



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

CAMILA VIANA XIMENES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE SISTEMAS BASEADOS EM LAMP
(AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA EM ALÇA) E PCR CONVENCIONAL PARA O
DIAGNÓSTICO DA *Wuchereria bancrofti* EM FLUÍDOS BIOLÓGICOS**

RECIFE

2017

CAMILA VIANA XIMENES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE SISTEMAS BASEADOS EM LAMP
(AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA EM ALÇA) E PCR CONVENCIONAL PARA O
DIAGNÓSTICO DA *Wuchereria bancrofti* EM FLUÍDOS BIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em
Biologia Aplicada a Saúde, área de concentração
parasitologia, da Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção de título de Doutor
em ciências.

Orientador: Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Co-orientador: Dr. Fábio Lopes de Melo

RECIFE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Ximenes, Camila Viana

Desenvolvimento e validação de sistemas baseados em Lamp (amplificação isotérmica em alça) e PCR convencional para o diagnóstico da *Wuchereria bancrofti* em fluidos biológicos/ Camila Viana Ximenes- 2017.

67folhas: il., fig.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Coorientador: Fábio Lopes de Melo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexos

1. Filariose 2. *Wuchereria bancrofti* 3. Urina I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (orient.) II. Melo, Fábio Lopes de (coorient.) III. Título

616.9652

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-273

Elaborado por Elaine C. Barroso CRB4/1728

CAMILA VIANA XIMENES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE SISTEMAS BASEADOS EM LAMP
(AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA EM ALÇA) E PCR CONVENCIONAL PARA O
DIAGNÓSTICO DA *Wuchereria bancrofti* EM FLUÍDOS BIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia Aplicada a Saúde, área de concentração parasitologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção de título de Doutor em ciências.

Aprovada em: 12/09/2017

BANCA EXAMINADORA

Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami /UFPE

Dr. Fabio Lopes de Melo
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Rosana Albuquerque Montenegro
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso Guimarães
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dr. Leandro Batista Wanderley
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus, por me dar forças e iluminar meus caminhos, e sem ele nada disso seria possível.

A minha família, meus pais e irmão, por todo apoio dado em todos os momentos, toda a educação dada e por sempre batalhar junto comigo. A Rafael, por todo amor e torcida dedicados a mim. Por ser sempre meu alicerce e me incentivar em todos os momentos. Obrigada pelo carinho, apoio e cumplicidade. A minha filha Mel por toda alegria, “aperreio” e amor.

Ao meu orientador Dr. Luiz Carvalho de Bezerra Júnior, agradeço por ter me aceitado como sua “barriga de aluguel” e ter confiado no meu trabalho.

Ao meu co-orientador Dr. Fabio Melo, imensamente, pela grande força que sempre me deu paciência, conhecimento e apoio nos momentos que eu mais precisei de ajuda, pela parceria e conselhos que me ajudaram ao longo desta caminhada. Sua orientação, amizade e paciência são muito valiosas para mim.

Ao Dr. Abraham Rocha, agradeço pelo conhecimento compartilhado, pelo empenho e pela confiança no meu trabalho para realização dessa pesquisa.

Ao Dr. Eduardo Brandão por toda ajuda prestada nesse trabalho, pelos ensinamentos e por todos os conselhos dados.

Aos meus amigos Gabriela e Divar, obrigado pelo amor, otimismo e confiança.

Aos amigos pela torcida e companheirismo nesses anos. Aos amigos do laboratório, por toda a ajuda dada e todos os momentos de diversão durante todo o tempo, tornando o ambiente de trabalho mais agradável.

As minhas amigas do colégio por sempre estarem presente na minha vida e por todos os momentos de apoio e descontração.

Ao Serviço de Referência Nacional em Filarioses que disponibilizou toda infraestrutura, recursos humanos e os insumos para a realização deste trabalho. Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, por fornecer a estrutura e todos os equipamentos que foram necessários durante o desenvolvimento desse trabalho.

À FACEPE por financiar o meu estudo.

RESUMO

A filariose linfática é uma parasitose, que há 17 anos, vem ocupando o segundo lugar no ranking mundial das doenças incapacitantes. O Plano Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL) tem como meta eliminar esta parasitose até o ano de 2020, e um dos pilares é o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos. A proposta do presente estudo é desenvolver e validar sistemas baseados em LAMP e PCR convencional para o diagnóstico da FB em fluidos biológicos. Dos resultados obtidos durante a otimização da PCR convencional, foi obtido um limite de detecção de 0,1fg. Além disso a PCR convencional foi aplicada em fluidos biológicos com sucesso, sendo utilizada em 20 amostras pareadas de sangue, soro e urina. Também foi otimizada a reação de LAMP que teve como limite de detecção 1 fg e amplificação apenas do DNA da *Wb* diante dos outros parasitas endêmicos estudados. A LAMP também foi testada em 30 amostras coletadas no período diurno, tendo 29 amostras positivas e uma amostra negativa para OG4C3, ELISA e LAMP. Em relação a validação das técnicas, PCR e LAMP foram testadas frente a 190 amostras de soro, sendo 95 positivas e 95 negativas pelo método de ICT e FMP. A sensibilidade e especificidade do ensaio LAMP foi de 100 % para ambos os testes; para PCR, os valores foram de 97.8 % e 98.9 %, respectivamente. O ensaio LAMP apresentou o VPP e VPN de 100% mais alto que a PCR [VPP (98.9%) e VPN (97.9%)]. A técnica de PCR obteve uma acurácia de 98,4% comparada com a de 100% do LAMP. O diagnóstico é um dos pilares para o controle da bancroftose, no entanto, os ensaios de diagnóstico atualmente disponíveis não são ideais. O nosso trabalho demonstrou a possibilidade da utilização das técnicas de LAMP e PCR quando comparados os métodos, ao contrário da PCR, o ensaio LAMP não requer ciclos de amplificação por termociclagem ou utilização da eletroforese para se visualizar os resultados; seu uso no campo, portanto, é facilitado. Desta forma, as técnicas de LAMP e PCR demonstraram rapidez, simplicidade, sensibilidade e especificidade adequada para a detecção de DNA. LAMP se mostrou, ainda, de fácil aplicação, o que pode melhorar a identificação de casos com infecções de baixa intensidade e tratamento direcionado, sendo de grande importância para o controle da FB e seu programa de eliminação.

Palavras-chaves: *Wuchereria bancrofti*. LAMP. PCR.

ABSTRACT

Lymphatic filariasis is a parasitic disease, which for 17 years has been ranked second in the world ranking of disabling diseases. The Global Plan for the Elimination of Lymphatic Filariasis (PGEFL) aims to eliminate this parasite by the year 2020, and one of the pillars is the development of new diagnostic methods. The purpose of the present study is to develop and validate LAMP and conventional PCR based systems for the diagnosis of BF in biological fluids. From the results obtained during the optimization of conventional PCR, a detection limit of 0.1fg was obtained. In addition, conventional PCR was successfully applied to biological fluids and used in 20 paired samples of blood, serum and urine. It was also optimized the LAMP reaction that had as limit of 1 fg detection and amplification of Wb DNA only in front of the other endemic parasites studied. LAMP was also tested in 30 samples collected during the day, with 29 samples positive and one negative sample for OG4C3, ELISA and LAMP. Regarding the validation of the techniques, PCR and LAMP were tested against 190 serum samples, being 95 positive and 95 negative by the ICT and FMP method. The sensitivity and specificity of the LAMP assay was 100% for both tests; for PCR, the values were 97.8% and 98.9%, respectively. The LAMP assay presented VPP and NPV 100% higher than the PCR [VPP (98.9%) and NPV (97.9%)]. The PCR technique obtained an accuracy of 98.4% compared to 100% of LAMP. Diagnosis is one of the pillars for the control of bancroftosis, however, the currently available diagnostic assays are not ideal. Our work demonstrated the possibility of using LAMP and PCR techniques when compared to methods, unlike PCR, the LAMP assay does not require cycles of amplification by thermocycling or use of electrophoresis to visualize the results; its use in the field, therefore, is facilitated. Thus, LAMP and PCR techniques demonstrated rapidity, simplicity, sensitivity and adequate specificity for DNA detection. LAMP has been shown to be easy to apply, which may improve the identification of cases with low intensity infections and targeted treatment, being of great importance for the control of FB and its elimination program.

Key-words: *Wuchereria bancrofti*. LAMP. PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Países e territórios endêmicos para a filariose linfática.	15
Figura 2 - Territórios endêmicos da Filariose Linfática no Continente Americano.....	17
Figura 3 - Ciclo biológico da <i>Wuchereria bancrofti</i>	19
Figura 4 - Esquematização dos seis primers utilizados na reação de LAMP, mostrando suas posições de hibridização com o gene alvo.....	26
Figura 5 - Esquematização da ação da calceína e dos íons de manganês para a formação de fluorescência	28
Figura 6 - Limite de detecção de LAMP	33
Figura 7 - Os tubos após a reação LAMP com SYBR Green	33
Figura 8 - Especificidade da reação de LAMP	33
Figura 9 - Amostras de urina dos pacientes.....	34
Figura 10 - Amostras de soro dos pacientes	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Resultados das técnicas de LAMP e PCR dos 190 pacientes rastreados pelo padrão composto (AD12-ICT e FMP.	40
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPqAM	Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães
DEC	Dietilcarbamazina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	desorribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPT	Eosinofilia pulmonar tropical
FB	Filariose Bancroftiana
FL	Filariose Linfática
FMP	Filtração em Membrana de Policarbonato
ICT	Teste de imunocromatografia rápida em cartão
IgG	Imunoglobulina do isotipo G
IgG4	Imunoglobulina do isotipo G do subtipo 4
IV	Ivermectina
kD	QuiloDalton
Kit	Conjunto diagnóstico
MDA	Mass drug administration
MF	Microfilárias
min	Minutos
MHz	mega-hertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
Og4C3	Anticorpo Monoclonal
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pg	Picograma

PGEFL	Plano Global de Eliminação da Filariose Linfática
pmoles	Picomoles
pH	Potencial hidrogeniônico
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RPM	Rotações por minuto
SDF	Sinal da dança da filaria
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
Seg	Segundo
UA	Unidades de Antígeno
US	Ultrasonografia
UV	Ultravioleta
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS.....	14
1.1.1 Objetivo geral.....	14
1.1.2Objetivos específicos	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DA FILARIOSE BANCROFTIANA	15
2.2 DIAGNOSTICO DIFERENCIAL.....	20
2.2.1Diagnóstico Parasitológico	21
2.2.2Diagnóstico Imunológico.....	22
2.2.3Diagnóstico Molecular.....	24
2.2.3.1 Reação em cadeia da polimerase	24
2.2.3.2 Amplificação Isotérmica em Alça (LAMP)	25
3 RESULTADOS	30
3.1 IDENTIFICAÇÃO DO DNA DE <i>Wuchereria bancrofti</i> EM AMOSTRAS DE URINA COM A TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA EM ALÇA (LAMP) EM TUBO FECHADO.....	30
3.2 VALIDAÇÃO DE LAMP E SISTEMAS CONVENCIONAIS BASEADOS EM PCR PARA O DIAGNÓSTICO DE <i>Wuchereria bancrofti</i> EM AMOSTRAS DE SORO.	37
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ.....	51
APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO NA ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL DISEASE	57
APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO NA ACTA TROPICAL	63

1 INTRODUÇÃO

A filariose linfática, também conhecida como elefantíase em sua fase crônica e sintomática, é uma parasitose que há 17 anos, vem ocupando o segundo lugar no ranking mundial das doenças incapacitantes (OMS, 2015). Como esta enfermidade não possui reservatórios em potencial, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou em 1997 o Plano Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL) que visa à erradicação da parasitose até o ano de 2020 (OMS, 2000). Desde sua implantação, o PGEFL, através da formalização de inúmeras parcerias com setores públicos e privados e do desenvolvimento de ações sistemáticas, vem conseguindo grande progresso. No entanto, apenas esse grupo de atividades não é suficiente para garantir o sucesso do programa. Diante disto, uma iniciativa essencial para contribuir com o sucesso do PGEFL é a continua participação ativa da comunidade científica, disposta a oferecer soluções para os problemas que eventualmente possam surgir (OMS, 2004).

Nas Américas, onde ocorre apenas a infecção por *Wb*, quatro países são considerados áreas de transmissão ativas: Brasil, Guiana, República Dominicana e Haiti, o último com maior prevalência (OMS, 2013). No Brasil, apenas Recife e sua região metropolitana (Olinda e Jaboatão dos Guararapes) ainda são considerados foco ativo da parasitose (OPAS, 2015). Após varios ciclos de tratamento em massa com dietilcarbamazina (DEC) na região metropolitana de Recife houve redução da prevalência de FL de 6,5% da microfilaremia em 1996 para 0% em 2014. Apesar de ter reduzido a prevalência da doença para Zero na cidade de Recife, a região metropolitana ainda é considerada o foco principal da FL no Brasil (OPAS, 2015).

Tradicionalmente, os métodos diagnósticos utilizados na investigação da filariose têm como princípio a identificação da microfilária pelas técnicas da gota espessa, concentração de Knott e filtração em membrana (ROCHA, 2004). Até a década de 80, os exames parasitológicos, em especial a gota espessa, eram os mais utilizados, tanto em inquéritos populacionais, quanto no diagnóstico clínico (OMS, 2000). Embora a detecção de microfilárias do parasito no sangue ainda possua um papel importante em nível de investigação comunitária, a medição de microfilaremia não é uma ferramenta ideal para programas de controle ou vigilância, tanto devido à necessidade de coletar sangue em horário noturno, para detectar o parasito, na maioria das áreas do mundo quanto à relativa sensibilidade limitada, pois não são capazes, na maioria das vezes, de identificar casos com baixa ou nenhuma parasitemia. Por esse motivo, não constituem ferramentas diagnósticas

adequadas para a realização de rastreamento de áreas de transmissão e inquéritos filariais (OTTESEN et al., 1997; MCCARTHY, 2000).

Para o diagnóstico da filariose bancroftiana a avaliação da antigenemia oferece a conveniência da realização dos testes a qualquer horário do dia. Porém o teste do cartão ICT, método que vem sendo empregado na investigação de indivíduos parasitados em áreas submetidas a ações de intervenção do PGEFL, possui uma sensibilidade variável, uma vez que, por se tratar de um teste qualitativo, sua interpretação varia de acordo com a habilidade do observador que está realizando o exame, acarretando eventuais resultados falsos positivos ou negativos. Outra limitação desta metodologia é a incapacidade de discriminar entre infecção presente e passada, e a necessidade de punção (método invasivo) para coleta da amostra de sangue. Isso representa um obstáculo para adesão dos pacientes ao programa, principalmente em se tratando da população pediátrica.

Por esses motivos, a OMS estabeleceu como estratégia prioritária o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas, principalmente aquelas que se baseiam na pesquisa de DNA do parasito em fluídos biológicos que não necessitem de técnicas invasivas para a obtenção das amostras a serem analisada. Dessa forma, o objetivo do nosso estudo é desenvolver e validar abordagens moleculares baseadas em PCR convencional e LAMP para o diagnóstico da *Wuchereria bancrofti* em sangue, soro e urina.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar sistemas baseados em LAMP e PCR convencional para a detecção de DNA de *Wuchereria bancrofti* em fluidos biológicos.

1.1.2 Objetivos específicos

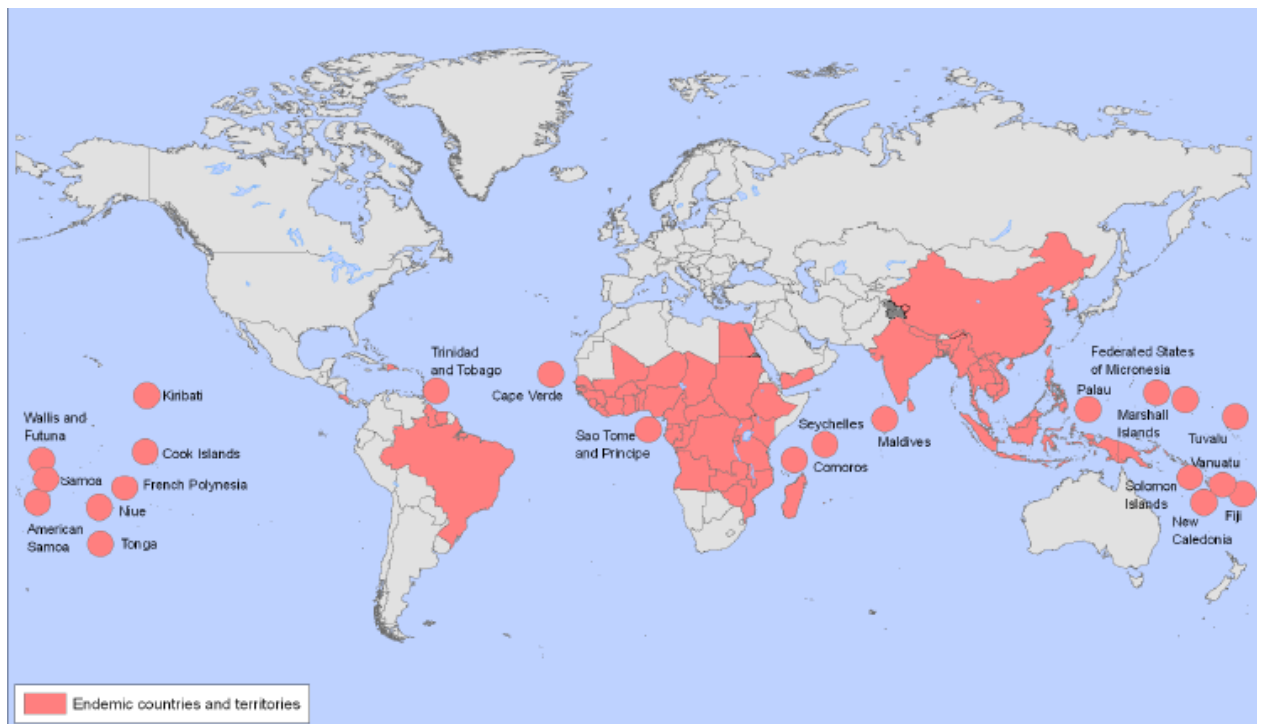
- a) Determinar o limite de detecção e a especificidade dos sistemas LAMP e PCR frente ao DNA *Wuchereria bancrofti* e de outras espécies pertinentes ao estudo;
- b) Estimar a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos, e a acurácia das técnicas no diagnóstico da infecção filarial em fluidos biológicos;
- c) Avaliar o comportamento das técnicas frente aos fluidos biológicos (sangue, soro e urina);
- d) Comparar o desempenho dos sistemas validados para o diagnóstico da filariose bancroftiana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DA FILARIOSE BANCROFTIANA

A filariose é uma doença tropical causada por helmintos do filo Nematodae subfamília Filarioidea. A denominação filariose linfática esta relacionada a três espécies desta subfamília: *Brugia timori*, *Brugia malayi* e *Wuchereria bancrofti* (MACIEL et al., 1994). A infecção pela *W.bancrofti* em humanos tem sido notificada em quase todos os países que estão dentro das regiões tropicais e subtropicais do globo e, sendo a mais difundida geograficamente, com cerca de 90% dos casos (OMS, 2013). Por ser a de maior importância, por atingir um maior contingente e provocar morbidade associada ao dano linfático esse tipo de FL também é conhecido como Filariose bancroftiana (DREYER et al., 1996; NOROES, et al 1997). O mapa abaixo mostra as áreas endêmicas para a filariose linfática no mundo (Figura 1).

Figura 1 – Países e territórios endêmicos para a FL.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2007).

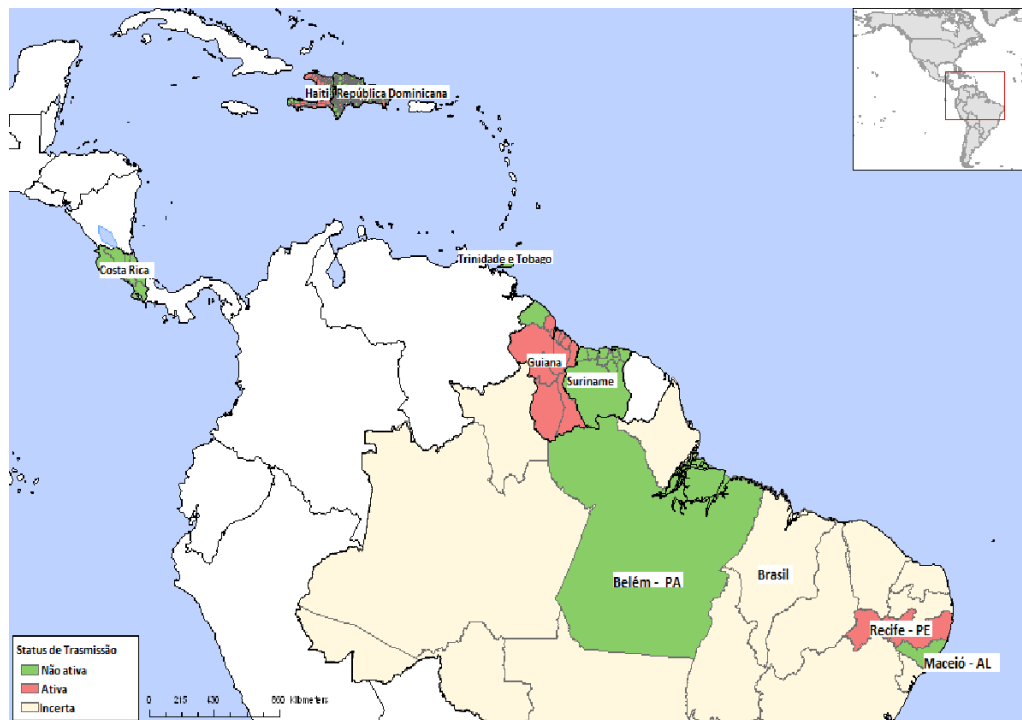
Estima-se em torno de 1,34 bilhões de pessoas vivendo em área de risco para a aquisição da doença, aproximadamente 20% da população mundial, em 83 países endêmicos

(MENDONZA et al., 2009; TAKAGI et al., 2011; CHANDY et al., 2011). E segundo a OMS, o número de infectados já ultrapassa 120 milhões de pessoas. Considerando que a maioria dos indivíduos que adquire a doença desenvolve a forma clínica assintomática, esse número pode ser bem mais elevado desde que milhares de pessoas vivem em áreas endêmicas e estão constantemente expostas ao risco de infecção (OMS, 2010).

Na América Latina, onde ocorre apenas uma infecção por Wb, quatro países são considerados áreas de transmissão ativas: Brasil, Guiana, República Dominicana e Haiti, o último com maior prevalência (OMS, 2013). Os estudos sobre a FL no Brasil tiveram início na década de 50 quando foram realizados inquéritos hemoscópicos demonstrando a transmissão autóctone em 11 cidades: Manaus (Amazonas), Belém (Pará), São Luis (Maranhão), Recife (Pernambuco), Maceió (Alagoas), Salvador e Castro Alves (Bahia), Florianópolis, São José da Ponta Grossa e Barra de Laguna (Santa Catarina) e Porto Alegre (Rio Grande do Sul) (RACHOU, 1960). Ao longo das últimas cinco décadas, milhares de exames hemoscópicos foram realizados anualmente nas populações residentes nas áreas endêmicas, seguindo-se o tratamento dos casos de microfilarêmicos detectados (BRASIL, 2009).

Atualmente, no Brasil, a parasitose apresenta distribuição urbana e nitidamente focal, sendo detectada transmissão apenas na Região Metropolitana do Recife, Jaboatão dos Guararapes e Olinda os municípios endêmicos na região (OPAS, 2015). Além disso, dados atuais demonstram a interrupção da transmissão em Belém e o seu controle em Maceió (Fontes, 2012). Na região metropolitana de Recife os ciclos de tratamento em massa utilizando DEC permitiram reduzir a prevalência de FL de 6,5% da microfilaremia em 1996 para 0% em 2014. Apesar de ter reduzido a prevalência da doença para Zero na cidade de Recife, a região metropolitana ainda é considerada o foco principal da FL no Brasil (OPAS, 2015) (figura 2). Acredita-se que no País há cerca de 3 milhões de pessoas que residem em áreas de risco, o que equivale, aproximadamente, a 1,8% da população total, e tem-se em média 49 mil pessoas infectadas pela *Wuchereria bancrofti* (BRASIL, 2009; OMS, 2006).

Figura 2—Territórios endêmicos da Filariose Linfática no Continente Americano



Fonte: Adaptado da Organização Pan-Americana de Saúde (2007).

Como esta enfermidade não possui reservatórios em potencial, a OMS reconheceu como problema de saúde pública e propôs em 1997 o Plano Global de Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL) que visa à erradicação da parasitose até o ano de 2020 (OMS, 2000). O PGEFL fundamenta-se em dois pontos para o controle da FL: o controle da infecção (transmissibilidade) e o controle da doença (morbidade). No que diz respeito à transmissibilidade, duas são as estratégias gerais consideradas para interromper a transmissão da infecção filarial: o tratamento da população e a diminuição do contato homem-vetor (DREYER; COELHO, 1997; OTTESEN et al., 1997).

De acordo com o PGEFL, a principal estratégia para interromper a transmissão da filariose é a redução da infecção em humanos através da administração de drogas antifilárias em massa, por dose única anual, durante quatro a seis anos (OMS, 2010; OTTESEN et al., 1997). A implantação da estratégia de Administração de Drogas em Massa (Mass Drug Administration - MDA) ou apenas tratamento em massa, associada à utilização de métodos de diagnóstico com elevada sensibilidade e especificidade e à seleção e monitoramento de grupos sentinelas, permitirá que o PGEFL tenha êxito na eliminação global da FL (ROCHA, et al., 2010). Desde sua implantação, o PGEFL, vem adquirindo uma grande evolução através do desenvolvimento de ações sistemáticas e da formalização de inúmeras parcerias com setores públicos e privados.

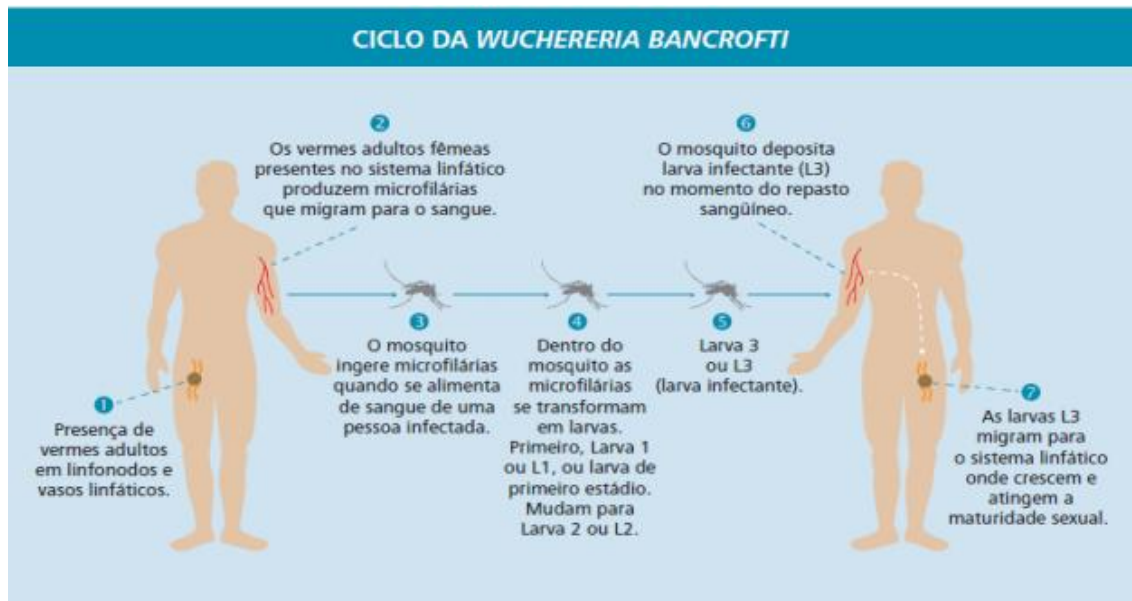
Fato este evidenciado no Brasil, onde a região nordeste, precisamente Pernambuco, mesmo ainda sendo um dos focos ativos da doença já apresentou uma queda vertiginosa no número de casos de filariose, cerca de 90% entre os anos de 2003 a 2010. Contudo, essa inter-relação de atividades não tem sido suficiente para garantir o sucesso do programa como um todo, diante disto, uma iniciativa essencial é a contínua participação ativa da comunidade científica, com o objetivo de promover medidas que garantam a progressão plena do PGEFL (OMS, 2004).

A transmissão da doença ocorre por meio do inseto da ordem Díptera, no Brasil, *Culex quinquefasciatus*, que é popularmente conhecido como “muriçoca”. O *C. quinquefasciatus* é um mosquito cosmopolita bem adaptado ao ambiente urbano e se desenvolve preferencialmente em pequenas quantidades de água estagnada rica em matéria orgânica. As larvas e ovos do inseto podem suportar a poluição, normalmente, ocasionada pelas deficiências de ações sanitárias efetivas que acompanhem a demanda da população (REY, 2001; PAILY et al., 2005).

A infecção do vetor ocorre quando este ao realizar o repasto sanguíneo ingere microfilárias, que chegam ao intestino médio do mosquito, perdem a bainha e atravessam o epitélio intestinal atingindo a hemocele. Migram para o interior das células musculares do tórax, onde passam por dois estádios (L1 e L2) de desenvolvimento morfológicamente distintos até atingirem a fase de larva infectante. Esta forma larvar (L3) é dotada de uma movimentação intensa e pode ser localizada tanto na cabeça, tórax ou abdome do mosquito (PAILY et al., 2005).

Ao realizar um novo repasto sanguíneo, ocorre a penetração da larva infectante (L3). Esta larva migra através da circulação sanguínea e se instala nos vasos linfáticos ou linfonodos, onde realiza duas mudas (L4 e L5) atingindo a fase adulta. As fêmeas adultas, por reprodução sexuada, liberam grande quantidade de embriões denominados microfilárias. Esta forma evolutiva apresenta um ritmo circadiano na circulação sanguínea, sendo encontrada nos vasos periféricos principalmente no período noturno, com horário de pico de 23h00min a 1h00min. No período diurno as microfilárias acumulam-se no interior da rede vascular sanguínea dos pulmões (DREYER; MEDEIROS, 1990). O ciclo biológico pode ser observado na figura 3.

Figura 3 – Ciclo biológico da *Wuchereria bancrofti*.



Fonte: Ministério da Saúde (Brasil 2009).

A doença atinge principalmente adultos jovens que, em áreas endêmicas, servem como indicadores da transmissão da doença (CHANDY et al., 2011). Essa infecção é inicialmente assintomática e possui a sua forma prolongada, debilitante e acarreta importantes consequências sociais, econômicas e individuais as populações afetadas (OMS, 2015).

A bancroftose caracteriza-se por apresentar uma ampla diversidade de manifestações clínicas, com sinais e sintomas que variam de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro definitivo e do estágio do parasito envolvido na infecção filarial (Turner et al. 2016). Essas expressões clínicas também são influenciadas pela idade e sexo dos indivíduos infectados, quantidade e localização dos vermes adultos, frequência de infecções bacterianas secundárias, tratamento específico prévio e os aspectos culturais da população (OMS, 2013).

A maioria dos indivíduos infectados é assintomática, estimando-se que, entre eles, cerca de 15 a 20% possam evoluir para doença filarial, havendo uma estreita relação entre a prevalência da infecção e a intensidade de transmissão com a ocorrência de manifestações clínicas na população (DREYER; NOROES, 1998). A infecção em relação aos seus níveis de microfírias pode ser classificada em amicrofilaremica, quando não há a presença de microfírias, apenas há a presença dos vermes adultos e microfilaremica quando existem microfírias circulantes. Além disso, a doença filarial pode ser causada tanto pelos vermes adultos quanto pelas microfírias. Os vermes adultos causam lesões primariamente nos vasos linfáticos, ao passo que as manifestações extra-linfáticas são decorrentes basicamente da ação das microfírias (AGUIAR-SANTOS et al., 2009).

Dentre as repercussões extra-linfáticas, as mais significativas são o comprometimento renal e a Eosinofilia Pulmonar Tropical (EPT). O dano renal é atribuído a uma ação direta das microfilárias que leva à hematúria, mas é também considerada por alguns autores a possibilidade de que a doença renal ocorra por deposição de imunocomplexos na membrana basal glomerular (DIXIT et al., 2007).

Apesar das várias formas de manifestação descritas acima, a grande maioria dos portadores da FL não tem sintomatologia aparente. Contudo, a literatura descreve que eles já apresentam algum dano linfático (SURESH et al, 1997). Esses indivíduos, assintomáticos, podem funcionar como fonte de infecção; e do ponto de vista epidemiológico, necessitam de atenção por contribuírem para dispersão da parasitose. Visto que uma pessoa infectada pode transmitir microfilárias por longos períodos, devido à longevidade dos vermes adultos, em geral 4 a 8 anos (BRASIL, 2009).

A droga indicada pela OMS é a dietilcarbamazina (DEC), por sua eficaz ação contra as microfilárias e os vermes adultos. O esquema terapêutico seletivo preconizado pela OMS é a utilização de 6 mg/kg durante 12 dias (OMS 2000). No entanto, essa recomendação não se aplica a programas de tratamento em massa em comunidades endêmicas, porque experiências anteriores mostraram que doses elevadas e diárias da DEC podem levar os indivíduos a recusarem ou abandonarem o tratamento (ANDRADE et al, 1997). Para o tratamento filarial em massa, sugere-se um esquema com DEC na dose única de 6 mg/kg, a qual pode causar importante redução e até mesmo a negatificação da microfilaremia em percentuais equivalentes aos do tratamento convencional preconizado pela OMS (TURNER et al. 2016). Uma outra droga antifilarial atualmente utilizada é a ivermectina (IV), sua ação é restrita por ser microfilaricida, tornando-se uma forte aliada na interrupção da transmissibilidade da doença (DREYER;ROCHA, 1996; DREYER;COELHO, 1997). No entanto, essa droga ainda não mostrou ser útil na substituição da DEC, por não ter ação sobre os vermes adultos da filariose (DREYER et al., 1995). Atualmente o programa de administração de droga utiliza o DEC conjugado com o albendazol, ou a ivermectina mais o albendazol (CHANDY et al., 2011).

2.2 DIAGNOSTICO LABORATORIAL

As dificuldades em realizar o diagnóstico da FB decorrem, em parte, da grande diversificação das manifestações clínicas, dependentes de fatores relacionados com o parasita,

quanto a resposta imunológica apresentada pelo paciente e outros co-fatores (OLIVEIRA, 2003). O diagnóstico laboratorial da infecção filarial é tradicionalmente baseado na pesquisa do parasita, tanto pela detecção do embrião na corrente sanguínea, como pela identificação do verme adulto, vivo ou morto (DREYER; ROCHA, 1996).

2.2.1 Diagnóstico Parasitológico

De acordo com OMS, o diagnóstico parasitológico se baseia na pesquisa de microfilárias no sangue periférico, colhido em horário compatível com a periodicidade do parasito na região. A pesquisa parasitológica pode ser realizada através de técnicas como a gota espessa de sangue, concentração de Knott e filtração de sangue em membrana de polycarbonato, nas quais a coleta sanguínea deve ocorrer entre 23h00min a 01h00min (DREYER et al, 1996).

A gota espessa é a mais utilizada em inquéritos epidemiológicos, por ser prática e de baixo custo, colhido por punção capilar digital (20 a 100 μ L). Em seguida, a amostra é fixada e corada (eosina-giemsa) sendo analisada em microscopia óptica. É um método de diagnóstico altamente específico para a filariose, mas, no entanto, sua baixa sensibilidade impede a utilização em situações em que os parasitados se mostram com baixa microfilaremia ou amicrofilarêmicos, esse fato pode ser observado na maioria dos métodos parasitológicos (SILVA et al, 2004).

A técnica descrita por Knott em 1939 foi o primeiro método a utilizar a concentração de sangue no diagnóstico filarial. Por meio da concentração sanguínea aumenta-se a sensibilidade do diagnóstico laboratorial. A técnica permite a utilização de 1 ml de sangue venoso diluído em 9 ml de formalina a 2 %. O método laboratorial que se segue, envolvendo um processo de sedimentação, aumenta a sensibilidade do exame. Além disso, por usar a formalina, que fixa e conserva as estruturas da microfilária, esta técnica possibilita que o exame microscópico laboratorial seja realizado vários dias após a coleta de material realizada no campo (MELROSE et al, 2004). Entretanto, por ser bastante laboriosa, essa técnica é pouco utilizada em campo.

A filtração em membrana de Polycarbonato (FMP) é considerada como o “padrão ouro” para investigação e quantificação da microfilaremia. A FMP apresenta uma elevada sensibilidade no diagnóstico filarial, por ser a técnica que possibilita a investigação de

microfilárias em até 10 ml de sangue total utilizando uma única membrana, porém tem um custo elevado em relação aos métodos parasitológicos descritos anteriormente. Baseia-se na passagem de sangue venoso através de uma membrana (Milipore ou Nuclepore) de diâmetro de 13 a 25 mm e poros de 5 ou 3 μm . Essa técnica, assim como a de Knott, permite a identificação de indivíduos com baixíssimas parasitemias (quantidade de microfilárias não-detectáveis pela técnica de gota espessa) (ROCHA, 2004).

O diagnóstico parasitológico do doente é particularmente difícil em pacientes que apresentam sintomas inflamatórios e se encontram na fase crítica, ou que apresentam quadro pulmonar (eosinofilia pulmonar tropical), situações nas quais as microfilárias estão normalmente ausentes do sangue periférico. Por essa razão avaliações imunológicas e de biologia molecular têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas (SILVA et al., 2008).

2.2.2 Diagnóstico Imunológico

O teste de Og4C3 foi o primeiro a tornar-se disponível comercialmente sob a forma de kit utilizando a técnica do ensaio imunoenzimático (TropBio 1996). Segundo More & Copeman (1990), O Og4C3 é um anticorpo monoclonal da classe das imunoglobulinas IgM, obtido contra a *Onchocerca gibsoni*, um filarídeo bovino, que identifica fortemente antígenos de *W. bancrofti*. A maior vantagem da detecção de antígenos circulantes é que seus níveis permanecem constantes durante o dia, não importando, desta forma, o horário de coleta de sangue para realização do teste. Em pacientes microfilarêmicos, sua sensibilidade chega a ser 100% para aqueles com microfilaremia de 30mf/ml de sangue, embora somente 72% a 75% em pacientes com baixa parasitemia (1mf/ml de sangue) sejam diagnosticados (DREYER et al., 1996). O diagnóstico sorológico, utilizando-se o anticorpo monoclonal Og4C3, oferece boa sensibilidade para detectar a infecção bancroftiana; contudo, sua especificidade ainda precisa ser melhor avaliada em indivíduos que compartilham de outras infecções parasitárias (ROCHA, 2000). Já houve relato de reação cruzada do Og4C3 em pacientes portadores de dracunculíase (BLOCH et al., 1998). Assim, é importante ter cautela ao interpretar um teste positivo de antigenemia em paciente procedente de uma área com concomitância de filariose bancroftiana e outras parasitoses (ROCHA et al., 1996).

O ICT é um teste que utiliza o AD12, uma imunoglobulina de classe IgG, como captador de antígenos filariais circulantes, padronizado sobre a forma de cartão, e utiliza a

imunocromatografia rápida, permitindo um diagnóstico rápido da doença. Esse teste, segundo Weil e colaboradores (1997), é capaz de reconhecer antígenos filariais de 200 KD. É um teste de imunodiagnóstico *in vitro* para detecção de antígenos de *W. bancrofti* em sangue total, plasma ou soro. Baseia-se em uma interação que ocorre entre anticorpos monoclonal e policlonal, na presença de antígeno filarial circulante, que é revelada através de reação colorimétrica (WEIL et al., 1997). O AD12 parece ter como propriedade a capacidade de reconhecer a presença de antígenos do parasito adulto, independente da presença ou ausência de microfilárias (ROCHA, 2004). Porém o ICT possui uma sensibilidade variável, uma vez que, por se tratar de um teste qualitativo, sua interpretação varia de acordo com a habilidade do observador que está realizando o exame, acarretando eventuais resultados falsos positivos ou negativos (ROCHA, 2004).

A utilização de ambos os testes, após tratamento anti-filarial bem-sucedido, é um fator que precisa ser aprimorado, já que esses testes não conseguem diferenciar uma infecção presente de uma passada, podendo permanecer circulante naqueles indivíduos curados por vários anos. Por esse motivo não devem ser utilizados como critério de cura (DREYER; MATTOS; NORÕES, 2005).

Testes de anticorpos têm sido utilizados para mapear e monitorar a distribuição da filariose em países e regiões que estabeleceram programas de eliminação baseados no tratamento em massa da população. Além disso, o teste tem sido aplicado em indivíduos com sinais clínicos da filariose. Anteriormente esse tipo de técnica era restrita devido à carência na sensibilidade e/ou especificidade ou ainda devido à falta de padronização (WEIL et al., 2010).

A Companhia Cellabs (Brookvale, NSW, Austrália) desenvolveu um teste “*CELISA Test*” baseado em um ensaio Imuno-enzimático (ELISA) indireto, detecta anticorpos (IgG4) para o antígeno recombinante Bm14 e pode ser realizada com soro, plasma ou sangue coletado em qualquer horário do dia. O Teste (IgG4 – anti-Bm14 filarial) tem sido estudado para a identificação de indivíduos expostos à infecção na ausência de outra evidência de confirmação (WEIL et al., 2010). Estudos anteriores demonstraram que esse teste é um marcador sensível de infecção ou alta exposição aos parasitas filariais (CHANDRASHEKAR et al., 1994; RAMZY et al., 1995; LAMMIE et al., 2004; WEIL et al., 1999).

2.2.3 Diagnóstico Molecular

Nos últimos anos, a biologia molecular, também, obteve avanços e contribuições importantes, não apenas para o diagnóstico da FB, como também de outras patologias. A utilização das ferramentas de biologia molecular nos estudos da filariose teve início a partir do ano de 1980, quando muitos pesquisadores deram ênfase e desenvolveu-se o procedimento de isolar e caracterizar seqüências de DNA filarial espécie-específicas (ROCHA; AYRES; FURTADO, 2002).

Na década de 90 foi constatado que o genoma da *W. bancrofti* tem seqüências curtas e repetidas (DISSANAYAKE; MIN; PIESSENS, 1990). Posteriormente, Raghavan e colaboradores, em 1991, construíram uma biblioteca de expressão (cDNA). Desta forma, tem-se demonstrado que o genoma de *B. malayi* e de *W. bancrofti* é formado por cerca de 70 a 80% de pares de bases do tipo timina – adenina (XIE; BAIN; WILLIAMS, 1994). Essas seqüências são distribuídas de forma altamente repetitiva e enfileirada (em tandem), sendo designadas de “famílias repetitivas” ((DISSANAYAKE; MIN; PIESSENS, 1990; ZHONG et al., 1996).

Logo, quatro seqüências de famílias, gênero e espécie-específicas foram identificadas por genoma haplóide, dispersas no genoma de *W. bancrofti*, podendo ser utilizadas com o propósito de diagnóstico: 1) pWB35, com 1.300 pares de base e 500-1.000 cópias (DENHAM; McGREEVY, 1977); 2) pWb12, com 969 pares de base e 450-700 cópias (SIRIDEWA et al., 1994); 3) SspI, com 195 pares de base e 300 cópias (ZHONG et al., 1996) e 4) AccI, com 254 pares de base, não tendo sido determinado o número de cópias (ABBASI et al., 1999). Essas quatro seqüências de famílias repetitivas têm sido utilizadas na construção dos primers (iniciadores) que permitem uma alta sensibilidade e especificidade na detecção do DNA do gênero *Wuchereria* (OMS, 1993; WILLIAMS et al., 1999).

2.2.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Nas abordagens de diagnóstico molecular, a PCR apresenta-se como uma técnica que possibilita uma grande aplicação no campo das doenças infecto-parasitárias. Uma das suas principais aplicações atualmente, para a filariose bancroftiana, é no diagnóstico dos vetores infectados, sem precisar fazer a dissecação manual destes, podendo detectar DNA de uma única larva L3 em um pool com vários mosquitos (CHANTAEU et al., 1994;

NICOLAS;SCOLES, 1997). Muitos pesquisadores, utilizando essa técnica, estão trabalhando para detectar DNA de *W. bancrofti* nos diversos fluidos biológicos humanos, tais como sangue total, plasma, urina, líquido hidrocélico e secreção pulmonar (ZHONG et al., 1996; ABBASI et al., 1999; LUCENA et al.,1998; HASSAN et al., 2005). Além disso, a PCR possibilita a detecção das diferentes espécies de filarias em áreas onde coexistem mais de um tipo, esta técnica conhecida como PCR-RFLP vem sendo muito utilizada para a rápida detecção e diferenciação das espécies (THANOMSUB et al.,2000; NUCHPRAYOON et al.,2005; JIMENEZ et al., 2011).

Recentemente, para aumentar a sensibilidade e a especificidade da detecção, a técnica de PCR sofreu algumas adaptações, como por exemplo, a dupla amplificação. A grande sensibilidade destes sistemas os torna altamente recomendado para a detecção de alvos com baixo número de cópias (DUPIN et al., 2002). Nesta modalidade de PCR, se encontra a Nested PCR que consiste na utilização de quatro primers. O ensaio se realiza em duas etapas consecutivas (duas PCRs simples). Na primeira etapa, uma sequência maior de DNA alvo é amplificada com um par de iniciadores externos. Uma alíquota, do produto assim obtido, é então submetida à segunda etapa, para amplificação de uma sequência interna do DNA alvo, usando-se um par de iniciadores internos (internos em relação à posição de anelamento do primeiro par utilizado) (MELO, 2006). Assim, ao final desta última etapa tem-se amplificada a sequência alvo interna que pode ou não se sobrepor a uma das terminações finais da sequência alvo maior (PINGON et al., 1990). Também se tem a Semi-Nested PCR que é uma variante da Nested PCR que se diferencia dessa por utilizar, apenas, três primers onde um destes se repete nas duas reações. Esses sistemas foram utilizados, com alta eficiência, para a detecção de DNA de *Wuchereria bancrofti* em amostras de sangue de pacientes (KANJANAVAS et al., 2005; JIMENEZ et al., 2011).

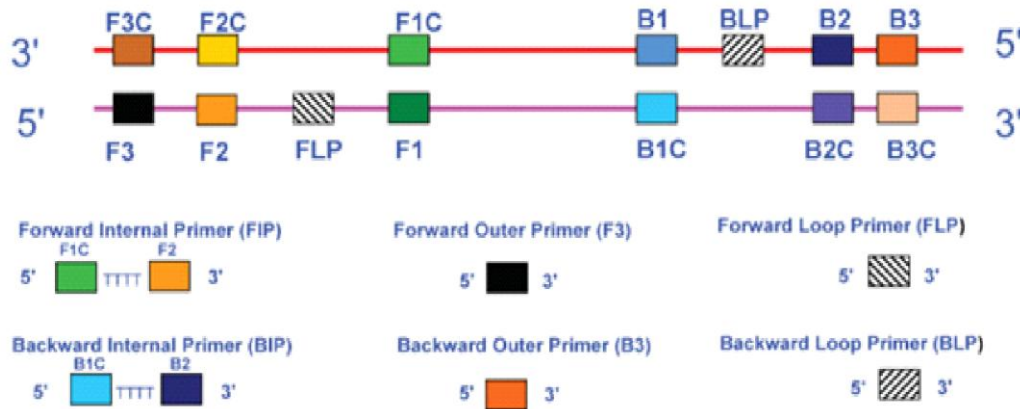
2.2.3.2 Amplificação Isotérmica em Alça (LAMP)

A técnica de Amplificação Isotérmica em Alça (do inglês *Loop-mediated isothermal amplification* – LAMP) descrita por Notomi et al (2000), é um teste simples e que não requer o uso de termocicladores (POON et al., 2006), o que tem atraído muita atenção para esta técnica de amplificação de nucleotídeos potencialmente rápida, acurada e com um bom custo-benefício.

O LAMP tem muitas características que o tornam adequado para uma detecção simples e rápida de ácidos nucleicos em amostras (MORI; NOTOMI, 2009). É uma técnica inovadora para amplificação de genes, que consiste, basicamente, na amplificação isotérmica do DNA alvo utilizando seis *primers* diferentes (Figura 1), sendo dois *primers* internos (FIP e BIP), dois *primers* externos (F3 e B3) e dois *primers* que hibridizam na volta formada (FLP, BLP), especialmente desenhados para amplificar oito regiões no gene alvo (PARIDA et al., 2008). O uso destes seis *primers* melhora a especificidade do teste ao mesmo tempo em que melhora a velocidade da reação (BOEHME et al., 2007).

Durante o processo de amplificação, o DNA forma voltas propiciadas pelas seqüências dos *primers* internos, pois os mesmos possuem duas regiões distintas, sendo uma complementar ao gene alvo (F2 complementar a F2c – FIP - e B2 complementar a B2c - BIP) e outra complementar a fita em formação (F1c complementar a F1 - FIP - e B1c complementar a B1 - BIP). Vale salientar que entre as duas regiões distintas contidas nos *primers* internos há uma seqüência rica em timina, o que evita seu pareamento com a fita molde (MORI; NOTOMI, 2009). Os *primers* que hibridizam na volta formada são facultativos na reação, sendo utilizados para acelerar o processo de amplificação, por pareamento em sítios adicionais que não são acessados pelos *primers* internos (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002). A amplificação ocorre em temperatura constante, cerca de 63°C, pois utiliza a *Bst* polimerase, uma enzima com atividade de separação de dupla fita de DNA, mas que não possui atividade de exonuclease 5' – 3' (PARIDA et al., 2008). Esta temperatura constante utilizada na técnica diminui a possibilidade de formação de bandas inespecíficas (BOEHME et al., 2007).

Figura 4 - Esquematisação dos seis primers utilizados na reação de LAMP, mostrando suas posições de hibridização com o gene alvo.



Fonte: PARIDA *et al.*, 2008

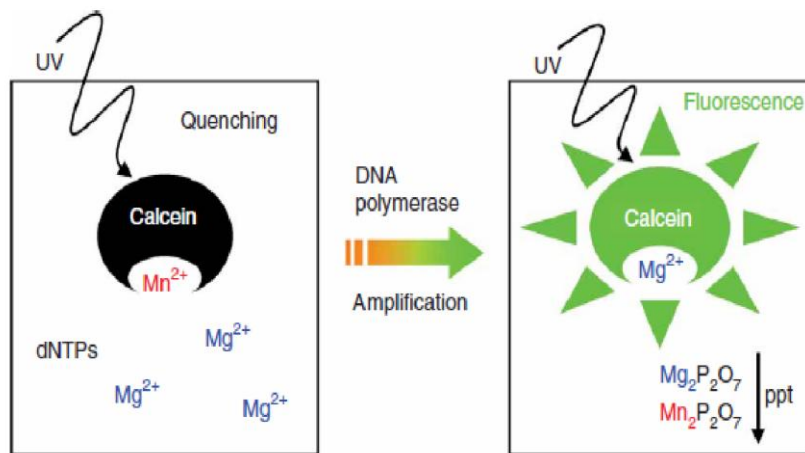
Após a amplificação o resultado pode ser observado no próprio tubo, dispensando o uso de técnicas de observação tradicionais, já que durante o processo de amplificação há alteração da turbidez da amostra por formação de precipitado branco decorrente da acumulação de pirofosfato de magnésio em proporção aos produtos amplificados, sendo assim, ideal para monitoração a olho nu ou análise por espectrofotômetro. O LAMP é processado rapidamente, durando cerca de 15 a 60 minutos (PARIDA *et al.*, 2008).

Adicionalmente, para observação destes resultados podem ser utilizados os fluorescentes *SYBR Green I* ou a calceína, reagentes de baixo custo que potencializam a observação da turbidez da amostra. O corante *SYBR Green I* pode ser observado através de luz UV ou luz normal. Contudo, ao ser adicionado no início da reação, este corante inibe a reação de amplificação, impossibilitando a sua adição prévia na reação. Para burlar esta desvantagem este corante geralmente é adicionado após a ocorrência da reação para marcar os produtos do LAMP. No entanto, isto envolve a abertura dos tubos de reação, o que pode levar a contaminação do material por material exógeno. (TAO *et al.*, 2011).

Recentemente, um método efetivo de observação do resultado foi desenvolvido por Tomita *et al.* (2008) utilizando a calceína (complexo de fluoresceína), um indicador metálico que gera uma forte fluorescência formando complexos com íons metálicos divalentes, como cálcio e magnésio. Contudo, estes autores observaram que a fluorescência obtida adicionando somente calceína não foi suficiente para a observação a olho nu. Então resolveram adicionar íon de manganês, os quais irão se ligar aos íons pirofosfato produzidos durante o curso da

reação de amplificação, fazendo com que a calceína produza fluorescência em uma reação positiva (Figura 5). A simplicidade e clareza desse método deve torná-lo aplicável até mesmo para laboratórios com recursos limitados em áreas rurais dos países em desenvolvimento (MORI; NOTOMI, 2009).

Figura 5 – Esquematisação da ação da calceína e dos íons de manganês para a formação de fluorescência.



Fonte: TOMITA et al., 2008

Ainda em relação à observação da reação de amplificação, também podem ser utilizados o brometo de etídeo, que é carcinogênico, e o turbidímetro, um equipamento caro que serve para medir a turbidez da amostra (ADAMS et al., 2010).

O LAMP é uma ferramenta para diagnóstico precoce, simples e prático para detecção e identificação de doenças infecciosas (PARIDA *et al.*, 2008). Considerando as vantagens da rápida amplificação, operação simples, baixo custo, alta sensibilidade e fácil detecção, além de ser altamente específico, o LAMP tem aplicações potenciais para diagnóstico clínico, assim como para vigilância de doenças infecciosas em países em desenvolvimento, sem que haja requerimento de equipamentos sofisticados (PARIDA *et al.*, 2008; MORI; NOTOMI, 2009).

Tem sido demonstrado que o LAMP exibe menor sensibilidade a substâncias inibitórias presentes em amostras biológicas do que a PCR. Esta robustez do LAMP contra estes inibidores pode contribuir para economizar tempo e custos requeridos nas etapas de processamento de amostras (MORI; NOTOMI, 2009).

As desvantagens observadas para a técnica começam no desenho dos seis primers que são utilizados na reação, fazendo com que alguns pesquisadores não arrisquem em utilizar

esta técnica em suas pesquisas. O uso de um software livre desenvolvido para o desenho destes *primers* pode prover *primers* candidatos para a sequência desejada e suprir esta dificuldade (MORI; NOTOMI, 2009). Também foi relatada a necessidade da pureza, através de HPLC, dos *primers* FIP e BIP, assim como a disponibilidade restrita dos reagentes a alguns países (PARIDA et al., 2008).

O método do LAMP tem sido desenvolvido em forma de kits comerciais, sendo alguns deles adotados como método oficialmente recomendado para identificação de microrganismos na rotina e vigilância epidemiológica no Japão. Essa técnica já tem sido testada para diversos organismos causadores de doenças alimentares, assim como para o diagnóstico de outros patógenos importantes, incluindo o vírus do sarampo, papiloma vírus humano, vírus da caxumba, oocistos de *Cryptosporidium*, *Vibrio cholerae*, Tuberculose, Malária (MORI; NOTOMI, 2009), e outras protozooses como as causadas pelo gênero *Plasmodium* e *Trypanosoma*, apresentando alta eficácia. (ADAMS et al., 2010).

3 RESULTADOS

3.1 IDENTIFICAÇÃO DO DNA DE *Wuchereria bancrofti* EM AMOSTRAS DE URINA COM A TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA EM ALÇA (LAMP) EM TUBO FECHADO

Introdução

A Filariose Linfática (FL) faz parte do grupo de doenças negligenciadas causadas pelos helmintos de *Wuchereria bancrofti* (Wb), *Brugia malayi* e *B. timori*, e é transmitida por muitos gêneros de mosquitos (Burkot, 2006; Small, 2014). Estima-se que 1,4 bilhão de pessoas em todo o mundo correm o risco de adquirir esse parasita e também precisam de quimioterapia preventiva para prevenir a transmissão e o surgimento de novos casos da doença (Michael e Sight, 2016; Turner et al., 2016).

Por muitos anos, o diagnóstico de FL depende da detecção de microfilárias no sangue periférico coletado à noite. Da mesma forma, estudos sobre a prevalência de Wb em mosquitos foram tradicionalmente confiados à dissecação manual e ao exame dos investidores (Weil, 2000). Testes imunológicos podem detectar antígenos circulantes de Wb, como o teste imunocromatográfico (teste de cartão AD12-IC) e o ensaio imunoenzimático (Og4C3-Elisa), ou serem desenvolvidos na detecção de anticorpos como o teste de anticorpo antimalárico Bm-14. Os testes têm boa sensibilidade e especificidade e a coleta pode ser feita a qualquer hora do dia (Rocha et al., 2009; Weil et al., 2011). No entanto, nos testes imunológicos, houve relato de reatividade cruzada de Og4C3 em pacientes com dracunculose (BLOCH et al., 1998).

Desta forma, outros testes diagnósticos foram desenvolvidos para a detecção do DNA de Wb via técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa metodologia foi usada tanto em mosquitos quanto em amostras de fluidos biológicos humanos (Koussi et al., 2015; Ximenes et al., 2014). Uma amplificação de loop isotérmico (LAMP) foi descrita na detecção de DNA de Wb em amostras de sangue de mosquitos e humanos (Takagi et al., 2011; Koussi et al., 2015). A técnica LAMP vem ganhando terreno porque é rápida, sensível, específica e fácil de usar em nível de campo. LAMP tem as vantagens de trabalhar a uma temperatura constante, sem a necessidade de instrumentos sofisticados, como termocicladores, além de ter boa sensibilidade e especificidade, o que facilita seu uso no diagnóstico em campo. O objetivo

do presente estudo foi otimizar e aplicar a técnica de LAMP para detectar DNA de Wb em amostras de urina.

Métodos

População alvo e considerações éticas - As amostras foram coletadas no período de 2007 a 2015, na região metropolitana de Recife (PE). Posteriormente, os participantes assinaram um termo de consentimento para amostras biológicas obtidas a partir de sangue total, soro e urina. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CAE 48287915.7.0000.5190).

Testes laboratoriais - Os pacientes foram rastreados usando o teste de cartão ICT, FMP (Nucleopore®) e Og4C3-ELISA (TropBio®, Pty Ltd, Townsville, Queensland, Austrália). 50 ml de urina foram coletados durante o dia e 50 µl de 10 mM EDTA foi adicionado para posterior extração e diagnóstico molecular.

Extração e purificação de DNA - Para otimizar o sistema LAMP, foram extraídos os vermes WB adultos da base de dados NCLF, usando o kit de extração Kit de Centrifugação da Genomic Prep Ilustrativa (GE Healthcare, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. Um estudo de especificidade da técnica foi realizado utilizando o DNA de espécies que coexistem em áreas onde a Wb é considerada endêmica. Assim, o DNA foi quantificado em um espectrofotômetro e as amostras armazenadas a -20 ° C. O DNA foi extraído da urina usando o método do fenol clorofórmio como descrito por Sambrook et al. (1989). As amostras foram armazenadas a -20 ° C.

LAMP - Os iniciadores utilizados foram F3 (TTTGATCATCTGGGAACGT), B3c (AAGCACCTTAAATCTGTCAAT), FIP (CGACTGTCTAATCCACAGAGTG-TATCCCCATAGAACTACTACG) e BIP (TCTGCTGAATTTTGTGGATTGCCAACTAATTGTAAGCAGTCTT) descritos por Takagi et al. (2011). 1 mL de SYBR GREEN foi colocado na tampa dos tubos e colocado por 10 minutos para secagem em forno a 56 ° C. Os tubos foram então utilizados para realizar a reação ao volume final de 25 mL contendo 50 pmol de cada primer interior, 5 pmol de cada iniciador externo, 20 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 8 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 1,4 mM dNTPs, 0,4 M betaa,

0,1% Tween 20, 8 unidades de Bst 2.0 Warmstart DNA Polymerase e 2 µl de DNA modelo. Em cada reação de amplificação, um tubo contendo todos os componentes da mistura foi usado na ausência de DNA molde, o controle negativo. As amplificações foram realizadas a temperatura constante em banho-maria ou em placa térmica. A temperatura de amplificação foi de 65 ° C e duração de 60 minutos. Quando os tubos foram removidos do banho de água ou da placa térmica, a reação de SYBER GREEN da tampa do tubo foi misturada e os resultados foram visualizados à luz ambiente. Os produtos LAMP também foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados em luz ultravioleta.

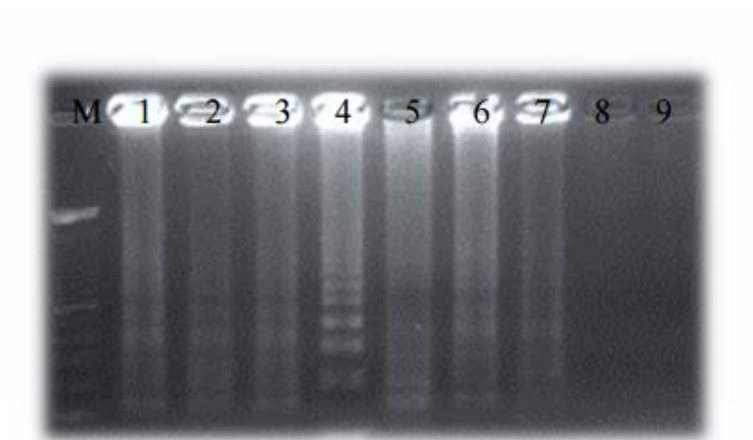
Avaliação do limite de detecção dos sistemas - A avaliação do limite de detecção da técnica envolveu a construção de uma curva de diluição baseada em quantidades previamente medidas de DNA purificado de vermes Wb adultos para avaliar a quantidade mínima de DNA que os sistemas em estudo eram capazes de amplificar. Diluições seriadas de fator de 10 foram realizadas nas seguintes concentrações: 0,5 ng / µl, 50 µg / µl, 5 µg / µl, 0,5 µg / µl, 50 µg / µl, 5 µg / µl, 0,5 µg / µl e 0,05 µg / µL. Posteriormente, 2 mL de cada diluição foi adicionado às reações.

Avaliação da especificidade dos sistemas - A especificidade dos primers foi confirmada experimentalmente por amplificações utilizando 1 ng de DNA purificado de uma variedade de parasitas não filarianos (*Schistosoma mansoni*, *Homo sapiens*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* e *Ascaris lumbricoides*).

Resultados

Foram obtidas 30 amostras de indivíduos: 16 do sexo masculino e 14 do feminino, com idade variando de 19 a 54 anos e média de idade de aproximadamente 32 anos. Todos os 30 indivíduos foram avaliados por TIC, QMF, Og4C3-ELISA e LAMP. Neste último exame, amostras biológicas de urina foram avaliadas. Todos os indivíduos foram positivos para as TIC. Foram diagnosticados 15 indivíduos microfilarêmicos (14-530 mf / mL). Uma amostra foi negativa para Og4C3 e LAMP. O limite de detecção para LAMP foi de 1 fg (Figuras 6 e 7).

Figura 6 - limite de detecção de LAMP. M - marcador de peso molecular (100 pb), 1-8: escala de diluição de DNA de 1 ng - 0,01fg, 9 - controle negativo



Fonte: autor.

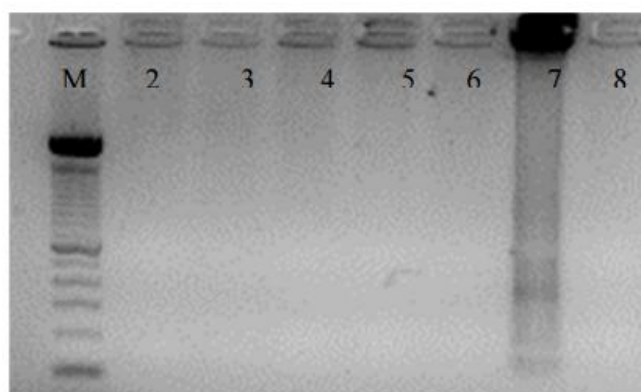
Figura 7—Os tubos após a reação LAMP com SYBR Green. As amostras positivas ficam verdes e os negativos ficam laranja.



Fonte: autor.

Para o sistema LAMP não houve aplicação de outras espécies, apenas DNA de Wb (figura 8).

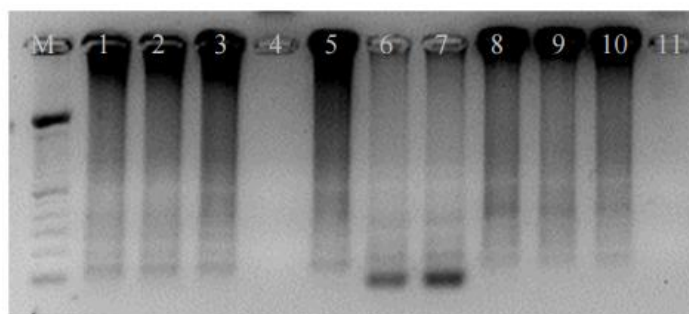
Figura 8—Especificidade da reação de LAMP. M: marcador de peso molecular (100 pb). 1 - 5: amostras de *Schistosoma mansoni*, *Homo sapiens*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* e *Ascaris lumbricoides*, respectivamente; 6: controle positivo, 7: controle negativo.



Fonte: autor.

O sistema também foi testado no soro de humanos não infectados e não houve amplificação (dados não mostrados). Para LAMP, 29 amostras foram positivas em amostras de urina (figura 9).

Figura 9: Amostras de urina dos pacientes. M: marcador de peso molecular; 1-9: amostras de urina do paciente; 10: controle positivo; 11: controle negativo.



Fonte: autor.

Discussão

O sucesso da técnica de LAMP aplicada na detecção rápida e específica de infecções por helmintos e protozoários tem sido relatada como a técnica descrita por Takagi et al. (2011) para detecção de Wb. O presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento da técnica em diferentes fluidos biológicos, uma vez que a disponibilidade de testes diagnósticos rápidos e precisos tem sido enfatizada pela OMS como um meio de monitorar, verificar, eliminar e fornecer vigilância FL (Klepac et al. 2013).

Apesar da alta sensibilidade, a técnica LAMP apresenta desvantagens, como a contaminação cruzada do produto. Esta é uma questão importante, considerando relatos na literatura cujas amostras, incluindo o controle negativo, são positivas (Parida et al., 2005; Agantamuthus et al., 2014). O motivo de contaminação não foi esclarecido corretamente, mas a chance de contaminação é maior quando as tampas dos tubos são abertas no final da reação para adicionar corante para fins de visualização do resultado (Lau et al., 2010).

A LAMP utilizada no presente estudo baseia-se na descrita por Takagi et al. (2011), mas por não conseguir reproduzir os mesmos resultados, essa técnica passou por uma otimização. No presente estudo foi possível obter um limite de detecção de 1 fg, sendo superior ou equivalente a várias técnicas de detecção de DNA de Wb descritas em PCR, nested-PCR, RT-PCR (Nuchprayoon S., 2009, Wijegunawardana et al. (2004), Abdel-Shaf et al. 2017). Além disso, nosso estudo também utilizou a instalação da SYBER na tampa do

tubo, o que reduz a risco de contaminação, já que não é necessário abrir a tampa para colocar o reagente de visualização. Nosso estudo mostrou que o sistema LAMP testado produziu 29 de 30 resultados positivos em amostras de urina coletadas durante o dia de indivíduos infectados com Wb.

A detecção de DNA de Wb na urina utilizando LAMP é uma alternativa muito promissora, pois utiliza um método não invasivo de coleta e em diferentes estados parasitológicos. Segundo Takagi et al. (2011) e Koussi et al. (2015), embora algumas técnicas de detecção de DNA por PCR tenham mais sensibilidade e especificidade, elas também apresentam desvantagens para o uso em campo, como a necessidade de um termociclador. A eletroforese em agarose também é um passo necessário para obter o resultado de uma PCR; Para LAMP, o diagnóstico pode ser feito visualmente após a reação usando um bloco de aquecimento ou um banho de água. Além disso, o custo por teste LAMP é inferior a US \$ 0,82, comparado a mais de US \$ 2,2 da PCR, incluindo o custo da eletroforese.

Diante do exposto, nosso estudo demonstra a possibilidade de aplicar a técnica LAMP para detectar *Wuchereria bancrofti* em amostras de urina. Foi demonstrada a ótima sensibilidade da técnica, sua especificidade e possível campo de uso, uma vez que ela pode ser realizada apenas em banho-maria e os resultados obtidos podem ser visualizados a olho nu.

Referências

Molecular identification and phylogenetic analysis of *Wuchereria bancrofti* from human blood samples in Egypt. **Epub.** v.16, n.3, p. 963-970. 2017.

Angamuthu R., Baskaran S., Gopal D.R., Devarajan J., Kathaperumal K. Rapid detection of the Marek's disease viral genome in chicken feathers by loop-mediated isothermal amplification. **J. Clin. Microbiol.** v.50, n.3, p.961–965. 2012.

Burkot TR, Durrheim D, Melrose WD, Speare R, Ichimori K. The argument for integrating vector control with mass drug administration campaigns to ensure elimination of lymphatic filariasis. **Filaria J**, v.5, p.10, 2006.

Klepac P, Metcalf CJ, McLean AR, Hampson k. Towards the endgame and beyond: complexities and challenges for the elimination of infectious diseases Philos. Trans. R. **Soc. B: Biol.Sci.** v.1623, p.201. 2013.

Kouassi BL, de Souza DK, Goepogui A, Narh CA, King SA, Mamadou BS, Diakité L, Dadzie SK, Boakye DA, Utzinger J, Bockarie MJ, Koudou BG. Assessing the presence of *Wuchereria bancrofti* in vector and human populations from urban communities in Conakry, Guinea. **Parasit Vectors.** v.26, n.8, p.492, 2015.

Lau Y.L., Meganathan P., Sonaimuthu P., Thiruvengadam G., Nissapatorn V., Chen Y. Specific, sensitive, and rapid diagnosis of active toxoplasmosis by a loop-mediated isothermal amplification method using blood samples from patients. **J. Clin. Microbiol.** v.48, n.10, p.3698–3702.2010.

Michael E, Singh BK. Heterogeneous dynamics, parameter sloppiness, robustness/fragility trade-offs, and the eradication of the macroparasitic disease, lymphatic filariasis. **BMC Med.** v.14, p.14.2016.

Nuchprayoon S. DNA-based diagnosis of lymphatic filariasis. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.** v.40, n.5, p.904-13. 2009.

Parida, M. et al. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 6, p. 2895-903. 2005.

Rocha A, Braga C, Belém M, Carrera A, Aguiar-Santos A, Oliveira P, Texeira MJ; Furtado A. 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. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.104, n 4, p. 621-5. 2009.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Small ST, Tisch SJ, Zimmerman PA. . **Infection, Genetics and Evolution.** v.28, p. 33-34. 2014.

Takagi, H. et al. Development of loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Wuchereria bancrofti* DNA in human blood and vector mosquitoes. **ernational.** v.60, n.4, p.493-7, 2011.

Turner HC, Bettis AA, Chu BK, McFarland DA, Hooper PJ, Ottesen EA, Bradley MH. The health and economic benefits of the global programme to eliminate lymphatic filariasis (2000 – 2014). **Infect Dis Poverty.** v.24, n.51, p.54, 2016

Ximenes C, Brandão E, Oliveira P, Rocha A, Rego T, Medeiros R, Aguiar-Santos A; Ferraz J, Reis C, Araujo P, Carvalho L, Melo F. Detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in paired serum and urine samples using polymerase chain reaction-based systems. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.** v.109, n.8, p .978-983. 2014.

Weil GJ, Curtis KC, Fischer PU, Won KY, Lammie PJ, Joseph H, Melrose WD, Brattig NW. A multicenter evaluation of a new antibody test kit for lymphatic filariasis employing recombinant *Brugia malayi* antigen Bm-14. **Acta Tropica**, v.20, n.1, p.19-22. 2011.

Weil GJ, Ramzy RM. Diagnostic tools for filariasis elimination programs. **Trends Parasitology.** v.23, n.2, p.78-82, 2007.

Wijegunawardana AD, Gunawardane NS, Hapuarachchi C, Manamperi A, Abeyew. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.3, n.5, p.381-387. 2013.

3.2 VALIDAÇÃO DE LAMP E SISTEMAS CONVENCIONAIS BASEADOS EM PCR PARA O DIAGNÓSTICO DE *Wuchereria bancrofti* EM AMOSTRAS DE SORO

Introdução

Tradicionalmente, o diagnóstico da filariose bancroftiana é feito pela investigação de microfilárias no sangue periférico, coletadas em horário compatível com a periodicidade do parasita na região. A pesquisa parasitológica pode ser realizada utilizando técnicas como esfregaço de sangue espesso, concentração de Knott e filtração sanguínea na membrana de polycarbonato (MELROSE et al, 2004). A filtração por membrana de polycarbonato (PMF) é considerada o padrão ouro para a investigação e quantificação de microfilaremia. A PMF apresenta alta sensibilidade no diagnóstico filarial, uma vez que é a técnica que permite a investigação de microfilárias em até 10 ml de sangue total por meio de uma única membrana, mas apresenta alto custo quando comparado aos métodos parasitológicos tradicionais. (ROCHA, 2009). O diagnóstico parasitológico é particularmente difícil em pacientes que apresentam sintomas inflamatórios e estão em um estágio crítico, ou que apresentam doença pulmonar (eosinofilia pulmonar tropical), na qual as microfilárias estão normalmente ausentes do sangue periférico. Por essa razão, avaliações de biologia molecular e imunológica foram desenvolvidas e aperfeiçoadas (Silva et al., 2008, SAMAD et al 2013).

O teste Og4C3 identifica os antígenos de *W. bancrofti* e a amostra pode ser coletada a qualquer hora do dia. O diagnóstico sorológico, utilizando o anticorpo monoclonal Og4C3, oferece boa sensibilidade para detectar infecção bancroftiana; no entanto, sua especificidade ainda precisa ser melhor avaliada em indivíduos que compartilham outras infecções parasitárias (ROCHA, 2009). Há relatos de reatividade cruzada de Og4C3 em pacientes com dracunculose (BLOCH et al., 1998).

O ICT (teste imunocromatográfico) é um teste que utiliza a AD12, uma imunoglobulina da classe IgG como um coletor de antígenos filamentosos circulantes, padronizado na forma de papelão e utiliza imunocromatografia rápida, permitindo o rápido diagnóstico da doença. No entanto, a ICT possui uma sensibilidade variável, por se tratar de um teste qualitativo, sua interpretação varia de acordo com a habilidade do observador em realizar o exame, levando a eventuais resultados falso-positivos ou negativos (ROCHA, 2004).

O teste (IgG4 - anti-Bm14 filarial) é um ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), detecta anticorpos (IgG4) ao antígeno recombinante Bm14 e pode ser realizado com soro, plasma ou sangue coletado a qualquer hora do dia. Estudou para a identificação de indivíduos expostos à infecção na ausência de outras evidências de confirmação (WEIL et al., 2010). Estudos anteriores demonstraram que este teste é um marcador sensível de infecção ou alta exposição a parasitas filariais (RAMZY et al., 1995; LAMMIE et al., 2004).

Por fim, temos os testes moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a amplificação isotérmica da alça (LAMP), que são técnicas que buscam o DNA da Wb. Tanto na PCR como na LAMP, a pesquisa pode ser realizada com sangue, soro, urina e saliva, coletados a qualquer hora do dia; ambas as técnicas são capazes de detectar DNA livre em infecções ocultas (ABASSI et al., 1999; XIMENES et al., 2014). Esses métodos baseados em pesquisa de DNA têm excelente sensibilidade e especificidade. A técnica de LAMP ainda apresenta vantagem sobre a PCR, pois não há necessidade de uso de termociclador ou de eletroforese em gel de agarose, o que reduz seu custo e facilita seu uso no campo (TAKAGI et al., 2011; KOUSSI et al. 2015). O objetivo do presente estudo foi validar sistemas baseados em PCR convencional e LAMP em amostras de soro.

Metodologia

Amostragem, população alvo e considerações éticas - Um estudo de validação de teste de diagnóstico foi realizado na fase II da classificação de SACKETT e HAYNES (2002). Para este estudo, uma amostra não probabilística foi selecionada, por conveniência, de indivíduos sabidamente infectados por *Wuchereria bancrofti*, residentes em áreas endêmicas e diagnosticados como positivos pelos testes realizados: FMP e AD12-ICT (Padrão Composto). Todos os indivíduos positivos envolvidos no estudo foram provenientes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil e atendidos no ambulatório de Referência Nacional em Filariose (SRNF) do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM) - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) . O tamanho da amostra para o estudo foi calculado utilizando uma fórmula de cálculo amostral para avaliar a acurácia do teste (FLAHAULT; CADILHAC; THOMAS, 2005). Considerando uma sensibilidade e especificidade de 85% e um erro máximo tolerável de 15%, obtendo-se N = 190 indivíduos (95 positivos e 95 negativos). Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CAE: 48287915.7.0000.5190)

Exames laboratoriais - A triagem do paciente foi realizada usando um teste de cartão ICT que detecta CFA usando o anticorpo monoclonal AD12, que reconhece um antígeno filarial de 200 kDa de vermes adultos ou microfilares (Weil e Ramzy, 2007). Colheu-se sangue venoso das 11:00 às 13:00, 10 mL de sangue venoso em 5 mL foram dispensados para um tubo com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para detectar e quantificar microfilárias de filtração circulante (QMF) (Nucleopore®). Cinquenta µL de soro foram utilizados para posterior extração e diagnóstico molecular.

Extração e Purificação de DNA - Para validar os sistemas LAMP e PCR convencional, o DNA foi extraído do soro usando o kit de coleta de sangue Illustra™ Generic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare). As amostras foram armazenadas a -20 ° C.

PCR Convencional - Os primers Wb2 e WbF descritos por kanjanavas et al. 2005, foram utilizados seguindo o protocolo descrito por Ximenes et al. 2014

LAMP - Os iniciadores utilizados foram F3 (TTTGATCATCTGGGAACGT), B3c (AAGCACCTTAAATCTGTCAAT), FIP (CGACTGTCTAATCCACAGAGTG-TATCCCCATAGAACTACTACG) e BIP (TCTGCTGAATTTTTGTGGATTG-CCAACTAATTGTAAGCAGTCTT) descritos por Takagi et al. (2011). A reação foi realizada para o volume final de 25 µL, contendo 50 pmol de cada primer interno, 5 pmol de cada primer externo, 20 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 8 mM MgSO₄, KCl 10 mM, dNTPs 1,4 mM, betaina 0,4 M, 0,1% Tween 20, 8 unidades de Bst 2,0 DNase de Polimerase Warmstart e 2 mL de ADN molde. Em cada reação de amplificação, um tubo contendo todos os componentes da mistura foi usado na ausência de DNA molde, o controle negativo. As amplificações foram realizadas a temperatura constante em banho-maria ou em placa térmica. A temperatura de amplificação foi de 65 ° C e duração de 60 minutos. Os produtos LAMP foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados em luz ultravioleta. Também foi adicionado 2 mL de SYBR GREEN para visualização do resultado em luz ambiente.

Análise estatística - A sensibilidade diagnóstica, a especificidade, o VPP e o VPN foram calculados usando as seguintes fórmulas:

Sensibilidade = Positivos Verdadeiros / (Positivos Verdadeiros + Negativos Falsos)

Especificidade = Negativos Verdadeiros / (Negativos Verdadeiros + Positivos Falsos)

Valor preditivo positivo (VPP) = positivo verdadeiro / (positivo verdadeiro + falso positivo)

Valor Preditivo Negativo (NPV) = Negativos Verdadeiros / (Negativos Verdadeiros + Falso Negativo).

Os resultados obtidos foram analisados através do programa estatístico OriginPro8 (OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA).

Resultados

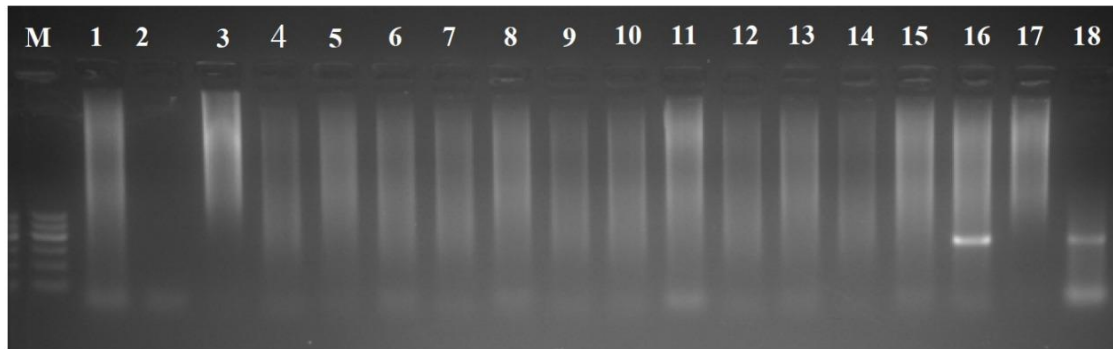
Das 95 amostras de soro do paciente com infecção Wb confirmada através de positividade nos testes FMP e AD12, a sensibilidade e especificidade do ensaio LAMP foi de 100% para sensibilidade e especificidade e a PCR foi de 97,8% e 98,9%, respectivamente. Tanto a PCR como a LAMP apresentaram valor de $p < 0,005$ com $\chi^2 = 182,16$ para PCR e 190 para LAMP. A Tabela x mostra o PPV e o NPV dos dois métodos de detecção, e o ensaio LAMP mostrou o PPV e o NPV 100% mais altos que o PCR [VPP (98,9%) e VPN (97,9%)] (tabela). A técnica de PCR obteve uma precisão de 98,4% em comparação com 100% de LAMP.

Tabela 1: Resultados das técnicas de LAMP e PCR dos 190 pacientes rastreados pelo padrão composto (AD12-ICT e FMP).

Métodos	Numero Total de amostras	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia
LAMP	190	100	100	100	100	100
PCR	190	97.8	98.9	98.9	97.9	98,4

Nós também usamos 95 amostras de soro de indivíduos de áreas não endêmicas com resultados negativos para todos os três métodos diagnósticos comumente usados, incluindo os testes FMP, ICT e Og4C3. Nenhum resultado positivo foi observado para as 95 amostras de soro humano não infectado, indicando excelente especificidade do ensaio LAMP. No entanto, para as mesmas 95 amostras de soro negativas, uma amostra foi positiva, diagnosticada por PCR (Figura 10).

Figura 10: Amostras de soro de pacientes. M: marcador de peso molecular; 1-18: amostras de urina do paciente; 17: controle negativo; 18: controle positivo.



Fonte: autor.

Discussão

O diagnóstico é um dos pilares para o controle da bancroftose, prevenção e controle de doenças que necessitam de técnicas diagnósticas rápidas e confiáveis para identificar com precisão a população-alvo para tratamento (Turner et al., 2016). Entretanto, os ensaios diagnósticos atualmente disponíveis não são ideais, pois a detecção do parasito no sangue em situações de baixa prevalência e de amicrofilaremia e a detecção de anticorpos não têm especificidade para não distinguir infecções atuais e curadas (Silva et al. 2008). Isso resulta em dificuldades na determinação da prevalência, identificando indivíduos realmente infectados para quimioterapia seletiva e avaliando a eficácia da intervenção (Turner et al., 2016).

Nossos resultados demonstraram que os ensaios de amplificação de DNA, que tinham um valor diagnóstico idêntico ao dos métodos parasitológicos, podem fornecer abordagens alternativas para o diagnóstico sensível e específico da bancroftose. Jimenez et al. 2011 relatou um teste de nested-PCR para detectar infecções de baixa intensidade em uma sequência de pacientes na Índia. Em geral, amostras de soro coletadas durante o dia são mais aceitas em muitas populações do que as coletadas durante o período de *Wuchereria bancrofti*, e são mais aplicáveis em condições de campo. Embora os métodos baseados em PCR tenham potencial para a detecção sensível e específica de ilariase, a dependência de dispositivos frequentemente restringe sua ampla aplicação no campo, enquanto a aplicação de LAMP é facilitada pela não utilização de dispositivos complexos, que podem ser realizados com um banho de água.

O valor de diagnóstico de campo do método de LAMP e PCR foi testado usando 95 amostras de soro de pacientes com infecção confirmada por *W. bancrofti* pelos testes FMP, ICT e OG4C3 ELISA. Nossos resultados de detecção mostraram que o ensaio LAMP e PCR apresentou melhor desempenho do que os imunoenaios comumente utilizados, quando comparados aos dados obtidos na literatura (Rocha et al., 2009).

Cerca de 95 residentes que vivem em áreas não endêmicas com resultados negativos de detecção dos testes ELF, ICT e Og4C3 foram reconhecidos como residentes "saudáveis" e foram empregados para avaliar a capacidade do ensaio PCR e LAMP de diagnosticar com precisão a filariose. Podemos considerar o resultado positivo obtido em um dos pacientes pela PCR como falso positivo, uma vez que o mesmo paciente se apresentou negativo pela técnica LAMP e pelos testes imunológicos.

Em comparação com os métodos PCR e LAMP, ao contrário da PCR, o ensaio LAMP não requer ciclos de amplificação termociclagem nem o uso de eletroforese para visualizar os resultados. Dadas essas características, o LAMP é potencialmente útil para o trabalho de campo e já foi utilizado em laboratórios rurais em áreas em desenvolvimento para o diagnóstico da tuberculose (Nagdev et al., 2011).

Em conclusão, técnicas de LAMP e PCR demonstraram rapidez, simplicidade, sensibilidade e especificidade adequada para detecção de DNA. O LAMP ainda mostrou que a facilidade de aplicação desse método pode melhorar a identificação de casos com infecções de baixa intensidade e tratamento direcionado, o que é de grande importância para o controle do AM e seu programa de eliminação.

Referências

- Abbasi I, Githure J, Ochola JJ, Agure R, Koech DK, Ramzy RM, Williams SA, Hamburger J. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction employing patients' sputum. **Parasitol Res.** v.85, p.844-849. 1999.
- Bloch P, Simonsen PE, Weiss N, Nutman TB. The significance of guinea worm infection in the immunological diagnosis of onchocerciasis and bancroftian filariasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v.92, p.518-521.1998.
- Flahault, A et al. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. **Journal of Clinical Epidemiology.** v.58, n.8, p.859 – 862. 2005.
- Kouassi BL, de Souza DK, Goepogui A, Narh CA, King SA, Mamadou BS, Diakité L, Dadzie SK, Boakye DA, Utzinger J, Bockarie MJ, Koudou BG. Assessing the presence of *Wuchereria bancrofti* in vector and human populations from urban communities in Conakry, Guinea. **Parasit Vectors.** v.26, n.8, p.492, 2005.

Jimenez M, Gonzalez LM, Carranza C, Bailo B, Perez-Ayala A, Muro A, Perez-Arellano JL, Garate T. Detection and discrimination of *Loa loa*, *Mansonella perstans* and *Wuchereria bancrofti* by PCR-RFLP and nested-PCR of ribosomal DNA ITS1 region. **Exp. Parasitol.** v.127, p.282–286. 2005.

Lammie, P. et al. Recombinant antigen-based assays for the diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis - a multicenter trial. **Filaria Journal**, London, 3: 9, 2004.

Melrose, W. D. Lymphatic filariasis: new insights into an old disease. **International Journal for Parasitology**, v.32, p. 947-960. 2002.

Nagdev, Khushboo J. et al. “Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid and Reliable Diagnosis of Tuberculous Meningitis.”, **Journal of Clinical Microbiology**. v.45, p.1861–1865. 2011.

Ramzy, R.M.R et al. Effect of yearly mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on bancroftian filariasis in Egypt: a comprehensive assessment. London. **Lancet**. v.367, p. 992-99. 2006.

Rocha A, Braga C, Belém M, Carrera A, Aguiar-Santos A, Oliveira P, Texeira MJ, Furtado A. 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. **Mem Inst Oswaldo Cruz** .v.104, p.621-625. 2009.

Rocha A, Lima G, Medeiros Z, Aguiar-Santos A, Alves S, Montarroyos U, Oliveira P, Béliz F, Netto MJ, Furtado A. Circulating filarial antigen in the hydrocele fluid from individuals living in a bancroftian filariasis area - Recife, Brazil - detected by the monoclonal antibody Og4C3-assay. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.99, p.101-105. 2004.

Sackett D, Haynes R. The architecture of diagnostic research. **BMJ**, v.324, p.7336, p.539-41. 2002.

Silva ECBF, da Silva MAL, Oliveira PAS. Lymphatic filariasis: progresses and perspectives of the laboratorial diagnostic: a review. **Rev Bras Anal Clin**. v. 40, p. 177-181. 2008.

Takagi, H. et al. Development of loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Wuchereria bancrofti* DNA in human blood and vector mosquitoes. **Parasitology International**. v. 60, n.4, p.493-7.2011.

Weil GJ, Curtis KC, Fischer PU, Won KY, Lammie PJ, Joseph H, Melrose WD, Brattig NW. A multicenter evaluation of a new antibody test kit for lymphatic filariasis employing recombinant *Brugia malayi* antigen Bm-14. **Acta Trop**. v.120, n.1, p.19-22, 2011.

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 Tropica**. v. 120, s p. 19 – 22. 2011.

Weil GJ, Ramzy RM. Diagnostic tools for filariasis elimination programs. v.23, n.2, p.78-82. 2007.

Ximenes C, Brandão E, Oliveira P, Rocha A, Rego T, Medeiros R, Aguiar-Santos A ; Ferraz J, Reis C, Araujo P, Carvalho L, Melo F. Detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in paired serum and urine samples using polymerase chain reaction-based systems. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.109 , n.8, p.978-983, 2014.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo desenvolveu e validou duas técnicas diagnósticas que apresentaram alta especificidade e sensibilidade para o diagnóstico da *Wuchereria bancrofti* em diversos fluídos biológicos, inclusive os não invasivos como a urina. Dessa maneira ajudamos a aumentar o leque de opções disponíveis para detecção da doença, também contribuímos para a melhor adesão da população pediátrica ao programa de eliminação da filariose.

O trabalho representa um grande passo na otimização de métodos, que favorece o diagnóstico e o tratamento da filariose. Cabe ainda uma reflexão sobre prevenção da doença e sua presença da doença na Região metropolitana do Recife.

A doença já foi erradicada dos demais estados brasileiros e só persiste em Pernambuco, com foco em Recife. Como é sabido, o principal transmissor da filariose é o mosquito *Culex* e este tem sua existência vinculada a área parada — o que possui relação direta com a estrutura de saneamento básico da cidade.

É necessário um investimento em saneamento para se ter uma perspectiva de erradicação definitiva.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, I. et al. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction employing patients' sputum. **Parasitai Rés** v.85 p.844-849, 1999.
- ADAMS, E. R. et al. Development of a Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Sensitive Detection of *Leishmania* Parasites in Clinical Samples. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.82, p.591-596, 2010.
- AGUIAR-SANTOS, Ana Maria et al . Lymph scrotum: an unusual urological presentation of lymphatic filariasis. A case series study. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v.51, n.4, p.179-183, 2009.
- ANDRADE, L. D. et al. Comparative efficacy of three diferente diethylcarbamazine regimens in lymphatic filariasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.89, p. 319-321, 1995.
- BOEHME, C. C. et al. Operational Feasibility of Using Loop-Mediated Isothermal Amplification for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Microscopy Centers of Developing Countries. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.45, p.1936-1940, 2007.
- BLOCH, P. et al. The significance of guinea worm infection in the immunological diagnosis of onchocerciasis and bancroftian filariasis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 92, p. 518-521, 1998.
- BRASIL. **Guia de Vigilância Epidemiológica e Eliminação da Filariose Linfática**. Ministério da Saúde, Brasília / DF, 2009.
- CHANDY, A. et al. A review of neglected tropical diseases: filariasis. , v.4, n.7, p.581-6, 2011.
- DENHAM, D.A.; MCGREEVY, P.B. Brugian filariasis: epidemiological and experimental studies. **Advances in Parasitology**, v. 15, p. 243-309, 1977.
- DISSANAYAKE, S.; MIN, X.; PIESENS, W.F. Cloning and characterization of *Wuchereria bancrofti*-specific DNA sequence. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 39, p. 147-150, 1990.
- DIXIT V, SUBHADRA AV, BISEN PS, HARINATH BC, PRASAD GB. Antigen-specific immune complexes in urine of patients with lymphatic filariasis. **J Clin Lab Anal**, v.21, p.46–48, 2007.
- DREYER, G.; COUTINHO, A.; ALBUQUERQUE, R. Manifestações clínicas da filariose linfática bancroftiana. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 189-196, 1989.

DREYER, G. et al. Direct assessment of the adulticidal efficacy of single dose ivermectin in bancroftian filariasis. **Transactions of the royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.89, p.441-443, 1995.

DREYER, G.; MEDEIROS, Z. Filariose linfática: ainda um desafio. **Ciência Hoje**, São Paulo, v.12, p.6-7, 1990.

DREYER, G.; ROCHA, A. Filariose bancroftiana. In: FERREIRA, W.; ÁVILA, S. (Org.) Diagnóstico laboratorial: avaliação dos métodos diagnósticos das principais doenças infecciosas parasitárias e auto-imune. **Correlação clínico laboratorial**. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p.194-200. 1996.

DREYER, G.; COELHO, G. Filariose linfática: doença potencialmente eliminável. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.13, n.3, p.537-543, 1997.

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. **Tropical Medicine and International Health**.v.1, p. 264-272, 1996.

DREYER, G.; MATTOS, D.; NORÕES, J. Filariose Bancroftiana In: **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. José Rodrigues Coura (Ed). Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1ª Edição, p.1087-1106.2005.

DUPIN, N. et al. HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV- infected patients with lipodystrophy. **AIDS**, London, v.16, n.18, p. 2419-2424, Dec. 6. 2002.

FONTES, G. et al. Lymphatic filariasis in Brazil: epidemiological situation and outlook for elimination. **Parasites & Vectors**, v.5, p. 272, 2012.

HASSAN. M. et al. Detection of DNA of *W. bancrofti* in blood samples by QC-PCR-ELISA-based. **Journal Egyptian Society Parasitology**. v.35, n.3, p.963-70, 2005.

JIMÉNEZ, M. et al. Differential diagnosis of imported filariasis by molecular techniques (2006-2009). , v.29, n.9, p. 666-71, 2011.

KANJANAVAS, P. et al. Detection of lymphatic *Wuchereria bancrofti* in carriers and long-term storage blood samples using semi-nested PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v.19, p.169-172. 2005.

LUCENA, W.A et al. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction using urine and day blood samples from amicrofilaremic patients. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.92, p.290-293, 1998.

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

MCCARTHY J. Diagnosis of lymphatic filarial infections In: NUTMAN, T., B. Lymphatic Filariasis,1st ed. London: **Tropical Medicine**, p.127-150, 2000.

MENDONZA, N. et al. Filariasis: diagnosis and treatment. **Dermatologic Therapy**, v.22, p.475–490, 2009.

MELROSE, W. D. Lymphatic filariasis: new insights into an old disease. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.947-960, 2002.

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**, v.41, p.403-406, 1990.

MORI, Y.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.15, p.62–69, 2009.

NORÕES J. et al. Assessment of the efficacy of diethylcarbamazine on adult *Wuchereria bancrofti* in vivo. **Transactions of the royal society of tropical Medicine and Hygiene**, London, v.91, p.78-81, 1997.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.12, p.63, 2000.

Nuchprayoon S. et al. Detection and differentiation of filarial parasites by universal primers and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. **Am J Trop Med Hyg**, v.73, p.895-900, 2005.

OMS. **The global Alliance to Eliminate Lymphatic Filariasis**. Proceedings of the First Meeting – Santiago de Compostela, 2000.

OMS. **Global programme for the elimination of lymphatic filariasis**. Research in support of the Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: A Forum to Define today's activities, gaps and needs (Report to the Technical Advisory Group), v.71, n.5, p.1-43, 2004.

OMS. **The Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis(GPELF)**, Geneva, 2006.

OMS. **Progress report 2000-2009 and strategic plan 2010-2020 of the global programme to eliminate lymphatic filariasis**: halfway towards eliminating lymphatic filariasis; 2010.

OMS. Global programme to eliminate lymphatic filariasis. **Wkly Epidemiol Rec**, n.37, p.88, 389-400, 2013.

OMS. Global programme to eliminate lymphatic filariasis. **Wkly Epidemiol Rec**, n.38, p.90, p.489-504, 2015.

OPAS. 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. et al. Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariasis. **Bulletin of the World Health Organization**, v.75, n.6, p. 91-503, 1997.

PAILLY, et al. Changes in the haemocyte population of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, following infection with the filarial parasite, *Wuchereria bancrofti*. **Medicina veterinária e Entomologia**, n.19, v.1, p.116-118, 2005.

PARIDA, M. et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases, **Reviews in Medical Virology**, Chichester, v.18, p.407–421, 2008.

PIGNON, J. M. et al. Frequent detection of minimal residual disease by use of the polymerase chain reaction in long term survivors after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K**, Baltimore, v.4, n. 2, p.83-86, 1990.

POON, L.L.M. et al. Sensitive and Inexpensive Molecular Test for *Falciparum* Malaria: Detecting *Plasmodium falciparum* DNA Directly from Heat-Treated Blood by Loop-Mediated Isothermal Amplification. **Clinical Chemistry**, v.2, p.303-306, 2006.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. -. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROCHA, A. Métodos laboratoriais disponíveis para diagnóstico da filariose linfática. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 265-270, 2000.

ROCHA, A.; AYRES, C.J.; FURTADO, A. Abordagem molecular no diagnóstico laboratorial da filária linfática: *Wuchereria bancrofti*. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.31, n.2, p.161-174, 2002.

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

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

SILVA, E.C.B.F.; FONTES, G.; ROCHA, E.M.M. **Avaliação da prevalência de Filariose linfática pela *Wuchereria bancrofti*, utilizando teste de imunocromatografia rápida (“ICT card test”) em amostra da população das áreas endêmicas de Maceió-AL.** (Monografia de Bacharelado em Farmácia), Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2004.

SILVA, E.C.B.F. et al. Filariose Linfática: Avanços e Perspectivas do Diagnóstico Laboratorial – Revisão. **RBAC**, v.40, n.3, p.177-181, 2008.

Suresh S, Kumaraswami V, Suresh I, Rejash K, Suguna G, Vijayasekaran V, et al. Ultrasonographic diagnosis of subclinical filariasis. **J Ultrasound Med**, v.16, p.45-49, 1997.

TAO, Z. et al. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of *Plasmodium vivax* infection. **Parasites & Vectors**, v.4, p.1-8, 2011.

TAKAGI, H. et al. Development of loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Wuchereria bancrofti* DNA in human blood and vector mosquitoes. **International Journal of Parasitology**, v.60, n.4, p. 493-7, 2011.

THANOMSUB, B.W. et al. Differential diagnosis of human lymphatic filariasis using PCR-RFLP. **Molecular and Cellular Probes**, v.14, p.41–46, 2000;

Turner HC, Bettis AA, Chu BK, McFarland DA, Hooper PJ, Ottesen EA, Bradley MH. T Infect Dis Poverty. 24;5(1):54, 2016.

WEIL, G.J.; LAMMIE, P.J.; WEISS, N. The ICT Filariasis Test: A Rapid-format Antigen Test for Diagnosis of Bancroftian Filariasis. **Parasitology today**, v.13, n.10, p.401-404, 1997.

WILLIAMS, A.S. et al. Deep within the filarial genome: progress of the filarial genome project. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 15, p. 219-224, 1999.

XIE, H.; BAIN, O.; WILLIAMS, A.S. Molecular phylogenetic studies on filarial parasites based on 5S ribosomal spacer sequences. **Parasitology**, Stuttgart, v.1, p.141-151,1994.

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

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

978 Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 109(8): 978-983, December 2014

Detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in paired serum and urine samples using polymerase chain reaction-based systems

Camila Ximenes¹, Eduardo Brandão¹, Paula Oliveira¹, Abraham Rocha^{1/+},
Tamisa Rego¹, Rafael Medeiros¹, Ana Aguiar-Santos¹, João Ferraz¹,
Christian Reis², Paulo Araujo¹, Luiz Carvalho³, Fabio L Melo¹

¹Departamento de Parasitologia, Serviço de Referência Nacional em Filariose

²Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Recife, PE, Brasil,

³Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

The Global Program for the Elimination of Lymphatic Filariasis (GPELF) aims to eliminate this disease by the year 2020. However, the development of more specific and sensitive tests is important for the success of the GPELF. The present study aimed to standardise polymerase chain reaction (PCR)-based systems for the diagnosis of filariasis in serum and urine. Twenty paired biological urine and serum samples from individuals already known to be positive for *Wuchereria bancrofti* were collected during the day. Conventional PCR and semi-nested PCR assays were optimised. The detection limit of the technique for purified *W. bancrofti* DNA extracted from adult worms was 10 fg for the internal systems (WbF/Wb2) and 0.1 fg by using semi-nested PCR. The specificity of the primers was confirmed experimentally by amplification of 1 ng of purified genomic DNA from other species of parasites. Evaluation of the paired urine and serum samples by the semi-nested PCR technique indicated only two of the 20 tested individuals were positive, whereas the simple internal PCR system (WbF/Wb2), which has highly promising performance, revealed that all the patients were positive using both samples. This study successfully demonstrated the possibility of using the PCR technique on urine for the diagnosis of *W. bancrofti* infection.

Key words: *Wuchereria bancrofti* - DNA - diagnosis - filariasis - PCR - urine

Lymphatic filariasis (LF) has the *Wuchereria bancrofti* nematode as its main etiological agent and is transmitted by Culicidae, which live in the tropical and sub-tropical regions of 83 countries and infect approximately 120 million individuals around the world, placing 1.2 billion people at risk of being infected by this parasite (Chandy et al. 2011, WHO 2011).

The Global Program for the Elimination of Lymphatic Filariasis (GPELF) aims to eliminate this parasitic disease by the year 2020. The main strategy is mass drug administration (MDA) with antifilarial drugs among populations living in endemic areas with a single annual dose over a period of five-six years (Ottesen 2006). The development of more specific and sensitive tests are important for the GPELF, allowing to (i) suggest which areas should be involved in MDA, (ii) measure the efficacy of the intervention, (iii) help to decide when to stop MDA and (iv) suggest how to monitor populations after the ending of MDA, thereby preventing the re-occurrence of transmission of the parasite (Weil & Ramzy 2006, WHO 2008).

The diagnosis of LF, which has been universally used, involves investigation of the embryonic form of

the parasite (microfilaria) in capillary blood using the thick drop test under a microscope. However, this test has low sensitivity and depends on the periodicity of the parasite (Dreyer et al. 1996). Immunological diagnosis, which is based on investigation of both antigens and antibodies in the blood, has good sensitivity and specificity, despite its high cost (Nuchprayoon 2009). However, the parasitological and immunological techniques are both inconvenient because they require a biological sample to be acquired (from serum, plasma or total blood) by an “invasive” method (Rocha et al. 2004, 2009).

The use of DNA investigation by polymerase chain reaction (PCR) for diagnosis of *W. bancrofti* infection has been presented by various authors (Zhong et al. 1996, Rocha et al. 2002). The technique has been applied to the diagnosis of vectors, has no requirement for manual dissection and it is able to detect DNA of a single L3 larva, approximately 100 pg, in a pool of various mosquitoes (Chanteau et al. 1994, Nicolas & Scoles 1997). Many researchers have been doing detections with reactions using *W. bancrofti* DNA in a variety of human biological fluids such as total blood, plasma, urine, hydrocele and lung secretions (Zhong et al. 1996, Lucena et al. 1998, Ab-basi et al. 1999, Rocha et al. 2004, Hassan et al. 2005).

The aim of the present study was to standardise PCR-based systems for the diagnosis of bancroftian filariasis in serum and urine samples and also as a potential assessment of interventions proposed by the GPELF.

SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS

Target population and ethical considerations - All the individuals came from Recife, metropolitan region in the Brazilian state of Pernambuco and they were

doi: 10.1590/0074-0276140155

Financial support: SVS/FIOCRUZ/FIOTEC-

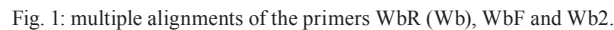
VPPLR-002-LIV11-2-1, 002-FIO 12

+ Corresponding author: rocha@cpqam.fiocruz.br Received 5

May 2014

Accepted 31 October 2014

online | memorias.ioc.fiocruz.br



Investigation of circulating W. bancrofti antigen (CWBa) - The investigation of CWBa was carried out with monoclonal AD12 (ICT card test) and Og4C3 (ELISA) in accordance with Weil et al. (1997) and Trop-BIO (1996), respectively. The rapid AD12-Card ICT test (NOW® Filariasis) is considered positive when any degree of colouring (light or dark) appears in the result position of the test. Additionally, it is considered positive or negative only when the control line can be visualised. For the Og4C3-ELISA in accordance with TropBIO (1996), samples with ag/mL ≥ 128 units were considered positive. The serum sample pairs for CWBa were collected in accordance with Rocha et al. (2004).

The internal (WbF/Wb2) and external PCRs (WbR/WbF) were carried out using the Top-Taq™ Master Mix Kit (QIAGEN, Germany) with the addition of 1.5 mM magnesium, the primers and ultrapure autoclaved water to a final volume of 25 µL. For the external PCR (WbR/WbF) 5 µM of the primers (WbR/WbF) was used and cycling was carried out in a thermocycler (Bioer LifePro, China) with initial denaturation at 90°C for 3 min, followed by 30 cycles of denaturation at 90°C for 1 min.

annealing at 55°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 8 min, amplifying a fragment of 780 bp. For the internal PCR (WbF/Wb2) 25 µM of primers (WbF/WbR) was used and cycling began with initial denaturation at 90°C for 3 min, followed by 25 cycles of denaturation at 90°C for 45 s, annealing at 60°C for 45 s and extension at 72°C for 45 s, with a final extension at 72°C for 5 min, amplifying a fragment of 400 bp.

Semi-nested PCR simple PCRs as described and optimised before with an aliquot of 2 µL of external PCR (WbR/WbF) product working as a template for the internal PCR (WbF/Wb2), which had a final volume of 25 µL.

Finally, 10 µL of each PCR product was analysed using electrophoresis in a 2% agarose gel with Blue Green Colouring (LGC, Brazil). The DNA bands were separated electrophoretically and the results were visualised with an ultraviolet light transilluminator and photographed using a Polaroid MP4⁺ SystemTM documentation system (Sigma, USA).

Evaluation of the detection limit of the systems - Evaluation of the technique's detection limit involved building a dilution curve based on previously dosed quantities of purified genomic DNA from *W. bancrofti* adult worms to evaluate the minimum quantity of DNA that the systems under study were able to amplify. Serial dilutions to a factor of 10 were carried out at the following concentrations: 0.5 ng/µL, 50 pg/µL, 5 pg/µL, 0.5 pg/µL, 50 fg/µL, 5 fg/µL, 0.5 fg/µL, 0.05 fg/µL and 0.005 fg/µL. Additionally, 2 µL of each dilution was added to the reactions.

Evaluation of the specificity of the systems - The specificity of the primers was confirmed experimentally by amplifications using 1 ng of purified genomic DNA from a variety of non-filarial parasites (*Schistosoma mansoni*, *Homo sapiens*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Ascaris lumbricoides*) provided by conventional and semi-nested PCR techniques.

RESULTS

Paired samples of urine and serum were obtained from 20 individuals between 18-46 years of whom 13 were men and seven women. Four of the 20 individuals were positive for PMF with the density of microfilariae ranging from 15-530 mf/mL. All the serum and urine samples tested positive and negative, respectively for CWBa. Only the amicrofilaremic individuals (10/20) underwent US and of them, only two/13 men presented with FDS in the lymphatic vessels of the scrotal sac.

For the WbR/WbF PCR we obtained a detection limit of 100 pg (results not presented in this paper) and the limit attained for semi-nested PCR was 0.1 fg of DNA demonstrating greater sensitivity (Fig. 2A). However, the detection limit of the internal WbF/Wb2 PCR was 10 fg (Fig. 2B).

For all the systems tested in the specificity test, no amplification was found from the DNA of the other species that were used; only *W. bancrofti* DNA was detected (Fig. 2C). The systems were also tested in human serum and urine of healthy patients and no amplification was observed in these samples (Fig. 3).

On the other hand, a simple internal PCR reaction (WbF/Wb2) showed all the patients to be positive, both

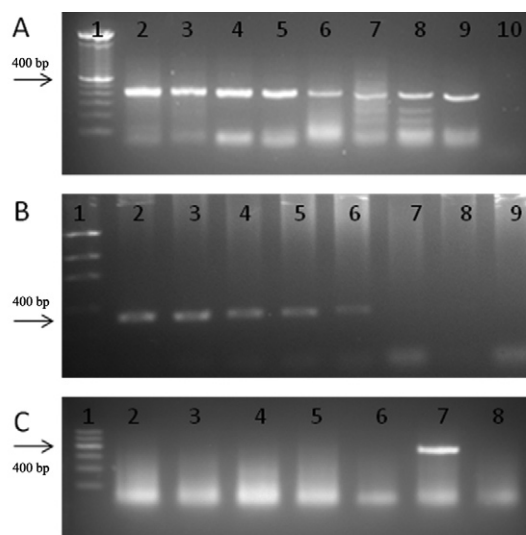


Fig. 2A: detection limit for semi-nested polymerase chain reaction (PCR). Line 1: molecular weight marker of 100 bp; 2-9: 10-fold dilution curve, 1 ng-0.1 fg; 10: negative control; B: detection limit for internal PCR. 1: molecular marker (Low DNA Ladder); 2-8: 10-fold dilution curve, 100 pg-0.1 fg; 9: negative control; C: specificity of internal PCR. 1: molecular weight marker of 100 bp; 2: genomic DNA of *Schistosoma mansoni*; 3: genomic DNA of *Trypanosoma cruzi*; 4: genomic DNA of *Leishmania chagasi*; 5: genomic DNA of *Ascaris lumbricoides*; 6: genomic DNA of *Homo sapiens*; 7: genomic DNA of *Wuchereria bancrofti*; 8: negative control.

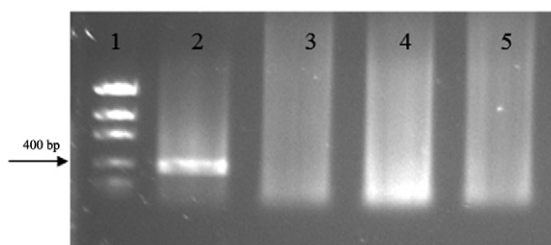


Fig. 3: polymerase chain reaction with serum and urine of healthy patients. Line 1: molecular weight marker; 2: positive control; 3: negative control; 4: serum sample of healthy patient; 5: urine sample of healthy patient.

for urine and serum (Fig. 4A-C). For the semi-nested PCR, only two of the 20 patients were positive either for serum or urine samples (t. 4D, E).

DISCUSSION

The present study undertook a pioneering attempt to obtain DNA of specific species from adult *W. bancrofti* worms. The availability of rapid and precise diagnostic tests has been stressed by the WHO as a way of monitoring, verifying, eliminating and providing surveillance of LF. Our study has shown that the simple internal PCR system tested yielded 100% positive results on samples of serum and urine collected during the day from individuals infected with *W. bancrofti*. Traditionally, diagnosis of ban-

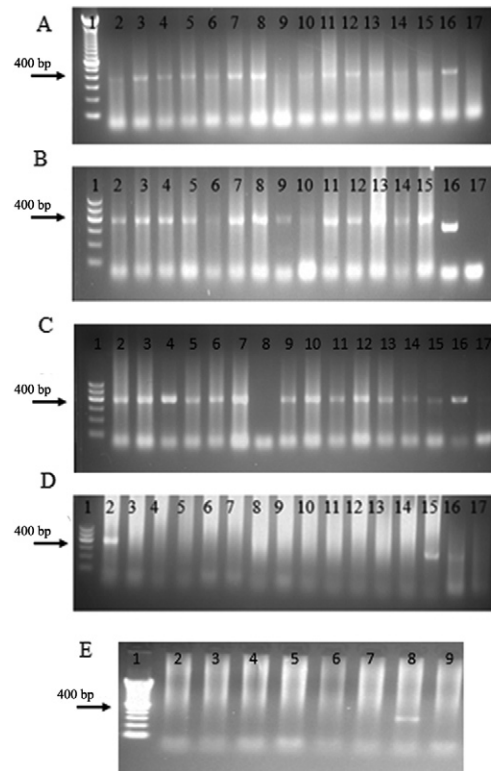


Fig. 4: detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in samples of serum and urine from patients using polymerase chain reaction (PCR). A: internal PCR. Line 1: molecular weight marker of 100 bp; 2-15: serum samples of patients; 16: positive control; 17: negative control; B: internal PCR (WbF/Wb2). 1: molecular weight marker of 100 bp; 2-15: urine samples from patients; 16: positive control; 17: negative control; C: internal PCR. 1: molecular weight marker of 100 bp; 2-7: urine samples from patients; 8: negative control; 9: positive control; 10-15: blood samples from patients; 16: positive control; 17: negative control; D: semi-nested PCR. 1: molecular weight marker of 100 bp; 2-15: urine samples from patients; 16: positive control; 17: negative control; E: semi-nested PCR. 1: molecular weight marker of 100 bp; 2-7: urine samples from patients; 8: positive control; 9: negative control.

croftian filariasis has been based on study of the parasite in blood samples, which requires well-trained microscope users. Additionally, the sample collection has to be carried out in accordance with the periodicity of the parasite (between 11:00 pm-01:00 am) in an unavoidably invasive manner (Silva et al. 2008). In addition, blood collection during late night hours for MF detection is impractical in some endemic areas due to the high levels of violence in these areas. Thus, the non-cooperation of most of the population living in these areas and the low sensitivity of the techniques prevents the large-scale use of these methods (Lucena et al. 1998, Weil & Ramzy 2006).

The advent of immunological methods, which consist of investigating circulating antigens from *W. bancrofti* (Turner et al. 1993, Rocha et al. 1996, Weil et al. 1997), has enabled great progress in the diagnosis of bancroftian filariasis. However, although these techniques have good sensitivity and specificity and do not present any variation between night to day, they require an invasive blood sample to be taken. Furthermore, it has already been reported

that there is a cross-reaction with Og4C3 in patients who are carriers of dracunculiasis (Bloch et al. 1998); thus, it is important to be cautious when interpreting a positive test result for CWBa in individuals from bancroftian filariasis and other parasites in endemic areas (Rocha et al. 1996). In addition, Gass et al. (2012) received attention for improving standardisation and also for providing rigorous quality control of commercially manufactured kits tests, a problem noted particularly with variability in the lots of commercial kits measuring BM14 antibodies and the TropBio Og4C3 antigen test. In the case of the AD12-card ICT, because this is a qualitative test, the interpretation varies according to the ability of the observer who is conducting the examination, leading occasionally to false positive or negative results (Rocha et al. 2009, Gass et al. 2012). With regard to the CWBa, 100% of urine samples tested were negative for the monoclonal AD12-card ICT and Og4C3-ELISA, which is considered a different result comparing to other fluids (Turner et al. 1993, Rocha et al. 2004). On the one hand, anti-filariasis antibody studies have been shown to be a promising feature, making it possible to identify a quarter of infected individuals by using the recombinant antigen SXP (Gass et al. 2012).

The development of new diagnostic methods using molecular biology has changed the way LF infection is diagnosed. The DNA may be detected at all stages in the development of the infection, even in patients with low or no microfilaraemia (Furtado et al. 1997). Furthermore, reports have been found in the literature about the detection of *W. bancrofti* DNA in blood samples collected during the day (Furtado et al. 1997) and also in other biological fluids obtained by non-invasive means (Lucena et al. 1998, Abbasi et al. 1999), which makes this method very attractive for use in populations living in endemic areas.

Comparing the results obtained with those of Kanjanavas et al. (2005), it can be observed that the detection limit is the same for external PCR (WbR/WbF), although the limit was different when comparing to the semi-nested PCR. The semi-nested PCR study was less successful (detection limit = 0.1 fg) in comparison to Kanjanavas et al. (2005) who obtained a detection limit of 0.001 fg. This may be because it was not possible to replicate the protocol described by the authors.

In the case of internal PCR (WbF/Wb2) detection, it was not possible to make a comparison with Kanjanavas et al. (2005) because these authors do not report the detection limit. However, the detection limit found was higher for other authors who were using different systems. Chansiri and Phantana (2002) found a detection limit of 10 pg for the same PCR and Zhong et al. (1996) obtained a detection limit of 1 pg, which according to the authors represents 1% of the total quantity of microfilaria DNA, which is supposed to be approximately 100 pg.

The presence of *W. bancrofti* DNA in urine has already been shown by Lucena et al. (1998), who suggest that for infected individuals, nucleic acid is released by the parasite into the urine. In sequence, the use of urine for PCR has been shown as a promising analysis for different species. Murdoch et al. (1996) detected the DNA of *Legionella*. Leishmaniasis has been detected with a sensitivity of approximately 88-97% and a specificity of 100% (Motazedian et al. 2008).

The simple and semi-nested PCR systems optimised in the present study were used to detect DNA in biological samples, thus we obtained promising results with the internal PCR (WbF/Wb2) reaction, which was capable of detecting all the positive individuals. However, the performance of the semi-nested PCR was unsatisfactory when compared to the simple internal system with only two/20 of the individuals tested showing up positive. Hypothetically, nested PCR systems are more sensitive than simple systems, although the aforementioned results do not support this theory and it may be because the first external PCR (WbR/WbF) reaction had a detection limit of only 100 pg, leading us to believe that the DNA that was extracted from the sample was at a concentration that is not detectable by this system. This finding compromises the development of the internal PCR (WbF/Wb2) reaction, which uses the amplicons formed in the first reaction of the semi-nested PCR. Despite the promising results of the simple PCR in biological samples for semi-nested PCR, the theory justifies making greater effort to improve the performance of this system.

The present study shows that it is possible to use the PCR technique during the day to diagnosis *W. bancrofti* in different biological samples and in different parasitological states. Moreover, it may even be possible to obtain samples such as urine in a non-invasive manner. One remarkable point of this approach is that it avoids the necessity of using blood samples, making it an effective methodology for LF infection diagnosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the staff of the National Centre of Lymphatic Filariasis, for the support to developed the present study.

REFERENCES

- Abbasi I, Githure J, Ochola JJ, Agure R, Koech DK, Ramzy RM, Williams SA, Hamburger J 1999. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction employing patients' sputum. *Parasitol Res* 85: 844-849.
- Amaral F, Dreyer G, Figueredo-Silva J, Noroes J, Cavalcanti A, Samico SC, Santos A, Coutinho A 1994. Live adult worms detected by ultrasonography in human bancroftian filariasis. *Am J Trop Med Hyg* 50: 753-757.
- Bloch P, Simonsen PE, Weiss N, Nutman TB 1998. The significance of guinea worm infection in the immunological diagnosis of onchocerciasis and bancroftian filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 518-521.
- Chandy A, Thakur AS, Singh MP, Manigauha A 2011. A review of neglected tropical diseases: filariasis. *Asian Pac J Trop Med* 4: 581-586.
- Chansiri K, Phantana S 2002. A polymerase chain reaction assay for the survey of bancroftian filariasis. *J Trop Med Pub Health* 3: 504-508.
- Chanteau S, Luquaud P, Failloux AB, Williams SA 1994. Detection of *Wuchereria bancrofti* larva in pools of mosquitoes by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 55: 665-666.
- Dreyer G, Pimenta A, Medeiros Z, Bêziz F, Moura I, Coutinho A, de Andrade LD, Rocha A, da Silva LM, Piessens WF 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.
- Furtado AF, Abath FGC, Regis L, Gomes YM, Lucena WA, Furtado PB, Dhalia R, Miranda JC, Nicolas L 1997. Improvement and application of a polymerase chain reaction system for detection of *Wuchereria bancrofti* in *Culex quinquefasciatus* and human blood samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 85-86.
- Gass K, Rochars MVB, Boakye D, Bradley M, Fischer PU, Gyapong J, Itoh M, Ituaso-Conway N, Joseph H, Kyelem D, Laney SJ, Legrand AM, Liyanage TS, Melrose W, Mohammed K, Piloni N, Ottesen EA, Plichart C, Ramaiah K, Rao RU, Talbot J, Weil GJ, Williams SA, Won KY, Lammie P 2012. A multicenter evaluation of diagnostic tools to define endpoints for programs to eliminate bancroftian filariasis. *PLoS Negl Trop Dis* 6: 1479.
- Hassan M, Sanad MM, el-Karamany I, Abdel-Tawab M, Shalaby M, el-Dairouty A, Assal K, Gamal-Edin MK, el-Kadi MA 2005. Detection of DNA of *W. bancrofti* in blood samples by QC-PCR-ELISA-based. *J Egypt Soc Parasitol* 35: 963-970.
- Kanjanavas P, Tan-ariya P, Khawak P, Pakpitcharoen A, Phantana S, Chansiri K 2005. Detection of lymphatic *Wuchereria bancrofti* in carriers and long-term storage blood samples using semi-nested PCR. *Mol Cell Probes* 19: 169-172.
- Lucena WA, Dhalia R, Abath FGC, Nicolas L, Regis LN, Furtado AF 1998. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction using urine and day blood samples from amicrofilaremic patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 290-293.
- Motazedian M, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam G, Mikaeili F 2008. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 60: 151-154.
- Murdoch DR, Walford EJ, Jennings LC, Light GJ, Schousboe MI, Cheresky AY, Chambers ST, Town GI 1996. Use of the polymerase chain reaction to detect *Legionella* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia. *Clin Infect Dis* 23: 475-480.
- Nicolas L, Scoles GA 1997. Multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of *Dirofilaria immitis* (Filarioidea: Onchocercidae) and *Wuchereria bancrofti* (Filarioidea: Dipetalonematidae) in their common mosquito vector *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 34: 741-744.
- Norões J, Addiss D, Amaral F, Coutinho A, Medeiros Z, Dreyer G 1996. Occurrence of living adult *Wuchereria bancrofti* in scrotal area of men with microfilaremia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 55-56.
- Nuchprayoon S 2009. DNA-based diagnosis of lymphatic filariasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 40: 904-913.
- Ottesen EA 2006. Lymphatic filariasis: treatment, control and elimination. *Adv Parasitol* 61: 395-441.
- Rocha A, Addiss D, Ribeiro ME, Norões J, Baliza M, Medeiros Z, Dreyer G 1996. Evaluation of the Og4C3 ELISA in *Wuchereria bancrofti* infection: infected persons with undetectable or ultra-low microfilarial densities. *Trop Med Int Health* 1: 859-864.
- Rocha A, Ayres CJ, Furtado A 2002. Molecular approach in the laboratory diagnosis of the lymphatic filariasis by *Wuchereria bancrofti*. *Rev Patol Trop* 31: 161-174.
- Rocha A, Braga C, Belém M, Carrera A, Aguiar-Santos A, Oliveira P, Teixeira MJ, Furtado A 2009. 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. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 621-625.
- Rocha A, Lima G, Medeiros Z, Aguiar-Santos A, Alves S, Montarroyos U, Oliveira P, Bêziz F, Netto MJ, Furtado A 2004. Circulating filarial antigen in the hydrocele fluid from individuals living in a bancroftian filariasis area - Recife, Brazil - detected by the monoclonal antibody Og4C3-assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 101-105.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 223 pp.

- Silva ECBF, da Silva MAL, Oliveira PAS 2008. Lymphatic filariasis: progresses and perspectives of the laboratorial diagnostic: a review. *Rev Bras Anal Clin* 40: 177-181.
- TropBIO 1996. ELISA kit for detecting and quantifying *Wuchereria bancrofti* antigen. Townsville, Australia, JCU Tropical Biotechnology Pty, James Cook University of North Queensland.
- Turner P, Copeman D, Gerisi D, Speare R 1993. A comparison of the Og4C3 antigen capture ELISA, the Knott test and IgG4 test and clinical signs in the diagnosis of bancroftian filariasis. *Trop Med Parasitol* 44: 45-48.
- Weil GJ, Lammie PJ, Weiss N 1997. The ICT filariasis test: a rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis. *Parasitol Today* 10: 401-404.
- Weil GJ, Ramzy RM 2006. Diagnostic tools for filariasis elimination programs. *Trends Parasitol* 23: 78-82.
- WHO - World Health Organization 2008. *Global programme to eliminate lymphatic filariasis: conclusions of the meeting of the Technical Advisory Group on the Global Elimination of Lymphatic Filariasis*, WHO, Geneva, 15 pp.
- WHO - World Health Organization 2011. *The global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report 2000-2009 and strategic plan 2010-2020*, WHO, Geneva, 93 pp.
- Zhong M, McCarthy J, Bierwert L, Lizotte-Waniewski M, Chanteau S, Nutman TB, Ottesen EA, Williams SA 1996. A polymerase chain reaction assay for detection of the parasite *Wuchereria bancrofti* in human blood samples. *Am J Trop Med Hyg* 54: 357-363.

APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO NA ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL DISEASE

Asian Pac J Trop Dis 2016; 6(7): 521-526

521

	HOSTED BY 	
	Contents lists available at ScienceDirect	
	Asian Pacific Journal of Tropical Disease journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtd	

Parasitological research

doi: 10.1016/S2222-1808(16)61081-2

©2016 by the Asian Pacific Journal of Tropical Disease. All rights reserved.

Lymphatic filariasis: Surveillance action among immigrants from endemic areas, Acre State, Brazilian Amazon

Lucineide Valentin Nunes^{1,2}, Abraham Rocha^{3*}, Josué Araújo³, Cynthia Braga³, Paula Alcantara³, Karina Fiorillo⁴, Camila Ximenes³, Eduardo Brandão³, Claudia Dávila Modesto², Thayna Maria Holanda de Souza⁵, Andreia Fernandes Brilhante^{1,6}

¹Meta Faculty, Rio Branco, Acre, Brazil

²Central Laboratory of Public Health, Rio Branco, Acre, Brazil

³National Filariasis Referral Service, Parasitology Department, Aggeu Magalhães, Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴General Coordination of Leprosy and Diseases in Disposal, Secretariat of Health Surveillance, Ministry of Health, Brasília, Distrito Federal, Brazil

⁵Department of Health, Rio Branco, Acre, Brazil

⁶Epidemiology Department, School of Public Health, São Paulo University, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2016

Received in revised form 14 Jun 2016

Accepted 18 Jun 2016

Available online 22 Jun 2016

Keywords:

Wuchereria bancrofti

Filariasis

Surveillance

Immigrants

Diagnosis

ABSTRACT

Objective: To investigate the positivity of *Wuchereria bancrofti* (*W. bancrofti*) in immigrants who entered the country through Rio Branco, reducing the risk of introduction of parasites into new areas and endemic areas of the past.

Methods: It was realized a descriptive study. The AD12-ICT card test was applied on all immigrants living temporarily in the Chacara Alliance shelter, located in the metropolitan area of Rio Branco-AC, Brazil. For the positive patients, 10 mL of venous blood was collected between 11:00 pm and 1:00 am. About 4 mL of venous blood was collected to detect the presence of microfilariae in circulation in the tube using ethylene diamine tetraacetic acid and 6 mL of venous blood was collected to obtain blood serum for the Og4C3-ELISA, antibody Bm-14 and DNA-*W. bancrofti* tests.

Results: The present study evaluated 415 individuals in September 2014 by circulating filarial antigen for *W. bancrofti* using the AD12-ICT card test. A total of 15/415 (3.61%) positive cases were found, all from Haiti. Night blood collection and serum were performed on 1/14 for confirmation the infection of *W. bancrofti*, which presented 34 microfilariae/mL, antigen, antibodies and PCR positives.

Conclusions: This surveillance action reveals, in a pioneering and unequivocal manner, that Brazil is an influx of immigrants carrying lymphatic filariasis and there is an urgent need to step up surveillance at the main entry point for immigrants. Active surveillance may prevent the reintroduction of lymphatic filariasis in areas under control, or prevent its introduction into other states of Brazil.

1. Introduction

Lymphatic filariasis (LF), which is a parasitic disease caused by

the infection of three species of nematodes, *Wuchereria bancrofti* (*W. bancrofti*), *Brugia malayi* and *Brugia timori*, was considered one among the six potentially eliminable infectious diseases of the

globe for more than two decades. *W. bancrofti* accounts for nearly

Nacional de Saúde nº 190/96, implementing the National Plan for the Elimination of LF (NPELF)[5].

In 2000, the Global Programme to Eliminate LF (GPELF) elaborated a plan to achieve the elimination of LF, in locations where it is endemic, by the year of 2020. The elimination strategy has two components: i) stopping the spread of infection by breaking the transmission cycle of vector-human parasite, by applying community-wide mass drug administration (MDA) to the population under risk of infection. The goal of GPELF is a yearly dose of albendazole (400 mg) associated with ivermectin (150–200 µg) or diethylcarbamazine (DEC) (6 mg/kg), reaching at least 65% population coverage yearly, for 5–6 years in areas where the prevalence of LF is equal to or greater than 1%, and ii) mitigating the suffering of affected individuals by controlling morbidity[3,6,7].

In the last half century, several countries have successfully eliminated LF, including Japan, China, South Korea, the Solomon Islands, Egypt and Togo[8]. In the Americas, only occurs infection of *W. bancrofti* and at the start of the GPELF, seven countries in the region were considered endemic for LF. In 2011, a review of epidemiological data led to the reclassification of Costa Rica, Suriname and Trinidad and Tobago as they are non-endemic. Thus, in the Americas, the remaining endemic countries are Brazil, Guyana, Dominican Republic and Haiti, with the latter being the country with the most cases of diseases and infection[9].

Epidemiological studies conducted in Brazil in the 1950s verified the existence of active transmission of LF in 11 cities from different States. With the control measures implemented over the years by the Ministry of Health, studies carried after the year of 1980 have shown a significant reduction, from 11 to only 2 and some areas are considered as active focus including Recife-Pernambuco and Belem-Pará[10]. Currently, Belem-Pará has eliminated LF under control and it is seeking full eradication. On the other hand, the metropolitan area of Recife, Olinda, Jaboatão dos Guararapes and Paulista, despite the significant decrease in prevalence (6.5% of microfilaremia in 1996 came to 0.002% in 2014 in Recife), is still considered the main focus of LF in Brazil[11-13].

The state of Santa Catarina is worth mention, where the years of 1951 and 1967 were considered endemic for LF. In both cases, a control action based on selective treatment of the microfilaremics and MDA using DEC was successful in eliminating the LF in that state[14].

Over the past 5 years, Brazil has become a migratory route of thousands of immigrants from African countries (Senegal, Gambia, Ghana), the Caribbean (Dominican Republic and Haiti) and Asian (Bangladesh and India), most considered transmission areas of filariasis by *W. bancrofti*. It is estimated that in the 2010–2014 period, about 42 000 immigrants from the Dominican Republic, Haiti and Africa settled in Brazilian States, of which approximately 11 500 (27.4%) resided in Southern Brazil[15-17].

The city of Rio Branco-Acre is the main gateway for immigrants, mostly from Haiti, considered hyper-endemic for LF and the source of over 90% of the total LF cases in the Americas. Immigrants are housed in a shelter in Rio Branco's metropolitan region, and then traveled by bus to the city of São Paulo, São Paulo, where they seeked jobs available especially in Southern and Southeastern Brazil[18,19]. Thus, the aim of this study is to investigate the positivity of *W. bancrofti* of immigrants who entered the country through Rio Branco, reducing the risk of reintroduction of parasites into new areas and endemic areas of the past.

2. Materials and methods

2.1. Study design and setting

This descriptive study was based on records from the databank of

the Environmental Management Laboratory and Central Laboratory of Acre, Brazil. This data were generated by a surveillance action involving immigrants from endemic areas for LF, which took place during 1 week on September 2014 as part of Brazil's NPELF, conducted by the Central Laboratory of Acre, Rio Branco Municipal and State Health/Epidemiological Surveillance, the Brazilian Ministry of Health, and the National Filariasis Referral Service of the Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation of Pernambuco.

All immigrants living temporarily in the Chacara Alliance shelter, located in the metropolitan area of Rio Branco-AC, Brazil, during the period of the surveillance action were invited to attend the Lymphatic Filariasis Diagnostic Investigation Laboratory (LFDIL)[19].

2.2. Data analysis

The database analysis of Environmental Management Laboratory began in May 2015, after consideration and approval by the Ethics in Research Committee of the Clinical Hospital of Rio Branco, Acre- Fundhacre nº 040776/2015.

2.3. Study population

Before the LFDIL began, a lecture was given on the general aspects of LF (epidemiology, clinical features, diagnosis and treatment), as well as the objectives of this surveillance action coordinated by the Health Institutions of Brazil, with an emphasis on the enormous importance of diagnostic evaluation and treatment of positive cases. For better understanding of the information given, Haitian immigrants fluent in Portuguese provided simultaneous translation from Portuguese to French and Haitian Creole.

Participation was voluntary and prior to the LFDIL, consent for the tests was obtained from all participants, including minors who were accompanied by their parents, who authorized the participation of their children in the LFDIL. Sociodemographic information (full name, sex, age, parents and hometown) was collected, and individuals with difficulty in understanding the questionnaire in Portuguese were assisted by a translator.

2.4. Laboratory assays

The AD12-immunochromatographic (ICT) card test was applied according to the manufacturer's instructions and the results read by technicians trained in the field, precisely 10 min after taking the blood sample. The appearance of two lines (test and control) was interpreted as a positive result[20-22]. All positive cards were repeated on the same occasion to confirm the results, following the same criteria listed above. For the positive patients, 10 mL of venous blood was collected between 11:00 pm and 1:00 am. About 4 mL of venous blood was collected to detect the presence of microfilariae in circulation in the tube using ethylene diamine tetraacetic acid and 6 mL of venous blood was collected to obtain blood serum for the Og4C3-ELISA, antibody Bm-14 and DNA-*W. bancrofti* tests. Three drops of blood were placed on two slides for study of microfilariae morphology. Blood, serum and slides were stored at temperatures of 4°–20 °C and ambient temperature, respectively, and then sent to the SRNF/CPqAM/Fiocruz-PE until the application of the standard operating procedures for each specific test.

Assessment of microfilariae was carried out using diagnosis and quantification of microfilariae (DQM) and thick blood film (TBF), circulating filarial antigen (CFA) by Og4C3-ELISA, antibody Bm-

14 and DNA-*W. bancrofti* for PCR[21-24].

3. Results

The presence of CFA was examined in 415 immigrants [313 (75.42%) males and 102 (24.58%) females aged between 2 and 55 years, and median of the 30 years] living temporarily in the shelter of Chacara Alliance at the moment of the surveillance action, agreed to perform in LFDIL by the point of care AD12-ICT card test. Table 1, showing the distribution of sex and age, reveals that the majority of participants (50.6%) were in the 26–35 year age group. The second largest concentration of young adults was in the 21–25 year age group (18.31%). All AD12-ICT test cards used in the quality control test showed satisfactory results.

Table 1

Distribution of the individuals according to age and gender in September 2014, Rio Branco, Acre, Brazil.

Age group (years)	Male	Female	Total (%)
0–5	2	0	2 (0.48)
6–10	1	2	3 (0.73)
11–15	0	3	3 (0.73)
16–20	17	7	24 (5.78)
21–25	59	17	76 (18.31)
26–30	96	22	118 (28.43)
31–35	67	25	92 (22.17)
36–40	32	15	47 (11.33)
41–45	19	6	25 (6.02)
46–50	14	5	19 (4.58)
51–55	4	0	4 (0.96)
56–60	0	0	0 (0.00)
> 60	0	0	0 (0.00)
No age	2	0	2 (0.48)
Total (%)	313 (75.42%)	102 (24.58%)	415 (100.00)

Table 2 shows the place of origin of the participants. Only 3 individuals were from areas not endemic for LF (Colombia and Cuba) and the place of origin of one individual could not be identified. On the other hand, 411/415 (99.04%) participants were from endemic areas (the Republic of Haiti, the Dominican Republic and Senegal), and the largest number of immigrants were from Haiti (375 individuals). The LFDIL by CFA AD12-ICT card test diagnosed 15/415 (3.61%) positive cases. However, considering only the immigrants from Haiti, the prevalence of a positive CFA point of care AD12-ICT card test, would be higher [14/375 (4%)]. Of this subgroup of immigrants, 12/15 (80.0%) were men and 3/15 (20.0%) were women and the mean age for both sexes was 26.5 years, ranging from 23 to 38 years. They came from the nine districts of the Republic of Haiti, all endemic for LF. These 7/15 (46.7%) participants, more specifically, were from the Gonaïves District, the capital of the Department of Artibonite, which had locations with a prevalence of CFA estimated by the point of care AD12-ICT card test to be between 10% and 45%, as well as 91/375 (24.3%) negatives.

Table 2

Result of AD12-ICT card test according to country of origin.

Country of origin	Investigated number	ICT card positive (%)	ICT card negative (%)
Colombia	1	0 (0)	1 (100)
Cuba	2	0 (0)	2 (100)
Haiti	375	15 (4)	360 (96)
Dominican Republic	16	0 (0)	16 (100)
Senegal	20	0 (0)	20 (100)
Not identified	1	0 (0)	1 (100)
Total	415	15 (3.61)	400 (96.39)

In order to avoid false positive results, all individuals positively diagnosed using the CFA point of care AD12-ICT card test (15/15) were subjected to a new test and there was a 100% concordance between the first and second tests. Only 1/15 individuals with a positive CFA point of care AD12-ICT card test remained at the shelter for 2 days after the completion of the LFDIL to carry out the collection of nocturnal venous blood for parasitological research (research and quantification of microfilariae) by DQM and TBF, CFA Og4C3 by ELISA, antibody Bm-14 and DNA *W. bancrofti*, obtaining the following results: 34 microfilariae/mL, morphology of microfilariae compatible with *W. bancrofti*, 7.054 AU, 0.432 DO and positive, respectively.

Despite having been offered treatment with DEC, none of the immigrants who tested positive on the CFA point of care AD12-ICT card test, including those who were microfilaremic, accepted the treatment, since everyone was waiting for the ground transportation (bus) to the city of São Paulo-SP, Brazil where they would be recruited to work in companies and industries in the major states of the South and Southeast of Brazil.

4. Discussion

Several studies have noted the importance of surveillance actions focused on migrant populations from areas endemic for LF to non-endemic areas, or areas under control of the MDA[25-28]. After the disaster in Haiti in 2010, Brazil has been the main country in the Americas to receive a large number of immigrants from this country, as well as from other regions endemic for LF (the Dominican Republic, Africa, India and Bangladesh)[15-17].

The results presented in this LFDIL action used the point of care AD12-ICT card test for the presence of CFA for *W. bancrofti* and was the first to confirm the high prevalence of 3.61% (15/415) in the CFA positive immigrant population. Moreover, the CFA prevalence was higher than 4% (15/375) in the population of Haitian immigrants alone.

Although the LFDIL only diagnosed individuals from Haiti, an area known to be endemic for LF, examination of CFA point of care AD12-ICT card tests drew attention to the need for confirmation of infection with *W. bancrofti*, since Brazil also has many immigrants from the African continent, where there are co-infections with other filarial worms, such as *Loa loa* (*L. loa*), which depending on the parasite density, may also react positively to CFA in the point of care AD12-ICT card test[29]. The drug of choice for LF treatment in Brazil is the DEC[30]. The use of DEC for the treatment of loiasis is limited, especially in cases with high parasite loads, where there is a risk of developing severe reactions, such as encephalopathies, which may lead to death[31]. Despite not being the drug of choice for LF treatment in Brazil, the use of ivermectin is worth mentioning, as its use against infection with *L. loa* can also cause severe adverse reactions, leading to coma and death[32].

In Brazil, nowadays, the TBF for microfilariae is still widely used for laboratory diagnosis of LF[30]. The microfilariae stages of *W. bancrofti* and *L. loa* have similar characteristics. In spite of *L. loa* is diurnally periodic, microfilariae can be found in night blood (individuals with large numbers of microfilariae *L. loa*) like *W. bancrofti*. Both has sheath visible under microscopy. On the other hand, the differences between species can be identified by skilled technicians. Microfilariae with a single nucleus in the tip of the tail is classified as *L. loa*. Predicting this potential problem of differentiation between species, the secretary of Health Surveillance, Ministry of Health of Brazil, published a technical note (TN) n°

09/2013 (Guidelines for LF Surveillance)[33]. The TN was sent to all Central Laboratories of the Brazilian states, recommending that all microfilaremic individuals must undergo morphological identification of filarial worms before treatment with DEC. It also recommends the use of other diagnostic tools, such as CFA by Og4C3-ELISA and DQM by the polycarbonate membrane filtration technique using venous blood. This TN also recommends that both morphological differentiation of parasites and other complementary tests (antibody research Bm-14 and DNA *W. bancrofti*) should be carried out by the SRNF/CPqAM/Fiocruz-PE[21,22,24].

Only 1/15 immigrants had undergone other complementary tests (TBF, DQM, Og4C3-ELISA, antibody research Bm-14 and DNA *W. bancrofti*), confirming the results found by the LFDIL and in all cases tested positive for infection with *W. bancrofti*. This individual had a parasite load of 34 microfilariae/mL. Jayasekera *et al.* draw attention to the high capacity of *C. quinquefasciatus* to become infected when feeding on people with very different levels of microfilaremia and even those with very low levels (< 5 microfilariae/mL) were capable of producing infectious larvae (L3)[34]. These authors also observed that with a density of between 31 and 100 microfilariae/mL, 165/259 (63.7%) of the mosquitoes dissected were infected, with an average of 3.27 (1–15) L3 per mosquito. It should be noted that in both the Republic of Haiti and Brazil, the main vector of LF is *C. quinquefasciatus*, with a high prevalence and density of individuals in both countries[30,35].

In the case of the other positive cases (14/15) that did not undergo parasitological research, it is possible that this group contains individuals with microfilariae, given that 46.7% of these individuals come from the Gonaives District, categorized as a highly endemic area, with CFA > 10%[25]. The Republic of Haiti was the first country in the Americas to carry out MDA with a combination of DEC and albendazole, in the city of Léogâne, with extensive social mobilization and successful distribution of medication to the population. The National Program for Elimination of Lymphatic Filariasis in Haiti (NPFLH) was able to expand this pilot MDA, undertaken in 2000, to other endemic regions of the country. Despite all the NPFLH's efforts to maintain and expand MDA over the past 14 years, financial, political and climate problems have led to discontinue MDA in various areas of the country, preventing the expansion of MDA to other districts[36]. According to Oscar *et al.*, a MDA was scheduled in the Gonaives District in 2008[36]. However, successive hurricanes in this region caused frequent flooding and the implementation of the MDA was not possible. Furthermore, in 2010, earthquake interrupted the NPFLH itself and it was only in 2012 that the NPFLH was able to cover all endemic areas of the country with at least one MDA cycle. The World Health Organization recommends 4–6 cycles of treatment. In this study, over 24% of the Haitian immigrants testing negative on the point of care AD12-ICT card test were from Gonaives District. Some of these individuals who were reported to participate in an MDA cycle (data not shown) that might not have been enough to overcome the infection, but may have decreased the parasite load. Iqbal and Sher conducted a study in Kuwait to determine the prevalence of LF in groups of immigrants from India, the Philippines and Sri Lanka[37]. The authors found that the point of care AD12-ICT card test failed to detect CFA in a group of individuals with microfilariae and low parasite load (< 20 microfilariae/mL), suggesting a decrease in sensitivity of the point of care AD12-ICT card test in cases of low parasitaemia. If so, probably the Gonaives immigrants (prevalence in this area > 10%) testing negative on the LFDIL CFA by point of care AD12-ICT card test can be infected with low or very low microfilaremia, which,

nevertheless, has the potential to infect the *C. quinquefasciatus* vector present throughout the national territory of Brazil[30,34].

There is still a large gap in scientific knowledge regarding the potential of immigrants to contribute to the development of a new source of LF and/or re-transmission in areas under control (microfilaremia > 1 or CFA by point of care AD12-ICT card test > 2%) after several cycles of MDA[38]. A recent review conducted by Ramaiah assesses the extent to which immigrants may jeopardize the achievements of elimination programs, particularly when the local *Culex* strain is highly susceptible to infection[27]. The author highlights four categories of immigrants that may affect the efforts of the LF elimination plan: A) immigrants from endemic areas migrating to non-endemic areas; B) immigrants from rural to urban areas; C) immigrants from endemic areas to areas with control/elimination of LF and D) immigrants in border areas. In Brazil, there are three classifications regarding the situation of the LF: 1) non-endemic areas; 2) areas with control/elimination of LF and 3) former foci where LF is considered to have been eliminated[10,12–14]. Immigrants from countries endemic for LF can be found in all areas and according to Ramaiah classification, immigrants of category A and C are found in Brazil[16,17,19,27]. However, Hairston and de Meillon reported the inefficiency of transmission of *W. bancrofti* from *C. quinquefasciatus* to human[39]. The authors suggest that it would take 15500 bites by L3 *Culex* to infect an individual. They also conclude that the individual would need to have had contact with > 9000 L3 before becoming microfilaremic, which would require an average of 298 bites per year. Furthermore, evaluation of other powerful vectors of *W. bancrofti* (*Aedes* and *Anopheles*) in different parts of the world indicates that between 2700 and 100000 infective bites are needed for each new case of microfilaremia[40]. Recent data contest this evaluation of vector-host transmission efficiency[41]. Jones points out that if there were such a high inefficiency of transmission, it would not be possible to detect microfilaremia in children in endemic areas, since they would allegedly have been exposed to a significantly smaller number of infectious bites than the number estimated by the authors cited above[41]. Furthermore, Wartman also draws attention to the case of a US serviceman who became infected during a short period of exposure (1 year) while serving the army in the South Pacific during World War II[42]. Notification of acquiring LF in short-term tourists and travelers in endemic areas is not very common, particularly infection with *W. bancrofti*. On the other hand, Rubin used fine-needle aspiration cytology of a nodule in the neck of an individual who spent a short period of time in Nepal and India to demonstrate the presence of *W. bancrofti* microfilariae[43]. Another recent case of short-term exposure to infective larvae of *W. bancrofti* leading to infection, occurred with a US missionary/volunteer who spent a week in the city of Leogane, Haiti, an area known to be hyperendemic. This city, despite having undergone seven cycles of MDA, was still capable of transmitting *W. bancrofti*[44,45].

The data reported above regarding the acquisition of LF in a short period of time (ranging from 1 week to 1 year), raise the following question: despite the inefficiency of transmission of *W. bancrofti* from *C. quinquefasciatus* pointed to by Hairston and de Meillon[39], would it be possible for migrants with microfilariae to introduce or re-introduce the transmission cycle of LF in areas where LF is under control, but which have a high density of the *C. quinquefasciatus* vector, which is present in most regions of Brazil? This question as yet remains unanswered, since this study is the first to present data that point to a high prevalence of LF in migrants from areas endemic for LF. Other studies, however, have attributed the spread

of LF around the world from the migration of infected individuals to non-endemic areas, possibly introducing the transmission cycle or creating new endemic areas[40].

The presence of the appropriate vector, and its ability to sustain transmission, is one of the main requirements for such dissemination to occur. As the main vector, in both Brazil and Haiti, is *C. quinquefasciatus*, which is highly susceptible to infection, and the same strain of *W. bancrofti* may be present in Brazil as in Haiti, it may be possible to maintain the LF transmission cycle in areas 1, 2 and 3 of Brazil, as per the classification previously mentioned[30,35,40]. According to the news media, there is a higher concentration of immigrants in the south and southeast regions of Brazil, which are traditionally non-endemic regions for LF, except for the southern part of the state of Santa Catarina, where positive cases were reported in 1951 and 1967[14,16,17]. As it is a silent progressive disease, *W. bancrofti* infection is usually subclinical and does not show any specific signs or symptoms (such as itching, edema or subcutaneous evident urogenital problems). Thus, clinical identification of cases of LF is a big challenge in non-endemic areas. It is therefore of great importance that the medical staff in these areas have a high degree of clinical suspicion of LF, given the presence of this population of immigrants from endemic areas.

It also highlights that many Haitian immigrants return to their home towns and many of these areas today have completed 4–6 rounds of MDA and are carrying out a transmission assessment survey[12]. Thus, the return of native microfilariæ may jeopardize the success achieved by the NPELFH and could restart the transmission cycle of LF in areas already considered under control. The *sine qua non* for the success of PGELF is reducing microfilæmia in the blood of infected individuals to a level that makes maintenance of the vector transmission cycle unsustainable. To achieve this, it is important to keep up active surveillance to identify and treat individuals with microfilæmia.

Finally, the surveillance system should be simple and active, with targeted actions that can be easily implemented by the healthcare system to systematically identify and treat positive cases of LF, thereby sustaining the progress made by the NPELFH[12]. To achieve this goal, the following surveillance strategy activities are recommended: 1) training of technicians from municipal laboratories and state LACENS in collection of thick blood samples and the point of care AD12-ICT card test; 2) in positive cases, following the protocol issued by the Brazilian Ministry of Health through the NT; 3) training Family Health Program health workers to identify and advise immigrants on the importance of undergoing the LFDIL, focusing on the preservation of their health and their families; 4) raising awareness and encouraging immigrants from areas endemic for LF to undergo the LFDIL exams. Actions such as lectures in churches, associations, and companies that have higher concentrations of workers and institutions that represent these individuals are possible starting points for such guidance; 5) maintaining active surveillance on the borders of Brazil that have the largest influx of immigrants; 6) the medical profession in non-endemic areas needs to be aware and to be trained to perform differential diagnosis among this immigrant population coming from areas endemic for LF and 7) for all investigated individuals, using the official Brazilian Health System (Ministry of Health) to release the results of the negatives and of the positives treated and, after laboratory screening, releasing their cure certificates.

In conclusion, this surveillance action, conducted in partnership with the various health institutions in Brazil, to identify LF carriers among immigrants from endemic areas has produced pioneering results that clearly reveal that there is an influx of immigrants

carrying LF to Brazil and points to the urgent need to step up surveillance on the busiest borders. As LF is a silent and progressive parasitic disease, it is extremely important that healthcare professionals are properly trained to identify and encourage immigrants to undergo diagnostic tests for infection with *W. bancrofti* and other parasites (and all testing positive to be treated with DEC), thereby safeguarding both their own health and that of their families and all the benefits that NPELFH has given Brazil. It is noteworthy that Haiti, despite all the adversities the NPELFH suffered, has established MDA since 2000, covering all endemic areas of the country, with satisfactory coverage. It is thus critical that Haitian immigrants are diagnosed and treated so that they do not return to their hometowns and potentially restart the cycle of transmission in areas where this has been broken.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgments

This surveillance action was funded by the Department of Health Surveillance/Oswaldo Cruz Foundation/Foundation for Technological Development in Health-Vice-President for Research and Referral Laboratories (Fiocruz/FIOTECVPLR)-002-LIV11-2-1 Project. General Coordination of Hanseniasis and Diseases under Elimination, Department of Health Surveillance/Ministry of Health, DF and the Acre State Department of Health is also appreciated.

References

- [1] Center for Diseases Control and Prevention. Recommendations of international task force for disease eradication. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1993; **42**(16): 1-38.
- [2] Rebollo MP, Bockarie MJ. Shrinking the lymphatic filariasis map: update on diagnostic tools for mapping and transmission monitoring. *Parasitology* 2014; **141**(14): 1912-7.
- [3] World Health Organization. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report for 2012. *Wkly Epidemiol Rec* 2013; **88**(37): 389-400.
- [4] World Health Organization. Fiftieth World Health Assembly, Geneva, 5-14 May 1997: resolutions and decisions, annexes. Geneva: World Health Organization; 1997. [Online] Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/179638/1/WHA50_1997-REC-1_eng.pdf [Accessed on 18th May, 2016]
- [5] National Health Foundation. National Epidemiology Center. [Elimination Program of lymphatic filariasis in the Americas]. *Bol Epidemiol* 1997; **1**(6): 12. Portuguese.
- [6] Ottesen EA. The global programme to eliminate lymphatic filariasis. *Trop Med Int Health* 2000; **5**(9): 591-4.
- [7] World Health Organization. Monitoring and epidemiological assessment of the programme to eliminate lymphatic filariasis at implementation unit level. Geneva: World Health Organization; 2005. [Online] Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/179638/1/WHA50_1997-REC-1_eng.pdf [Accessed on 18th May, 2016]
- [8] Cano J, Rebollo MP, Golding N, Pullan RL, Crellen T, Soler A, et al. The global distribution and transmission limits of lymphatic filariasis: past and present. *Parasit Vectors* 2014; **7**(1): 466-85.
- [9] World Health Organization. Global programme to eliminate lymphatic filariasis. *Wkly Epidemiol Rec* 2014; **89**(38): 409-20.
- [10] Superintendency of Public Health Campaigns. [The control of endemic diseases in Brazil (1979-1984)]. Brasilia: Ministry of Health; 1985, p.

154. Portuguese.
- [11] Maciel A, Rocha A, Marzochi KB, Medeiros Z, Carvalho AB, Regis L, et al. Epidemiological study of bancroftian filariasis in Recife, northeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; **91**(4): 449-55.
- [12] Pan American Health Organization. [Lymphatic filariasis elimination in the Americas: 15th Regional Program Managers Meeting]. San Jose: Costa Rica Pan American Health Organization; 2014, p. 52. Portuguese.
- [13] Pernambuco. State Health Department. Filariasis: PE hosts international event; 2015. [Online] Available from: <http://portal.saude.pe.gov.br/noticias/secretaria-executiva-de-vigilancia-em-saude/filariose-pe-sedia-evento-internacional> [Accessed on 18th May, 2016].
- [14] Schlemper BR Jr, Steindel M, Grisard EC, Carvalho-Pinto CJ, Bernardini OJ, de Castilho CV, et al. Elimination of bancroftian filariasis (*Wuchereria bancrofti*) in Santa Catarina state, Brazil. *Trop Med Int Health* 2000; **5**(12): 848-54.
- [15] Ottesen EA, Duke BO, Karam M, Behbehani K. Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariasis. *Bull World Health Organ* 1997; **75**(6): 491-503.
- [16] Rollsing C, Trezzi H. [New immigrants change the Rio Grande do Sul scenario]; 2014. [Online] Available from: <http://zh.clicrbs.com.br/rs/noticias/noticia/2014/08/novos-migrantes-mudam-o-cenario-do-rio-grande-do-sul-4576728.html> [Accessed on 18th May, 2016] Portuguese.
- [17] Trezzi H. [Brazil adds 120 000 immigrant workers]. [Online] Available from: <http://zh.clicrbs.com.br/rs/noticias/noticia/2014/11/brasil-soma-120-mil-trabalhadores-imigrantes-4641728.html> [Accessed on 18th May, 2016] Portuguese.
- [18] Fellet J, Kawaguti L. [Sending Haitians SP opens wide migration crisis; understand]. São Paulo: British Broadcasting Corporation; 2014. [Online] Available from: http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2014/04/140425_haitianos_entenda_jf.shtml [Accessed on 18th May, 2016] Portuguese.
- [19] Fulgêncio C. [In BC, immigrants do tests elephantiasis, malaria and Chagas disease]. [Online] Available from: <http://g1.globo.com/ac/acre/noticia/2014/09/no-ac-imigrantes-fazem-exames-de-elefantiose-malaria-e-mal-de-chagas.html> [Accessed on 18th May, 2016] Portuguese.
- [20] Rocha A, Lima G, Medeiros Z, Aguiar-Santos A, Alves S, Montarroyos U, et al. Circulating filarial antigen in the hydrocele fluid from individuals living in a bancroftian filariasis area-Recife, Brazil: detected by the monoclonal antibody Og4C3-assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; **99**(1): 101-5.
- [21] Rocha A, Braga C, Belém M, Carrera A, Aguiar-Santos A, Oliveira P, 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. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; **104**(4): 621-5.
- [22] Oliveira P, Braga C, Alexander N, Brandão E, Silva A, Wanderley L, et al. Evaluation of diagnostic tests for *Wuchereria bancrofti* infection in Brazilian schoolchildren. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014; **47**(3): 359-66.
- [23] Weil GJ, Curtis KC, Fischer PU, Won KY, Lammie PJ, Joseph H, et al. A multicenter evaluation of a new antibody test kit for lymphatic filariasis employing recombinant *Brugia malayi* antigen Bm-14. *Acta Trop* 2011; **120**(1): S19-22.
- [24] Ximenes C, Brandão E, Oliveira P, Rocha A, Rego T, Medeiros R, et al. Detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in paired serum and urine samples using polymerase chain reaction-based systems. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014; **109**(8): 978-83.
- [25] Huppatz C, Durrheim D, Lammie P, Kelly P, Melrose W. Eliminating lymphatic filariasis--the surveillance challenge. *Trop Med Int Health* 2008; **13**(3): 292-4.
- [26] Kia EB, Sharifdini M, Hajjaran H, Shahbazi AE, Sayyad-Talaie Z. Impoed lymphatic filariasis in an Indian immigrant to Iran. *Iran J Parasitol* 2014; **9**(1): 145-8.
- [27] Ramaiah KD. Population migration: implications for lymphatic filariasis elimination programmes. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; **7**(1): e2079.
- [28] Toothong T, Tipayamongkhogul M, Suwannapong N, Suvannadabba S. Evaluation of mass drug administration in the program to control imported lymphatic filariasis in Thailand. *BMC Public Health* 2015; **15**(1): 975.
- [29] Wanji S, Amvongo-Adjia N, Koudou B, Njouendou AJ, Chounna Ndongmo PW, Kengne-Ouafo JA, et al. Cross-reactivity of filariasis ICT cards in areas of contrasting endemicity of *Loa loa* and *Mansonella perstans* in Cameroon: implications for shrinking of the lymphatic filariasis map in the Central African region. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; **9**(1): e0004184.
- [30] Ministry of Health. Secretariat of Health Surveillance. [Guidelines for surveillance and elimination of lymphatic filariasis]. Brasília: Ministry of Health; 2009, p. 83. Portuguese.
- [31] Carme B, Boulesteix J, Boutes H, Puruehnce MF. Five cases of encephalitis during treatment of loiasis with diethylcarbamazine. *Am J Trop Med Hyg* 1991; **44**(6): 684-90.
- [32] Boussinesq M, Gardon J, Gardon-Wendel N, Chippaux JP. Clinical picture, epidemiology and outcome of *Loa*-associated serious adverse events related to mass ivermectin treatment of onchocerciasis in Cameroon. *Filaria J* 2003; **2**(1): S4.
- [33] Secretariat of Health Surveillance. [Guidelines on the monitoring of lymphatic filariasis]. Brasília: Ministry of Health; 2013, p. 57. Portuguese.
- [34] Jayasekera N, Kalpage KS, De Silva CS. The significance of low density microfilaraemia in the transmission of *Wuchereria bancrofti* by *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say in Sri Lanka. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991; **85**(2): 250-4.
- [35] Ben-Chetrit E, Schwartz E. Vector-borne disease in Hati: a review. *Travel Med Infect Dis* 2015; **13**(2): 150-8.
- [36] Oscar R, Lemoine JF, Direny AN, Desir L, de Rochars VEMB, Poirier MJP, et al. Haiti national program for the elimination of lymphatic filariasis-A model of success in the face of adversity. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; **8**(7): e2915.
- [37] Iqbal J, Sher A. Determination of the prevalence of lymphatic filariasis among migrant workers in Kuwait by detecting circulating filarial antigen. *J Med Microbiol* 2006; **55**(4): 401-5.
- [38] World Health Organization. Transmission assessment surveys in the global programme to eliminate lymphatic filariasis. Geneva: World Health Organization; 2015. [Online] Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77690/1/WHO_HTM_NTD_PCT_2012_9_eng.pdf [Accessed on 18th May, 2016].
- [39] Hairston NG, de Meillon B. On the inefficiency of transmission of *Wuchereria bancrofti* from mosquito to human host. *Bull World Health Organ* 1968; **38**(6): 935-41.
- [40] Southgate BA. Recent advances in the epidemiology and control of filarial infections including entomological aspects of transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984; **78**(1): 19-28.
- [41] Jones RT. Non-endemic cases of lymphatic filariasis. *Trop Med Int Health* 2014; **19**(11): 1377-83.
- [42] Wartman WB. Filariasis in American armed forces in World War II. *Medicine (Baltimore)* 1947; **26**(4): 333-96.
- [43] Rubin A. Filariasis in a tourist diagnosed by fine needle aspiration cytology. *Cytopathology* 2002; **13**(6): 383-4.
- [44] Boyd A, Won KY, McClintock SK, Donovan CV, Laney SJ, Williams SA, et al. A community-based study of factors associated with continuing transmission of lymphatic filariasis in Leogane, Haiti. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; **4**(1): e640.
- [45] Marcos LA, Shapley NP, Eberhard M, Epstein JI, Fox LM, Magill A, et al. Testicular swelling due to lymphatic filariasis after brief travel to Haiti. *Am J Trop Med Hyg* 2014; **91**(1): 89-91.

APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO NA ACTA TROPICAL

Acta Tropica 176 (2017) 192–196



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



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?



Arthur Zuchi^a, Lucas Theodorovitz Prust^a, Abraham Rocha^{b,c,d}, Josué Araújo^b, Paula Senna da Silva^d, Karina Fiorillo^e, Eduardo Brandão^b, Camila Ximenes^b, Fábio Lopes^b, Carolina Cipriani Ponzi^{a,f}

^a Universidade Comunitária da Região de Chapecó — Unochapecó, Faculdade de Medicina, Chapecó, SC, Brazil

^b Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Serviço de Referência Nacional em Filarioses (CPqAM/SRNF), Fundação Oswaldo Cruz, PE, Brazil

^c Laboratório do Hospital Otávio de Freitas, Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, Brazil

^d Direção de Vigilância Epidemiológica da Secretaria, Municipal de Saúde do Município de Chapecó, SC, Brazil

^e Coordenação Geral de Hanseníase e Doenças em Eliminação (CGHDE), Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, DF, Brazil

^f Médica Infectologista, Hospital Unimed Chapecó, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Lymphatic filariasis
Immigrants
Reemergence

ABSTRACT

Lymphatic filariasis (LF) has been targeted by the World Health Organization for elimination by the year 2020. However, migration of infected individuals from areas where LF is endemic to areas considered non-endemic or foci for the control and elimination may jeopardize the achievement of this goal. The aim of the present study was to evaluate the occurrence of filarial infection by way of circulating filarial antigen (CFA) circulation using the point of care AD12-immunochromatography card (POC-ICT) among immigrants from Haiti residing in Chapecó, Santa Catarina, between May and October 2015. Of the 420 subjects examined, 77.4% were male, aged 19–54 years. Ten (2.38%) were POC-ICT positive. Of this total, one was not found. Two individuals were negative for Og4C3-ELISA and DNA/Wb-PCR in all biological samples, but positive for the anti-filarial antibody Bm14 and only one showed microfilaremia (1mf/mL). These findings point to the importance of the Brazilian surveillance action to reduce the possibility of reintroduction of LF in Chapecó, Santa Catarina, by infected immigrants, and to guarantee the success of the National LF Elimination Plan.

1. Background

Lymphatic Filariasis (LF), popularly known as elephantiasis, is a neglected disease caused by helminths of the species *Wuchereria bancrofti* (Wb), *Brugia malayi* and *B. timori* and transmitted by multiple genera of mosquitoes, especially *Culex quinquefasciatus* (Burkot et al., 2006; Ottesen, 2000). Currently, an estimated 1.403 billion individuals living in 55 countries are at risk of acquiring this parasite, requiring preventive chemotherapy to prevent transmission and the emergence of new cases of filarial morbidity (hydrocele and lymphedema). Sixteen years ago, the Global Program to Eliminate Lymphatic Filariasis (GPELF) was launched to prevent the spread of the infection and reduce morbidity, aiming to eliminate it by 2020. The main strategies of the GPELF are focused on two main objectives: a) the breakdown of transmission of the vector-human parasite through Mass Drug Administration (MDA) of the populations at risk of acquiring the infection and

b) prevention and relief of the suffering of the carriers with morbidity (WHO, 2013; WHO, 2015a).

In the Americas, where only Wb infection occurs, four countries are considered active transmission areas: Brazil, Guyana, Dominican Republic and Haiti, the latter with a higher prevalence (WHO, 2013). In Brazil, which is a signatory of the GPELF, only Recife and its metropolitan region (Olinda and Jaboatão dos Guararapes) are still an active focus of the parasitosis (NHE, 1997; PAHO, 2015). Various rounds of MDA using diethylcarbamazine citrate (DEC) alone in the metropolitan area of Recife (MAR) made it possible to reduce the prevalence of LF of 6.5% of microfilaremia in 1996–0% in 2014. Despite having reduced the prevalence of the disease to zero in the city of Recife, the MAR is still considered the main focus of LF in Brazil (Maciel et al., 1996; PAHO, 2015).

From the year 2010, thousands of immigrants from African countries (Senegal, Gambia, Ghana), the Caribbean (Dominican Republic

and Haiti) and Asia (Bangladesh and India) all endemic for *Wb*, entered Brazil through the border states of the northern region, (Nunes et al., 2016; Ottesen et al., 1997; Santos, 2016). It is estimated that, between 2010 and 2014, about 42,000 immigrants from the Dominican Republic, Haiti and Africa entered Brazil officially or illegally in search of work, establishing themselves in the different Brazilian states (Rawlinson et al., 2014; Trezzi, 2014). Of these thousands of immigrants, approximately 11,500 (27.4%) live in the southern region of Brazil, a region called the “South Maravilha” (Duarte, 2015). About 3500 Haitians reside in several municipalities in the state of Santa Catarina (SC) and it is estimated that 1800 individuals reside in the city of Chapecó (CH), in the west of the state (Debona, 2015).

SC state was considered endemic for LF between 1951 and 1967. In these periods, control actions were carried out involving selective treatment with DEC of microfilaremic individuals, or with MDA in the resident populations of the endemic areas, making it possible to eliminate LF in the state (Schlemper et al., 2000).

The current circulating filarial antigen (CFA) for *Wb* administered through point of care AD12-immunochromatography card (POC-ICT) (Binax NOW® Filariasis, Alere Inc., Scarborough, ME), for reason of its speed and practicality, has been recommended by the World Health Organization (WHO) as a diagnostic tool to be used in the mapping of the areas to be submitted to MDA, as well as in surveillance actions (Rebollo and Bockarie, 2014). In Brazil, according to the recommendations of the Secretariat of Health Surveillance of the Ministry of Health, all positive results for *Wb* infection by POC-ICT should be confirmed using other widely known diagnostic tools (membrane filtration, CFA by Og4C3-ELISA, antibody anti Bm14-ELISA, DNA-*Wb* investigation) before treatment with DEC (SHS, 2013).

The aim of the present study was to evaluate the occurrence of filarial infection among Haitian immigrants resident in the city of CH, SC, using the CFA for *Wb* conducted by POC-ICT.

2. Material and methods

2.1. Area and population studied

CH has 183,530 inhabitants and is located in the western region of the State of Santa Catarina, southern region of Brazil, located 550 km from the capital Florianópolis (IBGE, 2015). In the period from May to October 2015, an antigenic investigation was conducted to detect LF in Haitian immigrants living in CH through the CFA survey using POC-ICT. Prior to the development of the survey, the coordinators of the present study made contact with the Representatives of the Haitian Association in CH who were fluent in the Portuguese language. This occasion provided an opportunity to communicate the objectives of the study and the importance of the participation of resident immigrants.

2.2. Laboratory assays

2.2.1. Antigen investigation

It was carried out using the POC-ICT, a test that detects the CFA of *Wb* using the monoclonal antibody AD12, which recognizes a 200-kDa filarial antigen from either adult worms or microfilariae. The test was performed according to the manufacturer's instructions and read by trained technicians in the field after 10 min. Visualization of two lines (test and control) was interpreted as a positive result (Oliveira et al., 2014).

2.2.2. Complementary laboratory assays

paired venous blood and urine samples were collected between 11:00 pm – 01:00 am from patients testing positive on the POC-ICT. 10 mL of venous blood was distributed in five mL tubes with ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) to detect and quantify circulating microfilariae by filtration (QMF) (Nucleopore®) and ~ five mL to obtain serum for the assays: CFA by Og4C3-ELISA (TropBio®, Pty Ltd,

Townsville, Queensland, Australia), anti-filarial Bm-14 antibody (Filariasis CELISA, Cellabs Pty. Ltd., Brookevale, Australia tests) and DNA-*Wb*/PCR. Fifty µL of 10 mM EDTA was added to each 50 mL urine sample. The presence of DNA-*Wb*/PCR also was investigated in 100 µL of blood with EDTA and urine. Three drops of blood were distributed on two slides for study of microfilariae morphology. Blood, serum, urine and slides were stored at temperatures of 4, –20, –20 °C and room temperature, respectively, and then sent to the SRNF/CPqAM/Fiocruz-PE until the application of the standard operating procedures for each specific test. All the procedures were conducted according to the manufacturer's protocols described elsewhere (Nunes et al., 2016; Rocha et al., 2009; Weil et al., 2011; Ximenes et al., 2014).

3. Statistical analysis

The data were stored in a Microsoft Excel database and analyzed by descriptive statistics, the results are presented in tables that show the frequencies with which the variables under analysis occurred.

4. Questionnaire administration and ethics committee

Socio-demographic data and information on the use of DEC and the number of doses taken were gathered using a structured questionnaire. Those who had difficulty to understanding the questions in Portuguese were assisted by a translator. The present study was approved by the Ethics Committee of Universidade Uno Chapecó, Chapecó-SC No. CAEE. 972.980.

5. Results

A total of 420 individuals from Haiti were examined, 77.38% male, ranging in age from 19 to 54 years. The distribution by sex and age revealed that the majority of the individuals (69.29%) were in the young adult age range of between 20 and 34 years (Table 1). Of the individuals examined, 10 (2.38%) had positive POC-ICT, of these, 7 were male and 3 female, with a mean age of approximately 32 years.

The immigrants came from eight districts of the Republic of Haiti, all endemic for LF, the main district being Gonaïves, the capital of the Artibonite Department, with 147 (35%) individuals. Of these, 7 (4.76%) were POC-ICT positive. The second most common place of origin was the capital of the Republic of Haiti, Port-au-Prince, with 83 individuals (19.76%), of whom three were POC-ICT positive.

In relation to permanence of residence in the municipality of CH, 65.23% of those surveyed stated that they had lived there for more than 2 years and 34.8% for at least 6 months, including 10 positive cases.

Less than half (43.81%) of the subjects examined reported having received at least one dose of MDA for LF, with DEC, at their place of origin. Of the POC-ICT positive immigrants, only five reported receiving some of the annual doses administered by the National Filariasis

Table 1

Distribution of individuals according to the results of POC-ICT surveillance, gender and age, May to October 2015, Chapecó, Santa Catarina, Brazil.

Age (years)	Male		Female		Total (%)
	Positive	Negative	Positive	Negative	
< 20	0	2	0	0	2 (0.48)
20–24	0	36	1	16	53 (12.62)
25–29	2	91	2	28	123 (29.29)
30–34	1	87	0	27	115 (27.38)
35–39	2	51	0	13	66 (15.71)
40–44	1	30	0	4	35 (8.33)
45–49	0	13	0	3	16 (3.81)
> 50	1	5	0	0	6 (1.43)
Unifomed	0	3	0	1	4 (0.95)
Total (%)	7 (1.67)	318 (75.71)	3 (0.71)	92 (21.91)	420 (100.00)

Table 2

Results of laboratory investigation using circulating filarial antigen by POC-ICT and Og4C3-ELISA, anti-filarial Bm14 antibody, QMF and PCR DNA/Wb in nine antigen positive individuals.

Individuals	Age/Sex	POC – ICT ^a	CFA Og4C3 – ELISA (UA) ^b	Bm14 (OD) ^c	QMF ^d	+PCR
1	28/M	Positive	361	3.884	0 mf	Positive
2	30/M	Positive	32357	3.694	0 mf	Positive
3	25/M	Positive	32261	3.591	1 mf	Positive
4	26/F	Positive	6	0.462	0 mf	Negative
5	35/M	Positive	1991	1.662	0 mf	Positive
6	25/F	Positive	396	0.333	0 mf	Positive
7	52/M	Positive	350	0.110	0 mf	Positive
8	30/M	Positive	29528	0.744	0 mf	Positive
9	40/M	Positive	4	0.800	0 mf	Negative

^a PCR = Investigation of – DNA/Wb in total blood, serum and urine.

^b Point of care AD12-immunochromatography card (POC-ICT) = Positive or negative.

^c CFA by Og4C3-ELISA, Cut off ≥ 128 UA (unit antigen).

^d Anti filarial Bm14 antibody Cut off $\geq 0,200$ Optic density (OD).

^e QMF = Quantification of microfilaria.

Elimination Program in Haiti but were unable to report precisely how many MDA rounds they attended.

Of the 10 individuals diagnosed as positive for POC-ICT, only one was not located to perform venous blood and urine collection for confirmation of Wb infection through complementary tests. Table 2 shows the complementary results for the 9 individuals who were reassessed using the complementary methods. Only one individual was diagnosed as microfilaremic (1mf/mL). Individuals number 4 and 9 were negative for both CFA Og4C3-ELISA and DNA/Wb-PCR in all biological samples, but positive for anti-filarial Bm14 antibody. All other individuals were positive for POC-ICT and CFA Og4C3-ELISA, anti-filarial Bm14 antibody and DNA/Wb-PCR detection in blood, serum and urine, except for individual number 7, who tested negative for anti-filarial Bm14 antibody. The thick blood smears performed for the morphological study were all negative for MF.

In spite of intensive investigation by the Head of Epidemiological Surveillance of the Chapecó (SC) Municipal Health Department of the addresses provided by the immigrants, none of the positive individuals were found, ruling out the possibility of administering anti-filarial treatment with DEC.

6. Discussion

The present study identified a prevalence of antigen positivity of 2.38% among Haitian immigrants from areas endemic for LF, living in the city of CH. This is lower than that observed in another study, which evaluated the occurrence of filarial infection among immigrants in a border region of Brazil and identified a prevalence of 4% (Nunes et al., 2016). On the other hand, both the results of the present study and those of Nunes et al. (2016) draw attention to the problem of the re-introduction of parasitosis in former foci where it was considered extinct, as well as the introduction of the disease into new areas of Brazil.

Since the devastating earthquake that occurred in Haiti in 2010, Brazil has been the main country in the Americas to receive significant numbers of Haitian immigrants. In 2010, there was a great influx of immigrants to the entire southern region of Brazil. It is estimated that about 60% of Haitian and African immigrants entering the country legally or illegally are distributed in the three states that make up this region (Santa Catarina, Paraná and Rio Grande do Sul) (Trezzi, 2014).

In relation to socio-demographic information (age and sex) the present study, found that approximately 70% of the individuals were young adults of productive age (20–34 years) mostly males. These results corroborate with a data previously disclosed that demonstrate a greater prevalence of Haitian immigrants in this age group, generally coming in search of work and better living conditions (Santos, 2016).

The municipality of CH is an important agro-industrial center in the south of Brazil and an economic, political and cultural center in the State of SC. These aspects are attractive for immigrants. On average about 1800 Haitian immigrants work on the refrigerator industry of the city of CH (Debona, 2015).

Despite the estimated entry of 44,000 Haitians (71% men aged 19–35 years) into Brazil, in the period between 2011 and 2015 (Fleck and Foreque, 2015), to date, no study has been conducted to assess the occurrence of Wb infection involving Haitians residing in the country. The present pioneering study is thus of extreme importance, because the majority of immigrants are in the age group at risk of being infected (Brabin, 1990; Maciel et al., 1996). In addition, 35% and 19.8% of Haitians originate from the Gonaives district and the capital Port-Au-Prince, respectively, areas classified as endemic, with high prevalence for LF (Oscar et al., 2014).

The Republic of Haiti was the first country in the Americas to carry out MDA preventive chemotherapy with a combination of DEC and albendazole in the year 2000. The National Program for Elimination of Lymphatic Filariasis in Haiti (NPELFH) was able to expand this MDA to many endemic regions of the country. The success of the program was demonstrated in 2012 when 100% geographical coverage was achieved for at least one round of MDA. The average epidemiological coverage for LF MDA rounds ranged from 86% to 94%. According to the WHO, a program must achieve $\geq 65\%$ coverage in ≥ 5 MDA rounds (Lemoine et al., 2016; WHO, 2015). Despite all the NPELFH's efforts to maintain and expand MDA over the past 16 years, financial, political and climate problems have led to discontinuation of MDA in various areas of the country and prevented the expansion of MDA to other districts (Oscar et al., 2014). The MDA was scheduled in the Gonaives District in 2008 (Oscar et al., 2014). However, successive hurricanes in this region caused frequent flooding and implementation of the MDA was not possible.

As a consequence, many Haitians who entered in Brazil between January 2010 and June 2012 have never had at least one round of MDA (Nunes et al., 2016; Santos, 2016). In the present study, only 43.8% of the individuals examined reported having received at least one round of MDA for LF, with DEC, in their locality of origin, among them the 10 POC-ICT positive cases. It is widely known that, for the GPELF to be a success, in terms of both breaking transmission (decreasing the prevalence of microfilaremia) and reducing the risk of infection of the population (with preventive chemotherapy), annual participation in the MDA for at least five years is necessary (Ichimori et al., 2014; WHO, 2015).

According to the information provided by the positive individuals, the mean residence time in CH was at least 6 months. Some studies have drawn attention over the years to the potential of LF-infected, immigrants to reintroduce parasites in areas under control (during and after MDA) or even to introduce LF in non-endemic areas (Huppatz et al., 2008; Ramaiah, 2013; Tritteeraprab et al., 2000). Studies in Thailand have demonstrated the high ability of *Culex quinquefasciatus* to become infected after being fed with blood from volunteer microfilaremic immigrants from neighboring Myanmar. The authors observed that, after 14 days of feeding, mosquitoes harbored a wide variety of infective larvae (L3) as well as a wide variation in the number of L3 per mosquito, including in those vectors that fed on patients with very low parasite load (Tritteeraprab et al., 2000). In the present study, only one individual presented microfilaremia with low parasitemia (1 mf/mL) but this does not rule out the possibility of *C. quinquefasciatus* being capable of producing infection, as shown by other authors (Jayasekera et al., 1991; Tritteeraprab et al., 2000).

Ramaiah (2013), quite objectively, conducted a review of the possibility that migrants from LF endemic areas are a threat to the GPELF. Although the author reported that there was no evidence to date that such individuals represented a real threat to the elimination plan, this possibility cannot be excluded. The author also pointed out that the infected immigrant can prolong the residual microfilaremia in the areas

under MDA and active surveillance should be kept up by way of sentinel sites, with prolonged investigation and monitoring of the population in these areas (Ramaiah, 2013).

Regarding the evaluation and treatment of these patients, The Brazilian Ministry of Health standards stipulate that all positive cases of *Wb* infection detected by direct parasitological diagnosis or indirect tests (antigenemia or antibody) should be tracked using the “diagnostic toolbox available for LF” (DTALF) to confirm or rule out the diagnosis by POC-ICT (Nunes et al., 2016; Oliveira et al., 2014; Rocha et al., 2009; SHS, 2013; Ximenes et al., 2014).

Although only one individual had microfilaremia, 7 tested positive on the quantitative tests for both CFA OG4C3-ELISA and DNA-*Wb* and 8 were positive for anti-filarial BM14 antibody. For other amicrofilaremic individuals, DTALF testing unequivocally confirmed infection by *Wb*. Although the CFA Og4C3-ELISA remains positive for several years after parasitological cure and despite the fact that the anti-filarial BM14 antibody test does not distinguish active from past infection (Fink et al., 2011), positive tests are considered markers of infection until proven otherwise (Nunes et al., 2016; Rebollo and Bockaire, 2014; Weil et al., 2011; WHO, 2015). The DNA-*Wb* test thus provides the final diagnosis of active infection, as widely reported in the literature (Fink et al., 2011; Nunes et al., 2016; Ximenes et al., 2014). It is very likely that individuals positive for DNA-*Wb* are carriers of adult amicrofilaremic worms or have ultralow microfilaremia detectable in only 10 mL of venous blood by QMF (Rocha et al., 1996). Furthermore, it is possible that the females were temporarily sterilized, since these individuals reported having participated in at least one round of MDA. However, the MDA received may not have been enough to kill the adult worms and microfilaremia negative status may also be due to the presence of single-sex worms.

The present study was able to identify an important failure of the LF surveillance system regarding tracking these immigrants. This is of great importance for the success of the National Program, since it makes it possible to objectively track and possibly treat the infected individuals. Public health policies should be alert to the economic and social impact that LF can have, given the morbidity associated with the disease, and action aiming to detect and treat infected individuals is also of fundamental importance in this regard.

In order to block cases of LF imported by immigrants from Myanmar, a country with a high prevalence of LF, seeking work in Thailand, the Thai Ministry of Health introduced biannual treatment with 6 mg/kg DEC throughout the country for all immigrants from Myanmar at the time of medical examination for renewal of work permit (Toothong et al., 2015). Unlike in Thailand, the Brazilian Ministry of Health is prohibited from tying any clinical or epidemiological condition to obtaining a residence visa in the country, if the immigrant does not agree with said health action (Brasil, 1993).

Finally, the surveillance system should be simple and active, with targeted actions that can be easily implemented by the healthcare system to systematically identify and treat positive cases of LF, thereby sustaining the progress made by the National Program for the Elimination of Lymphatic Filariasis (NHF, 1997). According to Nunes et al. (2016), to achieve this goal, the following surveillance strategy activities are recommended: 1) training of technicians from municipal and state laboratories in collection of thick blood samples and the POC-ICT (now replaced by Alere Filariasis Test Strip [FTS] (WHO, 2015); 2) in positive cases, following the protocol issued by the Brazilian Ministry of Health (SHS, 2013); 3) training Family Health Program health workers to identify and advise immigrants on the importance of undergoing the LF Diagnostic, focusing on the preservation of their health and that of their families; 4) raising awareness and encouraging immigrants from LF endemic areas to undergo the LF exams. Actions such as lectures in churches, associations, companies that have higher concentrations of workers, and institutions that represent these individuals are possible starting points for such guidance; 5) maintaining active surveillance on the borders of Brazil that have the largest influx of

immigrants; 6) the medical professionals in non-endemic areas needs to be aware and to be trained to perform differential diagnosis among the immigrant population coming from LF endemic areas and 7) for all investigated individuals, using the official Brazilian Health System (Ministry of Health) to release the results of the negatives and positives treated and, after laboratory screening, releasing their cure certificates.

In conclusion, the results of the present study clearly show that infected Haitian immigrants are residing permanently in the municipality of CH and may be exposed to mosquito bites, leading to the possibility of reemergence of LF in the State of Santa Catarina. The implementation of local public health policies aiming to identify infected immigrants is crucial for maintaining LF-free areas in Brazil. Efforts should be made to develop a cooperative international surveillance program between Caribbean countries that have successfully eliminated LF (Suriname, Trinidad and Tobago, and Costa Rica) and countries that are in the process of control and elimination of the disease (Guyana, Brazil, Dominican Republic and Haiti), to avoid the re-emergence of LF in these countries or the persistence of current foci.

Conflict of interest

We declare that we have no conflicts of interest.

Authors' contributions

AZ, LT, AR AND CCP conceived the study and wrote the draft of the manuscript. JA, PS and KF provided the field work support. EB, CX AND LF carried out the laboratory assays. All authors contributed to revision, reading and approval of the article.

Acknowledgments

This surveillance action was funded by the Department of Health Surveillance/Oswaldo Cruz Foundation/Foundation for Technological Development in Health-Vice-President for Research and Referral Laboratories (Fiocruz/FIOTECVPLR)-002-LIV11-2-1 Project. General Coordination of Hanseniasis and Diseases under Elimination, Department of Health Surveillance/Ministry of Health, DF and the University Uno-Chapécó, SC and Epidemiological Surveillance of the Municipal Health Department of the Municipality of Chapécó, SC.

References

- Brabin, L., 1990. Sex differentials in susceptibility to lymphatic filariasis and implications for maternal child immunity. *Epidemiol. Infect.* 105 (2), 335–353.
- Brasil, 1993. Brasil Ministry of Health of Brazil. Portaria No. 1.286 De 26 De Outubro De. http://www.lex.com.br/doc/4362.portaria_N_1286.DE_26.DE_OUTUBRO.DE_1993.aspx. (Accessed 2 July 2016).
- 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.
- Debona, D., 2015. No Oeste De SC, Indústrias Foram Atrás Dos Imigrantes Haitianos. <http://dc.clicrbs.com.br/sc/noticias/noticia/2015/05/no-oeste-de-sc-industrias-foram-atras-dos-imigrantes-haitianos-4768503.html>. (Accessed 8 August 2016).
- Duarte, G., 2015. Palhoça é a Cidade Mais Procurada Por Imigrantes Haitianos Na Grande Florianópolis. <http://dc.clicrbs.com.br/sc/estilo-de-vida/noticia/2015/12/palhoca-e-a-cidade-mais-procurada-por-imigrantes-haitianos-na-grande-florianopolis-4931115.html>. (Accessed 23 July 2016).
- Fink, D.L., Fahle, G.A., Fischer, S., Fedorko, D.F., Nutman, T.B., 2011. Toward Molecular Parasitologic diagnosis: enhanced diagnostic sensitivity for filarial infections in mobile populations. *J. Clin. Microbiol.* 49 (1), 42–47.
- Fleck, I., Foreque, F., 2015. Brasil Concederá Permanência a 45 Mil Haitianos Que Chegaram Desde 2010. <http://www.folha.uol.com.br/mundo/2015/11/1704865-brasil-concedera-permanencia-a-45-mil-haitianos-que-chegaram-desde-2010.shtml>. (Accessed 15 May 2016).
- Huppertz, C., Durrheim, D., Lammie, P., Kelly, P., Melrose, W., 2008. Eliminating lymphatic filariasis? the surveillance challenge. *Trop. Med. Int. Health* 13 (3), 292–294.
- IBGE, 2015. Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. Estimativas Populacionais Para Os Municípios E Para as Unidades Da Federação Brasileiros. Disponível Em. http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2015/estimativa_dou.shtm (Acesso em: 04 ago. 2016).
- Ichimori, K., King, J.D., Engels, D., Yajima, A., Mikhailov, A., Lammie, P., Ottesen, E.A.,

2014. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: the processes underlying programme success. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12 (8), e3328.
- Jayasekera, N., Kalpage, K.S.P., De Silva, C.S.S., 1991. The significance of low density microfilaremia in the transmission of *Wuchereria bancrofti* by *Culex* (*Culex quinquefasciatus* Say in Sri Lanka. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85 (2), 250–254.
- Lemoine, J.F., Desormeaux, A.M., Monestime, F., Fayette, C.R., Desir, L., Direny, A.N., Carciunoiu, S., Miller, L., Knipes, A., Lammie, P., Smith, P., Stockton, M., Trofimovich, L., Bhandari, K., Reithinger, R., Crowley, K., Ottesen, E., Baker, M., 2016. Controlling Neglected Tropical Diseases (NTDs) in Haiti: implementation strategies and evidence of their success. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (10), e0004954.
- Maciel, A., Rocha, A., Marzochi, K.B., Medeiros, Z., Carvalho, A.B., Regis, L., Souza, W., Lapa, T., Furtado, A., 1996. Epidemiological study of bancroftian filariasis in Recife, northeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91 (4), 449–455.
- NHF, 1997. National health foundation. national epidemiology center., elimination program of lymphatic filariasis in the americas. *Bol. Epidemiol.* 71 (6), 12.
- Nunes, L.V., Rocha, A., Araújo, J., Braga, C., Alcantara, P., Fiorillo, K., Ximenes, C., Brandão, E., Modesto, C.D., Souza, T.M.H., Brilhante, A.F., 2016. Lymphatic filariasis: surveillance action among immigrants from endemic areas, Acre State, Brazilian Amazon. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* 6 (7), 521–526.
- Oliveira, P., Braga, C., Alexander, N., Brandão, E., Silva, A., Wanderley, L., Aguiar, A.M., Diniz, G., Medeiros, Z., Rocha, A., 2014. Evaluation of diagnostic tests for *Wuchereria bancrofti* infection in Brazilian schoolchildren. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47 (3), 359–366.
- Oscar, R., Lemoine, J.F., Direny, A.N., Desir, L., de Rochars, V.E.M.B., Poirier, M.J.P., Varghese, A., Obidegwu, I., Lammie, P.J., Streit, T.G., Milord, M.D., 2014. Haiti national program for the elimination of lymphatic filariasis-A model of success in the face of adversity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (7), e2915.
- Ottesen, E.A., Duke, B.O., Karam, M., Behbehani, K., 1997. Strategies and tools for control/elimination of lymphatic filariasis. *Bull. World Health Organ.* 75 (6), 491–503.
- Ottesen, E.A., 2000. The global programme to eliminate lymphatic filariasis. *Trop. Med. Int. Health* 5 (9), 591–594.
- PAHO, 2015. PAHO 16th regional lymphatic filariasis elimination program managers' meeting and 15th regional lymphatic filariasis elimination program review group. In: 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.
- Ramaiah, K.D., 2013. Population migration: implications for lymphatic filariasis elimination programmes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (1), e2079.
- Rawlinson, T., Siqueira Machado, A., Fontes, G., Beltrão, R.P.L., Monteiro, W.M., Martins, M., Silva-Júnior, E.F., Mourão, M.P.G., Albuquerque, B., Alecrim, M.G.C., Lacerda, M.V.G., 2014. From Haiti to the amazon: public health issues related to the recent immigration of haitians to Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (5), e2685.
- Rebollo, M.P., Bockarie, M.J., 2014. Shrinking the lymphatic filariasis map: update on diagnostic tools for mapping and transmission monitoring. *Parasitology* 141 (14), 1912–1917.
- Rocha, A., Addiss, D., Ribeiro, M.E., Norões, J., Baliza, M., Medeiros, Z., Dreyer, G., 1996. Evaluation of the Og4C3 elisa in *wuchereria bancrofti* infections: infected persons with undetectable or ultra-Low microfilarial densities. *Trop. Med. Int. Health* 1 (6), 859–864.
- Rocha, A., Braga, C., Belém, M., Carrera, A., Aguiar-Santos, A., Oliveira, P., Texeira, M.J., Furtado, A., 2009. 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. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (4), 621–625.
- SHS, 2013. Secretariat of Health Surveillance. [Guidelines on the Monitoring of Lymphatic Filariasis]. Ministry of Health, Brasília, pp. 57.
- Santos, F.V., 2016. The inclusion of international migrants in Brazilian healthcare system polices the case of Haitians in the state of Amazonas. *His. Ciênc. Saúde – Manguinhos* 23 (2), 477–494.
- Schlemper, B.R., Steindel, M., Grisard, E.C., Pinto, C.J.C., Bernardini, O.J., Castilho, C.V., Rosa, G., Kilian, S., Guarneri, A.A., Rocha, A., Medeiros, Z., Ferreira Neto, J.A., 2000. Elimination of bancroftian filariasis (*Wuchereria bancrofti*) in Santa Catarina state. Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 5 (12), 848–854.
- Toothong, T., Tipayamongkhogul, M., Suwannapong, N., Suvannadabba, S., 2015. Evaluation of mass drug administration in the program to control imported lymphatic filariasis in Thailand. *BMC Public Health* 15, e975.
- Trezzi, H., 2014. Brasil Soma 120 Mil Trabalhadores Imigrantes. *Jornal Zero Hora*. <http://m.zerohora.com.br/noticia/4641728/brasil-soma-120-mil-trabalhadores-imigrantes>. (Accessed 22 July 2016).
- Triteerapapab, S., Kanjanopas, K., Suwannadabba, S., Sangprakarn, S., Poovorawan, Y., Scott, A.L., 2000. Transmission of the nocturnal periodic strain of *Wuchereria bancrofti* by *Culex quinquefasciatus*: establishing the potential for urban filariasis in Thailand. *Epidemiol. Infect.* 125 (1), 207–212.
- WHO, 2013. Global programme to eliminate lymphatic filariasis. *Wkly Epidemiol. Rec.* 37 (88), 389–400.
- WHO, 2015. Global programme to eliminate lymphatic filariasis. *Wkly Epidemiol. Rec.* 38 (90), 489–504.
- Weil, G.J., Curtis, K.C., Fischer, P.U., Won, K.Y., Lammie, P.J., Joseph, H., Melrose, W.D., Brattig, N.W., 2011. A multicenter evaluation of a new antibody test kit for lymphatic filariasis employing recombinant *Brugia malayi* antigen Bm-14. *Acta Trop.* 120 (1), 19–22.
- Ximenes, C., Brandão, E., Oliveira, P., Rocha, A., Rego, T., Medeiros, R., Aguiar-Santos, A., Ferraz, J., Reis, C., Araújo, P., Carvalho, L., Melo, F., 2014. Detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in paired serum and urine samples using polymerase chain reaction-based systems. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109 (8), 978–983.