UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública

DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA CISTICERCOSE SUÍNA COMO CONTRIBUIÇÃO
À INSPEÇÃO DE CARNES

PAULO SÉRGIO DE ARRUDA PINTO

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano

São Paulo

1998

DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA CISTICERCOSE SUÍNA COMO CONTRIBUIÇÃO
À INSPEÇÃO DE CARNES

PAULO SÉRGIO DE ARRUDA PINTO

ORIENTADOR:

PROF. DR. PEDRO MANUEL LEAL GERMANO

Tese apresentada à Faculdade de Saúde Pública
da Universidade de São Paulo para obtenção do
grau de Doutor em Saúde Pública, Área de
Concentração em Serviços de Saúde Pública.

São Paulo

1998

PINTO, PAULO SÉRGIO DE ARRUDA
DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA
CISTICERCOSE SUÍNA COMO
CONTRIBUIÇÃO À INSPEÇÃO DE CARNES,
FSP/USP, DEPARTAMENTO DE PRÁTICA
DE SAÚDE PÚBLICA, 1998.

TESE: Doutorado em Saúde Pública, Área de
Concentração em Serviços de Saúde
Pública.

1. Cisticercose suína
2. ELISA
3. Imunoblot
4. Inspeção de Carnes
5. Saúde Pública

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

À minha mãe Idalina Gregória de Arruda

À minha esposa Ana Beatriz Fialho Pinto

Aos meus filhos Vitor, Juliana e Gustavo

Pesquisa financiada pela Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP.

Trabalho laboratorial realizado nas Seções de
Sorologia e de Bacteriologia do Instituto Adolfo
Lutz da Secretaria de Estado da Saúde-São
Paulo-SP.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano que assumiu a orientação na fase final do curso, especialmente pela dedicada participação na análise dos resultados e redação da tese.

Ao Prof. Dr. Omar Miguel e ao Prof. Dr. Gil Vianna Paim pela orientação na programação do curso e do trabalho de tese.

À Prof^a Dr^a Adelaide José Vaz pelas indispensáveis e prósperas intervenções durante a programação e orientação dos trabalhos de experimentação e auxílio na redação do documento de tese, bem como pelas decisivas articulações desempenhadas nas soluções dos problemas encontrados na fase experimental da tese. Em particular agradecemos ainda à Prof^a Adelaide pelo fornecimento de camundongos infectados com larvas de *Taenia crassiceps* para o preparo de antígenos.

Ao Dr. Paulo Mutuko Nakamura pela orientação nos trabalhos laboratoriais de rotina e incansável e eficiente apoio nas diversas dificuldades encontradas no decorrer de toda a fase experimental da tese.

Ao Prof. Dr. Laerte Pereira de Almeida pelo efetivo apoio na análise estatística

Aos seguintes profissionais e respectivas entidades pelo imprescindível auxílio na colheita ou concessão das amostras e de parasitas (larvas de *Taenia solium*):

Prof. Dr. José Lucio dos Santos - DVT / Universidade Federal de Viçosa

Prof. Romeu Gama do Carmo - DTA / Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves e Dr. Leonardo Pereira dos Santos - Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Germano Francisco Biondi - Universidade Estadual Paulista/Botucatú-SP

Dr Oscar Lago Pessoa e Dr^a Soraia Reda Gilber- Laboratório Central / Secretaria de Estado da Saúde do Paraná

Dr^a Wilma R. Guerra - Centro de Produção e Pesquisas de Imunobiológicos / Secretaria de Estado da Saúde do Paraná

Dr Rubens Luiz Ferreira Gusso - Coordenação da Campanha de Controle da Cisticercose / Secretaria de Estado da Saúde do Paraná.

Dr Celso de Oliveira - 5^a Regional de Saúde - Guarapuava-PR / Secretaria de Estado da Saúde do Paraná

Dr^a Maria Fernanda F. Moraes - Secretaria Municipal de Agricultura / Guarapuava-PR

Dr. Ronan Monteiro de Barros - Serviço de Inspeção Federal - Frigorífico Modelo - Belo Horizonte-MG

Dr. Miguel Ramos - Serviço de Inspeção Federal - Frigorífico Rajá - Carapicuíba-SP

Dr^a. Zaia - Serviço de Inspeção Estadual - Frigorífico Paulista - Recife-PE

Dr. Gil Tiago de Souza e Dr. Tarcísio Lopes Milagres -EMATER-Viçosa/Teixeiras-MG

Sr. Dagoberto Silva - DVT / Universidade Federal de Viçosa

Sr. Antônio Jorge da Silva - Serviço de Inspeção Federal - Frigorífico Modelo - Belo Horizonte-MG

À Chefia, técnicos e funcionários da Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz / Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo pela viabilização geral dos trabalhos laboratoriais da tese.

À Dr^a Vera Simonsen Dias Vieira - Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz e à Dr^a Érica - Pharmacia pela colaboração nos ensaios de fracionamento de antígenos.

À Dr^a Elvira Maria Guerra Shinohara - Seção de Hematologia do Instituto Adolfo Lutz pelo auxílio na leitura dos peptídeos reativos no imunoblot por densitometria.

À estagiária Rute Chuang Kuei Ching pelo auxílio nos trabalhos de rotina laboratorial.

À Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal Docente - CAPES pela concessão da bolsa de estudos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo financiamento da pesquisa objeto da tese, processo nº 96/2235-8.

E a todos que nos incentivaram na condução dos nossos trabalhos, especialmente aos nossos familiares, que nos transmitiram a devida força e otimismo, facilitando a conclusão do referido curso.

CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Prevalência da teníase e cisticercose.....	5
2.1.1. Teníase e cisticercose humana.....	5
2.1.2. Cisticercose suína.....	8
2.2. Aspectos patológicos e imunológicos da cisticercose suína.	11
2.3. Métodos diagnósticos empregados na cisticercose suína.	16
2.4. Diagnóstico imunológico da cisticercose.	18
2.4.1. Padronização.....	18
2.4.1.1. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	18
2.4.1.2. Imunoblot (Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot).....	22
2.4.2. Desempenho dos testes no diagnóstico da cisticercose suína.....	26
2.5. Antígenos.....	29
2.5.1. Antígenos heterólogos.....	29
2.5.2. Extratos antigênicos.....	31
2.5.3. Purificação.....	33
2.6. Inspeção de Carne e Saúde Pública.....	38
3. OBJETIVOS.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1. Amostragem.	46
4.1.1. Padronização do teste ELISA.	46
4.1.1.1. ELISA.	46
4.1.1.2. Imunoblot	47
4.1.2. Inquérito.....	47
4.1.2.1. ELISA.	47
4.1.2.2. Imunoblot	48
4.1.3. Teste de frações.	48
4.2. Preparo dos antígenos.	48
4.2.1. Obtenção dos parasitas.....	48
4.2.1.1. Forma larvária de <i>Taenia solium</i> -Tso (<i>Cysticercus cellulosae</i>).....	48
4.2.1.2. Forma larvária da <i>Taenia crassiceps</i> -Tera (<i>Cysticercus longicollis</i>).....	49
4.2.2. Obtenção de antígenos.....	49
4.2.3. Fracionamento de antígeno.....	51
4.3. Caracterização dos antígenos totais e frações.....	51
4.3.1. Dosagem de proteínas.	51
4.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).	51

4.4. ELISA.....	53
4.4.1. Técnica básica.....	53
4.4.2. Padronização.....	53
4.4.3. Inquérito.....	55
4.4.4. Determinação dos pontos de corte.....	55
4.4.5. Teste de frações.....	55
4.4.5.1. Desempenho preliminar entre frações.....	55
4.4.5.2. Titulação em bloco de F4.....	56
4.4.5.3. Desempenho comparativo entre frações e antígeno total.....	56
4.5. Imunoblot.....	56
4.5.1. Técnica básica.....	56
4.5.2. Padronização.....	58
4.5.2.1 Titulação em bloco.....	58
4.5.2.2. Análise dos peptídeos reativos que discriminam soros de suínos com cisticercose dos soros de suínos sem cisticercose.....	58
4.5.3. Inquérito.....	59
4.6. Determinação da frequência de cisticercose suína e dos seus riscos.....	59
5. RESULTADOS.....	60
5.1. Obtenção de antígenos.....	61
5.1.1. Larvas de <i>Taenia crassiceps</i> total (LT).....	61
5.1.2. Vesicular de larvas de <i>Taenia crassiceps</i> (LV).....	61
5.1.3. Escólex de larvas de <i>Taenia solium</i> (E).....	61
5.1.4. Larvas de <i>Taenia solium</i> total (CT).....	62
5.1.5. Fracionamento dos antígenos.....	62
5.2. Caracterização dos antígenos totais e frações.....	63
5.2.1. Dosagem de proteína.....	63
5.2.2. SDS-PAGE.....	63
5.3. Padronização.....	66
5.3.1. ELISA.....	66
5.3.2. Teste de frações.....	77
5.3.2.1. Desempenho preliminar entre frações.....	77
5.3.2.2. Titulação em bloco de F4.....	77
5.3.2.3. Desempenho comparativo entre frações e antígeno total.....	78
5.3.3. Imunoblot.....	79
5.3.3.1. Titulação em bloco.....	79
5.3.3.2. Análise dos peptídeos reativos que discriminam soros de suínos com cisticercose dos soros de suínos sem cisticercose.....	81
5.4. Inquérito.....	84
5.5. Determinação da frequência de cisticercose suína e dos seus riscos.....	87

6. DISCUSSÃO.....	88
6.1. Antígenos.....	89
6.2. Fracionamento de antígenos.....	90
6.3. Padronização do teste ELISA.....	93
6.4. Padronização do imunoblot.....	99
6.5. Aplicação dos testes ELISA e imunoblot padronizados no diagnóstico da cisticercose em suínos inspecionados e não inspecionados.....	105
6.6. Relação dos testes ELISA e imunoblot com a Inspeção de carnes e a Saúde Pública..	107
7. CONCLUSÕES.....	110
7.1. ELISA.....	111
7.2. Imunoblot.....	112
7.3 Frequência e riscos de ocorrência da cisticercose em suínos inspecionados e não inspecionados.....	113
8. RESUMO.....	114
9. SUMMARY.....	117
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
11. APÊNDICE.....	131

1. INTRODUÇÃO

A cisticercose causada pela forma larvária da *Taenia solium* (Tso) afeta suínos e, acidentalmente, o ser humano, constituindo um dos clássicos exemplos de zoonose e um importante problema de Saúde Pública nos países em desenvolvimento e naqueles que recebem imigrantes de áreas endêmicas.

Os suínos infectados exercem fundamental participação na transmissão direta da teniase e indireta da cisticercose humana, requerendo ações efetivas dos serviços de inspeção de produtos de origem animal para o controle dessa parasitose.

A prevalência da infecção nos suínos varia de acordo com o sistema de criação, livre no ambiente ou sob confinamento. O primeiro sistema geralmente é praticado em regiões onde predominam baixo padrão sócio-econômico-cultural, precárias condições de saneamento ambiental, comercialização comunitária de suínos e inexistência de inspeção da carne destinada ao consumo humano, favorecendo a propagação da cisticercose suína. Por outro lado, o sistema confinado, de modo geral está associado a áreas onde se aplicam tecnologia desenvolvida, suínocultura industrial, valorização dos princípios higiênico-sanitários da criação e destinação dos animais para estabelecimentos de abate controlados por serviço de inspeção, reduzindo, portanto, os riscos de transmissão da cisticercose suína.

Os efeitos da cisticercose provocam impactos sócio-econômicos e sanitários, melhor evidenciados nos países em desenvolvimento da Ásia, África e América Latina, onde deveria ser considerada prioridade em Saúde Pública (CARRADA-BRAVO, 1987; FLISSER et al, 1991). No Brasil, atinge todo o território nacional, sendo mais evidente nas áreas menos desenvolvidas economicamente (STABENOW et al, 1987).

Tanto a alta frequência da cisticercose humana em determinados países como a gravidade de seu quadro patológico para a Saúde Pública, principalmente da forma cerebral, gerando entre outros efeitos, perda da capacidade de trabalho e alta letalidade, justificam a aplicação de medidas eficazes de controle, acompanhadas do emprego de métodos eficientes de diagnóstico e de levantamento da real prevalência da teníase e da cisticercose. Onde a prevalência de infecção suína é elevada, são observadas altas taxas de cisticercose e de teníase humanas e, sobretudo, falhas ou mesmo a inexistência de medidas de controle e de diagnóstico (ARRUDA et al, 1990).

A frequência da cisticercose suína, via de regra, é determinada a partir de dados obtidos pelos serviços de inspeção em matadouros. Contudo, isto não expressa a realidade, pois, grande número de animais são abatidos clandestinamente e muitos estabelecimentos não dispõem do recurso da inspeção da carne. Esta situação é agravada, ainda, pela resistência de produtores de áreas endêmicas, em destinar os animais suspeitos a matadouros inspecionados, para evitar eventuais condenações (GONZALEZ et al, 1990).

Levantamentos efetuados, complementares, ao diagnóstico *post-mortem*, utilizando exames sorológicos, testes ELISA e imunoblot para detecção de anticorpos, poderão contribuir para a precisão dos dados oficiais em estabelecimentos inspecionados; poderão, ainda, servir de instrumento para a colheita de dados da situação atual do abate, onde não existe estrutura para inspeção ou quando existe e é pouco explorada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Prevalência da teníase e cisticercose.

2.1.1. Teníase e cisticercose humana.

A América Latina apresenta alta prevalência de cisticercose, sendo comprovada a presença da neurocisticercose em 17 países (VILLA, 1995), com frequências variando de 0,4% a 3,6% (FLISSER et al, 1991).

A prevalência da *Taenia sp.* no Brasil varia de 0,21% a 2,83% (VILLA, 1995). ARRUDA et al (1990) encontraram uma prevalência para teníase de 4% numa amostragem correspondente a 88,3% da população de duas comunidades rurais no Estado do Paraná.

Entre os pacientes internados com sintomas neurológicos no Hospital das Clínicas da UFMG, no período de 1964 a 1976, 0,55% dos casos foi de infecção por larvas de *Taenia solium* (NASCIMENTO & ARAÚJO, 1982a).

Em levantamento feito na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, em período não informado, STABENOW et al. (1987) observaram uma prevalência de 0,2% de neurocisticercose em 60.000 necrópsias, ocorrendo em: 0,55% dos 41.328 pacientes atendidos no ambulatório da clínica neurológica; 3,0% dos 8.601 pacientes internados pela Enfermaria da Neurologia; e, 0,7% das 33.096 amostras de líquido analisadas.

Após selecionarem os indivíduos epiléticos ou portadores de outros sintomas, compatíveis com neurocisticercose, que corresponderam a cerca de 3% da população de duas comunidades rurais do Estado do Paraná, ARRUDA et al (1990) constataram a prevalência de 0,47% e 0,94% em cada comunidade, pela tomografia computadorizada. Porém, esta taxa deve ser superior, considerando que muitos casos são assintomáticos.

Partindo de situações com suspeita de cisticercose, BONAMETTI et al (1992) verificaram que 20% das amostras de soro e 34% de líquido cefalorraquiano (LCR), de 50

pacientes de três Serviços de Neurologia, foram positivas ao teste ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Levantamento feito pela Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, revelou que 5,7% dos casos com quadro clínico sugestivo da doença, foram positivos à tomografia (BONAMETTI et al., 1992)

Segundo TSANG et al (1989), a prevalência de cisticercose em pacientes hospitalizados, com sintomas neurológicos e com resultados anormais em imagens tomográficas ou de ressonância magnética, se aproxima de 30%.

Investigando a ocorrência de anticorpos contra cisticercose em 1.122 indivíduos, abrangendo grupos com diagnóstico ou suspeita da doença em exploração clínica, outros sem sintomas ou que conviveram com os primeiros, em cinco hospitais de Brasília-DF, VIANNA et al (1986) verificaram que 5,2% do total foram positivos bem como 16,7% dos exames de LCR das pessoas com sinais sugestivos de neurocisticercose, pelos testes ELISA e imunofluorescência indireta.

Após analisar 2.306 necrópsias realizadas na Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, em Uberaba-MG, a partir de 1960, GOBBI et al (1980) detectaram 2,4% de casos de cisticercose. Em outro município, vizinho ao anterior (Uberlândia-MG), a ocorrência de cisticercose foi de 1,4% em 2.862 necrópsias realizadas entre 1971 e 1993 (COSTA-CRUZ et al, 1995).

Dados sobre a frequência de neurocisticercose em Centros de Neurologia do Brasil têm variado de 2,9% a 3,39%, segundo VILLA (1995).

TSANG et al (1989) estimaram como razoáveis as prevalências de 3% para a cisticercose humana em locais onde a doença é endêmica.

DIAZ et al (1992a) verificaram em área endêmica, no Peru, a prevalência de 8% de neurocisticercose.

CHEQUER & VIEIRA (1990) consideraram a neurocisticercose como doença endêmica no Estado do Espírito Santo, alertando para o significativo aumento do número de casos nos últimos anos.

Conforme CLEMENTE & WERNECK (1990), é registrado cerca de um caso de neurocisticercose por mês no Rio de Janeiro, o que afasta o conceito de raridade da doença no Estado.

SILVA-VERGARA et al (1994) constataram prevalência aproximada de 1,9% para a neurocisticercose em região endêmica de Lagamar-MG.

Baseando-se na ocorrência de 1,02% de cisticercose, em 5.883 exames de tomografia computadorizada, realizadas entre 1993 e 1995, ou seja 2,14 casos por mês, em Campina Grande-PB, GONÇALVES-COELHO & COELHO (1996), consideraram como área endêmica o município de Campina Grande e, provavelmente o Estado da Paraíba. A doença foi associada ao baixo padrão sócio-econômico da população atingida, pois 96,7% das pessoas doentes dependiam do Sistema Único de Saúde - SUS. Ainda foi destacado pelos autores que a região nordeste, a mais pobre do país, provavelmente tenha uma prevalência maior de cisticercose do que as regiões sul e sudeste.

STABENOW et al (1987) estabeleceram como parâmetros para definição de área hiperendêmica, as prevalências de 2% para teníase ou 1% para a cisticercose humana ou 5% para a cisticercose suína.

2.1.2 - Cisticercose suína

A criação livre de suínos no ambiente, influente fator de propagação da cisticercose, é comum em países da América do Sul e de outros continentes. Está associada ao abate e à distribuição de carnes não inspecionadas interferindo nas estatísticas sobre a real prevalência da cisticercose suína (HERBERT & OBERG, 1974).

Verificando a prevalência da cisticercose suína em quatro regiões do Zaire, PANDEY & MBEMBA (1976), detectaram uma larga diferença de 0,1 e 0,4% contra 4,7 e 8,1%. As regiões correspondentes aos dois últimos coeficientes caracterizavam-se pelo nível sócio-econômico bem inferior ao das demais, prevalecendo condições que favorecem a transmissão da cisticercose, como a predominância de precárias instalações sanitárias, ausência de inspeção de carnes e criação livre dos suínos.

BOLIVAR-JIMÉNEZ (1976) encontrou a taxa de infecção suína de 5,7% numa cidade do Equador.

No México a cisticercose suína chegou a 10% em matadouros e 30% em animais vivos (FLISSER, 1987).

No Peru, GONZALEZ et al (1990) encontraram em uma área endêmica, a prevalência de 23,4% pelo exame de língua, 31,2% pela necrópsia, 37,7% pelo ELISA e 51,9% pelo EITB (enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay). Em outra região endêmica no Peru, DIAZ et al (1992a) encontraram uma prevalência de 43% de cisticercose suína pelo EITB e 33% pelo exame de língua em uma mesma amostragem.

Examinando 2.358 suínos abatidos, entre 1986 e 1988, em três comunidades da Nigéria, ONAH & CHIEJINA (1995) encontraram 20% de cisticercose, sem evidenciar diferença significativa entre sexo e idade.

A taxa de cisticercose suína tem sido alta em comunidades rurais, onde são criados suínos soltos: 4% no México (SARTI et al., 1992) e 20% em duas comunidades do Estado do Paraná (ARRUDA et al., 1990). Estimando uma faixa de 10-25% de prevalência real da cisticercose suína, em uma comunidade rural, no Peru, SARTI-G et al (1992) verificaram como o mais importante fator de risco de transmissão da doença ao suíno, o seu acesso a fezes humanas em locais de maior aglomeração pública.

Segundo SCHENONE & LETONJA (1974), a prevalência da cisticercose suína no Brasil era de 3,44% antes de 1960 e 3,02% após 1960; na América Latina a prevalência foi estimada em 2,61% em animais abatidos em 1973.

BRANT et al (1969) encontraram 5,53% de prevalência de cisticercose em 77.702 suínos abatidos em um frigorífico de Minas Gerais e inspecionados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) - Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, entre 1959 e 1968, evidenciando que a situação da doença permaneceu inalterada, em comparação aos anos anteriores.

A prevalência de cisticercose em 22.753 suínos abatidos e inspecionados em Feira de Santana-BA, entre 1963 e 1973, foi de 2,3% (TEIXEIRA et al, 1977).

A frequência da cisticercose em suínos provenientes de vários Estados do país e abatidos no Rio de Janeiro, variou de acordo com a procedência dos animais, revelando em média 3,49%, entre 1960 e 1971 (FRANCIS et al., 1979).

Extraindo dados das inspeções municipal e estadual realizadas no matadouro municipal de Teresina - PI, entre 1971 e 1973, FIGUEIREDO et al. (1973) verificaram a taxa de 1,12% de cisticercose suína entre os animais abatidos e provenientes do mesmo Estado; porém, este valor foi de 4,7% nos animais oriundos do Maranhão.

Conforme STABENOW et al (1987), a taxa de prevalência da cisticercose suína conhecida no Piauí baseia-se em registros obtidos do SIF, situando-se em 2,57% de 1975 a

1979. Acredita-se que essa taxa tenha aumentado nos anos posteriores, quando o abate clandestino também aumentou.

Pelos registros do SIF em 10 Estados do Brasil, a prevalência média de cisticercose suína foi de 0,83%, entre 1970 e 1972. Esta taxa é inferior às registradas em períodos anteriores por diversos autores, devendo estar subestimada, porque grande parte da carne consumida no país, cerca de 40%, não se origina de estabelecimentos que possuem o serviço de inspeção. As maiores taxas foram observadas nos Estados de Minas Gerais, Pernambuco e Bahia (ALMEIDA, 1973).

O número de casos de cisticercose em estabelecimentos sob inspeção federal, no Estado de São Paulo, entre 1980 e 1983, representou 0,09% dos suínos abatidos. Porém estes dados podem não significar a realidade atual, por não incluir o abate clandestino, que ocorre em grandes proporções no país (CALIL, 1984).

Entre as zoonoses de maior ocorrência em suínos procedentes de oito Estados e 306 municípios e abatidos em estabelecimentos de São Paulo, sob SIF, entre 1982 e 1984, a taxa de ocorrência da cisticercose foi de 0,27%, variando de 0,01% a 2,32%, destacando-se entre as principais zoonoses diagnosticadas. A cisticercose foi detectada em todos os Estados e em 20,26% dos municípios envolvidos no abate, atingindo a taxa de 71,42% para municípios de Goiás e 54,28% de Minas Gerais (PASSOS et al., 1989).

De acordo com os dados obtidos nos registros do SIF, foram condenadas 0,56% e 0,39% das carcaças suínas abatidas no Brasil, em 1986 e 1987 respectivamente, observando-se maior número de registros no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (VILLA, 1995).

Diante do exposto, percebe-se que os registros sobre a situação da cisticercose suína no país estão, relativamente, desatualizados e sinalizam para um ligeiro decréscimo da sua prevalência em animais inspecionados pelo SIF na década de 80. Mantem-se, contudo, um

quadro indefinido e preocupante por causa das situações de clandestinidade do abate e da comercialização dos animais, o que dificulta a mensuração de sua real prevalência. Este quadro está retratado pelas escassas e dispersas taxas disponíveis sobre a ocorrência da cisticercose suína.

2.2. Aspectos patológicos e imunológicos da cisticercose suína.

O envoltório do ovo de *T. solium* se desintegra no sistema digestivo do suíno, liberando o embrião hexacanto ou oncosfera, que penetra na mucosa digestiva e chega na circulação e em diferentes tecidos, num período de dois a quatro meses (FLISSER et al, 1991).

HERBERT & OBERG (1974) e FLISSER et al (1991) demonstraram a degeneração parasitária com liberação de antígenos, estimulando a resposta imune dos suínos com cisticercose, evidenciando produção eficaz de anticorpos específicos e reação inflamatória. O local da infecção, bem como o número de cisticercos influenciam na intensidade da resposta imune; infecções mais acentuadas estimulam maior reação imunológica e reduzem a longevidade dos cisticercos, podendo explicar as variações das respostas em diferentes indivíduos (HERBERT & OBERG, 1974). A imunossupressão de linfócitos B e T em suínos, naturalmente infectados com cisticercos, foi evidenciada por TATO et al. (1987), podendo justificar a longevidade dos cisticercos, mantendo o seu poder infectante.

O número de cisticercos bem como as formas encontradas, vesiculares ou degeneradas, variaram muito de um suíno para outro, entre animais examinados após a ingestão de ovos de *Taenia solium* (ALUJA et al., 1996). No cérebro, ocorreram 407 formas vesiculares e apenas uma degenerada, e nos músculos do pernil dianteiro, 667 vesiculares contra 134 degeneradas, observadas durante um período de 200 a 350 dias após a inoculação

de 17 suínos; em 350 dias identificaram-se, apenas formas degeneradas, indicando a destruição progressiva dos cisticercos ao longo do período de infecção.

Embora, o tratamento com Praziquantel tenha inativado todos os metacestódeos dos músculos, os de localização cerebral não foram atingidos, persistindo em sua forma vesicular, provavelmente ainda viáveis (ALUJA et al., 1996).

Infectando 30 ratas com ovos de *Taenia solium*, AGUILAR (1991) detectou, 10 dias após, formas larvárias em 20 exemplares (66,7%), dos quais 16 (53,3%) apresentaram formas pós-oncosferas, gerando a expectativa da existência dessas formas, microscópicas, na carne suína com cisticercose, conseqüentemente podendo serem ingeridas e se transformarem em cisticercos no homem.

RODRÍGUEZ et al (1995) verificaram a ocorrência de formas pós-oncosferas em suínos com cisticercose e em suínos aparentemente livres da doença. O maior número destas formas encontrado em suínos sem cisticercos, em comparação aos infectados, levou os autores a reforçar a teoria, previamente estabelecida por TATO et al (1995), de que um peptídeo de RNA, liberado pelos cisticercos, exerce efeito imunossupressor no hospedeiro, determinando a evolução das formas pós-oncosferas em cisticercos.

Tentativa de tratamento imunoterápico em suínos naturalmente infectados, realizada por EVANS et al. (1997), evidenciou queda do número de cistos viáveis, mas não exerceu efeito suficiente para garantir a prevenção da teníase humana. O número total de cisticercos nos suínos submetidos à imunoterapia, não se diferenciou significativamente quando comparado com o dos animais não imunizados, aparecendo em média em todos os grupos estudados (imunizados e controles) 14 cisticercos/Kg de cérebro, 356/Kg de músculo e 70/Kg de língua. No cérebro, o número de cistos encontrado foi menor e mostrou baixa viabilidade, em todos animais, mas estes cistos não foram atingidos pela imunoterapia, como nos músculos e na língua, onde apresentaram aumento do número de cistos não viáveis em três vezes.

HERBERT & OBERG (1974) e MOLINARI et al (1983) imunizaram suínos com ovos de *T. solium* e antígeno de larvas de *Taenia solium*, respectivamente, verificando a proteção desses animais contra a cisticercose. Nos suínos dos grupos não imunizados (controles), observou-se número significativamente superior de cisticercos implantados após desafio com ovos, sugerindo a intervenção de processos imunológicos na eliminação de grande quantidade de larvas, anteriormente à sua implantação.

Conforme MOLINARI et al (1983), a porcentagem de cisticercos implantados, em relação ao número de ovos inoculados, foi de 0,95% para os animais do grupo controle e de 0,14% para os suínos imunizados. Os mesmos autores, comprovaram a atuação da resposta imunológica nos suínos imunizados, pois mais de 40% das larvas estavam totalmente destruídas, enquanto as demais revelavam diferentes estágios de degeneração; suspeitaram, ainda, da participação de eosinófilos na destruição das referidas larvas, dada sua marcada reação celular, também, confirmada por KUMAR et al. (1991).

TATO et al. (1987) atribuíram aos eosinófilos a decisiva participação na destruição de cisticercos no processo de reação granulomatosa. NASCIMENTO et al. (1995) evidenciaram eosinofilia transitória em suínos vacinados com antígeno de escólex de *Taenia solium*.

Eosinófilos também predominaram entre os leucócitos, em lesões cisticercósicas de músculos e cérebro de suínos inoculados com proglotes grávidos de *Taenia solium* em pesquisa de PALAPA et al. (1997). Os cisticercos apresentaram graus leves (viáveis) e acentuados (não viáveis) de degeneração, em 85% dos 20 suínos inoculados, quando presentes no músculo, e 75%, no cérebro, quando sacrificados 70 dias após a inoculação; um suíno inoculado, sacrificado após 210 dias, possuía cisticercos totalmente destruídos nos músculos, bem como 47,6% de larvas viáveis e 52,4% em vias de degeneração, no cérebro.

Vacinando suínos jovens com antígeno de escólex de *Taenia solium*, o mesmo empregado em ensaios imunológicos, NASCIMENTO et al. (1995) verificaram que 71,43%

e 75% dos animais (variação devido a dois tipos de adjuvantes utilizados), não revelaram cistos quatro meses após serem desafiados com ovos viáveis de *Taenia solium*. Os suínos vacinados e não protegidos e os não vacinados (controle) veiculavam 2,56% e 5,16-9,26% de cisticercos, respectivamente, em relação ao número de ovos inoculados, caracterizando uma alta proteção conferida pela vacinação, traduzida por significativa redução do número de cisticercos. Cinco peptídeos foram reconhecidos nesse antígeno, pelos soros de suínos protegidos pela vacinação: 13, 48, 70, 95 e 105kD. Segundo os mesmos autores, estes peptídeos devem exercer importante papel na imunização de suínos contra a cisticercose.

Outra alternativa de vacinação de suínos em áreas endêmicas tem sido sugerida por SCIUTTO et al. (1990). A comprovação de imunidade cruzada entre larvas de *Taenia solium* e de *Taenia crassiceps* em camundongos, por SCIUTTO et al. (1990), configurou a larva de *Taenia crassiceps* como um conveniente modelo laboratorial na produção de antígeno para o imediato preparo industrial de vacinas, diante da dificuldade de se atingir a fonte de larva de *Taenia solium* e enquanto a tecnologia do DNA recombinante ou da síntese de peptídeos não soluciona a dificuldade de obtenção de antígenos em larga escala e com homogeneidade de composição imunogênica e antigênica.

Com o teste ELISA houve um significativo aumento do nível de anticorpos após a infecção experimental com ovos de *Taenia solium*, o qual decresceu após 92 dias, mas permaneceu na faixa de positividade durante um período superior a 281 dias. Tratamento e reinfecção elevaram significativamente o nível de anticorpos no teste, devido à liberação de antígenos somáticos durante a destruição dos cisticercos no primeiro caso (ALUJA et al., 1996).

Pelo teste do imunoblot, ALUJA et al. (1996) verificaram que o número de glicoproteínas, consideradas importantes no diagnóstico da cisticercose suína, conforme TSANG et al. (1989), aumentou após os suínos serem inoculados, atingindo valores máximos

entre 29 e 52 dias após a infecção. Na maioria das vezes, em que o teste foi negativo, não foram encontradas larvas musculares vesiculares. As glicoproteínas de 18, 14 e 13 kD foram reconhecidas, mais frequentemente, em infecções recentes até 92 dias, ao passo que as de 50, 42 e 24 kD em infecções mais prolongadas, 200 dias.

Após estimulação de suínos naturalmente infectados com antígenos de membrana e total de *Taenia solium*, EVANS et al. (1997) verificaram o aparecimento de novos anticorpos, correspondentes aos peptídeos, 24, 19 e 13-12kD, em 64% dos animais vacinados e apenas 7% nos não vacinados.

Em infecção experimental de suínos, com ovos de *Taenia solium* (TSANG et al, 1991), a imunoglobulina (Ig) M apareceu e predominou na fase inicial da doença, uma a duas semanas, desaparecendo entre seis a nove semanas após. IgG apareceu a partir da terceira semana e aumentou à medida que a IgM diminuía. A IgA teve participação incipiente. O tipo de glicoproteína reativa também variou com o estágio da doença, a glicoproteína 97kD predominou na fase inicial e desapareceu entre a sexta e a nona semanas, comportando-se como o alvo exclusivo da IgM. As glicoproteínas 50 e 42kD e as de baixo PM (24, 21, 18, 14 e 13kD) apareceram, posteriormente, persistindo até o final da pesquisa (15 semanas) e se relacionaram à IgG, que, também, foi ativa contra a de 97kD. Todos os suínos responderam com anticorpos para mais que uma glicoproteína de *Taenia solium*.

Estudando a segunda fração do antígeno larvas de *Taenia solium* em Sephadex G-200, que é composta de peptídeos de baixo peso molecular (65, 45, 30, 24, 20 e 18kD), KAUR et al (1995) também verificaram a ausência deste tipo de antígeno em infecções recentes em suínos, perdendo para o antígeno total quando usados para diagnóstico nessa fase. Ambos os antígenos revelaram progressiva elevação do nível de anticorpos nos suínos quando determinado pelo teste ELISA aos 25, 40 e 55 dias após inoculação de ovos de *Taenia solium*.

Ambos os antígenos revelaram progressiva elevação do nível de anticorpos nos suínos quando determinado pelo teste ELISA aos 25, 40 e 55 dias após inoculação de ovos de *Taenia solium*.

HAYUNGA et al (1991) detectaram o aparecimento de reação imunológica, em suínos experimentalmente infectados com cisticercos a partir da 4^a semana, utilizando o imunoblot e antígeno heterólogo de *Taenia hydatigena*.

Como IgM e IgG apareceram simultaneamente, nenhuma das duas parece ter maior afinidade pelas glicoproteínas ou alta concentração, sendo uma capaz de prejudicar a atividade da outra, embora a IgG pareça dominar sobre a IgM, persistindo durante toda a infecção (TSANG et al, 1991).

Estudando a resposta imunológica de leitões oriundos de região endêmica (nativos) e de região não endêmica, como sentinela para a investigação de contaminação ambiental com ovos de *Taenia solium*, pelo teste do imunoblot, GONZALEZ et al (1994) verificaram que os não nativos demonstraram infecção mais leve e peptídeos reativos mais fracos, revelando maior susceptibilidade dos nativos à cisticercose. Esta diferença foi atribuída a fatores previamente discutidos por TSANG et al (1991), como hábito alimentar distinto, susceptibilidade genética e resposta humoral diferente. Reinfecção em suínos nativos foi associada ao aparecimento futuro de peptídeos diferentes das encontradas na fase inicial do experimento.

2.3. Métodos diagnósticos empregados na cisticercose suína.

No diagnóstico da cisticercose suína é usual o exame da língua (*ante-mortem*), o exame anátomo-patológico (*post-mortem*) e mais recentemente os testes sorológicos para pesquisa de anticorpos.

W.H.O.(1993), é útil na determinação da prevalência da cisticercose suína em áreas endêmicas.

O exame anátomo-patológico (necrópsia) pode deixar escapar lesões em animais com baixos níveis de infecção, principalmente, se procedentes de áreas endêmicas, não sendo indicado para selecionar animais sadios, apenas os infectados (GONZALEZ et al, 1990). Este exame, empregado na conhecida “Inspeção *Post-mortem*”, foi aprimorado por SANTOS (1975) no diagnóstico da cisticercose bovina e por PRATA (1982), da cisticercose suína.

Investigando a prevalência da cisticercose suína em área endêmica, com quatro diferentes métodos, GONZALEZ et al (1990) alcançaram maior taxa para o EITB, seguido em ordem decrescente do teste ELISA, necrópsia e exame da língua. Considerando a necrópsia como prova padrão (padrão-ouro ou gold standard), o teste do EITB apresentou melhor desempenho (sensibilidade, especificidade e valores preditivos) que o ELISA e o exame da língua, confirmando sua melhor eficiência no diagnóstico da cisticercose suína.

Os testes imunológicos têm atingido destacado espaço no diagnóstico da cisticercose humana e mais recentemente da suína, como alternativa aos demais.

Alguns autores têm considerado os exames de imagem, tomografia computadorizada e ressonância magnética, como os mais seguros para diagnóstico da cisticercose, permitindo detectar tanto as formas inativas como as ativas, embora sejam testes onerosos e de pouca disponibilidade; é capaz ainda de evidenciar alterações patológicas atípicas ou inespecíficas, que dificultam o diagnóstico (CARRADA-BRAVO, 1987).

Analisando resultados do exame *post-mortem*, FLISSER et al (1991) verificaram que 90% dos suínos com cisticercos revelaram imagens tomográficas de cisticercose, sendo que o animal falso-negativo continha apenas um cisto cerebral, enquanto 75% dos cistos encontrados no exame *post-mortem* foram visualizados na tomografia. É importante ressaltar sua inviabilidade no diagnóstico de campo da cisticercose suína.

2.4. Diagnóstico imunológico da cisticercose.

2.4.1. Padronização

2.4.1.1. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

O ELISA tem sido considerado procedimento padrão em parasitologia, na área laboratorial e em aplicação de campo (VENKATESAN & WAKELIN, 1993).

Conforme PERALTA & FRIAS (1987), o teste ELISA reúne diversas vantagens: altas sensibilidade e especificidade; rapidez e precisão; emprego de extratos totais e antígenos fracionados; conservação dos reagentes por longo período; automatização; padronização e emprego em diagnóstico de grande número de amostras; possui baixo custo; e, requer equipamento simples.

Particularidades do teste ELISA são discutidas em detalhes por PERALTA & FRIAS (1987) e VENKATESAN & WAKELIN (1993), os quais destacam diversos fatores e tecem considerações gerais que influenciam o desempenho do teste, apresentados a seguir.

As bases para a padronização são: o emprego de reagentes, material e equipamentos de alta qualidade, complementados pela escolha de procedimentos adequados e de concentrações ótimas, para cada componente das reações.

A perda de 20 a 50% das proteínas, inicialmente adsorvidas nas placas, pode ocorrer durante os períodos de incubação ou lavagem, quando se empregam altas concentrações de proteínas, para a sensibilização ou antígenos homogêneos de alto peso molecular.

Na detecção de anticorpos, a sensibilização da fase sólida (placa) deve ser feita com antígenos purificados ou semi-purificados, bem como devem ser determinadas em testes prévios as condições ótimas de adsorção, tais como concentração, pH, temperatura e tempo de incubação.

Dois tipos de ligações são desencadeadas pelos soros imunes: a específica, com os epítopos do antígeno, e a ligação inespecífica, com a porção inespecífica do antígeno ou com sítios vazios da placa.

Reações falso-positivas têm sido um grande problema no ELISA e decorrem de reações cruzadas com outras patologias (heterólogas), além das reações inespecíficas imprevisíveis.

Há duas formas de se minimizar as reações inespecíficas: por prevenção, bloqueando os sítios vazios das placas, ou por correção, lavando-as entre as etapas preconizadas para o teste.

A determinação das diluições ótimas em ensaios de padronização baseia-se na maior diferença entre os resultados obtidos pelas amostras negativas e positivas mais fracas, atentando para o fato de que ambos os grupos sejam de referência.

Considerando que o aumento de reações específicas é acompanhado de elevação das inespecíficas e que a redução das inespecíficas, também, é acompanhada da redução das específicas, deve-se insistir na obtenção do balanço entre ambas as reações em ensaios de padronização, visando minimizar a reação em soros negativos e, ao mesmo tempo, maximizar a diferença entre as densidades ópticas dos soros positivos e dos negativos. As alternativas disponíveis para atingir tal equilíbrio envolvem o emprego de: lavagens, reagentes bloqueadores, Tween 20 e diversas diluições de soro.

O soro usado como amostra pode dispor de substâncias com capacidade de se adsorverem na fase sólida; para minimizar este inconveniente, as amostras são diluídas em

solução tamponada com fosfatos (PBS) contendo tween 20 e, para reduzir a coloração de fundo, utiliza-se uma proteína bloqueadora, como a albumina. Produtos de reações entre substâncias do soro, também, podem fixar-se na fase sólida.

Entre os reagentes bloqueadores, o leite desnatado e a caseína parecem mostrar melhor desempenho que o BSA (albumina bovina). Estas substâncias reagem com os sítios vazios e com anticorpos inespecíficos; por isso são empregadas na solução diluente dos soros com PBS.

O detergente Tween 20 em PBS ou solução salina, também, reduz reações inespecíficas, solubilizando proteínas hidrofílicas, como imunoglobulinas, mas deve ser evitado quando os epítopos antigênicos contêm lipídeos. Em algumas condições o uso de PBS-Tween para diluição de soros pode reduzir o efeito da substância bloqueadora. Por isso, cada sistema de ELISA deve ser tratado individualmente, avaliando o Tween 20 e a substância bloqueadora em conjunto.

Em função da corrente variação da qualidade das placas, devem ser usados controles em cada uma, empregando-se diluições distintas das amostras, o que permite sua calibração automática.

As condições ótimas de incubação devem ser definidas experimentalmente caso a caso.

Há uma diluição crítica de soros, em que há somente reação inespecífica e imediatamente próxima da zona de reações inespecíficas e específicas, denominado título, o qual é determinado por análise simultânea de amostras positivas e negativas. Reações específicas, tendem a desaparecer em diluições superiores ao título.

O teste ELISA não mede o nível de anticorpos existentes no soro, determina apenas os anticorpos ligados, sem expressar informação quantitativa absoluta; assim uma mesma ligação

ou D.O. pode ser evidenciada por uma baixa concentração de um anticorpo de alta afinidade para o antígeno e por uma concentração maior de outro anticorpo de baixa afinidade.

Os conjugados, anticorpos anti-Ig marcados com enzima, também podem reagir com sítios vazios das placas e com antígenos provocando reações inespecíficas, o que pode ser evidenciado nos orifícios controle da placa. A concentração desejável do conjugado deve atender à economia do reagente e à minimização da coloração inespecífica de fundo. Conjugados muito diluídos requerem maior tempo de incubação ao contrário dos concentrados.

MONTENEGRO et al (1994) consideraram a titulação em bloco, envolvendo diferentes concentrações de antígenos, diluições de soro e conjugado, como um valioso instrumento na padronização do teste ELISA para diagnóstico da cisticercose humana .

Enquanto KUMAR & GAUR (1987) encontraram a concentração ótima de 2,5 mg/ml para o antígeno, CHENG & KO(1992) e BIONDI (1994) encontraram 10 µg/ml.

Para CHENG & KO (1992), a diluição ótima de soro suíno foi de 1/1.000 e a de conjugado 1/10.000, enquanto que BIONDI (1994) encontrou melhor reação para a diluição do soro a 1/800 e a de conjugado a 1/2.000.

Efetuando a titulação em bloco no teste ELISA para diagnóstico da cisticercose suína, PATHAK et al. (1994) concluíram como melhores quantidades: antígeno (Total de larvas de *Taenia solium*) a 11,5µg/ml, soro a 1/100 e conjugado (IgG fragmento Fc-fosfatase) a 1/1.000. O ponto de corte foi definido pela média das densidades ópticas dos soros controles negativos, mais três desvios-padrão, como 0,115.

GUO et al (1994) também adotaram a média de D.O., mais três desvios-padrão, para cálculo do ponto de corte do ELISA, no diagnóstico da cisticercose suína.

Empregando o teste ELISA no diagnóstico da cisticercose humana, GOTTSTEIN et al (1987) escolheram três desvios-padrão para o cálculo do ponto de corte e

quantificaram os resultados como a diferença das absorbâncias dos positivos em relação ao ponto de corte, em porcentagem, denominando os valores resultantes de “porcentagem de reatividade”.

CHENG & KO (1992) consideraram positivos no ELISA, os soros com valores de D.O. no mínimo três vezes superiores aos valores dos negativos-controle.

A importância da padronização do método relaciona-se à garantia da reprodutibilidade dos experimentos e à confiabilidade dos resultados, bem como à possibilidade de compará-los com os de outras pesquisas.

A confiabilidade ou eficácia é determinada a partir do teste das amostras positivas e negativas, confrontando-as com os resultados esperados; ou ainda, mediante a determinação de outras características como sensibilidade, especificidade e os falso-positivos ou falso-negativos.

A reprodutibilidade baseia-se na variação dos resultados de uma mesma amostra num mesmo tipo de placa em diferentes ensaios. O coeficiente de variação não deve ultrapassar 10%, caso isto ocorra, deve-se reajustar as condições de experimentação.

2.4.1.2. Imunoblot (Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot).

As reações desenvolvidas na técnica básica do imunoblot envolvem os mesmos princípios do teste ELISA, embora exista uma fundamental diferença entre as duas provas, o tipo de antígeno em teste. No imunoblot os antígenos estão disponíveis em partes, peptídeos específicos e não específicos, possibilitando reações individuais com diferentes componentes de anticorpos; no ELISA estes peptídeos só estão disponíveis em mistura, inviabilizando a separação entre as reações específicas e inespecíficas. DIAZ et al (1992b) reforçaram esta argumentação quando verificaram a superioridade do imunoblot sobre o ELISA no

diagnóstico da cisticercose humana. Os antígenos no imunoblot são separados previamente, de acordo com o peso molecular, por eletroforese em gel de poliacrilamida, geralmente sob condições redutoras.

O estudo da especificidade sorológica dos testes se faz necessário, onde são comuns outras infecções suínas por cestódeos, a exemplo de *T. hidatigena* e *Echinococcus granulosus* (HERBERT & OBERG, 1974); deve-se nestas circunstâncias, proceder a cuidadosa seleção de indivíduos controles negativos, sobretudo em países em desenvolvimento (DIAZ et al 1992b).

A correlação do aparecimento dos peptídeos, com a atividade funcional da proteína, pode ser dificultada quando o sistema utilizado no imunoblot envolve a condição desnaturante da proteína (GERSHONI & PALADE, 1983). TSANG et al (1983) também alertam para a possibilidade de alguns sítios antigênicos perderem sua integridade conformacional, alterando sua capacidade de detectar anticorpos; por outro lado, lembram que este fenômeno não ocorre com todas as proteínas tratadas com SDS (dodecil sulfato de sódio), sendo possível a sua recuperação após a lavagem da matriz (nitrocelulose), removendo o SDS remanescente.

Proteína em excesso provoca enfraquecimento de sua ligação com a matriz, melhorando o acesso aos anticorpos, mas facilitando a remoção do complexo antígeno-anticorpo durante as fases de lavagem. Ainda, ocorre perda de proteína no processo de transferência, quando esta ultrapassa a matriz, membrana de nitrocelulose (carregada negativamente), durante a eletroeluição; este fenômeno se acentua na ausência do metanol (GERSHONI & PALADE, 1983).

Excesso ou insuficiência de antígeno determinam o aparecimento de reações inespecíficas no imunoblot, segundo TSANG et al (1989).

GOTTSTEIN et al (1987) verificaram 92% de sensibilidade e 100% de especificidade do imunoblot no diagnóstico da cisticercose humana, quando selecionaram os anticorpos anti-

26kD ou anti-8kD como critério diagnóstico, simultaneamente ou não. Em face destas altas taxas, o imunoblot foi considerado como um excelente procedimento para confirmar a especificidade das reações sorológicas obtidas no teste ELISA.

Empregando antígeno de glicoproteínas purificadas em cromatografia de sepharose, ligadas em lentil-lectina (GP-LL) no imunoblot, para diagnóstico da cisticercose humana, TSANG et al (1989) identificaram como específicas para a cisticercose: GP50kD, GP42-39, GP-24, GP-21, GP-18, GP-14 e GP-13. Os demais peptídeos, de modo geral, não reagiram com amostras positivas ou se localizaram distantes dessa faixa. Quando pacientes com hidatidose demonstraram peptídeos reativos, estas foram superiores a 70kD. A maioria das amostras de pacientes com cisticercose foram reconhecidas por mais de um dos peptídeos específicos, sendo que 63,4% reconheceram pelo menos seis peptídeos.

As glicoproteínas específicas mencionadas são responsáveis pela formação de traços largos, o que sugere o desprezo daqueles estreitos (falsas), localizadas entre 13 e 50kD, como critério para diagnóstico. Pondera-se o aparecimento de três peptídeos com PM (peso molecular) imediatamente superior a 13kD, que não foram relacionados como específicos, mas ocorreram na maioria dos pacientes positivos (TSANG et al, 1989).

Concordando com TSANG et al (1989), DIAZ et al (1992b) e MONTENEGRO et al (1994), também, consideraram as glicoproteínas com PM de 50, 42-39, 24 , 21, 18, 14 e 13 kD como específicas no diagnóstico da cisticercose humana, pelo teste do imunoblot. Acrescidas a essas, uma glicoproteína na faixa de 61-67kD, também, foi específica para cisticercose humana, todavia, a de 38kD reagiu com soros de indivíduos portadores de outras parasitoses (*E. granulosus* e *Hymenolepis nana*) enquanto as de 62 e 48 kD reagiram com soros de pessoas normais (MONTENEGRO et al, 1994).

Em ensaios de PATHAK et al. (1994), o imunoblot comportou-se como um teste útil no diagnóstico *ante-mortem* da cisticercose suína. Quatro peptídeos antigênicos de baixo PM

(8, 11, 16 e 23 kD) foram reconhecidos por 90% dos soros positivos ao EITB, sem acusar reação cruzada com outras patologias. O peptídeo 46 kD acusou reação cruzada com soro de suíno com hidatidose e reagiu com alguns negativos. GOTTSTEIN et al. (1986) e LARRALDE et al. (1989) detectaram peptídeos similares no reconhecimento de pessoas positivas à cisticercose.

Segundo TSANG et al (1989), o maior desafio da interpretação do imunoblot é o correto reconhecimento das peptídeos específicos, o qual está intimamente ligado à aparência física e localização nas tiras de nitrocelulose. Um bom exemplo de peptídeo falso encontrado, foi aquele situado imediatamente acima do peptídeo de 50kD, levando à sua não utilização como critério diagnóstico da cisticercose humana, quando acompanhada da falsa.

A identificação de peptídeos reativos no imunoblot, bem como a sua enumeração dependem de experiência técnica do pesquisador nesse particular, conforme LARRALDE et al (1989). A frequência dos peptídeos deve ser considerada como o valor médio, dentro do grupo de amostras testadas. Cuidados especiais devem ser tomados quando se analisam peptídeos fracos, em áreas manchadas da matriz da reação.

2.4.2. Desempenho dos testes no diagnóstico da cisticercose suína

Avaliando o desempenho do imunoblot no diagnóstico da cisticercose humana, TSANG et al (1989) alertaram para a necessidade da seleção das amostras controle, as negativas e as relacionadas a infecções heterólogas, não procedentes de áreas endêmicas, e as positivas, confirmadas por exames anátomo-patológico ou histo-patológico. Embora, recomendem o estudo de indivíduos reconhecidamente sadios ou com doença única, os mesmos admitem a dificuldade de formar grupos uniformes dessas categorias de amostras em áreas sub-desenvolvidas. O mesmo deve ocorrer quando se estudam amostras de soros animais.

Além dos testes ELISA e imunoblot, a hemaglutinação indireta também foi utilizada para diagnóstico da cisticercose suína. Os resultados do teste de hemaglutinação efetuados por HERBERT & OBERG (1974) mostraram que alguns suínos acusam resultados falso-negativos e que podem ocorrer resultados positivos que não evidenciam cistos durante a inspeção, indicando sua reabsorção. Concluiu-se neste estudo que a hemaglutinação indireta é altamente sensível, porém de baixa especificidade para o diagnóstico da cisticercose suína, devendo ser aprimorada para esta finalidade.

A Imunofluorescência indireta foi testada com fins de diagnóstico da cisticercose suína por KUMAR et al (1987). Foram utilizados escólex de larvas de *Taenia solium*, sua primeira fração (pico) obtida em Sephadex G-200 e ovos de *Taenia solium* como antígenos e foram alcançados 80,8%, 82,7% e 90,4% de sensibilidade e 80,0%, 94,3% e 85,7% de especificidade, respectivamente para os três antígenos.

Na Guatemala, CASTILLO et al (1991) e PÉREZ & CÁCERES DE MASELLI (1991), estudando o antígeno total de larva de *Taenia solium*, mediante o teste ELISA,

verificaram percentuais de sensibilidade de 90% e de especificidade de 90 e 100%, respectivamente.

Pelos resultados de PATHAK et al. (1994), o teste ELISA revelou seis reações falso-negativas em 20 amostras, indicando uma sensibilidade de 70%, semelhante à obtida por GONZALEZ et al. (1990); e, quatro reações cruzadas em 15 soros de suínos com hidatidose (26,7%), não revelando reações falso-positivas, nem reações cruzadas com *Trichinella spiralis* ou *Fasciolopsis buski*, resultando numa especificidade de 93,4%, similar a KUMAR & GAUR (1987), que haviam obtido 92,3%. O critério para identificação de amostras positivas e negativas foi a necrópsia e o antígeno foi o total de larvas de *Taenia solium*.

Também empregando antígeno total de larvas de *Taenia solium* e considerando a necrópsia como prova padrão, GONZALEZ et al (1990) demonstraram, para o teste ELISA, uma sensibilidade de 79,2% e alta taxa de reações falso-positivas, observando reações cruzadas com *T. hydatigena*, *E. granulosus* e *F. hepatica*, resultando numa especificidade de 76,2%. Neste caso o ELISA foi mais sensível que o exame visual de língua (70,8%), mas inferior ao imunoblot (100%), e menos específico que ambos, os quais revelaram 100% de especificidade.

BIONDI (1994), empregando larva de *Taenia crassiceps* como antígeno no teste do ELISA, para a detecção de anticorpos contra larvas de *Taenia solium*, em soros suínos, com referência ao exame *post-mortem*, detectou 100% de sensibilidade e especificidade, quando adotou três desvios-padrão como ponto de corte e sensibilidade de 100% e especificidade de 97%, para dois desvios.

Nos suínos procedentes de área supostamente livre de cisticercose, a sensibilidade e a especificidade atingiram 100% para o imunoblot; mas nos casos de área endêmica houve cerca de 40% de casos falso-positivos em relação à necrópsia, sem ocorrência de

falso-negativo. Como não houve ligação dos casos falso-positivos com reações cruzadas (*E. granulosus*, *T. hidatigena* e *F. hepática*), concluiu-se que estes estavam associados à distorsão diagnóstica na necrópsia, quando os animais possuíam cistos imaturos ou não os apresentavam, mas preservavam resposta humoral ativa; portanto parte dos casos interpretados como falso-positivos nos testes sorológicos deveriam ser verdadeiros positivos (GONZALEZ et al, 1990).

TSANG et al (1991) também obtiveram máximas taxas (100%) de sensibilidade e de especificidade para o imunoblot na pesquisa de cisticercose suína, utilizando glicoproteínas purificadas (TSANG et al, 1989); não se registraram reações inespecíficas entre os soros controles negativos e reações cruzadas com ascaridiose, hidatidose, fasciolose, triquinose e tricuriase.

Segundo PATHAK et al. (1994) nenhum soro negativo acusou resultado falso-positivo no imunoblot (100% de especificidade), embora amostras provenientes de região endêmica acusassem reações mais fortes que as de região não endêmica. As duas reações falso-negativas evidenciadas foram atribuídas à ausência de resposta imunológica inerente a estes indivíduos, como pode ocorrer em casos de lesão cerebral sem reações inflamatórias ao redor do cisticerco.

O custo do imunoblot por teste chega a ser mais de três vezes superior ao do ELISA, particularmente devido ao preço da membrana de nitrocelulose e do conjugado; os equipamentos se nivelam em preço. Diante da maior eficiência do imunoblot seu emprego torna-se valorizado, sobretudo se o conjugado é obtido por produção própria, com redução de seu custo (DIAZ et al, 1992b).

O emprego de testes de baixa sensibilidade pode ser útil em ensaios diagnósticos de animais experimentalmente infectados, mas pode ser deficiente no caso de animais acometidos, de modo natural, por infecções leves.

2.5. Antígenos.

2.5.1. Antígenos heterólogos

Há necessidade de se desenvolver um modelo animal, de fácil manutenção em laboratório, como fonte alternativa de obtenção de parasitas para o preparo de antígenos heterólogos adequados. Suínos com infecção natural são mantidos na clandestinidade e de difícil manipulação experimental, dificultando a escolha de antígenos adequados e em quantidade suficiente para garantir a homogeneidade e o controle de qualidade dos lotes antigênicos (VAZ, 1993). As vantagens do emprego de antígenos heterólogos no diagnóstico da cisticercose também são destacadas por HAYUNGA et al (1991).

DIWAN et al (1982) alertam para a dificuldade de se obter cisticercos totalmente livres de proteína do suíno no preparo do antígeno, promovendo interferência na diferenciação entre pessoas positivas e normais pelo teste do ELISA.

Ocorrem grandes variações na qualidade dos antígenos entre os laboratórios que os preparam, seja pela variação técnica de cada um, seja pela heterogeneidade antigênica dos lotes de cisticercos de *Taenia solium*, estas variações podem ser minimizadas com a introdução do antígeno de larva de *Taenia crassiceps* (LARRALDE et al, 1990; Mc MANUS et al, 1991).

Verificando a alta reatividade cruzada entre soros de pacientes com cisticercose e com hidatidose frente a antígenos vesiculares de larvas de *T. solium* (*Cysticercus cellulosae*), *T. crassiceps* (*Cysticercus longicollis*) e de *E. granulosus* (cisto hidático), LARRALDE et al (1989) consideram uma boa alternativa o emprego de larvas de *Taenia crassiceps* como fonte de antígeno para diagnóstico da cisticercose humana.

A substituição do antígeno de larvas de *Taenia solium* pelo de *Taenia crassiceps* foi reforçada por LARRALDE et al (1990) ao verificar semelhança no desempenho de ambos no teste ELISA para cisticercose humana através das taxas de sensibilidade e de especificidade, diante das vantagens do emprego dos antígenos de *Taenia crassiceps*.

Estudando os antígenos de larvas de *Taenia solium* (total e vesicular) e de *Taenia crassiceps* (membrana + pseudo-escólex e vesicular) pelos imunoblots de soros de coelhos imunizados contra cisticercose, VAZ (1993) observou que os dois parasitas partilham epítopos antigênicos e imunogênicos entre si, em concentrações suficientes para uso em testes imunológicos, havendo intensa e ampla reatividade cruzada entre os peptídeos componentes dos seus extratos antigênicos, o que se confirmou em testes imunológicos em líquido cefalorraquiano de pacientes com cisticercose. Não foi observada diferença significativa entre os referidos antígenos, homólogo e heterólogo em um mesmo teste imunológico.

Compensando também a baixa disponibilidade de antígenos de *Taenia solium* (Mc MANUS et al, 1991), os modelos experimentais exploradores de larvas de *Taenia crassiceps* privilegiarão pesquisas que requerem grande quantidade de antígenos, sobretudo as de purificação de antígenos, altamente relevantes no aprimoramento dos testes imunológicos para diagnóstico da cisticercose, bem como as de padronização de testes para aplicação em vigilância epidemiológica da cisticercose (LARRALDE et al, 1990).

Partículas antigênicas de larvas de *Taenia crassiceps* e de *Taenia solium* testadas por imunofluorescência indireta para a cisticercose humana, também, não evidenciaram diferença nos resultados, acusando satisfatórias sensibilidades médias de 84,8% e 82,6%, respectivamente e especificidade de 100% para o teste de ambas, reforçando a aplicabilidade destes antígenos em testes imunológicos (VAZ et al, 1997).

Com base em resultados do imunoblot, HAYUNGA et al (1991) verificaram a intercorrespondência de um peptídeo de PM menor que 12kD em antígenos vesiculares de

T. hydatigena (ovinos) e de *T. crassiceps* com propriedade diagnóstica para a cisticercose no homem, em suínos e em bovinos. Este peptídeo também foi identificado em *T. taeniaeformis* (ratos), reagindo com soros de bovinos e de pessoas com cisticercose. Não obstante o baixo número de amostras, o emprego de antígeno de *T. hydatigena* possibilitou valores aparentes de 100% de sensibilidade e de especificidade no imunoblot, omitindo reações cruzadas com *Trichinella spiralis* e com *Toxoplasma gondii* para suínos.

Diversos relatos favoráveis à utilização e desempenho de antígenos de larvas de *Taenia crassiceps* em testes imunológicos foram registrados em etapas anteriores desta revisão, sobretudo em diagnóstico da cisticercose suína (BIONDI, 1994).

2.5.2. Extratos antigênicos

O processo de preparo dos antígenos é bem diversificado, mas geralmente não exclui os procedimentos de trituração, tratamento com ultrassom e centrifugação do material de interesse.

A diálise do antígeno total e de suas três frações (picos) em Sephadex G-200 provocou queda do teor de carboidratos nestes quatro antígenos e queda acentuada do teor protéico da terceira fração, de 55,8 para 1,4%, 40 vezes (PRIEGO et al, 1977).

As atividades de dois diferentes antígenos foram equivalentes no teste ELISA, quando os metacestódeos de *Taenia solium* foram congelados ou liofilizados previamente ao seu preparo (GOTTSTEIN et al, 1987).

Quando testados frente a soros de coelhos imunizados, pelo teste de dupla difusão em gel de ágar, o extrato de escólex revelou maior imunogenicidade em comparação aos extratos de larvas de *Taenia solium* total, de membrana, de líquido vesicular e de *T. solium* adulta (NASCIMENTO & ARAÚJO, 1982a). O escólex apresentou identidade imunológica com

todas as linhas de precipitação da membrana e do líquido vesicular; induziu maior título de anticorpos, juntamente com o líquido vesicular e menor número de linhas com ausência de identidade. A membrana revelou menor número de linhas de precipitação; sua baixa capacidade de induzir a síntese de anticorpos é uma hipótese que explica algumas infecções com fraca reação inflamatória ao redor dos cisticercos vivos. A baixa imunogenicidade dos antígenos totais de larvas de *Taenia solium* e de sua forma adulta, pode ser explicada pelo número e concentração de seus componentes antigênicos, levando a uma competição entre eles, podendo ainda haver liberação de algum fator imunossupressor.

O antígeno de escólex de larvas de *Taenia solium* foi significativamente melhor que o total na detecção de cisticercose humana pelo teste ELISA, também mostrando melhor desempenho nos testes de hemaglutinação indireta e de fixação de complemento (NASCIMENTO et al, 1987).

Provavelmente os epítomos antigênicos estejam distribuídos em todas as partes da larva de *Taenia solium*, devido a ocorrência de reações cruzadas entre os epítomos de extratos totais, de membrana e vesicular; entre oito arcos de precipitação obtidos no antígeno de larvas de *Taenia solium* pelo teste de dupla difusão em gel de ágar, três foram exclusivos do extrato total, um do vesicular e quatro comuns entre si (VAZ, 1993).

A quantidade de 10-15ml de antígeno de larvas de *Taenia solium* obtido a partir de 400 cisticercos, com cerca 2,5-3,5mg/ml de proteína, permitem a realização de 3.000 ensaios, considerando cada ensaio em duplicata, quatro diluições e perda de 20% (VAZ, 1993).

2.5.3. Purificação

Componentes do antígeno total de larvas de *Taenia solium* responsáveis por reações cruzadas constituem o maior fator limitante em testes sorológicos para diagnóstico da cisticercose humana, por isso a purificação do antígeno total de larvas de *Taenia solium* e de polipeptídeos específicos dele originados, pode ser uma boa alternativa de reagente para emprego em técnicas de alta sensibilidade como o ELISA (GOTTSTEIN et al., 1986).

Ao verificar que antígenos de glicoproteínas purificadas em cromatografia propiciaram especificidade superior à dos antígenos total e precipitado com sulfato de amônia, em imunoblot para cisticercose humana, MONTENEGRO et al (1994) concluíram que o uso de antígenos purificados sem peptídeos responsáveis por reações cruzadas irá aumentar a sensibilidade e a especificidade dos testes imunológicos, em relação aos antígenos que lhes deram origem.

PRIEGO et al (1977) fracionaram o antígeno total de larvas de *Taenia solium* em Shephadex G-100 e G-200, sob taxa de fluxo de 6,1cm/h, obtendo em G-200 uma separação de componentes (picos) mais homogêneos, tanto no volume de exclusão (os dois primeiros picos), como no de inclusão (terceiro); em G-100 o volume de inclusão caracterizou-se por um grupo de proteínas mais homogêneo, com PM previsto como menor que 100.000, enquanto que o volume de exclusão revelou pelo menos três componentes heterogêneos, devido aos picos fundidos apresentados. Tanto o antígeno total quanto as frações I e III mostraram altas especificidades no teste de imunodifusão frente a soro de coelho imunizados.

Testando antígenos fracionados por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose), visando evitar reações cruzadas em pacientes com cisticercose ou teníase, NASCIMENTO & ARAÚJO (1982b) verificaram que os picos II e III foram os mais sensíveis na detecção de anticorpos contra larvas de *Taenia solium*; ainda verificaram que os

antígenos preparados a partir de *T. solium* adulta não se prestam ao diagnóstico da cisticercose.

Os antígenos de escólex e de pico II, foram mais específicos para anticorpos contra larvas de *Taenia solium* que os de membrana, líquido vesicular e total de larvas de *Taenia solium* (NASCIMENTO & MAYRINK, 1984).

Segundo GOTTSTEIN et al (1986) a corrida de SDS-PAGE em gradiente de 5-20% do antígeno total de larvas de *Taenia solium* revelou um complexo antígeno com peptídeos de peso molecular relativo variando entre 250 e 8kD, a maioria entre 94 e 28kD, evidenciando ainda uma segunda região de peptídeos de baixo PM entre 24 e 8kD. Dois peptídeos, 26 e 8kD, detectaram anticorpos em pacientes com cisticercose, sem acusar reação em pacientes com equinococose cística ou alveolar. O desempenho do peptídeo de 26kD foi melhor, revelando reação mais forte e positiva em todos soros e no líquido cefalorraquiano (LCR) de pacientes com cisticercose, enquanto que a 8kD foi positiva para 7 de 8 soros e para 3 de 4 LCR.

ROSSI (1989) fracionou o antígeno total de larvas de *Taenia solium* sob fluxo de 2,6cm/h em Sephadex G-200 obtendo duas frações homogêneas (I e III) e uma bastante heterogênea (II), compostas de vários picos. A maior parte dos anticorpos de pessoas com neurocisticercose reconheceram os componentes antigênicos da fração II pelo teste Erythro-LIT, utilizando conjugado contendo lectina com afinidade para eritrócitos de carneiro.

KUMAR & GAUR (1987) fracionaram 5ml de antígeno de larvas de *Taenia solium* em cromatografia de filtração em gel sob fluxo de ascensão de 3,7cm/h, empregando coluna de Sephadex G-200, equilibrada com PBS (pH 7,2). Avaliando os antígenos obtidos pelo teste ELISA de soros suínos naturalmente e experimentalmente infectados, os autores observaram que o 1º pico revelou maior sensibilidade, 95,8%, frente ao escólex (91,6%) e ao 2º pico

(70,8%) e maior especificidade, 96,2%, ao lado de 92,3% para o escólex e para o 2º pico; o 1º pico não mostrou reação cruzada, a qual apareceu com *T. hidatigena* e *A. suum* ao utilizar 2º pico e escólex.

CHENG & KO (1992) purificaram o antígeno total de larvas de *Taenia solium* em coluna de gel contendo Sephacryl S-200 (26,4 ml/h) obtendo 4 frações (3 picos), as quais foram testadas por imunoenaios (ELISA, imunoblot, Imunodifusão e Imunoelektroforese), frente aos soros de suíno previamente imunizados com antígeno total de larvas de *Taenia solium* e frente aos soros de coelho imunizado contra antígenos heterólogos de outras 11 parasitoses (*T. hidatigena*, *E. granulosus*, *A. suum*, *Metastrongylus apri*, *Trichinella spiralis*, *Trichuris suis*, *Toxocara canis*, *Dipylidium caninum*, *Fasciolopsis buski*, *Hymenolepis diminuta*, *Gnathostoma hispidum*). As condições ótimas para reação no teste ELISA foram: soro de suíno (1/1.000), soro de coelho (1/8.000), antígeno (10µg/ml) e conjugado (1/1.000).

Todas as frações obtidas por CHENG & KO (1992) mostraram-se reativas aos soros de suínos imunizados. Não houve reação cruzada do soro suíno contra larvas de *Taenia solium* testado com as quatro frações obtidas e os antígenos heterólogos das 11 parasitoses mencionadas, mas as quatro frações apresentaram epítomos comuns a outras patologias, quando testados com soros de coelhos imunizados, principalmente com antígenos de *T. hidatigena* e de *E. granulosus*: provavelmente estas reações foram provocadas por elementos presentes, exclusivamente, nos soros de coelhos.

Analisando as frações do antígeno de larvas de *Taenia solium*, a maioria dos determinantes antigênicos reativos identificados pelo imunoblot estavam na 1ª e na 2ª frações, especialmente os de peso molecular de 105, 103 e 95kD, o primeiro e o último considerados como subunidades do antígeno B. A segunda fração antigênica (180, 165, 146, 134, 122, 105, 103, 95, 78, 73, 68, 51, 42 e 39kD) demonstrou ter alta sensibilidade e ser um antígeno

potencialmente eficiente no sorodiagnóstico da cisticercose suína, se submetido a novas purificações (CHENG & KO, 1992).

Segundo VAZ (1993), o peso molecular dos peptídeos do antígeno total de larvas de *Taenia solium* encontrados variaram de 255 a 23kD, sendo imunodominantes em ordem decrescente os peptídeos, quanto à sensibilidade ao imunoblot (gradiente 7,5-15%): 98-92 (82,6%), 56-52 (65,2%) e 72-68kD (56,5%). As frações 165 e 92kD desse antígeno reagiram fracamente com os soros de coelhos normais e imunizados, embora também reagisse com soros e LCR de pacientes com neurocisticercose. Os peptídeos 95-92 e 70-68kD foram imunodominantes para o antígeno de líquido vesicular e 72, 62 e 42 para o total, ambos de larvas de *Taenia crassiceps*.

Conforme MONTENEGRO et al. (1994) os peptídeos 62, 48 e 38kD revelaram reações cruzadas com outros helmintos.

Quadro 1. Peptídeos responsáveis por reatividade cruzada pelo imunoblot (gel 12%) segundo MONTENEGRO et al. (1994)

Antígenos	Soros humanos infectados por <i>T. solium</i>	Soros humanos infectados por <i>E. granulosus</i>
<i>T. solium</i> (total)	13,14,18,42,50,61	12,13,17,40,62,105,120
<i>T. solium</i> (precipitado)	13,14,18,42,50,61	12,13,17,40,62,92,105
<i>T. solium</i> (glicoproteínas purificadas)	13,14,18,21,24,42,50*	40,62
<i>E. granulosus</i> (total)	38,54	13,17,27,62

*Peptídeos glicoproteicos específicos para cisticercose; além destes foi detectada um peptídeo não glicoproteico também específico, de 61-67 kD.

A segunda fração do antígeno total de larvas de *Taenia solium* eluída de Sephadex G-200 a uma taxa de fluxo de 2,4cm/h, por KAUR et al (1996), apresentou sensibilidade de 95,2% e especificidade de 100% no teste ELISA para neurocisticercose humana, sensibilizando as placas com 10µg/ml. Esta eficiência, bem como sua natureza glicoprotéica termoestável a 60°C, favorecem seu emprego em levantamentos soroepidemiológicos. Os peptídeos encontrados nessa fração foram: 24, 20 e 18kD. O bom desempenho da referida fração também foi detectado em suínos por KAUR et.al. (1995),

sensibilizando as placas com 30µg/ml da segunda fração para os ensaios do teste ELISA, cinco vezes inferior à concentração do antígeno original.

A tecnologia do DNA recombinante ainda não revelou resultados satisfatórios no tocante à purificação de antígenos para aplicação no diagnóstico da cisticercose, embora tenha apontado algumas perspectivas positivas (GEVORKIAN et al, 1996).

Mc MANUS et al (1991) procederam a clonagem de vários lotes de metacestódeo de *Taenia solium*, identificando 40 clones soropositivos, representando alguns deles, polipeptídeos altamente específicos diferenciando soros de pessoas com cisticercose daqueles de pessoas infectadas por *E. granulosus*, *E. multilocularis* e *T. saginata*.

MANOUTCHARIAN et al (1996) verificaram a proteção 96,8% de suínos vacinados com os peptídeos 74, 66 e 56kD de larvas de *Taenia crassiceps* quando desafiados com ovos de *Taenia solium*. Este desempenho influenciou na escolha dos peptídeos 74 e 56kD para o estudo de DNA recombinante, visando obter antígeno com maior poder diagnóstico. A partir da sequência de DNA obtida, foram detectados e isolados 13 clones recombinantes fortemente soropositivos, dos quais cinco reagiram com um pool de soros de suínos portadores de cisticercose.

GEVORKIAN et al (1996) selecionaram um dos cinco clones destacados por MANOUTCHARIAN et al (1996) como importantes no estudo da cisticercose, o KETc7, rico em prolina (29%), com a finalidade de produzir peptídeos sintéticos imunodominantes de interesse no diagnóstico da cisticercose. Foram identificados diversos epítomos potencialmente antigênicos em KETc7 e escolhidos três para síntese protéica. Os peptídeos sintetizados foram testados em confronto com o antígeno vesicular de larvas de *Taenia crassiceps* pelo teste ELISA, obtendo-se valores inferiores de D.O. para os antígenos sintéticos e baixo poder discriminatório dos soros de suínos experimentalmente infectados com *Taenia solium*. Os autores associam a deficiência do antígeno sintético à escassez de

material antigênico utilizado na síntese, devendo-se empregar múltiplos peptídeos provenientes de diferentes clones para aprimorar o sorodiagnóstico.

2.6. Inspeção de Carne e Saúde Pública

A inspeção sanitária da carne efetuada em matadouro constitui um importante mecanismo de controle da teníase e da cisticercose, como recurso preventivo, reduzindo o consumo de carne contaminada com cisticercos e contribuindo com a vigilância epidemiológica da doença, pela notificação dos casos aos serviços de Saúde Pública e animal, segundo sua procedência (MACIEL & PAIM, 1966; ARRUDA et al, 1990).

Observa-se que nos países onde o consumo de carne suína contaminada é elevado, as prevalências de teníase e de cisticercose são altas (ARRUDA et al., 1990), realçando a importância da inspeção sanitária da carne como uma contundente medida de controle da cisticercose, influenciando em sua cadeia de transmissão (HERBERT & OBERG, 1974; FLISSER, 1987; SARTI et al, 1992).

A inspeção de carnes tem exercido importante papel na redução da cisticercose suína em diversos países (BOLIVAR-JIMÉNEZ, 1976), particularmente no Brasil (ARRUDA et al., 1990), na Costa Rica (ARROYO, 1989), no Peru (GONZALEZ et al, 1990) e na Nigéria (ONAH & CHIEJINA, 1995), devendo fazer parte das campanhas de controle do complexo teníase-cisticercose.

Embora não seja o único recurso disponível para o controle da teníase humana, a inspeção de carnes é o principal deles, segundo CÔRTES (1984).

O comércio de carne suína não inspecionada ainda é preocupante em diversos países, atingindo altas taxas como no Peru, 65% a 91%(GONZALEZ et al, 1990; W.H.O., 1993), na Guatemala (MASELLI et.al.,1992) e na Nigéria (ONAH & CHIEJINA, 1995), entre outros

países. No Brasil a situação é semelhante; segundo VILLA (1995), o SIF controla cerca de 49% da carne comercializada no país, sendo desconhecidos os dados das inspeções estaduais e municipais e dos matadouros clandestinos, que funcionam sem qualquer controle sanitário.

O afastamento dos fornecedores de animais dos estabelecimento de abate controlados por serviços de inspeção, prevendo perdas econômicas por condenação, também limitam a abrangência das ações de inspeção no controle da cisticercose (MACIEL & PAIM, 1966; GONZALEZ et al, 1990; SARTI-G et al, 1992).

As referidas perdas vêm sendo minimizadas com o desenvolvimento de recursos tecnológicos alternativos para o aproveitamento condicional das carnes provenientes de animais com cisticercose.

Segundo VERSTER et al (1976), carcaças de suínos contaminadas com larvas de *Taenia solium* podem se tornar próprias ao consumo humano se expostas a radiação gama em doses de 20 a 60krad. Embora os cisticercos irradiados permaneçam infectantes, os cestódeos desenvolvidos a partir destes não crescem no hospedeiro e são digeridos ou excretados posteriormente. É provável que a radiação gama iniba a habilidade das células da região do colo da tênia em se dividir e formar proglotes (VERSTER et al, 1976).

FLISSER et al (1986) demonstraram a resistência de metacestódeos de *Taenia solium* a agentes físicos, como choques hipertônicos (NaCl 1M) elétricos (250V-15minutos) e químicos, como detergentes, ácidos e oxidantes, mas observaram também sua sensibilidade a substância alcalina, ao calor e ao congelamento. Cisticercos contidos em fragmentos de carne com 3-4cm de espessura foram inativados à ebulição durante 5 minutos e a -20°C durante 200 minutos. Também foi demonstrado que os cisticercos são anaeróbios facultativos.

A transformação da carne em embutidos (linguiça) tem sido uma alternativa informal para o comércio da carne de animais com cisticercose. Esta hipótese foi formulada por STABENOW et al (1987) ao verificar um aumento no abate clandestino simultaneamente ao

do comércio de linguiças, no Estado do Piauí, logo após a reestruturação do serviço de inspeção em matadouros com a promulgação da “Lei da Federalização da Inspeção”, que estendeu a obrigatoriedade da inspeção federal (SIF) em todos os estabelecimentos de produtos de origem animal no Brasil, em 1971.

Baseando-se em recomendação da Organização Mundial de Saúde, STABENOW et al (1987) relatam os seguintes critérios para a destinação de carne de animais com cisticercose: condenação total em casos de aparecimento de mais de 20 cisticercos, congelamento a $-5^{\circ}\text{C}/350\text{h}$ ou a $-15^{\circ}\text{C}/145\text{h}$ em casos de 0-5 cisticercos e esterilização pelo calor (enlatados) em casos de 6-20 cisticercos.

O regulamento do SIF (BRASIL, 1980), em seus artigos 176 e 204, prevê a condenação total de carcaças com contaminação intensa e rejeição parcial das partes contaminadas, seguida de tratamentos pelo frio, calor ou salga das partes aparentemente sadias, nos casos de contaminação discreta ou moderada. Hoje tem sido rotina o emprego de congelamento de carcaças contaminadas em estabelecimento inspecionados pelo SIF.

São consideradas contaminações intensas, na França, a presença de mais de um cisticercos por 10cm^2 , mais de dois por 20cm^2 nos Estados Unidos, Alemanha e Austrália e um ou mais cisticercos em área equivalente à palma da mão, no Brasil - SIF (CÔRTEZ, 1984). ONAH & CHIEJINA (1995) consideram a presença de cisticercos em três ou mais superfícies de exame como generalizada e localizada quando encontrados em um ou dois locais.

Apesar da importância dos procedimentos usuais da inspeção de carne, há que se ressaltar algumas de suas deficiências principalmente em contaminações leves, quando podem passar despercebidos de 40% a 50% dos casos de cisticercose (CÔRTEZ, 1984), justificando o emprego de testes específicos para seu diagnóstico (HERBERT & OBERG, 1974).

Mesmo nos serviços controlados a ocorrência de casos pode ficar mascarada, devido a falhas técnicas, de infra-estrutura e à necessidade de se evitar perda comercial na carne,

devido suas desfigurações excessivas, por cortes, durante o exame *post-mortem* (VILLA, 1995). Ainda ocorrem falhas no registro dos dados no matadouro, principalmente quanto à procedência dos animais, dificultando as ações de controle da cisticercose (MACIEL & PAIM, 1966).

Considerando as deficiências do controle sanitário no sistema de criação dos suínos e na inspeção da carne durante o abate, notadamente o clandestino, presume-se que o risco de ocorrência de animais portadores de cisticercos e de formas pós-oncosferas seja maior em condições clandestinas (RODRÍGUEZ et al, 1995).

A detecção de formas pós-oncosferas em suínos aparentemente sadios ao exame *post-mortem*, em um matadouro municipal, por RODRÍGUEZ et al (1995), foi relacionada com possíveis falhas no controle sanitário de suínos em granjas que empregam tecnologia.

Os registros das principais doenças suínas que ocorrem em matadouros são escassos. Cisticercose, tuberculose e hidatidose foram as doenças predominantes em exames de 194.361 carcaças de suínos provenientes de oito Estados brasileiros e inspecionados pelo SIF em São Paulo, entre 1982 e 1984, conforme PASSOS et al (1989).

A pneumonia é uma das principais afecções encontradas em suínos abatidos. As taxas de ocorrência de Pneumonia Micoplásmica Suína - PMS ou pneumonia enzoótica podem alcançar até 90% em animais provenientes de rebanhos com infecção severa e atinge 10-20% dos suínos nos rebanhos discretamente infectados (NOGUEIRA, 1996).

Os princípios de modernização da inspeção sanitária em matadouros, aprovados pela Federação Veterinária Européia, privilegiam a integração entre os médicos veterinários responsáveis pelas inspeções *ante mortem* e *post mortem*, e os que atuam na defesa sanitária animal no campo pecuário. De outro lado valoriza, além das atividades inerentes a estes setores, o incremento do apoio diagnóstico laboratorial no matadouro, vinculando a

informação contínua de dados aos segmentos de origem dos animais, promovendo uma retroalimentação do sistema de controle das doenças (DIAS, 1995).

3. OBJETIVOS

Dada a relevância da cisticercose suína nos contextos da Saúde Pública e da saúde animal, constitui objetivo do presente trabalho avaliar o desempenho dos testes ELISA e imunoblot no diagnóstico desta patologia no âmbito da inspeção de carnes suínas, mediante:

- o preparo e fracionamento de antígenos de larvas de *Taenia solium* e de *Taenia crassiceps*;
- a padronização dos testes ELISA e imunoblot;
- o emprego dos testes ELISA e imunoblot padronizados na determinação da frequência e dos riscos da infecção em dois grupos de suínos: submetidos e não submetidos ao serviço de inspeção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.Amostragem.

4.1.1. Padronização.

4.1.1.1. ELISA.

Foram utilizados soros de 25 suínos considerados positivos para cisticercose (controle), oito confirmados ao exame *post-mortem*, cinco procedentes da EMATER-PR e do LACEN-Secretaria de Saúde do Paraná, informados como positivos ao exame *post-mortem* e comprovados no Imunoblot; e 12 procedentes de propriedade que revelou casos recentes de cisticercose e considerados como positivos no Imunoblot. Dos oito soros positivos confirmados ao exame *post-mortem*, quatro revelaram infecção discreta e quatro com infecção intensa, conforme BRASIL (1980). Todos os animais viveram em sistema de criação livre em comunidades rurais, que revelaram história anterior de cisticercose suína.

Os soros controles negativos foram colhidos de 59 suínos, submetidos a minucioso exame *post-mortem*, não apresentando cisticercos. Estes animais tinham idade superior a quatro meses e peso acima de 90Kg; 57 procediam de sistema confinado de criação e dois de criação livre no meio rural.

Também foram estudadas eventuais reações cruzadas frente a soros de oito suínos portadores de larva de *Equinococcus granulosus* (hidatidose), nove parasitados pelo nematódeo *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (macracantorrincose), 27 pelo *Ascaris suum* (ascaridiose) e 15 portadores de pneumonia causada por *Hemophilus sp* ou *Mycoplasma sp*. Os dois primeiros grupos constituíram-se de animais de idade variada (3-6 meses), procedentes de criação livre; os portadores de ascaridiose tinham perfil semelhante aos do

grupo dos controles negativos e o último grupo foi formado por suínos com idade de 1-3 meses, também criados em sistema de confinamento. As enfermidades mencionadas foram confirmadas ao exame *post-mortem* e, nos casos de pneumonia, também ao microbiológico. O exame *post-mortem* se baseou na técnica estabelecida no “Esquema Oficial de Trabalho nas Linhas de Inspeção” do SIF (BRASIL, 1995), considerando o minucioso exame em sítios de eleição da cisticercose, como, língua, coração, músculos da mastigação e da carcaça e cérebro, conforme recomendações de SANTOS (1975) e PRATA (1982).

Todas as amostras, inclusive as dos itens anteriores, foram armazenadas a -20°C .

4.1.1.2. Imunoblot.

Baseando-se no exame *post-mortem* de suínos abatidos foram analisados pelo imunoblot: 13 soros suínos com cisticercose, 30 soros controles negativos e 35 soros colhidos de suínos portadores de outras patologias, ou seja hidatidose (8), macracantorrincose (9), ascaridiose (10) e pneumonia (8).

4.1.2. Inquérito

4.1.2.1. ELISA.

Dois grupos de animais foram separados para a fase de inquérito: um envolvendo 322 suínos abatidos após se submeterem a um serviço de inspeção e outro com 306 animais tradicionalmente abatidos sem inspeção antes de serem comercializados e, ou consumidos. No primeiro grupo os soros foram colhidos durante o abate, na ocasião da sangria, em três frigoríficos localizados em Belo Horizonte-MG (103soros), Carapicuíba-SP (99) e Recife-PE

(120). No segundo, os soros foram colhidos por punção do plexo venoso orbitário de suínos em suas respectivas propriedades rurais, localizadas nos municípios de Guarapuava-PR (68 soros), Viçosa-MG (56), Terenos-MS (23) e Apodi-RN (159), estes não foram abatidos.

4.1.2.2. Imunoblot.

Entre as 628 amostras analisadas pelo teste ELISA, foram analisadas 195 no imunoblot, visando confirmação dos resultados do primeiro, sobretudo dos duvidosos. Esta amostragem foi composta dos 61 soros que revelaram densidade ótica (D.O.) superior ao ponto de corte (média + dois desvios-padrão = 0,879) e 134 com D.O. inferior.

4.1.3. Teste de frações.

Após ensaios preliminares (4.4.5) foram comparados, pelo teste ELISA, os cinco soros controles positivos com D.O. mais baixa frente aos cinco soros controles negativos com D.O. mais alta obtidos no item 5.3.1.

4.2. Preparo dos antígenos.

4.2.1. Obtenção dos parasitas:

4.2.1.1. Forma larvária de *Taenia solium*-Tso (*Cysticercus cellulosae*).

Os parasitas foram extraídos de músculos e vísceras de um suíno com infecção natural intensa, por dissecação dos mesmos, evitando-se os tecidos musculares. Após várias lavagens

em solução salina (NaCl 0,15M), desprezaram-se os cisticercos calcificados e degenerados e separaram-se os demais em duas porções, uma total(CT) e a outra para a separação de escólex(E).

4.2.1.2. Forma larvária da *Taenia crassiceps*-Tcra (*Cysticercus longicollis*):

Considerando as dificuldades encontradas na localização de suínos naturalmente infectados, optou-se pela inclusão do estudo do modelo experimental *C. longicollis*, forma larvária da *Taenia crassiceps* (FREEMAN, 1962). Os parasitas foram mantidos por infecção experimental com inoculação intraperitoneal de cinco a dez parasitas, formas pequenas sem brotamentos visíveis, em camundongos fêmeas BALB/c de 8-12 semanas, com auxílio de agulha de calibre 25x7 e cerca de 0,2ml de PBS (Na_2HPO_4 0,0075M; NaH_2PO_4 0,0025M; NaCl 0,14 - pH 7,2). Após 90 dias, os animais com aumento do volume abdominal foram sacrificados, e os parasitas foram retirados da cavidade peritoneal por meio de lavagens com PBS-I [PBS contendo inibidor de protease PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) P-7626 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), na concentração de $2,5 \cdot 10^{-3}$ mM]. Os cisticercos foram lavados exaustivamente por sedimentação em PBS-I, sendo eliminados aqueles em fase de degeneração ou calcificação e utilizados em seguida no preparo dos antígenos para evitar ruptura das vesículas.

4.2.2. Obtenção de antígenos

Variando apenas o processo de extração do parasito nos animais, os antígenos foram similarmente obtidos, resultando em quatro modalidades de antígenos: escólex (E) e total

(CT) de larvas de *Taenia solium* (Tso) e líquido vesicular (LV) e total (LT) de larvas de *Taenia crassiceps* (Tcra).

Técnica empregada (CT, E e LT):

- desidratação overnight dos cisticercos por liofilização;
- trituração dos cisticercos ou escólices desidratados em gral e pesagem do pó obtido;
- adição de solução salina 0,15M obtendo uma proporção final que variou de 6,5 a 10% (pó);
- homogeneização em homogeneizador de tecido tipo Potter, em banho de gelo;
- tratamento em ultrassom, 4 ciclos, 30segundos, 1mA e 20 Hertz.
- centrifugação a 16.800g/30min/4°C. O sobrenadante foi separado.
- repetição dos procedimentos de trituração, adição de salina, tratamento em ultrassom, e centrifugação, utilizando o sedimento resultante.
- o sobrenadante obtido foi homogeneizado com o primeiro.
- diálise em PBS 7,2, por 48 horas, efetuando-se 3-5 trocas.
- adição de inibidor de protease PMSF (0,25M – 10µl/ml).
- estocagem a –20°C.

Técnica empregada (LV):

- homogeneização dos cisticercos frescos com bastão de vidro durante 30 minutos.
- centrifugação a 4.200g/30min/4°C.
- tratamento do sobrenadante em ultrassom, 4 ciclos, 30segundos, 1mA e 20 hertz.
- centrifugação a 16.800g/30min/4°C.
- diálise do sobrenadante em PBS 7,2, por 48 horas, efetuando-se 3-5 trocas.
- adição de inibidor de protease PMSF (0,25M – 10µl/ml).
- estocagem a –20°C.

4.2.3. Fracionamento de antígeno

Após testes preliminares mal sucedidos, a tentativa de fracionar o antígeno de escólex de larvas de *Taenia solium* foi interrompida; tendo em vista a dificuldade de obter o referido antígeno em quantidade suficiente, optou-se pelo fracionamento do antígeno LT.

Foi realizado o fracionamento do referido antígeno, por cromatografia de filtração em gel, empregando Sephadex G-50, em coluna 56x0,9cm, aplicando 1,5ml de antígeno a uma concentração de 3,93mg/ml e taxa de fluxo de 15,7cm/h.

Após determinação da D.O. de cada alíquota a 280nm, as frações obtidas foram separadas conforme figura 1, concentradas por liofilização, rehidratadas em água destilada apenas o suficiente para solubilizá-las, adicionadas de PMSF (0,25M – 10µl/ml) e estocadas a -20°C.

4.3. Caracterização dos antígenos totais e frações.

4.3.1. Dosagem de proteínas (LOWRY et al., 1951).

4.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Os componentes dos antígenos e frações foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sob condições redutoras, em sistema descontínuo descrito por LAEMMLI, 1970, e por STUDIER, 1973. Foi utilizado gel de separação em gradiente de 5 a 20%, obtido em sistema de vasos comunicantes, e gel a 3% para o empilhamento. O gel de separação foi preparado em solução tamponada

Tris(hidroximetilaminoetano)-HCl 1,5M pH 8,8 e o gel de empilhamento em Tris-HCl 0,5M pH 6,8, ambas contendo 0,025% de SDS. Foram utilizadas placas de vidro de 14,5x16,5cm e espaçadores de 1mm de espessura.

As corridas eletroforéticas em solução-tampão de corrida (Tris 0,075M; glicina 0,576M; SDS 0,1%; pH 8,3) foram iniciadas a 50V (cerca de 15mA) até o empilhamento das amostras no início do gel de separação, quando a voltagem foi aumentada e mantida a 100V (cerca de 30mA), até a chegada do marcador azul de bromofenol no final do gel (aproximadamente 4 horas).

Após a corrida eletroforética os géis foram fixados por 30 minutos em metanol a 40% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v) em água e corados por 10 minutos a 56°C em "Coomassie brilliant blue R250" a 0,1%, metanol a 45% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v) em água e descorados por três trocas de 10 minutos em ácido acético a 7% (v/v) em água a 56°C.

Os antígenos, cerca de 6µg por mm, foram diluídos (v/v) em solução-tampão de amostra (Tris-HCl 0,01M pH 6,8; SDS 2%; glicerol 25%; 2-mercaptoetanol 14,4 mM - e azul de bromofenol 0,1%;), e submetidos a aquecimento em banho-maria a 100°C por 5 minutos, imediatamente antes da aplicação.

Foram utilizados marcadores de peso molecular (PM) de 14,4kD a 94kD (Pharmacia Fine Chemicals Co., Uppsala, Suécia) submetidos a igual tratamento, exceto o aquecimento, que se restringiu a 1 minuto.

Os peptídeos foram analisados por varredura em densitômetro GS-700 (Bio-Rad) e o Rf e o PM calculados com o auxílio do programa Molecular Analyst, versão 1.4 (Bio-Rad).

4.4. ELISA

4.4.1. Técnica básica.

Baseando-se em testes preliminares, as placas de poliestireno fundo chato (CORNING) foram sensibilizadas com os antígenos diluídos em solução tamponada carbonato-bicarbonato 0,5M pH 9,6 durante 12 horas a 4°C, antecedidas por incubação à temperatura ambiente durante uma hora. Após lavagens em solução salina contendo 0,05% de tween-20, foi realizado o bloqueio dos sítios reativos (PBS pH 7,4, leite desnatado, Molico - Nestlé, a 5%) por 1 hora a 37°C. Novas lavagens foram realizadas e as amostras foram diluídas em PBS pH 7,4, leite desnatado a 1% e a placa incubada por 30 minutos a 37°C. Após lavagens, foi adicionado o conjugado, anti-IgG de suíno marcada com peroxidase A-5670 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) e repetidos os procedimentos de incubação e lavagem. A reação foi revelada com solução de OPD (0,1%) e H₂O₂ 0,003% em tampão citrato-fosfato 0,2M pH 5,0, durante um período de incubação de 5 minutos. A reação foi bloqueada com H₂SO₄ 4N. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Neutral 2001 tipo 101540, Áustria) a 492nm. A quantidade de reagentes aplicados à placa se manteve em 100µl, exceto para a solução bloqueadora, 200µl.

4.4.2. Padronização.

Inicialmente foi efetuada a titulação em bloco de antígeno, soro e conjugado, para definir as melhores concentrações ou diluições para cada um dos quatro antígenos (LV, LT, E e CT). O critério de escolha se baseou na amplitude da diferença entre a D.O. que representa o ponto de corte (média de quatro soros controles negativos + dois desvios-padrão)

e a D.O. do soro positivo mais fraco, a semelhança de GOTTSTEIN et al (1987) e recomendação de PERALTA & FRIAS (1987). As figuras 4 a 7 mostram as condições analisadas.

Em sequência foi analisado simultaneamente o desempenho dos quatro antígenos, cada um em suas melhores condições experimentais anteriormente estabelecidas (blocos), visando escolher o melhor deles para seguir as demais etapas previstas para a padronização do teste ELISA (Figura 8). O antígeno LV foi eleito o melhor nessa etapa.

Nas etapas seguintes foram efetuados diversos ensaios com o antígeno LV, avaliando outros parâmetros da técnica ELISA, como períodos de incubação de soro, conjugado e substrato e de sensibilização das placas e bloqueio, conforme figuras 9 a 13.

A reprodutibilidade das melhores condições para os quatro antígenos foi verificada (Figura 14).

Na última etapa foram ensaiados os quatro antígenos cada um em suas melhores condições experimentais frente a todos os soros controles positivos (25), negativos (59) e de outras patologias, como hidatidose (8), macracantorrincose (9), ascaridiose(27) e pneumonia(15). Os soros foram analisados em triplicata, desprezando-se os valores discrepantes. Os resultados foram utilizados na determinação das frequências de reações positivas (verdadeiras), negativas (verdadeiras), inespecíficas (positivas em soros controles negativos) e cruzadas (positivas em soros de suínos com outras patologias). Essas frequências foram empregadas nos cálculos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, concordância e coeficiente de correlação intragrupal, visando avaliar o desempenho do teste ELISA padronizado (FLETCHER et al.,1991; GERMANO, 1989).

4.4.3. Inquérito

Esta fase se destinou à aplicação do teste padronizado em amostragem de soros de suínos de diversas procedências.

As amostras colhidas (item 4.1.2) foram testadas em triplicata seguindo a técnica básica do teste ELISA, ajustada ao melhor esquema padronizado, ou seja, antígeno LV, 2µg/ml, soro 1/400, conjugado 1/1000.

4.4.4. Determinação dos pontos de corte.

Visando a definição da positividade e negatividade dos soros analisados no teste ELISA, foram determinados os “pontos de corte”, representados pela soma da D.O. média obtida em análise prévia dos soros controles negativos mais dois (2sd) ou mais três desvios-padrão (3sd).

4.4.5. Teste de frações.

4.4.5.1. Desempenho preliminar entre frações.

As quatro frações obtidas, F₁, F₂, F₃ e F₄ (item 4.2.3) foram inicialmente testadas na concentração de 10µg/ml com quatro soros negativos e um positivo fraco nas diluições 1/50 a 1/400 e conjugado a 1/20.000.

4.4.5.2. Titulação em bloco de F₄.

Variaram-se as concentrações de antígeno, 2, 5 e 10µg/ml e as diluições de soro 1/25, 1/50, 1/100 e 1/200 e de conjugado 1/2.000, 1/5.000, 1/10.000 e 1/20.000. Empregaram-se os mesmos soros do item anterior.

4.4.5.3. Desempenho comparativo entre frações e antígeno total.

Foram testados o antígeno LT (total) na concentração de 5µg/ml, frente a cinco soros controles positivos com D.O. mais baixa no teste ELISA e a cinco soros controles negativos com D.O. mais alta, nas diluições 1/25 e 1/50 e de 1/20.000 para conjugado. Também foram testadas simultaneamente as três frações, na concentração de 2µg/ml e diluições de soro 1/25 e 1/50 e de conjugado 1/5.000. Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, concordância e coeficiente de correlação intragrupal do teste ELISA frente ao antígeno total e frações foram determinados.

4.5. Imunoblot.

4.5.1. Técnica básica.

Os peptídeos separados por SDS-PAGE foram transferidos eletroforéticamente do gel para membranas de nitrocelulose de 0,2µ (Millipore, USA), segundo a metodologia descrita por TOWBIN et al (1979), utilizando solução tamponada de transferência contendo metanol (Tris-hidroximetilaminoetano 25mM; glicina 192mM e metanol 20% -v/v-, pH 8,3). A transferência foi procedida por um período de 1 hora, a temperatura ambiente, com corrente

de 50mA e voltagem constante de 17V (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas em solução aquosa contendo Ponceau-S a 0,5%, para visualização qualitativa e quantitativa da transferência.

A partir das membranas foram obtidas tiras de 3 a 4 mm de largura que foram descoradas e lavadas três vezes em solução salina (NaCl 0,15M) contendo 0,05% (v/v) de tween-20.

As tiras foram tratadas com solução bloqueadora [leite desnatado, Molico – Nestlé, a 5% dissolvido em Tris-salina (Tris-hidroximetilaminoetano 10mM e NaCl 0,15M; pH 7,4), por aquecimento até cerca de 90°C e filtrado em papel de filtro] por uma hora sob agitação lenta à temperatura ambiente.

As amostras de soro a 1/50 ou 1/100 em solução diluidora (Solução bloqueadora diluída a 1/5 em Tris-salina) foram adicionadas às tiras e a incubação realizada por 14-18 horas, a 4°C, sob agitação lenta.

Após seis lavagens, cinco minutos cada, as tiras foram novamente incubadas por uma hora com conjugado, anti-IgG de suíno marcada com peroxidase (A-5670), diluído em solução diluidora, e em seguida novas lavagens foram procedidas.

Os peptídeos reativos foram evidenciados com a solução cromógena (Diaminobenzidina 5mg, H₂O₂ 1,5% em PBS pH 7,2) por cerca de 10 minutos, em seguida as tiras foram lavadas com água destilada e secadas. As peptídeos reativas foram analisadas por varredura em densitômetro GS-700 (Bio-Rad) e o R_f e o PM calculados com o auxílio do programa Molecular Analyst, versão 1.4 (Bio-Rad).

Os marcadores de peso molecular utilizados variaram de 94kD a 14,4kD (Pharmacia Fine Chemicals Co., Uppsala, Suécia).

Na transferência optou-se pelo antígeno LT, na concentração de 6µg/mm, em face de sua maior disponibilidade, diante da alta quantidade requerida e de sua maior versatilidade de peptídeos em relação aos demais.

4.5.2. Padronização.

4.5.2.1 Titulação em bloco.

Com o propósito de testar basicamente variações de diluições ótimas de soro e conjugado, foram analisadas as diluições 1/25, 1/100, 1/500 e 1/5.000 de soro e 1/100, 1/500, 1/1.000 e 1/5.000 de conjugado, empregando-se um soro controle positivo e um negativo. Em seguida procedeu-se a confirmação do melhor bloco diante de três soros controles positivos, um deles procedentes de suínos com poucos cisticercos e três negativos

4.5.2.2. Análise dos peptídeos reativos que discriminam soros de suínos com cisticercose dos soros de suínos sem cisticercose.

Partindo da amostragem explicitada no item 4.1.2.2 e atendendo à recomendação de LARRALDE, et al (1989), para a análise dos peptídeos reativos, foi determinada a frequência média dos diferentes peptídeos do antígeno LT capazes de reagirem com os anticorpos dos soros controles dos diversos grupos de suínos, conforme sua condição anátomo-patológica pré-determinada. A localização dos peptídeos reativos na tira de nitrocelulose, bem como sua aparência física, particularmente a intensidade de cor, foram consideradas na interpretação da reatividade e enumeração dos peptídeos (LARRALDE, et al, 1989; TSANG et al, 1991).

Em função dos resultados obtidos foram determinados para cada peptídeo os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos, visando estabelecer os critérios para diferenciação dos soros como positivos ou negativos para cisticercose suína, ou seja, definição dos peptídeos específicos e estabelecimento dos critérios de positividade e de negatividade.

4.5.3. Inquérito

Esta fase se destinou a complementar a fase de inquérito do teste ELISA.

Com base no teste padronizado foram analisadas 195 (31%) amostras investigadas na fase de inquérito do teste ELISA. Cerca de 1/3 (61) dessas amostras corresponderam àquelas que revelaram D.O. superior ao ponto de corte (dois desvios-padrão) no teste ELISA e 2/3(134) englobaram parte das que tiveram D.O. abaixo, especialmente com valores próximos ao ponto de corte ou mostraram grande variação nas replicatas do teste ELISA.

4.6. Determinação da frequência de cisticercose suína e do seu risco de ocorrência no inquérito.

Pelos resultados do ELISA e do Imunoblot foram determinados a frequência e os riscos de ocorrência de cisticercose suína nos grupos dos animais submetidos a um serviço de inspeção e dos suínos convencionalmente não inspecionados. Os cálculos dos riscos foram efetuados pelo teste do Odds Ratio (FLETCHER et al, 1991) e sua significância estatística pelo Intervalo de Confiança 95% e pelo teste de Fisher (Programa EpiInfo 6, versão 6.04b, CDC, Atlanta, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção dos antígenos

5.1.1. Larvas de *Taenia crassiceps* total (LT)

Foram extraídos os parasitos de 25 camundongos, resultando em 300,91g de peso úmido, que se transformaram em 14,4g de pó através de liofilização.

A partir de 10g de pó foram obtidos 84ml de antígeno total (LT), na concentração protéica de 18,05 mg/ml, representando 151,6mg de antígeno protéico/g(pó) ou 873mg de antígeno protéico por camundongo.

5.1.2. Vesicular de larvas de *Taenia crassiceps*.(LV)

Foram obtidos 26ml de líquido vesicular de parasitos extraídos de dois camundongos, com o teor protéico de 2,46 mg/ml ou 32mg de antígeno protéico por camundongo.

5.1.3. Escólex de larvas de *Taenia solium* (E)

Após liofilização e trituração dos escólices obteve-se 1,3g de pó, que se transformaram em 14ml de antígeno total, com o teor protéico de 5,66 mg/ml, ou seja, 61mg/g pó.

5.1.4. Larvas de *Taenia solium* total (CT)

Os cisticercos obtidos representaram 3,9g de pó após sua liofilização e trituração, transformando-se em 27ml de antígeno total, com o teor protéico de 6,69 mg/ml, ou seja, 46mg/g pó.

5.1.5. Fracionamento dos antígenos.

Foram obtidas quatro frações conforme figura 1, variando de 6 a 13 alíquotas de 0,7ml colhidas em cada fração, que foram processadas segundo o item 4.2.3, obtendo-se, finalmente, 430µl de 1ª fração, 400 de 2ª, 350 de 3ª e 740 de 4ª.

Pelo teor protéico constatou-se no fracionamento do antígeno LT (3,93mg/ml) uma perda total de cerca de 6% do antígeno aplicado, recuperando-se cerca de 56% na primeira fração e 18%, 7% e 13% nas demais, respectivamente.

Figura1. Resultado do fracionamento do antígeno total de cisticercos de *Taenia crassiceps* (LT), leitura de densidade óptica (DO) a 280nm, de cada fração obtida em coluna de Sephadex G-50

5.2. Caracterização dos antígenos totais e frações.

5.2.1. Dosagem de proteína.

A tabela 1 mostra o teor de proteína dos antígenos em mg/ml.

TABELA 1. Teor protéico dos antígenos estudados

Antígeno	Teor Protéico(mg/ml)
LV	2,46
LT	18,05
E	5,66
CT	6,69
F ₁	7,74
F ₂	2,63
F ₃	1,13
F ₄	1,06

Enquanto as primeiras frações evidenciaram uma capacidade de recuperação do teor protéico do antígeno aplicado na coluna, as duas últimas mostraram baixo rendimento.

5.2.2. SDS-PAGE

A figura 2 e a tabela 2 mostram a frequência e os pesos moleculares (kD) dos peptídeos disponíveis em cada um dos antígenos totais utilizados neste estudo.

Observa-se que o antígeno LT apresentou uma maior quantidade de peptídeos, o que contribuiu para sua escolha para o teste do imunoblot.

Em geral os antígenos revelaram peptídeos entre 14 e 190kD.

Peptídeos de baixo peso molecular (PM) realçaram-se mais nos antígenos de larvas de *Taenia crassiceps* (Figura 2).

TABELA 2. Caracterização dos antígenos totais - SDS-PAGE

Ordem Identificação*	Peptídeos (kD)	Antígenos			
		LT	LV	E	CT
1	190	X	-	-	-
2	177	X	X	X	X
3	146	-	-	X	-
4	137	X	X	X	-
5	132	-	-	X	-
6	121	-	-	X	-
7	112	-	-	X	-
8	108	-	X	-	-
9-E	106-5	X	-	-	X
10-E	96-5	X	-	-	X
11	93-2	X	-	X	X
12-F	88-7	X	-	-	X
13-G	83-0	X	-	X	X
14-H	75-3	X	X	X	X
15-I	70-1	X	X	X	X
16-K	61-59	X	-	X	X
17	57	X	-	X	X
18	53	X	-	-	-
19	49-7	X	-	X	X
20-M	46	X	X	X	X
21	44	X	-	-	-
22	42	X	-	-	X
23	40-39	X	-	X	X
24	36	X	-	X	X
25	35	X	-	X	-
26	33	X	-	-	-
27	30	X	-	X	X
28	29	X	-	X	-
29-R	28-7	X	X	X	X
30	26	X	-	-	-
31	23	X	-	-	-
32	22	X	-	X	X
33	21	X	-	-	-
34	19	-	X	-	X
35	18	X	-	X	X
36	17	X	-	X	-
37	16	-	-	X	X
38-Y	15	X	X	X	X
39-Z	14	X	-	X	-
Total	-	32	9	26	22

X = Presença de peptídeo

- = Ausência de peptídeo

* As letras indicam a semelhança de alguns peptídeos com os apresentados na padronização do imunoblot, segundo a localização e aparência física.

Figura 2. Peptídeos dos antígenos total (LT) e vesicular (LV) de larva de *Taenia crassiceps* e de escólex (E) e Total (CT) de larva de *Taenia solium* acompanhadas de marcador de PM (P), correspondentes a 94, 67, 43, 30, 20 e 14,4kD.

Quanto às frações, a figura 3 mostra o perfil eletroforético de cada uma utilizada neste estudo.

A terceira e a quarta frações mostraram ter um número bem inferior de peptídeos que a primeira e a segunda. Como se esperava o número de peptídeos de alto PM foi decrescendo à medida que as frações subsequentes iam saindo da coluna.

A terceira fração evidenciou os peptídeos, 19, 15, 14, 13 e 12kD. Estes apareceram também na segunda fração, mais realçados, mas acompanhados de diversos outros de PM superior até cerca de 94kD. A primeira fração se assemelha ao antígeno total. A quarta não evidenciou peptídeos.

Figura 3. Peptídeos das frações F₁, F₂, F₃ e F₄ obtidas do fracionamento do antígeno total de larva *Taenia crassiceps* (LT) em Sephadex G-50 acompanhadas de marcador de PM (P), correspondentes a 94, 67, 43, 30, 20 e 14,4kD.

5.3. Padronização

5.3.1. ELISA

O resultado da titulação em bloco de antígeno, soro e conjugado dos quatro tipos de antígenos utilizados são mostrados nas figuras 4 a 7 e correspondentes tabelas 16 a 19 (Apêndice), indicando as tendências do(s) melhor(es) bloco(s) entre os testados, quanto à diferenciação do soro suíno positivo mais fraco dos negativos à cisticercose.

O melhor bloco para o antígeno LV foi 2 μ g/ml(antígeno) - 1/400(soro) - 1/1.000(conjugado), pois revelou a maior amplitude da diferença de DO entre soros negativos e positivo fraco(89,2%), por isso foi o bloco escolhido para seguir a padronização.

Figura 4. Amplitude da diferença de densidade ótica entre soros negativos e positivo fraco segundo diluições(1/...) de soro e conjugado(C) e concentração de antígeno(LV)

Figura 5. Amplitude da diferença de densidade óptica entre soros negativos e positivo fraco segundo diluições(1/...) de soro(S) e conjugado e concentração de antígeno(E)

Quanto aos antígenos E, $5\mu\text{g/ml}$ - $1/100$ - $1/1.000$ foi o melhor bloco (amplitude de 25,5%), LT, $10\mu\text{g/ml}$ - $1/400$ - $1/20.000$ (25,2%) e CT, $2\mu\text{g/ml}$ - $1/400$ - $1/20.000$ (10,1%). Algumas considerações, principalmente os valores de DO muito altos ou muito baixos nos blocos acima, recomendaram outros blocos como os mais indicados para seguir a padronização. Foi escolhido o bloco $5\mu\text{g/ml}$ - $1/100$ - $1/20.000$ para os três antígenos.

Os blocos evidenciaram comportamento instável para os antígenos LT e CT (Figuras 6 e 7), não revelando tendências nítidas, exceto para o conjugado $1/20.000$. Para estes dois casos foi escolhido para seguir a padronização, o bloco $5\mu\text{g/ml}$ - $1/100$ - $1/20.000$, que preservou uma DO intermediária e valores de amplitude entre os mais elevados, como ocorrido com o antígeno E.

Figura 6. Amplitude da diferença de densidade ótica entre soros negativos e positivo fraco segundo diluições(1/...) de soro e conjugado(C) e concentração de antígeno(LT)

Figura 7. Amplitude da diferença de densidade óptica entre soros negativos e positivo fraco segundo diluições (1/...) de soro e conjugado (C) e concentração de antígeno (CT)

Ao serem comparados os quatro antígenos simultaneamente, cada um com o seu melhor bloco, pode-se destacar o melhor desempenho na diferenciação de soro positivo fraco de negativos para o antígeno LV (Figura 8, Tabela 20 - Apêndice), indicando este antígeno como o eleito para prosseguir a padronização.

Figura 8. Comparação dos quatro antígenos pela amplitude da diferença de densidade óptica entre soros negativos e positivo fraco segundo diluição de soro.

Na investigação dos melhores períodos de incubação de soro, de conjugado e de substrato, não se observou destaque entre os testados, especialmente quando se analisou separadamente a melhor diluição de soro eleita, 1/400 (Figuras 9, 10 e 11; Tabelas 21 e 22 - Apêndice). Entretanto se observou uma ligeira tendência de melhor comportamento dos períodos de 30 minutos para soro e conjugado e de 5 minutos para substrato, justificando sua continuidade nos testes de padronização.

Figura 9. Amplitude da diferença de densidade ótica entre soros negativos e positivo fraco segundo períodos de incubação de soro(S) e conjugado(C) e diluição(1/...) de soro(S)

Figura 10. Amplitude da diferença de densidade ótica entre soros negativos e positivo fraco segundo diluição (1/...) de soro (S) e períodos de incubação (minutos) de soro (S) e conjugado(C)

Figura 11. Amplitude da diferença de densidade ótica entre soros negativos e positivo fraco segundo diluição(1/...) de soro(S) e períodos de incubação de substrato(minutos)

Quanto aos períodos de sensibilização das placas testados, 12horas/4°C e 1hora/37°C, também não mostrou vantagem de nenhum deles. A sensibilização de 12 horas a 4°C foi selecionada para seguir a padronização, dada sua ligeira vantagem na diluição do soro a 1/400 (Figura 12, Tabela 23 - Apêndice).

Figura 12. Amplitude da diferença de densidade ótica entre soros negativos e positivo fraco segundo diluição(1/...) de soro e períodos de sensibilização das placas com LV

Leite a 5% foi a melhor solução bloqueadora dos sítios reativos remanescentes das placas, ultrapassando os efeitos da albumina bovina (BSA 1%), da gelatina a 1% e da ausência de bloqueio e ausência de Tween-20 nas soluções diluidora de soro e conjugado e de lavagem das placas (Figura 13, Tabela 24 - Apêndice).

Figura 13. Amplitude da diferença de densidade ótica entre soros negativos e positivo fraco segundo tipo de bloqueio dos sítios reativos das placas e diluição(1/...) de soro(S).

Nos experimentos anteriores realizados com o antígeno LV (Figuras 9 a 12), ficou evidente a boa reprodutibilidade da diluição de soro 1/400, em face das altas amplitudes de diferença entre positivo e negativos reveladas; quando não eram as maiores posicionavam-se próximas destas.

A reprodutibilidade dos melhores blocos (Figura 14, Tabela 25 - Apêndice), com respeito à maior amplitude da diferença entre soros positivo fraco e negativos só se manteve para o antígeno E, considerando o bloco escolhido para a padronização, ou seja, mostrando o conjugado 1/20.000 melhor que 1/1.000. Para o antígeno LV obteve-se maior amplitude para o bloco 5µg/ml-1/200-1/20.000, embora o valor obtido não tenha excedido muito ao do bloco escolhido anteriormente como o melhor (2µg/ml-1/400-1/1.000). Quando se sensibilizaram as placas com os antígenos LT e CT se mantiveram como melhores a diluição de conjugado(1/20.000) e a concentração de antígeno (5µg/ml), as melhores diluições de soro

passaram a ser 1/200 para o LT e 1/400 para o CT, discordando da melhor definida anteriormente (1/100).

Figura 14. Reprodutibilidade dos principais parâmetros escolhidos por antígeno

Testando os antígenos LV, E, LT e CT, em seus melhores blocos, frente a todos os soros controles disponíveis, foram obtidos os resultados expressados nas tabelas 26 a 31 (Apêndice), que foram analisados segundo o ponto de corte com dois desvios-padrão (2sd) ou três (3sd), conforme tabelas 3 a 5.

TABELA 3. Reações cruzadas de soros de suínos com outras patologias com a cisticercose.

Outras Patologias	Antígeno /Desvios-padrão							
	LV		E		LT		CT	
	2sd	3sd	2sd	3sd	2sd	3sd	2sd	3sd
Hidatidose	1/8 12,5%	0	1/8 12,5%	1/8 12,5%	1/8 12,5%	1/8 12,5%	0	0
Ascaridiose	1/27 3,7%	0	1/27 3,7%	0	0	0	2/27 7,4%	0
Macracantorrincose	0	0	0	0	0	0	0	0
Pneumonia	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	2/59 3,4%	0	2/59 3,4%	1/59 1,7%	1/59 1,7%	1/59 1,7%	2/59 3,4%	0

Não obstante o menor número de amostras, a hidatidose foi responsável pela maior proporção de reações cruzadas (12,5%), não ocorrendo apenas com o antígeno CT. Suínos com ascaridiose também esboçaram capacidade de apresentar reação cruzada com antígenos de cisticercos, embora em proporções mais baixas (até 7,4%), não ocorrendo o mesmo com animais infectados com macracantorrincose ou portadores de pneumonia, que não revelaram tais reações.

TABELA 4. Reações inespecíficas à cisticercose em soros de suínos sem enfermidades

Desvios-padrão	Antígeno			
	LV	E	LT	CT
2sd	1/59(1,7%)	2/59(3,4%)	1/59(1,7%)	2/59(3,4%)
3sd	0	0	1/59(1,7%)	0

TABELA 5. Avaliação do teste ELISA na fase de padronização adotando o exame *post-mortem* como prova padrão (soros controles)

Tipo de Reação e Valores	Antígeno/Desvios-padrão							
	LV		E		LT		CT	
	2sd	3sd	2sd	3sd	2sd	3sd	2sd	3sd
Reação Positiva/Total	24/25	20/25	22/25	19/25	25/25	23/25	22/25	18/25
Reação Negativa/Total	115/118	118/118	114/118	117/118	116/118	116/118	114/118	118/118
Reação Inespecífica	1	0	2	0	1	1	2	0
Reação Cruzada	2	0	2	1	1	1	2	0
Sensibilidade(%)	96	80	88	76	100	92	88	72
Especificidade(%)	97,5	100	96,5	99	98	98	96,5	100
Valor Preditivo +(%)	89	100	84,5	95,0	92,5	92	84,5	100
Valor Preditivo –(%)	96,5	96	94	94	98	96,5	94	93,5
Concordância Observada	0,97	0,96	0,95	0,95	0,99	0,97	0,95	0,95
Concordância Esperada	0,70	0,73	0,71	0,73	0,70	0,71	0,71	0,74
Coefficiente de Correlação Intragrupal (K)	0,90	0,85	0,83	0,81	0,97	0,90	0,83	0,81

5.3.2. Teste de frações

5.3.2.1. Desempenho preliminar entre frações.

As frações F₃ e F₄ mostraram melhor desempenho, conforme a figura 15 e tabela 39 (Apêndice).

Figura 15. Amplitude da diferença de densidade óptica entre soros negativos e positivo fraco empregando frações de LT obtidas em Sephadex G-50

Apenas a diluição de soro 1/50 revelou diferença de amplitude entre soro positivo fraco e negativos.

5.3.2.2. Titulação em bloco de F₄.

A concentração de antígeno 2µg/ml mostrou nítida vantagem sobre 5 e 10µg/ml (Figura 16, Tabela 40 - Apêndice). Considerando o antígeno na concentração de 2µg/ml, a diluição 1/5.000 de conjugado se destacou como a melhor. Nas condições de 2µg/ml e 1/5.000, a menor diluição de soro (1/25) respondeu melhor, definindo o bloco mais recomendado.

A disponibilidade de fração F₄ se esgotou nesta fase.

Figura 16. Amplitude da diferença de densidade óptica entre soros negativos e positivo fraco segundo diluições de soro e conjugado(C) e concentração de antígeno(F4)

5.3.2.3. Desempenho comparativo entre frações e antígeno total

Conforme resultados e valores mostrados nas tabelas 6 e 7, o antígeno total (LT) e a terceira fração obtiveram melhor desempenho na diferenciação de cinco soros positivos fracos e cinco negativos com DO alta, em relação à primeira e à segunda frações. A mesma sensibilidade permaneceu em 3sd para F₃, mas caiu para LT.

TABELA 6. Total de soros com reação(ELISA) ao antígeno total e suas frações

Antígenos*	Desvios-padrão/Resultado			
	2sd		3sd	
	+	-	+	-
LT	4	5	3	5
F ₁	2	5	1	5
F ₂	2	5	2	5
F ₃	4	5	4	5

+ cinco soros positivos fracos ao teste ELISA
- cinco soros negativos com DO alta.

TABELA 7. Taxas de desempenho do teste ELISA para o antígeno total e suas frações

Valores	Antígeno/Desvios-padrão							
	LT		F ₁		F ₂		F ₃	
	2sd	3sd	2sd	3sd	2sd	3sd	2sd	3sd
Sensibilidade(%)	80,0	60,0	40,0	20,0	40,0	40,0	80,0	80,0
Especificidade(%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Valor Preditivo +(%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Valor Preditivo –(%)	83,3	71,4	62,5	55,5	62,5	62,5	83,3	83,3
Concordância Observada	0,9	0,8	0,7	0,6	0,7	0,7	0,9	0,9
Concordância Esperada	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Coeficiente de Correlação Intragrupal (K)	0,8	0,6	0,4	0,2	0,4	0,4	0,8	0,8

5.3.3. Imunoblot

5.3.3.1. Titulação em bloco

Os resultados que constam das tabelas 8 a 10 indicam as diluições de soro e conjugado mais adequadas à diferenciação entre soros positivos e negativos. As reações dos soros positivos e negativos por peptídeos estão mostradas nas tabelas 41 a 43 (Apêndice).

TABELA 8. Quantidade de peptídeos reativos aos soros positivo (191) e negativo (188) encontrado no imunoblot sob diferentes diluições de conjugado (1/100 e 1/500) e soro.

Número de Peptídeos	Diluição de Conjugado/Soro															
	1/100								1/500							
	1/25		1/100		1/500		1/5.000		1/25		1/100		1/500		1/5.000	
	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188
Total	22	12	14	8	9	3	9	3	16	10	16	7	8	3	8	3
Diferença +/-	10		6		6		6		6		9		5		5	
Específicos	9	1	4	-	2	-	2	-	2	-	4	-	2	-	2	-

TABELA 9. Quantidade de peptídeos reativos aos soros positivo (191) e negativo (188) encontrado no imunoblot sob diferentes diluições de conjugado (1/1.000 e 1/5.000) e soro.

Número De Peptídeos	Diluição de Conjugado/Soro															
	1/1.000								1/5.000							
	1/25		1/100		1/500		1/5.000		1/25		1/100		1/500		1/5.000	
	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188
Total	22	11	18	5	6	3	5	-	12	6	10	5	6	2	4	3
Diferença.	11		13		3		5		6		5		4		1	
Específico	9	-	6	-	2	-	2	-	3	-	3	-	2	-	2	-

A diluição de conjugado 1/1.000 se comportou melhor na diferenciação entre positivo e negativo, devido a ocorrência de maior número de anticorpos reativos compondo a diferença +/- e reação com maior número de peptídeos específicos. Pelo mesmo critério as diluições 1/25 e 1/100 de soro foram melhores. Entendeu-se como melhor entre as duas diluições mencionadas, a de 1/100, pois mostrou maior número na diferença entre soros positivos e negativos, facilitando a leitura quanto à visualização dos peptídeos reativos, particularmente as específicas, que apareceram em número apreciável (6), nessa condição. Embora a combinação 1/25(soro)-1/1.000(conjugado) tenha permitido o aparecimento de maior número de peptídeos específicos(9), também houve excesso de peptídeos dificultando a sua visualização e esboçou a reação de anticorpos de soro negativo com peptídeo específico, o que ocorreu, também, nas diluições 1/25 (soro) e 1/100 (conjugado).

TABELA 10. Quantidade de peptídeos reativos aos três soros controles positivos (191, 393 e 400), um deles procedentes de suínos com lesões discretas (393) e três soros controles negativos (188, 334 e 398), na diluição 1/1.000 de conjugado e 1/100 de soro.

Número de Peptídeos	Tipo de Soro							
	191	400	393	Total Positivo	188	334	398	Total Negativo
Total	16	14	10	40	9	5	6	20
Diferença Total/Soro	20/3 = 6,7							
Específicos/Soro	5	5	2	12/3 = 4	-	-	-	-

O teste com maior número de soros continua evidenciando a importância de alguns peptídeos na diferenciação de suínos com cisticercose dos suínos sem a infecção, sobretudo aqueles peptídeos de baixo peso molecular (Tabela 43 – Apêndice). O decréscimo no número de peptídeos reativos, inclusive das específicas, se explica pelo emprego de soro com maior potencial de reação imunológica nos experimentos anteriores (Tabelas 8 e 9).

Os peptídeos específicos foram relacionados na fase seguinte da padronização do imunoblot.

5.3.3.2. Análise dos peptídeos reativos que discriminam soros de suínos com cisticercose dos soros de suínos sem cisticercose.

Em função dos resultados obtidos (Tabela 11) foram determinados para cada peptídeo as taxas de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos, visando estabelecer os critérios para diferenciação dos soros como positivos ou negativos para a cisticercose suína. O resultado detalhado do imunoblot dos soros controles analisados estão registrados nas tabelas 44 a 48 (Apêndice).

Os referidos critérios foram assim estabelecidos:

A-Definição do Peptídeo Específico:

1-Peptídeo absolutamente específico: aquele que reagiu com soros controles positivos e não reagiu com os negativos ou com os responsáveis por reação cruzada (100% de especificidade); este grupo foi composto pelos peptídeos S(23-5kD), T(22), U(21), V(19-20) e Z(14).

2-Peptídeo relativamente específicos: aquele que reagiu com mais de 50% dos soros controles positivos e com menos de 10% dos negativos ou 10% dos procedentes de suínos portadores de outras patologias, ou seja acima de 50% de sensibilidade e acima de 90% de especificidade, abrangendo os peptídeos I(68-72kD), O(36-9), X(17-8) e Y(15-6).

B-Definição da Positividade dos Soros:

Reação com dois ou mais Peptídeos Específicos, principalmente se houver reação simultânea com os peptídeos I(68-72kD) e Y(15-16kD).

TABELA 11. Frequência dos peptídeos reativos e taxas do imunoblot no teste de soros controles.

Ident.	Peptídeos kD	Negativos	Outras Patologias	Positivos	Sensib.	Especif. Média	VP+	VP –	Peptídeos Específicos
1-A	172-204	-	1	5	38,4	98,5	83,3	88,9	-
2-B	143-64	-	1	3	23,1	98,5	75,0	86,5	-
2-C	130-40	3	3	4	30,8	90,8	40,0	86,8	-
4-D	114-20	2	7	7	53,8	86,1	43,7	90,3	-
5-E	105-10	11	25	7	53,8	44,6	16,3	82,8	-
6-E	101-4	9	14	8	61,5	64,6	25,8	88,9	-
7-E	97-100	25	29	9	69,2	16,9	14,3	73,3	-
8-F	91-6	1	-	2	15,4	98,5	66,7	85,3	-
9-G	82-90	4	4	4	30,8	87,7	33,3	86,4	-
10-H	74-81	24	27	12	92,3	21,5	19,0	93,3	-
11-I	68-72	2	3	13	100,0	92,3	72,2	100,0	E
12-J	63-6	4	5	8	61,5	86,1	47,0	91,8	-
13-K	55-62	12	22	9	69,2	44,6	20,9	87,8	-
14-L	51-4	5	2	7	53,8	89,2	50,0	90,6	-
15-M	45-50	18	29	8	61,5	27,7	14,5	78,3	-
16-N	42-4	16	14	7	53,8	53,8	18,9	85,4	-
17-N ₁	40-1	5	7	-	0	81,5	0	80,3	-
18-O	36-9	1	2	8	61,5	95,4	72,7	92,5	E
19-P	33-5	12	6	11	84,6	72,3	37,9	95,9	-
20-Q	30-2	8	9	7	53,8	73,8	29,2	88,9	-
21-Q ₃	29	5	1	3	23,1	90,8	33,3	85,5	-
22-R	26-8	14	21	4	30,8	46,1	10,3	79,5	-
23-S	23-5	-	-	1	7,7	100,0	100,0	84,4	E
24-T	22	-	-	2	15,4	100,0	100,0	85,5	E
25-U	21	-	-	4	30,8	100,0	100,0	87,8	E
26-V	19-20	-	-	1	7,7	100,0	100,0	84,4	E
27-X	17-8	1	2	7	53,8	95,4	70,0	91,2	E
28-Y	15-6	-	1	10	76,9	98,5	90,9	95,5	E
29-Z	14	-	-	3	23,1	100,0	100,0	86,7	E
(I+Y)	68-72/15-6	-	-	10	76,9	100,0	90,9	95,5	-
n		30	35	13	-	-	-	-	-
Total de Peptídeos		182	234	175					
Média de Peptídeos/Amostra		6,1	6,7	13,5	-	-	-	-	-
Total de Peptídeos Específicos		4	8	48					
Média de Peptídeos Específicos/Amostra		0,1	0,2	3,4	-	-	-	-	-
Média das Taxas dos Peptídeos Específicos		-	-	-	41,9	98,0	89,5	89,8	-

Pelos resultados e taxas do imunoblot dos soros controles foram identificados nove peptídeos específicos: I(68-72kD), O(36-39), S(23-25), T(22), U(21), V(19-20), X(17-18), Y(15-16), Z(14).

A figura 17 ilustra as reações de alguns peptídeos com anticorpos de soros positivo e negativo para a cisticercose suína.

Figura 17. Reação dos principais peptídeos com anticorpos de soros de suínos positivo (P) e negativo (N), acompanhados de marcador de PM (PD), evidenciando alguns peptídeos específicos: I (68-72kD), O(36-9), S(23-5), U(21), V(19-20), Y(15-16) e Z(14).

Entre os peptídeos específicos destacaram-se o I(68-72kD) e o Y(15-16), sobretudo sua ocorrência simultânea, quando revelaram alta frequência entre os soros positivos e baixa entre os negativos ou soros de suínos com outras patologias, traduzidos em 76,9% de sensibilidade e 100% de especificidade. Isto significa que todas as vezes em que apareceram esses dois peptídeos simultaneamente o soro era positivo.

O número de peptídeos que reagiram com anticorpos dos soros positivos (13,5) foi superior ao número dos que reagiram com os outros dois grupos de soros (6,1 e 6,7); esta diferença foi bem maior quando se analisaram os peptídeos “específicos” separadamente, ou seja, 3,4 peptídeo específico por soro contra 0,1 e 0,2, respectivamente (Tabela 11).

Entre as reações inespecíficas e cruzadas, predominaram as reações cruzadas com soros de suínos portadores de hidatidose, que acusaram 9,1 peptídeo/soro e 0,5 peptídeo específico/soro.

5.4. Inquérito

Pelos seus elevados valores apresentados e pela regularidade do antígeno LV durante toda a padronização do teste ELISA, esse foi o escolhido para a análise dos soros colhidos para a fase de inquérito.

Os resultados foram analisados inicialmente pelo teste ELISA, utilizando-se 2^{sd} e 3^{sd} na determinação dos pontos de corte.

O imunoblot indicou os resultados determinantes da reatividade imunológica dos soros colhidos na fase de inquérito para a cisticercose suína, decidindo inclusive as dúvidas geradas pelos resultados do teste ELISA.

As tabelas 12 e 32 a 38 (Apêndice) explicitam os resultados.

TABELA 12. Número de soros com reação imunológica à cisticercose segundo a procedência

Procedência	n	n ₁	ELISA		Imunoblot (%)	Conclusão (%)
			2 sd (%)	3sd (%)		
Belo Horizonte-MG	103	31	3(2,9)	1(1,0)	1(3,2)**	1(1,0)
Carapicuíba-SP	99	25	3(3,0)	-	-	-
Recife-PE	120	40	5(4,2)	2(1,7)	-	-
Inspecionados	322	96	11(3,4)	3(0,9)	1(0,3)	1(0,3)
Guarapuava-PR	68	28	18(26,5)	11(16,1)	11(39,3)**	11(16,2%)**
Viçosa-MG	56	7	1(1,8)	-	-	-
Terenos-MS	23	8	3(13,0)	-	-	-
Apodi-RN	159	56	28(17,6)	11(6,9)	14(25,0)***	14(8,8)***
Não Inspecionados	306	99	50(16,3)	22(7,2)	25(8,2)	25(8,2)
Total	628	195*	61(9,7)	25(4,0)	26(4,1)	26(4,1)

n = amostragem do ELISA.

n₁ = amostragem do imunoblot.

*Não foram analisados todos os soros, mas os positivos e os suspeitos a partir do ELISA, conforme constam as tabelas 32 a 38.

**Corresponde aos soros positivos reconhecidos por ponto de corte com 3sd no ELISA.

***Corresponde a 8 soros positivos reconhecidos por ponto de corte com 3sd e 6 soros positivos apenas com 2sd e classifica três soros positivos a 3sd como negativos.

A frequência da cisticercose é bem superior em suínos não inspecionados que nos inspecionados, seja empregando o teste ELISA, com 2sd ou 3sd, seja o imunoblot, atingindo os valores de reatividade imunológica de 8,2% e 0,3%, respectivamente.

Considerando os critérios de definição do ponto de corte, 2sd ou 3sd, observou-se acentuada elevação da frequência da cisticercose do segundo para o primeiro. Ao comparar tais resultados com as frequências apontadas pelos do imunoblot verifica-se maior aproximação do critério de 3sd.

TABELA 13. Avaliação do teste ELISA na fase de inquérito adotando o imunoblot como prova padrão.

Valores	ELISA/ Desvios-padrão	
	2sd	3sd
Sensibilidade(%)	100,0	76,9
Especificidade(%)	79,2	97,0
Valor Preditivo +(%)	42,6	80,0
Valor Preditivo –(%)	100,0	96,5
Concordância Observada	0,82	0,94
Concordância Esperada	0,64	0,77
Coefficiente de Correlação Intragrupal (K)	0,50	0,74

Os valores da tabela 13 indicam que o teste ELISA com 2sd funciona bem para separar as amostras possivelmente positivas, porém previne que 17,9% destas sejam falso-positivas. Ocorre uma inversão desta característica do teste quando se emprega 3sd, ou seja, a ocorrência de soros falso-positivos cai para 2,6%, mas os falso-negativos passam a ocorrer (3,1%).

Foi possível analisar o desempenho do teste ELISA duas vezes, nas fases de padronização e de inquérito, considerando o antígeno LV, sendo que as provas padrões adotadas variaram entre exame *post-mortem* e imunoblot, respectivamente (Tabela 14).

TABELA 14. Comparação da análise do teste ELISA nas fases de padronização (Pad) e de inquérito (Inq).

Valores	Desvios-padrão/Pad(n=143)/Inq(n=628)			
	2sd		3sd	
	Pad	Inq	Pad	Inq
Sensibilidade(%)	96	100,0	80	76,9
Especificidade(%)	97,5	79,2	100	97,0
Valor Preditivo +(%)	89	42,6	100	80,0
Valor Preditivo –(%)	96,5	100,0	96	96,5
Concordância Observada	0,97	0,82	0,96	0,94
Concordância Esperada	0,70	0,64	0,73	0,77
Coefficiente de Correlação Intragrupal (K)	0,90	0,50	0,85	0,74

Houve queda acentuada das taxas de especificidade, valor preditivo positivo e coeficiente de correlação intragrupal na fase de inquérito utilizando-se 2sd como ponto de corte, as taxas mostraram pouca variação nas outras condições analisadas.

5.5. Determinação da frequência de cisticercose suína e dos seus riscos.

A frequência de soros com reação imunológica à cisticercose suína foi determinada pelos resultados do teste ELISA complementados pelos do imunoblot na fase de inquérito.

Conforme tabela 12, o número de soros suínos positivos à cisticercose entre os animais não inspecionados foi bem superior, 25 (8,2%), em comparação ao dos inspecionados 1 (0,3%).

Duas comunidades se destacaram quanto à positividade de cisticercose suína: Guarapuava-PR (11-16,2%) e Apodi-RN (14-8,8%).

TABELA 15. Cálculo dos riscos de ocorrência de cisticercose suína e sua significância entre amostras inspecionadas e não inspecionadas

Tipo de Amostras	N	Positivas	Negativas	Frequência	Odds Ratio	IC 95%	P Fisher
Inspecionadas	322	1	321	0,3%	1,0		
Não Inspecionadas	306	25	281	8,2%	28,5	(3,84-212,3)*	0,0001*

*Estatisticamente significativo

Conforme tabela 15, existe uma probabilidade 28,5 vezes maior (Odds Ratio) de ocorrer cisticercose suína em situações clandestinas do que em situações inspecionadas, sendo esta variação estatisticamente significativa.

6. DISCUSSÃO

A alta frequência de cisticercose suína e de cisticercose e teníase humanas em determinados países, além da gravidade do seu quadro patológico, principalmente da forma cerebral no homem, justificam a aplicação de métodos eficientes de diagnóstico, como o ELISA e o imunoblot, visando alcançar medidas eficazes de controle da doença, tanto no âmbito da Saúde Pública, quanto no da saúde animal.

6.1. Antígenos

O elevado rendimento protéico dos antígenos de larvas de *Taenia crassiceps*, bem como sua diversidade em peptídeos, aliados ao seu desempenho nos testes ELISA e imunoblot, revelados neste trabalho, credenciam-no como substituto dos antígenos de larvas de *Taenia solium* nos testes imunológicos para diagnóstico da cisticercose suína.

Além das características mencionadas, favoráveis à utilização do antígeno de larvas de *Taenia crassiceps*, têm-se algumas outras vantagens, destacando-se a referente à isenção de proteínas musculares dos suínos, inevitáveis em partidas de antígenos de larvas de *Taenia solium*, sobretudo do total (CT), responsáveis pela promoção de reações imunológicas inespecíficas. Essa interferência pode explicar a menor amplitude da diferença de D.O. entre amostras negativas e positiva fraca quando se utilizou o antígeno CT, em comparação com o de escólex (E), nas fases iniciais da padronização do teste ELISA (Figuras 5 e 7), sendo portanto o antígeno de escólex mais específico que o total, concordando com NASCIMENTO & ARAÚJO (1982a).

Ainda presume-se que o emprego de larvas de *Taenia crassiceps* possa eliminar as dificuldades encontradas na localização de fontes de parasitas de *Taenia solium* (Mc MANUS et al, 1991; VAZ, 1993), além de evitar a heterogeneidade antigênica,

decorrentes dos diferentes lotes de cisticercos de *Taenia solium* e das diferentes partidas laboratoriais de antígenos (LARRALDE et al, 1990; Mc MANUS et al, 1991).

O emprego de larvas de *Taenia crassiceps*, ainda privilegiarão pesquisas que requerem grande quantidade de antígenos, sobretudo as de purificação, relevantes no aprimoramento dos testes imunológicos para diagnóstico da cisticercose, bem como as de padronização de testes para aplicação em vigilância epidemiológica da cisticercose (LARRALDE et al, 1990).

A intensa e ampla reatividade cruzada entre os peptídeos componentes dos extratos antigênicos de larvas de *Taenia crassiceps* e de larvas de *Taenia solium*, já confirmada em testes sorológicos de pessoas com cisticercose (VAZ, 1993), bem como a imunidade cruzada já observada em camundongos (SCIUTTO et. al, 1990), também fortalecem a opção pelos primeiros diante das considerações favoráveis anteriormente discutidas.

A corrida eletroforética do antígeno LV (Figura 2) mostrou um número expressivamente inferior de peptídeos em relação àquele encontrado em outras oportunidades (dados não apresentados), isto pode indicar subestimação do número real. Neste caso deve ter ocorrido aplicação de quantidade insuficiente de antígeno dificultando o aparecimento de alguns peptídeos, que apenas esboçaram sinais de sua presença ou deve ter havido desnaturação parcial do antígeno, o qual se revelou como o menos estável entre os antígenos avaliados durante o trabalho.

6.2. Fracionamento de antígenos

O processo de fracionamento, tanto dos antígenos de larvas de *Taenia solium* como de larvas de *Taenia crassiceps* é complexo e tem requerido diversos testes de ajuste. Isto deve-se ao fato da dispersa informação científica sobre a recomendação do sistema mais adequado de

fracionamento desse material, com vistas à aplicação no teste ELISA para diagnóstico da cisticercose suína.

A escassez de material antigênico, sobretudo das frações potencialmente mais interessantes para diferenciação de soros positivos dos negativos, F₃ e F₄, limitou seu estudo, que deveria ter sido estendido para outros testes, em especial com todos os soros controles; F₄ chegou a se esgotar durante os testes iniciais.

A quarta fração não evidenciou peptídeos em SDS-PAGE no ensaio realizado (Figura 3), provavelmente devido à insuficiente quantidade de antígeno aplicado, uma vez que esta fração sinalizou a presença de um conjunto de peptídeos específicos para cisticercose no teste ELISA em razão da diferenciação mostrada entre soros controles positivo e negativos. A condição desnaturante do SDS-PAGE sobre os peptídeos de F₄ pode ter sido outra causa da ausência de peptídeos. GERSHONI & PALADE (1983) e TSANG et al (1983) alertam para a possibilidade de alguns sítios antigênicos perderem sua integridade conformacional, além de comprometer sua reatividade com anticorpos após tratamento com SDS.

Considerando a utilização de soros-problema, a sensibilidade de F₃ foi relativamente alta até mesmo em 3sd (F₄ não testado), vislumbrando o investimento de frações antigênicas no aprimoramento do teste ELISA.

A composição de F₃ caracterizou-se por peptídeos de baixo PM, como a segunda fração de larvas de *Taenia solium* obtida em Sephadex G-200, por KAUR et al (1995) e ambas as frações confirmaram boa capacidade de detectar anticorpos para cisticercose suína pelo teste ELISA.

O emprego do Sephadex G-50 como resina responsável pelo fracionamento do antígeno LT nesta pesquisa, bem como o tipo de antígeno (Tcra) constituíram novidade em relação aos registros bibliográficos, inviabilizando a comparação dos resultados obtidos com os de outras pesquisas, particularmente com respeito ao desempenho das frações no teste

ELISA para diagnóstico da cisticercose suína. O grau de porosidade da resina foi escolhido como G-50, diferente da maioria mostrada na literatura (G-100 ou G-200), pela expectativa de obter frações com peptídeo de pesos moleculares abaixo de 50.000 no volume de inclusão, considerando que os antígenos de baixo peso molecular parecem ser mais discriminadores entre soros suínos positivos e negativos à cisticercose em testes imunológicos.

Como o imunoblot resolveu a questão da especificidade do ELISA, a aplicação do fracionamento, que vem sendo recomendada pela literatura (KUMAR & GAUR, 1987; CHENG & KO, 1992; KAUR et al, 1995), perdeu sua finalidade nesta pesquisa, sendo inviabilizada em substituição aos antígenos íntegros, também pelo seu baixo rendimento e necessidade de melhor padronização e avaliação deste método. Apenas 20% do antígeno aplicado com vistas ao fracionamento se transformaram em F₃ e F₄. PRIEGO et al (1977) se referem a uma perda aproximada de 40 vezes para a terceira fração, no fracionamento de larvas de *Taenia solium* em Sephadex G-200.

Na padronização dos métodos de fracionamento de antígenos pela cromatografia de filtração em gel, com o propósito de uniformizar a obtenção das frações, devem ser controlados entre outros parâmetros, o tipo de resina, o tamanho da coluna, o volume e a concentração da amostra, a taxa de fluxo, os volumes de exclusão e de inclusão eluídos da coluna e o critério de separação das frações eluídas de acordo com os picos obtidos. Todo este controle visa, finalmente, a caracterização dos peptídeos componentes das frações e a determinação do seu desempenho, principalmente quanto à especificidade, em testes imunológicos, sobretudo no ELISA, dadas suas vantagens de aplicação, em particular em grandes amostragens.

A tecnologia do DNA recombinante (MANOUTCHARIAN et al, 1996) e a síntese de peptídeos (GEVORKIAN et al, 1996) ainda não alcançaram posição de destaque na

purificação de antígenos para aplicação no diagnóstico da cisticercose, embora algumas perspectivas positivas estejam sendo sinalizadas.

6.3. Padronização do teste ELISA

Na fase inicial da padronização do teste ELISA foram consideradas as leituras de D.O. de soros controles negativos e positivo fraco e fixado o critério de diferenciação destes, conforme item 4.4.2.

Observa-se na figura 4, nítida melhoria no desempenho do teste à medida que a diluição de soro e a concentração do antígeno LV aumentam e a diluição do conjugado se reduz, tendo sido por isso sendo escolhido como melhor o bloco 2 μ g/ml para antígeno, 1/400 soro e 1/1.000 conjugado, revelando inclusive a maior amplitude da diferença de D.O. entre soros negativos e positivo fraco (89,2%).

Para o antígeno E (Figura 5), houve certo nivelamento entre os diferentes blocos estudados. Embora 5 μ g/ml - 1/100 - 1/1.000 tenha sido o bloco de maior amplitude, sua alta D.O. e o alto nível de reações inespecíficas, justificam sua substituição por uma condição de menor D.O. sem maiores alterações em relação ao valor da amplitude, ou seja, 5 μ g/ml - 1/100 - 1/20.000.

Também não ocorreram destacados contrastes entre a maioria dos blocos analisados em LT e em CT, nem nítidas tendências de elevação da amplitude à medida que se variavam as quantidades dos reagentes em teste, como ocorrera com o antígeno LV, exceto uma relativa tendência de melhoria no desempenho para o conjugado 1/20.000.

Para ambos os casos foi escolhido o mesmo bloco selecionado para o antígeno E, por se situar entre os de maior amplitude e pela semelhança entre os três antígenos no SDS-PAGE, principalmente quanto ao número de peptídeos revelados (Tabela 2).

Os valores da amplitude da diferença entre soros negativos e positivo fraco não ultrapassou a 25,5% para os antígenos E, LT e CT, ultrapassando frequentemente este valor nos ensaios com o antígeno LV, chegando até 89,2% (Tabelas 16 a 19).

O teste da comparação simultânea dos quatro antígenos (Figura 8, Tabela 20) confirmou o melhor desempenho do antígeno LV na fase inicial da padronização.

Tendo em vista a variação do desempenho do teste ELISA à medida que se variaram as quantidades de reagentes utilizados, sobretudo antígeno, soro e conjugado, o recurso da titulação em bloco torna-se imprescindível em pesquisas de padronização do teste ELISA, como preconizam MONTENEGRO et al (1994).

As concentrações ótimas de antígenos empregadas variaram entre 2µg/ml (LV) e 5µg/ml (E, LT, CT), pouco inferior aos valores apresentados por outros autores (CHENG & KO, 1992; BIONDI, 1994; PATHAK et al, 1994), entre 10 e 11,5µg/ml.

As diluições ótimas de soro também variaram com o tipo de antígeno 1/400 (LV) e 1/100 (E, LT, CT), posicionando-se distantes dos resultados de CHENG & KO (1992), 1/1.000 (CT) e de BIONDI (1994), 1/800 (LT), mas coincidindo com os de PATHAK et al (1994), 1/100 (CT).

A diluição 1/50 do soro não permitiu a distinção entre soros positivo e negativos em razão da alta sensibilidade do teste imunoenzimático, que também amplifica reações inespecíficas.

Quanto ao conjugado, as diluições ótimas foram 1/1.000 (LV) e 1/20.000 (E, LT, CT), superiores às de CHENG & KO (1992), 1/10.000 (CT) e de BIONDI (1994), 1/2.000 (LT). PATHAK et al (1994) utilizaram outro tipo de conjugado, o de fragmento Fc de IgG com fosfatase.

A comparação de leite a 5%, BSA a 1% e gelatina a 1% como solução bloqueadora dos sítios reativos remanescentes das placas (Figura 13) mostrou larga vantagem para o

primeiro, contribuindo para maior destaque das reações específicas em detrimento das inespecíficas, concordando com VENKATESAN & WAKELIN (1993).

A presença do Tween-20 em soluções diluidoras de soro e de conjugado e em solução bloqueadora (leite 5%) no teste ELISA foi decisiva na ampliação da diferença entre D.O. de soros positivo e negativos (Figura 13), confirmando seu efeito sobre a minimização de reações inespecíficas em conjunto com leite desnatado a 5%, conforme destacam PERALTA & FRIAS (1987) e VENKATESAN & WAKELIN (1993).

Quanto aos períodos de incubação de antígenos, soros, conjugado e substrato, considerando o antígeno LV, não houve diferenciação nítida entre os analisados (Figuras 9 a 12), sendo fixados 5 minutos para substrato, 30 minutos para soro e conjugado e 12 horas a 4°C para antígeno, visando principalmente obter D.O. mais baixa, pelos motivos já expostos.

Como o propósito dos testes iniciais da padronização era apenas detectar uma tendência de melhor tipo de antígeno e de melhores condições experimentais da técnica básica do teste ELISA, utilizou-se a princípio um baixo número de amostra (uma positiva e quatro negativas) e procederam-se ensaios posteriores com todos os soros controles disponíveis, visando consolidar um teste ELISA de desempenho melhor definido e recomendável para o diagnóstico da cisticercose suína.

As taxas de sensibilidade e de especificidade para os quatro antígenos testados frente a todos os soros controles foram altas, mas os dois antígenos de larvas de *Taenia crassiceps* revelaram maiores valores de sensibilidade que os dois antígenos de larvas de *Taenia solium* (Tabela 5). O antígeno LT obteve melhor desempenho, embora fosse superado pelo LV na especificidade(100%) e valor preditivo positivo, quando o ponto de corte escolhido utilizou 3sd, indicando que o LV assegura maior confiança nos resultados das amostras positivas nessa circunstância, além de não evidenciar a ocorrência de reações falso-positivas.

À medida que se elevou o desvio-padrão de 2sd para 3sd na determinação do ponto de corte, a sensibilidade se reduziu para os quatro antígenos. Com pouca influência no antígeno LT, também ocorreu nos três outros, relativa manutenção do valor preditivo negativo e elevações da especificidade e do valor preditivo positivo (expressiva), quando o desvio-padrão foi aumentado de 2sd para 3sd. O coeficiente de correlação intragrupal foi maior em 2sd para os quatro antígenos.

Portanto empregando-se 2sd vislumbra-se um teste ELISA para diagnóstico da cisticercose suína com maior poder de detecção de amostras verdadeiramente positivas, mas com maior probabilidade de acusar reações inespecíficas e cruzadas (falso-positivas). Por outro lado 3sd reduziu o aparecimento de reações falso-positivas, mas aumentou a ocorrência das falso-negativas.

Todas as amostras falso-negativas em LV (5) também se confirmaram nessa condição quando testadas frente aos outros antígenos. As reações cruzadas e as inespecíficas (falso-positivas) desapareceram em 3sd quando se empregou LV e permaneceram com o LT.

Portanto justifica-se a escolha do antígeno LV para o teste ELISA da fase de inquérito desta pesquisa, considerando ainda o seu melhor desempenho atingido nas fases iniciais da padronização (Figuras 4 a 8).

Ressalta-se que ainda não se obtiveram registros do emprego do antígeno LV com objetivo de diagnóstico da cisticercose suína e que o outro antígeno de larvas de *Taenia crassiceps*, estudado no presente trabalho (LT), vem sendo estudado, nos últimos anos, com o mesmo propósito (BIONDI, 1994).

Os testes de reprodutibilidade do antígeno LV no ELISA limitaram-se à fase inicial da padronização (Figura 14), não se estendendo a todos os soros controles, devido ao esgotamento de alguns desses soros e da mesma partida do antígeno no final da pesquisa.

Considerando o emprego inédito do antígeno LV no diagnóstico da cisticercose suína pelo teste ELISA e os resultados pouco conclusivos dos testes de reprodutibilidade, necessitam-se de pesquisas adicionais no sentido de validar o teste para emprego na rotina de diagnóstico nas condições padronizadas à princípio, embora a condições experimentais e o desempenho do teste ELISA estabelecidos por outros autores não variem substancialmente em relação a esta pesquisa.

A padronização do teste ELISA com o emprego de soros controle e de concentrações ótimas dos reagentes, bem como modificações dos procedimentos analíticos da técnica tradicionalmente empregada para o diagnóstico da cisticercose humana, adotados neste trabalho, parece ter aumentado a eficiência deste teste no diagnóstico da cisticercose suína, quando comparado com algumas taxas menos favoráveis alcançadas por outros autores (GONZALEZ et al, 1990; PATHAK et al, 1994).

Neste trabalho as taxas de sensibilidade para o antígeno LV variaram, respectivamente, entre as fases de padronização e de inquérito de 96,0% a 100,0%, para o ponto de corte com 2sd e de 80,0% a 76,9% para 3 sd e as de especificidade variaram de 97,5% a 79,3 % para 2sd e de 100,0% a 97,0% para 3sd (Tabela 14).

KUMAR & GAUR (1987), PÉREZ & CÁCERES DE MASELLI (1991) e CASTILLO et al (1991) também encontraram altas taxas de desempenho do testes ELISA para o diagnóstico da cisticercose suína, sensibilidades e especificidades variando de 90 a 100%. Em contrapartida, GONZALEZ et al. (1990) e PATHAK et al. (1994), revelaram taxas inferiores de sensibilidade, 79,2% e 70%, respectivamente. PATHAK et al (1994) também evidenciaram alta taxa de especificidade (93,4%), mas a determinada por GONZALEZ et al. (1990) foi de apenas 76,2%.

Considerando o imunoblot como o melhor teste para diagnóstico da cisticercose suína disponível no momento, pode-se concluir em relação ao ELISA, que na fase de inquérito

ocorreram neste teste (2sd), 17,9% de amostras falso-positivas e nenhuma falso-negativa, enquanto no 3sd apenas 2,6% de amostras falso-positivas e 3,1% de falso-negativas.

Com relação ao teste ELISA isoladamente, a decisão de utilizar 2sd ou 3sd como ponto de corte dependerá do interesse da pesquisa ou da finalidade do teste: evitar os falso-positivos (3sd) ou os falso-negativos (2sd).

Ponderando o emprego de diferentes provas padrões para a análise dupla do teste ELISA nas fases de padronização (exame *post-mortem*) e de inquérito (imunoblot), observaram-se acentuadas quedas das taxas de especificidade, valor preditivo positivo (VP+) e coeficiente de correlação intragrupal (K) na fase de inquérito, quando se utilizou 2sd como ponto de corte. As taxas mostraram pouca variação nas outras três condições analisadas; o critério de ponto de corte com 3sd foi mais vantajoso, sobretudo na fase de inquérito (Tabela 14).

Via de regra, o critério de 3sd (maior especificidade), quando pretendida em levantamentos epidemiológicos (inquérito), confere melhor desempenho para fins de diagnóstico, enquanto que 2sd (maior sensibilidade) atua melhor quando o propósito é triagem. O critério 3sd permite uma abrangência de 97,5% da população, ou seja apenas 2,5% dos eventos ocorreriam ao acaso e o critério de 2sd atinge 95% da população, com uma margem de erro de 5%. A condição mais rigorosa imposta pelo critério de 3sd, com uma margem de erro menor, requer uma amostragem maior, o que constitui uma desvantagem de sua aplicação em fases de triagem de levantamentos epidemiológicos, quando comparado com 2sd.

Embora proporcione menor sensibilidade, a opção pelo critério de 3sd, para o teste ELISA como única alternativa diagnóstica, se justifica, pois a maioria das amostras falso-negativas detectadas na fase de inquérito, geralmente com D.O. entre os pontos de corte envolvendo 2 e 3sd, foram confirmadas como negativas pelo imunoblot; considerando ainda

que as outras taxas de desempenho obtidas foram superiores em 3sd, principalmente para especificidade, VP+ e K (Tabela 13). GUO et al (1994) e PATHAK et al (1994) utilizaram 3sd como critério para fixar o ponto de corte no diagnóstico da cisticercose suína pelo teste ELISA.

Assim depreende-se que a maioria das amostras duvidosas se encontram entre 2sd e 3sd; o que sugere o emprego do imunoblot com a finalidade de confirmação de resultados do teste ELISA nas amostras com leitura superior ao ponto de corte com 2sd, principalmente entre 2sd e 3sd, como foi efetuado nesta pesquisa.

6.4. Padronização do imunoblot

A propriedade do imunoblot em segmentar o antígeno em peptídeos distinguindo os específicos dos inespecíficos, permite o descarte das reações inespecíficas, o que não ocorre em testes como o ELISA, por exemplo (DIAZ et al, 1992b). Por isso o imunoblot constitui uma promessa de um teste eficiente para o diagnóstico da cisticercose suína, tornando possível elevar a especificidade sem comprometer a sensibilidade, mantendo-a alta, o que dificilmente ocorre com os outros testes imunológicos.

Para estabelecer o critério que definia a especificidade de cada peptídeo reativo na padronização do imunoblot foram consideradas duas categorias de peptídeos:

- 1-Peptídeo absolutamente específico: aquele que reagiu com soros controles positivos e não reagiu com os negativos ou com os responsáveis por reação cruzada (100% de especificidade).
- 2-Peptídeo relativamente específico: aquele que reagiu com mais de 50% dos soros controles positivos e com menos de 10% dos negativos ou 10% dos procedentes de suínos portadores

de outras patologias, ou seja acima de 50% de sensibilidade e acima de 90% de especificidade.

Os peptídeos mencionados no item 2 tiveram um perfil de reatividade semelhante aos do item 1, sendo mais discriminadores que os outros, conforme demonstram os valores preditivos e de especificidade (acima de 70%), mais elevados que os dos outros (Tabela 11).

O grupo de peptídeos relacionados como específicos nesta pesquisa, apresentou uma alta taxa de especificidade média (98%), tornando o imunoblot um teste altamente específico, considerando o critério de seleção dos peptídeos específicos estabelecido. A sensibilidade média foi bem inferior (41,9%).

O baixo valor da sensibilidade média dos peptídeos específicos em conjunto (Tabela 11) parece ter sido influenciado por deficiências no processo de transferência de alguns deles para a matriz de nitrocelulose, o que inviabilizou algumas reações com os anticorpos dos soros controles positivos ou tornou outras fracas o bastante para dificultar sua revelação pela solução cromógena. Este efeito também pode ter sido ocasionado pela variação da resposta imune que ocorre de indivíduo para indivíduo, já que o lote dos suínos controles positivos é bastante heterogêneo (TSANG et al, 1991).

Pela sua faixa de PM alguns peptídeos que apresentaram baixa sensibilidade se assemelham a três peptídeos de PM acima de 13kD, que revelaram peptídeos fracos, mas reagiram com a maioria dos pacientes com cisticercose, segundo TSANG et al. (1989).

Foram consideradas positivas as amostras que reagiram com dois ou mais peptídeos definidos como específicos pelos dois critérios anteriormente estabelecidos na presente pesquisa, principalmente quando houve reações simultâneas com os peptídeos I(68-72kD) e Y(15-16kD).

Os peptídeos I e Y reagiram simultaneamente com 76,9% dos soros controles positivos (sensibilidade), não ocorrendo reação simultânea de ambos com nenhum soro controle negativo ou causador de reação cruzada (100% de especificidade).

Alguns soros controles positivos (30,8%) reagiram apenas com dois peptídeos específicos (Tabela 44 - Apêndice).

Apenas um soro controle negativo (3,3%) e um soro de suíno portador de outra patologia (2,9%) reagiram com dois peptídeos específicos, os demais com apenas um, ou principalmente, nenhum peptídeo específico (Tabelas 45 a 48 - Apêndice).

Salienta-se que a média de ocorrência de peptídeos específicos por soro foi de 0,1 para os negativos, 0,2 para os de suínos com outras patologias e 3,4 para os positivos; mostrando, portanto, que o critério de positividade para 2,0 peptídeos por soro pode ser altamente rigoroso para a discriminação de suínos com cisticercose daqueles sadios ou portadores de outras patologias, prevendo uma alta especificidade.

Todos os suínos experimentalmente infectados com ovos de *Taenia solium* por TSANG et al (1991) produziram anticorpos para mais de uma das glicoproteínas específicas, no imunoblot.

A maioria das amostras de pacientes com cisticercose foram reconhecidas por mais de uma das peptídeos específicos, sendo que 63,4% reconheceram pelo menos seis peptídeos (TSANG et al, 1989).

A definição dos peptídeos, I(68-72kD), O(36-39kD), S(23-25kD), T(22kD), U(21kD), V(19-20kD), X(17-18kD), Y(15-16kD) e Z(14kD), como específicos, obteve respaldo em outras pesquisas, principalmente para os de baixo PM, tanto para detecção de anticorpos contra a cisticercose humana quanto suína.

Outros autores consideraram importantes no diagnóstico da cisticercose humana os peptídeos: 26 e 8kD (GOTTSTEIN et al, 1986); 65, 45, 30, 24, 20 e 18kD

(KAUR et al, 1996); 105, 95, 70, 48 e 13kD (NASCIMENTO et al., 1995); 92-98, 52-56, 68-72kD (VAZ, 1993); 50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13kD (TSANG et al, 1989; DIAZ et al, 1992b; MONTENEGRO et al, 1994).

KAUR et al (1995) encontraram os peptídeos 65, 45, 30, 24, 20 e 18, kD, integrantes da segunda fração do antígeno de larvas de *Taenia solium* em Sephadex G-200, com capacidade de detectar a produção de anticorpos em teste ELISA de amostras de suínos inoculados com ovos de *Taenia solium*, a partir do 25º dia após a inoculação.

ALUJA et al. (1996) verificaram que as glicoproteínas de 18, 14 e 13kD foram reconhecidas mais frequentemente em infecções suínas recentes até 92 dias, ao passo que as de 42, 50 e 24 kD em infecções mais prolongadas, cerca de 200 dias.

EVANS et al. (1997) detectaram o aparecimento de novos anticorpos correspondentes aos peptídeos, 24, 19 e 12-13, kD, em 64% dos animais vacinados e apenas em 7% dos não vacinados.

Predominou na fase inicial da cisticercose suína, uma a duas semanas, desaparecendo entre seis a nove semanas após, a imunoglobulina (Ig) M correspondendo à glicoproteína 97kD. Por outro lado, IgG apareceu a partir da terceira semana contra as glicoproteínas 42 e 50 kD e as de baixo PM (24, 21, 18, 14 e 13kD), persistindo até o final da pesquisa, 15 semanas (TSANG et al, 1991).

A eficiência de alguns blots quanto à detecção de peptídeos de mesma amostra (repetições) variou quando as transferências se realizaram em diferentes momentos. Esta variação provavelmente se relacionou ao potencial de reatividade do antígeno adsorvido na membrana de nitrocelulose, pela quantidade de antígeno transferida, que varia em diferentes partidas de separação eletroforética e transferência, e pela desnaturação parcial de alguns peptídeos em diferentes momentos, por ação do SDS (GERSHONE & PALADE, 1983; TSANG et al, 1983; TSANG et al, 1989).

O desempenho do imunoblot na fase de padronização traduziu-se por uma especificidade de 96,7% e sensibilidade de 100,0%. Não foi possível determinar as taxas de desempenho do imunoblot na fase de inquérito, pois a condição sanitária dos suínos era desconhecida nesta fase.

TSANG et al (1991) obtiveram máximas taxas (100%) de sensibilidade e de especificidade para o imunoblot na pesquisa de cisticercose suína, utilizando glicoproteínas purificadas (TSANG et al, 1989).

A definição dos critérios da seleção do grupo de peptídeos específicos e do número destes que significarão positividade pode variar de acordo com o interesse da pesquisa, tornando o teste mais sensível e menos específico ou o contrário.

GONZALEZ et al (1990) verificaram maior eficiência do imunoblot em comparação ao exame *post-mortem* no diagnóstico da cisticercose suína em área endêmica indicando a ocorrência de casos de suínos com anticorpos, mas sem cisticercos. Este achado reforça três hipóteses defendidas na imunopatologia da cisticercose, quais sejam: persistência de anticorpos no soro após a destruição de cisticercos (ALUJA et al, 1996; EVANS et al, 1997; PALAPA et.al., 1997); reinfecção em estágio inicial da doença (GONZALEZ et al, 1994; ALUJA et al, 1996; EVANS et al, 1997); e, presença de formas pós-oncosferas em suínos imunocompetentes (RODRIGUEZ et al, 1995).

Os anticorpos contra larvas de *Taenia solium* geralmente aparecem em suínos na primeira semana de infecção, a IgM e a partir da terceira, a IgG (HAYUNGA et al, 1991; TSANG et al, 1991; KAUR et al, 1995; ALUJA et al, 1996). Como os cisticercos requerem um período aproximado de dois meses para se estabelecerem no hospedeiro (FLISSER et al, 1991), a resposta imunológica surge antes da sua manifestação anátomo-patológica. Neste particular faz-se necessário esclarecer a participação das formas pós-oncosferas eventualmente

presentes na carne suína, na transmissão da cisticercose ao homem, para redefinir a dimensão do problema e os seus reflexos sobre a Saúde Pública.

Por outro lado a deficiência na resposta imunológica ocorre principalmente em casos de cisticercose cerebral (PATHAK et al, 1994). No cérebro predominam as formas vesiculares sobre as degeneradas (ALUJA et al, 1996; PALAPA et. al, 1997), devido à fraca resposta imunológica constatada neste local (EVANS et al, 1997).

Entre as cinco amostras falso-negativas no ELISA, a única (soro 394) comprovada como positiva ao exame *post-mortem* (quatro ao imunoblot) apresentava lesões discretas com localização predominantemente cerebral, concordando com PATHAK et al (1994), sobre a deficiente resposta imunológica em casos dessa natureza. O referido soro também revelou fraca reação no imunoblot. Ao contrário os soros provenientes de suínos com infecção intensa (191 e 192) mostraram fortes reações tanto no ELISA quanto no imunoblot.

A pequena intensidade da resposta imunológica em infecções de baixo número de cisticercos (HERBERT & OBERG, 1974), pode ser outra explicação para a ocorrência de resultados falso-negativos, além da localização dos cisticercos, nas fases de padronização e de inquérito.

Sem comprometer o desempenho dos testes imunológicos empregados, a hidatidose e a ascaridiose foram duas doenças que revelaram anticorpos com potencial capacidade de reagir com os antígenos utilizados. Pelo contrário, macracantorrincose e pneumonia provocada por *Hemophilus sp* ou *Mycoplasma sp* não mostraram reação cruzada com cisticercose. Os suínos com pneumonia revelaram D.O. mais baixa ao ELISA, provavelmente em função da idade mais baixa desse grupo em relação aos demais testados.

Quatro peptídeos antigênicos de baixo PM (23, 16, 11 e 8kD) foram reconhecidas por 90% dos soros suínos positivos ao EITB, sem acusar reação cruzada com hidatidose ou triquinose (PATHAK et al, 1994).

Utilizando glicoproteínas purificadas de baixo PM no imunoblot, TSANG et al (1991) também não encontraram reações inespecíficas entre os soros controles negativos, nem reações cruzadas com ascaridiose, hidatidose, fasciolose, triquinelose ou tricuriase.

MONTENEGRO et al (1994) verificaram reações cruzadas para peptídeos de baixo PM provenientes de antígeno total de larvas de *Taenia solium* em soros de pessoas com hidatidose, mas estas reações desapareceram quando se empregaram glicoproteínas purificadas de baixo PM obtidas de mesmo antígeno total.

6.5. Aplicação dos testes ELISA e imunoblot padronizados no diagnóstico da cisticercose em suínos inspecionados e não inspecionados

Pelas altas taxas de desempenho indicadas pela bibliografia e neste trabalho e pelo distinto perfil de reatividade das amostras positivas e negativas ou associadas a outras patologias evidenciado neste estudo pelo imunoblot, este teste pode ser considerado melhor para fins de diagnóstico que o ELISA, pois reduz a probabilidade de encontrar resultados falso-positivos (alta especificidade) e falso-negativos (alta sensibilidade). Entretanto o teste ELISA (2sd) é mais recomendável para triagem por ser capaz de detectar até mesmo indícios de positividade, alta sensibilidade (nesta pesquisa). A menor especificidade que o imunoblot pode ser compensada pelo menor custo e maior simplicidade de execução, principalmente quando se trata de grande número de amostras a analisar (DIAZ et al, 1992b).

A conclusão sobre a presença ou ausência de cisticercose suína nas amostras da fase de inquérito baseou-se num primeiro momento nos resultados do teste ELISA (2sd), determinando a ausência da doença nas amostras com D.O. abaixo do ponto de corte, e confirmando os resultados positivos e esclarecendo os suspeitos ao ELISA (2 e 3sd) com

valores de D.O. situados no ponto de corte (2sd) ou acima deste, através do imunoblot. Ainda se adotou o imunoblot para confirmar amostras negativas ao ELISA (2sd) que se aproximavam do ponto de corte ou que apresentavam grandes oscilações de D.O. nas triplicatas e, ou nas repetições.

A frequência de 8,2% de cisticercose suína, maior que 5%, encontrada nas condições de ausência de inspeção, configura uma situação hiperendêmica, conforme STABENOW et al (1987). Esta alta frequência obtida no momento ajuda a esclarecer um quadro indefinido e preocupante da ocorrência da cisticercose suína em situações de abate clandestino e comercialização dos animais no Brasil, em face das escassas e dispersas taxas disponíveis nestas situações. ARRUDA et al. (1990) determinaram a taxa de cisticercose suína de 20% em duas comunidades rurais do Estado do Paraná, onde são criados suínos em condições de plena liberdade.

Pelo contrário a baixa taxa de cisticercose em suínos destinados a matadouros submetidos à inspeção, de 0,3%, foi estatisticamente diferente daquela obtida em suínos não inspecionados e se encontra dentro da faixa de 0,09 a 2,57% referida por outros autores no Brasil (ALMEIDA, 1973; FIGUEIREDO et al, 1973; TEIXEIRA et al, 1977; CALIL, 1984; STABENOW et al, 1987; PASSOS et al, 1989; VILLA, 1995), em registros de suínos inspecionados nas três últimas décadas.

GONZALEZ et al (1994) também verificaram que os suínos provenientes de áreas endêmicas revelaram maior susceptibilidade à cisticercose em comparação aos suínos normalmente explorados em suinocultura industrial, que demonstraram infecção mais leve e peptídeos reativos mais fracos. Esta diferença foi atribuída a fatores previamente discutidos por TSANG et al (1991), como hábito alimentar distinto, susceptibilidade genética e resposta humoral diferente.

PATHAK et al. (1994) não detectaram resultado falso-positivo no imunoblot (100% de especificidade) para cisticercose suína, entretanto as amostras provenientes de região endêmica acusaram reações mais fortes que as de região não endêmica.

A forte influência do sistema de criação livre dos suínos, particularmente do seu acesso a fezes humanas, na transmissão da cisticercose entre estes animais (HERBERT & OBERG, 1974; PANDEY & MBEMBA, 1976; SARTI-G et al, 1992), também, ficou evidenciada nesta pesquisa, uma vez que as taxas expressivas de ocorrência da doença limitaram-se às situações clandestinas, que conservam tais características.

6.6. Relação dos testes ELISA e imunoblot com a inspeção de carnes e a Saúde Pública.

Pela análise dos riscos (valores de Odds Ratio e significância estatística), concluiu-se que os testes ELISA e imunoblot padronizados permitem a concreta quantificação do impacto sócio-econômico e sanitário da cisticercose suína em circunstâncias em que se utiliza o recurso da inspeção sanitária da carne, probabilidades de ocorrência de 1,0 vez, ou não, probabilidade de 28,5 vezes, diferenciando-as significativamente.

Pelas altas taxas de cisticercose suína obtidas nesta pesquisa e sua aplicabilidade em inquéritos epidemiológicos (BIONDI, 1994), o teste ELISA constitui um valioso instrumento para diagnóstico de doenças transmissíveis dos animais ao homem (zoonoses), contribuindo para o seu mapeamento e aprimorando os dados sanitários da procedência dos animais destinados ao abate e, conseqüentemente ao consumo humano. Os resultados dos testes imunológicos orientarão a equipe de inspeção para o rigor a ser dispensado nos exames clínico e *post-mortem*, geralmente empregados na rotina de inspeção, e na destinação das partes comestíveis oriundas do abate.

Em face da dificuldade de se manter uma rotina de diagnóstico laboratorial nos estabelecimentos de abate, sobretudo nos menores, os testes imunológicos, principalmente o ELISA, poderão ser introduzidos como meio auxiliar de diagnóstico em lotes de animais com suspeita de alguma doença, entre elas a cisticercose, diante de prévio conhecimento da situação sanitária dos plantéis fornecedores de animais para abate, mantendo um controle sanitário integrado em toda a cadeia de produção da carne suína.

A Federação Veterinária Européia vem estimulando a integração entre os setores de inspeção nos matadouros e de defesa sanitária animal no campo pecuário, com subsídios do diagnóstico laboratorial, como alternativa de modernização e aprimoramento do sistema de controle das doenças animais, sobretudo as de interesse da Saúde Pública (DIAS, 1995).

Os testes imunológicos também poderão auxiliar campanhas de controle da cisticercose em localidades ou regiões com manejo higiênico-sanitário deficiente das criações, sem inspeção no abate e sem vigilância sanitária nos canais de comercialização dos produtos suínos, onde o problema se agrava.

Os recursos tecnológicos de aproveitamento condicional da carne de alguns animais portadores de cisticercose, principalmente o congelamento (VERSTER et al, 1976; BRASIL, 1980; FLISSER et al, 1986; STABENOW et al, 1987), também favorecem o controle da doença no âmbito dos matadouros inspecionados, combatendo as perdas econômicas, por condenação desses animais, tão temidas pelos fornecedores de animais para abate e, sobretudo, protegendo a Saúde Pública.

A inspeção de carnes tem sido um tradicional caminho no controle da cisticercose suína em diversos países (BOLIVAR-JIMÉNEZ, 1976; ARROYO, 1989; ARRUDA et al., 1990; GONZALEZ et al, 1990, ONAH & CHIEJINA, 1995), devendo ser um recurso ainda mais útil nesse propósito, se incrementado pelos testes imunológicos.

A facilidade de colheita de amostras de sangue, bem como o princípio imunológico (reação antígeno-anticorpo) do teste ELISA e imunoblot, conduzem estes testes a uma perspectiva de aplicação futura muito vasta no diagnóstico de diversas doenças infectocontagiosas, além da cisticercose, exercendo considerável contribuição à rotina de inspeção de carnes em estabelecimentos de abate.

Diante de uma alternativa prática e possivelmente mais eficiente de diagnóstico de zoonoses no âmbito de matadouros, ficarão favorecidas as ações de Saúde Pública e de sanidade animal, na medida em que os registros dos dados de sua ocorrência serão aprimorados e poderão nortear medidas racionais de controle, em especial nos procedimentos clandestinos.

7. CONCLUSÕES

7.1. ELISA.

Os resultados do teste ELISA, indicando altas taxas de desempenho, sobretudo de sensibilidade e de especificidade credenciam-no como um recurso aplicável ao diagnóstico da cisticercose suína, principalmente em situações de triagem.

Entre as variáveis do teste ELISA exerceram maior influência no seu desempenho as quantidades ótimas de antígeno, soro e conjugado, o emprego de Tween-20 e o tipo de solução bloqueadora dos sítios reativos das placas, destacando-se entre estas o leite a 5%; os períodos de incubação interferiram menos.

As melhores concentrações de antígeno para o teste ELISA foram 2µg/ml para o antígeno vesicular (LV) de larva de *Taenia crassiceps* e de 5µg/ml para os antígenos total de mesmo parasita (LT) e para os de escólex (E) e total (CT) de larva de *Taenia solium*. As melhores diluições de soro foram 1/400 (LV) e 1/100 (LT, E, CT) e de conjugado, 1/1.000 (LV) e 1/20.000 (LT, E, CT).

Os antígenos LV e LT mostraram melhor desempenho no teste ELISA do que o E e o CT, havendo ligeira vantagem do LV sobre o LT; os quatro antígenos evidenciaram altas taxas de sensibilidade e de especificidade, demonstrando serem todos úteis no ELISA para o diagnóstico da cisticercose suína.

O fracionamento do antígeno LT em Sephadex G-50 ocasionou uma perda de 80% de proteínas para as principais frações (terceira e quarta) e não indicou resultados com vantagem compensadora das frações sobre o antígeno total, embora as principais frações, caracterizadas por antígenos de baixo PM, sinalizassem bom desempenho.

As taxas de sensibilidade para o antígeno LV no teste ELISA variaram, respectivamente, entre as fases de padronização e de inquérito, de 96,0 a 100,0%, para o

ponto de corte com 2sd e de 80,0 a 76,9%, para 3 sd e as de especificidade variaram de 97,5 a 79,3 %, para 2sd, e de 100,0 a 97,5%, para 3sd.

Em face de sua interferência no desempenho do teste ELISA, a decisão sobre o emprego de 2sd ou 3sd como critério de ponto de corte dependerá da finalidade da pesquisa, 3sd (maior especificidade) é mais apropriado para fins de diagnóstico e 2sd (maior sensibilidade) para triagem; como única alternativa para diagnóstico ou inquérito da cisticercose suína, recomenda-se a opção de 3sd, que revelou maiores taxas de desempenho em geral.

7.2. Imunoblot.

Mostrando taxas de desempenho ainda superiores às do teste ELISA, o imunoblot representa um excelente teste para o diagnóstico da cisticercose suína, sendo recomendado para confirmação dos resultados do ELISA, dado seu custo mais alto.

As diluições ótimas de soro e conjugado foram 1/100 e 1/1.000, respectivamente.

Os peptídeos que se comportaram como específicos para o diagnóstico da cisticercose suína foram os de PM: 68-72, 36-39, 23-25, 22, 21, 19-20, 17-18, 15-16 e 14kD.

O número médio de peptídeos específicos por soro controle positivo foi de 3,4 e se manteve em 0,1 e 0,2 para os negativos e os de outras patologias, respectivamente.

O teste revelou sensibilidade de 100,0% e especificidade de 96,7%.

A ocorrência de reações cruzadas com outras patologias comuns em suínos nos testes ELISA e imunoblot foi baixa, verificando-se maior frequência nos animais com hidatidose seguido de ascaridiose; soros de suínos com macracantorrincose ou com pneumonia causada por *Hemophilus sp* ou *Mycoplasma sp* não evidenciaram reação cruzada com cisticercose.

7.3. Frequência e riscos de ocorrência da cisticercose em suínos inspecionados e não inspecionados.

No contexto da inspeção de carnes, os testes ELISA e imunoblot poderão ser introduzidos como meio auxiliar de diagnóstico em lotes de animais com suspeita de cisticercose nos matadouros, diante de prévio levantamento da ocorrência da doença, realizado pelos mesmos testes no setor criatório, contribuindo para o delineamento de medidas de controle da cisticercose, integrado em toda a cadeia de produção da carne suína.

A frequência da cisticercose foi de 0,3% para o grupo de suínos inspecionados e de 8,2% para os não inspecionados, gerando uma relação de probabilidade de ocorrência de 1,0 vez para os primeiros contra 28,5 vezes para os clandestinos.

Dada a alta frequência da cisticercose suína em situações não inspecionadas, os testes imunológicos se apresentam como indispensável instrumento em campanhas de controle da doença nos âmbitos clandestinos da exploração suína e da comercialização de sua carne.

Foram estudados os testes ELISA e imunoblot com os propósitos de padronização para o emprego no diagnóstico da cisticercose suína, e posterior aplicação do teste padronizado em inquérito de soros procedentes de suínos inspecionados e não inspecionados. Após confirmação por exame *post-mortem*, foram empregados na padronização de ambos os testes, soros controles positivos e negativos à cisticercose e soros oriundos de suínos portadores de hidatidose, ascaridiose, macracantorrincose e de pneumonia causada por *Hemophilus sp* ou *Mycoplasma sp*, detectando-se reação cruzada somente à hidatidose e à ascaridiose. Os quatro antígenos preparados e testados na fase de padronização constituíram-se de extratos vesicular (LV) e total (LT) de larvas de *Taenia crassiceps* e de escólex (E) e total (CT) de *Taenia solium*. Foram testadas, também as quatro frações de LT obtidas em Sephadex G-50. Todos os antígenos revelaram bom desempenho na diferenciação entre soros positivos e negativos à cisticercose pelo teste ELISA. O antígeno LV foi escolhido para a fase de inquérito, devido às altas taxas de desempenho apresentadas, seguidas das referentes ao LT, suplantando as dos antígenos de larvas de *Taenia solium*. A titulação em bloco das ótimas concentrações de antígenos e diluições de soros e de conjugado, bem como o emprego de Tween-20 e de leite desnatado nas soluções bloqueadora e de lavagem exerceram nítida influência no desempenho do teste ELISA. As taxas de sensibilidade para o antígeno LV no teste ELISA variaram, respectivamente, entre as fases de padronização e de inquérito de 96,0% a 100,0%, para o ponto de corte com 2sd e de 80,0% a 76,9% para 3 sd e as de especificidade variaram de 97,5% a 79,3 % para 2sd e de 100,0% a 97,0% para 3sd. A opção de 3sd mostrou-se mais apropriada em caso de única alternativa do teste ELISA para fins de diagnóstico. Foram considerados peptídeos específicos para o diagnóstico da cisticercose suína no imunoblot os de PM: 68-72, 36-39, 23-25, 22, 21, 19-20, 17-18, 15-16 e 14kD. As diluições ótimas de soro e conjugado para o imunoblot foram 1/100 e 1/1.000, respectivamente. O imunoblot revelou sensibilidade de 100,0% e especificidade de 96,7%. Os testes ELISA e imunoblot se

complementam como excelentes recursos para diagnóstico da cisticercose suína, dada a alta sensibilidade e aplicabilidade do primeiro para situações de triagem e a alta especificidade do segundo para confirmação de resultados positivos do ELISA. A frequência da cisticercose foi de 0,3% para os suínos inspecionados e de 8,2% para os não inspecionados, fornecendo uma probabilidade de ocorrência de 1,0 vez para os primeiros contra 28,5 vezes para os clandestinos, destacando a grave situação da doença nas criações com padrão higiênico-sanitário deficiente e nos canais clandestinos de comercialização dos produtos suínos. Considerando o desempenho e os resultados obtidos nos testes imunológicos para cisticercose suína, ELISA e imunoblot, recomenda-se o seu emprego no diagnóstico de animais suspeitos em matadouros e no levantamento de ocorrência da doença nos segmentos de produção, sobretudo nos clandestinos, dando suporte às medidas de controle da cisticercose, integradas em toda a cadeia de produção da carne suína, exercendo efetiva contribuição à Saúde Pública.

Studies were accomplished in order to standardize both the ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) and the EITB (enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay) for the diagnosis of swine cysticercosis and to apply them in survey cysticercosis to the inspected and non-inspected swine. The standardization of these two tests were carried out using the necropsy parameter and involved cysticercosis positive and negative control sera and heterologous sera of hidatidosis, ascaridiosis, macracantorrhincosis and pneumonia by *Hemophilus sp* or *Mycoplasma sp*. Cross-reactivity was verified only for hidatidosis and ascaridiosis. Four antigens were assayed: vesicular (LV) and crude (LT) *Taenia crassiceps* larvae and scolex (E) and crude (CT) *Taenia solium* larvae. Fractionation of LT in Sephadex G-50 was made and the four fractions resulted were also tested. All antigens showed good performance, but LV was the best. Thus, LV was selected for the survey phase. Checkerboard system for antigen concentration and sera and conjugate dilutions and utilization of Tween-20 and skimmed bovine milk in wash and blocking solutions, promote intense influence in the performance of ELISA. Sensitivity rates of ELISA in standardization and survey phases, were respectively 96,0% and 100,0% in 2sd and 80,0% and 76,9% in 3sd cut-off for the LV antigen and specificity of 97,5% and 79,3% in 2sd and 100,0% and 97,0% in 3sd. As unique alternative, the 3sd criteria revealed the best performance for diagnosis. The specific peptides were: 68-72, 36-39, 23-25, 22, 21, 19-20, 17-18, 15-16 e 14kD. The EITB results were optimized with 1/100 serum and 1/1.000 conjugate dilutions. In this test, the sensitivity was 100,0% and the specificity 96,7%. ELISA and EITB complement each other as excellent tools for the diagnosis of swine cysticercosis because of the high sensitivity and feasibility of the first for the survey condition and the high specificity of the second to confirm the results of the ELISA.

The cysticercosis frequency of the inspected swine was 0,3% and the non-inspected was 8,2%, indicating occurrence risks of 1,0 against 28,5, respectively. These rates show the

serious sanitary situation in the informal swine production sector and its market. Due to the high performance of ELISA and EITB tests, they are recommended for the diagnosis of cysticercosis in suspected swine in slaughterhouses and for the survey of cysticercosis occurrence in swine production, mainly in the informal sector. These results will support integrated measures of cysticercosis control in the whole chain of swine production, performing effective contribution to the public health.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUILAR, O. Diseño experimental: "Ciclo evolutivo de *Taenia solium*".
Rev. Asoc. Guatemal. Parasit. Med. Trop., 6 (1): 103, 1991.
2. ALMEIDA, G. L. G. Cisticercose suína no Brasil. *Bol. Def. Sanit. Anim.*, 7(1-7): 41-50, 1973.
3. ALUJA, A. S. et al. Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. *Vet. Parasitol.*, 61: 49-59, 1996.
4. ARROYO, R. Teniasis-cisticercosis en Costa Rica. *Rev. Cost. Cienc. Méd.*, 10 (2): 82-8, 1989.
5. ARRUDA, W. O. et al. Neurocysticercosis : an epidemiological survey in two small rural communities. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)*, 49 (4): 419-24, 1990.
6. BIONDI, G. F. *Emprego do teste imunoenzimático ELISA indireto no sorodiagnóstico da cisticercose suína*. São Paulo, 1994. [Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo].
7. BOLIVAR-JIMÉNEZ, S. La cisticercosis por *C. cellulosae* como zoonosis. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 80: 403-11, 1976.
8. BONAMETTI, A. M. et al. Índice de positividade da reação imunoenzimática (ELISA) para cisticercose no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no soro de pacientes com epilepsia. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 34 (5): 451-8, 1992.
9. BRANT, P. C. et al. Ocorrência de cisticercose suína no decênio de 1959 a 1968. *Arq. Esc. Vet.*, 21: 17-21, 1969.
10. BRASIL. Leis, decretos, etc. *Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal*. Aprovado pelo decreto 30.691 de 29/03/52, alterado pelo decreto 1.255 de 25/06/1962. Brasília, Ministério da Agricultura, 1980.

11. BRASIL. Leis, decretos, etc. *Normas de instalações e equipamentos para abate e industrialização de suínos*. Aprovado pela portaria 711 de 01/11/95. Brasília, MAARA/SDA/DIPOA, 1995.
12. CALIL, R. M. Situação atual do complexo teníase humana-cisticercose no Brasil. *Comun. cient. Fac. Med. vet. Zoot. Univ. S. Paulo*, 8 (2): 227-9, 1984.
13. CARRADA-BRAVO, T. Teniasis - cisticercosis como problema de salud pública. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, 44 (7): 427-34, 1987.
14. CASTILLO, S. et al. Investigación de antígenos y anticorpos de *Cysticercus cellulosae* en el diagnóstico de cisticercosis humana y porcina por el método ELISA. *Rev. Asoc. Guatemal. Parasit. Med. Trop.*, 6 (1): 102-3, 1991.
15. CHENG, R. W. K. & KO, R. C. Purification of larval *Taenia solium* antigens by gel filtration. *Vet. Parasitol.*, 43 (1/2): 65-73, 1992.
16. CHEQUER, R. S. & VIEIRA, V. L. F. Neurocisticercose no estado do Espírito Santo. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)*, 48 (4): 431-40, 1990.
17. CLEMENTE, H. A. M. NEUROCISTICERCOSE Incidência no estado do Rio de Janeiro. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)*, 48 (2): 207-9, 1990.
18. CÔRTEZ, J. A. Epidemiologia do processo teníase humana-cisticercose. *Comun. cient. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 8 (2): 31-41, 1984.
19. COSTA-CRUZ, J. M. et al. Ocorrência de cisticercose em necrópsias realizadas em Uberlândia. Minas Gerais, Brasil. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)*, 53 (2): 227-32, 1995.
20. DIAS, M. A. Eficácia da inspeção sanitária nos matadouros. *Vet. Téc.*, 5(3): 20-4, 1995.
21. DIAZ, F. et al. Epidemiology of taeniasis and cysticercosis in a peruvian village. *Am. J. Epidem.*, 135 (8): 875-82, 1992a.

22. DIAZ, J. F. et al, Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a field comparison of an antibody-enzyme-linked assay (ELISA), an antigen-ELISA, and an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 46(5): 610-15, 1992b.
23. DIWAN, A. R. et al, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31 (2): 364-9, 1982
24. EVANS, C. A.W. et al, Immunotherapy for porcine cysticercosis: implications for prevention of human disease. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 56(1): 33-7, 1997.
25. FIGUEIREDO, P. Z. et al. *Cysticercus cellulosae* (Cestoda-Taeniidae) em suínos abatidos no Matadouro Municipal de Teresina, Brasil. *Arq. Esc. Vet., UFMG*, 25(3): 265-70, 1973.
26. FLISSER, A. Relación huésped - parásito en la cisticercosis humana y porcina. *Gac. Méd. Mex.*, 123 (7/8): 157-62, 1987.
27. FLISSER, A. et al, Efecto de agentes físicos y químicos sobre la viabilidad del cisticerco de la *Taenia solium*. *Salud Pub. Mex.*, 28(5): 551-5, 1986.
28. FLISSER, A. et al, Diagnóstico, tratamiento y mecanismos de evasión inmune de la cisticercosis por larvas de *Taenia solium* en seres humanos y cerdos. *Rev. Asoc. Guatemalt. Parasit. Med. Trop.*, 6 (1): 43-54, 1991.
29. FLETCHER, R.H. et al. *Epidemiologia clínica*. 2^a ed. Trad. SCHMIDT, M.A. Porto Alegre, Artes Médicas, 1991.
30. FRANCIS, M. et al, Cisticercose bovina, suína e humana e sua relação com teníases humanas. *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro*, 20:1-6, 1979.
31. FREEMAN, R. S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. *Can. J. Zool.*, 40: 969-90, 1962

32. GERMANO, P. M. L. Características dos métodos diagnósticos aplicados pela vigilância sanitária na área de alimentos. *Comum. cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 13(2): 75-9, 1989.
33. GERSHONI, J. M. & PALADE, G. E. Protein blotting: principles and applications. *Analytical Biochemistry*, 131: 1-15, 1983.
34. GEVORKIAN, G. et al, Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol. Letters*, 49:185-9, 1996.
35. GOBBI, H. et al. Ocorrência de cisticercose (*Cysticercus cellulosae*) em pacientes necropsiados em Uberaba-M.G. *Rev. Pat. Trop.*, 9 (1/2): 51-9, 1980.
36. GONÇALVES-COELHO, T. D. & COELHO, M. D. G. Neurocysticercosis in Paraíba, Northeast Brazil - An endemic area? *Arq. Neuro-Psiquiat.* (São Paulo), 54 (4): 565-70, 1996.
37. GONZALEZ, A. E. et al. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 43 (2): 194-9, 1990.
38. GONZALEZ, A. E. et al. Use of sentinel pigs to monitor environmental *Taenia solium* contamination. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 51(6): 847-50, 1994.
39. GOTTSTEIN, B. et al. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *T. solium* metacestode antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35 (2): 308-13, 1986.
40. GOTTSTEIN, B. et al. Species-specific immunodiagnosis of *T. solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. *Trop. Med. Parasit.*, 38: 299-303, 1987.
41. GUO, R. M. et al, A comparative test on ELISA procedures to diagnose cysticercosis. *Qinghai Xumu Shouyi*, 24 (1): 14-5, 1994. (resumo)
42. HAYUNGA, E. G. et al. Development of a serologic assay for cysticercosis, using an antigen isolated from *Taenia spp* cyst fluid. *Am. J. Vet. Res.*, 52(3): 462-70, 1991.

43. HERBERT, I. V. & OBERG, C. Cysticercosis in pigs due to infection with *Taenia solium* (LINNAEUS, 1958). In: SOULSBY, E. J. L. *Parasitic zoonoses, clinical and experimental studies*. New York, Academic Press, 1974. p. 199-211.
44. KAUR, M. et al. Evaluation of the efficacy of albendazole against the larvae of *Taenia solium* in experimentally infected pigs, and kinetics of the immune response. *Int. J. Parasitol.*, 25(12):1443-50, 1995.
45. KAUR, M. et al. Evaluation and characterization of purified antigenic fraction-II of *Cysticercus cellulosae* by enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of neurocysticercosis before and after treatment. *Immunol. Inf. Dis.*, 6:25-9, 1996.
46. KUMAR, D. & GAUR, S. N. S. Serodiagnosis of porcine cysticercosis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using fractionated antigens. *Vet. Parasit.*, 24 (3/4): 195-202, 1987.
47. KUMAR, D. et al. Indirect fluorescent antibody test in the diagnosis of porcine cysticercosis. *Indian J. Animal Sci.*, 57(11):1204-6, 1987.
48. KUMAR, D. et al. Host tissue response against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *Indian J. Animal Sci.*, 61(3): 270-3, 1991.
49. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-5, 1970.
50. LARRALDE, C. et al. Deciphering Western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 40(3): 282-90, 1989.
51. LARRALDE, C. et al. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 114:926-8, 1990

52. LOWRY, H. L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-75, 1951.
53. MACIEL, G. A. & PAIM, G. V. Os dados nosogeográficos obtidos através do matadouro e sua importância para a saúde pública, *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, 20 (2): 241-9, 1966.
54. MANOUTCHARIAN, K. et al. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.*, 82(2): 250-4, 1996.
55. MASELLI, R. et al. Control de teniasis/cisticercosis utilizando al cerdo infectado como indicador de riesgo a nivel comunitario. *Rev. Asoc. Guatemalt. Parasit. Med. Trop.*, 7 (1): 36, 1992.
56. McMANUS, D. P. et al. Some recent advances in the molecular characterization of *Echinococcus* and *Taenia solium*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health*, 22:256-61, 1991.
57. MOLINARI, J. L. et al. *Taenia solium*: immunity in hogs to the cysticercus. *Exp. Parasit.*, 55: 340-57, 1983.
58. MONTENEGRO, T. et al. The diagnostic importance of species specific and cross-reactive components of *Taenia solium*, *Equinococcus granulosus*, and *Hymenolepis nana*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 36(4): 327-34, 1994.
59. NASCIMENTO, E. & ARAUJO, F. G. Estudos imunoquímicos em extratos aquosos de larva e adultos de *Taenia solium*. I - imunogenicidade e composição antigênica. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 24 (6): 353-8, 1982a.
60. NASCIMENTO, E. & ARAUJO, F. G. Estudos imunoquímicos em extratos aquosos de larva e adultos de *Taenia solium*. II - Relacionamento antigênico, padrões cromatográficos, atividade imunológica do escólex. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 24 (6): 359-63, 1982b.

61. NASCIMENTO, E. & MAYRINK, W. Avaliação de antígenos de *Cysticercus cellulosae* no imunodiagnóstico da cisticercose humana pela hemaglutinação indireta. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 26 (6): 289-94, 1984.
62. NASCIMENTO, E. et al. Improved immunodiagnosis of human cysticercosis with scolex protein antigens. *Parasitol. Res.*, 73: 446-50, 1987.
63. NASCIMENTO et al. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet. Immunol Immunopathol.*, 45: 127-37, 1995.
64. NOGUEIRA, R.H.G. Micoplasmose pulmonar no suíno. *Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG*, (15): 65-77, 1996.
65. ONAH, D. N. & CHIEJINA, S. N. *Taenia solium* cysticercosis and human taeniasis in the Nsukka area of Enugu State, Nigeria. *Annals Trop. Med. Parasitol.*, 89(4): 399-407, 1995
66. PALAPA et al. Comparación de la reacción inflamatoria causada por el metacestodo de *T. solium* en músculos y encéfalos de cerdos. *Vet. Mex.*, 28(1): 1-5, 1997.
67. PANDEY, V. S. & MBEMBER, Z. Cysticercosis of pig in the Republic of Zaire and its relation to human teniasis. *Annales de la Societe Belge de Medicine Tropicale*, 56: 43-8, 1976.
68. PASSOS, E. C. et al. Investigação epidemiológica sobre as zoonoses de maior constatação em matadouros. I. Suínos. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. S. Paulo*, 26(1): 39-51, 1989.
69. PATHAK, K.M.L. et al. A Western blot and ELISA assay for the diagnosis of *Taenia solium* infection in pigs. *Vet. Parasitol.*, 53: 209-17, 1994.
70. PERALTA, E. L. & FRIAS, M. T. *Manual sobre la tecnica inmunoenzimática ELISA*. Havana, ENPES, 1987.
71. PÉREZ, K. & CÁCERES DE MASELLI, A. L. Inmunodiagnostico de cisticercosis porcina en Guatemala. *Rev. Asoc. Guatemalt. Parasit. Med. Trop.*, 6 (1): 102, 1991.

72. PRATA, L.F. Avaliação da técnica de exame do coração na detecção da cisticercose suína, durante a inspeção em matadouros. *Hig. Alim.*, 1(3/4): 205-13, 1982.
73. PRIEGO, A. G. et al. Fraccionamiento de un antígeno crudo de *Cysticercus cellulosae*. *Sal. Pub. Mex.*, 19(3): 421-30, 1977.
74. RODRÍGUEZ et al. Estudio cualitativo y cuantitativo de la presencia de posoncosferas de *Taenia solium* en el tejido muscular de cerdos com y sin cisticercosis. *Bol. Chil. Parasitol.*, 50:50-7, 1995.
75. ROSSI, C. L. Avaliação de frações antigênicas de *Cysticercus cellulosae* para o imunodiagnóstico da neurocisticercose utilizando conjugados anticorpo-lectina. *Arq Neuro-psiquiat.* (São Paulo), 47(3):287-90, 1989.
76. SANTOS, I.F. Nova técnica de exame do coração na rotina de Inspeção da Cisticercose Bovina. Niterói, 1975. [Tese de mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense].
77. SARTI, E. et al. Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 46 (6): 677-85 , 1992.
78. SARTI-G., E. et al. Epidemiologic observations on porcine cysticercosis in a rural community of Michoacan State, México. *Vet. Parasit.*, 41: 195-201, 1992.
79. SCHENONE, H. & LETONJA, T. Cisticercosis porcina y bovina en Latinoamérica. *Bol. Chil. Parasit.*, 29: 90-8, 1974.
80. SCIUTTO et al. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol.*, 12: 687-96, 1990.

81. SILVA-VERGARA, M. L. et al. Achados neurológicos e laboratoriais em população de área endêmica para teníase-cisticercose, Lagamar, MG, Brasil (1992-1993). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 36(4): 335-42, 1994.
82. STABENOW, M. B. et al. Aspectos clínicos, laboratoriais, epidemiológicos e de controle das Teníases/Cisticercoses. In: Congresso Brasileiro de Zoonoses, I, Rio de Janeiro, 1987. *Anais*. s. n., 1987. p. 57-60.
83. STUDIER, F.W. - Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J. molec. Biol.*, 79: 237-48, 1973.
84. TATO, P. et al. Efecto de la inmunización en cerdos inmunodeprimidos, naturalmente parasitados con *Cysticercus cellulosae*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, 29: 67-71, 1987.
85. TATO, P. et al. Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by small RNA purified from *Taenia solium* metacestode. *Parasitol. Res.*, 81: 181-7, 1995.
86. TEIXEIRA, E. N. et al. Cisticercose em suínos abatidos em Feira de Santana-Bahia. *Arq. EMV-UFBa.*, Salvador, 2(1): 20-8, 1977.
87. TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON I - Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-2, 1979.
88. TSANG, V. C. W. et al. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzimol.*, 92:377-91, 1983.
89. TSANG, V. C. W. et al. An Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Inf. Dis.*, 159: 50-9, 1989.

90. TSANG, V. C. W. et al. Efficacy of the immunoblot assay for cysticercosis in pigs and modulated expression of distinct IgM/IgG activities to *Taenia solium* antigens in experimental infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 29: 69-78, 1991.
91. VAZ, A. J. *Cysticercus longicollis: caracterização antigênica e desenvolvimento de testes imunológicos para pesquisa de anticorpos em líquido cefalorraquiano no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana*. São Paulo, 1993. [Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo].
92. VAZ, A. J. et al. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis: use of heterologous antigenic particles (*Cysticercus longicollis*) in indirect immunofluorescence test. *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease*, 8:157-61, 1997.
93. VENKATESAN, P. & WAKELIN, D. ELISAs for parasitologists: or lies, dammed lies and ELISAs. *Parasitol. Today*, 9(6): 228-32, 1993.
94. VERSTER, A. et al. The effect of gamma radiation of the cysticerci of *Taenia solium*. *Onderstepoort J. vet. Res.*, 43(1): 23-6, 1976.
95. VIANNA, L. G. et al. Estudo soroepidemiológico da cisticercose humana em Brasília Distrito Federal. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 19 (3): 149-56, 1986.
96. VILLA, M. F. G. Situação epidemiológica do complexo teníase/cisticercose como problema de saúde pública no Brasil. *Hig. Alim.*, 9 (36): 8-11, 1995.
97. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The cysticercosis working group in Peru. The marketing of cysticercotic pigs in the Sierra of Peru. *Bull. W. H. O.*, 71 (2): 223-8, 1993.

TABELA 16. Amplitude da diferença(%) de D.O. entre soros negativos e positivo fraco (Antígeno LV).

Diluição de Conjugado	Diluição de Soro/Concentração de Antígeno(µg/ml)											
	1/50			1/100			1/200			1/400		
	0,5	1	2	0,5	1	2	0,5	1	2	0,5	1	2
1/1.000	8,8	29,3	19,0	9,4	21,0	34,8	14,0	30,1	50,4	31,5	49,2	89,2
1/2.000	5,5	17,8	-	4,7	19,9	-	8,1	28,7	-	17,1	31,5	-
1/5.000	13,4	14,3	-	6,3	12,0	-	16,0	21,7	-	17,3	18,7	-
1/10.000	41,8	0,2	-	10,0	7,4	7,9	10,9	20,9	18,9	31,8	25,9	45,0
1/20.000	-*	18,7	-	-	21,5	-	11,8	43,0	-	6,4	77,3	-

-* não houve diferenciação de reatividade entre os controles.

TABELA 17. Amplitude da diferença (%) de D.O. entre soros negativos e positivo fraco (Antígeno E).

Diluição de Soro	Diluição de Conjugado/Concentração de Antígeno(µg/ml)														
	1/1.000					1/5.000					1/20.000				
	0,5	2	5	10	20	0,5	2	5	10	20	0,5	2	5	10	20
1/50	nt	nt	nt	-	-	nt	nt	nt	9,6	9,1	nt	nt	nt	-	18,2
1/100	4,6	15,0	25,5	5,4	5,3	6,9	18,3	15,5	10,7	15,3	11,2	9,5	19,5	24,3	17,5
1/200	5,1	18,1	18,5	11,6	13,0	-	17,2	10,5	15,0	3,4	11,2	22,3	23,6	15,2	8,2
1/400	14,4	10,7	9,1	16,8	12,3	-	16,5	19,6	15,0	20,8	7,0	18,2	-	20,4	-
1/800	-	-	-	nt	nt	-	5,7	-	nt	nt	-	-	8,2	nt	nt

nt = não testado.

TABELA 18. Amplitude da diferença(%) de D.O. entre soros negativos e positivo fraco (Antígeno LT).

Diluição de Conjugado	Diluição de Soro/Concentração de Antígeno(µg/ml)											
	1/50			1/100			1/200			1/400		
	2	5	10	2	5	10	2	5	10	2	5	10
1/1.000	-	-	-	-	-	-	4,4	-	2,3	-	9,0	14,1
1/5.000	-	-	-	-	0,2	-	-	-	1,6	1,5	10,9	9,8
1/20.000	-	-	-	-	13,2	8,9	-	-	8,4	-	-	25,2

TABELA 19. Amplitude da diferença(%) de D.O. entre soros negativos e positivo fraco (Antígeno CT).

Diluição de Conjugado	Diluição de Soro/Concentração de Antígeno(µg/ml)											
	1/50			1/100			1/200			1/400		
	2	5	10	2	5	10	2	5	10	2	5	10
1/1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/5.000	-	-	-	-	-	0,1	-	-	1,6	-	-	-
1/20.000	-	-	1,1	2,7	5,6	7,7	5,9	1,1	-	10,1	1,3	3,9

TABELA 20. Comparação dos quatro antígenos através da amplitude da diferença(%) de D.O. entre soros negativos e positivo fraco.

Diluição de Soro	Antígeno			
	LV*	E**	LT**	CT**
1/50	16,2	-	-	-
1/100	40,3	-	-	-
1/200	51,1	25,6	-	1,5
1/400	41,3	-	-	0,7

*2µg/ml - 1/1.000

**5µg/ml - 1/20.000

TABELA 21. Amplitude da diferença(%) de D.O. entre soros negativos e positivo fraco.

Diluição de Soro	Período de Incubação: SoroxConjugado								
	30x30	30x45	30x60	45x30	45x45	45x60	60x30	60x45	60x60
1/50	23,9	9,1	18,5	10,8	4,5	1,2	6,2	5,7	-
1/100	30,9	48,0	24,8	27,8	24,4	11,3	15,1	17,3	15,8
1/200	63,0	47,5	38,5	44,2	38,2	36,5	32,8	34,7	31,4
1/400	44,2	46,3	40,6	42,3	43,4	46,9	24,4	49,5	43,1
1/800	49,8	43,0	3,4	45,8	45,4	38,1	25,7	38,0	40,0
1/1600	20,2	19,5	4,4	35,6	30,0	19,6	15,1	42,3	22,0
1/3200	-	-	-	2,7	30,4	-	-	13,9	-
1/6400	-	5,2	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 22. Amplitude da diferença(%) de D.O. entre soros negativos e positivo fraco.

Diluição de Soro	Período de Incubação de Substrato		
	5 minutos	10 minutos	15 minutos
1/50	-	-	-
1/100	13,3	8,1	4,0
1/200	31,1	19,9	16,5
1/400	35,1	27,2	31,6

TABELA 23. Amplitude da diferença(%) de D.O. entre soros negativos e positivo fraco.

Diluição de Soro	Período de Sensibilização	
	12h-4°C	1h-37°C
1/50	-	-
1/100	2,7	4,5
1/200	13,1	13,9
1/400	21,8	16,9

TABELA 24. Amplitude da diferença(%) de D.O. entre soros negativos e positivo fraco.

Diluição de Soro	Bloqueio				
	Leite 5%	BSA 1%	Gelatina 1%	Leite 5% sem Tween	Ausente
1/100	2,9	-	-	-	-
1/200	39,4	-	-	-	-
1/400	54,5	-	-	-	-
1/800	71,0	1,5	-	-	-

TABELA 25. Amplitude da diferença(%) de D.O. entre soros negativos e positivo fraco.

Diluição de Soro	Concentração de antígeno-Diluição de Conjugado/Tipo de Antígeno							
	2µg/ml - 1/1.000				5µg/ml - 1/20.000			
	LV	E	LT	CT	LV	E	LT	CT
1/50	-	-	-	-	9,9	5,9	-	4,0
1/100	-	-	-	-	4,5	9,4	2,7	-
1/200	-	-	-	-	18,1	4,9	7,8	0,6
1/400	13,1	-	1,4	-	14,3	5,7	-	7,5

TABELA 26. Densidade ótica de soros de suínos portadores de cisticercose (n = 25)

Ordem	Amostra	Antígeno			
		LV	E	LT	CT
1	191	3,000	2,337	1,132	0,940
2	192	2,961	1,561	1,269	1,010
3	393	1,328	0,733	0,735	0,552
4	394	0,847	0,736	0,524	0,395
5	400	1,228	1,650	0,980	0,864
6	409	2,829	0,981	1,059	0,394
7	410	1,177	0,851	0,843	0,666
8	411	1,029	0,746	0,925	0,945
9	174	1,475	2,582	1,001	1,061
10	175	1,862	2,338	1,044	1,429
11	176	1,716	2,257	1,222	1,242
12	178	1,223	2,050	1,048	1,416
13	990	0,962	0,588	0,535	0,565
14	535	1,355	1,239	0,741	0,929
15	541	1,963	1,433	1,153	0,568
16	542	0,974	1,213	0,834	0,361
17	585	1,619	2,334	1,259	1,056
18	586	1,234	2,252	1,604	1,486
19	598	1,354	1,289	0,716	0,512
20	610	1,155	1,071	1,027	0,714
21	614	1,266	1,248	1,248	0,787
22	633	0,969	0,980	0,767	0,791
23	636	1,215	1,587	1,152	0,948
24	640	1,723	1,715	1,200	0,813
25	677	2,349	1,773	1,536	1,036
Média		1,553	1,502	1,022	0,859
Desvio Padrão		0,626	0,607	0,272	0,321
Ponto de Corte	2Sd	0,879	0,825	0,499	0,492
	3Sd	1,108	1,025	0,558	0,587
Reações Negativas	2Sd	1/25(4%)	3/25(12%)	0	3/25(12%)
	3Sd	5/25(20%)	7/25(28%)	2/25(8%)	7/25(28%)

TABELA 27. Densidade ótica de soros de suínos não portadores de cisticercose (n = 59)

Ordem	Amostra	Antígeno			
		LV	E	LT	CT
26	333	0,630	0,648	0,337	0,350
27	334	0,454	0,421	0,284	0,416
28	335	0,624	0,556	0,319	0,323
29	336	0,496	0,484	0,260	0,257
30	337	0,443	0,424	0,248	0,357
31	338	0,433	0,540	0,307	0,213
32	339	0,806	0,580	0,331	0,227
33	340	0,527	0,410	0,275	0,226
34	341	0,863	0,617	0,347	0,436
35	342	0,709	0,464	0,238	0,189
36	343	0,321	0,376	0,244	0,294
37	344	0,541	0,595	0,306	0,331
38	345	0,456	0,465	0,302	0,297
39	346	0,425	0,529	0,312	0,222
40	347	0,439	0,486	0,335	0,252
41	348	0,452	0,692	0,327	0,436
42	349	0,588	0,524	0,339	0,417
43	350	0,543	0,465	0,324	0,328

Continua...					
44	351	0,573	0,612	0,342	0,261
45	352	0,483	0,522	0,322	0,412
46	353	0,528	0,540	0,278	0,432
47	354	0,374	0,642	0,271	0,306
48	355	0,599	0,617	0,350	0,339
49	356	0,453	0,479	0,255	0,379
50	358	0,524	0,542	0,393	0,411
51	359	0,319	0,518	0,267	0,302
52	360	0,991	0,503	0,379	0,382
53	361	0,649	1,004	0,430	0,558
54	362	0,686	0,624	0,341	0,454
55	181	0,139	0,164	0,099	0,219
56	182	0,136	0,173	0,078	0,200
57	183	0,185	0,166	0,092	0,123
58	184	0,174	0,182	0,106	0,130
59	185	0,148	0,188	0,121	0,194
60	186	0,222	0,195	0,125	0,208
61	187	0,198	0,161	0,137	0,192
62	188	0,230	0,203	0,131	0,212
63	189	0,140	0,199	0,105	0,178
64	190	0,109	0,151	0,094	0,188
65	17	0,395	0,248	0,159	0,146
66	18	0,442	0,202	0,154	0,183
67	110	0,303	0,297	0,202	0,219
68	111	0,415	0,352	0,282	0,332
69	133	0,874	0,722	0,437	0,193
70	134	0,443	0,464	0,321	0,267
71	135	0,799	0,598	0,394	0,218
72	136	0,740	0,804	0,331	0,416
73	137	0,555	0,479	0,300	0,279
74	19	0,173	0,250	0,124	0,267
75	20	0,244	0,373	0,196	0,194
76	21	0,205	0,365	0,301	0,162
77	22	0,163	0,211	0,145	0,201
78	23	0,418	0,259	0,127	0,304
79	24	0,420	0,347	0,298	0,265
80	25	0,191	0,312	0,206	0,296
81	26	0,295	0,265	0,375	0,290
82	27	0,209	0,326	0,188	0,322
83	101	0,840	0,874	0,696	0,564
84	398	0,413	0,499	0,463	0,338
Média		0,460	0,449	0,261	0,287
Desvio Padrão		0,216	0,192	0,099	0,100
Ponto de Corte	2sd	0,879	0,825	0,499	0,492
	3sd	1,108	1,025	0,558	0,587
Reações Inespecíficas	2sd	1/59(1,7%)	2/59(3,4%)	1/59(1,7%)	2/59(3,4%)
	3sd	-	-	1/59(1,7%)	-

TABELA 28. Densidade ótica de soros de suínos portadores de hidatidose (n = 8)

Ordem	Amostra	Antígeno			
		LV	E	LT	CT
85	102	0,633	0,654	0,427	0,197
86	107	0,839	0,170	0,260	0,336
87	399	0,966	1,177	0,648	0,411
88	402	0,350	0,230	0,187	0,217
89	403	0,295	0,282	0,182	0,268
90	405	0,246	0,336	0,161	0,225
91	406	0,395	0,361	0,318	0,364
92	98	0,858	0,595	0,476	0,158
Média		0,573	0,476	0,332	0,272
Desvio Padrão		0,287	0,330	0,172	0,089
Ponto de Corte	2Sd	0,879	0,825	0,499	0,492
	3Sd	1,108	1,025	0,558	0,587
Reações Cruzadas	2Sd	1/8(25%)	1/8(25%)	1/8(25%)	0
	3Sd	0	1/8(25%)	1/8(25%)	0

TABELA 29. Densidade ótica de soros de suínos portadores de Macracantorrinose (n = 9)

Ordem	Amostra	Antígeno			
		LV	E	LT	CT
93	99	0,710	0,752	0,371	0,427
94	100	0,539	0,538	0,298	0,362
95	104	0,618	0,612	0,449	0,211
96	108	0,399	0,519	0,464	0,333
97	388	0,380	0,374	0,275	0,300
98	389	0,504	0,551	0,420	0,228
99	390	0,584	0,596	0,341	0,431
100	395	0,794	0,521	0,424	0,456
101	404	0,537	0,340	0,315	0,299
Média		0,563	0,534	0,373	0,339
Desvio Padrão		0,134	0,123	0,069	0,088
Ponto de Corte	2Sd	0,879	0,825	0,499	0,492
	3Sd	1,108	1,025	0,558	0,587
Reações Cruzadas	2Sd	0	0	0	0
	3Sd	0	0	0	0

TABELA 30. Densidade ótica de soros de suínos portadores de Ascariidose (n = 27)

Ordem	Amostra	Antígeno			
		LV	E	LT	CT
102	1	0,628	0,409	0,332	0,256
103	2	0,617	0,657	0,440	0,201
104	363	0,553	0,528	0,252	0,318
105	364	0,482	0,546	0,281	0,384
106	365	0,688	0,854	0,253	0,242
107	366	0,609	0,583	0,217	0,259
108	367	0,486	0,393	0,185	0,167
109	368	0,574	0,543	0,289	0,180
110	369	0,807	0,617	0,320	0,362
111	370	0,738	0,507	0,447	0,246
112	371	0,703	0,481	0,323	0,332
113	372	0,627	0,480	0,397	0,331
114	373	0,775	0,422	0,377	0,261
115	374	0,496	0,482	0,323	0,240
116	375	0,992	0,448	0,324	0,248

Continua...					
117	376	0,597	0,506	0,379	0,320
118	377	0,827	0,429	0,325	0,280
119	378	0,425	0,365	0,282	0,343
120	379	0,306	0,689	0,316	0,545
121	380	0,740	0,704	0,343	0,491
122	381	0,545	0,462	0,282	0,368
123	382	0,461	0,502	0,297	0,368
124	383	0,496	0,431	0,404	0,325
125	384	0,451	0,663	0,332	0,524
126	385	0,696	0,656	0,303	0,318
127	386	0,437	0,382	0,305	0,293
128	387	0,481	0,404	0,369	0,278
Média		0,605	0,524	0,322	0,314
Desvio Padrão		0,159	0,119	0,061	0,094
Ponto de Corte	2Sd	0,879	0,825	0,499	0,492
	3Sd	1,108	1,025	0,558	0,587
Reações Cruzadas	2Sd	1/27(3,7%)	1/27(3,7%)	0	2/27(7,4%)
	3Sd	0	0	0	0

TABELA 31. Densidade ótica de soros de suínos portadores de Pneumonia (n = 15)

Ordem	Amostra	Antígeno			
		LV	E	LT	CT
129	3	0,341	0,734	0,451	0,365
130	4	0,251	0,343	0,235	0,292
131	5	0,123	0,145	0,060	0,167
132	6	0,357	0,347	0,234	0,200
133	7	0,794	0,693	0,461	0,401
134	8	0,313	0,230	0,154	0,225
135	9	0,305	0,253	0,221	0,200
136	10	0,212	0,235	0,154	0,227
137	11	0,391	0,263	0,193	0,234
138	12	0,129	0,167	0,095	0,210
139	13	0,246	0,214	0,137	0,219
140	14	0,211	0,314	0,199	0,272
141	15	0,256	0,241	0,155	0,232
142	16	0,163	0,211	0,151	0,230
143	28	0,465	0,233	0,156	0,244
Média		0,304	0,308	0,204	0,248
Desvio Padrão		0,166	0,174	0,113	0,063
Ponto de Corte	2Sd	0,879	0,825	0,499	0,492
	3Sd	1,108	1,025	0,558	0,587
Reações Cruzadas	2Sd	0	0	0	0
	3Sd	0	0	0	0

TABELA 32. Resultados do inquérito de Guarapuava-PR (n = 68)

Soro	DO	ELISA		Imunoblot n=28	Conclusão
		2Sd	3Sd		
29	0,636	-	-	nt	-
30	0,287	-	-	nt	-
31	0,780	-	-	nt	-
32	0,770	-	-	nt	-
33	1,016	+	-	-	-
34	1,375	+	+	+	+
35	0,733	-	-	nt	-
36	0,480	-	-	-	-
37	1,135	+	-	-	-
38	2,715	+	+	+	+
39	0,829	-	-	-	-
40	0,565	-	-	nt	-
41	0,541	-	-	nt	-
42	0,531	-	-	nt	-
43	2,672	+	+	+	+
44	0,733	-	-	nt	-
45	0,659	-	-	nt	-
46	0,608	-	-	nt	-
47	1,051	+	-	-	-
48	0,639	-	-	nt	-
49	0,777	-	-	nt	-
50	0,669	-	-	nt	-
51	0,860	-	-	-	-
52	0,225	-	-	nt	-
53	0,180	-	-	nt	-
54	0,244	-	-	nt	-
55	0,250	-	-	nt	-
56	0,645	-	-	nt	-
57	1,497	+	+	+	+
58	0,746	-	-	nt	-
59	0,978	+	-	-	-
60	1,419	+	+	+	+
61	0,577	-	-	nt	-
62	0,782	-	-	-	-
63	0,470	-	-	nt	-
64	0,789	-	-	nt	-
65	1,101	+	-	-	-
66	0,553	-	-	nt	-
67	0,970	+	-	-	-
68	1,491	+	+	+	+
69	0,701	-	-	nt	-
70	0,677	-	-	nt	-
71	0,675	-	-	nt	-
72	0,717	-	-	nt	-
73	1,911	+	+	+	+
74	0,544	-	-	nt	-
75	1,315	+	+	+	+
76	0,856	-	-	-	-
77	0,773	-	-	-	-
78	0,668	-	-	nt	-
79	2,214	+	+	+	+
80	1,438	+	+	+	+
81	0,678	-	-	nt	-

Continua...					
82	0,424	-	-	nt	-
83	0,712	-	-	nt	-
84	0,755	-	-	nt	-
85	0,614	-	-	nt	-
86	0,519	-	-	nt	-
87	0,760	-	-	-	-
88	1,878	+	+	+	+
89	0,611	-	-	nt	-
90	0,822	-	-	-	-
91	0,852	-	-	-	-
92	0,468	-	-	nt	-
93	0,793	-	-	nt	-
94	0,745	-	-	-	-
95	0,778	-	-	nt	-
96	0,908	+	-	-	-
Positivos		18	11	11	11

- = resultado negativo
+ = resultado positivo
nt = não testado

TABELA 33. Resultados do inquérito de Viçosa-MG (n = 56)

Soro	DO	ELISA		Imunoblot n=7	Conclusão
		2Sd	3Sd		
112	0,323	-	-	nt	-
113	0,768	-	-	nt	-
114	0,445	-	-	nt	-
115	0,746	-	-	-	-
116	0,422	-	-	nt	-
117	0,388	-	-	nt	-
118	0,454	-	-	nt	-
119	0,724	-	-	nt	-
120	0,532	-	-	nt	-
121	0,762	-	-	-	-
122	0,732	-	-	-	-
123	0,611	-	-	nt	-
124	0,297	-	-	nt	-
125	0,446	-	-	-	-
126	0,794	-	-	nt	-
127	0,553	-	-	nt	-
128	0,303	-	-	nt	-
129	0,326	-	-	nt	-
130	0,318	-	-	nt	-
131	0,300	-	-	nt	-
132	0,195	-	-	nt	-
138	0,422	-	-	nt	-
139	0,761	-	-	nt	-
140	0,452	-	-	nt	-
141	0,170	-	-	nt	-
142	0,238	-	-	nt	-
143	0,515	-	-	nt	-
144	0,341	-	-	nt	-
145	0,378	-	-	nt	-
146	0,401	-	-	nt	-
147	0,593	-	-	nt	-
148	0,268	-	-	nt	-
149	0,413	-	-	nt	-

Continua...					
150	0,299	-	-	nt	-
151	0,397	-	-	nt	-
152	0,400	-	-	nt	-
153	0,354	-	-	nt	-
154	0,260	-	-	nt	-
156	0,604	-	-	nt	-
157	0,367	-	-	nt	-
158	0,445	-	-	nt	-
159	0,495	-	-	nt	-
160	0,583	-	-	nt	-
161	0,682	-	-	nt	-
162	1,039	+	-	-	-
163	0,570	-	-	nt	-
164	0,551	-	-	nt	-
165	0,737	-	-	-	-
166	0,697	-	-	-	-
167	0,678	-	-	nt	-
169	0,537	-	-	nt	-
170	0,642	-	-	nt	-
171	0,479	-	-	nt	-
172	0,596	-	-	nt	-
173	0,459	-	-	nt	-
Positivos		1	-	-	-

TABELA 34. Resultados do inquérito de Belo Horizonte-MG (n = 103)

Soro	DO	ELISA		Imunoblot n=3 l	Conclusão
		2Sd	3Sd		
200	0,728	-	-	nt	-
201	0,683	-	-	nt	-
202	0,619	-	-	nt	-
203	0,598	-	-	nt	-
204	0,714	-	-	nt	-
205	0,725	-	-	-	-
206	0,743	-	-	-	-
207	0,719	-	-	nt	-
208	0,669	-	-	nt	-
209	0,617	-	-	nt	-
210	0,502	-	-	-	-
211	0,639	-	-	nt	-
212	0,636	-	-	nt	-
213	0,703	-	-	-	-
214	0,628	-	-	nt	-
215	0,669	-	-	nt	-
216	0,660	-	-	nt	-
217	0,454	-	-	-	-
218	0,520	-	-	nt	-
219	0,565	-	-	nt	-
220	0,494	-	-	nt	-
221	0,525	-	-	nt	-
222	0,617	-	-	nt	-
223	0,710	-	-	nt	-
224	0,708	-	-	nt	-
225	0,397	-	-	nt	-
226	0,570	-	-	nt	-
227	0,596	-	-	nt	-

Continua...					
228	0,335	-	-	nt	-
229	0,755	-	-	-	-
230	0,489	-	-	nt	-
231	0,858	-	-	-	-
232	0,795	-	-	nt	-
233	0,686	-	-	nt	-
234	1,200	+	+	+	+
235	0,616	-	-	nt	-
236	0,436	-	-	nt	-
237	0,372	-	-	nt	-
238	0,622	-	-	nt	-
239	0,676	-	-	nt	-
241	0,677	-	-	nt	-
242	0,942	+	-	-	-
243	0,593	-	-	nt	-
244	0,428	-	-	nt	-
245	0,659	-	-	-	-
246	0,772	-	-	nt	-
247	0,534	-	-	nt	-
248	0,641	-	-	nt	-
249	0,428	-	-	nt	-
250	0,783	-	-	-	-
251	0,819	-	-	-	-
252	1,053	+	-	-	-
253	0,556	-	-	nt	-
254	0,481	-	-	nt	-
255	0,843	-	-	-	-
256	0,491	-	-	nt	-
257	0,734	-	-	nt	-
258	0,586	-	-	nt	-
259	0,660	-	-	nt	-
260	0,850	-	-	-	-
261	0,643	-	-	nt	-
262	0,454	-	-	nt	-
263	0,460	-	-	nt	-
264	0,621	-	-	nt	-
265	0,549	-	-	nt	-
266	0,694	-	-	-	-
267	0,607	-	-	nt	-
268	0,790	-	-	-	-
269	0,695	-	-	nt	-
271	0,747	-	-	nt	-
272	0,754	-	-	-	-
273	0,825	-	-	-	-
274	0,676	-	-	-	-
275	0,877	-	-	-	-
277	0,370	-	-	nt	-
278	0,435	-	-	nt	-
279	0,332	-	-	nt	-
280	0,759	-	-	-	-
281	0,512	-	-	nt	-
283	0,460	-	-	nt	-
284	0,810	-	-	-	-
285	0,461	-	-	nt	-
286	0,834	-	-	-	-
287	0,592	-	-	-	-

Continua...					
288	0,533	-	-	nt	-
289	0,449	-	-	nt	-
290	0,352	-	-	nt	-
291	0,732	-	-	-	-
292	0,778	-	-	-	-
293	0,695	-	-	nt	-
294	0,564	-	-	nt	-
295	0,467	-	-	nt	-
296	0,724	-	-	nt	-
297	0,676	-	-	-	-
299	0,388	-	-	nt	-
300	0,845	-	-	-	-
301	0,592	-	-	nt	-
302	0,481	-	-	nt	-
303	0,663	-	-	nt	-
304	0,492	-	-	nt	-
305	0,513	-	-	-	-
306	0,726	-	-	-	-
Positivos		3	1	1	1

TABELA 35. Resultados do inquérito de Terenos-MS (n = 23)

Soro	DO	ELISA		Imunoblot n=8	Resultado
		2Sd	3Sd		
310	0,516	-	-	nt	-
311	0,455	-	-	nt	-
312	0,595	-	-	nt	-
313	0,661	-	-	nt	-
314	0,446	-	-	nt	-
315	0,395	-	-	nt	-
316	0,465	-	-	nt	-
317	0,569	-	-	nt	-
318	1,000	+	-	-	-
319	0,728	-	-	nt	-
320	0,623	-	-	-	-
321	0,872	-	-	-	-
322	0,467	-	-	nt	-
323	0,272	-	-	nt	-
324	0,553	-	-	nt	-
325	0,657	-	-	nt	-
326	0,805	-	-	-	-
327	0,329	-	-	nt	-
328	0,682	-	-	-	-
329	0,927	+	-	-	-
330	1,031	+	-	-	-
331	0,290	-	-	nt	-
332	0,678	-	-	-	-
Positivos		3	-	-	-

TABELA 36. Resultados do inquérito de Carapicuiaba-SP (n = 99)

Soro	DO	ELISA		Imunoblot n=25	Resultado
		2Sd	3Sd		
412	0,284	-	-	nt	-
413	0,982	+	-	-	-
414	0,724	-	-	-	-
415	0,670	-	-	-	-

Continua...					
416	0,798	-	-	-	-
417	0,789	-	-	-	-
418	0,541	-	-	nt	-
419	0,777	-	-	-	-
420	0,324	-	-	nt	-
421	0,464	-	-	nt	-
422	0,516	-	-	nt	-
423	0,673	-	-	nt	-
424	0,402	-	-	nt	-
425	0,475	-	-	nt	-
426	0,361	-	-	nt	-
427	0,645	-	-	-	-
428	0,297	-	-	nt	-
429	0,547	-	-	nt	-
430	0,307	-	-	nt	-
431	0,663	-	-	-	-
432	0,657	-	-	nt	-
433	0,597	-	-	-	-
434	0,796	-	-	nt	-
435	0,697	-	-	nt	-
436	0,653	-	-	-	-
437	0,450	-	-	nt	-
438	0,473	-	-	nt	-
439	0,491	-	-	nt	-
440	0,332	-	-	nt	-
441	0,821	-	-	-	-
442	0,727	-	-	nt	-
443	0,320	-	-	nt	-
444	0,820	-	-	-	-
445	0,541	-	-	nt	-
446	0,471	-	-	nt	-
447	0,345	-	-	nt	-
448	0,848	-	-	-	-
449	0,560	-	-	nt	-
450	0,779	-	-	nt	-
451	0,731	-	-	nt	-
452	0,580	-	-	nt	-
453	0,456	-	-	nt	-
454	0,422	-	-	nt	-
455	0,507	-	-	nt	-
456	0,912	+	-	-	-
457	0,365	-	-	nt	-
458	0,584	-	-	nt	-
459	0,606	-	-	nt	-
460	0,656	-	-	-	-
461	0,757	-	-	nt	-
462	0,542	-	-	nt	-
463	0,605	-	-	nt	-
464	0,782	-	-	-	-
465	0,297	-	-	nt	-
466	0,292	-	-	nt	-
467	0,384	-	-	nt	-
468	0,371	-	-	nt	-
469	0,826	-	-	-	-
470	0,718	-	-	nt	-
471	0,354	-	-	nt	-

Continua...					
472	0,736	-	-	nt	-
473	0,471	-	-	nt	-
474	0,603	-	-	nt	-
475	0,520	-	-	nt	-
476	0,299	-	-	nt	-
477	0,312	-	-	nt	-
478	0,188	-	-	nt	-
479	0,384	-	-	nt	-
480	0,291	-	-	nt	-
481	0,449	-	-	nt	-
482	0,776	-	-	-	-
483	0,458	-	-	nt	-
484	0,376	-	-	nt	-
485	0,322	-	-	nt	-
486	0,793	-	-	-	-
487	0,482	-	-	nt	-
488	0,487	-	-	nt	-
489	1,032	+	-	-	-
490	0,667	-	-	-	-
491	0,221	-	-	nt	-
492	0,246	-	-	nt	-
493	0,350	-	-	nt	-
494	0,331	-	-	nt	-
495	0,722	-	-	-	-
496	0,538	-	-	nt	-
497	0,609	-	-	nt	-
498	0,461	-	-	nt	-
499	0,567	-	-	nt	-
500	0,485	-	-	nt	-
501	0,465	-	-	nt	-
502	0,804	-	-	-	-
503	0,823	-	-	-	-
504	0,673	-	-	nt	-
505	0,816	-	-	-	-
506	0,552	-	-	nt	-
507	0,623	-	-	nt	-
508	0,533	-	-	nt	-
509	0,423	-	-	nt	-
510	0,502	-	-	nt	-
Positivos		3	-	-	-

TABELA 37. Resultados do inquérito de Apodi-RN (n = 159)

Soro	DO	ELISA		Imunoblot n=56	Resultado
		2Sd	3Sd		
535	1,414	+	+	+	+
536	0,672	-	-	nt	-
537	0,565	-	-	nt	-
538	0,315	-	-	nt	-
539	0,619	-	-	nt	-
540	0,359	-	-	nt	-
541	1,978	+	+	+	+
542	0,990	+	-	+	+
543	0,228	-	-	nt	-
544	0,554	-	-	nt	-
545	0,834	-	-	-	-

Continua...					
546	0,500	-	-	nt	-
547	0,799	-	-	nt	-
548	0,997	+	-	-	-
549	0,478	-	-	nt	-
550	0,580	-	-	nt	-
551	0,982	+	-	-	-
552	0,386	-	-	nt	-
553	0,641	-	-	nt	-
554	0,790	-	-	-	-
555	1,089	+	-	-	-
556	0,193	-	-	nt	-
557	1,133	+	+	-	-
558	0,482	-	-	nt	-
559	0,508	-	-	nt	-
560	0,404	-	-	nt	-
561	0,896	+	-	-	-
562	1,075	+	-	-	-
563	0,601	-	-	nt	-
564	0,396	-	-	nt	-
565	0,598	-	-	nt	-
566	0,628	-	-	nt	-
567	0,616	-	-	nt	-
568	0,530	-	-	nt	-
569	0,334	-	-	nt	-
570	0,506	-	-	nt	-
571	0,234	-	-	nt	-
572	0,523	-	-	nt	-
573	0,448	-	-	nt	-
574	0,667	-	-	-	-
575	0,486	-	-	nt	-
576	0,690	-	-	-	-
577	0,776	-	-	-	-
578	0,593	-	-	nt	-
579	0,476	-	-	nt	-
580	0,667	-	-	nt	-
581	0,778	-	-	-	-
582	0,681	-	-	nt	-
583	0,867	-	-	-	-
584	0,576	-	-	nt	-
585	1,498	+	+	+	+
586	1,223	+	+	+	+
587	0,542	-	-	nt	-
588	0,336	-	-	nt	-
589	0,589	-	-	nt	-
590	0,768	-	-	nt	-
591	1,076	+	-	-	-
592	0,873	-	-	-	-
593	0,331	-	-	nt	-
594	1,007	+	-	-	-
595	0,542	-	-	nt	-
596	0,747	-	-	nt	-
597	1,051	+	-	-	-
598	1,250	+	+	+	+
599	0,671	-	-	nt	-
600	0,668	-	-	-	-
601	0,323	-	-	nt	-

Continua...					
602	1,275	+	+	-	-
603	0,725	-	-	-	-
604	0,624	-	-	-	-
605	0,132	-	-	nt	-
606	0,857	-	-	-	-
607	1,351	+	+	-	-
608	0,457	-	-	nt	-
609	0,351	-	-	nt	-
610	0,939	+	-	+	+
611	0,124	-	-	nt	-
612	0,193	-	-	nt	-
613	0,556	-	-	nt	-
614	1,217	+	+	+	+
615	0,806	-	-	-	-
616	0,903	+	-	-	-
617	0,224	-	-	nt	-
618	0,428	-	-	nt	-
619	0,959	+	-	+	+
620	0,537	-	-	nt	-
621	0,358	-	-	nt	-
622	0,490	-	-	nt	-
623	0,589	-	-	nt	-
624	0,353	-	-	nt	-
625	0,500	-	-	nt	-
626	0,421	-	-	nt	-
627	0,143	-	-	nt	-
628	0,848	-	-	-	-
629	0,377	-	-	nt	-
630	0,319	-	-	nt	-
631	0,219	-	-	nt	-
632	0,761	-	-	nt	-
633	1,000	+	-	+	+
634	0,353	-	-	nt	-
635	0,651	-	-	-	-
636	0,952	+	-	+	+
637	0,433	-	-	nt	-
638	0,779	-	-	-	-
639	0,125	-	-	nt	-
640	1,124	+	+	+	+
641	0,330	-	-	nt	-
642	0,873	-	-	-	-
643	0,728	-	-	-	-
644	0,751	-	-	nt	-
645	0,807	-	-	-	-
646	0,312	-	-	nt	-
647	0,570	-	-	nt	-
648	0,588	-	-	nt	-
649	0,137	-	-	nt	-
650	0,739	-	-	nt	-
651	0,611	-	-	nt	-
652	0,747	-	-	-	-
653	0,199	-	-	nt	-
654	0,153	-	-	nt	-
655	0,289	-	-	nt	-
656	0,214	-	-	nt	-
657	0,298	-	-	nt	-

Continua...					
658	0,623	-	-	nt	-
659	0,187	-	-	nt	-
660	0,472	-	-	nt	-
661	0,462	-	-	nt	-
662	0,507	-	-	nt	-
663	0,727	-	-	nt	-
664	1,025	+	-	+	+
665	0,848	-	-	-	-
666	0,464	-	-	nt	-
667	0,465	-	-	nt	-
668	0,863	-	-	-	-
669	0,498	-	-	nt	-
670	0,941	+	-	-	-
671	0,878	-	-	-	-
672	0,843	-	-	-	-
673	0,176	-	-	nt	-
674	0,252	-	-	nt	-
675	0,526	-	-	nt	-
676	0,484	-	-	nt	-
677	2,132	+	+	+	+
678	0,593	-	-	nt	-
679	0,262	-	-	nt	-
680	0,436	-	-	nt	-
681	0,402	-	-	nt	-
682	1,039	+	-	-	-
683	0,783	-	-	-	-
684	0,285	-	-	nt	-
685	0,701	-	-	nt	-
686	0,326	-	-	nt	-
687	0,868	-	-	-	-
688	0,711	-	-	nt	-
689	0,388	-	-	nt	-
690	0,458	-	-	nt	-
691	0,818	-	-	-	-
692	0,696	-	-	nt	-
693	0,811	-	-	-	-
Positivos		28	11	14	14

TABELA 38. Resultados do inquérito de Recife-PE (n = 120)

Soro	DO	ELISA		Imunoblot n=40	Resultado
		2Sd	3Sd		
694	0,720	-	-	nt	-
695	0,796	-	-	-	-
696	0,652	-	-	nt	-
698	0,589	-	-	nt	-
699	0,728	-	-	-	-
700	0,750	-	-	nt	-
701	0,519	-	-	nt	-
702	0,654	-	-	nt	-
703	0,630	-	-	nt	-
704	0,745	-	-	nt	-
705	0,679	-	-	nt	-
706	0,720	-	-	nt	-
707	0,441	-	-	nt	-
708	0,732	-	-	nt	-

Continua...					
709	0,608	-	-	nt	-
710	0,402	-	-	nt	-
711	0,518	-	-	nt	-
712	0,618	-	-	nt	-
713	1,152	+	+	-	-
714	0,342	-	-	nt	-
715	0,562	-	-	nt	-
716	0,634	-	-	nt	-
717	0,637	-	-	nt	-
718	0,694	-	-	nt	-
719	0,816	-	-	-	-
720	0,674	-	-	-	-
721	0,881	-	-	-	-
722	0,906	-	-	-	-
723	0,791	-	-	-	-
724	0,725	-	-	nt	-
725	0,732	-	-	-	-
726	0,600	-	-	nt	-
727	0,945	+	-	-	-
728	0,599	-	-	nt	-
729	0,711	-	-	nt	-
730	0,684	-	-	nt	-
731	0,844	-	-	-	-
732	0,590	-	-	nt	-
733	0,975	+	-	-	-
734	0,983	+	-	-	-
735	0,789	-	-	-	-
736	0,770	-	-	-	-
737	0,389	-	-	nt	-
738	0,657	-	-	nt	-
739	0,841	-	-	-	-
740	0,478	-	-	nt	-
741	0,465	-	-	nt	-
742	0,344	-	-	nt	-
743	0,832	-	-	-	-
744	0,721	-	-	nt	-
745	0,658	-	-	nt	-
746	0,762	-	-	nt	-
747	0,417	-	-	nt	-
748	0,690	-	-	nt	-
749	0,761	-	-	nt	-
750	0,845	-	-	-	-
751	0,529	-	-	-	-
752	0,567	-	-	nt	-
753	0,805	-	-	-	-
754	0,708	-	-	nt	-
755	0,700	-	-	nt	-
756	0,728	-	-	-	-
757	0,868	-	-	-	-
758	0,831	-	-	-	-
759	0,641	-	-	nt	-
760	0,747	-	-	nt	-
761	0,519	-	-	nt	-
762	0,507	-	-	nt	-
763	0,657	-	-	nt	-
764	0,612	-	-	-	-

Continua...					
765	0,526	-	-	nt	-
766	0,503	-	-	nt	-
767	0,768	-	-	nt	-
768	0,675	-	-	-	-
769	0,670	-	-	nt	-
770	0,502	-	-	nt	-
771	0,560	-	-	nt	-
772	0,628	-	-	nt	-
773	0,452	-	-	nt	-
774	0,695	-	-	-	-
775	0,504	-	-	nt	-
776	0,678	-	-	nt	-
777	0,687	-	-	-	-
778	0,457	-	-	nt	-
779	0,649	-	-	nt	-
780	0,436	-	-	nt	-
781	0,680	-	-	nt	-
782	0,474	-	-	nt	-
783	0,561	-	-	nt	-
784	0,711	-	-	-	-
785	0,698	-	-	-	-
786	0,778	-	-	-	-
787	0,569	-	-	nt	-
788	0,549	-	-	nt	-
789	0,449	-	-	nt	-
790	0,531	-	-	nt	-
791	0,627	-	-	nt	-
792	0,607	-	-	nt	-
793	0,249	-	-	nt	-
794	0,588	-	-	nt	-
795	0,487	-	-	nt	-
796	0,671	-	-	nt	-
797	1,862	+	+	-	-
798	0,415	-	-	nt	-
799	0,651	-	-	nt	-
800	0,655	-	-	-	-
801	0,665	-	-	nt	-
802	0,732	-	-	-	-
803	0,617	-	-	nt	-
804	0,725	-	-	-	-
805	0,621	-	-	-	-
806	0,363	-	-	-	-
807	0,669	-	-	nt	-
808	0,607	-	-	-	-
809	0,398	-	-	nt	-
810	0,621	-	-	-	-
811	0,755	-	-	-	-
812	0,601	-	-	nt	-
813	0,815	-	-	-	-
814	0,631	-	-	nt	-
Positivos		5	2	-	-

TABELA 39. Amplitude da diferença (%) de D.O. entre soros negativos e positivo fraco.

Diluição de Soro	Fração			
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄
1/50	-	-	6,4	14,5
1/100	-	-	-	-
1/200	-	-	-	-
1/400	-	-	-	-

TABELA 40. Amplitude da diferença(%) de D.O. entre soros negativos e positivo fraco.

Conjugado	Diluição de soro/ Concentração de antígeno (F ₄)											
	1/25			1/50			1/100			1/200		
	2	5	10	2	5	10	2	5	10	2	5	10
1/2.000	45,6	4,9	7,8	29,5	12,3	-	10,4	14,8	-	-	-	-
1/5.000	94,1	-	17,5	71,0	-	12,2	44,7	-	-	-	-	-
1/10.000	36,7	-	15,6	19,0	-	-	-	-	-	-	-	-
1/20.000	45,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 41. Reatividade (X) dos peptídeos (bandas) com um soro controle positivo e um negativo em diferentes diluições de soro e conjugado(1/100 e 1/500).

Ident	Bandas	Diluição de Conjugado/Soro															
		1/100								1/500							
		1/25		1/100		1/500		1/5.000		1/25		1/100		1/500		1/5.000	
		191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188
1-E	111	X	X	X	X	X	-	X	-	X	X	X	X	X	-	X	-
2-E	105	X	X	X	-	X	-	X	-	X	X	X	X	X	-	X	-
3-E	101	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X	-	X	-
4-G	88	X	X	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-
5-H	81	X	X	X	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-	-	-
6-I	72	X		X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-
7-K	62	X	X	X	X	X	-	X	-	X	X	X	X	X	-	X	-
8-L	57	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	-	-	X	-	X
9-M	50	X	X	X	X ₅₃	X	-	X	-	X	X	X	X	X	-	X	-
10-N	45	X	X	X	X	-	-	-	X	X	X	X	X	-	X	-	X
11-O	44	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-
12-P	41	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13-Q	38	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-
14-Q ₃	36	X	-	X	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-
15-R	31	X	X	-	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-	-	-
16-S	28	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17-T	25	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18-U	22	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19-V	21	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20-X	19	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21-Y	17	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
22-Z	14	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-
Total		22	12	14	8	9	3	9	3	16	10	16	7	8	3	8	3
Diferença +/-		10		6		6		6		6		9		5		5	
Específica		9	1	4	-	2	-	2	-	2	-	4	-	2	-	2	-

191 - Soro positivo
188 - Soro negativo

TABELA 42. Reatividade (X) dos peptídeos (bandas) com um soro controle positivo e um negativo em diferentes diluições de soro e conjugado(1/1.000 e 1/5.000).

Ident	Bandas	Diluição de Conjugado/Soro															
		1/1.000								1/5.000							
		1/25		1/100		1/500		1/5.000		1/25		1/100		1/500		1/5.000	
		191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188
1-E	111	X	X	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	-	-
2-E	105	X	X	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	-	-
3-E	101	X	X	X	X	X	-	X	-	X	X	X	X	X	-	X	-
4-G	88	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-H	81	X	X	X	X	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-
6-I	72	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-
7-K	62	X	X	X	-	X	-	-	-	X	-	X	-	X	-	X	-
8-L	57	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-M	50	X	X	X	X	-	X	-	-	X	X	X	X	-	-	-	-
10-N	45	X	X	X	X	-	X	-	-	X	X	X	X	-	X	-	-
11-O	44	X	-	X	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-
12-P	41	X	X	X	X	-	X	-	-	X	X	X	X	-	X	-	-
13-Q	38	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14-Q ₃	36	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15-R	31	X	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-
16-S	28	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17-T	25	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18-U	22	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19-V	21	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20-X	19	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21-Y	15	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-
22-Z	14	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total		22	11	18	5	6	3	5	0	12	6	10	5	6	2	4	3
Diferença.		11		13		3		5		6		5		4		1	
Específica		9	-	6	-	2	-	2	-	3	-	3	-	2	-	2	-

191 - Soro positivo
188 - Soro negativo

TABELA 43. Reatividade (X) dos peptídeos (bandas) com três soros controles positivos (191, 393 e 400), um deles procedentes de suínos com lesões discretas (393) e três soros controles negativos(188, 334 e 398), na diluição 1/1.000 de conjugado e 1/100 de soro.

Identificação	Bandas	Tipo de Soro							
		191	400	393	Total Positivo	188	334	398	Total Negativo
1-A	203	-	-	-	-	-	-	-	-
2-B	164-51	-	-	X	1	X	-	-	1
3-D	118-7	-	-	X	1	-	-	X	1
4-E	111-8	X	-	-	1	-	-	-	-
5-E	106-1	X	-	-	1	-	-	-	-
6-E	103-98	X	X	X	3	X	X	-	2
7-F	97-4	X	-	-	1	-	-	-	-
8-G	86	-	X	-	1	-	-	-	-
9-H	79-5	X	X	X	3	X	X	X	3
10-I	71-68	X	X	X	3	-	-	-	-
11-J	65-4	-	-	X	1	-	-	X	1
12-K	60-56	X	X	X	3	X	X	X	3
13-M	52-49	X	X	X	3	X	-	X	2
14-N	47-5	X	X	-	2	X	X	X	3
15-N _I	44-3	X	-	-	1	X	-	-	1
16-O	40-38	X	X	X	3	-	-	-	-
17-P	37-6	X	X	-	2	X	X	-	2
18-Q	34-2	-	X	X	3	-	-	-	-
19-R	28	X	X	-	2	X	-	-	1
20-X	20-19	X	X	-	2	-	-	-	-
21-Y	17-15	X	X	-	2	-	-	-	-
22-Z	14	X	X	-	2	-	-	-	-
Total		16	14	10	40	9	5	6	20
Diferença Total		19							
Específica/Soro		5	5	2	12/3 = 4	-	-	-	-

TABELA 44. Distribuição dos peptídeos que reagiram com anticorpos de soros controles positivos (n= 13)

Ident	Peptídeos	990	409	410	174	175	176	178	192	191	400	393	411	394	Total(%)
1-A	204-172	-	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X	-	X	5(38,4)
2-B	164-43	-	X	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	3(23,1)
2-C	140-30	-	X	-	-	X	-	-	-	X	-	X	-	-	4(30,8)
4-D	120-14	-	X	-	X	X	X	X	-	-	-	X	X	-	7(53,8)
5-E	110-5	-	X	-	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	7(53,8)
6-E	104-1	-	-	-	X	X	X	X	X	X	-	X	-	X	8(61,5)
7-E	100-97	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	9(69,2)
8-F	96-1	-	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	2(15,4)
9-G	90-82	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	-	-	4(30,8)
10-H	81-74	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	12(92,3)
11-I	72-68	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	13(100,0)
12-J	66-3	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	8(61,5)
13-K	62-55	X	X	X	-	X	-	-	-	X	X	X	X	X	9(69,2)
14-L	54-1	X	X	X	X	-	-	-	X	-	-	X	-	X	7(53,8)
15-M	50-45	X	-	X	X	-	-	-	-	X	X	X	X	X	8(61,5)
16-N	44-2	-	X	X	X	-	-	-	X	X	X	-	-	X	7(53,8)
17-N ₁	41-40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18-O	39-6	-	X	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	8(61,5)
19-P	35-3	X	X	-	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X	11(84,6)
20-Q	32-30	-	X	-	-	-	X	X	-	X	X	X	-	X	7(53,8)
21-Q ₃	29	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	X	-	-	3(23,1)
22-R	28-6	X	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-	4(30,8)
23-S	25-3	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(7,7)
24-T	22	-	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	2(15,4)
25-U	21	-	X	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-	4(30,8)
26-V	20-19	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(7,7)
27-X	18-7	-	X	-	X	X	X	X	X	-	-	-	X	-	7(53,8)
28-Y	16-5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	10(76,9)
29-Z	14	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-	3(23,1)
	Total	9	22	8	13	13	12	12	16	19	15	15	8	12	174/13=13,4

TABELA 45. Distribuição dos peptídeos que reagiram com anticorpos de soros controles negativos (n=30)

Ident	Peptídeos	333	335	336	337	338	340	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352
1-A	204-172	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-B	164-43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-C	140-30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-D	120-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-E	110-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-E	104-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7-E	100-97	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	X	X
8-F	96-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-G	90-82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10-H	81-74	X	X	X	-	X	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X
11-I	72-68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12-J	66-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
13-K	62-55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14-L	54-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15-M	50-45	X	X	-	-	-	-	-	X	X	X	X	-	-	-	-	-
16-N	44-2	X	-	X	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
17-N ₁	41-40	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18-O	39-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19-P	35-3	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
20-Q	32-30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21-Q ₃	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22-R	28-6	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
23-S	25-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24-T	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25-U	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26-V	20-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27-X	18-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28-Y	16-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29-Z	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Total	6	4	3	2	2	1	1	4	2	2	3	1	1	1	2	4

TABELA 46. Distribuição dos peptídeos que reagiram com anticorpos de soros controles negativos (continuação)

Ident	Peptídeos	339	341	342	357	359	360	133	135	361	362	101	334	398	188	Total (%)
1-A	204-172	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-B	164-43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-C	140-30	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	X	3(10,0)
4-D	120-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	2(6,7)
5-E	110-5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	-	-	X	11(36,7)
6-E	104-1	X	X	X	X	X	X	-	X	-	-	X	-	-	X	9(30,0)
7-E	100-97	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	25(83,3)
8-F	96-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	1(3,3)
9-G	90-82	-	-	X	-	X	-	X	X	-	-	-	-	-	-	4(13,3)
10-H	81-74	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	24(80,0)
11-I	72-68	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X	-	-	-	2(6,7)
12-J	66-3	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	X	4(13,3)
13-K	62-55	X	X	X	X	X	X	-	X	X	-	X	X	X	X	12(40,0)
14-L	54-1	X	-	-	X	-	X	-	-	-	X	-	-	-	X	5(16,7)
15-M	50-45	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X	18(60,0)
16-N	44-2	X	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	16(53,3)
17-N ₁	41-40	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	X	-	-	X	5(16,7)
18-O	39-6	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	1(3,3)
19-P	35-3	X	-	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X	-	X	12(40,0)
20-Q	32-30	-	X	-	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	8(26,7)
21-Q ₃	29	-	-	-	-	X	X	-	-	X	-	X	-	-	X	5(16,7)
22-R	28-6	-	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	-	-	X	14(46,7)
23-S	25-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24-T	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25-U	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26-V	20-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27-X	18-7	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(3,3)
28-Y	16-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29-Z	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Total	10	8	10	10	12	12	10	14	10	6	13	5	6	17	182/30=6,1

BELA 47. Distribuição dos peptídeos que reagiram com anticorpos de soros controles de suínos com outras patologias (n = 35)

it	Peptídeos	Hidatidose (n=8)									Macracantorrincose (n=9)									
		98	107	102	399	402	403	405	406	Total%	99	100	104	108	388	389	390	395	404	
A	204-172	X	-	-	-	-	-	-	-	1(12,5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	164-43	X	-	-	-	-	-	-	-	1(12,5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	140-30	X	-	-	-	-	-	-	-	1(12,5)	-	-	-	-	X	-	-	-	X	2(22,2)
D	120-14	X	-	-	X	X	-	-	-	3(37,5)	-	-	-	-	-	-	X	X	X	3(33,3)
E	110-5	X	X	-	X	X	X	X	X	7(37,5)	X	X	-	-	X	X	X	X	X	7(77,7)
F	104-1	X	-	-	X	X	X	X	X	6(75,0)	X	-	-	-	-	-	-	-	-	1(11,1)
G	100-97	X	X	-	X	X	X	X	X	7(37,5)	X	X	-	-	X	X	X	X	X	7(77,7)
H	96-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	90-82	X	-	-	X	-	-	-	X	3(37,5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	81-74	X	X	X	X	X	X	-	X	7(37,5)	X	X	X	X	X	X	X	X		8(88,8)
K	72-68	-	-	-	X	-	-	X	-	2(25,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	66-3	-	X	X	-	-	-	-	-	2(25,0)	-	-	-	-	-	X	X	-	-	2(22,2)
M	62-55	X	X	X	X	-	X	X	X	7(87,5)	X	X	X	-	X	X	X	X	X	8(88,8)
N	54-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	2(22,2)
O	50-45	X	X	X	X	-	-	X	X	6(75,0)	X	X	X	-	X	X	X	X	X	8(88,8)
P	44-2	X	X	X	X	X	X	-	-	6(75,0)	-	-	X	X	-	-	X	-	-	3(33,3)
Q	41-40	X	-	-	X	-	-	-	-	2(25,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R	39-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	1(11,1)
S	35-3	-	-	-	X	-	-	-	-	1(12,5)	-	-	-	X	X	X	-	-	-	3(33,3)
T	32-30	X	-	X	X	X	-	-	-	4(50,0)	-	-	X	X	X	-	X	-	-	4(44,4)
U	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	28-6	X	X	X	X	-	-	-	X	5(62,5)	-	-	X	X	X	-	X	-	-	4(44,4)
W	25-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Z	20-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18-7	-	-	-	-	-	-	X	-	1(12,5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16-5	-	-	-	-	-	X	-	-	1(12,5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Total	15	8	7	14	7	7	7	8	73/8=9,1	7	5	6	5	9	7	11	7	6	63/9=7,0

3ELA 48. Distribuição dos peptídeos que reagiram com anticorpos de soros controles de suínos com outras patologias (continuação)

t	Peptídeos	Ascariidose (n=10)										Pneumonia (n=8)									
		373	369	377	378	380	365	375	379	384	385	Total(%)	3	7	4	5	6	8	9	10	Total(%)
	204-172	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	164-43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	140-30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	120-14	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	1(10,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	110-5	X	X	X	X	X	X	-	-	-	X	7(70,0)	X	X	X	-	X	-	-	-	4(50,0)
	104-1	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	5(50,0)	-	-	X	-	X	-	-	-	2(25,0)
	100-97	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X	9(90,0)	X	X	X	-	X	-	X	X	6(75,0)
	96-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	90-82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	1(12,5)
H	81-74	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	10(100)	-	-	X	-	X	-	-	-	2(25,0)
I	72-68	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	1(10,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	66-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	1(12,5)
K	62-55	X	X	X	X	X	X	-	X	-	-	7(70,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	54-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M	50-45	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	10(100)	X	X	-	-	X	X	X	-	5(62,5)
N	44-2	-	-	-	-	X	-	-	-	X	X	3(30,0)	-	X	-	-	X	-	-	-	2(25,0)
N ₁	41-40	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	2(20,0)	-	-	-	-	X	X	-	X	3(37,5)
O	39-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	1(12,5)
P	35-3	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	1(10,0)	-	-	-	-	-	-	-	X	1(12,5)
Q	32-30	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	1(10,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Q ₃	29	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	1(10,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R	28-6	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	9(90,0)	-	-	-	-	X	-	X	X	3(37,5)
S	25-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	20-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X	18-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	1(10,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y	16-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Z	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Total	7	7	7	7	10	7	3	5	7	8	68/10=6,8	3	4	4	0*	10	2	3	5	31/8=3,9

ovavelmente pouco soro