do tratamento da pré-AMM x 1ªAMM e da 1ªAMM x 5ªAMM (último ano).	68
Tabela 4	Resultados do desempenho do teste para curva ROC FMP (padrão ouro) e curva ROC CL, <i>cut-off</i> otimizado.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACF	Antígenos Circulantes Filariais
AD12	Anticorpo monoclonal contra antígeno de verme adulto de <i>Wuchereria bancrofti</i>
AMM	Administração de Medicamentos em Massa
Bm14	Antígeno recombinante de <i>Brugia malayi</i>
CL	Classes Latentes
DEC	Citrato de Dietilcarbamazina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNERu	Departamento Nacional de Endemias Rurais
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FIED	Força Internacional para Erradicação de Doenças
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FL	Filariose linfática
FMP	Filtração em Membrana de Policarbonato
FTS	Filariasis Test Strip
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IAT	Inquéritos de Avaliação da Transmissão
ICT	Teste de imunogromatografia em cartão
IgG4	Subclasse de imunoglobulinas da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
L ₃	Larva infectante
MEE	Modelo de Equações Estruturais
MS	Ministério da Saúde
Og4C3	Anticorpo monoclonal contra antígenos de <i>Onchocerca gibsoni</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGEFL	Plano Global de Eliminação da Filariose Linfática
PNEFL	Plano Nacional de Eliminação da Filariose Linfática
PSF	Programa de Saúde da Família

RMR	Região Metropolitana do Recife
ROC	Receiver Operating Characteristic
SRNF	Serviço de Referência Nacional em Filarioses
UA	Unidade de Antígeno
VPN	Valores Preditivos Negativos
VPP	Valores Preditivos Positivos
Wb123	Antígeno recombinante da larva infectante de <i>W. bancrofti</i>
WHA	World Health Assembly

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1	Aspectos Gerais da Filariose Linfática.....	18
2.2	Aspectos Epidemiológicos e Plano de Eliminação da Filariose Linfática.....	22
2.3	Histórico da Filariose Linfática no Brasil.....	26
2.4	Pesquisa de Anticorpos e Antígenos Recombinantes.....	29
2.5	Diagnóstico filarial.....	30
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Geral.....	36
3.2	Específicos.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	Desenho do estudo.....	37
4.2	Local de estudo.....	37
4.3	Amostra e/ou População do estudo.....	39
4.4	Período do estudo de Seguimento.....	40
4.5	Fluxograma de Seleção da amostra do seguimento.....	40
4.6	Categorização das idades dos indivíduos do seguimento.....	41
4.7	Descrições das técnicas.....	42
4.7.1	Para o estudo de avaliação diagnóstica.....	42
4.7.2	Para o estudo de seguimento.....	44
4.8	Análises de dados.....	44
4.9	Limitações do estudo.....	46
4.10	Aspectos Éticos.....	46
5	RESULTADOS.....	47
5.1	Avaliação do Filaria Detect™ IgG4 ELISA System produzido com o antígeno recombinante Wb123 para o diagnóstico da Filariose Linfática em área endêmica do Brasil.....	47
5.2	Avaliação comparativa entre a microfilaremia, antígeno filarial, anticorpos Bm14 e Wb123 no monitoramento de indivíduos microfilareêmicos submetidos ao tratamento em massa para filariose linfática em área endêmica do Brasil.....	62
6	CONCLUSÃO.....	77
7	PERSPECTIVAS E SUGESTÕES.....	78
8	REFERÊNCIAS	79
	APENDICES.....	87
	APENDICE A - Comprovante de envio do artigo 1.....	87
	APENDICE B - Evaluation of Filaria Detect™ IgG4 ELISA System produced with the recombinant Wb123 antigen for the diagnosis of Lymphatic Filariasis in an endemic region of Brazil.....	88
	APENDICE C - Comprovante de envio do artigo 2.....	104
	APENDICE D - Comparative evaluation between microfilaremia, filarial antigen, Bm14 and Wb123 antibody for the monitoring of microfilaremic	105

individuals submitted to mass treatment for lymphatic filariasis in an endemic area of Brazil.....	
ANEXOS.....	123
ANEXO A - CARTA DE ANUÊNCIA DO SERVIÇO DE REFERÊNCIA NACIONAL E FILARIOSES.....	123
ANEXO B - APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA.....	124

1 INTRODUÇÃO

A Filariose Linfática (FL), também conhecida como elefantíase em sua fase crônica e sintomática, é uma doença tropical negligenciada transmitida por vetores, que atinge pessoas de todas as idades e de ambos os sexos. Essa parasitose possui, como agentes etiológicos, helmintos das espécies: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori* (NUTMAN; KUMARASWAMI, 2001; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016). Trata-se de uma doença desfigurante e incapacitante, sendo considerada uma das principais causas de estigmatização social e de perdas econômicas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000; SIMONSEN; MWAKITALU, 2013).

Estima-se em aproximadamente 120 milhões o número de pessoas acometidas pela FL, distribuídas em 73 países (RAMAIAH; OTTESEN, 2014; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016). No continente americano, cerca de 12 milhões de pessoas vivem em áreas de risco, distribuídas no Brasil, na Guiana, na República Dominicana e no Haiti, sendo este último responsável por conter 92% dessa população (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2015). Exceto a Guiana, todos aderiram ao tratamento em massa da população e até o ano de 2013, haviam tratado cerca de sete milhões de pessoas. Esses mesmos países deverão verificar a interrupção da transmissão através de Inquéritos de Avaliação da Transmissão (IAT) e poderão obter o certificado de eliminação até 2022 (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2015).

No Brasil, até 1950 pouco se conhecia sobre a FL no país, apenas haviam inquéritos hemoscópicos isolados que apontavam as cidades de Salvador (BA) e Belém (PA) como focos. No período de 1951 a 1958, a Campanha Nacional contra a FL promovida pelo Ministério da Saúde (MS), constatou a transmissão autóctone em 11 localidades: São José da Ponta Grossa (SC), Belém (PA), Barra de Laguna (SC), Recife (PE), Castro Alves (BA), Florianópolis (SC), São Luís (MA), Salvador (BA), Maceió (AL), Manaus (AM) e Porto Alegre (RS). O tratamento nessas áreas, fontes de infecção, a partir de 1951 proporcionou uma redução apreciável nas taxas de prevalência, fazendo com que na década de 80, apenas os focos de Belém (PA) e Recife (PE) fossem considerados como ativos. Contudo, nos anos 90, estudos mostraram que a capital do estado de Alagoas (Maceió), também apresentava alguns focos de transmissão ativa. Ainda nos anos 90, em Pernambuco, a parasitose foi detectada em outras cidades da Região Metropolitana de Recife como: Olinda, Jaboatão dos Guararapes e Paulista e até o presente, a RMR-PE permanece, de acordo com MS, como único foco no

país com registro de transmissão ativa da FL (FONTES et al., 2005, BRASIL, 2012, PAHO, 2015, ROCHA et al., 2016, ZUCHI et al., 2017).

Em 1993, após a proposta da Organização Mundial de Saúde (OMS) - que incluiu a FL como uma das seis doenças infecciosas consideradas como elimináveis ou potencialmente elimináveis - o MS e o Conselho Nacional de Saúde (CNS) implementaram, em 1996, o Plano Nacional de Eliminação da Filariose Linfática (PNEFL), tendo como parâmetro a descentralização das ações de controle para os municípios e os estados. Dentre os objetivos do PNEFL estão: interrupção da transmissão com quimioterapia e controle vetorial; e assistência à morbidade (MEDEIROS et al., 2003). Mais tarde, em 2000, a OMS lançou o Plano Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL), tendo como meta eliminar a FL no mundo até 2020, o PGEFL atua sob dois pilares, o primeiro baseado em interromper a infecção através da Administração de Medicamentos em Massa (AMM) para população nas regiões endêmicas e o segundo consiste no gerenciamento da morbidade filarial (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000; RAMAIAH; OTTESEN, 2014).

O Programa de Controle da FL, em Pernambuco, foi iniciado nos municípios de Recife e de Olinda nos anos de 2003 e 2005, respectivamente. Em ambos, houve a AMM, exclusiva com Citrato de Dietilcarbamazina (DEC), a população residente nas áreas com prevalência de infecção filarial (por microfilarêmia) superior a 1%. Essa estratégia estava baseada “na constatação da eficácia de uma única dose de DEC seis mg/kg por um período de durante 4 a 6 anos, como capaz de remover as microfilárias e manter essa situação por pelo menos por um ano” (ANDRADE, 1997; HELMY et al., 2006; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1992; 2002; SANTOS, 2005; ROCHA et al., 2016).

A OMS recomenda que a avaliação do progresso das ações de interrupção da transmissão, como a AMM, seja feita através de um monitoramento da carga de antígenos em crianças entre seis e sete anos de idade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016). Contudo, é de conhecimento geral, que a metodologia baseada na pesquisa de antígenos filariais, apresenta uma sensibilidade limitada na detecção da infecção precoce, em comparação aos ensaios baseados na pesquisa de anticorpos (STEEL et al., 2015).

Por muito tempo, a maior dificuldade observada com a pesquisa de anticorpos foi o grande número de reações cruzadas que se obtinha pela utilização de antígenos não específicos, limitando o uso dos mesmos, principalmente em áreas que apresentam sobreposição de diferentes espécies filariais (LAL; OTTESEN, 1988). Para solucionar esse problema, um antígeno recombinante obtido a partir de larvas infectantes (L₃) de *W. bancrofti* foi recentemente produzido (Wb123). O mesmo tem se mostrado bastante eficaz na detecção

rápida de IgG4 em indivíduos infectados, não reagindo com outros parasitas como *Onchocerca volvulus*, *Loa loa*, *Mansonella perstans* (KUBOFCIK; FINK; NUTMAN; NUTMAN, 2012, STEEL et al., 2015).

A pesquisa de anticorpos, particularmente os direcionados aos antígenos expressos pela forma infectante do verme (L₃), pode representar uma importante ferramenta diagnóstica, pois viabilizaria uma detecção precoce do contato com o parasito, atuando como uma forma mais sensível de medir a efetividade da AMM sobre a interrupção da transmissão nas áreas endêmicas (KUBOFCIK; FINK; NUTMAN, 2012; STEEL et al., 2015).

Uma vez que a relação entre esta resposta de anticorpos para o Wb123 e os diferentes níveis de prevalência populacional de infecção não estão bem elucidados, o presente trabalho visou avaliar o comportamento do Wb123 e dos principais marcadores de infecção filarial utilizados: pesquisa de microfilárias (técnica de filtração), pesquisa de antígenos (Og4C3), pesquisa de anticorpos (Bm14), em indivíduos microfilarêmicos, residentes em áreas endêmicas da Região Metropolitana de Recife - Pernambuco, submetidos ao tratamento em massa.

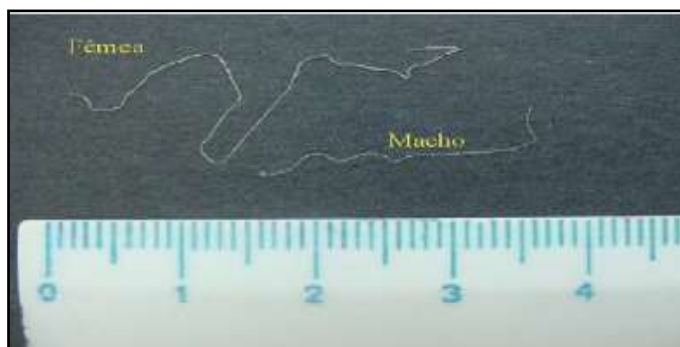
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos Gerais da Filariose Linfática

O termo Filariose Linfática (FL), também conhecido como “elefantíase”, compreende as filarioses brugiana e bancroftiana, que têm como transmissor, mosquitos dos gêneros: *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*. A brugiana é causada pelas espécies *Brugia malayi* e *Brugia timori*, ambas endêmicas da Ásia, que parasitam o sistema linfático humano e de alguns animais (BENNURU; NUTMAN; 2009; SIMONSEN; MWAKITALU, 2013). A filariose bancroftiana tem como agente etiológico a *Wuchereria bancrofti*, a qual apresenta como hospedeiro definitivo, o homem; está presente no continente asiático, africano e com exclusividade no continente americano, e em algumas regiões do pacífico, afetando milhões de pessoas no mundo (SIMONSEN; MWAKITALU, 2013; DAURES et al., 2015).

Esses parasitas são vermes nematoides, filiformes e longos que habitam vasos e gânglios linfáticos, onde podem ser encontrados enrolados em novelos que provocam reação inflamatória e perturbam a circulação linfática. A longevidade deles é desconhecida, podendo variar em média de 4 a 8 anos, entretanto, há autores que lhes atribuem 17 anos de vida (BRASIL, 2009; FONTES; ROCHA, 2005; REY, 2001). Os vermes adultos apresentam dimorfismo sexual – sendo os machos menores que as fêmeas (Figura 1) e suas formas embrionárias são denominadas microfíliarias (Figura 2) (FONTES; ROCHA, 2005; MIRANDA, 2006).

Figura 1: Vermes adultos de *W. bancrofti*.



Fonte: Abraham Rocha - Guia de Vigilância Epidemiológica e Eliminação da Filariose Linfática (2009).

Figura 2: Microfilária de *W. bancrofti* corada com eosina-giemsa, seta indicando a presença da bainha, característica sine qua non da espécie.

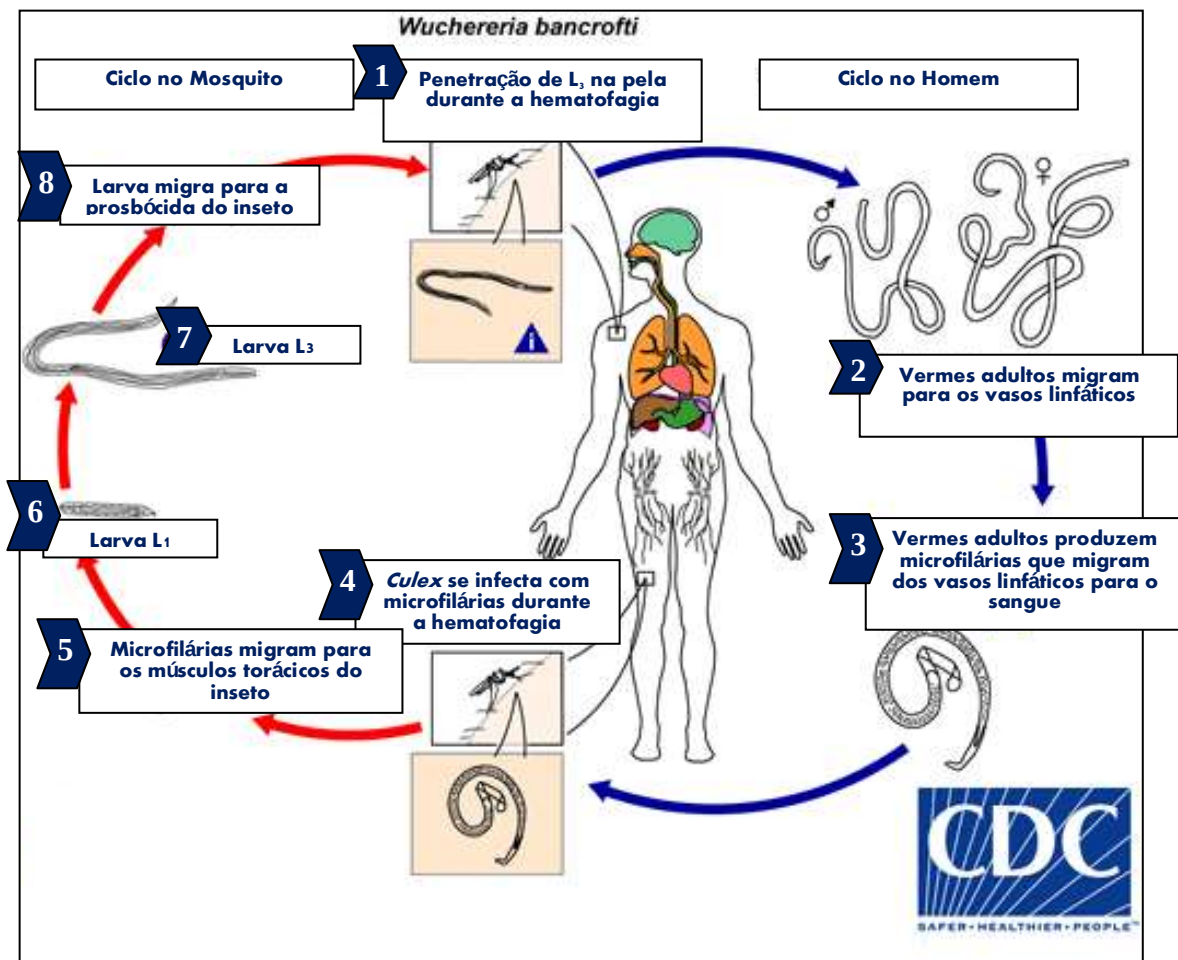


Fonte: Foto do Serviço de Referência Nacional em Filarioses, 2017.

As microfilárias, por razões desconhecidas, depois de eliminadas pela fêmea, migram dos ductos linfáticos e acumulam-se no interior da rede vascular sanguínea, principalmente nos pulmões. Ao anoitecer, elas começam a surgir na circulação periférica e seu número aumenta progressivamente até as primeiras horas da madrugada, decrescendo ao amanhecer (BRASIL, 2009; FONTES; ROCHA, 2005; REY, 2001).

A *W. bancrofti*, apresenta ciclo evolutivo heteroxeno, tendo como único reservatório o homem (BRASIL, 2009; FONTES; ROCHA, 2005; REY, 2001). A transmissão desses parasitos aos humanos ocorre através do contato com insetos dípteros, sendo o principal vetor, no Brasil, os mosquitos fêmeas, da espécie *Culex quinquefasciatus* (REGIS et al., 1996). As microfilárias infectam as fêmeas do mosquito vetor durante o repasto sanguíneo, que são seus hospedeiros intermediários. No inseto, o parasita se desenvolve, sendo transmitido durante um novo repasto sanguíneo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015, SIMONSEN; MWAKITALU, 2013).

No mosquito-vetor, as microfilárias se transformam em uma *larva salsichóide* (L₁). Após alguns dias ocorre a primeira muda, esse segundo estágio larval (L₂) cresce rapidamente, abandona os músculos torácicos e realiza a segunda muda na hemolinfa. A larva resultante do terceiro estágio (L₃) constituirá a forma infectante para o hospedeiro humano; movendo-se ativamente, desloca-se pela cavidade geral do inseto para ir alojar-se de preferência na bainha da tromba do mosquito, localizada na probóscida do inseto. Quando o vetor realiza nova hematofagia, a larva infectante migra e penetra por solução de continuidade, estimulada – acredita-se – pelo calor da pele humana (Figura 3) (FONTES; ROCHA, 2005).

Figura 3: Ciclo biológico da *W.bancrofti*. Adaptado pela autora.

Fonte: https://www.cdc.gov/parasites/lymphaticfilariasis/biology_w_bancrofti.html, acessado em 25/05/2017.

Semelhante à maioria das infecções por helmintos, as filárias têm ciclos de vida complexos que envolvem vários estágios de desenvolvimento dentro do hospedeiro humano. A resposta imune a estes parasitas abarca múltiplas vias efetoras dirigidas contra diferentes fases do parasita, cada uma das quais ocorre simultaneamente dentro do mesmo hospedeiro (NUTMAN; KUMARASWAMI, 2001). O delineamento dessas respostas imunes na FL tem sido um processo dinâmico, com novas descobertas após a identificação de cada nova citocina, quimiocina e subconjunto de células T. Avanços no diagnóstico indicam que a infecção "ativa" ou patente, a presença de microfilárias e / ou vermes adultos são determinantes na natureza da resposta imune sistêmica na infecção crônica com parasitas filariais (NUTMAN et al., 2001).

Geralmente, é na infância ou na adolescência, que os indivíduos ficam mais expostos a infecção, podendo permanecer clinicamente assintomáticos durante anos (NUTMAN; KUMARASWAMI, 2001). Contudo, sabe-se que nos casos clinicamente assintomáticos, praticamente todos os indivíduos apresentam algum dano subclínico incluindo hematúria e/ou

proteinúria, aumento dos vasos linfáticos (linfangiectasia) quando vistos pela imagem, com maior frequência nos homens na região escrotal, e, nas mulheres, nos membros inferiores (DREYER; DREYER, 2000).

Acredita-se que as respostas locais dirigidas contra a presença do parasita adulto de *W. bancrofti* nos vasos linfáticos trazem consequências patológicas, que causam processos granulomatosos e proliferativos, causando disfunção ou lesão inflamatória, promovendo a dilatação e espessamento das paredes desses vasos; e embora ocorra alguma colateralização, a função linfática permanece gravemente comprometida (NUTMAN; KUMARASWAMI, 2001).

As consequências decorrentes da doença filarial que podem levar à morbidade clínica, na maioria das vezes, é reflexo da natureza e da intensidade da resposta imune do hospedeiro ao parasitismo (KING; NUTMAN, 1991; NUTMAN; KUMARASWAMI, 2001). Estima-se que de 10 a 15% dos indivíduos infectados evoluam para cronicidade, gerando, no universo dos doentes, uma parcela importante da população que precisará de cuidados especiais relacionados com a recuperação de sua saúde física e mental (Figura 4) (DREYER; DREYER, 2000; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000).

Figura 4: Indivíduos com FL crônicos, apresentando linfedema nos membros inferiores.



Fonte: http://www.who.int/lymphatic_filariasis/disease/en/. Adaptado pela autora.

Acessado em 25/05/2017.

As formas sintomáticas da parasitose podem variar desde formas agudas a crônicas: o processo inflamatório agudo (que ocorre em uma pequena parcela da população) é causado diretamente pela morte do verme adulto da filária, denominado de linfangite filarial aguda, raramente produzindo linfedema. Já no processo crônico, há disfunção linfática ocasionada pela linfangiectasia, e esta, por sua vez, induzida pelos vermes filariais adultos, gerando

consequências diferentes, a depender da região anatômica em que os mesmos estejam localizados. Quando se localiza em áreas que têm contato com o exterior (membros superiores e inferiores, mama feminina, parede escrotal ou pênis) pode haver predisposição para as infecções bacterianas secundárias. Quando o linfático afetado drena linfa para partes internas do organismo, causa hidrocele, quilocele e quilúria. (KING; NUTMAN, 1991; DREYER; DRYER, 2000; EVANGELISTA NETTO, 2008).

2.2 Aspectos Epidemiológicos e Plano de Eliminação da Filariose Linfática

Em 1993 a Força Internacional para Erradicação de Doenças (FIED), em uma de suas revisões ordinárias, estabeleceu uma lista de enfermidades (principalmente infecciosas) que poderiam ser eliminadas efetivamente ou que tinham potencial para a eliminação, com base em recursos disponíveis para combatê-las àquele tempo. Dentre as seis doenças elegíveis, com potencial de erradicação, estavam: Dracunculose, Poliomielite, Rubéola, Caxumba, Cisticercose e Filariose Linfática (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1993). Após considerarem as particularidades da FL, concluíram que a administração de doses anuais dos medicamentos e sal contendo estas drogas, poderia garantir a eliminação da FL do planeta (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1993).

No Brasil, o Conselho Nacional de Saúde, em 1996, através da Resolução Nº 190 de 13/06/96, criou o Plano Nacional para Eliminação da Filariose Linfática (PNEFL), definindo diretrizes e estabelecendo como estratégias: avaliação dos focos ativos e extintos; interrupção da transmissão nos focos endêmicos com quimioterapia e controle vetorial; e assistência integral aos portadores de morbidade filarial para garantir a eliminação da endemia no país (ROCHA et al., 2010).

Em maio de 1997, a Assembleia Mundial da Saúde preocupada com o aumento da disseminação e da distribuição da FL em todo o mundo, tanto em áreas urbanas bem como nas áreas rurais; consolidou a indicação da FIED e anunciou através da resolução WHA 50.29 que a FL deveria ser eliminada como um problema de Saúde Pública no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1997). Os avanços nos métodos de tratamento através de abordagens simples e bem-sucedidas no manejo dos pacientes com morbidade filarial, juntamente com notáveis melhorias nas técnicas de diagnóstico da infecção, abriram uma oportunidade para eliminar a doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000).

Três anos depois, o Plano Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL) foi elaborado e lançado (2000), para orientar os países membros a desenvolverem Programas

Nacionais e Planos de Ação a fim de eliminar a FL até 2020 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000; DREYER et al., 2009). O PGEFL representa uma busca coletiva em cumprir o compromisso global assumido, impedindo a propagação da infecção e aliviando o sofrimento dos pacientes. Apresenta como base dois grandes pilares: interrupção da transmissão e controle da morbidade nas fases aguda ou crônica da doença (DREYER et al., 2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000; 2015).

A interrupção da transmissão da FL pode ser alcançada de três maneiras: reduzindo e, conseqüentemente, eliminando o reservatório de microfilárias através do tratamento da população; diminuindo o contato entre seres humanos (especialmente portadores de microfilarias) e mosquitos vetores; e por fim, a combinação de ambas abordagens. Tais medidas levam a uma redução da carga de microfilarias na comunidade, quebrando a manutenção da infecção nessas áreas. Contudo, as estratégias escolhidas podem diferir de uma área endêmica para outra, dependendo da situação de cada uma, da relação entre parasita-vetor presente e dos cuidados de saúde existentes (OTTESEN et al., 1997).

Segundo recomendações do PGEFL (2000), áreas endêmicas onde a prevalência da antigenemia ou da microfilaremia para FL fossem maiores ou iguais a 1%, deveria haver à Administração de Medicamentos em Massa (AMM), anualmente, por um período de 4 a 6 anos (DREYER et al., 2009; RAMAIAH; OTTESEN, 2014; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015). Repetidos ciclos de AMM são necessários para eliminar os vermes adultos, os quais conseguem manter a viabilidade reprodutiva mesmo após o tratamento. Esse número dependerá, em parte, da proporção da população que ingere os medicamentos em cada ciclo (cobertura), ou seja, da probabilidade de tratar todas as pessoas com infecções (até os assintomáticos) que é maximizado ampliando a cobertura da AMM. Por isso, a OMS recomenda em média cinco anos de tratamento anual, com pelo menos 65% de cobertura da população total, e só posteriormente a esse período, avaliação do impacto nos níveis de infecção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016).

As drogas utilizadas para combater os parasitos filariais são: Albendazol, Ivermectina e Dietilcarbamazina (DEC). Estudos de campo constataram a eficácia dessas drogas na redução de mais de 90% da carga parasitária (OTTESEN et al., 1997, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000; 2015), capaz de proporcionar redução significativa na densidade de parasitas circulantes no sangue das pessoas infectadas e na prevalência de infecção na comunidade, a níveis tão baixos onde a transmissão não poderia ser mantida, cessando eventualmente novas infecções e a necessidade de continuidade do tratamento (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016).

Todas as drogas supracitadas possuem atividade microfilaricida, e a DEC também apresenta efeito macrofilaricida. Elas ainda agem contra outros parasitas intestinais (OTTESEN et al., 1997; RAMAIAH; OTTESEN, 2014). De acordo com PGEFL, dois regimes de distribuição podem ser usados na AMM: dois fármacos - Ivermectina (200 µg / kg de peso corporal) coadministrado com DEC (6 mg / kg) ou Albendazol (400 mg); ou uso exclusivo de DEC (6 mg / kg). É possível também, usar sal fortificado com DEC em substituição ao sal de cozinha normal durante 6 a 12 meses (OTTESEN et al., 1997).

Para prevenir a invalidez e controlar as incapacidades nos indivíduos com morbidade filarial, as recomendações do PGEFL estavam direcionadas a aplicação de medidas que viessem a aliviar o sofrimento dos portadores, baseadas em novas abordagens sobre o controle da doença. Essas medidas foram direcionadas à prevenção de infecções bacterianas, permitindo interromper ou mesmo reverter as sequelas existentes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000; OTTESEN et al., 1997). Estimativas recentes indicam que as intervenções realizadas no mundo tenham prevenido ou curado mais de 97 milhões de casos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000; 2017).

Os programas e esforços para eliminar a FL só conseguiriam sucesso se amparados na vontade política e no compromisso dos gestores de saúde. Isso exigiu o reconhecimento por parte destes, de que a FL era um importante problema de saúde, que leva à privação social e econômica das comunidades endêmicas, especialmente aquelas que já estão marginalizadas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000).

No início do PGEFL em 2000, cerca de 120 milhões de pessoas estavam infectadas com *W. bancrofti*, das quais 40 milhões sofriam com a doença crônica, distribuídas em 81 países (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000). Em 2009, quase dez anos após o lançamento do PGEFL, houve expansão do tratamento para mais de 496 milhões de pessoas em 53 países, destes 37 estavam em vias de completar o quinto ciclo de AMM e prontos para avaliar a possibilidade de interromper o tratamento e fazer a transição para a vigilância pós-AMM (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015).

Em 2011, alguns países com antecedentes de baixa prevalência foram reavaliados e declarados não endêmicos, restando 73 países. Em 2013, 13 dos 73 países remanescentes haviam concluído a AMM e iniciado a fase de vigilância pós-AMM; 42 países estavam implantando o programa e 18 países ainda não tinham implantado nenhum. Estes 18 países - 15 na região da África - representam cerca de 10% da população endêmica global (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015; 2016; RAMAIAH; OTTESEN, 2014).

Uma estimativa do impacto da AMM de 2000 a 2012 indica que houve uma redução para cerca de 67 milhões de pessoas infectadas por *W. bancrofti* no mundo e para 36 milhões no número de portadores de manifestações crônicas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017).

A AMM em 2013 havia conseguido curar ou prevenir um total de 96,71 milhões de casos FL, o que equivale a uma redução de 59% (no número de casos estimados para 2013 se não houvesse a AMM) (RAMAIAH; OTTESEN, 2014). Nas Américas, o Brasil, o Haiti e a República Dominicana que haviam aderido à AMM, tinham e até o ano de 2013, tratado cerca de sete milhões de pessoas (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2015).

Em 2015, os programas nacionais em diversas regiões haviam conseguido tratar mais de 556 milhões de pessoas, alcançando uma cobertura mundial de AMM acima de 79% (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015; 2016). Contudo, ainda encontramos diversas situações em diferentes países: há alguns que não iniciaram ou precisam confirmar se há exigência de implantarem a AMM; outros continuam com AMM em andamento, inclusive com 100% de cobertura alcançada. Existem ainda aqueles em que a AMM foi posta em prática, mas não conseguiu alcançar a cobertura mínima (65%) e muitos se encontram com o processo de vigilância pós-AMM em curso, e deverão verificar a interrupção da transmissão através de Inquéritos de Avaliação de Transmissão (IAT), podendo obter o certificado de eliminação até 2022 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016; RAMAIAH; OTTESEN, 2014).

Dados divulgados em 2017, pela OMS, confirmam que seis países endêmicos conseguiram o certificado de eliminação (Camboja, Ilhas Cook, Maldivas, Niue, Sri Lanka e República de Vanuatu), de acordo com processo atualmente padronizado para validar a eliminação (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). Além disso, incluindo os seis países validados, 18 haviam descontinuado os programas de AMM e passado para a vigilância pós-eliminação. Constataram que a AMM ainda é necessária em pelo menos 54 países, 25 destes já implementaram pelo menos uma rodada de AMM. Se tiverem cobertura efetiva (65%) durante as rodadas consecutivas, eles poderão parar a AMM até 2020. Outros 20 países estão implementando, mas ainda não atingiram toda a cobertura necessária. A AMM não foi relatada em 10 países, dos quais um foi reconhecido recentemente como não endêmico para FL, dispensando a AMM e dados epidemiológicos são necessários de três países para confirmar se a AMM é necessária (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017).

2.3 Histórico da Filariose Linfática no Brasil

No Brasil, inquéritos hemoscópicos realizados durante a década de 50, por meio de busca ativa, apontavam casos autóctones de microfilaremia em diversas cidades brasileiras. Estes inquéritos foram promovidos pelo Departamento Nacional de Endemias Rurais (DNERu) sob coordenação do Dr. René Rachou, e constituíram o primeiro estudo sobre a distribuição geográfica da filariose no Brasil (RACHOU, 1957). As campanhas promovidas pelo DNERu detectaram 11 localidades como endêmicas pela presença de indivíduos microfilarêmicos e de mosquitos vetores com larvas infectantes de *W. bancrofti*: Ponta Grossa – SC; Belém – PA; Barra de Laguna – SC; Recife – PE; Castro Alves – BA; Florianópolis – SC; São Luís – MA; Salvador – BA; Maceió – AL; Manaus – AM e Porto Alegre – RS (RACHOU, 1956; 1957; 1960; FRANCO; SILVA LIMA, 1967).

Particularmente, no Estado Pernambucano, inquérito hemoscópico realizado por Azevedo e Dobbin Jr. (1952), examinou 450 moradores de um bairro da cidade e encontrou índice de microfilaremia de 9,2%, demonstrando a capital Pernambucana, Recife, como importante área endêmica para FL no país. Em seguida, o DNERu realizou um inquérito epidemiológico (1955), que examinou mais de 23 mil pessoas e dissecou cerca de 14 mil fêmeas de *Culex*; encontraram um índice de microfilaremia de 6,9% e um índice de infecção vetorial de 7,3% (FRANCO; SILVA LIMA, 1967; MACIEL; FURTADO; MARZOCHI, 1999).

Ainda nos anos 1950, medidas de controle como combate ao vetor e tratamento terapêutico para os microfilarêmicos foram realizados nas 11 localidades vistas como endêmicas. Porém, a constatação, ainda na década de 50, que os inseticidas existentes eram ineficazes contra os mosquitos adultos e o método de controle que atuava sobre as formas larvais era bastante dispendioso levou ao abandono da estratégia de combate ao vetor e voltou-se a atenção para o tratamento de indivíduos microfilarêmicos em todo o país (MACIEL; FURTADO; MARZOCHI, 1999).

Ao final da década de 60, o DNERu chegou a declarar que dentre os focos endêmicos descobertos, os únicos que continuavam ativos, eram às cidades de Recife, Belém e Salvador. E que as intervenções realizadas, a partir desta constatação, deveriam priorizar essas áreas (RACHOU, 1960; MINISTÉRIO DA SAÚDE. SUCAM, 1985; 1989).

No período de 1979 a 1984, trabalhos desenvolvidos revelaram que a filariose, no Brasil, não apresentava a mesma gravidade do passado. Assim, a endemia continuou a ser considerada como de importância médico-sanitária apenas nos focos residuais de Belém – PA

e Recife – PE (MINISTÉRIO DA SAÚDE. SUCAM, 1983; MARQUES, 1986), sendo Recife, em 1989, considerada pelo Ministério da Saúde (MS), o principal foco no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE. SUCAM, 1989), em decorrência do aumento da prevalência, em 1985 (MINISTÉRIO DA SAÚDE. SUCAM, 1985).

Durante os anos 90', na cidade de Maceió-AL, área considerada pelo Ministério da Saúde (MS) na época como “livre de transmissão”; houve a redescoberta de casos da endemia. Dreyer e Col. (1991) ao examinarem militares do exército encontraram dois casos autóctones no município. Em seguida Fontes e Col. (1998) em inquérito hemoscópico feito em escolares, constataram transmissão em uma área centralizada da cidade. Ambos os estudos confirmaram a presença da infecção no local, entretanto, foi constatado que as ocorrências eram restritas a apenas três bairros: Feitosa, Jacinto e Pitanguinha. Após a implantação do Programa de Eliminação da FL em Maceió (1999) houve uma redução significativa no número de casos, sendo o último registrado em 2006, em inquérito envolvendo 22.934 indivíduos, onde apenas um indivíduo apresentou 4 microfilarias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006, LEITE et al., 2009).

Em Belém-PA, inquérito realizado pelo Serviço Nacional de Malária em 1951, evidenciou a presença de microfilarias de *W. bancrofti* em mais de 8 mil exames realizados naquele ano, apresentando uma positividade de 9,8% (FRANCO; SILVA LIMA, 1967; MACIEL; FURTADO; MARZOCHI, 1999). Após várias ações visando à eliminação a região apresentou uma redução da prevalência da infecção de 8,5% em 1957 para 0,2% em 1983 (COUTINHO; MEDEIROS; DREYER, 1996). No período de 1995 a 2003, após inquéritos hemoscópicos, nenhum microfilarêmico na região foi encontrado a partir de 1999, exceto no ano de 2001 com a identificação de um indivíduo positivo. Em reunião técnica realizada na cidade, no ano de 2008, ficou evidente a interrupção da transmissão da infecção na localidade, uma vez que dentre 3000 exames em escolares realizados para verificar a prevalência de antígenos filariais, todos foram negativos. E em mais de 40 mil mosquitos avaliados por PCR para detectar a infecção por *Wuchereria bancrofti*, todos tiveram resultado negativo (FREITAS et al., 2008).

Em Recife-PE, início dos anos 90, Medeiros et al. (1992) identificaram casos autóctones e infecção vetorial, confirmando a ocorrência de transmissão ativa, não só na cidade, mais em outros municípios da Região Metropolitana do Recife (RMR) (MARQUES, 1986; MACIEL et al., 1996; COUTINHO; MEDEIROS; DREYER, 1996; MACIEL; FURTADO; MARZOCHI, 1999). Posteriormente, inquéritos hemoscópicos em oito municípios da RMP - PE: Itamaracá, Camaragibe, Moreno, Cabo de Santo Agostinho,

Paulista, Jaboatão dos Guararapes, além de Olinda e Recife, encontrou a presença de microfilarêmicos, alguns casos autóctones e outros alóctones em todos os municípios estudados, exceto em Paulista, cujos dados não foram apresentados no período (BRASIL, 2000).

Tendo como base as diretrizes do PNEFL, após inquérito epidemiológico (1999-2000), o município de Recife identificou áreas com elevadas prevalências de infecção filarial, consideradas como núcleo de transmissão, nas quais iniciou o Programa de Controle/Eliminação da Filariose Linfática (SOUZA, 2012; RECIFE, 2002; SANTOS, 2005). Um dos bairros que foi contemplado de forma pioneira foi o bairro Alto de Santa Terezinha, onde a AMM iniciou em 2003, tendo como estratégia a mobilização da comunidade por um período de três a quatro dias, com a instalação de mini postos de medicação em vários pontos do bairro (casas comerciais, escolas, postos de saúde e nas residências dos agentes comunitários) (ROCHA et al., 2010).

Em Olinda, a implantação da AMM, baseou-se em critérios de seleção das áreas de transmissibilidade local (prevalência > 1% de microfilaremia) e o risco socioambiental. As áreas foram, então, classificadas em quatro níveis de prioridade: prioridade 1 (alto/médio risco ambiental e transmissão reconhecida), prioridade 2 (médio/baixo risco ambiental e transmissão reconhecida), prioridade 3 (baixo risco ambiental ou não transmissão reconhecida) e prioridade 4 (baixo risco ambiental e sem transmissão). A AMM iniciou em dezembro de 2005, optando-se pela estratégia de tratamento porta a porta sob supervisão, semelhante ao tratamento realizado na cidade de Belém-PA (FREITAS et al., 2008; ROCHA et al., 2010).

Com a expansão para as demais áreas de prioridade 1, o Programa de Filariose de Olinda, modificou a estratégia inicial de tratamento realizada porta a porta, incluindo o tratamento para filariose na rotina do agente de saúde, que logo passou a ser realizado pela equipe do Programa de Saúde da Família (PSF). Assim, no ano de 2007, foram envolvidos mais dois novos bairros: Alto da Bondade e Alto da Conquista (ROCHA et al., 2010).

2.4 Pesquisa de Anticorpos e Antígenos Recombinantes

Atualmente, as diretrizes da OMS para a avaliação da interrupção da transmissão recomendam o uso da prevalência da microfilaremia ou o monitoramento da antigenemia (pelo menos para *W. bancrofti*) em crianças nas áreas sentinelas e sítios de verificação aleatórios (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2015; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015). Contudo, as respostas de anticorpos - particularmente aos antígenos expressos em L₃ (as larvas infectantes) são susceptíveis de fornecer medidas muito mais precoces de transmissão em andamento do que a presença de microfilárias ou antígeno filarial circulante (HAMLIN et al., 2012; KUBOFCIK; FINK; NUTMAN, 2012).

Ensaio imunoenzimático (ELISA- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para pesquisa de anticorpos, utilizando uma variedade de diferentes antígenos filariais como ferramenta para vigilância em áreas de FL, foram desenvolvidos, e incluem: Bm14, BmSXP-1, BmR1, WbSXP-1 e Bm33. A sensibilidade destes ensaios tem sido geralmente elevada, mas a especificidade é limitada em relação às filarias que não causam FL, muitas vezes coendêmicas com *W. bancrofti* (KUBOFCIK; FINK; NUTMAN, 2012). Tentando solucionar este problema, Kubofick; Fink e Nutman (2012), utilizaram a bioinformática para identificar antígenos expressos em larvas L₃ específicos para *W. bancrofti*, tornando a pesquisa por anticorpos antifilariais, já sensível, também mais específica. Eles identificaram uma proteína recombinante que chamaram “Wb123” (KUBOFCIK; FINK; NUTMAN, 2012).

O desenvolvimento de testes diagnósticos utilizando o Wb123 parece ser promissor no monitoramento do programa global como para as suas necessidades de vigilância pós-AMM e pode vir a ser aplicada na detecção precoce de infecções recrudescentes em áreas de controle; no mapeamento de novas áreas de transmissão de infecção por *W. bancrofti* e potencialmente para certificar regiões / países como livres de transmissão (KUBOFCIK; FINK; NUTMAN, 2012; STEEL et al., 2012).

Para Hamlin et al. (2012), embora a detecção de anticorpos filariais não possa identificar definitivamente a infecção ativa, nem distinguir entre infecção passada e atual, os testes de anticorpos podem ser utilizados na vigilância para estimar as taxas de prevalência de infecção filarial. Eles podem fornecer uma identificação precoce de novas infecções e, por inferência, da transmissão em curso nas áreas endêmicas, proporcionando um rastreio rápido na população e um meio pelo qual os programas de controle poderiam ser mais rigorosamente monitorados.

2.5 Diagnóstico filarial

As dificuldades em realizar o diagnóstico humano da filariose bancroftiana decorrem, em parte, da grande diversificação das manifestações clínicas (quando presentes), dependentes de fatores relacionados com o parasita, com a resposta imunológica apresentada pelo paciente e outros cofatores. Além disso, em virtude das alterações provocadas pela *W. bancrofti* serem semelhantes àsquelas produzidas por outros agentes etiológicos, o diagnóstico clínico torna-se difícil, necessitando ser complementado com o diagnóstico laboratorial (FONTES; ROCHA, 2005).

O diagnóstico laboratorial da infecção filarial é tradicionalmente baseado na pesquisa de microfilárias na corrente sanguínea através da microscopia, mas também pode ser realizado com testes rápidos para detecção de Antígenos Circulantes Filariais (ACF) de vermes adultos de *W. bancrofti*, ELISA para detecção de anticorpos e de antígenos da FL Brugian e Bancroftiana, métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de DNA do parasita em humanos e mosquitos (Quadro 1) (DREYER; ROCHA, 1996, OLIVEIRA, 2003; SILVA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2014; REBOLLO; BOCKARIE, 2014).

Quadro 1. Resumo dos testes disponíveis para o diagnóstico da FL.

TIPOS DE DIAGNÓSTICO			
Exame	Molecular		Imagem
	PCR		Ultrassom
Horário	Qualquer horário		Qualquer horário
Característica	Detecta DNA do parasito		Dança da filaria (Verme adulto)
Vantagens	Alta sensibilidade e especificidade		Identificação apenas de vermes adultos
Desvantagens	Custo e padronização		Custo elevado e profissional capacitado
Imunológico			
Exame	ELISA-Og4C3-	CELISA-Bm14	ELISA- Wb123
Horário	Qualquer	Qualquer horário	Qualquer horário

	horário		
Característica	Detecta a presença de antígenos	Detecta a presença de anticorpos IgG4 anti-Bm14	Detecta a presença de anticorpos IgG4 anti- <i>Wb123</i>
Vantagens	Sensibilidade e especificidade superiores aos parasitológicos	Usado no diagnóstico filarial para <i>Brugia</i> ou para <i>Wuchereria</i>	Marcador de exposição à larva infectante de <i>W. bancrofti</i>
Desvantagens	Não distingue infecções: atual/passada;	Não distingue infecções: atual/passada e reações cruzadas;	Não distingue infecções: atual/passada
<u>Parasitológico</u>			
Exame	Gota Espessa – 20 a 60µL de sangue	KNOTT – 1 a 5 mL de sangue	Filtração em Membrana de Policarbonato - Até 16 mL de sangue
Horário	23:00 – 01:00	23:00 – 01:00	23:00 – 01:00
Característica	Presença de microfilárias	Presença de microfilárias	Presença de microfilárias
Vantagens	Baixo custo	Identificação de indivíduos com baixa parasitemia	Maior volume de sangue - Padrão-ouro. Identificação de indivíduos com baixa parasitemia
Desvantagens	Coleta noturna e de baixa sensibilidade	Coleta noturna, técnica laboriosa.	Coleta noturna, técnica laboriosa.

A utilização da ultrassonografia foi empregada de forma pioneira por pesquisadores brasileiros, como uma ferramenta não invasiva para o diagnóstico filarial (AMARAL et al., 1994; DREYER et al., 1996). Essa técnica permite a visualização de vermes adultos, mas é considerada uma técnica operador-dependente. É realizada apenas em casos onde há indicação clínica, e não rotineiramente (ROCHA et al., 2009).

Em relação ao diagnóstico molecular, segundo Fontes e Rocha (2005), a PCR para detectar DNA de *W. bancrofti* é uma técnica bastante sensível. E, por isso, apresenta uma importância no diagnóstico em áreas onde existem mais de uma espécie filarial. A pesquisa pode ser realizada com sangue, urina e saliva (os dois últimos de coleta não invasiva) que podem ser coletados a qualquer hora do dia; sendo capaz de detectar DNA livre em infecções ocultas (ABBASI et al., 1999; WILLIAMS et al., 1996; FURTADO et al., 1997). A utilização da PCR sofre com a falta de padronização o que gera resultados variados (NDAO, 2009), além de se tratar de uma técnica que necessita de profissionais capacitados e treinados (BOCKARIE et al., 2000; MCCARTHY et al., 1996; THANOMSUB et al., 2000).

A técnica parasitológica mais difundida para diagnóstico da FL trata-se da gota espessa, por ser de baixo custo e fácil processamento laboratorial, porém, o pequeno volume sanguíneo confere ao teste uma baixa sensibilidade, podendo não identificar indivíduos com baixa parasitemia (ROCHA, 2000; WITT; OTTESEN, 2001). A técnica de concentração de KNOTT utiliza de 1 a 5 mL de sangue venoso para pesquisa de microfilárias, aumentando a sensibilidade em comparação com a gota. Porém, é laboriosa, e por isso foi substituída nos laboratórios pela técnica de Filtração em Membrana de Policarbonato - FMP (considerada o *gold standard* para pesquisa de microfilárias); é mais sensível que as mencionadas anteriormente, utiliza até 16 mL de sangue venoso e permite identificar indivíduos com baixa parasitemia, fato esse importante como critério de cura após o tratamento. Entretanto, tem um elevado custo (ROCHA, 2004).

Os três métodos citados para pesquisa parasitológica são limitados, pois só identificam pessoas portadoras das formas embrionárias do verme (microfilárias), não identificando a presença de formas adultas do verme. Além disso, requerem que a coleta do sangue seja feita no horário noturno de 23:00h a 1:00h da manhã, devido a este ser o período de maior densidade de microfilárias de *W. bancrofti* no sangue periférico (DREYER et al., 1996).

Os testes para pesquisa de antígenos só reconhecem os produtos excretórios ou secretórios, ou seja, ACF de vermes adultos (CHATEAU, 1994; SILVA et al., 2008; ROCHA et al., 2009). A pesquisa por ACF pode ser feita através de dois testes disponíveis comercialmente: o primeiro – seria um anticorpo monoclonal (Og4C3) da classe das

imunoglobulinas IgM, produzido contra antígenos do parasita bovino *Onchocerca gibsoni*, que curiosamente reconhece antígenos circulantes no soro ou plasma de indivíduos infectados com *W. bancrofti* (BRASIL, 2009). Este tipo de abordagem foi a primeira a se tornar disponível comercialmente no formato de kit utilizando a técnica de ELISA - fabricado por JCU Tropical Biotechnology Pty. Ltd., Townsville, Queensland, Austrália - (TROPBIO, 2014) (MORE; COPEMAN, 1990).

O segundo teste para pesquisa de antígenos surgiu da necessidade de se ter um exame de fácil aplicação no campo. Assim, foi produzido o Teste de Imunocromatografia Rápida em Cartão (ICT - CardTest) pela empresa BINAX (Balgowlah, New South Wales, Austrália), que utiliza o anticorpo monoclonal AD12, no reconhecimento de um antígeno com 200 kD produzidos por vermes adultos (WEIL; LAMMIE; WEISS, 1997; ROCHA, 2004; ARAUJO, 2009; BRASIL, 2009). Este teste está sendo trocado pelo Filariasis Test Strep (FTS).

O FTS foi concebido para substituir o ICT a fim de solucionar problemas de armazenamento e de custo (preço do produto). Os países terão acesso a uma nova ferramenta equivalente ao cartão ICT por um custo menor e, além disso, que pode ser armazenada em temperatura ambiente, não necessitando de refrigeração. Comparando ICT e FTS, ambos possuem o mesmo tempo para leitura dos resultados (10 minutos) e utilizam o mesmo anticorpo (AD12) para reconhecer o antígeno de verme adulto, além disso, a adesão ao FTS proporcionou importante redução dos custos. Entretanto, o FTS apresenta algumas desvantagens como: exigência de micropipetas de 75 microlitros; não têm mais a conveniência do formato do cartão, por conter apenas uma fita, com pouco espaço para registro de informações e não pode ser aplicado em sangue coletado com EDTA, pois leva a resultados falsos positivos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2015).

A busca pelo aprimoramento de metodologias confiáveis e práticas, capazes de avaliar com precisão e rapidez a distribuição da infecção, tem impulsionado a investigação por novas ferramentas diagnósticas rápidas na identificação de comunidades com infecção filarial. Em apoio, pesquisas baseadas na detecção de anticorpos estão atualmente em teste de campo e dados estão sendo coletados para comparar os resultados destes testes com os de outros testes diagnósticos (OTTESEN et al., 1997, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2015).

O uso de testes diagnósticos para detecção de anticorpos antifilariais, indicativo da exposição a larvas infectantes (quer haja ou não a infecção) têm se mostrado um método sensível e específico para diagnosticar a FL (HAMLIN et al., 2012). A pesquisa de anticorpos específicos através de antígenos recombinantes supera os problemas de reações cruzadas com

outros parasitos filariais que existiam quando se utilizava extratos brutos filariais (DISSANAYAKE et al., 1994; CHANDRACHEKAR et al., 1994).

A Companhia Cellabs (Brookvale, NSW, Austrália) desenvolveu o “CELISA Test”, que vem equipado com reagentes padronizados e um protocolo otimizado (WEIL et al., 2011; HAYLEY et al., 2011). Trata-se de um ELISA indireto, ou seja, detecta anticorpos (IgG4) para o antígeno recombinante *Bm14* e pode ser realizada com soro, plasma ou sangue coletado em qualquer horário do dia. O *Bm14* trata-se de uma proteína recombinante, que foi selecionada de uma biblioteca de DNA complementar de *B. malayi*, e é reconhecido no soro de pacientes com FL (CHANDRASHEKAR et al., 1994; RAMZY et al., 1995; WEIL et al., 1999; LAMMIE et al., 2004).

Outro teste de anticorpos desenvolvido, mas ainda não disponível comercialmente, é o *Filaria Detect*[™] IgG4 ELISA System (ELISA-Wb123), um ELISA indireto que detecta anticorpos (IgG4) para o antígeno recombinante Wb123, produzido pela companhia Inbios (InBios International, Inc.) (STEEL et al., 2012; INBIOS, 2015). O antígeno Wb123 é uma proteína recombinante (de 42,259 Da), característica da fase larval (L₃) de *Wuchereria bancrofti* formada por uma sequência de 372 aminoácidos [GENBANK: ADT91439.1] (KUBOFCIK; FINK; NUTMAN, 2012), pertencente à família serpinas, as quais são inibidoras de proteases. Essas inibidoras de proteases, que são expressas em maior quantidade nas larvas L₃, são altamente imunogênicas em seres humanos. Embora existam serpinas humanas, estas compartilham pouca homologia com as de Wb123 (HAMLIN et al., 2012).

O diagnóstico com o Wb123 provou ser altamente sensível e específico em detectar a exposição à *W. bancrofti* (KUBOFCIK; FINK; NUTMAN, 2012). Segundo Steel et al. (2012), o teste com o Wb123 combina três atributos específicos que o tornam particularmente valioso para uso no PGEFL: detecta a exposição à *W. bancrofti*; sua prevalência, especialmente em crianças pequenas, reflete os níveis de exposição (e presumivelmente de transmissão) na população e; é altamente específico para detectar *W. bancrofti*, mostrando pouca ou nenhuma reatividade cruzada em soros de pacientes com Oncocercose, Loíase ou Mansonelose.

Ao contrário do Bm14 (que é extraído de vermes adultos de *Brugia malayi*), o Wb123 é extraído de larvas L₃ de *Wuchereria bancrofti*, que são as formas infectantes do verme em humanos, o que a torna mais específico. Assim considerando que a *W. bancrofti* é a espécie responsável pela infecção no Brasil, e na maior parte do mundo, buscou-se com essa pesquisa elucidar a importância do Wb123, ainda pouco estudado no mundo e inédito em nosso país,

como ferramenta de diagnóstico de monitoramento da infecção filarial em áreas endêmicas submetidas ao AMM e o comportamento dos anticorpos antifilariais para o Wb123.

Outra abordagem metodológica que pode ser aplicada nas investigações filariais é a avaliação direta dos parasitas com a técnica de PCR nos mosquitos vetores, denominado Xenomonitoramento (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2015). A princípio, a constatação da presença do parasita em vetores era realizada através da dissecação de mosquitos, seguida da análise microscópica para identificação específica e quantificação das larvas presentes em diferentes estádios evolutivos. Esse método, segundo FURTADO et al. (1997), bastante cansativo e demorado, algumas vezes de resultados duvidosos quanto à distinção específica das larvas, principalmente em áreas em que há presença de outras espécies de filarídeos, foi substituído pela Técnica de PCR, sensível o bastante para identificar a presença de uma larva de *W. bancrofti* em amostra com até 100 mosquitos.

O avanço no desenvolvimento e na validação da detecção de anticorpos antifilariais ou do xenomonitoramento para o diagnóstico filarial é importante principalmente nas áreas onde os Programas de Eliminação para FL foram estabelecidos; estima-se que pelo menos uma destas novas ferramentas esteja disponível para uso na vigilância pós-AMM, em um futuro próximo, podendo até atuar de forma complementar às outras (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2015; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o comportamento dos principais marcadores de infecção filarial em indivíduos microfilarêmicos, residentes em áreas endêmicas da Região Metropolitana de Recife, Pernambuco, submetidos ao tratamento em massa.

3.2 Específicos

3.2.1 Definir o ponto de corte do ELISA-Wb123 para utilização em programas nacionais de eliminação da FL;

3.2.2 Avaliar o perfil de resposta para o ELISA-Wb123 em relação a microfilaremia;

3.2.3 Avaliar o ELISA-Wb123 frente ao Bm14 – “Comparação entre testes de anticorpos baseados em antígenos recombinantes como ferramenta para vigilância da FL em áreas submetidas a AMM”;

3.2.4 Comparar o desempenho do teste ELISA-Wb123 em relação ao teste ELISA-Og4C3, através da observação da cinética de anticorpos e de antígenos;

3.2.5 Avaliar a cinética de anticorpos frente ao antígeno recombinante Wb123 utilizando o teste ELISA-Wb123 como ferramenta diagnóstica de monitoramento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

A princípio foi realizado um estudo de avaliação de teste diagnóstico para verificar a validade do teste *Filaria Detect*TM IgG4 ELISA System, baseado na pesquisa de anticorpos produzidos para o antígeno recombinante Wb123, através da análise da curva ROC e outras medidas de precisão como: sensibilidade, especificidade, valores preditivos em indivíduos sabidamente positivos e negativos (SACKETT; HAYNES, 2002; BRASIL, 2014).

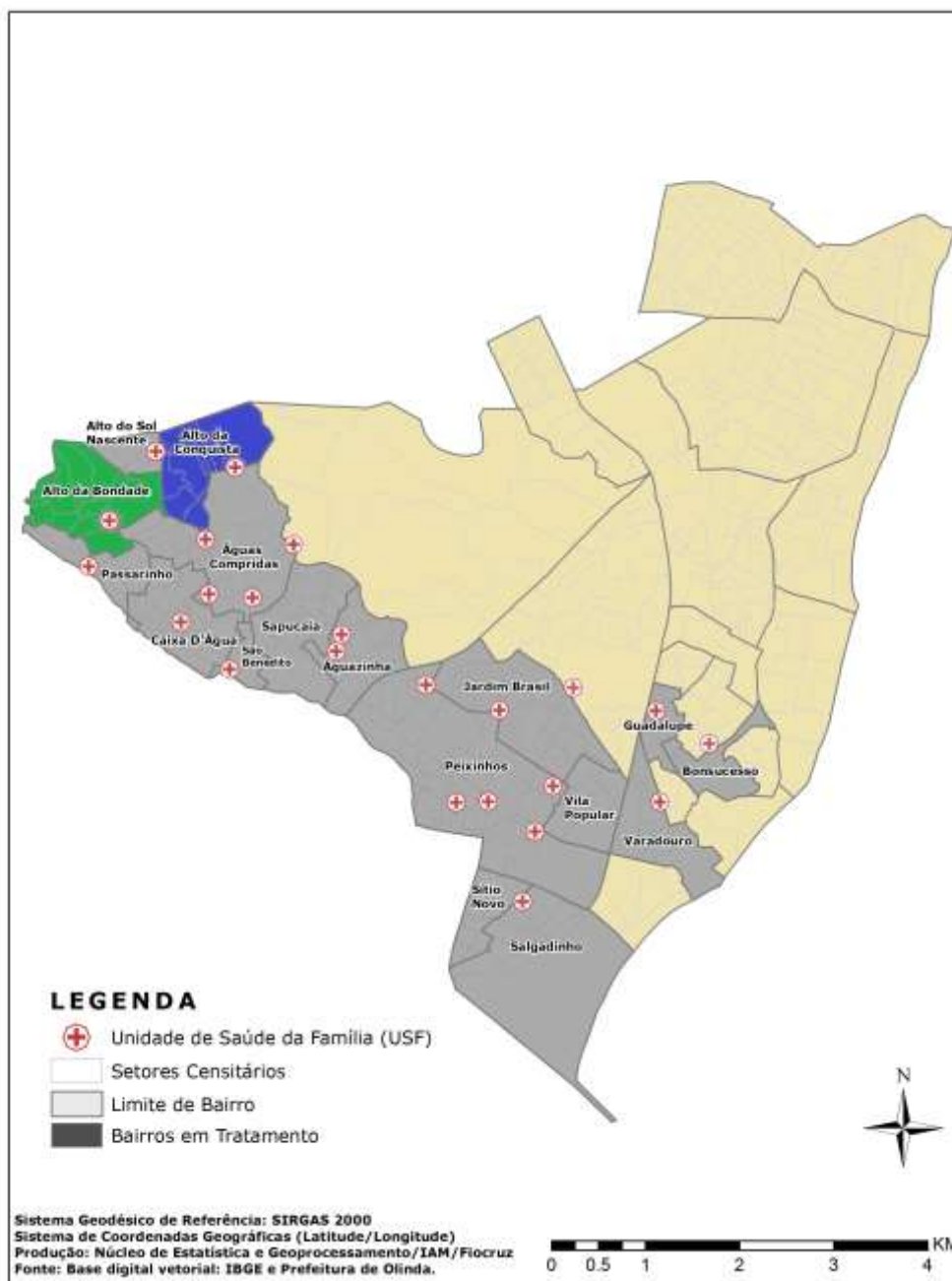
Em seguida foi feito um estudo de seguimento (PEREIRA, 2013), com a seleção de 63 indivíduos microfilarêmicos, submetidos à AMM. Esses indivíduos foram selecionados a partir de um inquérito parasitológico, realizado antes do início do AMM, sendo então acompanhados durante cinco anos consecutivos. Todos os indivíduos foram tratados anualmente, por cinco anos, com DEC 6 mg/kg, dose única.

4.2 Local do estudo

Os 63 indivíduos selecionados para o estudo de seguimento, residiam em municípios endêmicos da RMR submetidos à AMM: a cidade de Olinda, e a capital pernambucana Recife. Em Olinda foram selecionados os bairros Alto da Conquista, com população de 5.245 habitantes e área 83 ha e Alto da Bondade, com população de 8.280 habitantes e área de 93 ha. O Alto da Conquista, em inquérito parasitológico realizado em 1998, apresentou uma prevalência de microfilaremia de 9,2% para FL. Embora, o bairro do Alto da Bondade (Figura 5 - Verde) não tenha sido avaliado neste inquérito, foi selecionado para AMM por fazer fronteira com o bairro do Alto da Conquista (Figura 5 - Azul). No Alto da Bondade, a população elegível foi de 7.263 pessoas e a população tratada 6.243 pessoas; para o Alto da Conquista, a população elegível foi de 8.104 pessoas e população tratada 7.465 pessoas, obtendo-se coberturas de 86% e 92%, respectivamente (BRAGA et al., 2001; IBGE, 2013).

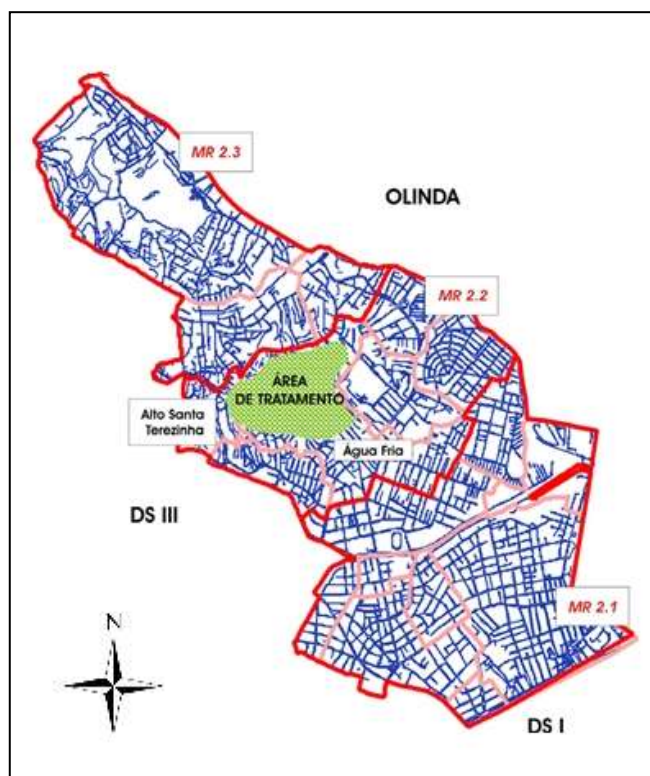
Em Recife (Figura 6), temos o bairro Alto Santa Terezinha com população 7.703 habitantes, área de 31 ha, cujo um inquérito, entre agosto de 1999 e maio de 2000, revelou uma prevalência de 10,37% para FL (BRAGA et al., 2001; RECIFE, 2002; IBGE, 2013). A AMM iniciou no ano de 2003, com população elegível de 23.510 pessoas, alcançando-se uma cobertura de 96%, o que correspondeu a 22.567 pessoas tratadas (LIMA et al., 2007. ROCHA et al., 2010).

Figura 5: Mapa do município de Olinda ilustrando os bairros: Alto da Bondade (Verde) e Alto da Conquista (Azul), Olinda-PE.



Fonte: Adaptado pela autora (2018).

Figura 6: Mapa do município de Recife, ilustrando o bairro Alto Santa Terezinha, área verde onde ocorreu a AMM, Recife – PE.



Fonte: Adaptado pela autora (2018).

4.3 Amostra e/ou População do estudo

Para a avaliação do teste diagnóstico *Filaria Detect*TM IgG4 ELISA, foram selecionadas 256 amostras de soros a partir do Banco de Amostras Biológicas do Serviço de Referência Nacional em Filariose (SRNF) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) / Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), em Pernambuco (ANEXO 1). Dentre essas amostras havia indivíduos sabidamente positivos para FL (microfilarêmicos) e negativos (endêmicos normais e não endêmicos), sem microfilárias e sem vermes adultos. A microfilaremia foi avaliada pela técnica de Filtração em Membrana de Policarbonato (FMP). Os diagnósticos imunológicos das amostras foram feitos com a pesquisa do antígeno, através do Teste *Og4C3-ELISA*, e de anticorpo, pelo *Lymphatic Filariasis Bm14 Antibody CELISA*.

- Endêmico normal: indivíduo residente em área endêmica para FL, exposto ao parasito, mas, sem evidência clínica da doença e ou parasitológica da infecção (com exames laboratoriais e de imagem negativos);

- Não endêmicos: indivíduos residentes em área não endêmica para FL, com exames negativos.

Para o estudo de seguimento, a amostra foi constituída pela seleção de 63 indivíduos, microfilarêmicos, que foram acompanhados, do início da AMM, por cinco anos consecutivos com coletas anuais de amostras biológicas. Dentre os selecionados, havia adultos, crianças e adolescentes de ambos os sexos, com diferentes faixas etárias moradores dos bairros: Alto da Bondade, Alto da Conquista em Olinda e Alto Santa Terezinha em Recife. As coletas destas amostras ocorreram seis meses antes da administração dos medicamentos, no horário entre 23:00 e 1:00 hora da manhã, respeitando a periodicidade do parasito (DREYER et al., 1996). Foram coletados 5 mL de sangue venoso, sendo 1 mL em tubo contendo EDTA para a FMP e os 4mL restantes em tubo seco para os testes sorológicos. Para que fossem incluídos no estudo, cada indivíduo deveria apresentar um número mínimo de três coletas anuais dentro do período pesquisado.

4.4 Período do estudo de seguimento

Em Recife o período de estudo compreendeu o ano de 2003 (início do tratamento) até o ano 2009 (RECIFE, 2008). Contudo, em 2008, a Prefeitura do Recife, por razões políticas, não realizou a coleta desse material, nem houve tratamento. Na cidade de Olinda o período foi de 2007 a 2012 (OLINDA, 2009; ROCHA et al., 2010).

4.5 Fluxograma de Seleção da amostra do seguimento

Do total de 178 indivíduos selecionados para o estudo, 84 tiveram que ser excluídos, pois não tinham resultado parasitológico positivo ou apresentaram problemas que não permitiram a realização da FMP. Das 94 que restaram - 31 foram retirados - visto que não seria possível ter o acompanhamento dos mesmos durante o período de estudo com a coleta de no mínimo 3 anos durante o todo o período. Dessa forma, apenas 63 amostras foram selecionadas.

Figura 7: Fluxograma de seleção da amostra “seguimento”.

Fonte: Autor, 2018

4.6 Categorização das idades dos indivíduos do seguimento

Com a finalidade observar o comportamento do teste ELISA-Wb123 e também dos outros testes realizados neste estudo em relação a faixa etária, o grupo de 63 indivíduos foi dividido em oito classes etárias (Tabela 2). Elas foram definidas de acordo com o tamanho da amostra, fornecendo reflexo da mesma de forma semelhante à distribuição realizada por Jaoko et al., (2007).

Tabela 1. Categorização da Idade

Faixa etária
3 a 10 anos
11 a 15 anos
16 a 20 anos
21 a 30 anos
31 a 40 anos
41 a 50 anos
51 a 60 anos
60+ anos

Fonte: Autor, 2018

4.7 Descrições das técnicas

4.7.1 Para o estudo de avaliação diagnóstica

- **Padrão Ouro:** Filtração em Membrana de Policarbonato “FMP” (pesquisa parasitológica): As amostras de sangue venoso foram filtradas em membranas de 13mm e poros de 3 mm de diâmetro. Os filtros foram lavados com solução salina e água destilada (água tipo II) até que a membrana ficasse límpida. A membrana foi colocada em uma lâmina e posta para secar a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram fixadas com álcool metílico, coradas com Hematoxilina de Carazzi e lidas em microscópio óptico. O resultado foi considerado positivo quando encontrado no mínimo uma microfilária e considerado negativo quando não foi encontrada nenhuma microfilária.
- **Pesquisa de Antígenos “ELISA-Og4C3”:** foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e protocolos laboratoriais. No momento da realização do teste, as amostras de soro foram descongeladas e uma alíquota de 100 µL de soro foi diluída em 300 µL do diluente do kit. Em seguida, a solução foi fervida durante 5 minutos a uma temperatura de 99°C e centrifugada a 10.000 g por 5 minutos. Posteriormente, uma alíquota de 50 µL foi retirada do sobrenadante de cada amostra e aplicada nos poços da placa de ELISA, previamente sensibilizada pelo anticorpo monoclonal Og4C3. Alíquotas de 50 µL dos sete padrões e do branco (diluente sem soro) foram colocadas em duplicata na placa. Após a incubação da placa em câmara úmida por uma hora, ela foi lavada por três vezes, e foi acrescentado primeiro uma solução diluída de anticorpo anti-Onchocerca de coelho, conjugado e cromógeno que acompanham o kit. Cada acréscimo de reagente na placa foi precedido de três lavagens, e aplicou-se o período de incubação de 1h. Depois do último período de incubação, a placa foi lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450nm, onde os resultados foram expressos em absorbância (densidade ótica). Os valores expressos em densidade ótica foram convertidos em unidade de antígeno por fórmula específica no Excel. Quando a amostra foi positiva para o antígeno filarial, a unidade de antígeno (UA) foi igual ou maior que 128 UA. Quando a amostra foi negativa, esse valor foi menor que 128 UA.
- **Pesquisa de anticorpos anti-Bm14 “CELISA - Bm14”:** este teste é produzido pela Cellabs (Cellabs Pty Ltd., Brookvale, Australia), e foi realizado de acordo as instruções do fabricante. As amostras de soro foram diluídas na proporção de 1:100

com a solução diluente presente no kit. Em seguida, 100µl dessa diluição, juntamente com os controles de referência (positivo, negativo e branco) foram adicionados nos poços da placa de ELISA previamente sensibilizada com o antígeno. Após incubação em câmara úmida a 37°C por 1h, a placa passou por quatro lavagens. Após essa lavagem, 100µl do conjugado diluído foi adicionado em cada poço e permaneceu incubada por 45 minutos a 37°C, conforme instruções do fabricante. Em seguida, a placa foi novamente lavada e, após esse procedimento, foi adicionado 100µl do substrato (preparado de acordo com as instruções do fabricante) em cada poço. Finalmente, a placa foi colocada em câmara escura e agitada manualmente a cada cinco minutos (por três vezes). Por fim, a interrupção da reação antígeno-anticorpo foi realizada, com a adição de 100µl da solução de parada. A leitura da placa foi feita em espectrofotômetro, com densidade ótica (DO) medida em comprimento de onda de 450nm a 620nm. O *cut-off* foi calculado a partir das médias de amostras de áreas não endêmicas sabidamente livres da infecção, onde os valores somados a 3 desvio-padrões para mais eram considerados positivos, para menos considerados negativos, e os valores contidos nesse intervalo como indeterminados. Esses indeterminados foram excluídos da análise.

- **Pesquisa de anticorpos anti-Wb123 “ELISA-Wb123”:** foi realizada com o teste “*Filaria Detect*[™] IgG4 ELISA System” da companhia Inbios International, Inc. (InBios, 2015). Amostras de 100µL de soros diluídas 1:50 foram adicionadas em seus respectivos poços. Os controles internos do SRNF (soros sabidamente positivo e negativo) e do Kit foram adicionados à placa, que foi incubada a 37°C por 30 minutos. Após esse período, foi lavada 6 vezes usando 300µL da solução de lavagem. Em seguida foi adicionado o anti- IgG4 humano conjugado a peroxidase, incubada novamente a 37°C por 30 minutos. Após esse período de incubação, a placa foi lavada novamente por 6 vezes. Foi adicionado 100µL da solução de substrato (TMB) e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente, em local escuro. A reação foi parada com a adição de 50µL da solução de parada e a leitura da DO realizada em leitor de ELISA (espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan FC, Thermo Fischer Scientific) com comprimento de onda em 450nm.

A partir das DO's do Wb123 a curva ROC foi construída tendo como referência a contagem de microfilárias pela FMP (padrão ouro) para determinar a sensibilidade e especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN), razão de verossimilhança (*Likelihood ratio LR+* e *LR-*) utilizando as amostras selecionadas. A razão de verossimilhança

> 1 indica que o resultado do teste está associado à presença da infecção, enquanto que uma razão de verossimilhança < 1 indica que o resultado do teste está associado à ausência de infecção (DEEKS; ALTMAN, 2004).

4.7.2 Para o estudo de seguimento

- ✓ **Pesquisa Parasitológica** – conforme descrito acima.
- ✓ **Pesquisa de antígeno - ELISA-Og4C3**: conforme descrito acima.
- ✓ **Pesquisa de anticorpos - CELISA- Bm14**: conforme descrito acima.
- ✓ **Pesquisa de anticorpos - ELISA-Wb123**: realizado conforme descrito acima. Foram considerados positivos, os valores expressos em DO, iguais ou superiores ao *cut-off* de 0,239. De acordo com o *cut-off* estabelecido a partir da construção e análise da curva ROC.

4.8 Análises de dados

- **Para o estudo da avaliação de teste diagnóstico**

A partir desses resultados foram definidas curvas ROC para os testes tendo como referência a FMP. Esses resultados também foram utilizados para construção de uma nova curva ROC utilizando uma abordagem de Classe Latente (CL) para que os resultados de desempenho das curvas “FMP” e “CL” fossem comparados.

A Curva ROC é uma ferramenta destinada a descrever quantitativamente o desempenho de um teste diagnóstico cujo resultado pode ser tratado como uma variável contínua ou categórica ordinal. Trata-se de um gráfico do complemento da especificidade *versus* sensibilidade. Essa curva demonstra a habilidade do teste de discriminar diferentes diagnósticos da doença, logo, é uma ferramenta gráfica que serve para avaliar o desempenho de um teste, ou seja, um gráfico dos resultantes pares de S_e e $1-E_s$ constitui uma curva ROC (ALTMAN; BLAND, 1994; VAZ, 2009; MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003). A curva ROC foi aplicada para definir o valor do ponto de corte ideal, e a área “abaixo da curva” representou a acurácia das predições (ZHOU, OBUCHOWSKI, McCLISH, 2002; MARTINEZ et al., 2003). Consideramos como ponto de corte ou *cut-off*: “valor que pode ser selecionado pelo pesquisador entre os valores possíveis para a variável de decisão, acima do qual o paciente é classificado como positivo e abaixo do qual é classificado como negativo” (MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003).

Modelo de Classes Latentes: apresenta-se com diversas denominações na literatura científica, faz parte de uma família de procedimentos estatísticos pertencente ao Modelo de Equações Estruturais (MEE), que tem ampla aplicação em muitos campos científicos por levar em conta os mecanismos causais das variáveis, diferentemente das abordagens tradicionais de estatísticas, o MEE trabalha com variáveis latentes que representam os fenômenos que não são observados ou mensurados diretamente (BOLLEN; CURRAN, 2005; COLLINS; LANZA, 2010; DUCAN et al., 2011; KLINE, 2011).

Análise de Classes Latentes – (CL): As três técnicas: Og4C3, Bm14 e Wb123 contribuíram para construção da variável latente de acordo com a probabilidade de detectar a infecção. As avaliações dos testes Og4C3 e Bm14, expressos em positivos e negativos (conforme orientação do fabricante dos kits), enquanto que para o Wb123, os valores obtidos acima e abaixo da mediana (com a DO) foram utilizados para definição de positivo e negativo. Assim, os três testes foram utilizados para construir a variável CL abordando o modelo ACL que pertence à família de MEE (RINDSKOPF; RINDSKOPF, 1986; RINDSKOPF, 2002). A CL foi então criada sem a utilização do padrão ouro (contagem de microfilárias), e utilizada para análise da curva ROC do WB123 determinando um cut-off (positivo e negativo), e em seguida estes resultados foram confrontados com os resultados obtidos (cut-off) da curva ROC padrão ouro FMP.

Softwares: O programa estatístico MedCal v. 9.2 foi utilizado para criar a curva ROC e o R v. 3.3.2 foi utilizado para criar a variável latente e as demais análises (R CORE TEAM, 2016).

- **Para o estudo de seguimento**

Para análise dos dados e interpretação dos resultados, foi utilizado o software R (RDCT, 2012), e as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Para avaliar a positividade para a infecção e a transmissão ao longo do tempo (pré-AMM, 1º, 2º, 3º, 4º e 5º AMM) foram utilizados os testes de Mantel-Haenzel, regressão log linear. O teste de Qui-quadrado de Pearson e Exato de Fisher quando necessários foram utilizados para avaliar cada momento “round”. Na avaliação da pré-AMM vs 1ª AMM e 1ª AMM vs 5ª AMM foi abordada uma análise pareada utilizando-se o teste de McNemar (AGRESTI, 2002; KATERI, 2014).

4.9 Limitações do estudo

As principais limitações foram as perdas de seguimento, devido à dificuldade de realização de coletas noturnas, além do período relativamente grande entre as avaliações e o longo tempo de acompanhamento dos indivíduos. Além disso, algumas amostras não possuíam volume suficiente para realização dos testes.

4.10 Aspectos Éticos

Esse estudo (parte de uma pesquisa conduzida pelo Serviço de Referência Nacional em Filarioses) foi submetido previamente ao Comitê de Ética em Pesquisas do Instituto Aggeu Magalhães sendo aprovado conforme CAEE: 47227015.9.0000.5190 (ANEXO 2).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do *Filaria Detect*[™] IgG4 ELISA System produzido com o antígeno recombinante Wb123 para o diagnóstico da Filariose Linfática em área endêmica do Brasil

Introdução

A Filariose Linfática (FL) é uma doença endêmica em regiões tropicais e subtropicais que afeta aproximadamente 120 milhões de pessoas. Destas, cerca de 25 milhões de indivíduos do sexo masculino apresentam alterações urogenitais, sendo a hidrocele a manifestação mais comum, e cerca de 15 milhões, principalmente mulheres, têm linfedema ou elefantíase de membros inferiores (WHO, 2017). Essa parasitose possui como agentes etiológicos, helmintos das espécies *Brugia malayi*, *Brugia timori* e *Wuchereria bancrofti* (ADDISS; BRADY, 2007). Apesar de não ser causa de mortalidade, a FL foi considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das principais causas mundiais de incapacidade permanente e de longo prazo, com repercussão psicossocial e econômica aos seus portadores (ADDISS; BRADY, 2007; WHO, 2017).

Em 1997, a OMS considerou a FL como uma das seis doenças infecciosas potencialmente erradicáveis, determinando através da resolução 50.29 a adoção de metas para a eliminação global da FL até o ano de 2020 (WHO, 1997; FREITAS et al., 2008). Atendendo a essa Resolução, foi criado o Plano Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL), que foi iniciado em 2000 submetendo as populações endêmicas à administração em massa de medicamentos (AMM) antifilariais, uma vez por ano, no mínimo por cinco anos. Até o momento, a AMM alcançou uma cobertura global de cerca de 6,7 bilhões de tratamentos, entre 66 dos 72 países onde FL é endêmica. Cerca de 20 países já completaram as cinco rodadas de AMM e estão agora sob vigilância pós-AMM para demonstrarem que a eliminação foi alcançada (OMS, 2017). A expansão rápida e significativa do PGEFL aumentou consideravelmente a necessidade de monitoramento e de vigilância para avaliar a interrupção da transmissão nessas áreas (STEEL et al., 2013).

De acordo com as recomendações da OMS a vigilância das áreas pós AMM deve ser conduzida através da detecção de antígenos circulantes filariais (ACF) utilizando um teste imunocromatográfico (WHO, 2015). Este teste, apesar de apresentar uma alta capacidade em reconhecer antígenos de vermes adultos, falha no reconhecimento precoce da infecção (STELL et al., 2013). Diante dessa limitação, testes baseados em anticorpos específicos

podem ser mais adequados, uma vez que esses anticorpos podem ser detectáveis de forma mais precoce que a presença de ACF (RAMZY et al., 2006, HAMLIN et al., 2012). Vários antígenos recombinantes, para a pesquisa de anticorpos, têm sido descritos pela literatura: BmR1 e BmSXP, WbSXP-1 e Bm33 (ABDUL et al., 2007; KRUSHNÁ et al., 2009; PANDIARAJA et al., 2010). Entretanto, a baixa especificidade destes testes nas áreas onde coexistem filarídeos tem impulsionado o desenvolvimento de novos antígenos recombinantes (STEEL et al., 2013).

Um novo teste que pesquisa anticorpos, com o antígeno recombinante *Wb123*, obtido de larvas infectantes (L₃) de *W. bancrofti* foi produzido; o “*Filaria Detect*[™] IgG4 ELISA System” (Inbios Internatonal, Inc.). Até o momento utilizado apenas para pesquisa, o teste pode servir como um marcador precoce de exposição filarial à *W. bancrofti* (KUBOFCIK; FINK; NUTMAN, 2012; STEEL et al., 2013, 2015, INBIOS, 2015). Para melhorar o desempenho do teste o fabricante recomenda que, os países endêmicos, estabeleçam o *cut-off*, utilizando seus bancos de amostras sorológicas positivas e negativas para FL, conferindo maior precisão aos resultados obtidos (DE SOUZA et al., 2017; INBIOS, 2015).

O Brasil tornou-se signatário do PGEFL ainda em 1997, criando o Programa Nacional para Eliminação da Filariose Linfática (PNEFL), cujas atividades foram respaldadas pela resolução 190/96 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1997). No Brasil, a parasitose é causada exclusivamente pela *W. bancrofti* e, atualmente, ainda representa um problema de saúde pública no Estado de Pernambuco, particularmente na Região Metropolitana de Recife (RMR), que inclui os municípios de Recife, Olinda, Jaboatão dos Guararapes e Paulista (FONTES et al., 2012, ZUCHI et al., 2017). Nessas localidades, algumas áreas que apresentavam altas prevalências no passado já concluíram sua quinta rodada de AMM precisando nesse momento de uma reavaliação para determinar o real *status* de transmissão local. Diante dessa necessidade e levando-se em conta as recomendações do fabricante do teste *Filaria Detect*[™] IgG4 ELISA System (InBios Internatonal, Inc.), o presente estudo teve como objetivo determinar o *cut-off* e avaliar a acurácia do teste através do *Wb123* em amostras provenientes de áreas endêmicas do Brasil, estabelecendo com maior precisão os resultados positivos e negativos.

Materiais e Métodos

Tipo de Estudo: foi realizado um estudo de avaliação de teste diagnóstico para verificar o desempenho do teste de detecção de anticorpos para FL através do antígeno recombinante

Wb123, *Filaria Detect*TM IgG4 (INBIOS) ELISA System, em amostras sorológicas obtidas de indivíduos residentes em áreas endêmicas do Brasil (BRASIL, 2014).

Amostras do estudo: foram selecionadas 256 amostras de soro a partir do banco de amostras biológicas do Serviço de Referência Nacional em Filariose (SRNF) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) / Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), em Pernambuco, armazenadas a -30°C. As amostras foram classificadas em dois grupos, segundo status de infecção e sua origem: Grupo I – pacientes microfilarêmicos (positivos) e Grupo II - pacientes amicrofilarêmicos (negativos). Do total das amostras estudadas, 79 (30,9%) pertenciam ao Grupo I (pacientes microfilarêmicos), residentes em áreas endêmicas; e 177 pertenciam ao Grupo II, pacientes amicrofilarêmicos residentes em áreas endêmicas, considerados como endêmicos normais, e pacientes amicrofilarêmicos residentes em áreas não endêmicas.

Ambos os grupos foram avaliados em relação à microfilaremia, através da técnica de Filtração em Membrana de Policarbonato (FMP), ao Antígeno Circulante Filarial (ACF), através do teste Og4C3-ELISA, ao anticorpo anti-Bm14, com o Lymphatic Filariasis Bm14 Antibody (CELISA test), e ao anti-Wb123 com o *Filaria Detect*TM IgG4 ELISA System. O Grupo II, “particularmente os endêmicos normais”, foi submetido ao diagnóstico por imagem segundo Amaral et al. (1994), onde não foi visualizada a presença de vermes adultos através da “dança da filária” (AMARAL et al., 1994; DREYER et al., 1996; ROCHA et al., 2009).

Procedimentos laboratoriais: a filtração em Membrana de Policarbonato (FMP): realizada conforme a técnica descrita por ROCHA et al. (2004), sendo considerados positivos os indivíduos que apresentaram microfíliarias nas amostras de sangue periférico. Essa técnica foi definida como padrão ouro para a realização da análise da curva Receiver Operator Characteristic (ROC).

O Teste Og4C3-ELISA: foi realizado conforme recomendado pelo fabricante TropBioTM Og4C3 Filariasis Antigen ELISA test (Cellabs Pty Ltd., Brookvale, Australia). As amostras com uma concentração de antígeno ≥ 128 unidades de antígenos (UA) foram interpretadas como positivas (MORE; COPEMAN, 1990; ROCHA et al., 1996; PION et al., 2016).

O Teste Lymphatic Filariasis Bm14 Antibody - CELISA: foi realizado conforme recomendado pelo fabricante (Cellabs Pty Ltd. - Brookvale, Australia). Soros de amostras de áreas não endêmicas para FL, sabidamente sem infecção, foram incluídos nas placas para determinar o *cut-off* conforme orientações do fabricante [média obtida com as Densidades Óticas (DO) dos soros não endêmicos somada a 3x o desvio padrão]. DO's maiores ou iguais

ao *cut-off* foram considerados positivos para o Bm14-CELISA (LAMMIE et al., 2004; WEIL et al., 2011; MASSON et al., 2017).

A Pesquisa de anticorpos anti-Wb123: foi realizada com o kit “*Filaria Detect™* IgG4 ELISA System” de acordo com as instruções do fabricante Inbios International, Inc. (InBios, 2015). A leitura das DO's foi realizada em leitor de ELISA (espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan FC, Thermo Fischer Scientific) com comprimento de onda em 450nm.

A partir das DO's do Wb123 a curva ROC foi construída tendo como referência a contagem de microfilárias pela FMP (padrão ouro) para determinar a sensibilidade e especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN), razão de verossimilhança (*Likelihood ratio LR+ e LR-*) utilizando as amostras selecionadas. A razão de verossimilhança > 1 indica que o resultado do teste está associado à presença da infecção, enquanto que uma razão de verossimilhança < 1 indica que o resultado do teste está associado à ausência de infecção (DEEKS; ALTMAN, 2004).

Análise dos dados: a curva ROC foi utilizada tanto para definir o status de infecção através da determinação do ponto de corte, como também para determinar a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos, negativos e área abaixo da curva a qual representa a acurácia das predições (ZHOU, OBUCHOWSKI, McCLISH, 2002; MARTINEZ et al., 2003).

Em uma segunda etapa os resultados dos testes categorizados (positivo/negativo) para Og4C3-ELISA, CELISA-Bm14 (conforme fabricante) e para o ELISA-Wb123 (categorizado com base no valor mediano das DO's de 0,07, sendo positivo - DO igual ou acima de 0,07 e negativo - DO inferior a 0,07); foram utilizados para construção de uma variável “Classe latente – CL” utilizando a abordagem Análise de Classe Latente (ACL). Para a ACL as três técnicas (Og4C3-ELISA, Bm14-ELISA e Wb123-ELISA) foram utilizados na criação da variável latente “CL” de acordo com a probabilidade que cada uma possui em detectar positivos ou negativos dentre as amostras (RINDSKOPF; RINDSKOPF, 1986; RINDSKOPF, 2002). O Modelo “Classe Latente - CL” pertence a uma família de procedimentos estatísticos: Modelo de Equações Estruturais (MEE), que trabalha com variáveis latentes que representam os fenômenos que não são observados ou mensurados diretamente (BOLLEN; CURRAN, 2005; COLLINS; LANZA, 2010; DUCAN et. al., 2011; KLINE, 2011).

A CL foi então criada sem a utilização do padrão ouro, ou seja: a FMP, e posteriormente utilizada como parâmetro para construção de uma segunda curva ROC para o ELISA-WB123, sendo essas curvas avaliadas e comparadas entre si.

O programa estatístico MedCalc v. 9.2 foi utilizado para criar a curva ROC e o R v. 3.3.2 foi utilizado para criar a variável latente e as demais análises (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

Considerações Éticas: esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisas do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) de Pernambuco (CAEE: 47227015.9.0000.5190).

Resultados

Considerando como teste de referência a Filtração em Membrana de Policarbonato (FMP) a contagem de microfilárias apresentou nos 256 soros selecionados, um total de 79 (31%) indivíduos positivos e 177 (69%) negativos. Entre os 177 indivíduos, 74 (41,8%) endêmicos normais e 103 (58,2%) de área não endêmica.

De acordo com a tabela 1, as DO's variaram de 0 a 4,5 e com médias bastante similares. A mediana para o Wb123 foi a menor (0,07) que as demais medianas (0,13 e 0,12) para o Og4C3 e Bm14 respectivamente. Ao estratificar pela presença de microfilárias nota-se que houve no grupo dos negativos uma redução na mediana de 0,01 para o Wb123 e de 0,04 para o Bm14.

Tabela 1 – Valores relativos à análise da Densidade Ótica (DO) de todos os pacientes e os mesmos estratificados pela positividade para a contagem da microfilárias.

	Apenas DO			DO estratificada pela Microfilária (+/-)					
	Wb 123	Og4c3	Bm14	Wb 123		Og4c3		Bm14	
				+	-	+	-	+	-
N	256	256	256	79	177	79	177	79	177
Min	0,047	0,000	0,017	0,055	0,047	0,238	0,000	0,082	0,017
Max	4,395	2,957	4,449	4,395	0,676	2,957	0,328	4,449	2,268
Media	0,780	0,600	0,770	2,350	0,080	1,680	0,120	2,110	0,180
Mediana	0,070	0,130	0,120	2,800	0,060	1,770	0,120	2,410	0,080
Desvio	1,400	0,840	1,060	1,670	0,080	0,780	0,040	0,900	0,300

Fonte: Autor, 2017.

Na Tabela 2 observa-se a curva ROC construída para o ELISA-Wb123 tendo como referência o padrão ouro (FMP), o valor de absorbância da DO para o grupo controle foi de 0,215 DO, com sensibilidade e especificidade 82,3% e 96,0% respectivamente. E os resultados da DO estratificados dentro do grupo em endêmicos normais e não endêmicos foram 0,214 DO e 0,288 DO respectivamente.

Tabela 2 – Acurácia dos pontos de corte (*cut-off*) obtidos na curva do Wb123 padrão ouro (FMP).

Banco Utilizado	<i>cut-off</i>	<i>Se</i>	95% IC	<i>Es</i>	95% IC	+LR	-LR
Grupo II	> 0,215	82,28	72,1 - 90,0	96,05	92,0 - 98,4	20,80	0,18
Controle (Área não Endêmica)	> 0,214	82,28	72,1 - 90,0	98,06	93,1 - 99,7	42,37	0,18
Controle (Endêmicos normais)	> 0,288	79,75	69,2 - 88,0	97,30	90,6 - 99,6	29,51	0,21

Fonte: Autor, 2017.

Para a variável construída “Classe latente - CL”, semelhante à classificação encontrada segundo a contagem de microfilárias, observou-se que 79 (30,9%) das amostras eram positivos e 177 (69,1%) eram negativas. Na tabela 3 são observados percentuais semelhantes de sensibilidade e de especificidade quando comparamos os resultados previamente definidos utilizados para construção da CL (conforme fabricante Og4C3/Bm14 e mediana Wb123) X os resultados obtidos com a curva ROC para cada um dos testes pelo padrão ouro (contagem de microfilárias). A baixa especificidade (69,49%) apresentada pelo teste Wb123 deve-se a utilização do ponto de corte de 0,07 (mediana). Com base na análise da “CL” para o Wb123 observou-se que a probabilidade de encontrar uma amostra devidamente classificada como positiva foi próximo de 1,00 (0,937).

Tabela 3 – Sensibilidade e especificidade observadas utilizando os dados de identificação dos positivos e negativos e os valores obtidos utilizando a curva ROC para os testes Wb123, Og4C3 e Bm14.

Fonte: Autor, 2017.

	Teste Critério		Sensibilidade	95% CI	Especificidade	95% CI
TESTES	Bm14 (+/-)		96,20	89,42 - 98,7	93,22	88,52 - 96,08
	Wb123 (Mediana+/-)	>0,071	93,67	86,02 - 97,27	69,49	62,35 - 75,8
	Og4c3 (+/-)		100,00	95,36 - 100,0	98,31	95,14 - 99,42
FMP	Bm14 Roc	>0,511	96,20	89,3 - 99,2	93,22	88,5 - 96,4
	Wb123 Roc	>0,215	82,28	72,1 - 90,0	96,05	92,0 - 98,4
	Og4c3 Roc	>0,220	100,00	95,4 - 100,0	98,31	95,1 - 99,6

O limite de positividade otimizado para ponto de corte da DO do ELISA-Wb123 foi identificado em > 0,239 DO, após análise das possibilidades apresentadas pela curva ROC (FMP). Para a decisão do valor mais equilibrado na definição do ponto de corte da DO para o

Wb123, foram considerados: o valor de *cut-off* das amostras negativas, a sensibilidade e a especificidade em combinação com outros parâmetros como: VPP, VPN, LR+, LR- (Tabela 4). Os resultados do Wb123 para a curva ROC (FMP), apresentaram Se 81%, Es 96,6%, VPP 91,4%, VPN 91,9% e LR+ acima de 1 (23,9). Semelhante aos valores que identificamos para a curva ROC da CL no ponto de corte correspondente a $DO > 0,240$, com sensibilidade de 81,0%, especificidade em 96,6% (Tabela 4).

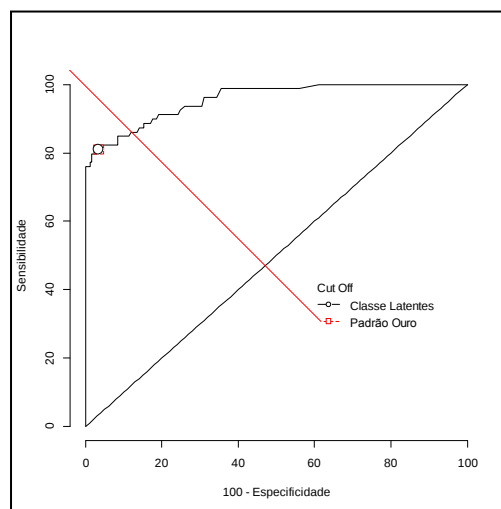
Tabela 4 – Resultados do desempenho do teste para curva ROC FMP (padrão ouro) e curva ROC CL, *cut-off* otimizado.

	Curva ROC Wb123			
	FMP (padrão- ouro)	95% CI	CL (Classe Latente)	95% CI
DO	>0,239		>0,240	
Se	81,01	70,6 – 89,0	81,00	71,0 – 88,1
Es	96,61	92,8 – 98,7	96,60	92,8 – 98,4
+LR	23,90	17,1 – 33,4	23,82	17,1 – 33,3
-LR	20,00	17,2 – 22,4	19,65	17,2 – 22,2
VPP	91,43	82,5 – 96,0	91,43	82,5 – 96,1
VPN	91,94	87,1 – 95,0	91,94	87,1 – 95,0

Fonte: Autor, 2017.

Para conferir maior precisão valor do ponto de corte adotado, ambas as curvas Wb123 foram comparadas (curvas ROC FMP e CL), apresentaram uma sobreposição entre si e uma área sob a curva (AUC) de 0,96 com intervalo de confiança (0,923 - 0,978) e significância estatística ($p < 0,01$) (Figura 1).

Figura 1 – Curvas ROC padrão ouro (FMP) e CL para Wb123.



Fonte: Autor, 2017.

Após análise da curva ROC, AUC e outras medidas de precisão o ponto de corte da Densidade ótica para o teste *Filaria Detect™* IgG4 ELISA ficou definido em 0,239 DO,

considerado como a melhor otimização possível dos valores para o teste. Com uma capacidade de identificar 81,0% dos resultados positivos e 96,6% dos resultados negativos, a proporção de indivíduos verdadeiramente positivos e negativos em 91,4% (VPP) e 91,9% (VPN) respectivamente, aproximadamente 100%. E uma razão de verossimilhança positiva (LR+) de 23,90, ou seja, 23 vezes mais chances dentre os positivos serem identificados pelo teste Wb123.

Discussão

À medida que o PGEFL prossegue uma das suas necessidades imediatas é um teste diagnóstico sensível e específico para a avaliação da potencial transmissão dos parasitas filariais (LIANG et al., 2008). O foco para as ferramentas de vigilância e monitoramento têm se voltado para o uso de ensaios com anticorpos que podem detectar exposição a larvas infectantes, funcionando como “sinais de aviso” sobre um possível potencial de transmissão nas áreas endêmicas que foram tratadas (DAMGAARD et al., 2016).

O antígeno recombinante “Wb123” tem sido utilizado no desenvolvimento de ensaios baseados na detecção de anticorpos filariais, sendo apontado como um marcador de exposição para FL, capaz de identificar a exposição às larvas infectantes de *W. bancrofti* (KUBOFCIK; FINK; NUTMAN, 2012; WON et al., 2018). Ele foi utilizado pela companhia InBios para a produção de um novo teste o *Filaria Detect*TM IgG4 ELISA System (ELISA-Wb123), o qual, de acordo com o fabricante (InBios International, Inc.) necessita que cada área geográfica, onde for utilizado, defina com base em amostras de sua região o valor de corte adequado, através da construção da Curva ROC (Receiver Operating Characteristic) (InBios, 2015).

Neste estudo o ELISA-Wb123 foi avaliado e também as medidas de precisão encontradas para ele, a fim de se estabelecer o ponto de corte ideal da densidade ótica (DO) a ser utilizada no Brasil, na definição de casos positivos e negativos. A partir de amostras brasileiras, atendendo as recomendações do próprio fabricante, uma curva ROC foi construída, tendo como teste de referência a FMP “padrão-ouro”. Uma segunda curva baseada no modelo ACL através da CL foi também construída, em seguida para conferir maior precisão aos resultados.

De acordo com Moreira (2016) o ponto de maior acurácia do teste é aquele situado mais distante da linha traçada em diagonal no gráfico da curva ROC. Entretanto, a adoção do ponto de corte para a definição da positividade ou negatividade deve considerar a velocidade de evolução da patologia ou seu risco. Além disso, segundo Greiner, Pfeiffer, Smith (2000) e Hajian-Tilaki et al (2013) a curva ROC em combinação com outros valores de acurácia de um

teste (Se, Es, AUC, LR+, LR-), permitem otimizar a decisão do ponto de corte ideal. Baseado nestas informações, embora o ponto de corte para o ELISA-Wb123 tenha sido identificado pela curva ROC em 0,215 DO (grupo controle), após análise em conjunta dos outros parâmetros, o ponto de corte da densidade ótica definido foi 0,239, para as amostras de nossa região.

Steel et al. (2013), também utilizaram a curva ROC para definir o ponto de corte do ELISA-Wb123 utilizando 95 amostras de infectados e 289 de não infectados com *W. bancrofti* (com e sem outras infecções helmínticas). O *cut-off* definido com base em seu banco de amostras foi 2.5 DO, com Se e ES acima de 90%. Entretanto, para esse valor de *cut-off*, dos 289 não infectados, sete indivíduos apresentaram-se falso-negativos e nove falso-positivos, todos os falsos positivos estavam infectados com *O. volvulus*.

O valor encontrado por Steel (2013) é bem superior ao encontrado neste trabalho. No entanto, pela escassez de trabalhos que relatam o uso da curva ROC para o ELISA-Wb123 e que demonstram valores definidos como ponto de corte para as densidades óticas, fica indefinido, um parâmetro para escolha do ponto de corte ideal. Outra dificuldade é que estes trabalhos não foram realizados no Brasil ou com amostras brasileiras. Eles ocorreram em outras regiões endêmicas diferentes, onde a prevalência para FL e as características da população e dos parasitas são diferentes (STEEL et al., 2013; 2015 ; DE SOUZA et al., 2017; WON et al. 2018).

A técnica da curva ROC tem sido amplamente utilizada na epidemiologia clínica para avaliar a capacidade diagnóstica de marcadores (ex. sorológicos). Os índices de precisão derivados da curva ROC como, por exemplo, a área sob a curva “AUC”, não são distorcidos por flutuações causadas pelo uso de critérios de decisão ou cortes arbitrariamente escolhidos. A AUC determina a capacidade inerente do teste em discriminar populações doentes e saudáveis, quando a AUC=1 reflete o potencial de teste diagnóstico como perfeito na diferenciação entre o doente e o não doente, o que acontece quando a distribuição dos resultados para os doentes e não doentes não se sobrepõe (KUMMAR; INDRAYAN, 2011; HAJIAN-TILAKI et al., 2013). Nós encontramos para a curva ROC do ELISA-Wb123 uma AUC significativamente elevada (AUC 0.96, $P < 0,01$), demonstrando o potencial do teste (ELISA-Wb123) de discriminar indivíduos positivos e negativos.

Attallah et al. (2013) encontram valor para AUC semelhante ao nosso, ao pesquisarem um novo ELISA baseado em antígenos de 27kDA de *Fasciola gigantica*: “o FgCA-27 ELISA”, encontrando altos graus de sensibilidade, especificidade e AUC 0.961, $P < 0.0001$.

Diante disso, foi apontado como altamente e específico para o diagnóstico laboratorial de fasciolíase humana (ATTALLAH et al., 2013).

Segundo Florkowski (2008) a curva ROC mostra graficamente o “trade-off” entre sensibilidade e especificidade. É útil para atribuir o melhor corte para uso no diagnóstico e a AUC define a capacidade do teste em detectar os verdadeiro-positivos e os verdadeiro-negativos, representando a acurácia do teste. Essa precisão fornece um parâmetro útil para conferir o desempenho de um teste.

A metodologia aplicada no cálculo da curva ROC para definir o ponto de corte ideal para o teste objetivou garantir que as medidas de desempenho obtidas fossem precisas, não tendenciosas, corretamente estimadas e apresentadas. Os valores de Se e Es combinados a AUC definem a validade inerente ao teste diagnóstico (KUMMAR; INDRAYAN, 2011; HAJIAN-TILAKI et al., 2013).

As análises convencionais consideram a sensibilidade e a especificidade de um teste de diagnóstico como os principais índices de precisão. No entanto, o uso apenas de ambos, como únicas como medidas de precisão, é problemático, uma vez que essas medidas dependem do ponto de corte para a positividade escolhida. A análise da ROC contorna essa arbitrariedade (HAJIAN-TILAKI et al., 2013). De acordo com Greiner, Pfeiffer, Smith (2000), todas as combinações possíveis de sensibilidade e especificidade podem ser alcançadas alterando o valor de corte do teste e podem ser resumidas usando um único parâmetro: a área sob a curva ROC.

No estudo, caso aumentássemos o valor da sensibilidade do ELISA-Wb123 haveria uma redução muito grande no valor da DO. E se selecionássemos um ponto de corte maior, haveria uma redução da sensibilidade para 73%.

Os valores preditivos positivo e negativo encontrados para o ELISA-Wb123 foram elevados, 91,4% e 91,9% respectivamente. O VPP representa a proporção de resultados positivos que são verdadeiros positivos, enquanto o VPN representa a proporção de resultados negativos que são negativos verdadeiros (DEEKS; ALTMAN, 2004; FLORKOWSKI, 2008). Semelhantes aos nossos valores, Steel et al. (2013) também acharam valores preditivos superiores a 90% para o ELISA-Wb123. Segundo estes autores, esses valores elevados são benéficos nas análises populacionais das áreas endêmicas para FL após o tratamento, fornecendo informações necessárias sobre o tamanho de amostragem para pesquisar adequadamente a população e servindo para mapear áreas onde a prevalência de *W. bancrofti* é desconhecida. Isso é possível devido ao rendimento relativamente elevado, custo reduzido e tempo de resposta rápido apresentado pelo teste.

Os valores de *Likelihood* obtidos neste estudo para o ELISA-Wb123 com o *cut-off* 0,239 foram para o LR+ maior que 1 (23,9) e para o LR- menor que 1 (0,2). Segundo Deeks e Altman (2004) índices de probabilidade como “*Likelihood ratios*” são estatísticas alternativas para resumir a precisão diagnóstica, possuindo várias propriedades particularmente poderosas que os tornam mais úteis do que outras estatísticas. Capazes de refletir a quantidade de vezes mais (ou menos) que os pacientes com a doença devem ter esse resultado específico do que os pacientes sem a doença. Assim com o *cut-off* 0,239 estabelecido para o ELISA-Wb123 existe 23 vezes mais chances dos resultados positivos para o antígeno Wb123 serem identificados pelo teste. Quanto maior o LR+, maior informação traz o teste e quando o LR- for próximo a zero, traz maiores informações de uma prova negativa (HAJIAN-TILAKI et al., 2013).

A definição do valor do ponto de corte da densidade ótica em 0,239 para o ELISA-Wb123 levou em consideração a curva ROC e os valores obtidos para Se, Es, VPP, VPN, LR+, LR- e AUC, que representaram o melhor equilíbrio de desempenho do teste (DEEKS; ALTMAN, 2004; FLORKOWSKI, 2008).

Contribuições dos autores

P.F. conduziu os experimentos e escreveu o manuscrito com suporte de R.A, M.A.M, B.E. M.A.L; o apoio laboratorial foi realizado por M.A.L, M.R., J.A., A.F; contribuiu com as análises estatísticas G.T. Todos os autores contribuíram com a revisão, leitura e aprovação deste artigo.

Declaração de conflito de interesses

Declaramos que não há conflitos de interesse.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação Oswaldo Cruz / Fundação para o desenvolvimento tecnológico em saúde-Vice-Presidente de Pesquisa e Laboratórios de Referência (FIOTEC/Fiocruz) VPPLR-15-2-2-30 projeto.

Referências

- ABDUL, R.R.; HWEN-YEE, C.; NOORDIN, R. Pan LF-ELISA using *BmR1* and *BmSXP* recombinant antigens for detection of lymphatic filariasis. **Filaria Journal**. London, GM, v. 6, n. 10, 2007.
- ADDISS, D.G.; BRADY, M.A. Morbidity management in the Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: a review of the scientific literature. **Filaria Journal**. London, GM, v. 6, n. 2, 2007.
- AMARAL, F.; DREYER, G.; FIGUEREDO-SILVA, J.; NOROES, J.; CAVALCANTI, A.; SAMICO, S.C.; SANTOS, A.; COUTINHO, A. Adult worms detected by ultrasonography in human bancroftian filariasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, US, v. 50, p.753-757, 1994.
- ATTALLAH, A.M.; BUGHDADI, F.A.; EL-SHAZLY, A.M.; ISMAIL, H. Immunodetection of *Fasciola gigantica* Circulating Antigen in Sera of Infected Individuals for Laboratory Diagnosis of Human Fascioliasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, US, v. 20, n.10, p. 1569-1577, 2013.
- BOLLEN, K. A. ;CURRAN, P. J. (2005). **Multivariate Latent Curve Models, in Latent Curve Models: A Structural Equation Perspective**, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/0471746096.ch7
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Coordenação-Geral de Gestão do Conhecimento. **Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de estudos de acurácia diagnóstica**. Brasília, 2014. 115 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação do Controle de Doenças Transmissíveis por Vetores, Gerência de Endemias Focais. Brasil: Fundação Nacional de Saúde; 1997. **Programa de Eliminação da Filariose linfática do Brasil**. Brasília (DF), 1997.
- COLLINS, L. M.; LANZA, S. T. (2009). **General Introduction, in Latent Class and Latent Transition Analysis: With Applications in the Social, Behavioral, and Health Sciences**, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9780470567333.ch1
- DAMGAARD, J. et al. Assessing drivers of the IgG4 antibody reactivity to recombinant antigen Bm14 in *Wuchereria bancrofti* endemic populations in East Africa. **Acta Tropica**, Netherlands, v.161, p. 26-32, 2016.
- DE SOUZA, DK et al., An evaluation of Wb123 antibody elisa in individuals treated with ivermectin and albendazole, and implementation challenges in Africa **The Pan African Medical Journal**, p 27-65, 2017.
- DEEKS, J.J.; ALTMAN, D.G. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. **British medical journal**. London, GM, v. 3, n.29, p.168-9, 2004.

DREYER, G. et al. Studies on the periodicity and intravascular distribution of *Wuchereria bancrofti* microfilariae in paired samples of capillary and venous blood from Recife, Brazil. **Trop Med Int Health**, v. 1, p. 264-272, 1996.

FLORKOWSKI, C.M. Sensitivity, specificity, receiver-operating characteristic (ROC) curves and likelihood ratios: communicating the performance of diagnostic tests. **Clin Biochem Rev.** Austrália, AU, v. 29, p.83-7, 2008.

FONTES, G. et al. Lymphatic filariasis in Brazil: epidemiological situation and outlook for elimination. **Parasites & Vectors.** London, GB, v. 5, n. 272.

FREITAS, H.; VIEIRA, J. B.; BRAUN R.; MEDEIROS. Z.; ROCHA, E. M. M.; AGUIAR-SANTOS, A.; FRAIHA, H.; ROCHA, A. RELATÓRIO: Workshop para avaliação da situação epidemiológica da filariose linfática no Município de Belém, Pará, norte do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** Brasília, BR, v. 41, p. 212-21, 2008.

GREINER, M.; PFEIFFER, D.; SMITH, R.D. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. **Prev Vet Med.** Amsterdam, NL, v. 30, n.45, p. 23-41, 2000.

HAJIAN-TILAKI, K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. **Caspian Journal of Internal Medicine.** Iran, IR, v. 4, n. 2, p. 627-635, 2013

HAMLIN, K.L. et al.. Longitudinal monitoring of the development of antifilarial antibodies and acquisition of *Wuchereria bancrofti* in a highly endemic area of Haiti. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 6, n. 12, e1941, 2012.

INBIOS. *Filaria Detect*TM IgG ELISA. www.inbioscom. Seattle, WA 98104 USA: InBios International, Inc.; 2015.

KLINE, R.B. (2011). **Principles and practice of structural equation modeling.** New York, NY: Guilford.

KUBOFCIK, J.; FINK, D.L.; NUTMAN, T.B. Identification of Wb123 as an Early and Specific Marker of *Wuchereria bancrofti* Infection. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, US, v.6, n. 12, e1930, 2012.

KUMAR, R.; INDRAYAN, A. Receiver operating characteristic (ROC) curve for medical researchers. **Indian Pediatr.** New Delhi, IN, v.48, n. 4, p 277-87, 2011.

LAMMIE, P.J. et al. Recombinant antigen-based antibody assays for diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis-a multicenter trial. **Filaria Journal.** London, GB, v. 3, p.1-5, 2004.

LIANG, J.L. et al. Impact of five annual rounds of mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on *Wuchereria bancrofti* infection in American Samoa. **Am J Trop Med Hyg**, v. 78, n. 6, p. 924-8, Junho 2008.

MARTINEZ, E.Z. et al. A curva Roc para Testes Diagnósticos. **Caderno de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 7-31, 2003.

MASSON, J. et al. Relative Performance and Predictive Values of Plasma and Dried Blood Spots with Filter Paper Sampling Techniques and Dilutions of the Lymphatic Filariasis Og4C3 Antigen ELISA for Samples from Myanmar. **Trop. Med. Infect. Dis**, v. 2, n. 7, 2017.

MOREIRA, W.B. Artigos sobre testes diagnósticos. In: *Leitura Crítica de Artigos Científicos. Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica*, Belo Horizonte, BR, p. 83 – 89, 2016. Disponível em: < <https://www.sboc.org.br/leitura-critica-de-artigos-cientificos/>>. Acesso: 21 Nov. 2017.

MORE, S.J.; COPEMAN, D.B. A highly specific and sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating antigen in bancroftian filariasis. **Trop Med Parasitol**, v. 41, p. 403-406, 1990.

PION, S.D.; MONTAVON, C.; CHESNAIS, C.B. et al. Positivity of Antigen Tests Used for Diagnosis of Lymphatic Filariasis in Individuals Without *Wuchereria bancrofti* Infection But with High *Loa loa* Microfilaremia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Baltimore, US, v. 95, n. 6, p1417-1423. 2016.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

RAMZY, R.M. et al. Effect of yearly mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on bancroftian filariasis in Egypt: a comprehensive assessment. **Lancet**. London, GB, v. 25, n. 367, p. 992-9, 2006.

RINDSKOPF, D.; RINDSKOPF, W. The value of latent class analysis in medical diagnosis. **Stat Med**. Chichester, US, v. 5, n. 1, p. 21-7, 1986.

RINDSKOPF, D. Infinite Parameter Estimates in Logistic Regression: Opportunities, Not Problems. **Journal of Educational and Behavioral Statistics**. New York, US, v. 27, n. 2, p. 147-161, 2002.

ROCHA, A. et al. Evaluation of the Og4C3 ELISA in *Wuchereria bancrofti* infection: infected persons with undetectable or ultra-low microfilarial densities. **Trop Med Int Health**. Oxford, GB, v. 1, p.859-864, 1996.

ROCHA, A. (2004) Filariose bancroftiana: Avaliação dos testes de diagnóstico disponíveis frente às diversas formas clínicas da Bancroftose. 2004. Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

ROCHA, A.; BRAGA, C.; BELEM, M. et al. Comparison of tests for the detection of circulating filarial antigen (Og4C3-ELISA and AD12-ICT) and ultrasound in diagnosis of lymphatic filariasis in individuals with microfilariae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, BR, v. 104, n. 4, p. 621–625, 2009.

STEEL, C. et al. Rapid *Wuchereria bancrofti*-specific antigen Wb123-based IgG4 immunoassays as tools for surveillance following mass drug administration programs on lymphatic filariasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 8, p. 1155-6110, 2013.

STEEL, C. et al. Rapid Point-of-Contact Tool for Mapping and Integrated Surveillance of *Wuchereria bancrofti* and *Onchocerca volvulus* Infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 8, August 2015

WEIL, G.J et al. A multicenter evaluation of a new antibody test kit for lymphatic filariasis employing recombinant *Brugia malayi* antigen Bm-14. **Acta Trop.** Amsterdam, NL, v. 120, n. 1, p.19-22, 2011.

WHO, 2015. **Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2015.** Weekly epidemiological record. Geneva, SW, v. 39, n. 91, p. 441-460, 2015.

WHO, 2017. **Validation of elimination of lymphatic filariasis as a public health problem.** Geneva, SW, 2017, 24p.

WON, K.Y et al. Use of Antibody Tools to Provide Serologic Evidence of Elimination of Lymphatic Filariasis in The Gambia. *Am J Trop Med Hyg*, v. 98, n. 1, p. 15-20, Jan 2018.

ZHOU, XIAO-HUA; MCCLISH, D.K.; OBUCHOWSKI, N.A. (2002). *Statistical Methods in Diagnostic Medicine*. Hoboken, NJ: Wiley.

ZUCHI, A. et al. Screening and evaluation of lymphatic filariasis in immigrants from endemic countries residing in a focus where it is considered eliminated in the Southern Region of Brazil: A risk of reemergence? *Acta Trop.* Amsterdam, NL, v. 176, p. 192-196, 2017.

5.2 Avaliação comparativa entre a microfilaremia, antígeno filarial, anticorpos Bm14 e Wb123 no monitoramento de indivíduos microfilarêmicos submetidos ao tratamento em massa para filariose linfática em área endêmica do Brasil

Introdução

A Filariose Linfática (FL) é uma parasitose que possui como agentes etiológicos helmintos das espécies *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori* (OMS, 2015). Também conhecida como elefantíase em sua fase crônica e sintomática, é uma doença tropical negligenciada transmitida por mosquitos vetores, que atinge pessoas de todas as idades e de ambos os sexos (OMS, 2016). Considerada uma doença potencialmente eliminável pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que lançou, em 2000, o Plano Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL) possuindo como meta eliminar a FL no mundo até 2020 (OMS, 2010).

Uma das principais estratégias do PGEFL é a interrupção da transmissão, através da Administração em Massa de Medicamentos (AMM) antifilariais para toda população residente em áreas endêmicas, com a distribuição anual de Dietilcarbamazina (DEC) durante 4 a 6 anos (OMS, 2010). Até o momento, estima-se que mais de 550 milhões de pessoas tenham sido tratadas, o que ocasiona uma nova demanda aos programas de eliminação: a necessidade de avaliação do impacto do tratamento para definir o status de transmissão na área (OMS, 2015; RAMAIAH; OTTESEN, 2014; DE SOUZA et al., 2017).

Para a avaliação das áreas submetidas ao AMM, a OMS tem recomendado a realização de Inquéritos de Avaliação da Transmissão (IAT) baseados na detecção de Antígenos Circulantes Filariais (ACF) (OMS, 2015). Entretanto, os testes baseados na pesquisa de antígenos têm como principal limitação à detecção de infecções somente após o desenvolvimento de parasitos adultos, o que pode levar até 18 meses (STEEL et al., 2015; DE SOUZA et al., 2017; HUPPATZ et al., 2008; WEIL; RAMZY, 2007). Além disso, a antigenemia pode permanecer positiva mesmo após o declínio da microfilaremia ou da sua negatificação na população submetida a múltiplas rodadas de AMM (TISCH et al., 2008; DAMGAARD et al., 2016).

Dessa forma, se faz necessária a identificação e a avaliação de novos marcadores de vigilância pós-AMM como objetivo de evitar o ressurgimento ou reintrodução da FL nessas áreas. Para este fim, ensaios direcionados a anticorpos, desenvolvidos em resposta às larvas infectantes (L₃), têm sido propostos como alternativa, uma vez que o surgimento dos mesmos

ocorre no sangue de forma mais rápida em comparação com os antígenos (STEEL et al., 2012; 2013; DE SOUZA et al., 2017; WON et al., 2018).

Vários ensaios baseados em anticorpos contra antígenos recombinantes foram desenvolvidos, inclusive para reduzir reações cruzada com outros parasitas filariais (HAMLIN et al., 2012; STEEL et al., 2012; 2013). O problema da especificidade para infecções por *W. bancrofti* parece ter sido resolvido com o desenvolvimento de um novo ensaio baseado em anticorpos para o antígeno recombinante de *W. bancrofti*, o Wb123 (KUBOFCIK; FINK; NUTMAN, 2012; STEEL et al., 2012; 2013). Este ensaio ainda não foi habilitado para sua comercialização, e encontra-se disponível apenas para pesquisa, uma vez que não se conhece suficientemente o comportamento dos anticorpos anti-Wb123 ao longo do tempo. Assim, fazem-se necessários estudos que o avaliem e o comparem com os marcadores de infecção atualmente utilizados para monitorar a transmissão e a vigilância pós-AMM (HAMLIN et al., 2012; STEEL et al., 2012; DE SOUZA et al., 2017; WON et al., 2018). Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar os principais marcadores utilizados para o monitoramento e vigilância da FL em áreas submetidas à AMM, com ênfase na detecção de anticorpos através do antígeno recombinante Wb123, em indivíduos microfilarêmicos, residentes na Região Metropolitana do Recife, Pernambuco – Brasil.

Materiais e Métodos

Local de estudo: o estudo foi realizado nos bairros Alto da Bondade e Alto da Conquista (Olinda) e no bairro Alto Santa Terezinha (Recife), localidades situadas na Região Metropolitana do Recife (RMR), Pernambuco - Brasil. Essas áreas foram selecionadas como prioritárias para intervenção, através da AMM anualmente com DEC por apresentarem prevalências de aproximadamente 10% para FL (BRAGA et al., 2001; RECIFE, 2002; IBGE, 2013).

Desenho do estudo e população alvo: um estudo de *follow-up* foi realizado com amostras sorológicas de 63 indivíduos, microfilarêmicos, submetidos à AMM e acompanhados pelo Serviço de Referência Nacional em Filariose (SRNF). Dentre eles haviam pessoas de ambos os sexos, com idade variando entre 3 e 68 anos. Esses indivíduos foram selecionados a partir de um inquérito parasitológico, realizado antes do início do AMM, sendo então acompanhados durante cinco anos consecutivos. Todos os indivíduos foram tratados anualmente com DEC 6 mg/kg, dose única.

Coleta das amostras: a coleta das amostras foi realizada anualmente, seis meses antes da administração dos medicamentos nas áreas selecionadas, no horário entre 23:00 e 1:00 hora

da manhã, respeitando a periodicidade do parasito (DREYER et al., 1996). Foram coletados 5 mL de sangue venoso, sendo 1 mL em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para a FMP e os 4mL restantes em tubo seco para os testes sorológicos. Para que fossem incluídos no estudo, cada indivíduo deveria apresentar um número mínimo de três coletas anuais dentro do período pesquisado.

Procedimentos laboratoriais:

- I. Filtração em Membrana de Policarbonato (FMP): Aproximadamente 1 mL de sangue foi filtrado através de uma membrana de policarbonato com uma largura de 13 mm e tamanho de poro de 3 μ m, conforme descrito por ROCHA et al. (2004). Após a filtração, elas foram fixadas com álcool metílico e coradas com Hematoxilina de Carrazi, para serem examinadas ao microscópio (resolução final de 160X);
- II. Og4C3-ELISA: O teste foi realizado conforme recomendado pelo fabricante (TropBio®, Townsville, Austrália, 2014). As amostras de soro com uma concentração de antígeno ≥ 128 unidades de antígenos (UA) foram interpretadas como positivas (MORE; COPEMAN, 1990);
- III. Bm14-ELISA: O teste foi realizado conforme recomendado pelo fabricante (Lymphatic Filariasis Bm14 Antibody CELISA; Cellabs Pty Ltd. - Brookvale, Austrália). Em todas as placas, foram incluídos soros de pacientes residentes de áreas não endêmicas, sabidamente sem infecção, a fim de calcular o *cut-off* conforme orientações do fabricante [média obtida com as Densidades Ópticas (DO) dos soros não endêmicos somada a 3x o desvio padrão]. Amostras que tiveram DO's maior ou iguais ao *cut-off* foram consideradas positivas para o Bm14 (LAMMIE et al., 2004; MASSON et al., 2017);
- IV. Wb123-ELISA: A pesquisa de anticorpos anti-Wb123 foi realizada com o teste “Filaria Detect™ IgG4 ELISA System” da companhia Inbios International, Inc. (InBios, 2015). Seguindo as recomendações do fabricante, um cut-off de 0,239 DO foi estabelecido a partir da construção e análise da curva ROC “Receiver Operating Characteristic” (MARTINEZ et al., 2003), sendo consideradas positivas amostras com valor igual ou superior ao *cut-off*.

Análise de dados: Para análise dos dados e interpretação dos resultados, foi utilizado o software R (RDCT, 2012), e as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Para avaliar a positividade para a infecção e a transmissão ao longo do tempo (pré-AMM, 1º, 2º, 3º, 4º e 5º AMM) foram utilizados os testes de Mantel-Haenzel, regressão log linear. O

teste de Qui-quadrado de Pearson e Exato de Fisher quando necessários foram utilizados para avaliar cada momento “round”. Na avaliação da pré-AMM vs 1ª AMM e 1ª AMM vs 5ª AMM foi abordada uma análise pareada utilizando-se o teste de McNemar (AGRESTI, 2002; KATERI, 2014).

Com a finalidade de se observar o comportamento dos testes em relação à faixa etária, os 63 participantes foram categorizados em oito classes etárias. Elas foram definidas de acordo com o tamanho da amostra, fornecendo reflexo da mesma de forma semelhante à distribuição realizada por Jaoko et al., (2007).

Considerações éticas: Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisas do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) de Pernambuco (CAEE: 47227015.9.0000.5190). Todos os pacientes positivos foram tratados e acompanhados clínico-laboratorialmente no SRNF.

Resultados

Das 63 amostras dos indivíduos microfilarêmicos estudados, 23 eram do sexo feminino e 40 do sexo masculino, a média de idade foi de 28 anos ($\pm 17,7$ DP) variando de 3 a 68 anos. A avaliação da positividade para os marcadores estudados (microfilaremia, antígeno filarial, anticorpos anti-Bm14 e anti-Wb123) segundo o sexo, durante o período do estudo, demonstrou uma maior positividade entre indivíduos do sexo masculino. No entanto, essa diferença só foi significativa para os anticorpos anti-Wb123 (Tabela 01). A tabela 2 demonstra a distribuição dos indivíduos positivos, segundo teste e idade. Pode-se observar que nenhum dos quatro testes avaliados apresentou uma associação significativa entre positividade e grupo etário.

Tabela 1 – Associação do sexo com o tratamento em cada momento (ano) e ao longo do tempo pelos marcadores, Wb123, Bm14, ACF e FMP nas cidades de Olinda (2007-2012) e Recife (2003-2009).

	Sexo	Pré-AMM			1ª AMM			2ª AMM			3ª AMM			4ª AMM			5ª AMM			p-valor ²
		-	+	+ (%)	-	+	+ (%)	-	+	+ (%)	-	+	+ (%)	-	+	+ (%)	-	+	+ (%)	
Wb123	Feminino	6	17	73,9	6	17	73,9	6	17	73,9	10	13	56,5	14	8	36,4	11	6	36,8	0,0264
	Masculino	5	35	87,5	7	28	80,0	6	33	84,6	14	25	64,1	14	22	61,1	17	12	41,2	
p-valor¹		0,1886			0,7490			0,3345			0,5975			0,1040			0,7613			
Bm14	Feminino	1	22	95,6	1	22	95,6	1	22	95,6	3	20	87,0	5	18	78,3	2	18	90,0	0,4894
	Masculino	2	38	95,0	1	37	97,4	2	38	95,0	3	36	93,2	6	31	83,8	2	35	94,6	
p-valor¹		1,0000			1,0000			1,0000			0,6615			0,7340			0,6066			
CFA	Feminino	0	23	100,0	0	23	100,0	3	20	87,0	15	8	34,8	20	3	13,0	20	1	4,8	0,4293
	Masculino	0	40	100,0	1	39	97,5	8	32	80,0	24	16	40,0	29	11	27,5	32	6	15,8	
p-valor¹		1,0000			1,0000			0,7319			0,7902			0,2232			0,4032			
PMF	Feminino	0	23	100,0	11	12	52,2	18	5	21,7	22	1	4,4	22	1	4,4	21	0	0,0	0,8907
	Masculino	0	40	100,0	21	19	47,5	32	8	20,0	36	4	10,0	39	1	2,5	38	0	0,0	
p-valor¹		1,0000			0,7966			1,0000			0,6444			1,0000			1,0000			

Fonte: Autor, 2017. Mantel-Haenzel / Log Linear² – Chi-square / Fisher's exact test¹

Tabela 2 – Idade categorizada da amostra avaliada para cada um dos marcadores a pré-AMM por mais 5 anos.

	Anos	Pré -AMM			1ª AMM			2ª AMM			3ª AMM			4ª AMM			5ª AMM			p-valor ²
		-	+	+ (%)	-	+	+ (%)	-	+	+ (%)	-	+	+ (%)	-	+	+ (%)	-	+	+ (%)	
Wb123	3 a 10	1	7	87,5	2	5	71,4	1	5	83,3	2	3	60,0	1	1	50,0	1	1	50,0	0,3086
	11 a 15	2	11	84,6	4	8	66,7	1	10	90,9	3	7	70,0	4	4	50,0	1	1	50,0	
	16 a 20	2	6	75,0	1	5	83,3	3	4	57,1	4	4	50,0	6	6	50,0	6	2	25,0	
	21 a 30	3	2	40,0	2	5	71,4	3	6	66,7	5	6	54,6	6	4	40,0	6	3	33,3	
	31 a 40	1	13	92,9	1	12	92,3	2	11	84,6	4	9	69,2	5	5	50,0	5	3	37,5	
	41 a 50	1	5	83,3	1	4	80,0	1	5	83,3	2	3	60,0	3	4	57,1	4	4	50,0	
	51 a 60	0	6	100,0	1	4	80,0	0	5	100,0	3	3	50,0	2	3	60,0	2	2	50,0	
	60+	1	2	66,7	1	2	66,7	1	4	80,0	1	3	75,0	1	3	75,0	3	2	40,0	
p-valor ¹		0,2145			0,8385			0,6371			0,9663			0,9797			0,9879			0,0761
Bm14	3 a 10	0	8	100,0	0	7	100,0	0	6	100,0	0	5	100,0	0	2	100,0	0	2	100,0	
	11 a 15	1	12	92,3	1	11	91,7	0	11	100,0	1	9	90,0	3	5	62,5	1	4	80,0	
	16 a 20	0	8	100,0	0	6	100,0	1	7	87,5	2	6	75,0	3	9	75,0	1	10	90,9	
	21 a 30	1	4	80,0	1	6	85,7	1	8	88,9	1	10	90,9	3	8	72,7	0	10	100,0	
	31 a 40	0	14	100,0	0	14	100,0	0	13	100,0	1	12	92,3	1	9	90,0	1	9	90,0	
	41 a 50	1	5	83,3	0	5	100,0	0	6	100,0	0	5	100,0	0	7	100,0	0	9	100,0	
	51 a 60	0	6	100,0	0	6	100,0	1	4	80,0	1	5	83,3	1	4	80,0	1	3	75,0	
	60+	0	3	100,0	0	4	100,0	0	5	100,0	0	4	100,0	0	5	100,0	0	6	100,0	
p-valor ¹		0,3533			0,7514			0,3365			0,8976			0,5699			0,4887			0,1318
ACF	3 a 10	0	8	100,0	0	8	100,0	0	6	100,0	4	1	20,0	2	0	0,0	2	0	0,0	
	11 a 15	0	13	100,0	0	12	100,0	3	8	72,7	7	3	30,0	6	2	25,0	5	0	0,0	
	16 a 20	0	8	100,0	0	7	100,0	0	8	100,0	3	5	62,5	9	3	25,0	11	0	0,0	
	21 a 30	0	5	100,0	0	7	100,0	0	9	100,0	6	5	45,5	7	4	36,4	7	3	30,0	
	31 a 40	0	14	100,0	0	14	100,0	2	11	84,6	9	4	30,8	10	0	0,0	10	0	0,0	
	41 a 50	0	6	100,0	0	5	100,0	2	4	66,7	3	2	40,0	6	3	33,3	8	2	20,0	
	51 a 60	0	6	100,0	1	5	83,3	2	3	60,0	4	2	33,3	4	1	20,0	4	0	0,0	
	60+	0	3	100,0	0	4	100,0	2	3	60,0	3	2	40,0	5	1	16,7	5	2	28,6	
p-valor ¹		1,0000			0,2381			0,1195			0,8531			0,5578			0,1808			0,4071
FMP	3 a 10	0	8	100,0	2	6	75,0	6	0	0,0	5	0	0,0	2	0	0,0	2	0	0,0	
	11 a 15	0	13	100,0	5	7	58,3	6	5	45,5	8	2	20,0	8	0	0,0	4	0	0,0	
	16 a 20	0	8	100,0	3	4	57,1	7	1	12,5	8	0	0,0	12	0	0,0	11	0	0,0	
	21 a 30	0	5	100,0	4	3	42,9	7	2	22,2	11	0	0,0	11	0	0,0	11	0	0,0	
	31 a 40	0	14	100,0	8	6	42,9	12	1	7,7	13	0	0,0	10	0	0,0	9	0	0,0	
	41 a 50	0	6	100,0	3	2	40,0	4	2	33,3	4	1	20,0	9	0	0,0	11	0	0,0	
	51 a 60	0	6	100,0	4	2	33,3	4	1	20,0	5	1	16,7	4	1	20,0	4	0	0,0	
	60+	0	3	100,0	3	1	25,0	4	1	20,0	4	1	20,0	5	1	16,7	7	0	0,0	
p-valor ¹		1,0000			0,7281			0,3550			0,1667			0,1055			1,0000			0,1318

Fonte: Autor, 2017. Mantel-Haenzel / Log Linear² – Chi-square / Fisher's exact test¹

No pré-AMM, foi observada uma média de aproximadamente 201 microfilárias/mL de sangue, variando de 1 a 1834 ($\pm 351,1$ DP). Quanto à pesquisa de ACF pelo Og4C3-ELISA, pode-se observar uma positividade de 100% com uma média de 9.025 Unidades de Antígenos “UA” (± 1.099 DP). Com relação à pesquisa de anticorpos, foi identificada uma positividade de 82,5% (52/63), com uma DO média de 2,6 ($\pm 1,66$ DP) e 95,2% (60/63) com uma DO média de 1,78 ($\pm 0,83$ DP), para o anti-Wb123 e anti-Bm14, respectivamente.

A tabela 3 demonstra o resultado dos testes, para os marcadores, após o primeiro e o quinto round de AMM. Pode-se observar que após o primeiro round apenas a microfilaremia, avaliada pela FMP, apresentou uma redução significativa no número de indivíduos negativos, sendo identificada uma diminuição de 50,8%. Após cinco rounds de tratamento, não foram identificados indivíduos microfilarêmicos e os níveis de ACF e anticorpos anti-Wb123 reduziram 88,1% e 65,8%, respectivamente ($p < 0,05$). Entretanto, não foi identificada uma redução significativa na concentração dos níveis de anticorpos anti-Bm14 que reduziram apenas 7,2% ($p > 0,05$). Ao final dos cinco anos de tratamento foi identificada uma média de antigenemia de 225 UA ($\pm 853,62$ DP) e para os anticorpos uma média de 0,51DO ($\pm 0,91$ DP), para os anti-Wb123, e 1,47DO ($\pm 1,08$ DP), para os anti-Bm14.

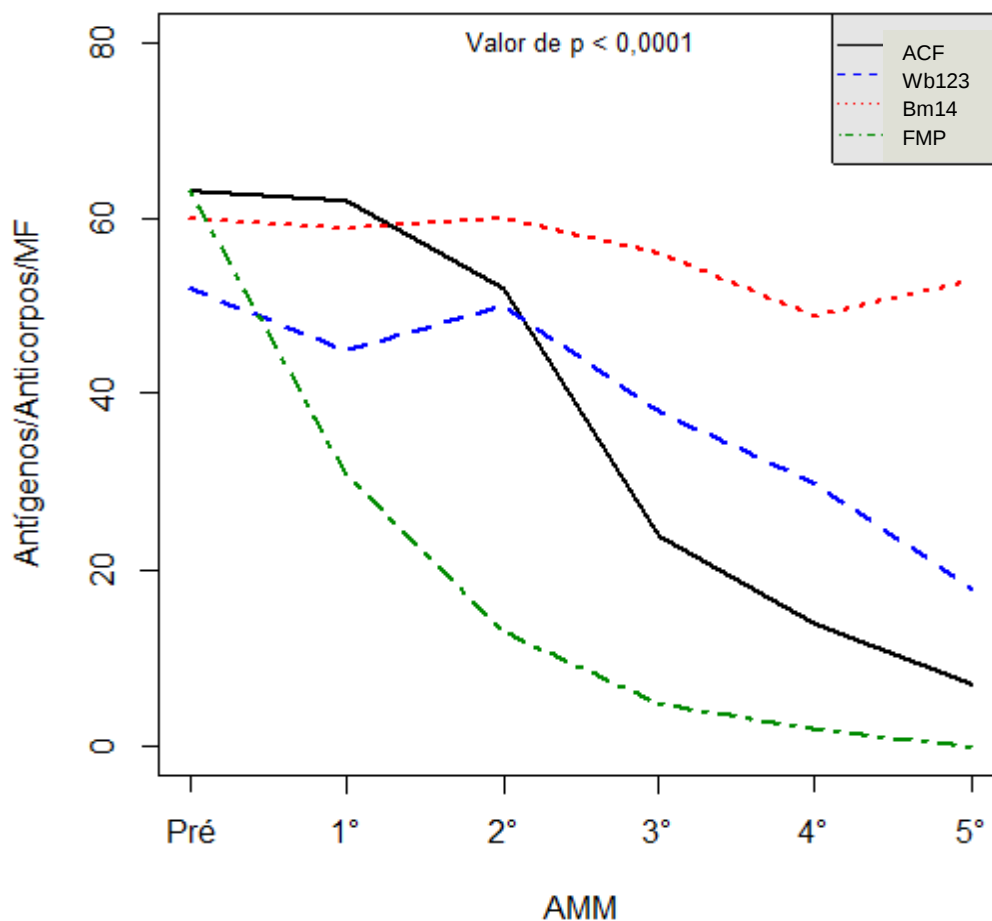
Tabela 3 – Avaliação dos marcadores sobre o impacto do tratamento da pré-AMM x 1ªAMM e da 1ªAMM x 5ªAMM (último ano).

Pre AMM	1ª AMM		Total (%)	p-value	1ºAMM	5ª AMM		Total (%)	p-valor
	Neg. (%)	Pos. (%)				Neg. (%)	Pos. (%)		
Wb123					Wb123				
Negativo	8 (13,8)	3 (5,2)	11 (19,0)	0,7237	Negativo	7 (17,7)	0 (0,0)	7 (17,1)	< 0,0001
Positivo	5 (8,6)	42 (72,4)	47 (81,0)		Positivo	20 (48,8)	14 (34,2)	34 (82,9)	
Total (%)	13 (22,4)	45 (77,6)		-	Total (%)	27 (65,8)	14 (34,2)		-
Bm14					Bm14				
Negativo	2 (3,3)	1 (1,6)	3 (4,9)	1,0000	Negativo	2 (3,6)	0 (0,0)	2 (3,6)	0,4795
Positivo	0 (0,0)	58 (95,1)	58 (95,1)		Positivo	2 (3,6)	51 (92,8)	53 (96,4)	
Total (%)	2 (3,3)	59 (96,7)		-	Total (%)	4 (7,2)	51 (92,8)		-
ACF					ACF				
Negativo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1,0000	Negativo	1 (1,7)	0 (0,0)	1 (1,7)	< 0,0001
Positivo	1 (1,6)	62 (98,4)	63 (100,0)		Positivo	51 (86,4)	7 (11,9)	58 (98,3)	
Total (%)	1 (1,6)	62 (98,4)		-	Total (%)	52 (88,1)	7 (11,9)	-	-
FMP					FMP				
Negativo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	< 0,0001	Negativo	30 (50,8)	0 (0,0)	30 (50,8)	< 0,0001
Positivo	32 (50,8)	31 (49,2)	63 (100,0)		Positivo	29 (49,2)	0 (0,0)	29 (49,2)	
Total (%)	32 (50,8)	31 (49,2)		-	Total (%)	59(100,0)	0 (0,0)		-

Fonte: Autor, 2017.

A análise do comportamento da microfilaremia, da antigenemia e dos anticorpos anti-Bm14 e anti-Wb123 ao longo do período de estudo permitiu identificar que os quatro marcadores apresentam um perfil decrescente ao longo do tempo. Porém, para os anticorpos anti-Bm14 esse perfil de redução é lento, não apresentando diferença significativa ao final dos cinco rounds de tratamento (Figura 01).

Figura 1 - Comportamento dos marcadores: Wb123, Bm14, ACF e FMP das amostras avaliadas ao longo do tempo.



Fonte: Autor, 2017.

Discussão

A morte de vermes adultos, associada a diminuição significativa da microfilaremia nas áreas endêmicas para FL submetidas à AMM, tem levado a necessidade de se definir quais marcadores seriam mais apropriados para determinar o momento exato de interromper o tratamento e iniciar a fase de vigilância (OTTESEN, 1997; OMS, 2000; OPAS, 2015). A

pesquisa de anticorpos vem sendo sugerida como sendo capaz de assegurar um diagnóstico precoce para infecção da FL, mas ainda requer estudos que possam atestar sua aplicabilidade no diagnóstico e também na confirmação da interrupção da transmissão em áreas sob intervenção (OMS, 2015; DE SOUZA et al., 2017). No presente estudo, avaliamos o desempenho dos marcadores utilizados na avaliação de áreas endêmicas para FL submetidas ao tratamento em massa. Para isso, um grupo de indivíduos microfilarêmicos residentes na RMR – atualmente, última área considerada endêmica no Brasil – foi acompanhado por cinco anos de AMM.

A análise da positividade dos marcadores segundo o sexo não identificou associação para a microfilaremia, ACF e para os anticorpos anti-Bm14. Esse resultado coincide com os observados em um estudo realizado em Luangwa, na Zâmbia, no qual foram avaliados 985 pacientes, com relação à presença de infecção e doença e também não identificaram associação entre sexo e positividade para os ACF e anticorpos anti-Bm14 (SHAWA et al., 2013). No entanto, foi observada diferença significativa entre os sexos para os resultados obtidos para os anticorpos anti-Wb123, sugerindo que os indivíduos do sexo masculino constituem um grupo de risco para contrair a infecção filarial e corroborando com estudos realizados em outras áreas endêmicas, que também identificaram um maior percentual de indivíduos positivos entre indivíduos do sexo masculino (HUPPATZ et al., 2008; LIANG et al., 2008; LAU et al., 2014). Uma hipótese que tem sido utilizada para justificar esse fenômeno é que os indivíduos masculinos, devido a sua rotina diária, estariam mais expostos a ação do mosquito vetor (*Culex quinquefasciatus*) (BRABIN, 1990; BURKOT et al., 2006).

Em relação a faixa etária, um estudo realizado em duas áreas endêmicas na África, uma com alta e outra com baixa intensidade de transmissão, identificou que na área de alta transmissão, o nível de infecção (segundo a microfilaremia, e o ACF) foi significativamente mais alto nos grupos etários mais jovens. Em contraste, na área de baixa transmissão, os níveis transmissão encontrados aumentavam junto com a idade. Os autores concluíram, analisando os níveis de anticorpos específicos que a idade certamente tem um efeito significativo nos níveis de anticorpos na área de alta transmissão, mas parecia ter um efeito diferenciado na produção desses mesmos anticorpos na comunidade de baixa transmissão.

Dessa forma, a idade afetava de alguma maneira a resposta dos anticorpos em ambas as áreas estudadas. Porém, mais estudos são necessários para obter conhecimento sobre a complexa relação imunológica que há entre o parasito e o hospedeiro (JAOKO et al., 2007). Neste estudo, a análise durante os seis anos não demonstrou relação entre a idade e a positividade para nenhum dos marcadores avaliados, isso provavelmente pode haver ocorrido

devido ao tamanho reduzido da amostra, sendo necessária a realização de novos estudos na área que confirmem o real comportamento desses marcadores segundo a idade.

A avaliação dos marcadores ao longo dos anos de tratamento permitiu evidenciar uma redução rápida, seguida da negatificação da microfilaremia após os cinco rounds de AMM. Esse resultado já era esperado, uma vez que o fármaco utilizado apresenta uma eficácia elevada na redução das microfilárias circulantes (SIMONSEN et al., 2004). Entretanto, o mesmo não aconteceu com a antigenemia, que apresentou uma redução lenta da carga antigênica e alguns pacientes ainda permaneceram positivos apesar dos cinco rounds de tratamento. Outros estudos também identificaram um padrão semelhante, com redução lenta da antigenemia, e segundo esses, a redução lenta da carga antigênica poderia estar relacionada com a presença de vermes adultos refratários ao tratamento. Entretanto, a ausência de uma avaliação radiológica nesses pacientes não permitiu confirmar essa hipótese (MORE; COPEMAN, 1990; EBERHARD et al., 1997).

Com relação a detecção dos anticorpos anti-Bm14 e anti-Wb123, observamos perfis de resposta diferentes ao longo do tratamento. Apesar dos dois anticorpos apresentarem um padrão decrescente, os anticorpos anti-Bm14 apresentaram uma depuração lenta nos seus títulos, o que resultou em uma diminuição não significativa no número de indivíduos positivos ao início e ao final do AMM. Um estudo realizado em Papua Nova Guiné identificou que, após vários rounds de tratamento, existe uma redução significativa na densidade de microfilárias e na antigenemia. Porém, esse comportamento não se reproduziu quando avaliaram o perfil dos anticorpos anti-Bm14 (TISCH et al., 2008). Segundo eles, a redução lenta dos títulos de anticorpos indicava a presença de infecção recente na área e, por essa razão, seria um marcador mais exato da epidemiologia da parasitose após a realização do tratamento em massa.

Outro estudo realizado no Egito também observou que os anticorpos anti-Bm14 persistiam por anos após a intervenção do AMM (RAMZY et al., 2006). Existe a expectativa que a soro-reversão ocorra em algum momento, porém a ausência dessa informação confere uma limitação na utilização dos anticorpos anti-Bm14 como ferramenta capaz de afirmar a interrupção da transmissão, pois não se pode precisar com segurança se os indivíduos positivos representam casos de exposição ao parasito ou memória imunológica residual.

A análise do comportamento dos anticorpos anti-Wb123 demonstrou uma diferença significativa nos títulos de anticorpos anti-Wb123 identificados no momento pré-AMM e ao final do estudo, sendo esse comportamento decrescente a cada novo round de tratamento. No entanto, ao final dos 5 anos, 34,2% dos pacientes ainda apresentavam uma concentração de

anticorpos que lhes conferiam positividade ao ELISA-Wb123. Esse fato provavelmente se deve a uma maior persistência dos anticorpos em alguns indivíduos expostos e não devido a refratariedade ao tratamento ou reinfecção, uma vez que, os mesmos não apresentaram microfilaremia positiva e tiveram redução efetiva nos títulos de ACF.

Esses resultados corroboram com os achados de um estudo realizado em Gâmbia, na África, que também evidenciou uma positividade refratária aos anticorpos anti-Wb123. Segundo os autores desse estudo, a positividade residual poderia estar relacionada aos valores de corte adotados para o teste, ressaltando a importância de definir pontos de corte precisos para o teste ELISA-Wb123. Esse fato resulta um desafio devido a disponibilidade limitada de painéis com soros bem caracterizados para definir pontos de cortes adequados (DE SOUZA et al., 2017; WON et al., 2018). Em um estudo realizado nas Ilhas Cook, amostras coletadas durante a década de 1970 foram analisadas quanto a anticorpos anti-Wb123 e comparadas com os resultados das amostras coletadas na mesma ilha em 1992, 5 anos após uma única rodada de tratamento. Os resultados indicaram uma diminuição significativa na positividade dos anticorpos anti-Wb123, sugerindo uma redução na transmissão da FL (STEEL et al., 2012).

Os resultados do presente estudo permitiram identificar que a redução na microfilaremia se reflete melhor nos títulos de ACF e anticorpos anti-Wb123, pois os três marcadores apresentam comportamentos semelhantes, ou seja, um decréscimo linear progressivo. Entretanto, esse mesmo comportamento não foi observado com os anticorpos anti-Bm14, os quais apresentaram títulos elevados de anticorpos mesmo após os cinco rounds de tratamento, inclusive nos pacientes diagnosticados amicrofilarêmicos já após o primeiro ciclo de tratamento. Dos dois anticorpos avaliados, os anticorpos anti-Wb123 se mostraram mais sensíveis ao impacto do AMM que os anticorpos anti-Bm14.

Embora a pesquisa de anticorpos seja sugerida como forma de avaliar e monitorar as áreas submetidas a AMM, de acordo com o PGEFL, enfatizamos que por um lado, os anticorpos podem se expressar mais precocemente, logo da exposição ao parasito, por outro lado a persistência desses marcadores representam uma limitação importante que dificulta a definição do real status de transmissão local, sendo necessária uma avaliação dos demais marcadores, incluindo a análise através da biologia molecular e o xenomonitoramento. Por essa razão, a eleição de anticorpos como marcadores adequados ainda é uma decisão complexa e que necessita estudos mais precisos, que envolvam a avaliação de uma maior quantidade de indivíduos e por um período de tempo mais prolongado.

Contribuições dos autores

P.F. conduziu os experimentos e escreveu o manuscrito com suporte de R.A, M.A.M, B.E., M.A.L; o apoio laboratorial foi realizado por M.A.L, M.R., J.A., A.F; contribuiu com as análises estatísticas G.T. Todos os autores contribuíram com a revisão, leitura e aprovação deste artigo.

Declaração de conflito de interesses

Declaramos que não há conflitos de interesse.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação Oswaldo Cruz / Fundação para o desenvolvimento tecnológico em saúde-Vice-Presidente de Pesquisa e Laboratórios de Referência (FIOTEC/Fiocruz) VPPLR-15-2-2-30 projeto.

Referências

AGRESTI, Alan. **Categorical Data Analysis**. 2nd edition. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2002.

BRABIN, L. Sex differentials in susceptibility to lymphatic filariasis and implications for maternal child immunity. **Epidemiology and Infection**. Cambrigde, US, v.105, n.2, p. 335–353, 1990.

BRAGA, C. et al. *Evaluation of a social and environmental indicator used in the identification of lymphatic filariasis transmission in urban centers*. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, Brasil, v. 17, p. 1211-1218, 2001.

BURKOT, T.R., DURRHEIM, D., MELROSE, W.D., SPEARE, R., ICHIMORI, K. The argument for integrating vector control with MDA campaigns to ensure elimination of lymphatic filariasis. **Filaria J**. 16 (5), 10p, 2006.

DAMGAARD, J. et al. Assessing drivers of the IgG4 antibody reactivity to recombinant antigen Bm14 in *Wuchereria bancrofti* endemic populations in EastAfrica. **Acta Tropica**, Netherlands, v.161, p. 26-32, 2016.

DE SOUZA, DK et al., An evaluation of Wb123 antibody elisa in individuals treated with ivermectin and albendazole, and implementation challenges in Africa **The Pan African Medical Journal**, p 27-65, 2017.

DREYER, G. et al. Studies on the periodicity and intravasular distribution of *Wuchereria bancrofti* microfilariae in paired samples of capillary and venous blood from Recife. Brazil. **Trop Med Int Health**, v. 1, p. 264-272, 1996.

EBERHARD, M.L. et al. Clearence of *Wuchereria bancrofti* antigen after treatment winth diethylcarbamazine or ivermectin. **Am J Trop Med Hyg**, v. 57, p 483-486, 1997.

HAMLIN, K.L. et al.. Longitudinal monitoring of the development of antifilarial antibodies and acquisition of *Wuchereria bancrofti* in a highly endemic area of Haiti. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 6, n. 12, e1941, 2012.

HUPPATZ, C. et al. Eliminating Lymphatic Filariasis - the Surveillance Challenge. **Trop Med Int Health**, v. 13, p. 292–294, 2008.

IBGE, 2013. Censo demográfico 2010: Características populacionais e domiciliares. Rio de Janeiro, 2010. <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 17/09/2017.

INBIOS. *Filaria Detect*TM IgG ELISA. [www.inbioscom](http://www.inbioscom.com). Seattle, WA 98104 USA: **InBios International**, Inc.; 2015.

JAOKO, W.G. et al. Immunoepidemiology of *Wuchereria bancrofti* Infection: Parasite Transmission Intensity, Filaria-Specific Antibodies, and Host Immunity in Two East African Communities. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 12, p. 5651-5662, December 2007.

KATERI, M.. Contingency Table Analysis Methods and Implementation Using R. **Springer**, New York, 2014. <http://cta.isw.rwth-aachen.de/>

KUBOFCIK, J.; FINK, D.L.; NUTMAN, T.B. Identification of Wb123 as an Early and Specific Marker of *Wuchereria bancrofti* Infection. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, US, v.6, n. 12, e1930, 2012.

LAMMIE, P.J. et al. Recombinant antigen-based antibody assays for diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis-a multicenter trial. **Filaria Journal**, v. 3, p.1-5, 2004.

LAU, C.L. et al. Seroprevalence and Spatial Epidemiology of Lymphatic Filariasis in American Samoa after Successful Mass Drug Administration. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 11, e3297, 2014.

LIANG, J.L. et al. Impact of five annual rounds of mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on *Wuchereria bancrofti* infection in American Samoa. **Am J Trop Med Hyg**, v. 78, n. 6, p. 924-8, Junho 2008.

MARTINEZ, E.Z. et al.. A curva Roc para Testes Diagnósticos. **Caderno de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 7-31, 2003.

MASSON, J. et al. Relative Performance and Predictive Values of Plasma and Dried Blood Spots with Filter Paper Sampling Techniques and Dilutions of the Lymphatic Filariasis Og4C3 Antigen ELISA for Samples from Myanmar. **Trop. Med. Infect. Dis**, v. 2, n. 7, 2017.

MORE, S.J.; COPEMAN, D.B. A highly specific and sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating antigen in bancroftian filariasis. **Trop Med Parasitol**, v. 41, p. 403-406, 1990.

OMS - (Organização Mundial de Saúde), 2000. Preparing and Implementing a National Plan to Eliminate Lymphatic Filariasis. **A guideline for Programme Managers**. WHO/CDS/CPE/CEE/2000.16. 2000.

OMS - (Organização Mundial de Saúde), 2010. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2010. **Weekly epidemiological record**, v. 85, n. 38, p. 365–372, 2010a.

OMS - (Organização Mundial de Saúde), 2010. **Progress Report 2000–2009 and Strategic Plan 2010–2020 of the Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: Halfway Towards Eliminating Lymphatic Filariasis**, 2010b.

OMS - (Organização Mundial de Saúde), 2015. Programa Mundial para Eliminação da Filariose Linfática. **Monitoramento e avaliação epidemiológica da intervenção com tratamentos coletivos**. Manual para programas nacionais de eliminação da filariose programa mundial para eliminação da filariose linfática. 2015.

OMS - (Organização Mundial de Saúde), 2016. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2015. **Weekly epidemiological record**, v. 91, n. 39, p. 441–460, 2016.

OPAS, 2015 (Organização Pan-Americana de Saúde). **16ª. Reunião Regional de Gerentes do Programa para Eliminação da Filariose Linfática e 15º. Grupo Regional de Análise do Programa para Eliminação da Filariose Linfática**. Recife, Brasil, 29 a 30 de Junho, 2015.

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

RAMAIAH, K.D.; OTTESEN, E.A. Progress and impact of 13 years of the global programme to eliminate lymphatic filariasis on reducing the burden of filarial disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 11, e3319, 2014.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

RAMZY, R.M. et al. Effect of yearly mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on bancroftian filariasis in Egypt: a comprehensive assessment. **The Lancet**, v. 367, e9515, p. 992-9, 2006.

RECIFE. Secretaria Municipal de Saúde. Manual de Operacionalização: **Intervenção-piloto para controle da filariose linfática**: Distrito Sanitário II - Microrregião 2.2 (Bairros de Água Fria e Alto Santa Terezinha). In: _____. Programa de Controle da Filariose do Recife. Recife, 2002.

ROCHA, A. (2004) Filariose bancroftiana: **Avaliação dos testes de diagnóstico disponíveis frente às diversas formas clínicas da Bancroftose**. 2004. Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

SIMONSEN, P.E. et al. The effect of single dose ivermectin alone or in combination with albendazole on *Wuchereria bancrofti* infection in primary school children in Tanzania. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 98, n.8, p. 462-72, Aug 2004.

STEEL, C. et al. Antibody to the Filarial Antigen Wb123 Reflects Reduced Transmission and Decreased Exposure in Children Born Following Single Mass Drug Administration (MDA). **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, e1940, 2012.

STEEL, C. et al. Rapid *Wuchereria bancrofti*-specific antigen Wb123-based IgG4 immunoassays as tools for surveillance following mass drug administration programs on lymphatic filariasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 8, p. 1155-6110, 2013.

STEEL et al. Rapid Point-of-Contact Tool for Mapping and Integrated Surveillance of *Wuchereria bancrofti* and *Onchocerca volvulus* Infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 8, August 2015.

TISCH et al. Mass drug administration trial to eliminate lymphatic filariasis in Papua New Guinea: changes in microfilaremia, filarial antigen, and Bm14 antibody after cessation. **Am J Trop Med Hyg**, v. 78, n. 2, p. 289-93, Feb 2008.

TROPBIO Pty. Ltd. ELISA Kit for Detecting and Quantifying *Wuchereria bancrofti* Antigen; Cellabs Pty. Ltd.: Brookvale, NSW, Australia, 2014.

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

WON, K.Y et al. Use of Antibody Tools to Provide Serologic Evidence of Elimination of Lymphatic Filariasis in The Gambia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 98, n. 1, p. 15-20, Jan 2018.

6 CONCLUSÃO

- Os resultados obtidos evidenciaram um melhor ponto de corte para a Densidade Ótica (DO) do teste *Filaria Detect*TM IgG4 ELISA (ELISA-Wb123) em 0,239, permitindo a discriminação de positivos (iguais ou superiores a DO 0,239) e negativos (DO inferior a 0,239) para as amostras brasileiras;
- O valor de corte definido pode ser utilizado por Planos e Programas Nacionais de Eliminação da FL no Brasil;
- Em relação ao monitoramento e a vigilância, a persistência dos anticorpos representa uma limitação a sua aplicação, demonstrando que a sua escolha como marcador ainda é uma decisão complexa e que requer mais estudos.

7 PERSPECTIVAS E SUGESTÕES

Sugere-se que novos estudos sejam desenvolvidos, ampliando o tamanho da amostra e aumentando o período de acompanhamento, para avaliar por quanto tempo os anticorpos anti-Wb123 permanecem positivos após o término do tratamento com a finalidade de fornecer informações mais precisas aos programas de nacionais e internacionais de controle da Filariose Linfática.

8. REFERÊNCIAS

- ABBASI, I.; GITHURE, J.; OCHOLA, J.J.; AGURE, R.; KOECH, D.K.; RAMZY, RM., WILLIAMS, S.A.; HAMBURGER, J. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction employing patients' sputum. **Parasitology Research**, Berlin, DE, v. 85, n. 10, p. 844–849, August 1999.
- AMARAL, F.; DREYER, G.; FIGUEREDO-SILVA, J.; NOROES, J.; CAVALCANTI, A.; SAMICO, S.C.; SANTOS, A.; COUTINHO, A. Adult worms detected by ultrassomography in human bancroftian filariasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, US, v. 50, p.753-757, 1994.
- ARAÚJO, M.E.B.B. **Avaliação da Cinética de Antígeno Circulante em pacientes portadores de *Wuchereria bancrofti***. 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, 2009.
- AZEVEDO, R; DOBBIN JR, J.E. Filariose (*Wuchereria bancrofti*) no grupo residencial do IAPB no bairro de Afogados (Recife). Publicações Avulsas do Instituto Aggeu Magalhães, Recife, BR, v. 1, n. 13, p. 157-162, 28 out. 1952.
- BENNURU, S.; NUTMAN, T.B. Lymphatics in Human Lymphatic Filariasis: In Vitro Models of Parasite-Induced Lymphatic Remodeling. **Lymphat Res Biol.**, Larchmont, US, v. 7, n. 4, p 215-219, DEC 2009.
- BOCKARIE, M.J.; IBAM, E.; ALEXANDER, N.D.E.; HYUN, P.; DIMBER, Z. et al. Towards eliminating lymphatic filariasis in Papua New Guinea: impact of annual single-dose mass treatment on transmission of *Wuchereria bancrofti* in East Sepik Province. **Papua New Guinea Medical Journal**, Port Moresby, PG, v. 43, p.172–182, 2000.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Gerência de Endemias Focais. Coordenação de Controle de Doenças Transmitidas por Vetores. **Relatório da Reunião de Avaliação do Programa de Controle da Filariose Linfática no Brasil, Recife- PE- 2000**. Brasília, 2000. 58 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Gerência Técnica do Programa de Eliminação da Filariose. Coordenação de Controle de Doenças Transmitidas por Vetores. **Síntese Epidemiológica da Filariose**, Brasília, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica e eliminação da filariose linfática** / Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Ministério da Saúde .Brasília, DF, 2009. 80 p.
- CHANDRASHEKAR, R.; CURTIS, K.C.; RAMZY, R.M.; LIFTIS, F.; Li, B.W.; WEIL, G.J. Molecular cloning of *Brugia malayi* antigens for diagnosis of lymphatic filariasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 64, n. 2, p. 261-271, 1994.

CHANTEAU, S. et al. Og4C3 circulating antigen: a marker of infection and adult worm burden in *Wuchereria bancrofti* filariasis. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, US, v. 170, p. 247-250, 1994.

COUTINHO, A.; MEDEIROS, Z.; DREYER, G. História da filariose linfática em Pernambuco. I. Aspectos Epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, BR, v. 29, 1996.

DAURES, M.; CHAMPAGNAT, J.; PFANNSTIEL, A.; RINGUENOIRE, F.; GRANGEON, J-P.; MUSSO, D. Filariasis serosurvey. **Parasites and Vectors**, New Caledonia, SP, v. 2015, p. 102, 2015.

DISSANAYAKE, S.; ZHENG, H.; DREYER, G.; XU, M.; WATAWANA, L.; CHENG, G.; WANG, S.; MORIN, P.; DENG, B.; KURNIAWAN, L. et al. Evaluation of a recombinant parasite antigen for the diagnosis of lymphatic filariasis. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore, US, v.50, n. 6, p. 727 – 734, Jun 1994.

DREYER, G.; MEDEIROS, Z.; BELIZ, 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**, Rio de Janeiro, BR, v 86, p 495-496, 1991.

DREYER, G.; BRANDÃO, A.C.; AMARAL, F.; MEDEIROS, Z.; ADDISS, D. Detection by ultrasound of living adult *Wuchereria bancrofti* in the female breast. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, BR, v 91, p. 95-6, 1996.

DREYER, G.; DREYER, P. Bases para o tratamento da morbidade em áreas endêmicas de filariose bancroftiana. **Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, BR, v. 33, p. 217-221, 2000.

DREYER, G.; MATTOS, D.; FIGUEIREDO-SILVA, J.; NORÕES, J. Mudanças de paradigmas na filariose bancroftiana. Paradigm shift in bancroftian filariasis. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, BR, v. 55, p. 355-362, 2009.

EVANGELISTA NETTO, M. J. **Filariose bancroftiana: a morbidade referida como indicador da parasitose em Jaboatão dos Guararapes-PE**. 2008, 74p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, 2008.

FONTES, G. ROCHA, E.M.M. Filariídea: *Wuchereria bancrofti* – Filariose linfática. In: NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana**. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. cap. 35

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

FREITAS, H.; VIEIRA, J. B.; BRAUN R.; MEDEIROS. Z.; ROCHA, E. M. M.; AGUIAR-SANTOS, A.; FRAIHA, H.; ROCHA, A. RELATÓRIO: Workshop para avaliação da situação epidemiológica da filariose linfática no Município de Belém, Pará, norte do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, BR, v. 41, p. 212-21, 2008.

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

FURTADO, A. F.; ABATH, F. G. C.; REGIS, L.; GOMES, Y. M.; LUCENA, W. A.; FURTADO, P. B.; DHALIA, R.; MIRANDA, J. C.; NICOLAS, L. Improvement and application of a polymerase chain reaction system for detection of *Wuchereria bancrofti* in *Culex quinquefasciatus* and human blood samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, BR, v.92, p. 85-86, 1997.

HAMLIN, K. L.; MOSS, D. M.; PRIEST, J. W.; ROBERTS, J.; KUBOFCEK, J. et al. Longitudinal Monitoring of the Development of Antifilarial Antibodies and Acquisition of *Wuchereria bancrofti* in a Highly Endemic Area of Haiti. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, US, v. 6, p. 1941, 2012.

HAYLEY, J. et al. Application of the Filariasis CELISA Antifilarial IgG4 Antibody Assay in Surveillance in Lymphatic Filariasis Elimination Programmes in the South Pacific. **J Trop Med**, Cairo, EG, v. 2011, 2011.

INBIOS. *Filaria Detect*TM IgG ELISA. www.inbioscom. Seattle, WA 98104 USA: **InBios International**, Inc.; 2015.

KING, C. L.; NUTMAN, T. B. Regulation of the immune response in lymphatic filariasis and onchocerciasis. **Parasitology Today**, Cambridge, US, v. 7, p. 54-58, 1991.

KUBOFCEK, J.; FINK, D. L.; NUTMAN, T. B. Identification of Wb123 as an Early and Specific Marker of *Wuchereria bancrofti* Infection. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, US, v. 6, p. 1930, 2012.

LAMMIE, P.J. et al. Recombinant antigen-based antibody assays for diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis-a multicenter trial. **Filaria Journal**, London, GB, v. 3, p.1-5, 2004.

LEITE, A.B.; LIMA, A.R.V.; DE LEITE, R.B.; SANTOS, R.V.; GONÇALVES, J.E.L.; ROCHA, E.M.M.; FONTES, G. Assessment of family and neighbors of an individual infected with *Wuchereria bancrofti* from a non-endemic area in the city of Maceió, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, BR, v. 14, p. 125-128, 2010.

MACIEL, M.A.V. et al., Estudo comparativo de áreas endêmicas de filariose bancroftiana na Região Metropolitana do Recife, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, suplemento 2, p. 301-309, 1994.

MACIEL, M.A.V. et al. Epidemiological study of bancroftian filariasis, in Recife Northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, BR, v. 91, p. 449 – 455, 1996.

MACIEL, A.; FURTADO, A.; MARZOCHI, K. B. F. Perspectivas da municipalização do controle da filariose linfática na região metropolitana do Recife. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, BR, v. 15, p. 195 – 203, 1999.

MARQUES, A.C. O Controle das Endemias no Brasil de 1979 a 1984. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, Uberaba, BR, v. 19, n. 2, p. 121-122, June 1986.

MCCARTHY, J. S. et al. Evaluation of a Polymerase Chain Reaction-Based Assay for Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 173, p. 1510-1514, 1996.

MEDEIROS, Z. et al. *Wuchereria bancrofti* microfilarial density of autochthonous cases and natural Culex infectivity rates in Northeast Brazil. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, US, v. 95, p. 214-217, 1992.

MEDEIROS, Z. et al. Controle da Filariose Linfática no Brasil, 1951-2000. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, BR, v. 12, n.2, p. 77-86, 2003.

MIRANDA, J.C. Estudo da resposta imune humoral (IgG específica) para antígenos de larvas infectantes (L3) de *Wuchereria bancrofti*, entre portadores e não portadores de filariose bancroftiana no Município de Olinda-PE. 2006. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, 2006.

MORE, S.J.; COPEMAN, D.B. A highly specific and sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating antigen in bancroftian filariasis. **Tropical Medicine and Parasitology**, Stuttgart, DE, v. 41, p. 403-406, 1990.

NDAO, M. Diagnosis of Parasitic Diseases: Old and New Approaches. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, Cairo, EG, v. 2009, 15p, 2009.

NETTO, M. J.; BONFIM, C.; BRANDÃO E.; AGUIAR-SANTOS, A. M.; MEDEIROS, Z. Burden of lymphatic filariasis morbidity in an area of low endemicity in Brazil. **Acta Tropica**, Basel, CH, v. 163, p. 54-60, 2016.

NUTMAN, T. B.; KUMARASWAMI, V. Regulation of the immune response in lymphatic filariasis: perspectives on acute and chronic infection with *Wuchereria bancrofti* in South India. **Parasite Immunology**, Oxford, GB, v. 23, n 7, p. 389 – 399, 2001.

OLIVEIRA, C. M. **Validação dos anticorpos monoclonais Og4c3 e AD12 no diagnóstico da filariose bancroftiana em inquérito populacional.** 2003. 104f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, 2003.

OLIVEIRA, P.; BRAGA, C.; ALEXANDER, N.; BRANDÃO, E.; SILVA, A.; WANDERLEY, L.; AGUIAR, A. M.; DINIZ, G.; MEDEIROS, Z.; ROCHA, A. Evaluation of diagnostic tests for *Wuchereria bancrofti* infection in Brazilian schoolchildren. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, BR, v. 47, p. 359-366, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Centers for Disease Control. **Recommendations of the International Task Force for Disease Eradication.** MMWR Recomm Rep. Atlanta, U.S, v. 42, p. 1-38, Dec 31 1993.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Elimination of lymphatic filariasis as a public health problem.** Fiftieth World health Assembly, Geneva, SW, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis. **Preparing and implementing a national plan to eliminate lymphatic filarias in countries where onchocerciasis is co-endemic,** Geneva, SW, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis.** Annual Report on Lymphatic Filariasis 2001, Geneva, SW, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Department of Control of Neglected Tropical Diseases. **Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis:** progress report, 2014. Weekly epidemiological record. Geneva, SW, v. 90, n. 38, p. 489-504. Sep 18 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Department of Control of Neglected Tropical Diseases. **Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis:** progress report, 2015. Weekly epidemiological record. Geneva, SW, v. 91, n. 39, p. 441-55. Sep 30 2016.

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

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2015. **16ª. Reunião Regional de Gerentes do Programa para Eliminação da Filariose Linfática e 15º. Grupo Regional de Análise do Programa para Eliminação da Filariose Linfática.** Recife, Brasil, 29 a 30 de Junho, 2015.

OTTESEN, E. A.; DUKE, B. O.; KARAM, M.; BEHBEHANI, K. **Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariasis.** Bulletin of the World Health Organization. Geneva, SW, v.75, p. 491–503, 1997.

RACHOU, R. G. Transmissores da filariose bancroftiana no Brasil. **Rev Bras Malariol Doenças Trop**, Rio de Janeiro, BR, v. 8, p. 267-279, 1956.

RACHOU, R. G. Distribuição geográfica das filariose humanas no Brasil. **Rev Bras Malariol Doenças Trop**, Rio de Janeiro, BR, v. 9, p. 79-100, 1957.

RACHOU, R. G. Conceito e programa de profilaxia da filariose bancroftiana no Brasil. **Rev Bras Malariol Doenças Trop**, Rio de Janeiro, BR, v. 12, p. 11-40, 1960.

RAMAIAH, K.; OTTESEN, E. A. Progress and impact of 13 years of the Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis on reducing the burden of filarial disease. **PloS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 11, 3319p, 2014.

RAMZY, R. M. R.; HELMY, H.; FARIS, R.; GAD, A. M.; CHANDRASHEKAR, R.; WEIL, G. J. Evaluation of a recombinant antigen-based antibody assay for diagnosis of bancroftian filariasis in Egypt. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, p. 443-446, 1995.

REBOLLO, M. P.; BOCKARIE, M. J. Shrinking the lymphatic filariasis map: update on diagnostic tools for mapping and transmission monitoring. **Parasitology**, London, GB, v. 141, p. 1912–1917, 2014.

RECIFE. Secretaria Municipal de Saúde. Diretoria de Epidemiologia. Programa de Controle da Filariose no Recife. **Intervenção-piloto para controle da Filariose Linfática**: Distrito Sanitário II: Microrregião 2.2 - bairros de Água Fria e Alto Santa Terezinha: manual de operacionalização. Recife, 2002.

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

REY, L. Filariose Linfática. In: ____ **Bases da Parasitologia Médica**. 3º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, p. 280- 293.

ROCHA, E.M.M.; FONTES, G. DIAGNOSTICO DA FILARIOSE LINFÁTICA BANCROFTIANA. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, BR, v. 29, n. 2, abr. 2007.

ROCHA, A. (2004) Filariose bancroftiana: **Avaliação dos testes de diagnóstico disponíveis frente às diversas formas clínicas da Bancroftose**. 2004. Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

ROCHA, A.; BRAGA, C.; BELEM, M. et al. Comparison of tests for the detection of circulating filarial antigen (Og4C3-ELISA and AD12-ICT) and ultrasound in diagnosis of lymphatic filariasis in individuals with microfilariae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, BR, v. 104, n. 4, p. 621–625, 2009.

ROCHA, A. et al. Programa de controle e eliminação da Filariose Linfática: uma parceria da Secretaria de saúde de Olinda-PE, Brasil, com o Serviço de Referência Nacional em Filariose. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, BR, v. 39, p. 233-249, 2010.

SANTOS, Z. C. **Tratamento coletivo da filariose com dose Única de dietilcarbamazina em residentes de área endêmica do Recife, Pernambuco: Um estudo antes e depois.** 2005, 68p. Dissertação de Mestrado (Curso de Mestrado Profissional em Vigilância sobre Saúde do Departamento de Medicina Social da Universidade de Pernambuco) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2005.

SILVA, E.C.B.F.; SILVA, M.A.L.; OLIVEIRA, P.A.S. Filariose Linfática: avanços e perspectivas do diagnóstico laboratorial: revisão. **RBAC**, Rio de Janeiro, BR, v. 40, p. 177-181, 2008.

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

SOUZA, P.F.A. **Monitoramento da infecção filarial por *Wuchereria bancrofti* através da cinética de anticorpos com o antígeno recombinante Bm14, em áreas endêmicas da RMR-PE submetidas ao tratamento coletivo para filariose.** 2012, 77p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife Pernambuco, 2012.

STEEL, C.; KUBOFCIK, J.; OTTESEN, E. A.; NUTMAN, T. B. Antibody to the Filarial Antigen Wb123 Reflects Reduced Transmission and Decreased Exposure in Children Born following Single Mass Drug Administration (MDA). **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, US, v. 6, p. 1940, 2012.

THANOMSUB, B.W.; CHANSIRI, K.; SARATAPHAN, N.; PHANTANA, S. Differential diagnosis of human lymphatic filariasis using PCR-RFLP. **Mol Cell Probes**, London, GB, v. 4, n. 1, p. 41-6, Feb 2000.

TROPBIO Pty. Ltd. ELISA Kit for Detecting and Quantifying *Wuchereria bancrofti* Antigen; Cellabs Pty. Ltd.: Brookvale, NSW, Australia, 2014.

WEIL, G.J.; LAMMIE, P.J.; WEISS, N. The ICT Filariasis Test: A rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis. **Parasitol Today**, Amsterdam, UK, v. 13,n. 10, p. 401-404, Oct 1997.

WEIL, G. J. et al. A longitudinal study of bancroftian filariasis in the Nile delta of Egypt: Baseline data and one year follow-up. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, US, v. 61, p. 53-58, 1999.

WEIL, G.J et al. A multicenter evaluation of a new antibody test kit for lymphatic filariasis employing recombinant *Brugia malayi* antigen Bm-14. **Acta Trop**, Basel, CH, v. 120, n. 1, p.19-22, 2011.

WILLIAMS, S.A. et al. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* in blood samples from French Polynesia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, London, GB, v. 90, n. 4, p. 384-7, 1996.

WITT, C.; OTTESEN, E.A. Lymphatic filariasis: an infection of childhood. **Tropical medicine and international health**, Oxford, GB, v. 6, p. 582-606, 2001.

APENDICES

APENDICE A – Comprovante de envio do artigo 1.

11/02/2018

Successfully received: submission Evaluation of ... - Paula Fernanda Alcantara

Successfully received: submission Evaluation of Filarial Detect™ IgG4 ELISA System produced with the recombinant Wb123 antigen for the diagnosis of Lymphatic Filariasis in endemic area of Brazil for Acta Tropica

Acta Tropica <EviseSupport@elsevier.com>

sex 09/02/2018 17:41

Para: Paula Fernanda Alcantara <pfalcantara@cpqam.fiocruz.br>;

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: ACTROP_2018_151

Title: Evaluation of Filarial Detect™ IgG4 ELISA System produced with the recombinant Wb123 antigen for the diagnosis of Lymphatic Filariasis in endemic area of Brazil

Journal: Acta Tropica

Dear Ms. Alcântara de Souza Melo,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Acta Tropica. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=ACTROP and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

APENDICE B–Evaluation of *Filaria Detect*TM IgG4 ELISA System produced with the recombinant Wb123 antigen for the diagnosis of Lymphatic Filariasis in an endemic region of Brazil

ACTA TROPICA (ISSN 0001-706X)

Paula Fernanda A. S. Melo^{a,b*}, Maria Almerice L. Silva^b, Maria Rosângela G. Oliveira^b, Josué Araújo^b, Amanda Fernandes^b, George Tadeu N. Diniz^d, Eduardo Brandão^b, Maria Amélia Maciel^a, Abraham Rocha^{b,c}

^a Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.

^b Instituto Aggeu Magalhães, Departamento de Parasitologia / Serviço de Referência Nacional em Filarioses (IAM/SRNF) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Av. Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.

^c Laboratório do Hospital Otávio de Freitas, Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, R. Aprígio Guimarães, s/n, Tejipió, Recife - PE, Brasil.

^d Instituto Aggeu Magalhães, Núcleo de Saúde Coletiva (IAM/NESC) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Av. Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.

* Correspondência

E-mail: pfalcantara@cpqam.fiocruz.br (Paula Alcântara)

ABSTRACT

According to recommendations of the World Health Organization, research for Lymphatic Filariasis (LF) in endemic areas that have adhered to the Global Plan for Elimination should be conducted through the detection of Circulating Filarial Antigen (CFA), which despite of having a high capacity to recognize antigens of adult worms, failure to recognize the infection early. Faced with this limitation, further studies based on antibodies specific for infective larvae (L₃) may be more suitable, since these antibodies are detectable earlier than the presence of CFA. In this perspective a new immunosorbent assay was produce a by the INBIOS International Inc.; the "*Filaria Detect*TM IgG4 ELISA System" (ELISA-Wb123). This test, so far used only par he research, use recombinant antigen "Wb123" to detect exposure to L₃ of *W. bancrofti*. The manufacturer does not establish a pattern for to the cut-off and recommends endemic countries where it is applied, be defined a cut-off, with the region

samples, giving improved accuracy of the results. In this study the point of cut was defined and evaluated the accuracy of the ELISA-Wb123 test in samples of endemic areas of Brazil, using curve ROC (Receiver Operator Characteristic). For the analysis 256 serological samples were selected, included infected and uninfected for *W. bancrofti* after construction and analysis of curve ROC, cut-off of the optics density for the ELISA-Wb123 for Brazilian samples was definite in 0,239.

Keywords: Lymphatic Filariasis; cutoff; antibodies; *Wuchereria bancrofti*.

1. BACKGROUND

Lymphatic Filariasis (LF) is an endemic disease in tropical and subtropical regions that affects approximately 120 million people. Of these, about 25 million males have urogenital alterations, hydrocele being the most common manifestation. 15 million, mainly females, have lymphedema or elephantiasis of the legs (WHO, 2017). This disease has as etiological agents helminths of the species *Brugia malayi*, *Brugia timori* and *Wuchereria bancrofti* (ADDISS; BRADY, 2007). Although not lethal disease, LF was considered by the World Health Organization (WHO) as one of the main worldwide causes of permanent and long-term disability, with a psychosocial and economic repercussion for its patients (ADDISS; BRADY, 2007; WHO, 2017).

In 1997, WHO considered LF as one of six potentially eradicable infectious diseases, determining through Resolution WHA 50.29 targets for the global elimination of LF by 2020 (WHO, 1997; FREITAS et al., 2008). WHO launched the Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis (GPELF) in 2000. The GPELF aims to interrupt transmission of LF using periodic, repeated mass drug administration (MDA) of antifilarial medications to entire at-risk populations. To date, MDA has achieved global coverage of about 6.7 billion treatments, out of 66 of the 72 countries where LF is endemic. About 20 countries have already completed the five MDA rounds and began post-AMM surveillance to verify that elimination (WHO, 2017). The rapid and significant expansion of GPELF increased the need for monitoring and surveillance to assess interruption of transmission in these areas (STEEL et al., 2013).

According to WHO recommendations surveillance of post AMM areas should be conducted through the detection of filarial circulating antigens (CFA) using an immunochromatographic test (WHO, 2015). This test has a high capacity to recognize antigens from adult worms, but fails to recognize early infection (STEEL et al., 2013). On this

limitation, specific antibody-based testing can be suitable because the antibodies may be detectable earlier than the ACF (RAMZY et al., 2006, HAMLIN et al., 2012). Several recombinant antigens for antibody screening have been described in the literature: BmR1 e BmSXP, WbSXP-1 e Bm33 (ABDUL et al., 2007; KRUSHNÁ et al., 2009; PANDIARAJA et al., 2010). However, the low specificity of the tests in the areas where filarides coexist has driven the development of new recombinant antigens (STEEL et al., 2013).

A new assay based IgG4 immunoassays utilizing recombinant antigens from the L₃ infective larvae of *W. bancrofti* (Wb123) was made by Inbios Internatonal, Inc. Until now only used for research, the test can serve as an early marker of filarial exposure (KUBOFCIK; FINK; NUTMAN, 2012; STEEL et al., 2013, 2015, INBIOS, 2015). To improve the performance of the test, the manufacturer recommends to establish the cutoff in the endemic countries through of their banks of positive and negative serological samples for LF (DE SOUZA et al., 2017; INBIOS, 2015).

Brazil became a signatory of PGEFL in 1997, elaborating the National Program for the Elimination of Lymphatic Filariasis (NPELF), whose activities were supported by Resolution 190/96 of the National Health Council (MS, 1997). In Brasil, LF has as its etiological agent the helminth *W. bancrofti*. This disease is a problem public health in Metropolitan Region of Recife, at Pernambuco state, na (RMR), which includes the cities of Recife, Olinda, Jaboatão dos Guararapes e Paulista. This area is only endemic area for LF in the country (FONTES et al., 2012, ZUCHI et al., 2017). In these cities, some locations that had high prevalence rates in the past have completed their fifth round of MDA and need a reevaluation to determine the actual status of local transmission. On this need and considering the recommendations of the test manufacturer *Filaria Detect*TM IgG4 ELISA System (InBios Internatonal, Inc.), this study proposed to determinate the cut-off and to evaluate the accuracy of the test in samples from endemic areas of Brazil, establishing with more precision the positive and negative results.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Study Design

Was conducted a study of evaluation of diagnostic test to verify the performance of the *Filaria Detect*TM IgG4 (INBIOS) ELISA System, detection of antibodies to LF through

recombinant antigen Wb123, serological samples obtained from residents in endemic areas of Brazil (BRAZIL, 2014).

2.2 Serum Specimens

Was selected 256 sera from the biological samples database of the National Reference Service in Filarioses (NRSF) of the Aggeu Magalhães Institute (IAM) / Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), in Pernambuco, stored at -30 ° C. Samples were classified into two groups according to infection status and their origin:

Grup I – microfilaremic / individuals with microfilariae (positive) e Grup II - amicrofilaremic / individuals without microfilariae (negative). Of the total of the samples studied, 79 (30.9%) belonged to Group I (microfilaremic patients) living in endemic areas; and 177 belonged to Group II, consisting of amicrofilaremic patients residing in endemic areas, considered as endemic normal and amicrofilaremic patients residing in non-endemic areas.

Both groups were evaluated in relation to microfilaremia, through the Polycarbonate Membrane Filtration (PMF), the Circulating Filarial Antigen (CFA), through the Og4C3-ELISA test, the anti-Bm14 antibody, and the Lymphatic Filariasis Bm14 Antibody (CELISA test), and to anti-Wb123 with the *Filaria Detect*TM IgG4 ELISA System. Group II, "particularly the normal endemic ones", was submitted to imaging according to Amaral et al. (1994), where the presence of adult worms was not visualized through the "filarial dance" (AMARAL et al., 1994; DREYER et al., 1996; ROCHA et al., 2009).

2.3 Laboratory procedures

Polycarbonate Membrane Filtration (PMF): performed according to the technique described by ROCHA et al. (2004) being considered positive the individuals who presented microfilarias in the samples of peripheral blood. This technique was defined as the gold standard for the analysis of the Receiver Operator Characteristic (ROC) curve.

Og4C3-ELISA Test: was performed as recommended by the manufacturer TropBioTM Og4C3 Filariasis Antigen ELISA test (Cellabs Pty Ltd., New South Wales, Australia). Samples with an antigen concentration ≥ 128 antigen units (AU) were interpreted as positive (MORE; COPEMAN, 1990, ROCHA et al., 1996; PION et al., 2016).

Lymphatic Test Filariasis Bm14 Antibody - CELISA: was performed as recommended by the manufacturer (Cellabs Pty Ltd. - Brookvale, Queensland, Australia). Serum samples from non-endemic areas for LF, known to be uninfected, were included in the plates to determine the cut-off according to manufacturer's guidelines [mean obtained with the OD of non-endemic sera added to 3x the standard deviation]. ODs greater than or equal to cut-off

were considered positive for Bm14CELISA (LAMMIE, et al., 2004; WEIL et al., 2011; MASSON, et al., 2017).

Antibody search for Wb123: was performed with the kit "Filaria *Detect*TM IgG4 ELISA System" according to the instructions of the manufacturer Inbios International, Inc. (InBios, 2015). The ODs were read in an ELISA reader (Thermo Scientific Multiskan FC spectrophotometer, Thermo Fischer Scientific) with a wavelength of 450nm.

From the ODs of Wb123 the ROC curve was constructed with reference to the microfilariae count by PMF (gold standard) to determine the sensitivity and specificity, positive predictive value (NPV) and negative predictive value (PPV), likelihood ratio (Likelihood ratio LR + and LR-) using the selected samples. The likelihood ratio > 1 indicates that the test result is associated with the presence of the infection, whereas a likelihood ratio <1 indicates that the test result is associated with absence of infection (DEEKS; ALTMAN, 2004).

2.4 Data analysis

The ROC curve was used both to define the infection status through the cut-off point determination, as well as to determine the sensitivity, specificity, predictive values (positive, negative) and area under the curve which represents the accuracy of the predictions (ZHOU, OBUCHOWSKI, McCLISH, 2002; MARTINEZ et al., 2003).

In a second step the results of the categorized tests (positive / negative) for Og4C3-ELISA, CELISA-Bm14 (according to manufacturer) and for ELISA-Wb123 (categorized based on median OD values of 0.07, being positive - OD equal to or greater than 0.07 and negative - OD less than 0.07); were used to construct a "Latent Class - LC" variable using the Latent Class Analysis (LCA) approach.

For LCA, the three techniques (Og4C3-ELISA, Bm14-ELISA and Wb123-ELISA) were used in the creation of the latent variable "LC" according to the probability that each one has in detecting positive or negative samples (RINDSKOPF, 1986, 2002). The "Latent Class - LC" model belongs to a family of statistical procedures: Model of Structural Equations (ESM), which works with latent variables that represent phenomena that are not observed or directly measured (BOLLEN; CURRAN, 2005; COLLINS; LANZA, 2010; DUCAN et al., 2011; KLINE, 2011).

The LC was then created without using the gold standard, ie: PMF, and later used as a parameter to construct a second ROC curve for ELISA-WB123, these curves being evaluated and compared to each other.

The statistical program MedCalc v. 9.2 was used to create the ROC curve and the R v. 3.3.2 was used to create the latent variable and the other analyzes (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016).

2.5 Ethical considerations

This study was approved by the research ethics committee of the IAM / FIOCRUZ of Pernambuco (CAEE: 47227015.9.0000.5190).

3 RESULTS

Considering as reference test PMF, the microfilariae count had a total of 79 (31%) positive and 177 (69%) negative individuals. Among the 177 individuals, 74 (41.8%) were endemic and 103 (58.2%) were non-endemic.

According to table 1, the DO's ranged from 0 to 4.5 and with very similar averages. The median for Wb123 was the lowest (0.07) than the other medians (0.13 and 0.12) for Og4C3 and Bm14 respectively. When stratifying by the presence of microfilariae, it was observed that in the negative group there was a reduction in the median of 0.01 for Wb123 and of 0.04 for Bm14.

Table 2 shows the ROC curve constructed for the Wb123-ELISA with reference to the gold standard (PMF), the OD absorbance value for the control group was 0,215 OD, with sensitivity and specificity 82.3% and 96.0% respectively. And the OD results stratified within the group into normal and non-endemic endemic were 0.214 OD and 0.288 OD respectively.

For the variable "Latent Class - LC", similar to the classification found according to the microfilariae count, it was observed that 79 (30.9%) of the samples were positive and 177 (69.1%) were negative. Table 3 shows similar percentages of sensitivity and specificity when comparing the previously defined results used for the construction of LC (according to manufacturer Og4C3 / Bm14 and median Wb123) X the results obtained with the ROC curve for each of the tests by the gold standard (counting microfilariae). The low specificity (69.49%) presented by the Wb123 test is due to the use of the cut-off point of 0.07 (median). Based on the analysis of the "LC" for Wb123 it was observed that the probability of finding a sample properly classified as positive was close to 1.00 (0.937).

The optimized positivity limit for cut-off point of OD of ELISA- Wb123 was identified in > 0.239 OD, after analyzing the possibilities presented by the ROC curve (FMP). For the decision of the most balanced value in the definition of the OD bridge for Wb123, we considered: the cut-off value of negative samples, sensitivity and specificity; in combination with other parameters such as: PPV, NPV, LR +, LR- (Table 4). The results of Wb123 for the

ROC curve (PMF) showed Se 81.0%, Sp 96.6%, PPV 91.4%, NPV 91.9% e LR+ above 1 (23,9). Similar to the values we identified for the ROC curve of LC at the cut-off corresponding to OD > 0,240, with sensitivity 81.0%, specificity 96.6% (Table 4).

To verify the accuracy of the cut-off point adopted, both Wb123 curves were compared (ROC PMF and LC curves), showed an overlap between them and an area under the curve (AUC) of 0.96 with confidence interval (0.923 - 0.978) and statistical significance ($p < 0.01$) (Graph 1).

After analysis of the ROC, AUC and other precision measurements, the Optical Density cut-off point for the *Filaria Detect*TM IgG4 ELISA test was defined as 0.239 OD, considered the best possible optimization of the values for the test. With a capacity to identify 81.0% of positive results and 96.6% of negative results, the proportion of truly positive and negative individuals at 91.4% (PPV) and 91.9% (NPV) respectively, approximately 100% . And a positive likelihood ratio (LR +) of 23.90, that is, 23 times more likely among the positives to be identified by the Wb123 test.

4. DISCUSSION

As the PGEFL goes on to one of your immediate needs is a sensitive and specific diagnostic test for evaluation of potential transmission of parasites filariais (LIANG et al., 2008). The focus for the surveillance and monitoring tools have turned to the use of antibody tests that can detect exposure to infective larvae, functioning as "warning signs" about a possible potential for transmission in endemic areas that were treated (DAMGAARD et al., 2016).

The recombinant Antigen "Wb123" has been used in developing tests based on detection of filariais antibodies, being appointed as a marker of exposure to FL, able to identify exposure to infective larvae of *W. bancrofti* (KUBOFCIK; FINK; NUTMAN, 2012; WON et al., 2017). He was used by the company InBios to produce a new test the Filarial *Detect*TM IgG4 ELISA System (ELISA-Wb123), which, according to the manufacturer (InBios International, Inc.) requires that each geographical area, where it is used, set on the basis of samples of your region the value of appropriate court, through the construction of the ROC curve (Receiver Operating Characteristic), there is no standardized test cut-off value (INBIOS, 2015).

In this study the ELISA-Wb123 was evaluated and also the measures of accuracy found for him, in order to establish the ideal cut point of optical density (OD) to be used in Brazil, in the definition of positives and negatives. Brazilian samples, taking into account the

recommendations of the manufacturer, a ROC curve was built, taking as a reference test to PMF "gold standard" and a second curve based on the LCA model by LC, was built next to check out greater precision to results.

According to MOREIRA (2012) of greater accuracy of the test is that situated farther from the diagonal line on the graph of the ROC curve. However, the adoption of the cutoff point for defining the positivity or negativity must consider the speed of evolution of the pathology or your risk. In addition, according to Greiner, Pfeiffer, Smith (2000), Hajian-Tilaki et al (2013) the ROC curve in combination with other values of accuracy of a test (If, Es, AUC, LR +, LR-), allow you to optimize the ideal cut point decision. Based on these information, although the cut-off for the ELISA-Wb123 has been identified by ROC curve in 0.215 (control group), after joint analysis of the other parameters the cutting bridge optical density set was to 0.239 samples of our region.

Steel et al. (2013), also used the ROC curve to define the cutting point of ELISA-Wb123 using 95 samples of infected and non-infected with 289 *W. bancrofti* (with and without other helmínticas infections), the cut-off set based on your sample database was the 2.5, and ES above 90%. However, for this cut-off value, of 289 uninfected, seven individuals were false-negatives and nine false positives, all false positives they were infected with the *O. volvulos*.

The value found by Steel et al. (2013) is far superior to that found in this work, however, we cannot make any kind of judgment, as are scarce jobs that report using the ROC curve for the ELISA-Wb123 and the values defined as cut-off to the optical densities. Those that are available do not provide sufficient data so that we can have a parameter in relation to definition of the ideal cut point to be chosen. Another difficulty is that these works were not carried out in Brazil or Brazilian samples were used, took place in different endemic regions where the prevalence for LF and the characteristics of the population and the parasites are different (STEEL et al., 2013; 2015; DE SOUZA et al., 2017; WON et al. 2017).

The ROC curve technique has been widely used in clinical epidemiology to assess the ability of diagnostic markers (e.g. serologic) and accuracy indices derived from the ROC curve as for example: the area under the curve "AUC", is not distorted by fluctuations caused by the use of decision criteria or cuts arbitrarily chosen. The AUC determines the inherent ability of the test to discriminate between sick and healthy populations when AUC = 1 reflects the potential for diagnostic testing to be perfect in differentiating between patient and non-patient, What happens when the distribution of patient results and not sick does not override (KUMMAR; INDRAYAN, 2011; HAJIAN-TILAKI, et al., 2013). We found for the ROC

curve of ELISA-Wb123 an AUC significantly high (AUC 0.96, $P < 0.01$), demonstrating the potential of the test (ELISA-Wb123) to discriminate positive and negative individuals.

Attallah et al. (2013) find a similar AUC value to ours by searching for a new ELISA based on *Fasciola gigantica* antigens: "the FgCA-27 ELISA", finding high degrees of sensitivity, specificity and AUC 0.961, $P < 0.0001$. This led them to conclude that the FgCA-27 ELISA was able to identify the 27 kDa *Fasciola* antigen in infected, highly sensitive and specific serum in laboratory diagnosis of human fascioliasis (ATTALLAH et al., 2013).

Second Florkowski (2008) the ROC curve graphically shows the "trade-off" between sensitivity and specificity and is useful to assign the best cut for use in the diagnosis and the AUC sets the test's ability to detect the true-positive and the true-negative, representing the accuracy of the test, this precision provides a useful parameter to check the performance of a test.

The methodology applied in calculation of the ROC curve to define the ideal cut point for the test aimed to ensure that performance measures obtained were accurate, unbiased, properly estimated and presented. The values of Sensibilidade and specificity, combined the AUC define the validity inherent in the diagnostic test (KUMMAR; INDRAYAN, 2011; HAJIAN-TILAKI et al., 2013).

Conventional analyzes consider the sensitivity and specificity of a diagnostic test as the main index of accuracy, however, the use of both alone as precision measurements is problematic, since these measurements depend on the cut-off point for the positivity chosen. The analysis of the ROC circumvents this arbitrariness (HAJIAN-TILAKI, et al., 2013). According to Greiner, Pfeiffer, Smith (2000), all possible combinations of sensitivity and specificity that can be achieved by changing the cutoff value of the test and can be summarized using a single parameter; the area under the ROC curve.

In this study, the increase in the value of the sensitivity of the ELISA-Wb123 would lead to a very big reduction in the value of the. And if it were a cut above the point that the set would be a reduction in sensitivity to 73%.

The predictive positive and negative values found for the ELISA-Wb123 were high, 91.4% and 91.9% respectively, the PPV represents the potential proportion of positive results that are true positives, while the NPV represents the proportion of negative results are negative real (DEEKS; ALTMAN 2004; FLORKOWSKI, 2008). Similar to our values Steel et al. (2013) also found predictive values superior to 90% for ELISA-Wb123, according to these authors, these high values are beneficial in the population analysis of endemic areas to FL after treatment, providing necessary information about the sampling size to search

properly the population and serving to map areas where the prevalence of *W. bancrofti* is unknown, given the relatively high yield, low cost and quick response time from the test.

The Likelihood values obtained in this study for ELISA-Wb123 with cutoff 0.239 were for LR + greater than 1 (23.9) and for LR- less than 1 (0.2). According to Deeks and Altman (2004) likelihood ratios like "Likelihood ratios" are alternative statistics to summarize the diagnostic accuracy, possessing several particularly powerful properties that make them more useful than other statistics. Capable of reflecting the amount of times more (or less) than patients with the disease should have that specific outcome than patients without the disease. Thus with the 0.239 cutoff established for ELISA-Wb123 there are 23 times more chances of positive results for the Wb123 antigen to be identified by the test. The higher the LR +, the more information the test brings and when the LR- is close to zero, it brings more information from a negative test (HAJIAN-TILAKI, et al., 2013).

Although some measures of accuracy/performance of diagnostic tests are not intrinsic properties of it and depend on the clinical context in which they are employed (FLORKOWSKI, 2008). The analysis applied to the technique of the ROC curve to define the ideal cut point for the test aimed to ensure that performance measures obtained were accurate, unbiased, properly estimated and presented. These combined values, mainly the AUC confirm the validity of the cutoff selected for ELISA-Wb123 (KUMMAR; INDRAYAN, 2011; HAJIAN-TILAKI, et al., 2013).

5. CONCLUSION

The cut-off of optical density in 0.239 to ELISA-Wb123 took into account the ROC curve and the values obtained for themselves, Es, VPP, VPN, LR +, LR-AUC, representing the best balance of performance of the test. In agreement to the values of greater than or equal to 0.239 as positive and the less negative to ELISA 0.239-Wb123 made in our country, the ELISA-Wb123 was able to safely determine infected / positive and non-infected / negative for Wb123 antigen in serological samples from our country that will be researched with *Filaria Detect*TM IgG4 ELISA, confirming its potential as a serological tool.

The cut-off defined values for the samples can be used for National Plans and Programmes for the Elimination of LF in the areas where the Elisa-Wb123 will be used.

Author's contributions

P.F. carried out the experiment and wrote the manuscript with support from R.A, M.A.M, B.E. M;A;L; provided support for laboratory work M.A.L, M.R., J.A., A.F;

contributed with the statistical analysis G.T. All the authors contributed to the review, reading and approval of the article.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This research was funded by the Oswaldo Cruz Foundation / Foundation for Technological Development in Health-Vice-President for Research and Referral Laboratories (Fiocruz/FIOTEC) VPPLR-15-2-2-30 Project.

References

- ABDUL, R.R.; HWEN-YEE, C.; NOORDIN, R. Pan LF-ELISA using BmR1 and BmSXP recombinant antigens for detection of lymphatic filariasis. *Filaria Journal*. London, GM, v. 6, n. 10, 2007.
- ADDISS, D.G.; BRADY, M.A. Morbidity management in the Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: a review of the scientific literature. *Filaria Journal*. London, GM, v. 6, n. 2, 2007.
- AMARAL, F.; DREYER, G.; FIGUEREDO-SILVA, J.; NOROES, J.; CAVALCANTI, A.; SAMICO, S.C.; SANTOS, A.; COUTINHO, A. Adult worms detected by ultrassomography in human bancroftian filariasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, US, v. 50, p.753-757, 1994.
- ATTALLAH, A.M.; BUGHDADI, F.A.; EL-SHAZLY, A.M.; ISMAIL, H. Immunodetection of *Fasciola gigantica* Circulating Antigen in Sera of Infected Individuals for Laboratory Diagnosis of Human Fascioliasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, Washington, US, v. 20, n.10, p. 1569-1577, 2013.
- BOLLEN, K. A. ;CURRAN, P. J. (2005). Multivariate Latent Curve Models, in *Latent Curve Models: A Structural Equation Perspective*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/0471746096.ch7
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Coordenação-Geral de Gestão do Conhecimento. Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de estudos de acurácia diagnóstica. Brasília, 2014. 115 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação do Controle de Doenças Transmissíveis por Vetores, Gerência de Endemias Focais. Brasil: Fundação Nacional de Saúde; 1997. Programa de Eliminação da Filariose linfática do Brasil. Brasília (DF), 1997.

COLLINS, L. M.; LANZA, S. T. (2009). General Introduction, in *Latent Class and Latent Transition Analysis: With Applications in the Social, Behavioral, and Health Sciences*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9780470567333.ch1

DAMGAARD, J. et al. Assessing drivers of the IgG4 antibody reactivity to recombinant antigen Bm14 in *Wuchereria bancrofti* endemic populations in East Africa. *Acta Tropica*, Netherlands, v.161, p. 26-32, 2016.

DE SOUZA, DK et al., An evaluation of Wb123 antibody elisa in individuals treated with ivermectin and albendazole, and implementation challenges in Africa *The Pan African Medical Journal*, p 27-65, 2017.

DEEKS, J.J.; ALTMAN, D.G. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *British medical journal*. London, GM, v. 3, n.29, p.168-9, 2004.

DREYER, G. et al. Studies on the periodicity and intravascular distribution of *Wuchereria bancrofti* microfilariae in paired samples of capillary and venous blood from Recife. Brazil. *Trop Med Int Health*, v. 1, p. 264-272, 1996.

FLORKOWSKI, C.M. Sensitivity, specificity, receiver-operating characteristic (ROC) curves and likelihood ratios: communicating the performance of diagnostic tests. *Clin Biochem Rev*. Austrália, AU, v. 29, p.83-7, 2008.

FONTES, G. et al. Lymphatic filariasis in Brazil: epidemiological situation and outlook for elimination. *Parasites & Vectors*. London, GB, v. 5, n. 272.

FREITAS, H.; VIEIRA, J. B.; BRAUN R.; MEDEIROS. Z.; ROCHA, E. M. M.; AGUIAR-SANTOS, A.; FRAIHA, H.; ROCHA, A. RELATÓRIO: Workshop para avaliação da situação epidemiológica da filariose linfática no Município de Belém, Pará, norte do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Brasília, BR, v. 41, p. 212-21, 2008.

GREINER, M.; PFEIFFER, D.; SMITH, R.D. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med*. Amsterdam, NL, v. 30, n.45, p. 23-41, 2000.

HAJIAN-TILAKI, K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian Journal of Internal Medicine*. Iran, IR, v. 4, n. 2, p. 627-635, 2013

HAMLIN, K.L. et al.. Longitudinal monitoring of the development of antifilarial antibodies and acquisition of *Wuchereria bancrofti* in a highly endemic area of Haiti. *PLoS Negl Trop Dis*., v. 6, n. 12, e1941, 2012.

INBIOS. *Filaria Detect™ IgG ELISA*. www.inbioscom. Seattle, WA 98104 USA: InBios International, Inc.; 2015.

KLINE, R.B. (2011). *Principles and practice of structural equation modeling*. New York, NY: Guilford.

- KUBOFCIK, J.; FINK, D.L.; NUTMAN, T.B. Identification of Wb123 as an Early and Specific Marker of *Wuchereria bancrofti* Infection. *PLoS Negl Trop Dis*, San Francisco, US, v.6, n. 12, e1930, 2012.
- KUMAR, R.; INDRAYAN, A. Receiver operating characteristic (ROC) curve for medical researchers. *Indian Pediatr*. New Delhi, IN, v.48, n. 4, p 277-87, 2011.
- LAMMIE, P.J. et al. Recombinant antigen-based antibody assays for diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis-a multicenter trial. *Filaria Journal*. London, GB, v. 3, p.1-5, 2004.
- LIANG, J.L. et al. Impact of five annual rounds of mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on *Wuchereria bancrofti* infection in American Samoa. *Am J Trop Med Hyg*, v. 78, n. 6, p. 924-8, Junho 2008.
- MARTINEZ, E.Z. et al. A curva Roc para Testes Diagnósticos. *Caderno de Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 7-31, 2003.
- MASSON, J. et al. Relative Performance and Predictive Values of Plasma and Dried Blood Spots with Filter Paper Sampling Techniques and Dilutions of the Lymphatic Filariasis Og4C3 Antigen ELISA for Samples from Myanmar. *Trop. Med. Infect. Dis*, v. 2, n. 7, 2017.
- MOREIRA, W.B. Artigos sobre testes diagnósticos. In: *Leitura Crítica de Artigos Científicos*. Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica, Belo Horizonte, BR, p. 83 – 89, 2016. Disponível em: < <https://www.sboc.org.br/leitura-critica-de-artigos-cientificos/>>. Acesso: 21 Nov. 2017.
- MORE, S.J.; COPEMAN, D.B. A highly specific and sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating antigen in bancroftian filariasis. *Trop Med Parasitol*, v. 41, p. 403-406, 1990.
- PION, S.D.; MONTAVON, C.; CHESNAIS, C.B. et al. Positivity of Antigen Tests Used for Diagnosis of Lymphatic Filariasis in Individuals Without *Wuchereria bancrofti* Infection But with High *Loa loa* Microfilaremia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Baltimore, US, v. 95, n. 6, p1417-1423. 2016.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2014). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- RAMZY, R.M. et al. Effect of yearly mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on bancroftian filariasis in Egypt: a comprehensive assessment. *Lancet*. London, GB, v. 25, n. 367, p. 992-9, 2006.
- RINDSKOPF, D.; RINDSKOPF, W. The value of latent class analysis in medical diagnosis. *Stat Med*. Chichester, US, v. 5, n. 1, p. 21-7, 1986.
- RINDSKOPF, D. Infinite Parameter Estimates in Logistic Regression: Opportunities, Not Problems. *Journal of Educational and Behavioral Statistics*. New York, US, v, 27, n. 2, p. 147-161, 2002.

ROCHA, A. et al. Evaluation of the Og4C3 ELISA in *Wuchereria bancrofti* infection: infected persons with undetectable or ultra-low microfilarial densities. *Trop Med Int Health*. Oxford, GB, v, 1, p.859-864, 1996.

ROCHA, A. (2004) Filariose bancroftiana: Avaliação dos testes de diagnóstico disponíveis frente às diversas formas clínicas da Bancroftose. 2004. Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

ROCHA, A.; BRAGA, C.; BELEM, M. et al. Comparison of tests for the detection of circulating filarial antigen (Og4C3-ELISA and AD12-ICT) and ultrasound in diagnosis of lymphatic filariasis in individuals with microfilariae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, BR, v. 104, n. 4, p. 621–625, 2009.

STEEL, C. et al. Rapid *Wuchereria bancrofti*-specific antigen Wb123-based IgG4 immunoassays as tools for surveillance following mass drug administration programs on lymphatic filariasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 20, n. 8, p. 1155-6110, 2013.

STEEL, C. et al. Rapid Point-of-Contact Tool for Mapping and Integrated Surveillance of *Wuchereria bancrofti* and *Onchocerca volvulus* Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 22, n. 8, August 2015

WEIL, G.J et al. A multicenter evaluation of a new antibody test kit for lymphatic filariasis employing recombinant *Brugia malayi* antigen Bm-14. *Acta Trop*. Amsterdam, NL, v. 120, n. 1, p.19-22, 2011.

WHO, 2015. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2015. *Weekly epidemiological record*. Geneva, SW, v. 39, n, 91, p. 441-460, 2015.

WHO, 2017. Validation of elimination of lymphatic filariasis as a public health problem. Geneva, SW, 2017, 24p.

WON, K.Y et al. Use of Antibody Tools to Provide Serologic Evidence of Elimination of Lymphatic Filariasis in The Gambia. *Am J Trop Med Hyg*, v. 98, n. 1, p. 15-20, Jan 2018.

ZHOU, XIAO-HUA; MCCLISH, D.K.; OBUCHOWSKI, N.A. (2002). *Statistical Methods in Diagnostic Medicine*. Hoboken, NJ: Wiley.

ZUCHI, A. et al. Screening and evaluation of lymphatic filariasis in immigrants from endemic countries residing in a focus where it is considered eliminated in the Southern Region of Brazil: A risk of reemergence? *Acta Trop*. Amsterdam, NL, v. 176, p. 192-196, 2017.

Table 1 – Optical Density (OD) values of all patients and stratified by the positivity for microfilariae counting.

	OD's			OD's stratified by Microfilaremia (+/-)					
	Wb 123	Og4c3	Bm14	Wb 123		Og4c3		Bm14	
				+	-	+	-	+	-
N	256	256	256	79	177	79	177	79	177
Min	0.047	0.000	0.017	0.055	0.047	0.238	0.000	0.082	0.017
Max	4.395	2.957	4.449	4.395	0.676	2.957	0.328	4.449	2.268
Mean	0.780	0.600	0.770	2.350	0.080	1.680	0.120	2.110	0.180
Median	0.070	0.130	0.120	2.800	0.060	1.770	0.120	2.410	0.080
Desviation	1.400	0.840	1.060	1.670	0.080	0.780	0.040	0.900	0.300

Table 2 – Accuracy of the cut-off points obtained in the gold standard Wb123 curve (PMF).

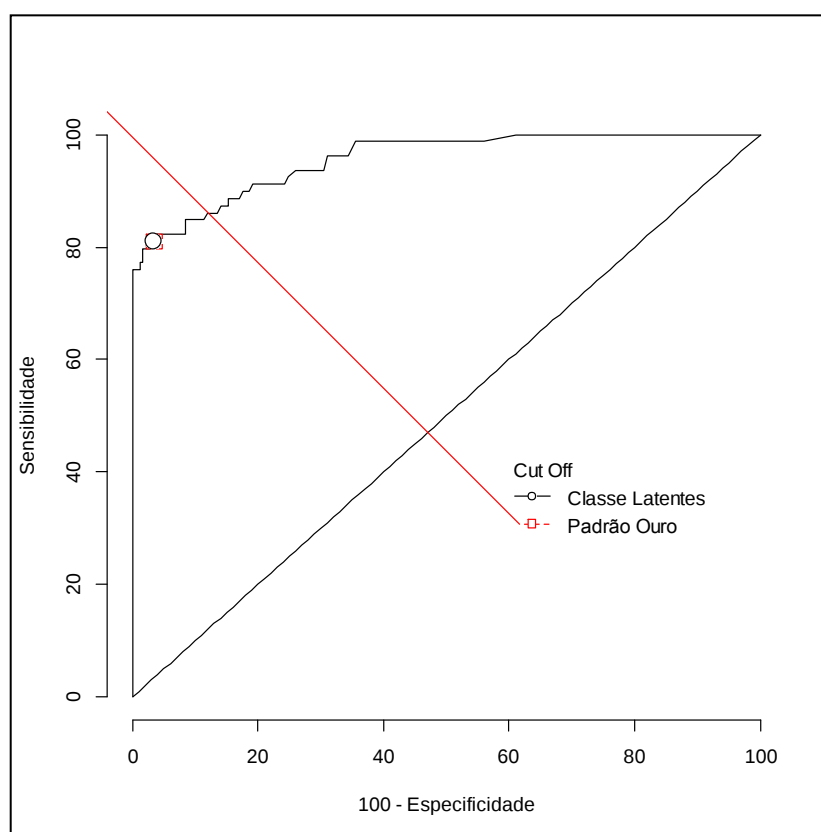
Group	Cut-off	Se	95% IC	Sp	95% IC	+LR	-LR
Grup II	> 0.215	82.28	72.1 - 90.0	96.05	92.0 - 98.4	20.80	0.18
Control - (Non endemic área)	> 0.214	82.28	72.1 - 90.0	98.06	93.1 - 99.7	42.37	0.18
Controle - (Normal endemic)	> 0.288	79.75	69.2 - 88.0	97.30	90.6 - 99.6	29.51	0.21

Table 3 – Sensitivity and specificity observed using the positive and negative identification data and the values obtained using the ROC curve for the Wb123, Og4C3 and Bm14 tests among the samples had been infected and not infected with *W. bancrofti*.

	Test		Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI
TEST	Bm14 (+/-)		96.2	89.4 - 98.7	93.2	88.5 - 96.0
	Wb123 (Median +/-)	>0.071	93.6	86.0 - 97.2	69.4	62.3 - 75.8
	Og4c3 (+/-)		100.0	95.3 - 100.0	98.3	95.1 - 99.4
PMF	Bm14 Roc	>0.511	96.2	89.3 - 99.2	93.2	88.5 - 96.4
	Wb123 Roc	>0.215	82.2	72.1 - 90.0	96.0	92.0 - 98.4
	Og4c3 Roc	>0.220	100.0	95.4 - 100.0	98.3	95.1 - 99.6

Table 4 – Performance test results for ROC curve PMF (gold standard) and ROC curve LC, cut-off optimized.

	Curve ROC Wb123			
	PMF (gold standard)	95% CI	LC (Latent Class)	95% CI
OD	>0.239		>0.240	
Se	81.01	70.6 – 89.0	81.00	71.0 – 88.1
Sp	96.61	92.8 – 98.7	96.60	92.8 – 98.4
+LR	23.90	17.1 – 33.4	23.82	17.1 – 33.3
-LR	20.00	17.2 – 22.4	19.65	17.2 – 22.2
PPV	91.43	82.5 – 96.0	91.43	82.5 – 96.1
NPV	91.94	87.1 – 95.0	91.94	87.1 – 95.0

Gráfico 1 – ROC curves gold standard (FMP) and LC for Wb123.

APENDICE C - Comprovante de envio do artigo 2

11/02/2018

Successfully received: submission Comparative ev... - Paula Fernanda Alcantara

Successfully received: submission Comparative evaluation between microfilaremia, filarial antigen, Bm14 and Wb123 antibody for the monitoring of microfilaremic individuals submitted to mass treatment for lymphatic filariasis in an endemic area of Brazi...

Acta Tropica <EviseSupport@elsevier.com>

sex 09/02/2018 17:49

Para: Paula Fernanda Alcantara <pfalcantara@cpqam.fiocruz.br>;

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: ACTROP_2018_139

Title: Comparative evaluation between microfilaremia, filarial antigen, Bm14 and Wb123 antibody for the monitoring of microfilaremic individuals submitted to mass treatment for lymphatic filariasis in an endemic area of Brazil

Journal: Acta Tropica

Dear Ms. Alcantara de Souza Melo,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Acta Tropica. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?_afRNL_ACR=ACTROP and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

APENDICE D - Comparative evaluation between microfilaremia, filarial antigen, Bm14 and Wb123 antibody for the monitoring of microfilaremic individuals submitted to mass treatment for lymphatic filariasis in an endemic area of Brazil

ACTA TROPICAL (ISSN 0001-706X)

Paula Fernanda A. S. Melo^{a,b}, Maria Amélia Maciel^a, Eduardo Brandão^b, George Tadeu N. Diniz^d, Maria Almerice L. Silva^b, Maria Rosângela G. Oliveira^b, Josué Araújo^b, Amanda Fernandes^b, Abraham Rocha^{b,c}

^a Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

^b Instituto Aggeu Magalhães, Departamento de Parasitologia / Serviço de Referência Nacional em Filarioses (IAM/SRNF) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Av. Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.

^c Laboratório do Hospital Otávio de Freitas, Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, R. Aprígio Guimarães, s/n, Tejiptio, Recife - PE, Brasil.

^d Instituto Aggeu Magalhães, Núcleo de Saúde Coletiva (IAM/NESC) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Av. Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.

* Corresponding author.

E-mail address: pfalcantara@cpqam.fiocruz.br (Paula Alcântara)

ABSTRACT

To assess the impact of Mass Drug Administration (MDA) of Lymphatic Filariasis (LF), the World Organization of Health recommends conducting Transmission Assessment Survey (TAS) based on the detection of Circulating Filarial Antigens (CFA), which are limited to infections detection only after the development of adult parasites. Assays directed to antibodies, developed in response to infective larvae (L₃) have been proposed as an alternative since the appearance of antibodies in the blood occurs more quickly. A new immunoenzymatic assay (ELISA) for screening antifilarial antibodies from recombinant antigen of L₃ from *W. bancrofti* "Wb123" was produced by INBIOS International Inc. The ELISA-Wb123 is available only for research due to the need to know the behavior of anti-Wb123 antibodies over time and after repeated MDA. This study evaluated the main markers used for the monitoring and surveillance of LF in areas submitted to MDA, with emphasis on the detection of antibodies anti-Wb123 in microfilaremic individuals living in an endemic

area of Brazil. Analysis of the behavior of microfilaraemia, antigenaemia and anti-Bm14 and anti-WB123 antibodies allowed us to identify that the four markers showed a decreasing profile over time. However, for anti-Bm14 antibodies, this reduction profile is slow, with no significant difference at the end of the five rounds of MDA.

Keywords: Lymphatic Filariasis; diagnostic; antibodies; *Wuchereria bancrofti*

1. BACKGROUND

Lymphatic Filariasis (LF) is a parasitic disease that has as etiological agents helminths of the species *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and *Brugia timori* (WHO, 2015). Also known as elephantiasis in its chronic and symptomatic phase, it is a neglected tropical disease transmitted by mosquito vectors, which affects people of all ages and both sexes (WHO, 2016). Considered a potentially eliminable disease by the World Health Organization (WHO) that launched in 2000 the Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis (GPELF) aiming to eliminate LF in the world by 2020 (WHO, 2010).

One of the main strategies of the GPELF is the interruption of transmission, through the Mass Drug Administration (MDA) for all resident population in endemic areas, with the annual distribution of Diethylcarbamazine (DEC) for 4 to 6 years (WHO, 2010). To date, it is estimated that more than 550 million people have been treated, resulting in a new demand for elimination programs: the need to assess the impact of treatment to define transmission status in the area (WHO, 2015; Ramaiah; Ottesen, 2014; De Souza et al., 2017).

In order to evaluate the areas submitted to MDA, the WHO has recommended the implementation of Transmission Assessment Survey (TAS) based on the detection of Circulating Filarial Antigens (CFA) (WHO, 2015). However, tests based on antigen search have as main limitation the detection of infections only after the development of adult parasites, which can take up to 18 months (Steel et al., 2017, De Souza et al., 2017; Huppertz et al., 2008; Weil; Ramzy, 2007). In addition to this limitation, antigenaemia may remain positive even after the decline or even the failure of microfilaraemia in the population submitted to multiple MDA rounds (Tisch et al., 2008; Damgarad et al., 2016).

Thus, it is necessary to identify and evaluate new surveillance markers after MDA in order to avoid the resurgence or reintroduction of LF in these areas. To this end, tests directed to antibodies, developed in response to infective larvae (L₃) have been proposed as an alternative since the appearance there of occurs in faster blood compared with the antigens (Steel et al., 2013; Won et al., 2018).

Several antibody-based assays against recombinant antigens have been developed, including to reduce cross-reactions with other filarial parasites (Hamlin et al., 2012; Steel et al., 2012). The problem of specificity for *W. bancrofti* infections was resolved with the development of a novel antibody-based assay for the recombinant antigen of *W. bancrofti*, Wb123 (Kubofcik; Fink; Nutman, 2012). This assay has not yet been enabled for its use and is available for research only, since the behavior of the anti-Wb123 antibodies is not sufficiently known over time and after successive cycles of treatment, requiring the development of new studies to assess and compare it with the infection markers currently used to monitor transmission and post-MDA surveillance (Hamlin et al., 2012; Steel et al., 2012). Therefore, the objective of the present study was to evaluate the main markers used for the monitoring and surveillance of LF in areas submitted to MDA, with emphasis on the detection of antibodies through recombinant Wb123 antigen in microfilaremic individuals living in the Metropolitan Region of Recife, Pernambuco - Brazil.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Study Area

The study was carried out in Alto da Bondade and Alto da Conquista neighborhoods (Olinda) and Alto Santa Terezinha neighborhood (Recife), localities located in the Metropolitan Region of Recife (MRR), Pernambuco - Brazil. These areas were selected as priority for intervention, through the MDA annually with DEC because they presented prevalence of approximately 10% for LF (Braga et al., 2004; RECIFE, 2002; IBGE, 2013).

2.2 Study design and target population

A *follow-up* study was conducted involving 63 biological samples from subjects submitted to MDA. Microfilaremic samples of both sexes, ranging in age from 3 to 68 years, were included in the study. These individuals were selected from a parasitological survey, performed before the beginning of the MDA and were followed up for five consecutive years. All subjects were treated annually with DEC 6 mg/kg single dose.

2.3 Sample collection

The samples were collected annually, six months before the administration of the drugs in the selected areas, between 11 pm and 1 am, respecting the periodicity of the parasite (Dreyer et al., 1996). 5 mL of venous blood was collected, 1 mL in a tube containing ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) for PMF and the remaining 4 mL in dry tube for the serological tests. To be included in the study, each sample selected should present a minimum of three annual collections within the period studied.

2.4 Laboratory procedures

I) Polycarbonate Membrane Filtration (PMF): Approximately 1 ml of blood was filtered through a polycarbonate membrane having a width of 13mm and a pore size of 3µm as described by Rocha et al. (2004). After filtration, they were fixed with methyl alcohol and stained with Carrazi Hematoxylin for examination under a microscope (final resolution of 160X). II) Og4C3-ELISA: The test was performed as recommended by the manufacturer (TropBio®, Townsville, Australia). Samples with antigen concentration ≥ 128 antigens units (AU) were interpreted as positive (MORE; COPEMAN, 1990). III) Bm14-ELISA: The test was performed as recommended by the manufacturer (Lymphatic Filariasis Bm14 Antibody CELISA; Cellabs Pty Ltd. - Brookvale, Queensland, Australia). In all plates sera from resident patients from non-endemic areas, known without infection, were included in order to calculate the cut-off according to the manufacturer's guidelines [mean obtained with Optical Densities (OD) of non-endemic sera added to 3x the deviation pattern]. ODs greater than or equal to cut-off were considered positive for Bm14 (Lammie, et al., 2004, Masson, et al., 2017). IV) Wb123-ELISA: The search for anti-Wb123 antibodies was performed with the "Filaria Detect™ IgG4 ELISA System" from Inbios International, Inc. (InBios, 2015). Following the manufacturer's recommendations, a cut-off of 0.239 OD was established from the construction and analysis of the ROC curve "Receiver Operating Characteristic" (Martinez et al., 2003), being considered positive samples with equal or higher value to cut-off.

2.5 Data analysis

For the analysis of the data and interpretation of the results, the software R (R Development Core Team, 2012) was used, and the conclusions were taken at the significance level of 5%. The Mantel-Haenzel tests, linear log regression, were used to evaluate positivity for infection and transmission over time (pre MDA, 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th MDA). The Pearson's Chi-square test and Fisher's exact test when necessary was used to evaluate "round", in each moment. In the evaluation of pre- MDA vs. 1st MDA and 1st MDA vs. 5th MDA a paired analysis was approached using the McNemar test (Agresti, 2002; Kateri, 2014).

In order to observe the behavior of the tests in relation to the age group, the group of individuals from the 63 samples was categorized into eight age groups. They were defined according to the size of the sample, providing reflection of the sample similarly to the distribution performed by (Jaoko et al., 2007).

2.6 Ethical Considerations

This study was approved by the research ethics committee of the Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) of Pernambuco (CAEE: 47227015.9.0000.5190). All positive patients were treated and monitored clinically-laboratorially at the National Reference Service in Filariasis.

3. RESULTS

Of the 63 samples of the microfilaremic individuals studied, 23 were females and 40 males, mean age was 28 years (± 17.7 DP) ranging from 3 to 68 years. The assessment of positivity for the markers studied (microfilaraemia, CFA, anti-Bm14 and anti-Wb123 antibodies) according to gender during the study period showed a higher positivity among males. However, this difference was only significant for anti-Wb123 antibodies (Table 01). Table 2 shows the distribution of positive individuals, by test and age. It can be observed that none of the four tests evaluated had a significant association between positivity and age group.

In pre- MDA , an average of approximately 201 microfilariae / mL of blood was observed, ranging from 1 to 1834 (± 351.1 SD). As far as the research of Filarial Circulating Antigen (CFA), by the Og4C3-ELISA, one can observe a positivity of 100% with a mean of 9,025 "AU" Antigen Units ($\pm 1,099$ DP). Regarding antibody detection, a positivity of 82.5% (52/63) was identified, with an average OD of 2.6 (± 1.66 SD) and 95.2% (60/63) with an OD mean of 1.78 (± 0.83 SD), for anti-Wb123 and anti-Bm14, respectively.

Table 3 shows the test results for the markers after the first and fifth round of MDA. It can be observed that after the first round only the microfilaremia, evaluated by PMF, showed a significant reduction in the number of negative individuals, a decrease of 50.8% was identified. After five rounds of treatment, no microfilaremic individuals were identified and the levels of CFA and anti-Wb123 antibodies reduced 88.1% and 65.8%, respectively ($p < 0.05$). However, was not identified, a significant reduction in the concentration of anti-Bm14 antibody levels that reduced only 7.2% ($p > 0.05$). At the end of the five years of treatment, a mean antigenemia of 225 AU (± 853.62 DP) was identified and for the antibodies an average of 0.51 OD (± 0.91 SD) for the anti-Wb123 and 1.47 OD (± 1.08 SD) for anti-BM14.

Analysis of the behavior of microfilaraemia, CFA and anti-Bm14 and anti-WB123 antibodies over the study period allowed us to identify that the four markers present a decreasing profile over time. However, for anti-Bm14 antibodies, this reduction profile is slow, with no significant difference at the end of the five rounds of treatment (Figure 01).

4. DISCUSSION

The death of adult worms associated with a significant decrease in microfilaremia in LF endemic areas submitted to MDA has led to the need to define which markers would be more appropriate to determine the exact time to stop treatment and to start the surveillance phase (Ottesen, 1997; WHO, 2000; PAHO, 2015). Antibody research has been suggested as being able to assure an early diagnosis for LF infection, but still requires studies that can attest to its applicability in diagnosis and also in confirming the interruption of transmission in areas undergoing intervention (WHO, 2015; De Souza et al., 2017). In the present study, we evaluated the performance of the markers used in the evaluation of endemic areas for LF submitted to mass treatment, using only DEC, in a group of microfilaremic individuals residing in MRR, the last area considered endemic in Brazil today.

Analysis of the positivity of markers according to sex did not identify an association for microfilaremia, CFA and for anti-Bm14 antibodies. This result coincides with that observed in a study conducted in Luangwa, Zambia, in which 985 patients were evaluated for infection and disease and also did not identify an association between sex and positivity for CFA and anti-Bm14 antibodies (Shawa et al., 2013). However, a significant difference in sex was observed for the results obtained for the anti-Wb123 antibodies, suggesting that males constitute a risk group for contracting the filarial infection and corroborating with studies carried out in other endemic areas that also identified a higher percentage of positive individuals among males (Huppatz et al., 2008; Liang et al., 2008; Lau et al., 2014). One hypothesis that has been used to justify this phenomenon is that the male subjects due to their daily routine would be more exposed to the action of the mosquito vector (*Culex quinquefasciatus*) (Brabin, 1990; Burkot et al, 2006).

Regarding the age group, a study carried out in two endemic areas in Africa, one with high and one with low transmission intensity, identified that in the high transmission area the level of infection according to microfilaremia and CFA was significantly higher in the younger age groups. In contrast, in the low-transmission area, the transmission levels found increased along with age. They concluded by analyzing immunoglobulin (IgG4) levels, that age certainly had a significant effect on the observed amount of antibodies in the high-transmission area, but appeared to have a differential effect on antibody production in the low-transmission community, that is, the age in some way affected the response of the antibodies in both areas studied, however, more studies would be necessary to obtain knowledge about the complex immunological relation between the parasite and the host (Jaoko et al., 2007). In the present study, the analysis during the six years did not show a

relationship between age and positivity for any of the markers evaluated, this probably could have occurred due to the reduced size of the sample, being necessary the accomplishment of new studies in the area that confirm the real behavior age markers.

The evaluation of the markers over the years of treatment allowed to evidence a rapid reduction, followed by the microfilariae negativity after the five rounds of MDA. This result was already expected, since the drug used has a high efficacy in the reduction of circulating microfilariae (Simonsen et al., 2004). However, the same did not happen with antigenaemia, which showed a slow reduction of the antigenic load and some patients still remained positive despite the five rounds of treatment. Other studies also identified a similar pattern, with slow reduction of antigenaemia, and according to these the slow reduction of the antigenic load could be related to the presence of adult worms refractory to the treatment, however, the absence of a radiological evaluation of these patients did not confirm this hypothesis (More; Copeman, 1990; Eberhard et al., 1997).

Regarding the detection of anti-Bm14 and anti-Wb123 antibodies, we observed different response profiles throughout the treatment. Although the two antibodies showed a decreasing pattern, anti-Bm14 antibodies showed a slow clearance in antibody titres which resulted in a non-significant decrease in the number of positive individuals at the beginning and at the end of the MDA. A study in Papua New Guinea has identified that after several rounds of treatment there is a significant reduction in microfilariae density and antigenemia. However, this behavior did not reproduce when they evaluated the profile of the anti-Bm14 antibodies (Tisch et al., 2008). According to them, the slow reduction of antibody titers indicated the presence of recent infection in the area and for that reason would be a more accurate marker of the epidemiology of parasitosis after mass treatment.

Another study in Egypt also found that anti-Bm14 antibodies persisted for years after MDA intervention (Ramzy, et al., 2006). Serum-reversal is expected to occur at some point, but the absence of such information confers a limitation on the use of anti-Bm14 antibodies as a tool capable of asserting the interruption of transmission, since it can not be safely determined if positive individuals represent cases of exposure to the parasite or residual immune memory.

Analysis of the anti-Wb123 antibody behavior demonstrated a significant difference in anti-Wb123 antibody titers identified at the pre MDA and at the end of the study, with this behavior decreasing with each new round of treatment. However, at the end of the 5 years 34.2% of the patients still had a concentration of antibodies that conferred positivity to Wb123-ELISA. This fact is probably due to a higher persistence of the antibodies in some

exposed individuals and not due to the refractoriness of the infection to the treatment or reinfection, since they did not present positive microfilaremia and had an effective reduction in the CFA titers. These results corroborate with the findings of a study in Gambia, Africa, which also showed positivity refractory to anti-Wb123 antibodies. According to the authors of this study, the residual positivity could be related to the cut-off values adopted for the test, emphasizing the importance of defining precise cut-off points for the Wb123-ELISA test, which is a challenge due to the limited availability of panels with sera well-defined points of cut (De Souza et al., 2017; Won et al 2018). In a study conducted in the Cook Islands, samples collected during the 1970s were analyzed for anti-Wb123 antibodies and compared to the results of samples collected on the same island in 1992, 5 years after a single round of treatment. The results indicated a significant decrease in Wb123 antibody positivity, suggesting a reduction in LF transmission (Steel et al., 2012).

The results of the present study allowed us to identify that the reduction in microfilaraemia is better reflected in CFA titers and anti-Wb123 antibodies, since the three markers present similar behaviors, that is, a progressive linear decrease. However, this same behavior was not observed with the anti-Bm14 antibodies, which had elevated antibody titres even after the five rounds of treatment, including in patients diagnosed with amicrofilaremic after the first treatment cycle. Of the two antibodies evaluated, anti-Wb123 antibodies were more sensitive to the impact of MDA than anti-Bm14 antibodies.

5. CONCLUSION

Although antibody screening has been suggested as a means of assessing and monitoring areas submitted to MDA, according to the GPELF, we emphasize that on the one hand; the antibodies can express themselves sooner after exposure to the parasite; on the other hand, the persistence of these markers represent an important limitation that makes it difficult to define the real status of local transmission, requiring an evaluation of the other markers, including analysis through biology molecular and xenomonitoring. For this reason, the choice of antibodies as adequate markers is still a complex decision and requires more precise studies, involving the evaluation of a larger number of individuals and for a longer period of time.

Author's contributions

P.F. carried out the experiment and wrote the manuscript with support from R.A, M.A.M, B.E.; provided support for laboratory work M.A.L, M.R., J.A., A.F; contributed with

the statistical analysis G.T. All the authors contributed to the review, reading and approval of the article.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This research was funded by the Oswaldo Cruz Foundation / Foundation for Technological Development in Health-Vice-President for Research and Referral Laboratories (Fiocruz/FIOTEC) VPPLR-15-2-2-30 Project.

References

- Agresti, A., 2002 Inference for Contingency Tables, in Categorical Data Analysis, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/0471249688.ch3
- Brabin L., 1990. Sex differentials in susceptibility to lymphatic filariasis and implications for maternal child immunity. *Epidemiol. Infect.* 105 (2), 335–353.
- Braga, C., Albuquerque, M. F. P. M., de Moraes, H. M., 2004. A produção do conhecimento científico e as políticas de saúde pública: reflexões a partir da ocorrência da filariose na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública.* 20 (2), 351-361.
- Burkot, T.R., Durrheim, D., Melrose, W.D., Speare, R., Ichimori, K., 2006. The argument for integrating vector control with MDA campaigns to ensure elimination of lymphatic filariasis. *Filaria J.* 16 (5), 10.filariasis. *Filaria J.* 16 (5), 10.
- Damgaard, J., Meyrowitsch D.W., Rwegoshora R.T., Magesa S.M., Mukoko, D.A., Simonsen, P.E., 2016. Assessing drivers of the IgG4 antibody reactivity to recombinant antigen Bm14 in *Wuchereria bancrofti* endemic populations in East Africa. *Acta Tropica.* 161, 26-32.
- De Souza, D.K., Owusu, I.O., Otchere, J., Adimazoya, M., Frempong, K., Ahorlu, C.S., Boakye, D.A., Wilson, M.D., 2017. An evaluation of Wb123 antibody elisa in individuals treated with ivermectin and albendazole, and implementation challenges in Africa The Pan African Medical Journal. 27, 65.
- Dreyer, G., Pimentael, A., Medeiros, Z., Béliz, F., Moura, I., Coutinho, A., Andrade, L.D., Rocha, A., Da Silva, L.M., Piessens, W.F., 1996. Studies on the periodicity and intravascular distribution of *Wuchereria bancrofti* microfilariae in paired samples of capillary and venous blood from Recife. Brazil. *Trop Med Int Health.* 1, 264-272.

- Eberhard, M. L., Hightower, A., Addiss, D. G., Lammie, P. J., 1999. Clearance of *Wuchereria bancrofti* antigen after treatment with diethylcarbamazine or ivermectin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 483.
- Hamlin, K. L., Moss, D. M., Priest, J. W., Roberts, J., Kubofcik, J., W., Gass, K., Streit, T.G., Nutman, T.B., Eberhard, M.L., Lammie, P.J., 2012. Longitudinal Monitoring of the Development of Antifilarial Antibodies and Acquisition of *Wuchereria bancrofti* in a Highly Endemic Area of Haiti. *PLoS Negl Trop Dis.* 6 (12), 1941.
- Huppertz, C., Durrheim, D., Lammie, P., Kelly, P., Melrose, W., 2008. Eliminating lymphatic filariasis – the surveillance challenge. *Trop Med Int Health.* 13, 292– 294.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2013. Censo demográfico 2010: Características populacionais e domiciliares. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 17/09/2017.
- InBios. *Filaria Detect™* IgG ELISA. www.inbios.com. Seattle, WA 98104 USA: **InBios International**, Inc.; 2015.
- Jaoko, W. G., Michael, E., Meyrowitsch, D. W., Estambale, B. B., Malecela, M. N., Simonsen, P. E., 2007. Immunoepidemiology of *Wuchereria bancrofti* infection: parasite transmission intensity, filaria-specific antibodies and host immunity in two East African communities. *Infect Immun.* 75, 5651-5662.
- Kateri, M., 2014. Contingency Table Analysis: Methods and Implementation Using R. DOI.10.1007/978-0-8176-4811-4.
- Kubofcik, J., Fink, D.L., Nutman, T.B., 2012. Identification of Wb123 as an Early and Specific Marker of *Wuchereria bancrofti* Infection. *PLoS. Negl Trop Dis.* 6 (12), 1930.
- Lammie, P., et al., 2004. Recombinant antigen based assays for the diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis - a multicenter trial. *Filaria Journal.* 3 (9).
- Lau, C. L., Won, K. Y., Becker, L., Soares-Magalhaes, R. J., Fuimaono, S., et al., 2014. Seroprevalence and Spatial Epidemiology of Lymphatic Filariasis in American Samoa after Successful Mass Drug Administration. *PLoS Negl Trop Dis.* 8 (11), e3297.
- Liang, J. L., King, J. D., Ichimori, K., Handzel, T., Pa'au, M., et al., 2008. Impact of five annual rounds of mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on *Wuchereria bancrofti* infection in American Samoa. *Am J Trop Med Hyg.* 78, 924–928.
- Masson, J., Douglass, J., Roineau, M., Aye, K. S., Htwe, K. M., Warner, J., Graves, P. M., 2017. Concordance between Plasma and Filter Paper Sampling Techniques for the Lymphatic Filariasis Bm14 Antibody ELISA. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2 (2), 6.

- Martinez, E.Z., Louzada, F., Pereira, B., 2003. A curva ROC para testes diagnósticos. *Cad. Saúde Coletiva*. 11. 7-31.
- More, S.J., Copeman, D.B., 1990. A highly specific and sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating antigen in bancroftian filariasis. *Trop Med Parasitol*. 41, 403-406.
- WHO, 2000. Preparing and Implementing a National Plan to Eliminate Lymphatic Filariasis. A guideline for Programme Managers. WHO/CDS/CPE/CEE/2000.16. 2000.
- WHO, 2010. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2010. *Weekly epidemiological record*, v. 85, n. 38, p. 365–372, 2010a.
- WHO, 2010. Progress Report 2000–2009 and Strategic Plan 2010–2020 of the Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: Halfway Towards Eliminating Lymphatic Filariasis, 2010b.
- WHO, 2015. World Programme for the Elimination of Lymphatic Filariasis. Monitoring and epidemiological evaluation of the intervention with collective treatments. Manual for national programmes of filariasis elimination program for elimination of lymphatic filariasis. ISBN 978 92 4 850148 7.
- OMS, 2016. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2015. *Weekly epidemiological record*, v. 91, n. 39, p. 441–460, 2016.
- PAHO. 16th Regional Lymphatic Filariasis Elimination Program Managers' Meeting; and 15th Regional Lymphatic Filariasis Elimination Program Review Group. Strengthening surveillance to achieve and sustain elimination of transmission of Lymphatic Filariasis and tackle other Neglected Infectious Diseases in the region of the Americas. Recife, Brazil, June 29 to 30, 2015.
- Ottesen, E. A., Duke, B. O., Karam, M., Behbehani, K. 1997. Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariasis. *Bulletin of the World Health Organization*, 75(6), 491–503.
- Ramaiah, K.D., Das, P.K., Vanamail, P., Pani, S.P., 2006. Impact of 10 years of diethylcarbamazine and ivermectin mass administration on infection and transmission of lymphatic filariasis. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 101 (6), 555–563.
- RDCT (R Development Core Team). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2012. <http://cran.r-project.org/>

- Ramzy, R.M.R., Setouhy, M.E., Helmy, H., Ahmed, E.S., Elaziz, K.M.A., Farid, H.A., Shannon, W.D., Weil, G.J., 2006. Effect of yearly mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on bancroftian filariasis in Egypt: a comprehensive assessment. 367 (9515), 992-999.
- Recife, 2002. Secretaria Municipal de Saúde. Manual de Operacionalização: Intervenção-piloto para controle da filariose linfática: Distrito Sanitário II - Microrregião 2.2 (Bairros de Água Fria e Alto Santa Terezinha). In: _____. Programa de Controle da Filariose do Recife.
- Rocha, A., 2004. Filariose bancroftiana: Avaliação dos testes de diagnóstico disponíveis frente às diversas formas clínicas da Bancroftose. 2004. Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Simonsen, P. E., Magesa, S. M., Dunyo, S. K., Malecela-Lazaro, M. N., Michael, E., 2004. The effect of single dose ivermectin alone or in combination with albendazole on *Wuchereria bancrofti* infection in primary school children in Tanzania. [Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene](#). 98 (8), 462-472.
- Steel, C., Kubofcik, J., Ottesen, E. A., Nutman, T. B., 2012. Antibody to the Filarial Antigen Wb123 Reflects Reduced Transmission and Decreased Exposure in Children Born following Single Mass Drug Administration (MDA). *PLoS Negl Trop Dis*. 6 (12), e1940.
- Steel, C., Golden, A., Kubofcik, J., LaRue, N., de Los Santos, T., Domingo, G. J., Nutman, T. B., 2013. Rapid *Wuchereria bancrofti* specific antigen Wb123-based IgG4 immunoassays as tools for surveillance following mass drug administration programs on lymphatic filariasis. *Clin Vaccine Immunol*. 20, 1155–1161.
- Steel, C., Golden, A., Stevens, E., Yokobe, L., Domingo, G. J., de los Santos, T., Nutman, T. B., 2015. Clinical and Vaccine Immunology Rapid Point-of-Contact Tool for Mapping and Integrated Surveillance of *Wuchereria bancrofti* and *Onchocerca volvulus* Infection. 22 (8).
- Tisch, D. J., Bockarie, M.J., Dimber, Z., Kiniboro, B., Tarongka, N., Hazlett, F.E., Kastens, W., Alpers, M.P., Kazura, J.W., 2008. Mass Drug Administration Trial to Eliminate Lymphatic Filariasis in Papua New Guinea: Changes in Microfilaremia, Filarial Antigen, and Bm14 Antibody after Cessation. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*. 78 (2), 289–293.
- TROPBIO Pty. Ltd. ELISA Kit for Detecting and Quantifying *Wuchereria bancrofti* Antigen; Cellabs Pty. Ltd.: Brookvale, NSW, Australia, 2014.

- Weil, G. J., Ramzy, R. M. R., 2007. Diagnostic Tools for filariasis elimination programs. Trends in Parasitology. 23, 78-82.
- Won, K. Y., Sambou, S., Barry, A., Robinson, K., Jaye, M., Sanneh, B., Sanyang, A., Gass, K., Lammie, P. J., Rebollo, M., 2018. Use of Antibody Tools to Provide Serologic Evidence of Elimination of Lymphatic Filariasis in The Gambia Am. J. Trop. Med. Hyg. 98 (1), 15–20.

Table 1 – Association of sex with the treatment at each moment (year) and over time by the techniques Wb123, Bm14, CFA and PMF in the cities of Olinda (2007-2012) and Recife (2003-2009).

	Sex	Pré-MDA			1ª MDA			2ª MDA			3ª MDA			4ª MDA			5ª MDA			p-valor ²
		-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	
Anti-Wb123	Female	6	17	73,9	6	17	73,9	6	17	73,9	10	13	56,5	14	8	36,4	11	6	36,8	0,0264
	Male	5	35	87,5	7	28	80,0	6	33	84,6	14	25	64,1	14	22	61,1	17	12	41,2	
p-valor ¹		0,1886			0,7490			0,3345			0,5975			0,1040			0,7613			
Anti-Bm14	Female	1	22	95,6	1	22	95,6	1	22	95,6	3	20	87,0	5	18	78,3	2	18	90,0	0,4894
	Male	2	38	95,0	1	37	97,4	2	38	95,0	3	36	93,2	6	31	83,8	2	35	94,6	
p-valor ¹		1,0000			1,0000			1,0000			0,6615			0,7340			0,6066			
CFA	Female	0	23	100,0	0	23	100,0	3	20	87,0	15	8	34,8	20	3	13,0	20	1	4,8	0,4293
	Male	0	40	100,0	1	39	97,5	8	32	80,0	24	16	40,0	29	11	27,5	32	6	15,8	
p-valor ¹		1,0000			1,0000			0,7319			0,7902			0,2232			0,4032			
PMF	Female	0	23	100,0	11	12	52,2	18	5	21,7	22	1	4,4	22	1	4,4	21	0	0,0	0,8907
	Male	0	40	100,0	21	19	47,5	32	8	20,0	36	4	10,0	39	1	2,5	38	0	0,0	
p-valor ¹		1,0000			0,7966			1,0000			0,6444			1,0000			1,0000			

Mantel-Haenzel / Log Linear² – Chi-square / Fisher's exact test¹

Table 2 - Categorized age of the sample evaluated for each of the tests since before the MDA (pre MDA) for another 5 years.

	Years	Pre MDA			1ª MDA			2ª MDA			3ª MDA			4ª MDA			5ª MDA			P- value ²
		+			+			+			+			+			+			
		-	+	(%)	-	+	(%)	-	+	(%)	-	+	(%)	-	+	(%)	-	+	(%)	
Anti-Wb123	3 a 10	1	7	87,5	2	5	71,4	1	5	83,3	2	3	60,0	1	1	50,0	1	1	50,0	0,3086
	11 a	1						1												
	15	2	1	84,6	4	8	66,7	1	0	90,9	3	7	70,0	4	4	50,0	1	1	50,0	
	16 a																			
	20	2	6	75,0	1	5	83,3	3	4	57,1	4	4	50,0	6	6	50,0	6	2	25,0	
	21 a																			
	30	3	2	40,0	2	5	71,4	3	6	66,7	5	6	54,6	6	4	40,0	6	3	33,3	
	31 a	1			1			1												
	40	1	3	92,9	1	2	92,3	2	1	84,6	4	9	69,2	5	5	50,0	5	3	37,5	
	41 a																			
	50	1	5	83,3	1	4	80,0	1	5	83,3	2	3	60,0	3	4	57,1	4	4	50,0	
	51 a																			
	60	0	6	100,0	1	4	80,0	0	5	100,0	3	3	50,0	2	3	60,0	2	2	50,0	
	60+	1	2	66,7	1	2	66,7	1	4	80,0	1	3	75,0	1	3	75,0	3	2	40,0	
p-value ¹		0,2145			0,8385			0,6371			0,9663			0,9797			0,9879			
Anti-Bm14	3 a 10	0	8	100,0	0	7	100,0	0	6	100,0	0	5	100,0	0	2	100,0	0	2	100,0	0,0761
	11 a	1			1			1												
	15	1	2	92,3	1	1	91,7	0	1	100,0	1	9	90,0	3	5	62,5	1	4	80,0	
	16 a																			
	20	0	8	100,0	0	6	100,0	1	7	87,5	2	6	75,0	3	9	75,0	1	0	90,9	
	21 a																			
	30	1	4	80,0	1	6	85,7	1	8	88,9	1	0	90,9	3	8	72,7	0	0	100,0	
	31 a	1			1			1			1									
	40	0	4	100,0	0	4	100,0	0	3	100,0	1	2	92,3	1	9	90,0	1	9	90,0	
	41 a																			
	50	1	5	83,3	0	5	100,0	0	6	100,0	0	5	100,0	0	7	100,0	0	9	100,0	
	51 a																			
	60	0	6	100,0	0	6	100,0	1	4	80,0	1	5	83,3	1	4	80,0	1	3	75,0	
	60+	0	3	100,0	0	4	100,0	0	5	100,0	0	4	100,0	0	5	100,0	0	6	100,0	
p-value ¹		0,3533			0,7514			0,3365			0,8976			0,5699			0,4887			
CFA	3 a 10	0	8	100,0	0	8	100,0	0	6	100,0	4	1	20,0	2	0	0,0	2	0	0,0	0,1318
	11 a	1			1															
	15	0	3	100,0	0	2	100,0	3	8	72,7	7	3	30,0	6	2	25,0	5	0	0,0	
	16 a	0	8	100,0	0	7	100,0	0	8	100,0	3	5	62,5	9	3	25,0	1	0	0,0	

Mantel-Haenzel / Log Linear² – Chi-square / Fisher's exact test¹

Table 3 - Evaluation of the tests used in the treatment in the sample since the pre-MDA, after the effect of the 1st MDA and in the last year.

Pre MDA	1ª MDA		Total (%)	p-value	1ªMDA	5ª MDA		Total (%)	p-value
	Neg. (%)	Pos. (%)				Neg. (%)	Pos. (%)		
Anti-Wb123					Anti-Wb123				
Negative	8 (13,8)	3 (5,2)	11 (19,0)	0,7237	Negative	7 (17,7)	0 (0,0)	7 (17,1)	< 0,0001
Positive	5 (8,6)	42 (72,4)	47 (81,0)		Positive	20 (48,8)	14 (34,2)	34 (82,9)	
Total (%)	13 (22,4)	45 (77,6)			Total (%)	27 (65,8)	14 (34,2)		
Anti-Bm14					Anti-Bm14				
Negative	2 (3,3)	1 (1,6)	3 (4,9)	1,0000	Negative	2 (3,6)	0 (0,0)	2 (3,6)	0,4795
Positive	0 (0,0)	58 (95,1)	58 (95,1)		Positive	2 (3,6)	51 (92,8)	53 (96,4)	
Total (%)	2 (3,3)	59 (96,7)			Total (%)	4 (7,2)	51 (92,8)		
CFA					CFA				
Negative	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1,0000	Negative	1 (1,7)	0 (0,0)	1 (1,7)	< 0,0001
Positive	1 (1,6)	62 (98,4)	63 (100,0)		Positive	51 (86,4)	7 (11,9)	58 (98,3)	
Total (%)	1 (1,6)	62 (98,4)			Total (%)	52 (88,1)	7 (11,9)		
PMF					PMF				
Negative	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	< 0,0001	Negative	30 (50,8)	0 (0,0)	30 (50,8)	< 0,0001
Positive	32 (50,8)	31 (49,2)	63 (100,0)		Positive	29 (49,2)	0 (0,0)	29 (49,2)	
Total (%)	32 (50,8)	31 (49,2)			Total (%)	59(100,0)	0 (0,0)		

McNemar's chi-square

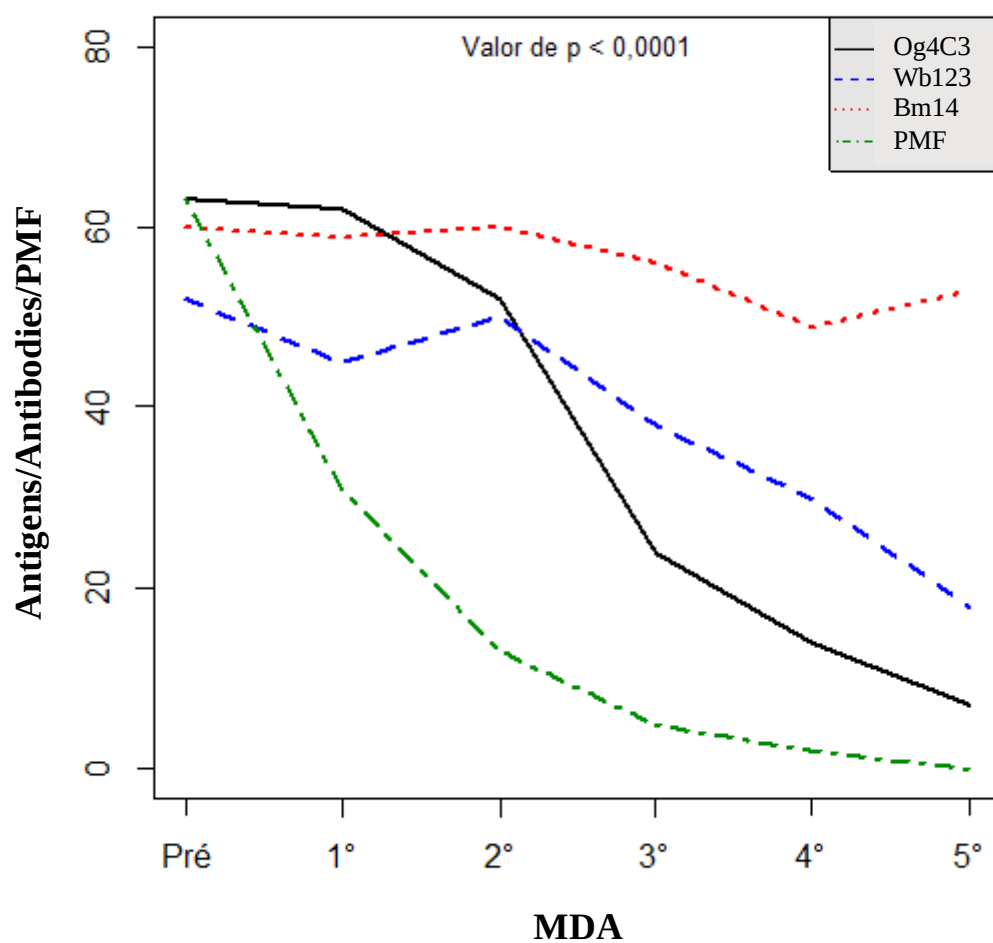


Figure 1 – Behavior of markers (PMF, CFA, Anti-Bm14 and Anti-Wb123) over time (since pre MDA for 5 consecutive years) in the cities of Olinda (2007-2012) and Recife (2003-2009)

ANEXOS

ANEXO A – CARTA DE ANUÊNCIA DO SERVIÇO DE REFERÊNCIA NACIONAL EM FILARIOSES

CARTA DE ANUÊNCIA

O Serviço de Referência Nacional em Filariose (SRNF) localizado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, declara que concorda em fornecer as amostras sorológicas e as informações necessárias para realização do projeto: “DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO UTILIZANDO O ANTÍGENO RECOMBINANTE *WB123* PARA VIGILÂNCIA DA INFECÇÃO FILARIAL EM ÁREAS ENDÊMICAS”, orientado pela Prof.^a Dra. Maria Amélia Vieira Maciel e sob a responsabilidade da doutoranda Paula Fernanda Alcântara de Souza Melo ambas vinculadas ao Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco. Ressaltamos que essa concordância está condicionada a aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa e que essa carta está sendo fornecida em virtude de todos os coordenadores e colaboradores do SRNF estarem envolvidos na pesquisa.

Recife, 28 de janeiro de 2015.

Dra. Ana Maria Aguiar
Coordenadora do Ambulatório
Serviço de Referência Nacional em Filariose

Dra. Ana Maria Aguiar dos Santos
SIAPE 463.11
Email: amaguiar@cpqba.fiocruz.br
Pesquisadora Cx - 1.1.1.1

ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA



Título do Projeto: "Desenvolvimento e validação de um ensaio imunoenzimático utilizando o antígeno recombinante WB123 para vigilância da infecção filarial em áreas endêmicas".

Pesquisador responsável: Paula Fernanda Alcântara de Souza Melo

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 15/07/2015

Registro no CAAE: 47227015.9.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 1.227.151

PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 22 de setembro de 2015.


Coordenadora do CEP/CPqAM

