
ABORDAGEM MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO

LABORATORIAL DA FILÁRIA LINFÁTICA:

Wuchereria bancrofti

Abraham Rocha¹, Constância Junqueira Ayres² e André Furtado³

RESUMO

A utilização dos testes parasitológicos sanguíneos no diagnóstico da infecção pela filária linfática *Wuchereria bancrofti* possui um fator limitante, o horário de coleta. Na maioria das regiões do mundo esse parasita apresenta uma periodicidade noturna quanto às suas microfíliarias presentes no sangue periférico do hospedeiro humano, com picos de densidade entre 23 horas e 1 hora da manhã. A proposta da presente revisão foi a de enfatizar novas perspectivas no diagnóstico laboratorial da infecção pela *W. bancrofti* que possam ser utilizadas com amostras diurnas. A aplicação de técnicas de biologia molecular no diagnóstico, na busca do DNA (estrutural ou livre) filarial, parece bastante promissora tanto em *pools* de mosquitos como nos diversos líquidos biológicos, na medida em que essas técnicas permitem detectar: 1) DNA em amostras sanguíneas coletadas no período diurno; 2) DNA livre em infecções ocultas; 3) DNA livre circulante em líquidos biológicos com coleta não-invasiva; 4) menos de 1% de DNA de uma microfíliaria em um *pool* de até cem mosquitos. Desta forma, a presente revisão chama a atenção do leitor para a disponibilidade de ensaios que envolvem a biologia molecular e utilizam a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) como fonte alternativa de diagnóstico da bancroftose. Permitem ainda diagnosticar especificamente infecções causadas pela *W. bancrofti* em áreas onde coexistem outras filárias.

DESCRIPTORIOS: *Wuchereria bancrofti*. Biologia molecular. Diagnóstico. Bancroftose. PCR.

1 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Departamento de Parasitologia – Coordenador do Serviço de Referência Nacional Clínico e Laboratorial em Filariose, Fiocruz/Funasa.

2 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Departamento de Entomologia – Pesquisadora do Serviço de Referência em Culicídeos Vetores, Fiocruz/Funasa.

3 Coordenador do Serviço de Referência em Culicídeos Vetores - Fiocruz/Funasa.

Endereço para correspondência: Dr. Abraham Rocha, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz, Departamento de Parasitologia, Serviço de Referência Nacional Clínico e Laboratorial em Filariose. Av. Moraes Rego, s.n., Recife, Pernambuco, Brasil. CEP 50670-420.

E-mail: rocha@cpqam.fiocruz.br

Recebido para publicação em 15/8/2002. Revisto em 26/10/2002. Aceito em 14/11/2002.

INTRODUÇÃO

Agente etiológico

A filariose linfática, causada pela *Brugia malayi* e *Wuchereria bancrofti*, persiste como um problema de saúde pública de magnitude considerável em mais de oitenta países, distribuídos principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre (49, 69). Nas Américas, onde só ocorre a filariose causada pela *W. bancrofti*, o Haiti tem a mais alta prevalência e, no Brasil, o Grande Recife-PE é uma área de importante transmissibilidade, seguindo-se Maceió-AL (19, 36, 37). Em Belém-PA, a transmissão parece já estar controlada (4, 67). Em outras regiões, principalmente no continente africano, embora essa transmissão seja subestimada, cerca de 107 milhões de pessoas estão infectadas por esse parasita (48).

Essa parasitose tem como vetor as fêmeas de mosquitos, principalmente do gênero *Culex*, largamente difundido no Brasil. A transmissão ocorre devido à presença, no sangue humano, das formas embrionadas, chamadas de microfíliarias (Mf), que, no momento da hematofagia, são sugadas juntamente com o sangue pelas fêmeas de mosquitos. As microfíliarias desenvolvem-se no interior do mosquito, por um período de 14 a 21 dias, e tornam-se larvas infectantes ou L3. Na oportunidade de uma nova hematofagia as L3, que apresentam movimentos ativos, são depositadas na pele do indivíduo sadio e, pela solução de continuidade acarretada pela picada do mosquito, penetram no organismo. Essas larvas possuem uma predileção até o momento não esclarecida pelo sistema linfático e pelos linfonodos. Sofrem então duas mudas, tornando-se vermes adultos, machos ou fêmeas, que, após o acasalamento, produzem microfíliarias por mais de quinze anos, ou até a sua morte natural, podendo também ocorrer a morte do parasita pela ação da droga dietilcarbamazina (DEC) (16, 46, 59).

A bancroftose constitui uma das importantes causas de morbidade aguda e crônica, afetando principalmente indivíduos de baixo poder socioeconômico de todas as idades e ambos os sexos. Raramente a infecção por esse helminto pode levar o indivíduo a óbito (8). Entretanto, essa parasitose pode provocar danos irreversíveis aos vasos linfáticos (hábitat dos vermes adultos) através dos processos de obstrução (transitória) e principalmente de dilatação (permanente), tendo como conseqüências as formas clínicas desfigurantes. São várias as manifestações clínicas que levam os indivíduos a essas formas: hidrocele e elefantíase ou linfedema dos membros inferiores ou das genitálias, acarretando a incapacitação do indivíduo para desenvolver suas atividades no trabalho (15, 18, 25, 39, 43, 52).

Por várias décadas a única forma utilizada de rotina, conclusiva e comprobatória da infecção filarial, tem sido o encontro de microfíliarias no sangue periférico ou nos líquidos biológicos (urina, sangue menstrual, líquido hidrocelico, quilocelico ou sinovial). A infecção filarial é diagnosticada através das técnicas de gota espessa (GE), de concentrações de Knott (17, 34) e filtração em membranas de policarbonato (FN), as duas últimas utilizando sangue venoso (6, 13, 26).

O sorodiagnóstico que envolve a pesquisa de anticorpos do isotipo IgG4 contra filária específica (27, 28), apesar de sua alta sensibilidade, é relativamente não específico. O teste pode apresentar positividade nos indivíduos residentes de áreas endêmicas que foram simplesmente expostos à L3, sem adquirir a infecção (54), e nos indivíduos infectados com parasitas intestinais que apresentam uma fase larvária de migração através dos pulmões (Ciclo de Loss) (32), manifestando sintomatologia pulmonar semelhante à provocada pela filária (7, 54, 55).

Por outro lado, as reações cruzadas, encontradas nas pesquisas que envolvem anticorpos, poderiam ser evitadas por meio da utilização de produtos protéticos originários de antígenos recombinantes (53). Dissanayake et al. (12) sugerem que um antígeno recombinante originário de uma biblioteca de cDNA (DNA complementar), de Mf de *Brugia malayi*, denominado gene *sxp-1*, parece só estar presente nos indivíduos verdadeiramente infectados com *W. bancrofti* ou *B. malayi*. Esse teste é capaz de distinguir indivíduos com infecção ativa daqueles com infecção passada ou indivíduos que foram simplesmente expostos às larvas infectantes, sem se tornar infectados. Os autores verificaram também que não existe correlação entre a carga parasitária e a positividade do teste, demonstrando que a resposta de anticorpos ao produto do gene *sxp-1* não é estágio específico, e a sua positividade indica a presença de vermes adultos jovens ou maturos com ou sem microfíliarêmia. Anticorpos contra o produto protético gerado pelo gene *sxp-1* parecem diminuir ao longo do tratamento com DEC, fato importante no tocante ao uso do teste para monitorizar a eficácia do tratamento nos pacientes (12). Contudo, a utilização do teste em larga escala para monitorar as campanhas de tratamento em massa na comunidade precisa ser mais bem avaliada.

Recentemente foram desenvolvidos testes envolvendo dois anticorpos monoclonais, o Og4C3 e o AD12 (38, 65). Esses testes representam um grande avanço no diagnóstico filarial e são capazes de detectar antígeno circulante de *W. bancrofti* a qualquer hora do dia (63). Contudo, a sensibilidade e a especificidade deles precisam ser mais bem estudadas diante das densidades de muito baixas Mf circulantes e contra populações não endêmicas, respectivamente (56).

A utilização das ferramentas da biologia molecular no estudo da filariose teve início a partir da década de 1980, quando muitos pesquisadores

deram ênfase ao procedimento de isolar e caracterizar seqüências de DNA filial espécie-específicas (22, 60, 70). Um dos principais objetivos foi introduzir uma nova metodologia que pudesse substituir a dissecação manual de milhares de mosquitos na avaliação do impacto dos programas de controle nas áreas endêmicas através da monitorização da infecção vetorial.

Diferentemente da *B. malayi*, que pode ser mantida em animais de experimentação (cães, gatos e girds), a *W. bancrofti* possui a particularidade de essencial ou exclusivamente infectar de forma natural o homem, podendo ser mantida experimentalmente em poucas espécies de primatas em extinção (50). Desta forma, a obtenção dos vários estágios desse helminto, em grande quantidade, para ser estudados pelas diversas técnicas da biologia molecular, tem sido, de certo modo, o principal obstáculo. Os estágios de Mf e de larva L3 vêm sendo obtidos diretamente do sangue de indivíduos parasitados e dos mosquitos, respectivamente.

Diagnóstico molecular

Apesar das dificuldades em obter o parasita, Dissanayake & Piesens (10), estudando o genoma da *W. bancrofti*, verificaram que este é constituído principalmente por seqüências curtas repetitivas. Raghavan et al. (51), utilizando Mf de *W. bancrofti*, obtidas do sangue de um paciente oriundo da Índia, construíram uma biblioteca de expressão (cDNA) em um bacteriófago λ gt11 (23), onde foi possível identificar e caracterizar genes e seus produtos que podem ser importantes no estudo da relação parasito-hospedeiro. O desenvolvimento de análises enfocando o genoma filial tem proporcionado um grande avanço no estudo do diagnóstico molecular da bancroftose (47).

Com a análise do genoma filial, tem sido isolado e estudado um grande número de genes que estão sendo clonados em diferentes laboratórios simultaneamente. As estratégias básicas para compartilhar as diversas seqüências codificadas pelos genes isolados nos diversos laboratórios ao redor do mundo culminaram na criação do projeto genoma filial (62). Para evitar que uma mesma seqüência fosse rotulada com diferentes nomes, foi criado um sistema unificado de nomenclatura abordando os genes filiais (3). Após quatro anos de estudos envolvendo o genoma filial, os pesquisadores enfatizam a possibilidade da descoberta de genes candidatos à produção de vacinas (alvos de drogas) e a probabilidade da construção de um mapa genético (72).

Desta forma, tem-se demonstrado que as várias seqüências estudadas até o momento, codificantes ou não, encontradas no genoma de *B. malyi* e *W. bancrofti*, são formadas por cerca de 70 a 80% de pares de bases (pb) do tipo timina-adenina (73). Além dessas informações, verificou-se que essas seqüências estavam distribuídas de forma altamente repetitiva e enfileirada (em tandem), sendo designadas de "famílias repetitivas" (10, 75).

Quatro seqüências de famílias gênero e espécie-específicas foram identificadas por genoma haplóide, sendo dispersas no genoma da *W. bancrofti* e podendo ser utilizadas com o propósito de diagnóstico: 1) *pWB35*, com 1.300 pb de tamanho e 500-1.000 cópias (11); 2) *pWb12*, com 969 pb e 450-700 cópias (61); 3) *SspI*, com 195 pb e 300 cópias (75) e 4) *AccI*, com 254 pb em que não foi determinado o número de cópias (1).

A técnica da PCR, que tem a capacidade de amplificar seqüências específicas de DNA em até bilhões de vezes (58), tem sido empregada como uma poderosa ferramenta de biologia molecular na detecção de DNA de parasitas (66), abrindo novos caminhos para o diagnóstico laboratorial da bancroftose.

Assim, as quatro seqüências de famílias repetitivas gênero e espécie-específicas citadas acima têm sido utilizadas na construção de iniciadores (*primers*) que permitem uma alta sensibilidade e especificidade na detecção do DNA do gênero *Wuchereria*, cujas seqüências encontram-se disponíveis em um banco de referências do Projeto Genômico Filial, financiado pela Organização Mundial da Saúde (68, 72).

INFECÇÃO DO VETOR

Em estudos piloto e em alguns programas de controle, a captura de mosquitos tem sido utilizada para avaliar a transmissão da parasitose e para monitorar o impacto das intervenções na transmissão filarial. Os estudos são realizados através de técnicas entomológicas convencionais de dissecação e análise microscópica dos mosquitos (21, 24). Contudo, essas técnicas, bem como as histológicas, morfométricas e imunológicas, têm sido consideradas inadequadas na identificação e classificação dos parasitas filariais que infectam os mosquitos nas diversas áreas endêmicas (9).

O desenvolvimento de *primers* para detectar parasitos filariais em *pools* de mosquitos, a partir de seqüências de "famílias repetitivas", distribuídas ao longo do genoma, tem-se mostrado eficiente tanto na especificidade quanto na identificação do gênero das espécies de filárias que os mosquitos carregam (70, 71, 72). Esse achado é de suma importância quando outras espécies de filárias capazes de infectar o homem coexistem nas mesmas áreas de bancroftose (41).

Destaca-se entre as vantagens práticas da utilização da PCR o acondicionamento dos mosquitos à temperatura ambiente por até dois anos, sem que ocorra perda da sensibilidade. Quanto à capacidade de análise do número de mosquitos, foi verificado que, na dissecação entomológica realizada por um técnico bem treinado, pode-se dissecar e analisar aproximadamente de cem a duzentos mosquitos no período de oito horas diárias, enquanto através da PCR, um único técnico, utilizando o mesmo

tempo e um único termociclador, pode analisar uma quantidade praticamente dez vezes maior de mosquitos (42).

A utilização da PCR no diagnóstico da *W. bancrofti* tem sido desenvolvida para amplificar a "família repetitiva" de oligonucleotídeos identificados como gênero e espécie-específico presentes no DNA (*pWB35*, *pWb12*, *SspI* e *AcclI*). Esse método tem se mostrado sensível em detectar até 0,1 picograma (pg) de DNA de *W. bancrofti*, o que corresponde a aproximadamente 1% do DNA contido em uma Mf ou L3 (5, 75).

Os ensaios moleculares, por meio da amplificação da família *SspI*, têm demonstrado maior sensibilidade em detectar *W. bancrofti* no vetor *Culex quinquefasciatus*, oriundo de Recife, do que no vetor *Aedes polynesiensis* advindo da Polinésia Francesa (20, 40).

De acordo com Chanteau et al. (5), a PCR permite detectar o DNA de uma única L3 de *W. bancrofti* em um *pool* de cinquenta mosquitos. Mais recentemente, Nicolas et al. (40) foram capazes de detectar uma única L3 em um *pool* de cem mosquitos.

Embora a técnica de PCR amplifique a "família repetitiva" *SspI*, específica do gênero *Wuchereria*, ela não identifica o estágio específico do parasita. Desta forma, os resultados obtidos com a utilização da PCR apresentam limitações quanto se trata de indicar apenas o estado de infecção dos mosquitos (Mf ou L3) e não os índices de infectividade *per se* (L3). Esses índices são extremamente importantes para se inferir a transmissibilidade nas áreas endêmicas ou em áreas sob investigação. Por outro lado, estudos envolvendo *B. malayi* têm demonstrado ser factível o isolamento de genes codificadores de seqüências estágio-específicas (72).

Vários pesquisadores participantes do Projeto Genoma Filial, estudando genes do RNA ribossomal, têm selecionado seqüências do genoma da *B. malayi* que potencialmente codifiquem proteínas estágio-específicas de Mf, L2, L3, L4 e vermes adultos macho e fêmea. Com a identificação e obtenção recente, pela primeira vez no mundo, de vermes adultos machos e fêmeas vivos de *W. bancrofti* (2), a construção de *primers* de todos os estágios dessa filária poderá tornar-se realidade num futuro próximo.

Desta forma, os conhecimentos básicos da utilização de ferramentas moleculares como técnica entomológica permitirão realizar com alta sensibilidade, especificidade e rapidez o diagnóstico de um grande número de mosquitos infectados ou não com a *W. bancrofti*. Esse diagnóstico pode funcionar como interruptor da transmissão após tratamento em massa, com a DEC, nas populações humanas de áreas endêmicas.

FLUIDOS BIOLÓGICOS

Nas áreas endêmicas, onde a Mf *W. bancrofti* apresenta periodicidade noturna, a análise do sangue periférico do hospedeiro pelas técnicas

parasitológicas de GE, Knott e FN deve ser realizada com sangue capilar ou venoso, coletado entre 23 horas e 1 hora da manhã (14). Entretanto, a realização de inquéritos epidemiológicos com sangue coletado no período noturno, em algumas regiões do mundo, como o continente africano, é muito difícil ou até mesmo impossível, devido à violência ou a crenças religiosas. Portanto, um teste que possa ser realizado a qualquer hora do dia é extremamente atrativo para os sistemas de saúde das regiões endêmicas, quer do ponto de vista individual quer do da própria comunidade (57).

Norteados por essa circunstância, vários trabalhos têm identificado tanto antígenos circulantes no sorodiagnóstico, através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e de imunocromatografia (30, 64), quanto DNA de *W. bancrofti*, pela PCR, em amostras biológicas coletadas durante o dia (20, 33, 75).

O desenvolvimento da pesquisa de DNA, no diagnóstico molecular da filariose linfática, em amostras biológicas, tem aberto novas perspectivas no diagnóstico laboratorial. Nas abordagens de diagnóstico molecular, a PCR apresenta-se como uma técnica que possibilita uma grande aplicação no campo das doenças infecto-parasitárias. 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 hidrocelico e secreção pulmonar (1, 33, 74).

Lizzote et al. (31) foram os primeiros a testar a viabilidade da pesquisa de DNA de *B. malayi* em sangue total noturno de indivíduos infectados por essa filária. Trabalhando com o *primer* da família repetitiva gênero-específico (*HhaI*), descrita por MacRaynolds et al. (35), os autores foram capazes de amplificar, pela PCR, DNA de *B. malayi* em 100% dos indivíduos microfilarêmicos com densidade a partir de 1 Mf/ mL. Entretanto, estudos envolvendo a pesquisa de DNA de *W. bancrofti*, também em sangue total, têm demonstrado que a sensibilidade da PCR em amplificar a família *SspI*, gênero-específica para *Wuchereria*, em 100% dos microfilarêmicos, ocorre somente acima de 9 Mf/ml (75).

Nos últimos anos têm-se dado especial atenção ao desenvolvimento de métodos laboratoriais que possam ser utilizados durante o dia, no diagnóstico da bancroftose (30), bem como à utilização de métodos moleculares não invasivos (1, 33).

Zhong et al. (75) conseguiram detectar experimentalmente um pouco menos de 1 pg de DNA de *W. bancrofti*, em sangue ou soro humano, sugerindo que a técnica da PCR para amplificar o *SspI* pode ser utilizada na detecção de DNA livre nos diversos líquidos biológicos durante o dia. Furtado et al. (20), comparando amostras sorológicas de indivíduos microfilarêmicos, coletadas nos períodos diurno e noturno, verificaram uma maior positividade nas amostras coletadas à noite, sugerindo a possibilidade de que a concentração de DNA livre circulante seja circadiana.

Partindo do princípio de que é possível a detecção de DNA livre circulante nos vários líquidos biológicos, uma nova abordagem de diagnóstico, de forma não invasiva, tem sido proposta na bancroftose. Lucena et al. (33), utilizando amostras de urina de indivíduos micro e amicrofilarêmicos, foram capazes de amplificar o DNA de *W. bancrofti* através do *primer SspI* em 100 e 50% das urinas analisadas, respectivamente. Recentemente, Abassi et al. (1), analisando amostras de escarro de indivíduos microfilarêmicos por meio do *primer AccI*, foram capazes de diagnosticar 88% dos casos positivos; contudo, obtiveram uma sensibilidade de 100% na identificação do total de indivíduos amicrofilarêmicos portadores de vermes adultos.

A eficiência da amplificação das seqüências desejadas através da PCR pode variar de amostra a amostra, dependendo da quantidade de DNA obtida durante o processamento metodológico. A padronização da metodologia poderá diminuir sobremaneira a presença de inibidores de PCR, presentes nos diversos líquidos biológicos, evitando resultados falso-negativos. Assim, a técnica da PCR poderá ser empregada com maior especificidade como uma ferramenta de diagnóstico. Apesar de o diagnóstico da bancroftose baseado em técnicas de biologia molecular não estar sendo ainda utilizado em larga escala, por não ter sido validado perante as diversas formas clínicas, sua aplicação para diagnóstico parece ser bastante promissora para os diversos líquidos biológicos. Isso se explica pela capacidade que essas técnicas apresentam em detectar: 1) DNA em amostras sanguíneas coletadas no período diurno; 2) DNA livre em infecções ocultas; 3) DNA livre circulante em líquidos biológicos coletados através de métodos não-invasivos; 4) especificamente infecções causadas pela *W. bancrofti* em áreas onde coexistem outras filárias.

CUSTO-BENEFÍCIO

Um aspecto importante a ser considerado na utilização de testes para diagnóstico individual ou em larga escala é o custo total do processo. Podemos citar como exemplo os testes que empregam a técnica de PCR, em que, excluindo-se os equipamentos necessários e o técnico especializado, cada amostra analisada custa aproximadamente US\$ 0,80 (44). Em relação à detecção de antígeno circulante, o custo do *kit* do Og4C3 é de cerca de US\$ 3.0 por teste (sem incluir os equipamentos ou a mão-de-obra especializada), e o ICT *card* é de aproximadamente US\$ 2,50 por teste. Os custos dos testes que utilizam a detecção de anticorpo antifilária são bem mais elevados, por não estarem ainda padronizados e não serem produzidos em escala comercial. Assim, diante das observações acima, o teste que utiliza a detecção do DNA do parasita nas amostras biológicas parece ser bastante promissor para a

adoção em áreas onde exista a infra-estrutura apropriada para esse tipo de tecnologia.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Testes mais sensíveis do que a pesquisa de microfilárias circulantes têm sido usados crescentemente. Isso vem modificando a definição de Ottesen (45), original e relativamente clara sobre os chamados "endêmicos normais" – indivíduos expostos a mosquitos infectados, mas com total ausência de qualquer evidência clínica ou parasitológica de infecção filarial, de forma a dar origem a diferentes interpretações dos testes diagnósticos. Em dois estudos recentes, todos os indivíduos amicrofilarêmicos e sem doença linfática óbvia foram considerados endêmicos normais, independente da presença ou ausência de antígeno circulante (29, 64). Assim, seria necessário seguir um padrão de definição dos grupos de indivíduos, cujas amostras biológicas seriam testadas ante os diversos testes de diagnóstico. Com isso, os resultados poderiam ser interpretados e comparados de acordo com os objetivos propostos e com a população estudada.

Em conclusão, a presença de anticorpos em indivíduos endêmicos pode ocorrer em uma boa parcela de pessoas não verdadeiramente infectadas devido às inúmeras reações cruzadas. A soronegatividade do antígeno circulante não descarta a infecção filarial, e a sua especificidade precisa ainda ser mais bem avaliada em indivíduos que compartilham outras infecções parasitárias. Por outro lado, nenhum dos testes atualmente disponíveis é marcador de morbidade filarial nem descarta a etiologia bancroftiana das doenças apresentadas pelo paciente, tais como a hidrocele, o linfedema ou mesmo a quilúria. Desta forma, enfatizamos a importância da pesquisa de antígenos para diagnosticar indivíduos amicrofilarêmicos portadores de vermes adultos, o que nenhuma outra técnica laboratorial conseguiria diagnosticar. Williams et al. (70) têm demonstrado como é prática, específica e rápida a utilização dos métodos moleculares na avaliação epidemiológica da transmissão e do controle da bancroftose.

A pesquisa de DNA através da técnica da PCR parece ser promissora como uma importante ferramenta nos estudos epidemiológicos, devendo ser utilizada na avaliação das áreas endêmicas onde a população recebeu tratamento em massa e também no controle de infecção dos vetores. Além dessas vantagens, trabalhos têm mostrado ser factível a detecção de DNA do parasito em amostras biológicas humanas obtidas de modo não invasivo (urina e escarro). Se esse achado for validado ante um grande número de amostras, poderá, sobremaneira, facilitar a adesão de um maior número de indivíduos nos programas de controle e eliminação da filariose. Por outro lado, lembramos que os *primers* das famílias repetitivas ainda não estão disponíveis para os diferentes estágios, não sendo possível a

diferenciação entre larva infectante e microfilária, quando o teste é feito no vetor.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem a Luciana Abrantes, Virginia Guimarães e Romero Euclides da Silva pela seleção dos periódicos utilizados neste trabalho.

ABSTRACT

Molecular approach in the laboratorial diagnosis of the lymphatic filariasis by *Wuchereria bancrofti*

The detection of *Wuchereria bancrofti* infection, in blood samples, frequently is not accurate due to the time-table of blood collection. In most parts of the world microfilariae are nocturnally periodic. That is, they appear only at night in the peripheral human blood, with levels peaking between 23 PM and 1 AM, what coincide with the feeding habits of the night biting mosquito *Culex quinquefasciatus*. This review aims to provide a brief overview of new perspectives for diagnosis of *W. bancrofti* infection, to be used with diurnal fluid samples. The detection of *W. bancrofti* infection based on molecular biology techniques, as the identification of filarial circulating free DNA in pools of mosquitoes and in several biological fluids is promising because it allows: i) the possibility to detect parasite DNA in diurnal collected samples; ii) the possibility to detect parasite free DNA in hidden infections; iii) the detection of parasite circulating free DNA in biological fluids, by mean of a non invasive collection of samples; iv) the possibility to diagnose specifically *W. bancrofti* infection, in areas where it cohabits with other filariae; and v) the possibility to detect less than 1% of the total DNA of a single microfilaria, in a pool of 100 mosquitoes. Thus, this review stresses the advantages of the use of PCR technique as an alternative tool in the diagnosis of bancroftian filariasis.

KEYWORDS: *Wuchereria bancrofti*. Molecular biology. Diagnosis. Bancroftian filariasis. PCR.

REFERÊNCIAS

1. Abbasi I, Githure J, Ochola JJ, Agure R, Koech DK, Ramzy RM, Willams AS, Hamburger J. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction employing patients' sputum. *Parasitol Res* 85: 844-849, 1999.
2. Amaral F, Dreyer G, Samico SC, Santos A, Coutinho A. Live adult worms detected by ultrasonography in human bancroftian filariasis. *Am J Trop Med Hyg* 50: 753-757, 1994.
3. Blaxter ML, Guiliano DB, Scott AL, Willams AS. A unified nomenclature for filarial genes. *Parasitol Today* 11: 416, 1997.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. Departamento de Erradicação e controle de Endemias. Filariose. In: *Demonstrativo dos*

resultados obtidos em 1985 e projeções para 1986. Brasília: Ministério da Saúde, p. 83-88, 1996.

5. Chanteau S, Luquiaud P, Failloux AB, Williams SA. Detection of *Wuchereria bancrofti* larvae in pools of mosquitoes by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 665-666, 1994.
6. Chularerk P, Desowitz RS. A simplified membrane filtration technique for the diagnosis of microfilaremia. *J Parasitol* 56: 623-624, 1970.
7. Coutinho A, Rocha A, Medeiros Z & Dreyer G. Eosinofilia Pulmonar Tropical Filariótica e o seu Diagnóstico Diferencial. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 53: 42-51, 1998.
8. Cox FEG. Elimination of lymphatic filariasis as a public health problem. *Parasitol Today* 16: 135, 2000.
9. Denham DA & McGreevy PB. Brugian filariasis: epidemiological and experimental studies. *Adv Parasitol* 15: 243-309, 1977.
10. Dissanayake S, Piessens WF. Cloning and characterization of *Wuchereria bancrofti*-specific DNA sequence. *Mol Biochem Parasitol* 39: 147-150, 1990.
11. Dissanayake S, Min X, Piessens WF. Detection of amplified *Wuchereria bancrofti* DNA in mosquitoes with a nonradioactive probe. *Mol Biochem Parasitol* 45: 49-56, 1991.
12. Dissanayake S, Zheng H, Dreyer G, Xu M, Watawana L, Cheng G, Wang S, Morin P, Deng B, Kurmiawan L, Vicent A & Piessens WF. Evaluation of a recombinant parasite antigen for the diagnosis of lymphatic filariasis. *Am J Trop Med Hyg* 50: 727-734, 1994.
13. Dreyer G, Bêliz F. Identificação de microfilária na urina pela técnica de concentração. *Rev Bras Patol Clin* 24: 120-121, 1988.
14. Dreyer G, Pimentel A, Medeiros Z, Bêliz F, Galdino E, Moura E, Coutinho A, Andrade LD, Rocha A, Da Silva LM, Piessens WF. 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, 1996.
15. Dreyer G, Norões J, Addis D. The silent burden of sexual disability associated with lymphatic filariasis. *Acta Trop* 63: 57-60, 1997.
16. Dreyer G, Rocha A. Filariose bancroftiana. In: Ferreira W, Ávila S. *Diagnóstico Laboratorial*. Avaliação de métodos de diagnósticos das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-ímmunes. Correlação clínico-laboratorial. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2000 cap. 29, p. 299-305.
17. Eberhard ML & Lammie PJ. Laboratory diagnosis of filariasis. *Clinics in Laboratory Medicine* 11: 977-1010, 1991.
18. Figueredo-Silva J, Jugmann P, Norões J, Piessens WF, Coutinho A, Brito C, Rocha A, Dreyer G. Histological evidence for the adjuvant effect of low doses of diethylcarbamazine in bancroftian filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 192-194, 1996.
19. Fontes G, Rocha EMM, Brito AC, Antunes CMF. Lymphatic filariasis in Brazilian urban area (Maceió, Alagoas). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 705-710, 1998.
20. Furtado A, Abath FGC, Regis L, Gomes YM, Lucena WA, Furtado PB, Dhalia R, Nicolas L. 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, 1997.
21. Gad AM, Farid HÁ, Soliman BA, Morsy ZS, Beier JC. Identification of endemic foci of filariasis by examination of mosquitoes for microfilariae. *J Am Mosq Control Assoc* 11: 434-437, 1995.
22. Harnet W, Chambers AE, Renz A, Parkhouse RME. An oligonucleotide probe specific for *Onchocerca volvulus*. *Mol Biochem Parasitol* 35: 119-125, 1989.
23. Huynh TV, Young RA, Davis RW. Constructing and screening cDNA libraries in λ gt10 and λ gt11. In: *DNA cloning: A practical approach*, vol. I (D.M. Glover, ed.) pp. 49-78. IRL Press, Oxford, 1985.
24. Jayasekera N, Chelliah RV, Jansen CG, Pathmanathan S. Mosquito studies in Sri Jayawardenapura - the new capital of Sri Lanka. *Mosquito-borne Disease Bulletin* 2: 87-93, 1986.

25. Jungmann P & Figueredo-Silva J. Bancroftian filariasis in the metropolitan area of Recife (Pernambuco State, Brazil): clinical aspects in histologically diagnosed cases. *Braz J Med Biol Res* 22:687-690, 1989.
26. Knott, J. A. Method for making microfilarial surveys on day blood. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 32: 191-196, 1939.
27. Kwan-Lim GKP, Forsyth KP, Maizels RM. Filarial-specific IgG4 response correlates with active *Wuchereria bancrofti* infection. *J Immunol* 145: 4298-4305, 1990.
28. Lal RB, Ottesen EA. Enhanced diagnostic specificity in human filariasis by IgG4 antibody assessment. *J Infect Dis* 158: 1034-1037, 1988.
29. Lalitha P, Ravichandra M, Suba S, Kaliraj P, Narayanan RB, Jayaraman K. Quantitative assessment of circulating antigens in human lymphatic filariasis: a field evaluation of monoclonal antibody-based ELISA using blood collected on filter strips. *Trop Med Int Health* 3: 41-45, 1998.
30. Lammie PJ, Hightower AW, Eberhard ML. The age-specific prevalence of antigenemia in a *Wuchereria bancrofti*-exposed population. *Am J Trop Med Hyg* 51: 548-355, 1994.
31. Lizotte, MR, Supali T, Partono F, Willams SA. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Brugia malayi* in blood. *Am J Trop Med Hyg* 51: 314-321, 1994.
32. Lucena R, Rocha A, Dreyer G. Síndrome de Löföfler: um alerta necessário em área endêmica de filariose (artigo de revisão). *An Fac Med Univ Fed Pernambuco* 40: 6-13, 1995.
33. Lucena WA, Dahlia R, Abath FGC, Nicolas L, Regis LN, Furtado AF. 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, 1998.
34. Manson, P. Medical Report 13 & Customs Gag. 33 (Jan-March, 1877) : 13 Shanghai 1877. Apud SASA, M. *Human filariasis: A global survey of epidemiology and control*. Tokyo: University of Tokyo Press, 1976, 819 p.
35. McReynolds LA, Desimone SM, Willams AS. Cloning and comparison of repeated DNA sequences from the human filarial parasite pahangi. *Proc Natl Acad Sci* 83: 797-801, 1986.
36. Medeiros Z, Gomes J, Bêliz F, Coutinho A, Dreyer P, Dreyer G. Screening of army soldiers for *Wuchereria bancrofti* infection in metropolitan Recife region, Brazil: implications for epidemiological surveillance. *Trop Med Int Health* 4: 499-505, 1999.
37. Michael E & Bundy DAP. Global mapping of lymphatic filariasis. *Parasitol Today* 13: 472-476, 1997.
38. More S J, Copeman D B. A highly specific and sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating antigen in bancroftian filariasis. *Trop Med Parasitol* 41: 403-406, 1990.
39. Muhondwa EPY. *Community participation in filariasis control: the Tanzania experiments*. TDR/SER/SWG(4)/WP/83.13, WHO, 1983.
40. Nicolas L, Luquiaud P, Lardeux F, Mercer DR. A polymerase chain reaction assay to determine infection of *Aedes polynesiensis* by *Wuchereria bancrofti*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 136-139, 1996.
41. Nicolas L & Scoles GA. 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, 1997.
42. Nicolas, L. New tools for diagnosis and monitoring of bancroftian filariasis parasitism: The Polynesian Experience. *Parasitol Today* 13: 370-375, 1997.
43. Norões J, Addiss D, Santos A, Medeiros Z, Coutinho A, Dreyer, G. Ultrasonographic evidence of abnormal lymphatic vessels in young men with adult *Wuchereria bancrofti* infection in the scrotal area. *J Urol* 156: 409-412, 1996.
44. Nutman TB, Zimmerman PA, Kubofcik J, Kostyu DD. A universally applicable diagnostic approach to filarial and other infections. *Parasitol Today* 10: 239-243, 1994.
45. Ottesen, EA. Immunological aspects of lymphatic filariasis and onchocerciasis in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78 (Suppl): 9-18, 1984.

46. Ottesen EA. Filial infections. *Infect Dis Clin North Am* 7: 619-633, 1993.
47. Ottesen EA. The human filariases: New understandings, new therapeutic strategies. *Current Opinion Infectious Diseases* 7: 550-558, 1994.
48. Ottesen EA, Duke BL, Karam M, Behbehani. Strategies and tools for control/elimination of lymphatic filariasis. *Bull World Health Organ* 75: 491-503, 1997.
49. Ottesen EA. Towards elimination of lymphatic filariasis. In: Angelico M and Rocchio. *Infectious diseases and public Health*. Philadelphia, L'aquila: Balan Publishers, 1998, Lymphatic Filariasis, p. 58-64.
50. Palmiere JR, Connor DH, Purnomo V, Dennis DT, Marwoto H. Experimental infection of *Wuchereria bancrofti* in the silvered leaf monkey *Presbytis cristatus* Eschsholtz, 1821. *J Helminthol* 56: 243-245, 1982.
51. Raghavan N, McReynolds LA, Maiana CV, Feinstone SM, Jayaramanc K, Ottesen EA, Nutman TB. A recombinant clone of *Wuchereria bancrofti* with DNA specificity for human filarial parasites. *Mol Biochem Parasitol* 47: 63-72, 1991.
52. Ramu K, Raimaiah KD, Guyatt H, Evans D. Impact of lymphatic filariasis on the productivity of male weavers in a south Indian village. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 669-670, 1996.
53. Ramzy RMR, Helmy H, Faris R, Gad AM, Chandrashekar R, Weill GJ. Evaluation of a recombinant antigen-based antibody assay for diagnosis of bancroftian filariasis in Egypt. *Ann Trop Med Parasitol* 89: 443-446, 1995.
54. Rocha A. *Estudo imunológico da síndrome de eosinofilia pulmonar tropical causada pela filária e outros helmintos*. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, p.p 136, 1995.
55. Rocha A, Dreyer G, Poindexter RW, Ottesen EA Syndrome resembling tropical eosinophilia but of non-filarial aetiology: serologic findings with filarial antigens. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89: 573-575, 1995.
56. Rocha A, Addiss D, Eunice Ribeiro M, Norões J, Baliza M, Dreyer G. 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, 1996.
57. Rocha A. Métodos laboratoriais disponíveis para o diagnóstico da filariose linfática. *Rev Soc Bras Anál Clin* 32: 265-270, 2000.
58. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HÁ, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354, 1985.
59. Sasa, M. Human filariasis - *A global survey of epidemiology and control*. Japão: University of Tokyo Press 1976, 813p.
60. Sim BKL, Piessens WF, Wirth DF. A DNA probe cloned in *Escherichia coli* for identification of *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol* 19: 117-123, 1986.
61. Siridewa K, Karunanayake EH, Chandrasekharan NV, Abeyewickreme W, Franzen L, Aslund L, Petersson U. Cloning and characterization of repetitive DNA sequence specific for *Wuchereria bancrofti*. *Am J Med Hyg* 51: 495-500, 1994.
62. Unnasch, TR. The filarial genome project. *Parasitol Today* 10: 415-417, 1994.
63. Weil GJ, Liftis F. Identification and partial characterization of a parasite antigen in sera from humans infected with *Wuchereria bancrofti*. *J Immunol* 138: 3035-3041, 1987.
64. Weil GJ, Ramzy RMR, Chandrashekar R, Gad AM, Lowrie RC, Faris R. Parasite antigenemia without microfilaremia in bancroftian filariasis. *Am J Trop Med Hyg* 55: 333-337, 1996.
65. Weil GJ, Lammie PJ, Weiss N. The ICT filariasis test: A rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis. *Parasitol Today* 13: 401-404, 1997.
66. Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Rev* 8: 113-130, 1995.
67. WHO. Fifth report of the Who Expert Committee on Filariasis. *Lymphatic filariasis: the disease and control*. Geneva:WHO, 1992.

68. WHO. *Workshop on DNA probes and PCR for detection of filarial parasites in vectors*, 11-12 January 1993, Beverly, MA, USA. Geneva: World Health Organization, mimeographed document TDR/WKSP/FIL/93.1.
69. WHO/CTD/TDR. *Strategies for control of lymphatic filariasis infection and disease*. Report of WHO/CTD/TDR consultative meeting held at the Universiti Sains, Malaysia, Penang, Malaysia, 22-24 August 1994. (TDR/CTD/FIL/PENANG/94.1).
70. Williams AS, DeSimone SM, McReynolds LA. Species-specific oligonucleotide probes for the identification of human filarial parasites. *Mol Biochem Parasitol* 28: 163-170, 1988.
71. Williams SA, Nicolas N, Lizotte MW, Plichart C, Luquiaud P, Nguyen N, Moullia-Pelat JP. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* in blood samples from French Polynesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 384-387, 1996.
72. Williams AS, Laney SJ, Bierwert LL, Waniewski ML, Saunders L, Lu Wenhong, Hayanes S, Li W. Deep within the filarial genome: progress of the filarial genome project. *Parasitol Today* 15: 219-224, 1999.
73. Xie H, Bain O, Williams AS. Molecular phylogenetic studies on filarial parasites based on 5S ribosomal spacer sequences. *Parasite* 1: 141-151, 1994.
74. Zheng HZ, Tao Z, Readdy MVR, Harinath BC, Piessens WF. Parasite antigens in sera and urine of patients with bancroftian and brugian filariasis detected by sandwich ELISA with monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 36: 554-560, 1987.
75. Zhong M, McCarthy J, Bierwert L, Lizzotte-Waniewski MR, Chanteau S, Nutman TB, Ottesen EA, Williams SA. A PCR assay for detection of *Wuchereria bancrofti* in blood. *Am J Trop Med Hyg* 54: 357-363, 1996.