
DIAGNÓSTICO DA FILARIOSE LINFÁTICA BANCROFTIANA

Eliana M. Mauricio da Rocha¹ e Gilberto Fontes²

RESUMO

São descritos os métodos disponíveis para o diagnóstico da filariose linfática causada pela *Wuchereria bancrofti*. Uma vez que o diagnóstico clínico além de pouco sensível não é específico para infecção ativa, devem-se efetuar exames laboratoriais para confirmação da parasitose. Entre os métodos parasitológicos para pesquisa de microfilárias no sangue destacam-se a gota espessa e as técnicas de concentração, como a descrita por Knott, e a filtração em membrana de policarbonato. No entanto, qualquer que seja a técnica para a detecção de microfilárias, o horário da colheita do sangue deve obedecer à periodicidade do embrião no sangue periférico, que em nosso meio é noturna. A pesquisa parasitológica dos vermes adultos é possível graças à visualização dos parasitos utilizando a técnica de ultrasonografia. Métodos baseados na pesquisa de anticorpos contra antígenos do parasito têm a desvantagem de apresentarem especificidade e sensibilidade limitadas e de não serem capazes de distinguir entre infecção ativa e passada. Outras alternativas para o diagnóstico da bancroftose, já padronizadas e disponíveis comercialmente, são testes baseados na captura de antígenos filariais circulantes, com uso de anticorpos monoclonais, e pesquisa de DNA do parasito, através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). Esse último também pode ser utilizado para a pesquisa das larvas do parasito nos insetos vetores. O diagnóstico da infecção dos vetores é uma ferramenta complementar importante, pois permite, juntamente com a determinação das taxas de prevalência da infecção humana, monitorar a eficácia das estratégias adotadas visando ao controle e à eliminação da bancroftose em áreas endêmicas.

UNITERMOS: Filariose linfática. Bancroftose. *Wuchereria bancrofti*.
Diagnóstico.

1 Professora Adjunta de Imunologia, Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

2 Professor Adjunto de Parasitologia, Departamento de Patologia, CCB, UFAL.

Endereço para correspondência: Profª Eliana M. Mauricio da Rocha, Departamento de Patologia/CCBi/UFAL. Praça Afrânio Jorge s/n, Prado 57.010-020 Maceió, AL, Brasil.
E-mail: emmr@fapeal.br

INTRODUÇÃO

A filariose linfática bancroftiana, também conhecida como elefantíase em uma de suas fases sintomáticas avançadas, é endêmica em várias regiões tropicais, sendo estimado em 120 milhões o número de parasitados (Ottesen & Ramachandran, 1995). A *Wuchereria bancrofti* apresenta larga distribuição geográfica, atingindo 80 países e sendo encontrada, principalmente, na Ásia, África e ilhas a Oeste do Pacífico. Nas Américas é prevalente no Haiti, Costa Rica, República Dominicana, Trinidad Tobago, Brasil, Guiana e Suriname (WHO, 1999). No Brasil, atualmente, a parasitose apresenta distribuição urbana e nitidamente focal, sendo detectada, por ordem de importância, em Recife, e sua região metropolitana, como Olinda e Jaboatão (PE), Maceió (AL) e Belém (PA) (Rocha & Fontes, 1998). Focos importantes que existiram no passado, como São Luís (MA), Salvador e Castro Alves (BA), Florianópolis, Ponta Grossa e Barra de Laguna (SC), hoje são considerados extintos (MS, 1985).

Os vermes adultos da *W. bancrofti* vivem nos linfonodos e vasos linfáticos, e as fêmeas grávidas produzem microfíliarias (mf) que são encontradas no sangue periférico humano. As mf são formas embrionárias que medem de 250 a 300µm e possuem uma membrana muito delicada que funciona como uma bainha de revestimento. A presença desta bainha é importante, pois as mf, de alguns filarídeos encontradas no sangue não possuem tal estrutura, sendo este um dos critérios morfológicos para o diagnóstico diferencial. O parasito é transmitido comumente por mosquitos do gênero *Culex*, conhecidos popularmente como pernilongo, muriçoca ou carapanã, nos quais as mf se desenvolvem atingindo o estágio de larva infectante (L₃) em aproximadamente 15 dias. Estas larvas, por ocasião do repasto sanguíneo do vetor, podem penetrar através da solução de continuidade da pele do hospedeiro, de onde migram para os vasos linfáticos. Após duas mudas tornam-se vermes adultos, de sexos distintos, e sete a oito meses depois as fêmeas grávidas eliminam as primeiras mf.

Uma característica peculiar da *W. bancrofti*, verificada na maioria das regiões onde é encontrada, é a periodicidade noturna de suas mf no sangue periférico do hospedeiro – durante o dia, essas formas se localizam nos capilares profundos, principalmente nos pulmões, e durante a noite migram para o sangue periférico, apresentando o pico da microfíliarémia em torno da meia-noite, decrescendo até o final da madrugada (Hawking et al., 1966). Os mecanismos e estímulos responsáveis por essa periodicidade não são claros, embora existam investigações que procuram relacionar a periodicidade noturna com fatores físicos e químicos alterados durante o sono (Hawking et al., 1981). O pico da microfíliarémia periférica coincide, na maioria das regiões endêmicas, com o horário preferencial de hematofagismo do principal inseto transmissor, o *Culex quinquefasciatus*. Nas regiões do

Pacífico Sul e Sudeste da Ásia, onde o principal transmissor é um mosquito que exerce a hematofagia durante o dia (*Aedes polynesiensis*), as microfíliarias podem ser detectadas no sangue periférico humano a qualquer hora, com maior concentração no final da tarde (em torno das 16 horas), sendo consideradas aperiódicas ou subperiódicas diurnas (WHO, 1992).

A maioria dos portadores é microfilarêmico aparentemente assintomático, porém funciona como fonte de infecção e, do ponto de vista epidemiológico, necessita de atenção para evitar a dispersão da parasitose. Os principais fatores que interferem na epidemiologia da *W. bancrofti* são: o ser humano como única fonte de infecção (ausência de reservatórios) e a presença do mosquito *Cx. quinquefasciatus*, sendo que somente as fêmeas são hematófagas.

As manifestações clínicas da bancroftose, devido à presença do verme adulto nos vasos linfáticos, são muito variáveis e vão desde indivíduos aparentemente assintomáticos, mas já com comprometimento renal e linfático, passando por aqueles com manifestações agudas (linfangite retrógrada, linfadenite associada com febre e mal-estar, funiculite e orquiepididimite), até os que apresentam as formas crônicas da doença (linfedema, hidrocele, quilúria, hematuria e elefantíase) (Dreyer et al., 1989; Ottesen, 1992; Partono, 1983). Outras manifestações mais raras, como eosinofilia pulmonar tropical (EPT), são resultado da hiper-reatividade imunológica do hospedeiro humano às mf do parasito (Dreyer et al., 1989).

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

É pouco sensível e não específico para infecções ativas, devido à semelhança das alterações provocadas pela *W. bancrofti* com aquelas produzidas por outros agentes etiológicos com efeitos parecidos. Pacientes que se encontram em fase clínica adiantada, como elefantíase, em que as mf estão freqüentemente ausentes do sangue periférico, tornam o diagnóstico particularmente difícil. Em uma área endêmica, a história clínica de febre recorrente associada com adenolinfangite pode ser indicativo de infecção. Paciente com alteração pulmonar, eosinofilia sanguínea e altos níveis de IgE total no soro leva à suspeita de eosinofilia pulmonar tropical (EPT). Para confirmação do diagnóstico de filariose linfática existem métodos que se baseiam na busca de mf ou vermes adultos e métodos sorológicos que se baseiam na busca de anticorpos específicos e antígenos circulantes do parasito.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PARASITOLÓGICO

Pesquisa de microfilárias

O método parasitológico mais utilizado para diagnosticar a *W. bancrofti* é a pesquisa das mf no sangue periférico através da gota espessa. Colhem-se, por punção capilar digital, 20 a 80µl de sangue, fazendo-se em seguida a gota espessa, que deve ser preparada sem uso de anticoagulante para evitar a perda de mf, estimada em até 69% quando esses produtos são utilizados (Partono & Idris, 1977). Após 12-15 horas, faz-se a desesemoglobinação, cora-se pelo Giemsa e examina-se ao microscópio para verificar a presença de mf (Figura 1).



Figura 1. Microfilária de *Wuchereria bancrofti* corada pela eosina-Giemsa (aumento 100 x 10) encontrada no sangue humano. Notar a presença da bainha de revestimento (seta) (original dos Profs. Gilberto Fontes e Eliana M M da Rocha).

Para a colheita de sangue deve-se obedecer sempre o horário noturno (entre 22-24 h), para evitar resultados falso-negativos. Fontes et al. (2000), examinando 45 indivíduos microfilarêmicos de Maceió, ao longo de 24 horas, verificaram que, em sangue colhido às 15 horas, 72% dos exames de gota espessa mensurada eram falso-negativos (Gráfico 1). Esses autores

verificaram ainda que os poucos pacientes que apresentavam exames positivos às 15 horas tinham uma densidade de mf no sangue periférico 170 vezes menor quando comparados com o número de mf no horário de pico (Gráfico 1). A técnica de gota espessa é utilizada não só para o diagnóstico de casos suspeitos, mas também para quantificar ou estimar a densidade de mf circulantes, desde que as gotas de sangue sejam mensuradas, o que é usualmente feito com auxílio de tubos capilares mensurados ou pipeta automática. Essa medida de densidade de mf é indicada, por exemplo, para controle da redução da microfilaremia pós-tratamento. Outros métodos para detecção de mf também podem ser empregados, como exame de sangue a fresco entre lâmina e lamínula e contagem de mf em câmara; no entanto, são técnicas menos sensíveis e não permitem o diagnóstico específico (Denham et al., 1971).

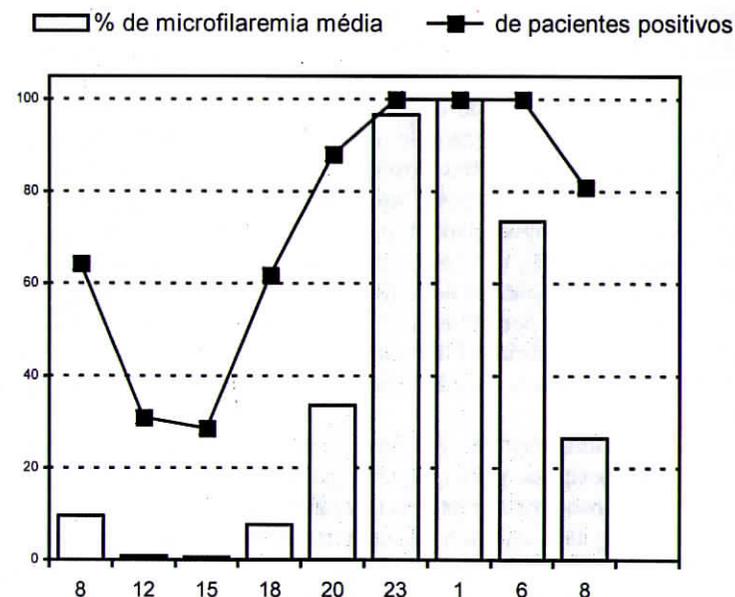


Gráfico 1. Porcentagem de microfilaremia média e porcentagem de pacientes com exames positivos (gota espessa quantitativa) para microfilárias de *Wuchereria bancrofti* em diferentes horários de colheita de sangue ao longo de 24 horas.

A pesquisa de mf pode também ser feita utilizando-se técnicas de concentração, assim denominadas porque utilizam um volume maior de sangue a ser examinado. Têm a mesma especificidade da gota espessa, porém

são mais sensíveis, particularmente em pacientes com baixa microfilaremia, ou seja, menos de 10 mf/ml de sangue (Fontes, 1996). Uma das técnicas de concentração mais utilizadas é a filtração em membrana, na qual amostras com até 10ml de sangue podem ser analisadas (Chularerk & Desowitz, 1970). É uma técnica bastante sensível e normalmente utilizada para diagnóstico de casos individuais ou no controle pós-tratamento, quando a parasitemia pode se apresentar bastante reduzida (WHO, 1992). Este método consiste na filtração do sangue diluído em solução salina tamponada, através da membrana de policarbonato, cujos poros (3 ou 5µm de diâmetro) permitem a passagem de hemácias, mas retêm as mf porventura existentes. Outra técnica de concentração, alternativa na falta de membrana de policarbonato, é a descrita por Knott (1939). Consiste em diluir o sangue na proporção de 1:10 com formol a 2% e, após centrifugação, gotas espessas são preparadas com o sedimento para pesquisa das mf. Esta técnica tem menor sensibilidade que a filtração em membrana, pois as mf ficam misturadas a um sedimento viscoso que dificulta a análise à microscopia; por isso, hoje em dia, é pouco utilizada rotineiramente.

Existindo dificuldade de colher o sangue durante a noite, pode-se induzir a microfilaremia diurna pelo uso de subdoses de dietilcarbamazina. O medicamento é empregado nas doses orais de 50mg para crianças, 100mg para adultos ou 2mg/Kg de peso. Após 30-60 minutos da administração da droga, colhe-se o sangue para a pesquisa de mf por uma das técnicas descritas. Apesar de útil, este teste tem menor sensibilidade, comparado com amostras de sangue colhidas à noite (Sabry, 1988; Singaravelu et al., 1999).

Microfilárias podem estar ausentes no sangue, mas presentes na urina (quilúria e hematúria) ou líquido da hidrocele. Nestes casos, o material obtido deve ser analisado usando técnicas de concentração (Dreyer & Béliz, 1988).

O xenodiagnóstico é uma técnica limitada praticamente a laboratórios de pesquisa, principalmente para obtenção de larvas L₃ a partir da infecção de mosquitos susceptíveis (Ramachadran, 1970).

Embora não seja um procedimento diagnóstico, a citologia de aspiração já foi empregada para detecção de mf em líquido de hidrocele, bolsa escrotal, linfonodos, nódulos de epidídimo e de mama (Vassilakos & Cox, 1974; Jayaram, 1987; Swarup et al., 1990; Kapila & Verma, 1996; Varghese et al., 1996).

Apesar das limitações da técnica da gota espessa com relação a sua sensibilidade, ainda é o método mais utilizado em áreas endêmicas para a determinação da prevalência, tanto pelo seu baixo custo como por sua relativa facilidade de execução.

Pesquisa de vermes adultos

Uma alternativa para o diagnóstico da parasitose é o uso da ultrasonografia para detectar a presença de vermes adultos nos vasos linfáticos. Com esta técnica podem-se visualizar os parasitos, principalmente nos vasos linfáticos da bolsa escrotal de pacientes microfilarêmicos assintomáticos, avaliar sua vitalidade e determinar sua localização para posterior remoção cirúrgica (Dreyer et al., 1994; Norões et al., 1996). Esta é uma técnica não invasiva para revelar os parasitos adultos vivos, a qual permite diagnosticar a infecção antes do aparecimento de manifestações clínicas e verificar a eficácia da terapêutica pelo acompanhamento da perda de motilidade dos vermes. Além disso, pode ser feita de dia ou à noite e mostra outras alterações como por exemplo a linfangiectasia e a varicocele. É particularmente útil no diagnóstico da filariose bancroftiana em pacientes amicrofilarêmicos, mas que albergam vermes vivos (Dreyer et al., 1996b). O ultra-som pode também auxiliar o diagnóstico da bancroftose em pacientes com EPT, nos quais o achado de mf no sangue periférico é raro (Dreyer et al., 1996a).

A linfocintigrafia, apesar de não diagnosticar a infecção filarial, permite avaliar as alterações anatômicas e funcionais dos vasos linfáticos infectados (Witte et al., 1993; Freedman et al., 1994).

A biópsia ou a citologia de aspiração de linfonodos, em pacientes com linfadenopatia ou com nódulos na mama ou na genitália masculina, presentes antes ou após tratamento específico, podem detectar vermes adultos (Figueiredo-Silva et al., 1994; 1996; Joshi et al., 1995; Naik et al., 1995; Kapila & Verma, 1996). No entanto, é um procedimento invasivo, que não deve ser utilizado como método de diagnóstico.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL SOROLÓGICO

Pesquisa de anticorpos circulantes

As técnicas imunológicas de uso corrente para a pesquisa de anticorpos séricos, como a reação de imunofluorescência indireta ou o ensaio imunoenzimático (ELISA), não são eficientes na bancroftose. Estes testes não permitem uma distinção da resposta imunológica humoral a antígenos filariais entre indivíduos parasitados, indivíduos já curados, e aqueles não infectados mas constantemente expostos a antígenos do parasito na área endêmica e que podem desenvolver níveis detectáveis de anticorpos (Piessens & Partono, 1980; Ottesen, 1989; WHO, 1992). Além disso, existe uma associação entre microfilaremia patente e imunossupressão imunológica específica a antígenos filariais, com pacientes apresentando baixos títulos de anticorpos específicos (Piessens & Mackenzie, 1982; Ottesen, 1989). Outro

problema no imunodiagnóstico da filariose é que os antígenos usados normalmente não são suficientemente específicos para resolver o problema de reações cruzadas observadas com soros de indivíduos infectados com outros helmintos, principalmente *Strongyloides stercoralis* e *Ascaris lumbricoides* (Lal & Ottesen, 1988, Yazdanbakhsh, 1990). Todos esses fatores contribuem para dificultar a padronização de um teste imunológico para o diagnóstico da infecção patente.

A especificidade dos testes sorológicos tem sido aprimorada através do uso de antígenos excretos/secretos purificados e específicos para detectar isotipos ou subclasses de imunoglobulinas, como, por exemplo, IgG₄. Alguns autores têm sugerido que uma resposta do tipo IgG₄ contra extrato solúvel do parasito é indicativa de infecção aguda ou crônica na filariose linfática (Ottesen, 1993). Este tipo de teste diminui o problema das reações cruzadas relacionadas à imunodominância de determinantes antigênicos contendo fosforilcolina, comum a vários helmintos (Ambroise-Thomas, 1974; Lal & Ottesen, 1988). Uma vez que a fosforilcolina aparentemente não estimula a produção de anticorpos da subclasse IgG₄, a medida da resposta de anticorpos a determinantes antigênicos "não fosforilcolinas" aumenta a especificidade dos testes sorológicos para a bancroftose (WHO, 1992).

Para superar as deficiências dos testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos a extratos filariais brutos ou fracionados, antígenos recombinantes têm sido descritos para este fim, permitindo a distinção de indivíduos com infecção ativa daqueles expostos ao parasito nas áreas endêmicas, mas não infectados (Dissanayake et al., 1994). Ainda assim, a maioria dos testes baseados na pesquisa de anticorpos não é capaz de distinguir entre infecção ativa ou passada, além de os títulos não correlacionarem com a intensidade de infecção, ou seja, o número de parasitos no paciente (Weil et al., 1997).

Pesquisa de antígenos circulantes

Outra abordagem utilizada para melhorar a qualidade dos testes consiste na utilização de anticorpos monoclonais que capturam antígenos filariais circulantes (CFA) de *W. bancrofti*. O teste para pesquisa de CFA é feito através de ELISA com soro (resultado semiquantitativo) ou através de imunocromatografia rápida (ICT) com resultado qualitativo (positivo/negativo) usando sangue ou soro do paciente (WHO, 1998; WHO, 1999). Ambas as técnicas já foram padronizadas e estão disponíveis comercialmente. Um destes testes foi desenvolvido a partir da produção de um anticorpo monoclonal anti-*Onchocerca gibsoni*, filarídeo de bovinos, denominado Og4C3, que se mostrou específico para captura de antígeno circulante de *W. bancrofti* no soro humano através do teste de ELISA (More

& Copeman, 1990; Turner et al., 1993). Apesar deste teste não apresentar boa sensibilidade para indivíduos com baixa microfilarêmia, ou amicrofilarêmicos, mas infectados com a forma adulta do parasito, a soropositividade com esse anticorpo monoclonal parece ser indicativo de infecção ativa, uma vez que é provável que não existam reações cruzadas com soros de indivíduos de área não endêmica de filariose linfática bancroftiana (Rocha et al., 1996). Já a técnica de imunocromatografia é mais simples, realizada em um cartão, e é baseada na detecção de antígenos circulantes de vermes adultos de *W. bancrofti*, utilizando anticorpos monoclonais. O exame pode ser feito tanto na clínica quanto no campo, com resultado imediato. As vantagens desta técnica são que se colhe o sangue a qualquer hora – uma vez que os níveis de antígeno no sangue periférico permanecem constantes durante o dia ou a noite –, não é necessário o uso de microscópio e pode-se diagnosticar filariose oculta (indivíduos com vermes adultos mas sem mf detectáveis no sangue periférico). Este método é especialmente rápido, tem alta especificidade (98,6% a 100%), sendo sua maior desvantagem o alto custo (Lammie, 1994; Rocha et al., 1996; WHO, 1998). No entanto, é adequado para o uso no campo, uma vez que permite a determinação mais rápida da distribuição da parasitose, o que agiliza a implementação das estratégias propostas pela Organização Mundial de Saúde para o controle e eliminação da filariose linfática em áreas endêmicas (Weil et al., 1997).

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL MOLECULAR

Pesquisa de DNA genômico

Novas técnicas de diagnóstico têm sido desenvolvidas, como a reação da polimerase em cadeia (PCR), baseada em uma sequência de DNA de *W. bancrofti* altamente repetitiva (Ssp I) (Zhong et al., 1996). Estudos recentes têm mostrado que este teste é bastante sensível para detectar a presença de DNA de *W. bancrofti* no sangue, na urina e até na saliva de pacientes, inclusive daqueles amicrofilarêmicos, e o material para exame pode ser coletado durante o dia (Williams et al., 1996; Lucena et al., 1998; Abbasi et al., 1999). As suas limitações estão no custo e nas dificuldades técnicas para ser feito, rotineiramente, em áreas endêmicas.

DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO NO VETOR

A verificação da presença de larvas do parasito em vetores tem por objetivo avaliar o papel que uma determinada espécie de mosquito desempenha na transmissão da filariose.

A disseção de insetos vetores em potencial, seguido da identificação microscópica das larvas encontradas, permite a identificação específica e a determinação do número de larvas nos diferentes estádios evolutivos. A partir destes dados é possível calcular o índice de infecção (porcentagem de mosquitos infectados por qualquer estágio larvário) e de infectividade (porcentagem de mosquitos albergando larvas infectantes-L₃) (Ramanchandran, 1970). No entanto, a disseção é um método enfadonho e demorado, apresentando por vezes resultado duvidoso, uma vez que a distinção específica das larvas encontradas se torna difícil em áreas onde outras espécies de filarídeos, inclusive de animais, são prevalentes.

Atualmente, a disseção vem sendo substituída pela técnica de PCR, sensível a ponto de detectar uma única larva de *W. bancrofti* em amostras contendo até 100 mosquitos (Furtado et al., 1997). A desvantagem deste método é que o cálculo dos índices de infecção e infectividade naturais ficam prejudicados, já que não é possível quantificar e distinguir os diferentes estádios evolutivos presentes. No entanto, o índice de infecção pode ser deduzido a partir da porcentagem de amostras PCR positivas usando programas de computador (Nicolas, 1997).

O diagnóstico da infecção dos vetores é uma ferramenta complementar importante em áreas onde programas de eliminação da bancroftose estão sendo implementados, pois permite, juntamente com a determinação das taxas de prevalência da infecção humana, monitorar a eficácia das estratégias de controle adotadas.

SUMMARY

Diagnosis of lymphatic bancroftian filariasis

Available diagnostic methods used to detect lymphatic filariasis due to *Wuchereria bancrofti* are described. Since clinical findings lack sensitivity and specificity, laboratorial tests are needed to confirm active filarial infection. Demonstration of microfilariae in the peripheral blood include microscopic examination of stained thick smears and concentration procedures like Knott's technique and blood membrane filtration. However, regardless the method used to detect microfilariae, the timing for collecting blood must agree with local periodicity pattern of microfilariae in the host's peripheral blood, which in our region is nocturnal. Living adult *W. bancrofti* worms can be detected and localized by ultrasound examination. Serological tests based on detection of antifilarial antibodies are relatively non-specific and do not distinguish subjects with previous filarial infection to those presently infected. Alternative choices in diagnosis of *W. bancrofti* infection, already standardized and commercially available, are monoclonal antibodies based assays which binds to circulating filarial antigens and PCR

(polymerase chain reaction) based tests that detects parasite DNA. PCR is also useful to detect filarial larvae in pools of mosquito vectors. Diagnosis of vector infection is an important complementary tool when associated with the prevalence rate of human infection, for it allows evaluation and monitoring of the efficacy of filariasis control programs in endemic areas.

KEYWORDS: Lymphatic filariasis. Bancroftian filariasis. *Wuchereria bancrofti*. Diagnosis.

REFERÊNCIAS

1. 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 patient's sputum. *Parasitol Res* 85: 844-849, 1999.
2. Ambroise-Thomas P. Immunological diagnosis of human filariasis: present possibilities, difficulties and limitations (a review). *Acta Trop* 31: 108-128, 1974.
3. Chularerk P, Desowitz RS. A simplified membrane filtration technique for the diagnosis of microfilaremia. *J Parasitol* 56: 623-624, 1970.
4. Denham DA, Dennis DT, Ponnudurai T, Nelson GS, Guy F. Comparison of a counting chamber and thick smear methods of counting microfilariae. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 65: 521-526, 1971.
5. Dissanayake S, Zheng H, Dreyer G, Xu M, Watawana L, Cheng G, Wang S, Morin P, Deng B, Kurniawan L, Vincent A, Piessens WF. Evaluation of a recombinant parasite antigen for the diagnosis of lymphatic filariasis. *Am J Trop Med Hyg* 50: 727-734, 1994.
6. Dreyer G, Béliz F. Identificação de microfilária na urina pela técnica de concentração. *Rev Bras Pat Clin* 24: 120-121, 1988.
7. Dreyer G, Coutinho A, Albuquerque R. Manifestações clínicas da filariose linfática bancroftiana. *Rev Ass Med Brasil*, 35: 189-196, 1989.
8. Dreyer G, Noroes J, Rocha A, Addis D. Detection of living adult *Wuchereria bancrofti* in a patient with tropical pulmonary eosinophilia. *Braz J Med Biol Res* 29: 1005-1008, 1996a.
9. Dreyer G, Santos A, Noroes J, Rocha A, Addis D. Amicrofilaremic carriers of adult *Wuchereria bancrofti*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 288-289, 1996b.
10. Dreyer G, Amaral F, Norões J, Medeiros Z. Ultrasonographic evidence for stability of adult worm location in bancroftian filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 558, 1994.
11. Figueiredo-Silva J, Dreyer G, Guimarães, K, Brant C, Medeiros Z. Bancroftian lymphadenopathy: absence of eosinophils in tissues despite peripheral blood hypereosinophilia. *J Trop Med Hyg* 97: 55-59, 1994.
12. Figueiredo-Silva J, Jungman P, Norões J, Piessens WF, Coutinho A, Brito C, Rocha A, Dreyer G. Histological evidence for adulticidal effect of low doses of diethylcarbamazine in bancroftian filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 192-194, 1996.
13. Fontes G, Rocha EMM, Brito AC, Fireman FAT, Antunes, CMF. The microfilarial periodicity of *Wuchereria bancrofti* in north-eastern Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 94: 373-379, 2000.
14. Fontes G. *Aspectos epidemiológicos da filariose linfática causada pela Wuchereria bancrofti no estado de Alagoas*. Belo Horizonte [Tese de Doutorado em Ciências - ICB/UFMG], 1996.
15. Freedman DO, Almeida Filho PJ, Besh S, Maia e Silva MC, Braga C, Maciel A. Lymphoscintigraphic analysis of lymphatic abnormalities in symptomatic and asymptomatic human filariasis. *J Infect Dis* 170: 927-933, 1994.
16. Furtado AF, Abath FGG, Régis L, Gomes YM, Lucena WA, Furtado PB, Dhália R, Miranda JC, 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.
17. Hawking F, Jennings T, Louis FJ, Taira E. The mechanisms which affect the periodic cycle of Pacific *Wuchereria bancrofti* microfilariae. *J Helmintol* 55: 95-100, 1981.
 18. Hawking F, Pattanayak S, Sharma LH. The periodicity of microfilariae. XI - The effect of the body temperature and other stimuli upon the cycles of *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. ceylonensis* and *Dirofilaria repens*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 60: 497-513, 1966.
 19. Jayaram G. Microfilariae in fine needle aspirates from epididymal lesions. *Acta Cytol* 31: 59-62, 1987.
 20. Joshi AM, Pangarkar MA, Ballal MM. Adult female *Wuchereria bancrofti* nematode in a fine needle aspirate of the lymph node. *Acta Cytol* 39: 138, 1995.
 21. Kapila K, Verma K. Diagnosis of parasites in fine needle breast aspirates. *Acta Cytol* 40: 653-656, 1996.
 22. Knott J. A method for making microfilarial surveys on day blood. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 33: 191-196, 1939.
 23. Lal RB, Ottesen EA. Enhanced diagnostic specificity in human filariasis by IgG₄ antibody. *J Infect Dis* 152: 1034-1037, 1988.
 24. Lammie PJ, Hightower AW, Eberhard ML. The age-specific prevalence of antigenemia in a *Wuchereria bancrofti* exposed population. *Am J Trop Med Hyg* 51:348-355, 1994.
 25. Lucena W, Dhalia R, Abath FGC, Nicolas L, Régis LN, Furtado AF. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction using urine and day blood samples from microfilaraemic patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 290-293, 1998.
 26. More SJ, Copeman DB. 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.
 27. MS - Ministério da Saúde. *O controle das Endemias no Brasil (de 1979 a 1984)*. Brasília (DF): Superintendência de Campanhas de Saúde Pública, SUCAM, 154p., 1985.
 28. Naik LP, Rege JD, Amin M. Full-length, live, adult filarial worm in a fine needle aspirate of an epikidymal nodule. *Acta Cytol* 39: 1074, 1995.
 29. Nicolas L. New tools for diagnosis and monitoring of Bancroftian filariasis parasitism: the polynesian experience. *Parasitol Today* 13: 370-375, 1997.
 30. Norões J, Addiss D, Amaral F, Coutinho A, Medeiros Z, Dreyer G. Occurrence of adult *Wuchereria bancrofti* in the scrotal area of men with microfilaremia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 55-56, 1996.
 31. Ottesen EA, Ramachandran, CP. Lymphatic filariasis, infection and disease: control strategies. *Parasitol Today* 11: 129-131, 1995.
 32. Ottesen EA. Infection and disease in lymphatic filariasis: an immunological perspective. *Parasitol* 104: 571-579, 1992.
 33. Ottesen EA. Filarial infections. *Inf Dis Clin of North America* 7: 619-633, 1993.
 34. Ottesen EA. Filariasis now. *Am J Trop Med Hyg* 41: 9-17, 1989.
 35. Partono F, Idris KN. Some factors influencing the loss of microfilariae from stained thick blood films. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 8: 158-164, 1977.
 36. Partono F. Filariasis in Indonesia: clinical manifestations and basic concepts of treatment and control. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 8-12, 1983.
 37. Piessens WF, Partono F. Host-vector-parasite relationships in Human Filariasis. In: Weinstein L., Fields B.N. *Seminars in Infectious Diseases*. New York, Thieme-Stratton Inc., v.III, p.131-152, 1980.
 38. Piessens, WF., Mackenzie, CD. Immunology of lymphatic filariasis and onchocerciasis. In: Cohen, S. & Warren, K.S. *Immunology of Parasitic Infections*. 2^a ed. Oxford, Blackwell Scient. Publ., p.622-636, 1982.
 39. Ramachandran CP. *A guide to methods and techniques in filariasis investigations*. Filariasis Research Officer Institute for Medical Research Kuala Lumpur. n.15, p.1-39, 1970.
 40. Rocha A, Addiss D, Ribeiro ME, Norões J, Baliza M, Medeiros Z, 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.
 41. Rocha EMM, Fontes G. Filariase bancroftiana no Brasil. *Rev Saúde Pública* 32: 98-105, 1998.
 42. Sabry M. A quantitative analysis of the diagnostic value of diethylcarbamazine provocation in endemic *Wuchereria bancrofti* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 117-121, 1988.
 43. Singaravelu G, Mahalingam S, Sumathy S. Estimation of different degrees of provocation by DEC (diethyl carbamazine citrate) medication in bancroftian filariasis in Vellore, Tamilnadu. *Indian J Exp Biol* 37: 1142-1143, 1999.
 44. Swarup K, Samal N, Sharma SM, Mulay R, Patil VM. Fine needle aspiration cytology in the diagnosis of bancroftian filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84: 113, 1990.
 45. Turner P, Copeman B, Gerisi D, Sperre R. A comparison of Og4C3 antigen capture ELISA, the Knott test, an IgG₄ assay and clinical signs, in the diagnosis of Bancroftian filariasis. *Trop Med Parasitol* 44: 45-48, 1993.
 46. Varghese R, Raghuvver CV, Pai MR, Bansal R. Microfilariae in cytologic smears: a report of six cases. *Acta Cytol* 40: 299-301, 1996.
 47. Vassilakos P, Cox JN. Filariasis diagnosed by cytologic examination of hydrocele fluid. *Acta Cytol* 18: 62-64, 1974.
 48. Weil GJ, Lamie PJ, Weiss N. The ICT Filariasis Test: A rapid-format antigen test for diagnosis of Bancroftian Filariasis. *Parasitol Today* 13: 401-404, 1997.
 49. WHO World Health Organization. *Epidemiologic approaches to lymphatic filariasis elimination: initial assessment, monitoring, and certification*. Report of WHO informal consultation. WHO/FIL/99.195, 35p., 1998.
 50. WHO. World Health Organization. *Lymphatic filariasis: the disease and its control*. Fifth report of the WHO Expert committee on filariasis. Geneva. Technical reports series, n. 821, 75p., 1992.
 51. WHO. World Health Organization. Division of Control of Tropical Disease. *Lymphatic Filariasis*. (<http://www.who.int/ctc/html/filariasis.htm>). 1999.
 52. Williams SA, Nicolas L, Lizotte-Waniewski M, Plichart C, Luchinud P, Nguyen IN, Moulija-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.
 53. Witte M, Jamal S, Williams WH, Witte CL, Kumaraswami V, Mcneil GC, Case TC, Panicker TMR. Lymphatic abnormalities in human filariasis as depicted by lymphocintigraphy. *Arch Int Med* 153: 737-744, 1993.
 54. Yazdanbakhsh M. Molecular biological approaches towards immunodiagnosis of filariasis. *Parasitol Today* 6: 207-208, 1990.
 55. Zhong M, Mccarthy J, Bierwert L, Lizotte-Waniewski M, Chanteau S, Nutman TB, Ottesen EA, Williams SA. A polymerase chain reaction assay for detection of the parasite *Wuchereria bancrofti* in human blood samples. *Am J Trop Med* 54: 357-363, 1996.