UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
Curso de Pós-Graduação em Qualidade e Produtividade Animal

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DA CISTICERCOSE SUÍNA PELO
ELISA UTILIZANDO OS ANTÍGENOS: TOTAL E DE ESCÓLEX
DE *Cysticercus Cellulosae* E LÍQUIDO VESICULAR DE
*Cysticercus longicollis***

KILLARNEY ATAIDE SOARES

Dissertação para obtenção do grau
de MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia

PIRASSUNUNGA

2003

Agradeço...

**À Deus pelo imensurável dom da
vida e pelas valiosas
oportunidades concedidas.**

Dedico...

Aos meus amados pais, Santos e Conceição, meus irmãos Kennerly e Kadija, e minhas queridas avós Ana e Conceição, pelo amor e apoio incondicionais em todas as minhas decisões... Pela educação exemplar, e por mostrarem-me que a honestidade, a perseverança e a fé removem as "montanhas" da nossa vida!

Dedico...

À minha esposa, Ana Cristina, pelo amor, compreensão, carinho e por todo apoio, tão imprescindíveis para que esta caminhada terminasse com sucesso. Minha linda, essa vitória também é sua!!!

**“Se pude enxergar mais ao longe foi porque
subi nos ombros de gigantes”.**

Issac Newton

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia pela amizade “mineiramente” moldada nestes quase 3 anos de convivência. Agradeço ainda pela orientação, dispendendo apoio, incentivo e confiança na minha capacidade, os quais foram pontos fundamentais para que este trabalho fosse realizado, esta etapa em minha vida fosse vencida e este sonho realizado.

À Márcia M. Silva e Mirele D. Poleti, pela sincera amizade, pela agradável convivência nestes 2 anos, e pela participação fundamental em todas as etapas. À vocês, só tenho a agradecer pela constante boa vontade, confiança, sinceridade, senso crítico e companheirismo. Compartilho com vocês esta vitória. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Antônio J. Rossini que, mesmo perante os diversos afazeres acadêmicos, nos apoiou, colaborando enormemente para a conclusão deste trabalho, e também pela amizade consolidada ao longo destes 2 anos.

À Prof^a Dr^a Maria Terezinha Bahia (Universidade Federal de Ouro Preto), que me apresentou ao fantástico e intrigante mundo da Parasitologia e da Pesquisa durante os anos da graduação, e por todo apoio durante os anos que se seguiram.

Ao Prof. Dr. Washington Luiz Tafuri, à Prof^a Dr^a Marta de Lana, Prof^a Dr^a Cláudia Carneiro e à Vanja Maria Veloso, todos da Universidade Federal de Ouro Preto, verdadeiros mestres que contribuíram na lapidação dos meus conhecimentos e na construção do senso crítico, virtudes importantíssimas àquele que almeja a vida científica.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica do ZAB pela ótima amizade, pela atenção e pelo “apoio logístico” essencial em todo o trabalho. Saudosa Beth... Silvana, Camila, Viviane e demais colegas, obrigado por tudo!

Aos amigos do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento, sobretudo ao Prof. Dr. Flávio V. Meirelles e à Giovana que nos apoiaram por diversas vezes durante estes 2 anos, colaborando com a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. César G. de Lima pela ajuda e pelas valiosas dicas com a estatística, colaborando na validação do trabalho, e à Ana Carolina (Lab. de Física Aplicada e Computacional) com a confecção dos gráficos, sempre com disposição em colaborar.

À Alessandra Boldrini, ao Antônio Fernandes (“China”), Agnaldo Bueno e ao Antônio Piovato, pela boa vontade e apoio no manuseio com os suínos, que foram fundamentais na fase inicial deste trabalho, e à Fabiana Pilarski pelos momentos de descontração, pela amizade e pela pequena, mas valiosa colaboração no início deste projeto.

Aos Professores Dr. Ernane X. Costa, Dr^a Mariza Melo e Dr. Rogério R. Lacaz pela amizade, pela ajuda e, sobretudo, pelo incentivo durante esta caminhada.

Às colegas da Secretaria do ZAB, Rosângela e Sandra, pela eficiência e pelo apoio, mesmo que indireto mas, da mesma forma importante, e pela convivência agradável e cordial.

Aos colegas da Secretaria da Pós: Wagner, Gláucia, Conceição, Régis, e Clélia. A vocês agradeço pela disposição em colaborar, cordialidade e, sobretudo, pela eficiência demonstrada nestes 3 anos.

Ao Marcelo Dozena, Bernadete Mehler, Maria Osório, Patrícia Fernandes, Cláudio Fernando e toda equipe da Biblioteca da FZEA, pela pronta colaboração em todos os momentos, sempre de forma atenciosa e agradável.

Aos colegas de pós-graduação: a vocês agradeço pela amizade, pelos momentos descontração e pelo apoio, fundamentais nesta minha passagem pelo “mundo da Zootecnia”, até então, pouco conhecido para mim. Em especial à Sandra Oliveira (ZAB/FZEA), Nilton dos Santos (ZAB/FZEA), Otaviano Carneiro, Farah Trementosa e Gustavo Del Claro.

À Maria Helena, Geraldo Guedes, Manoel Eduardo, Verônica, Anália e Jacques: à vocês o agradecimento por todo o apoio dado antes mesmo desta caminhada se iniciar, pelo incentivo, pela credibilidade na minha capacidade e pelo exemplo de dedicação e perseverança em um objetivo.

Ao Leonardo Barbosa e Carlos Eduardo Jensen, verdadeiros amigos, pelas dicas e pela força dada durante estes 3 últimos anos. Mesmo indiretamente e de longe, vocês contribuíram. Obrigado.

À Universidade Pública e gratuita, verdadeiro centro de excelência, celeiro do saber, base para uma sociedade igualitária e uma nação desenvolvida, que irriga com o seu conhecimento os áridos terrenos da educação e da ciência no nosso país.

Agradecimento especial,

Externo meus sinceros agradecimentos ao Ten. Cel. Méd. Carlos César Mundy da Costa, e ao Cel. Méd. Altair Alves Mourão Filho, ex-Chefe e atual Chefe da Subdivisão de Saúde da Academia da Força Aérea (AFA), respectivamente, por permitirem e apoiarem a realização desta pós-graduação e a conclusão deste sonho.

Aos amigos da Subdivisão de Saúde da AFA, sobretudo aos colegas da Seção Farmacêutica: Ilair, Rosângela, Daniela, Jonas, Vicente, Zuanetti, Brito, Ranzoni, Douglas, Célia e Cristina. A vocês agradeço pelo apoio irrestrito, pela amizade e compreensão durante estes árduos mas, gratificantes 2 anos, tornando possível o término desta etapa com sucesso. Valeu gente!

RESUMO

A cisticercose suína é uma doença causada pela larva de *Taenia solium*, Linneaus, 1758, denominada *Cysticercus cellulosae* (cisticerco). A doença está amplamente distribuída pelo mundo, sendo mais freqüente nos países onde o consumo de carne suína é elevado e as condições sanitárias são deficientes, como em grande parte dos países em desenvolvimento. A cisticercose causa prejuízo em criações de suínos, pois, a carne infectada torna-se imprópria para o consumo humano. Para o diagnóstico da cisticercose suína são realizados o exame da língua *in vivo* e o exame *post-mortem* (necropsia). O exame da língua é pouco sensível apesar da elevada especificidade, uma vez que a localização do parasita pode não ser disseminada. A análise *post-mortem* é baseada em sítios de predileção dos cisticercos. Por isso, são analisados em rotina de inspeção sanitária, o coração, a língua, o diafragma e músculos mastigadores (masseteres e pterigóide). No entanto, infecções brandas, com reduzido número de cisticercos instalados nos tecidos, podem não ser diagnosticadas na necrópsia, evidenciando uma sensibilidade baixa. Recentemente, tem sido sugerida a implementação de testes imunológicos, dentre eles o ELISA (*Enzyme Linked Immunossorbent Assay*), que tem por princípio a pesquisa de anticorpos no soro. Assim, o presente trabalho objetiva a avaliação de antígenos no método de ELISA para o imunodiagnóstico da cisticercose suína. Dessa forma, 7 suínos, desmamados, provenientes de criação tecnificada foram infectados com 200.000 ovos de *T. solium*. Foram coletadas amostras sanguíneas antes da infecção e a cada 7 dias até o 140º dia pós-infecção e os soros obtidos foram congelados a 20°C negativos. Os soros foram avaliados através do ELISA utilizando antígeno total (T-Tso) e de escólex (Es-Tso) de *C. cellulosae* e de líquido vesicular de *C. longicollis* (LV-Tcra). O exame da língua *in vivo* apresentou sensibilidade baixa pois, não foi detectada a presença de cisticercos nos 7 animais durante o período da infecção. Mediante o exame *post-mortem*, constatou-se a cisticercose em todos os animais. Por outro lado, a quantidade de cisticercos por animal foi baixa tendo em vista a alta dose de ovos inoculados. Foram detectados ao todo 238 cisticercos, sendo todos viáveis. Quanto à distribuição, foi observado que a musculatura do membro anterior e do membro posterior apresentaram as maiores quantidades de parasitas com 24,38% (58) e 28,57% (68) respectivamente. Apenas 18,67% (43) dos cisticercos foram encontrados em tecidos indicados para inspeção da carne. Quanto ao ELISA, obteve-se a padronização do teste para os 3 antígenos, que detectou aumento significativo de anticorpos à partir do 21º dia p.i., para os 7 suínos. O maior índice de reatividade foi encontrado para o antígeno LV-Tcra. O teste com antígenos Es-Tso e LV-Tcra apresentaram os melhores resultados, detectando níveis de anticorpos acima do *cut-off* nos soros dos animais. Na análise dos soros dos animais suspeitos através do ELISA com Es-Tso, 64,3% (9) das amostras apresentaram absorbâncias acima do *cut-off*, sendo os animais considerados prováveis portadores de cisticercose. Ficou demonstrada a boa sensibilidade do ELISA com os 3 antígenos, sobretudo quando utilizados o Es-Tso, detectando a doença em animais com infecção leve. Ademais, o ELISA com o antígeno Es-Tso apresenta-se como uma importante ferramenta na pesquisa epidemiológica da cisticercose.

ABSTRACT

Swine cysticercosis is a disease caused by the *Taenia solium*'s metacestodes, called *Cysticercys cellulosae* (Cisticerci). This disease is largely spread around the world and is more frequent in countries where swine meat consumption is high and sanitary conditions are poor, as in developing countries. Cysticercosis is harmful to the raising of the swine because infected meat is not proper for human consumption. To diagnose swine cysticercosis one clinically examines the tongue *in vivo* and also examines *post-mortem* (necropsy). The tongue exam has little sensitivity in spite of its high specificity as the parasite location cannot be determined. *Post-mortem* analysis is based on metacestodes's favorite sites. Therefore, the heart, the tongue, the diaphragm, and the chewing muscles (masseteres and pterigoidis) in the tissue are analyzed in the regular sanitary inspection. However, mild infections, with a minor number of metacestodes in the tissues may not be diagnosed in the necropsy, showing that evidently there is a low sensitivity. Recently there has been suggestions of immunological tests, including the ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) which has as a principle the antibodies research in swine's serum. Thus, this study's aim is to evaluate the antigens in the ELISA method for immunodiagnosis of the swine cysticercosis. The experiment used 7 weaned swine for technological rising were orally infected with 200.000 *T. solium* eggs. At every 7 days, up to the 140^o day of infection, 10 mL of blood was collected and the serum was frozen at minus 20°C. The serum were analyzed through the ELISA and the analyses used 3 antigens: total (T-Tso) and scolex (Es-Tso) of *C. cellulosae* and *C. longicollis*'s vesicular fluid (LV-Tcra). The *in vivo* tongue exam showed low sensitivity because at no time during in the infection the presence of metacestodes could be detected. Through the *post-mortem* exam one could notice the cysticercosis in all animals. However, the amount of metacestodes per animal was very low, considering the high number of inoculated eggs. As a total 238 metacestodes were detected and all were viable. As for distribution, one observed that the muscles of front and hindquarters showed more parasites with 24,38 % (58) and 28,57% (68), respectively. Only 18,67% (43) of metacestodes were found in tissue appointed for meat inspection. As for the ELISA, the standardization was obtained for 3 antigens, that detected a significant rise of antibodies from the 21st day of infection. It was also observed that the test using the 3 antigens could detected antibodies anti-*Cysticercus* from the 21th day post-infection. The highest rate of reactivity was found for the antigen LV-Tcra. The immunoenzimatic tests with the Es-Tso and LV-Tcra showed best results, detecting antibodies level over the cut-off in the animals. In the analysis of the suspected animals with ELISA using Es-Tso, 64,3% (9) samples showed high absorbance to the cut-off and the animals considered probably cysticercosis carriers. In conclusion, it was proved that there is good sensitivity in the ELISA, particularly when the antigen Es-Tso is used, detecting cysticercosis in animals with mild infection. Moreover, the ELISA with the Es-Tso show as an important tool for the cysticercosis epidemiological research.

Key words: Swine cysticercosis, ELISA, antigens, *Taenia solium*, *Taenia crassiceps*.

1. INTRODUÇÃO

A cisticercose suína é uma enfermidade parasitária que ocorre em criações de suínos em diversas regiões do mundo, tendo como agente causador a *Taenia solium*, Linneaus, 1758, na sua forma larvária, o *Cysticercus cellulosae*. Além dos suínos, essa enfermidade acomete também os seres humanos, motivo pelo qual ela constitui um importante problema de saúde pública, principalmente em locais de condições sanitárias deficientes.

Elevados índices de prevalência da cisticercose são encontrados em comunidades onde há: o contato entre o suíno e o homem, o consumo de carne de suíno crua ou mal cozida e em locais com práticas de higiene e padrões de saneamento inadequados ou insuficientes (Cook, 1988).

O diagnóstico da doença, importante também para a pesquisa epidemiológica, carece de métodos mais sensíveis, que possam dessa forma detectar infecções leves. Além disso, não existem reagentes ou kits disponíveis no mercado para a realização de testes sorológicos em suínos. É nesse sentido que métodos imunológicos mais sensíveis, com satisfatória especificidade, além do custo relativamente baixo e da grande reprodutibilidade vêm sendo propostos para a detecção da cisticercose suína.

O ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é o mais indicado para o diagnóstico sorológico da cisticercose em regiões endêmicas, visto que pode ser facilmente automatizado e possui boa repetibilidade.

O ELISA possui características que podem ser realçadas se utilizados antígenos específicos que o tornem mais eficiente na detecção de anticorpos no soro de animais em determinadas fases da infecção. A padronização desta técnica permitirá assim avaliar animais com cisticercose quando estes ainda se encontrarem nas criações ou antes do abate, mesmo para aqueles portadores de um pequeno número de cisticercos. Dessa forma, o diagnóstico da cisticercose suína propiciará aos órgãos de controle

sanitário, dados atualizados para que medidas racionais de controle e prevenção da doença sejam implementadas.

A escassez do material biológico dificulta o desenvolvimento de um método apropriado para diagnóstico, e o extrato bruto de parasita que poderia ser empregado, não é universalmente padronizado (Benitez *et al.*, 1998). Entre as alternativas usadas para diagnóstico estão as preparações de extratos antigênicos de larvas de *T. solium* e de espécies heterólogas.

O diagnóstico da cisticercose através de provas sorológicas apresenta sensibilidade e especificidade variáveis, dependentes do tipo de antígeno utilizado e da resposta imunológica do indivíduo. Vários antígenos e provas imunológicas foram dessa forma utilizados para esta finalidade.

O escólex de *C. cellulosae* parece apresentar uma fração com antígenos de baixo peso molecular que podem conferir ao teste imunoenzimático uma alta sensibilidade e especificidade (Ev *et al.* 1999).

A literatura permite verificar que existe uma variedade de antígenos utilizados no ELISA para o diagnóstico da cisticercose e que podem ser obtidos de parasitas heterólogos como o *C. longicollis*, a forma larvária da *T. crassiceps*. O antígeno obtido do líquido vesicular do *C. longicollis* também é proposto para o diagnóstico da neurocisticercose humana.

Desta forma, foi proposta a avaliação dos antígenos total e de escólex de *C. cellulosae* e de líquido vesicular de *C. longicollis* para o imunodiagnóstico da cisticercose suína.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Breve histórico

A cisticercose suína foi descrita pela primeira vez por Aristófanes e Aristóteles no século terceiro a.C (Pessoa & Martins, 1982), enquanto que em humanos o primeiro achado é creditado à Paranoli já no ano de 1550, ao descrever a presença de algumas vesículas cheias de líquido no corpo caloso de um homem que morreu de crise convulsiva. No ano de 1697, Malpighi relatou a existência de um parasita dentro das vesículas de cisticercos (Trelles e Lazarte, 1940).

Fisher demonstrou a perfeita identidade entre o cisticerco do suíno e do homem, enquanto que Redon ingeriu cisticerco colhido de cadáver humano e três meses depois veio a expelir o estróbilo completo de *T. solium* (Guccione, 1919 apud Silva, 1995).

Zeder, 1800, cria o gênero *Cysticercus* (Pessoa & Martins, 1982), e Leannec, em homenagem a Fisher, propôs o nome de *C. cellulosae* pelo fato do parasita ter preferência pelo tecido conjuntivo (Almeida, 1915 apud Silva, 1995). Em 1885, Kuchenmeister e Heubner confirmaram a relação entre os vermes intestinais (solitária) e as larvas parasitárias do homem e dos animais (Pessoa & Martins, 1982). Por fim, em 1856, estabeleceu-se definitivamente a forma larvária da *T. solium* como sendo a responsável pela cisticercose, tanto no suíno como no homem.

2.2. O Cisticerco: Morfologia e biologia

O parasita pertence ao filo *Platyhelminthes*, classe *Cestoidea*, ordem *Cyclophyllidea*, família *Taeniidea*, gênero *Taenia*, espécie *solium* (Pessoa & Martins, 1982).

A forma adulta, comum no homem, mede de 2 a 3 metros de comprimento, podendo em alguns casos atingir medidas de 8 ou até 9 metros. É constituído de uma cabeça ou escólex pequeno com 4 ventosas rodeando um rostro com 24 a 32 acúleos (Pessoa & Martins, 1982).

O *C. cellulosae*, forma larvária da *T. solium*, consiste basicamente em uma vesícula semitransparente com cerca de 15 mm de comprimento por 7 a 8 mm de largura, contendo líquido vesicular e um escólex invaginado em seu interior. (Pessoa & Martins, 1982).

Os cisticercos apresentam-se como elementos parasitários isolados com formato elíptico e de cor branca-nacarada (Bonametti, 1991), embora segundo Escobar *et al.*, 1985, o aspecto macroscópico do cisticerco possa variar de acordo com sua localização. O líquido vesicular por sua vez é composto de água, sais minerais, proteínas, uréia, creatinina, ácido úrico, glicose e traços de colesterol (Spina-França, 1976). Segundo estudos em microscopia eletrônica, a espessura da parede vesicular varia de 70 a 100 μm , e a superfície exterior desse tegumento possui microvilosidades que aumentam em dezenas de vezes a sua área total, o que incorre em aumento na sua inter-relação com o hospedeiro (Ramirez-Bom *et al.*, 1982).

A teníase acomete o homem, uma vez que ele é responsável pela manutenção do ciclo parasitário. O ser humano infecta-se quando há ingestão de carne contaminada com cisticercos viáveis, sendo que assim permanecem por vários dias em carnes conservadas sob refrigeração comum (Basílio de Oliveira, 1984). A larva emerge no intestino delgado e posteriormente, o seu escólex evagina-se e prende-se à mucosa. A evolução da forma larvária para a forma adulta e a expulsão das primeiras proglotes nas fezes ocorre entre a 5^a e a 12^a semana. Existem 800 a 1000 proglotes e quando grávidas, contém no seu interior 30.000 a 50.000 ovos cada uma. Os ovos de *T. solium* variam de 30 a 40 μm de diâmetro e contém em seu interior o embrião hexacanto (oncosfera) e possuem uma casca com até 3 μm de espessura (Pessoa & Martins, 1982). Por fim, o

ciclo se completa quando os ovos são ingeridos por suínos com a eventual produção de cisticercos em vários órgãos, em especial na musculatura.

No ciclo habitual da transmissão, os humanos são hospedeiros acidentais da forma larvária da *T. solium* e os únicos hospedeiros conhecidos que abrigam o parasita na sua forma adulta no intestino, e conseqüentemente os únicos a eliminar ovos nas fezes, o que os tornam assim responsáveis pela contaminação do solo, água e vegetais.

O suíno, hospedeiro intermediário da forma larvária, adquire a infecção através da alimentação com fezes humanas contaminadas – coprofagia –. Tal hábito cultural é muito comum nos criadouros domésticos em regiões pouco desenvolvidas. Em ambos os hospedeiros, há o desenvolvimento da cisticercose após a ingestão de ovos viáveis, excretados nas fezes de portadores de *T. solium* (Faust *et al.*, 1970). Os ovos contidos nas proglotes liberadas pelo homem, podem estar maduros ou não, variando entre 0 e 80%. Ademais, uma vez no ambiente, os ovos são bastante resistentes, permanecendo viáveis durante um ano em locais de umidade relativa alta (Pessoa & Martins, 1982).

O homem se infecta acidentalmente quando ingere alimentos ou água contaminados com ovos viáveis de *T. solium* ou ainda por auto-infecção, decorrente de maus hábitos de higiene, caso o indivíduo seja portador de teníase intestinal. Após a ingestão, os ovos alcançam o trato digestivo onde sofrem a ação dos sucos gástrico e pancreático. Aqueles que resistem à acidez local atingem o duodeno, onde há o rompimento da camada externa e a liberação do embrião hexacanto. Este, com o auxílio de seus acúleos atravessa a parede intestinal e atinge a circulação sanguínea alcançando vários órgãos e tecidos como, por exemplo, o sistema nervoso, a musculatura, o coração, os masséteres, os olhos e a cavidade oral, e ainda os tecidos subcutâneos. A forma mais séria da doença em humanos – neurocisticercose – é o resultado da fixação nos olhos e no cérebro (Monteiro *et al.*, 1992). Após fixarem-se em qualquer desses tecidos, ocorre o desenvolvimento até a forma larvária (cisticerco) num período médio de 2 a 3 meses (Escobar *et al.*, 1972; Manson-Bahr & Bell, 1987; Pessoa & Martins, 1982).

2.3. Cisticercose: Aspectos imunológicos

O *C. cellulosae* possui interações complexas com o seu hospedeiro, visto as suas diferentes fases de evolução, além das variações genéticas interindividuais, o que torna mais difícil o estudo e a compreensão dos mecanismos da sobrevivência do parasita e de defesa do hospedeiro. Através de imunoeletroforese e imunodifusão dupla, verificou-se que a diversidade antigênica entre cisticercos de *T. solium* pode explicar as diferentes respostas imunológicas do hospedeiro frente ao parasita (Yakoleff-Greenhouse *et al.*, 1982).

A degeneração parasitária com a conseqüente liberação de antígenos, estimula a resposta imune com a produção de anticorpos específicos e pode desencadear reação inflamatória em suínos infectados (Flisser *et al.*, 1990). Essa reação inflamatória ocorre geralmente quando há cisticercos viáveis. Quando analisada a nível tecidual, a reação inflamatória apresenta-se sob a forma granulomatosa e linfocitária crônica, pois a cápsula sofre o processo de fibrose e logo é circundada por neutrófilos, eosinófilos e mais tardiamente por linfócitos, células plasmocitárias e macrófagos, sendo responsável pela eventual morte e calcificação do cisticerco (Del Brutto *et al.*, 1988). Análises imunohistoquímicas revelam além da presença de células mononucleares e eosinófilos, linfócitos B e monócitos/macrófagos MHC-II em suínos (Londoño, *et al.*, 2002). O grau dessa reação é altamente variável, podendo em muitos casos, até mesmo não existir, evidenciando assim mecanismos de evasão imunológica do parasita (Del Brutto *et al.*, 1988) ou ainda uma imuno-tolerância desenvolvida pelo hospedeiro frente ao parasita, fazendo com que ele sobreviva sem alterações por vários anos.

O papel protetor dos anticorpos produzidos na cisticercose suína tem sido verificado em animais imunizados com ovos viáveis e, posteriormente, desafiados. Observa-se uma diminuição do número de cisticercos nos animais inoculados. (Molinari *et al.*, 1983).

Kaur *et al.*, 1995, realizaram infecção experimental de suínos divididos em 3 grupos, sendo 2 grupos tratados com droga e outro não tratado. Os autores utilizaram a técnica do ensaio imunoenzimático com 2 antígenos: o extrato solúvel bruto de *C. cellulosae* e uma preparação de fração antigênica purificada. Notou-se que nos animais não tratados o

título de anticorpos aumentou sucessivamente aos 10, 25, 40 e 55 dias de infecção. Estes resultados ocorreram com ambos os antígenos.

Aluja *et al.*, 1996, verificaram em suínos experimentalmente infectados com ovos de *T. solium*, que os níveis de anticorpos avaliados pelo ELISA decresciam após 92 dias de infecção e que animais com cisticercos viáveis apresentaram soropositividade aos 281 dias. Os autores compararam os resultados do ELISA com os do método de Western blot, mostrando que nas infecções iniciais são reconhecidos os antígenos de baixo peso molecular (13, 14 e 18 kDa) e em estágios tardios da infecção tem-se antígenos de maior peso molecular (45, 50 e 24 kDa), sugerindo assim que animais velhos são mais resistentes à infecções.

Em infecções experimentais em suínos com diferentes quantidades de ovos de *T. solium*, a detecção de antígenos circulantes através do ELISA teve início entre as 2ª e 6ª semanas pós-infecção. Os autores concluíram ainda que a presença de cisticercos não calcificados está relacionada com a positividade do ELISA (Nguekam *et al.*, 2002).

Santamaria *et al.*, 2002, infectaram suínos com diferentes números de ovos de *T. solium*, e foi observado que os animais que receberam 1000 ou mais ovos apresentaram níveis detectáveis de anticorpos anti-*Cysticercus* aos 30 dias pós-infecção. Nos suínos que receberam 10 ou 100 ovos, os anticorpos apareceram no dia 60 pós-infecção e respectivamente, em apenas 40 e 75% dos animais foi possível a detecção de anticorpos. Os autores concluem que a severidade da infecção e a provável regulação dos mecanismos de evasão dependem do número de cisticercos que se desenvolvem e se mantêm sob a forma vesicular, sem calcificação.

2.4. Epidemiologia

A real situação epidemiológica no tocante a dados de incidência e prevalência da cisticercose suína é mascarada ou até mesmo subdimensionada, visto que estes dados dependem apenas do ato da inspeção em estabelecimentos sujeitos à fiscalização. No entanto, muitos animais são abatidos clandestinamente, sem que haja controle algum por parte dos órgãos de vigilância sanitária. Sabe-se ainda que a inspeção realizada

comumente nos abatedouros não é suficientemente sensível para a detecção de cisticercos em casos de infecção branda (W.H.O., 1993).

A infecção por *T. solium* representa um grave problema de saúde pública em países em desenvolvimento. No México, os maiores fatores de risco encontrados para a soropositividade de suínos frente à análise pelo imunoblot, foram: a ausência de sanitários, aliado à grandes concentrações de pessoas (funciona como um marcador para condições sócio-econômicas e de higiene inferiores) e a criação de suínos em condições inadequadas (Widdowson *et al.*, 2000). Garcia-Noval *et al.*, 1996, analisaram a população de duas comunidades rurais na Guatemala e verificaram que a soropositividade para o imunoblot em humanos era maior na comunidade de piores condições sanitárias. A presença da teníase intestinal também seguiu o mesmo padrão.

A cisticercose suína apresenta alta prevalência em alguns países da América Latina (Flisser, 2002), alguns países da Ásia (Ito *et al.*, 2002) e do continente africano (Geerts *et al.*, 2002; Phiri *et al.*, 2003).

No Brasil, Sakai *et al.*, 2001, ao analisarem por EITB (*Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot*), soros de suínos criados livremente em 3 regiões do Estado da Bahia, observaram a prevalência de anticorpos para *T. solium* de 4,4% dos animais em Salvador, 3,2% em Santo Amaro e 23,5% em Jequié.

Quanto a cisticercose humana, intimamente relacionada com a suína, observa-se que ela é uma doença ainda de distribuição e mais freqüentemente encontrada no México, África, América Central e América do Sul, além de outras regiões que reúnem condições de disseminação e persistência (Mahajan, 1982). Na Ásia, a cisticercose é um grave problema de saúde pública, afetando milhões de pessoas com graves problemas neurológicos, além de perdas de ordem econômica (Rajshekhar *et al.*, 2003).

Takayanagui & Jardim, 1983 na região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, verificaram que 7,5% das internações realizadas na Clínica de Neurologia do Hospital das Clínicas da USP foram devidas a neurocisticercose. Takayanagui, *et al.*, 1996, verificaram em 21% dos pacientes examinados a presença de cisticercos vivos, indicando uma transmissão ativa. Estudos epidemiológicos realizados nesta mesma região mostraram em pacientes portadores de doenças psiquiátricas uma prevalência de 12,2% de neurocisticercose (Tavares Jr., 1994).

2.5. Métodos de diagnóstico

Usualmente, para o diagnóstico da cisticercose suína, são realizados o exame clínico da língua *in vivo* e o exame anátomo-patológico (*post-mortem*), sendo ambos baseados nos tecidos de maior probabilidade da cisticercose. Na rotina da inspeção são examinados os músculos mastigadores (masséter e pterigóide), o coração, a língua e o diafragma (W.H.O., 1993).

O exame da língua é pouco sensível (70%), apesar da elevada especificidade (100%), já que a localização do parasita pode não ser disseminada (WHO, 1993). A necrópsia dos animais abatidos pode deixar de identificar os que possuem infecção leve.

Boa *et al.*, 2002, analisaram tecidos de suínos de localidades da Tanzânia, naturalmente infectados a fim de determinar a distribuição e a densidade dos cisticercos de *T. solium* por grupo de músculos e órgãos. Os resultados obtidos mostraram que dos cisticercos encontrados, 10,5% estavam alojados nos músculos psoas, 8,1% no masséter interno, 7,1% no masséter externo, 4,9% no tríceps braquial e 3,4% na língua. No total, apenas 10,6% dos cisticercos encontrados estavam nos músculos preconizados como locais de inspeção sanitária.

O exame da língua em animais naturalmente infectados de comunidades rurais do Oeste da República de Camarões, alcançou um índice de positividade de 6,1% (Pouedet *et al.*, 2002).

Vários antígenos vêm sendo utilizados em testes sorológicos. Em estudos de imunodifusão dupla, o extrato de escólex foi a parte do cisticerco que apresentou o menor número de polipeptídeos comuns ao verme adulto (Nascimento & Araújo, 1982, II). O antígeno de escólex foi também o mais sensível e específico no imunodiagnóstico da cisticercose humana pela hemaglutinação indireta (Nascimento & Mayrink, 1984).

Nascimento *et al.*, 1987, compararam o ELISA com testes de Hemaglutinação Indireta e Fixação de Complemento, utilizando extrato bruto antigênico (CAE) e antígeno protéico de escólex (SPA) para os dois primeiros testes, enquanto que para o último fez-se uso de extrato alcoólico do CAE e do SPA. Foi então observado que a Fixação de Complemento detectou anticorpos em 45% e 73% dos pacientes utilizando os seus antígenos, CAE e SPA, respectivamente. Na Hemaglutinação Indireta, anticorpos foram detectados em 73% quando utilizado o antígeno CAE e 86% para o

SPA. E por fim, com o método imunoenzimático, os autores observaram que os anticorpos foram detectados em 63% e 91% dos pacientes utilizando os respectivos antígenos, mostrando assim que o teste utilizando antígeno obtido a partir do escólex de *C. cellulosae* possui maior capacidade para detectar pacientes infectados.

O imunoblot foi utilizado em soros de suínos por Gonzalez *et al.*, 1990, que observaram 30% de reações falso-positivas em soros de animais procedentes de regiões endêmicas. Essas reações podem ser atribuídas a reações cruzadas com anticorpos para outros parasitas, comuns em animais criados em condições sanitárias deficientes, e anticorpos específicos em suínos contactantes do parasita sem infecção estabelecida. Os autores relataram que os exames *post-mortem* em suínos apresentaram sensibilidade de 70% e que testes imunoenzimáticos utilizando antígeno total de *C. cellulosae* apresentaram sensibilidades de 79,4%.

Técnicas com maior sensibilidade, mais baratas, rápidas e que não requerem equipamentos caros vêm sendo aplicadas para diagnóstico, como a EITB. Porém, a EITB usa misturas de antígenos parcialmente purificados, de difícil produção. Apesar do aprimoramento das técnicas para diagnóstico, a obtenção do material biológico em quantidade e qualidade necessárias, continua sendo uma dificuldade.

2.6. O ELISA no diagnóstico da cisticercose

As propostas para um método de imunodiagnóstico da cisticercose tem sido aperfeiçoadas ao longo do tempo. O teste imunoenzimático foi empregado para diagnóstico da cisticercose suína no trabalho de Castillo, 1991, onde se observou 90% de sensibilidade e especificidade. Gonzalez *et al.*, 1990, obtiveram sensibilidade de 79,2% e reações cruzadas com *Taenia hidatigena*, *Echinococcus granulosus* e *Fasciola hepática*.

No intuito de se diminuir as reações cruzadas dos testes, a purificação dos antígenos foi proposta (Kumar & Gaur, 1987; Cheng & Ko, 1992). A pré-absorção dos soros com proteínas suínas também pode reduzir a inespecificidade do teste imunoenzimático, e o imunoblot pode ser empregado como teste para identificar os peptídeos reativos (Vaz, 1993).

Em bovinos a técnica imunoenzimática, utilizando diferentes antígenos, também vem proporcionando evoluções referentes ao diagnóstico da cisticercose. Smith *et al.*, 1991, trabalharam com fração de fluido cístico de larva de *T. hydatigena* como antígeno no intuito de verificar a presença de anticorpos do tipo IgG para *T. saginata* em bovinos com infecção experimental. Os autores observaram que havia correlação entre os altos níveis de anticorpos produzidos e detectados pelo método imunoenzimático e o número de ovos dados aos animais. Foram relatados níveis máximos de anticorpos entre 40 e 60 dias pós-infecção, seguido de diminuição gradual. Os autores concluíram também que o baixo nível de anticorpos circulantes em infecções leves poderiam ocasionar resultados falsos positivos ou falsos negativos dependendo do ponto de seleção do *cut-off*.

Kamanga-sollo e Lindqvist, 1991, trabalhando com 15 antígenos de *T. saginata*, verificaram que vários deles demonstraram reações cruzadas com outras parasitoses comuns nos bovinos. Dessa forma, os autores escolheram 3 antígenos com restritas reações cruzadas e os selecionaram para a avaliação no teste imunoenzimático. Esses antígenos por sua vez apresentaram alta sensibilidade e especificidade para o sorodiagnóstico da cisticercose bovina.

Posteriormente, outros antígenos foram testados com o mesmo objetivo. O extrato de *C. cellulosa* (CS), o fluido cístico (CF) e o extrato de *T. saginata* adulta (TS) foram avaliados em testes com soros de pacientes com neurocisticercose humana, onde o teste imunoenzimático obteve respectivamente 78,13%, 81,25% e 62,50% de sensibilidade (Morakote *et al.*, 1992). Reações falso positivas foram verificadas em 6,66% quando foi realizado o ensaio imunoenzimático utilizando o CS como antígeno, não sendo detectados anticorpos com outros antígenos. Os autores verificaram também que o CF foi o melhor antígeno para o uso no método imunoenzimático.

Estudos utilizando anticorpo monoclonal no teste imunoenzimático mostraram uma maior sensibilidade nos soros examinados de bovinos, sendo que 3,09% foram positivos para o teste, enquanto que o exame (inspeção) da carne detectou o parasita em apenas 0,26% das carcaças (Dorny *et al.*, 2000).

Sato *et al.*, 2003, utilizando um antígeno recombinante e uma glicoproteína purificada no ELISA, verificaram que somente suínos com infecção superior a 16 cisticercos apresentaram positividade no teste imunoenzimático. Os autores observaram que os soros provenientes de suínos positivos na inspeção da língua apresentaram

positividade no ELISA e no imunoblot, respectivamente de 76 e 78%. Aproximadamente, 34 e 18% dos soros de suínos negativos para a inspeção da língua mostraram positividade no ensaio imunoenzimático e no imunoblot, respectivamente. Os pesquisadores concluem que animais de regiões endêmicas que não apresentem nódulos na língua devem ser sorologicamente avaliados, e além disso, os autores estabelecem uma correlação entre o número de cisticercos vivos (vesiculares) e densidade óptica, onde suínos com maior número de cisticercos encontrados na necrópsia apresentavam maiores densidades ópticas no ELISA.

O trabalho de Souza *et al.*, 1999, com ELISA utilizando antígeno excretor-secretor, proveniente de cultura *in vitro* de *C. cellulosae*, obteve resultados de 92% de sensibilidade e 100% de especificidade quando analisados os soros de suínos criados livres e infectados naturalmente. Ademais, os autores perceberam que nenhuma reação cruzada foi observada em suínos que possuíam também cisticercos de *T. hydatigena* ou cisto hidático.

Uma implementação recentemente adotada é o uso de antígenos de espécies heterólogas, as quais vêm obtendo bons resultados a partir da observação da existência de antígenos comuns entre espécies diferentes de tênias (Vaz & Livramento, 1996). De acordo com Espíndola, 1997, em trabalho de caracterização de antígenos de cisticercos de *T. crassiceps*, foi observado que parte dos antígenos comuns entre *T. crassiceps* e *T. solium* são glicoproteínas. Correa *et al.*, 2000, caracterizaram e comprovaram que estruturas glicoprotéicas de *T. crassiceps* podem ser úteis no imunodiagnóstico da cisticercose, visando assim uma alternativa à substituição do antígeno homólogo (*T. solium*) já que este é de difícil obtenção. A Figura 1 apresenta um gel de SDS-PAGE após a eletroforese, onde é possível verificar presença de bandas de peso molecular semelhante entre o *C. cellulosae* e o *C. longicollis*.

A *T. crassiceps* é um cestóideo de raposas, isolada em 1962 no Canadá. Posteriormente foram descritas infecções natural e experimental obtendo a forma larvária, denominada *C. longicollis*, que é encontrada em roedores. Por meio de sucessivas inoculações em camundongos via intraperitoneal, isolou-se a cepa ORF (Freeman, 1962 apud Bueno, 1999), que tem a capacidade de reproduzir-se assexuadamente por brotamentos exógenos (Larralde, *et al.*, 1990). Diversos trabalhos concluem e reforçam a facilidade de manutenção e obtenção do parasita em condições

de laboratório. (Bueno, 1999; Larralde *et al.*, 1990; Vaz & Livramento, 1996; Vaz *et al.*, 1996; Vaz *et al.*, 1997).

Figura 1 - SDS-PAGE 5-20% corado pelo Comassie blue dos antígenos de *Taenia crassiceps*, *Taenia solium* e *Taenia saginata* aplicados 35µg por poço.

- 1 - LV-Tcra: Líquido Vesicular de cisticerco de *T. crassiceps*
- 2 - LV-Tso: Líquido Vesicular de *T. solium*
- 3 - M-Tso: Antígeno de membrana de *T. solium*
- 4 - Es-Tso: antígeno de escólex de *T. solium*
- 5 - T-Tso: antígeno total de *T. solium*
- 6 - M-E-Tsag: antígeno de membrana e escólex de *T. saginata*
- 7 e 8 - T-Tso: antígeno total de *T. saginata*

Testes imunoenzimáticos comparando antígenos preparados a partir de metacestódeos foram propostos para o diagnóstico de cisticercose em suínos, utilizando antígenos de líquido vesicular (VF-Tcra) e extrato larval bruto (T-cra) de *T. crassiceps* e extrato de escólex (S-Ts) e extrato larval (T-Ts) de *T. solium*. Como resultado, verificou-se que os antígenos apresentaram boa performance, porém o VF-Tcra foi o melhor, com 96% e 80% de sensibilidade com dois níveis de *cut-off*, respectivamente,

além da especificidade de 97,5% e 100%, indicando ser este antígeno recomendado para pesquisas de cisticercose em criações de suínos (Pinto *et al.*, 2000).

Biondi *et al.*, 1996, analisaram o soro de suínos infectados e não infectados, utilizando o ELISA com antígenos de *C. longicollis*, e duas faixas de corte (*cut-off*). Os autores observaram que a sensibilidade do método foi de 100% independentemente do *cut-off* adotado, e a especificidade foi de 97% para o *cut-off* de valor mais baixo e 100% para o mais alto.

Ao realizar ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-*Cysticercus* em soros de suínos natural e experimentalmente infectados, Nunes *et al.*, 2000, obtiveram como resultados uma sensibilidade maior do teste com antígeno total e líquido vesicular de *C. longicollis* (96,4 e 100% respectivamente). Os testes com antígenos homólogos - antígeno total e líquido vesicular de *T. solium* - revelaram maior especificidade, com 96,4 e 98,2% respectivamente. Os autores concluíram que para fins de pesquisa epidemiológica em áreas endêmicas, a sensibilidade é mais importante do que a especificidade, baseando assim a escolha do ELISA com líquido vesicular de *C. longicollis* como o mais indicado para estes casos.

Pinto *et al.*, 2000, analisaram soros de suínos com infecção natural por cisticercos e soros de suínos com outras parasitoses através do ELISA utilizando antígenos de líquido vesicular (LV-Tcra) e total (T) de *C. longicollis* e antígeno de escólex (S) e total de cisticerco de *T. solium*. Diante de 2 *cut-off*'s, o antígeno de LV-Tcra obteve os mais altos níveis de sensibilidade com 96 e 80% e também de especificidade com 97,5 e 100%. Em função desta boa performance, os autores recomendaram o ELISA usando LV-Tcra para o diagnóstico da cisticercose suína.

Além da pesquisa de anticorpos, diversos autores têm proposto o ELISA baseado na pesquisa de antígenos circulantes. Neste caso, um anticorpo monoclonal, e por isso altamente específico, é fixado à placa e, posteriormente, colocado em contato com o soro a fim de capturar o antígeno circulante. Kerckhoven *et al.*, 1998, determinaram a sensibilidade e a especificidade desse método utilizando anticorpo monoclonal do tipo IgM contra produtos excretores-secretóres de *T. saginata*. Os resultados obtidos mostraram um aumento na sensibilidade de 56 para 92%, quando comparados o ELISA com anticorpo do tipo IgG monoclonal e o mesmo método sorológico utilizando anticorpo do tipo IgM e soro tratado por aquecimento. A

especificidade foi de 93,4% para o ELISA com IgG monoclonal e de 98,7% quando realizado o mesmo teste com o anticorpo do tipo IgM monoclonal.

Em infecções experimentais de suínos com diferentes quantidades de ovos de *T. solium*, a detecção de antígenos circulantes teve início entre as 2^o e 6^o semanas pós-infecção e a presença de cisticercos viáveis está relacionada com a positividade do ELISA (Nguekam *et al.*, 2002).

O imunodiagnóstico da doença em humanos também vem sendo estudado a fim de aperfeiçoar os métodos sorológicos, obtendo a máxima sensibilidade e especificidade. A forma humana da cisticercose, caracterizada pelo acometimento do sistema nervoso, a neurocisticercose (NC), foi estudada por Bueno *et al.*, 1998, onde ELISA e Imunoblot foram realizados utilizando antígeno homólogo (extrato antigênico salino total de cisticerco de *T. solium* – Tso-ST) e heterólogo (extrato antigênico de líquido vesicular de *T. crassiceps* – Tcra-LV) para amostras de soro e líquido cefalorraquidiano de pacientes com NC. Os resultados indicaram que havia semelhança na sensibilidade e na especificidade nos dois testes tanto com antígeno Tso-ST quanto com Tcra-LV, indicando que os cisticercos de *T. crassiceps* são fonte alternativa de antígenos em testes imunodiagnósticos da NC, por apresentar epítomos em comum com o antígeno homólogo.

Para o diagnóstico da neurocisticercose, o ELISA com antígeno salino total de *T. solium* e antígeno do fluido vesicular de *T. crassiceps* apresentou respectivamente, 94,1% e 95,6% de sensibilidade, para a determinação de anticorpos no fluido cerebroespinal e respectivamente, 70,6% e 91,2% de sensibilidade, para a determinação de anticorpos no soro. A especificidade foi de 100% para o fluido cerebroespinal e 80% para a determinação no soro para ambos os antígenos. Esses resultados sugerem que o ELISA com antígeno de *T. crassiceps* seja utilizado para estudos sorológicos e confirmação de resultados positivos pelo método imunoblot onde são detectados peptídeos específicos (Bueno *et al.*, 2000).

Ev *et al.*, 1999, purificaram proteínas específicas do escólex de cisticerco de 13, 17 e 26 KDa através de eletroforese em gel de poliacrilamida seguida de eletroeluição. No Western Blot foram verificados o reconhecimento dessas bandas pelos anticorpos presentes no soro de pacientes com neurocisticercose. Tais proteínas por sua vez não mostraram reações cruzadas quando na presença de soro de pacientes portadores de

teníase ou hidatidose. Posteriormente, foram realizados então ELISA com os antígenos purificados de 13, 17 e 26 kDa, e estes demonstraram uma especificidade de 53%, 88% e 100% respectivamente. Quanto à sensibilidade, os autores obtiveram respectivamente, 100%, 80% e 100%, indicando que o antígeno de 26 kDa é o mais sensível e específico para a detecção de anticorpos no soro de pacientes com neurocisticercose.

2.7. O ELISA como ferramenta na epidemiologia da cisticercose

Diversos trabalhos consideram a técnica de ELISA como importante metodologia na pesquisa epidemiológica. No oeste da República dos Camarões, Pouedet *et al.*, 2002, propuseram a avaliação sorológica em 707 suínos de comunidades rurais por dois tipos de ELISA, além da inspeção da língua. Fez-se uso do ELISA para pesquisa de antígeno circulante, chamado de sanduíche (Ag-ELISA) e do ELISA para pesquisa de anticorpo anti-*Cysticercus* (Ab-ELISA). Foi verificado que 11% (78) das amostras apresentaram positividade no Ag-ELISA, e 21% (154) foram positivas no Ab-ELISA, enquanto que o índice de positividade no exame de inspeção da língua foi de 6,1% (43).

Phiri *et al.*, 2002, determinaram a prevalência e a importância da cisticercose suína em duas regiões da Zâmbia. Os autores utilizaram como recurso para o diagnóstico sorológico o ELISA-sanduíche a fim de detectar o antígeno circulante além do exame de palpação da língua. A análise sorológica revelou que de um grupo de 98 suínos, 20 animais (20,8%) apresentaram positividade no ELISA, enquanto que pelo exame da língua o percentual de positividade foi de 8,2%. No segundo grupo com 151 animais, 14 suínos (9,3%) mostraram-se positivos no ELISA, enquanto que 8 animais (5,2%) foram positivos ao exame da língua.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- 1–Avaliação da cisticercose em suínos experimentalmente infectados com ovos de *T. solium* em suínos.
- 2–Padronização do teste imunoenzimático (ELISA) para o diagnóstico da cisticercose em suínos, utilizando antígeno total (T-Tso) e de escólex (Es-Tso) de *C. cellulosae* e antígeno de líquido vesicular de *C. longicollis* (LV-Tcra).

3.2. Específicos

- 1–Obtenção e preparo de antígenos total e de escólex a partir de *C. cellulosae* retirados de músculos de suínos naturalmente infectados.
- 2–Padronização da técnica imunoenzimática (ELISA), com os antígenos total e de escólex de *C. cellulosae* e líquido vesicular de *C. longicollis*.
- 3–Avaliação do teste de ELISA com os 3 antígenos propostos no imunodiagnóstico da cisticercose suína, em soros de animais experimentalmente infectados e portadores de infecção natural confirmada.
- 4–Análise do soro de animais provenientes de regiões endêmicas para a cisticercose, utilizando o ELISA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Saúde Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga.

4.1. Infecção experimental em suínos

Sete suínos da raça landrace, desmamados, procedentes de criação tecnificada e sabidamente negativos para cisticercose foram mantidos em instalações do Biotério da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, Pirassununga. Cada animal foi identificado pelo sistema australiano de marcação. Os animais foram inoculados via oral com 200.000 ovos de *T. solium* (Stevenson, 1983). A padronização do inóculo foi feita em câmara de Neubauer. Os ovos do parasita foram obtidos após tratamentos de pacientes com exames de fezes positivos para *Taenia* sp com Niclosamida (Bayer AG, Leverkusen, Germany), seguido da administração de um purgativo salino (Aluja *et al.*, 1999). As tênias eliminadas foram lavadas em solução fisiológica por repetidas vezes e mantidas em solução fisiológica com antibióticos a uma temperatura de 4°C em geladeira (Lightowers *et al.*, 1996; Mayta *et al.*, 2000; Verastegui *et al.*, 2000) até a retirada dos ovos. O diagnóstico específico foi baseado nas ramificações das proglotes grávidas segundo Mayta *et al.*, 2000.

4.2. Obtenção dos soros

Antes da inoculação e posteriormente, a cada 7 dias, foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue dos 7 animais até a 20ª semana de infecção. Após centrifugação, os soros obtidos foram mantidos em freezer a 20° C negativos.

4.3. Exame clínico da língua *in vivo* (*ante-mortem*)

À partir dos 40 dias de infecção foram realizados o exame da língua nos animais infectados, a cada 7 dias. Este procedimento foi estabelecido devido ao tempo mínimo necessário para que os cisticercos estivessem desenvolvidos que é de aproximadamente 60 dias (Escobar *et al.*, 1972; Manson-Bahr & Bell, 1987; Pessoa & Martins, 1982).

4.4. Quantificação e distribuição dos cisticercos

Após 140 dias de infecção, os animais foram abatidos na média de um animal por semana e realizadas as contagens dos cisticercos por músculo ou região de localização.

A análise dos tecidos foi realizada através de finos cortes paralelos, com auxílio de bisturi, iniciando pela cabeça, onde foram dissecados todos os músculos, principalmente os mastigadores (masséter e pterigóide), diafragma e a língua, além do exame do cérebro. Foram examinados ainda músculos das regiões esofágica, cervical, dorsal e também os membros anterior e posterior. Da mesma forma órgãos como o coração, pulmão, rins, baço, pâncreas e fígado foram dissecados e examinados.

4.5. Extratos antigênicos

4.5.1. Obtenção dos cisticercos para o preparo de antígenos

Foi identificado na região de São João da Ponte, Norte do Estado de Minas Gerais, um suíno criado livre em uma propriedade, e que apresentava evidências clínicas de cisticercose, como dificuldades respiratórias, cisticercos na língua e região anterior muito desenvolvida. O animal foi sacrificado e assim, tornou-se possível verificar que o mesmo apresentava infecção generalizada. A Figura 2 mostra um suíno com infecção natural generalizada.

Figura 2 – *Cysticercus cellulosae* (seta) em tecido subcutâneo de suíno portador de infecção generalizada

Após o animal ter sido sacrificado, durante a necrópsia, diversos cisticercos desprenderam-se com facilidade dos tecidos. Estes cisticercos foram recuperados e após sucessivas lavagens com solução salina, foram mantidos à temperatura de 80°C negativos*, obtendo assim cisticercos íntegros, uma vez que foi preservado o líquido vesicular. A partir deste material foi preparado o antígeno total de *C. cellulosae*. Os tecidos foram mantidos como pequenas peças congeladas à temperatura de 20°C negativos, e descongeladas à medida que foram processadas.

Com auxílio de um bisturi e pinça, os cisticercos foram individualmente removidos do tecido muscular e lavados exaustivamente em solução salina, visando o preparo do extrato antigênico de escólex de *C. cellulosae*. Os cisticercos foram armazenados em microtubos a 20°C negativos.

4.5.2. Preparo do extrato antigênico total de *C. cellulosae* (T-Tso)

O antígeno foi preparado seguindo as recomendações de Pinto *et al.*, 2000, com algumas modificações. Para o preparo do antígeno T-Tso, foram utilizados os cisticercos íntegros.

Após o descongelamento, os cisticercos mantidos à 80°C negativos foram homogeneizados no homogeneizador de Potter, acrescido de um pequeno volume de solução fisiológica, em banho de gelo, por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para tubo em banho de gelo e submetido ao ultra-som (USC 5000, Unique, São Paulo, SP, Brasil), 20 kHz por 4 vezes, durante 30 segundos, com intervalos de 30 segundos. Posteriormente, a solução foi então centrifugada a 15.000g, à temperatura de 4°C, durante 30 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado um inibidor de protease, PMSF (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), obtendo uma concentração final de 1 mM. A solução antigênica foi aliquotada e congelada em freezer 20°C negativos.

* Neste caso a temperatura utilizada foi de 80°C negativos porque parte do material também seria usada em experimentos com o RNA do parasita.

4.5.3. Preparo do extrato antigênico de escólex de *C. cellulosae* (Es-Tso)

Para o preparo do antígeno Es-Tso, foram utilizados cisticercos obtidos das peças mantidas congeladas. As peças foram descongeladas e os cisticercos retirados e transferidos para uma placa de petri com solução salina, sobre banho de gelo. Logo depois, procedeu-se à separação da membrana e do escólex. Para o preparo do extrato antigênico do escólex, os demais procedimentos adotados foram os mesmos para o extrato antigênico total descrito no item 4.5.2.

4.5.4. Antígeno de líquido vesicular de *C. longicollis* (LV-Tera)

O antígeno de líquido vesicular da forma larvária de *T. crassiceps* foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Adelaide José Vaz, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, e preparado segundo método descrito por Espíndola (1999).

4.5.5. Dosagem de proteínas

Para as dosagens de conteúdo protéico dos extratos antigênicos foi utilizado o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, CA, USA), baseado no método de Bradford, 1976.

4.6. ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

4.6.1. Padronização do teste imunoenzimático

Foram consideradas as seguintes variáveis para a padronização: concentração antigênica, diluição das amostras, título do conjugado, tempo e temperatura de incubação, utilizando soros padrão positivos e negativos (Pinto *et al.*, 2000).

Na padronização do teste, cada uma das variáveis citadas foram avaliadas. Os resultados mais satisfatórios apresentaram maiores densidades ópticas para os soros controles positivos e menores para os soros controles negativos.

Após diversos testes preliminares de padronização da técnica para a sorologia pelo ELISA, mostraram-se satisfatórias a sensibilização da placa com o antígeno total de *C. cellulosa* pelo tempo de 1 hora à temperatura ambiente seguida por 14 horas de à temperatura de 4°C.

As concentrações de antígeno por cavidade avaliadas foram de 0,25, 0,5 e 1,0µg. Não foram verificadas diferenças significativas nos resultados das leituras das amostras controle para as 3 concentrações. Dessa forma, foi adotada a concentração de 0,5µg de antígeno por cavidade.

Quanto à diluição do soro, as diluições avaliadas foram de 1:100, 1:200 e 1:400, observando melhores resultados na diluição 1:100. O tempo de incubação adotado para o soro foi de 60 minutos, uma vez que testes iniciais realizados com tempos de 30 e 45 minutos ocasionaram o decréscimo das absorbâncias de todas as amostras controle.

Devido à alta sensibilidade do cromógeno da reação antígeno-anticorpo, o 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina (TMB – Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), foram necessárias algumas modificações na técnica inicial proposta por Pinto, *et al.*, 2000. Cada etapa de lavagem foi acrescida de mais um ciclo, gerando no total 6 ciclos de lavagens. A diluição do conjugado adotada foi de 1:10000.

Após as padronizações, a técnica para o ELISA foi a seguinte: placas de fundo plano (Costar, Corning, USA) foram previamente sensibilizadas com os antígenos na concentração de 0,5µg diluídos em 100µL de tampão carbonato/bicarbonato a 0,5M e pH 9,6, por cavidade. Logo após, as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora e depois a 4°C por 14 horas. Terminada a incubação, procedeu-se à lavagem das placas utilizando 100µL de PBS contendo tween 20 (PBS-T) a 0,05%, por 6 vezes durante 1 minuto. Em seguida foi realizado o bloqueio com leite desnatado (Molico, Nestlé) a 5%, dissolvido em PBS. Foram pipetadas 150µL da solução de bloqueio, em cada cavidade. Foi realizada nova incubação por 1 hora. Após novo ciclo de lavagens sucessivas, os soros foram diluídos em PBS-T contendo leite desnatado à 1%, na proporção 1:100 e distribuídos nas cavidades, ao volume de 100µL por cavidade. As placas foram submetidas à temperatura de 37°C durante 1 hora. Depois de novas lavagens, foram colocados 100µL por cavidade do conjugado: soro de coelho anti-IgG de suíno (Molécula total), marcado com peroxidase (Sigma Chemical Company, St.

Louis, MO, USA), diluído na proporção 1:10000, em solução PBS-T e leite desnatado a 1%. As placas foram incubadas à 37°C por 1 hora. Logo em seguida, repetiu-se a etapa de lavagem e foi feita a distribuição do substrato: 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina (TMB – Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), sendo utilizado 100µL deste, por cavidade. As placas foram deixadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Passados 8 minutos, a reação enzimática foi interrompida com 100µL de ácido sulfúrico 2N por cavidade. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Labsystems Multiskan, Finlândia) em comprimento de onda de 450nm.

4.6.2. Avaliação sorológica da cisticercose suína nos animais experimentalmente infectados

Todas as amostras de soro foram analisadas em duplicatas para os 3 antígenos T-Tso, Es-Tso e LV-Tcra. Após as padronizações, realizaram-se os ensaios imunoenzimáticos nos soros dos suínos experimentalmente infectados. Em cada teste, foi introduzido um branco a fim de eliminar as interferências dos reagentes. Como controle positivo, foi utilizado o soro de um suíno sabidamente com cisticercose natural generalizada.

As amostras coletadas dos sete suínos antes da infecção foram chamadas amostra do “dia zero”. A determinação do título de anticorpos foi realizada até a 20ª semana uma vez que os cisticercos estavam completamente desenvolvidos por volta da 9ª semana, aproximadamente 60 dias após a infecção.

A análise de concordância entre os testes com os 3 antígenos foi realizada através do cálculo do coeficiente de correlação linear de Pearson, utilizando o programa Proc Corr do Statistical Analysis System (SAS), 1989.

Para as sensibilidades dos antígenos, utilizou-se do cálculo do índice de sensibilidade (p) para cada teste, nos dias analisados, considerando o desvio-padrão .

$$p = \text{N}^\circ \text{ amostras positivas} / 7 \text{ (N}^\circ \text{ de amostras)}$$

$$\text{Sensibilidade (\%)} = p \times 100$$

4.6.3. Avaliação sorológica da cisticercose suína nos animais naturalmente infectados

Todas as amostras de soro foram analisadas em duplicatas para os 3 antígenos T-Tso, Es-Tso e LV-Tcra. Foram realizados ensaios imunoenzimáticos de amostras de 6 suínos naturalmente infectados e sabidamente positivos para cisticercose, sendo a infecção confirmada pela necrópsia. Também foram introduzidos um controle positivo, um controle negativo e o branco.

4.6.4. Avaliação sorológica da cisticercose suína nos animais suspeitos

Amostras de 14 suínos procedentes de 3 criações tradicionais (não tecnificadas), localizadas em área rural, próxima à cidade de São João da Ponte, Estado de Minas Gerais, foram avaliadas pelo ELISA. Estes animais foram considerados suspeitos de infecção pela cisticercose porque entre eles foram encontrados suínos naturalmente infectados. Além disso, o parasitismo destes suínos não foi confirmado pelos exames “*ante-mortem*” e “*post-mortem*”. No ELISA, foi utilizado apenas o antígeno Es-Tso uma vez que o seu comportamento nas avaliações sorológicas dos animais experimentalmente infectados foi melhor. Também neste caso foram introduzidos controles positivo e negativo, além do branco.

4.6.5. Avaliação sorológica da cisticercose suína nos animais negativos

Soros de 10 animais procedentes de uma criação tecnificada, localizada Campus da FZEA/USP, Pirassununga, e sabidamente negativos para cisticercose foram avaliados pelo ELISA com os 3 antígenos. Foram introduzidos controles positivo e negativo, além do branco.

4.6.6. Estabelecimento do ponto de corte (*cut-off*)

Para o estabelecimento do *cut-off*, foram avaliados os soros dos suínos usados na infecção experimental antes da inoculação (“dia zero”) e dos suínos desmamados provenientes de criação tecnificada do Campus da FZEA/USP, Pirassununga.

Para cada antígeno avaliado pelo ELISA, estabeleceu-se o *cut-off* respectivo. A média das absorbâncias dessas amostras foram acrescidas de duas vezes o desvio-padrão calculado, obtendo-se assim o *cut-off*. Amostras com valores acima do *cut-off* são consideradas positivas, e aquelas com valores abaixo do mesmo são consideradas negativas para o teste em questão.

$$Cut-off = \text{Média das absorbâncias das amostras negativas} + 2 \times \text{Desvio padrão}$$

5. RESULTADOS

5.1. Infecção experimental

Ao longo da infecção experimental foram realizados, periodicamente, exames clínicos da língua e da mucosa ocular. No entanto, não foi detectada a presença de cisticercos no exame *in vivo*, em nenhum dos animais. A infecção experimental com ovos de *T. solium* mostrou-se eficiente uma vez que todos os suínos apresentaram cisticercos no exame *post-mortem*. No entanto, o parasitismo foi baixo tendo em vista que foram inoculados aproximadamente 200.000 ovos para cada suíno. Foram recuperados apenas 238 cisticercos durante o exame *post-mortem* (Tabela 1).

Os suínos inoculados apresentaram no exame *post-mortem* cisticercos em seus tecidos, em quantidade variável. Todos os cisticercos foram considerados viáveis, uma vez que se apresentavam translúcidos e com escólex visível através da membrana, indicando não calcificação. Os cisticercos encontrados tinham medidas aproximadas de 0,1cm x 0,3cm.

Quanto à distribuição, foi observado que a musculatura do membro anterior e do membro posterior foram as que mais apresentaram cisticercos. Verificou-se a presença de 24,38% (58) dos cisticercos no membro anterior, 28,57% (68) no membro posterior e 17,65% (42) em músculos da região dorsal.

Apenas 18,67% (43) dos cisticercos foram encontrados em tecidos indicados pelo serviço de inspeção visando a pesquisa da cisticercose (coração, língua, diafragma e músculos mastigadores). Um animal apresentou apenas um cisto, na região do membro posterior (Suíno N° 2).

Observou-se que cada animal apresentou um comportamento diferente à infecção experimental, em função da quantidade de cisticercos encontrados e da localização dos mesmos. A Tabela 1 apresenta os resultados da infecção experimental em todos os animais, indicando os tecidos e a quantidade de parasitas identificados na necrópsia.

Tabela 1 – Distribuição dos cisticercos por órgãos e regiões em suínos experimentalmente infectados

Órgão/Região	Suínos							Total por órgão/ região	%
	1	2	3	4	5	6	7		
Coração	9	0	1	0	2	4	4	20	8,4
Diafragma	4	0	0	0	2	0	3	9	3,78
Língua	5	0	0	0	1	3	0	9	3,78
Masseter	0	0	0	2	1	7	4	14	5,88
Região Cervical	0	0	0	0	0	2	0	2	0,84
Região Esofágica	0	0	0	0	0	0	1	1	0,42
Membro Dianteiro	13	0	3	3	4	28	7	58	24,38
Membro Traseiro	7	1	1	4	8	32	15	68	28,57
Região Dorsal	18	0	0	2	6	9	12	47	19,75
Região da Nuca	2	0	1	0	2	0	1	8	3,36
Região Maxilar	2	0	0	0	0	0	0	2	0,84
Total por animal	60	1	6	11	26	85	47	238	100

5.2. ELISA

Depois de realizados os cálculos, os valores em absorbância dos *cut-off*s para cada antígeno foram: 0,316 para o T-Tso; 0,325 para o Es-Tso; e 0,100 para o LV-Tcra.

5.2.1. Avaliação sorológica dos suínos experimentalmente infectados

A Figura 3 apresenta a média das absorbâncias, determinadas pelo ELISA nos animais infectados experimentalmente, utilizando os antígenos T-Tso, Es-Tso e LV-Tcra. Foram analisadas amostras coletadas dos animais a partir do “dia zero (antes da infecção) até a 20^a semana.

Para os 3 antígenos foram encontrados comportamentos semelhantes ao longo da infecção experimental. Significativo aumento dos níveis de anticorpos foi observado aos

dias 21 pós-infecção. Foram observadas oscilações dos níveis de anticorpos ao longo do curso da infecção, com pequeno decréscimo após o 28^o dia pós-infecção seguido de aumento gradual a partir do 63^o dia pós-infecção, mantendo esta tendência até o final do experimento. Os maiores níveis ocorreram nos dias 21 e 140 pós-infecção.

Com os valores do *cut-off* estabelecidos, os resultados das absorbâncias das amostras dos dias 7, 21, 28, 49, 70, 91, 112 e 133 dos suínos experimentalmente infectados foram dispostos nas Figuras 4, 5 e 6. As amostras acima foram escolhidas com o objetivo de traçar um perfil representativo de todo o período da infecção. A Figura 7 apresenta as sensibilidades dos testes nos dias analisados, bem como os desvios-padrão para cada sensibilidade, representados pelas barras de erros.

5.2.2. Avaliação sorológica da cisticercose suína nos animais naturalmente infectados

Os resultados da avaliação sorológica pelo ELISA nos animais com infecção natural estão dispostos nas Figuras 4, 5 e 6. Observa-se que os títulos de anticorpos em todos os animais avaliados estão acima do *cut-off*. Este resultado foi semelhante para os 3 antígenos avaliados.

5.2.3. Avaliação sorológica da cisticercose suína nos animais suspeitos para cisticercose

Na Figura 8 estão as absorbâncias dos soros de suínos suspeitos para cisticercose, procedentes de criações tradicionais, determinadas pelo ELISA utilizando o antígeno Es-Tso. Foi observado que 64,3% (9) das amostras revelaram absorbância superior ao *cut-off*, indicando a existência de animais com provável infecção natural por cisticercos.

Figura 3 – Absorbâncias de imunoglobulinas da classe IgG em soros de suínos experimentalmente infectados, determinados pelo ELISA, utilizando os antígenos T-Tso, Es-Tso e LV-Tcra.

Figura 2 - Absorbâncias determinadas pelo ELISA utilizando antígeno T-Tso em soros de 7 suínos com cisticercose experimental.

Figura 3 - Absorbâncias determinadas pelo ELISA utilizando antígeno Es-Tso em soros de 7 suínos com cisticercose experimental.

Figura 4 - Absorbâncias determinadas pelo ELISA utilizando antígeno LV-Tcra em soros de 7 suínos com cisticercose experimental.

Figura 5 – Sensibilidade do ELISA utilizando os antígenos T-Tso, Es-Tso e LV-Tcra, em soros de suínos experimentalmente infectados, determinada aos 21, 28, 49, 70, 91, 112 e 133 dias pós-infecção.

Figura 6 - Absorbâncias de soros de suínos suspeitos para cisticercose, determinadas pelo ELISA utilizando o antígeno Es-Tso.

5.2.4. Índice de Reatividade

O índice de reatividade adotado é o resultado da razão entre o valor da absorbância da amostra num determinado dia (pós-infecção) e o valor da absorbância da amostra do mesmo animal no “dia zero” (antes da infecção). Com esse índice, tornou-se possível a avaliação do comportamento do título de anticorpos nos suínos após a infecção experimental. Valores de índice de reatividade maiores do que 1 indicam aumento no título de anticorpos.

Na Figura 9 são apresentados os Índices de reatividade médios das amostras dos suínos analisados nos testes imunoenzimáticos, para cada antígeno proposto no objetivo deste trabalho. Os índices de reatividade foram determinados em intervalos de aproximadamente 30 dias, a partir do 28º dia, passando pelos dias 63, 91 até o dia 119 pós-infecção, objetivando traçar um perfil representativo do período da infecção.

A Tabela 2 apresenta os índices de reatividade de cada suíno no 119º dia pós-infecção, uma vez que este dia foi o que apresentou os maiores valores dos índices de reatividade para os 3 antígenos calculados, o que pode ser observado na Figura 9. Dessa forma, torna-se possível a avaliação do comportamento sorológico do animal frente ao estabelecimento parasitário através do número de cisticercos encontrados na análise *post-mortem*.

Tabela 2 – Número de cisticercos encontrados na análise *post-mortem* e os índices de reatividade (IR) para os 3 antígenos avaliados no ELISA para cada suíno experimentalmente infectado, no 119º dia pós-infecção

Suíno	Nº de cistos	IR (T-Tso)	IR (Es-Tso)	IR (LV-Tcra)
1	60	2,5	4,1	7,2
2	1	4,8	6,1	14,2
3	6	2,4	3,4	4,5
4	11	1,8	3,3	5,2
5	26	2,7	3,7	12,4
6	45	3,7	3,5	17,9
7	47	4,5	4,6	9,3

Figura 9 – Índices de reatividade (IR) médio dos 7 suínos após a infecção experimental, para os antígenos T-Tso, Es-Tso e LV-Tcra.

6. DISCUSSÃO

Foram administrados por via oral, aproximadamente 200.000 ovos de *T. solium* por animal. As proglotes grávidas contendo os ovos foram conservadas segundo as recomendações descritas em trabalhos anteriores (Stevenson, 1983; Lightowlers *et al.*, 1996; Mayta *et al.*, 2000; Verastegui *et al.*, 2000). Verastegui *et al.*, 2000, relatam que proglotes grávidas mantêm a viabilidade dos ovos quando resfriadas à 4°C por um período de até 4 meses, mantidas em dicromato de potássio.

Infecções leves são caracterizadas basicamente pela ausência de evidências clínicas. No experimento proposto, os suínos infectados com ovos de *T. solium* apresentaram as características típicas de uma infecção leve apesar da maciça quantidade de ovos a eles administrados. Nenhum dos animais infectados experimentalmente apresentou cisticercos ao exame clínico *in vivo* da língua e da mucosa ocular. A baixa sensibilidade do exame *ante-mortem* poder ser atribuído à infecção não ser disseminada (W.H.O., 1993), quando os cisticercos se localizam em áreas onde não há a possibilidade da visualização ao exame *in vivo*. Pouedet *et al.*, 2002, examinaram animais de região endêmica, e encontraram cisticercos na língua de 6,1% dos suínos examinados. Phiri *et al.*, 2002, também examinaram a língua de dois grupos de suínos naturalmente infectados procedentes de regiões endêmicas, encontrando cisticercos em 8,2% e 5,2% dos animais.

Na Tabela 1 verificam-se as maiores quantidades de cisticercos encontrados em músculos da região dorsal com 19,75% (47), membro anterior com 24,38% (58) e membro posterior com 28,57% (68). No coração, masséteres, diafragma e na língua, considerados como locais indicados para a inspeção pós-abate foram encontrados respectivamente 8,4% (20), 5,88% (14), 3,78% (9) e 3,78% (9) dos cisticercos. Foram encontrados apenas 238 cisticercos em todos os animais.

Observa-se dessa forma que, no experimento proposto, grande parte dos ovos perdeu a capacidade de infectar os hospedeiros após um período de armazenamento de aproximadamente 2 meses, onde as proglotes foram mantidas resfriadas à temperatura de 4°C e em solução salina contendo penicilina e estreptomicina. Kaur *et al.*, 1995, obtiveram número maior de cisticercos recuperados na necrópsia, após infecção experimental em suínos com 20000 ovos. No entanto, a maior parte dos suínos foi imunossuprimida com antiinflamatório do grupo esteróide, o que justifica o maior parasitismo. Santamaria *et al.*, 2002, observaram após inoculação de diferentes quantidades de ovos de *T. solium* em grupos de suínos, que os animais que receberam 10000 ovos apresentaram entre 16 e 472 cisticercos recuperados na necrópsia. Os mesmos autores relataram que suínos infectados com 100000 ovos apresentaram ao exame *post-mortem* entre 374 e 1253 cisticercos, e concluem que a eficiência da infecção foi satisfatória.

Na infecção experimental proposta, verifica-se que a infecção foi eficiente, ainda que uma baixa quantidade de cisticercos foi encontrados na necrópsia, uma vez que uma grande quantidade de ovos foi administrada aos animais. Essa observação reforça a hipótese que parte dos ovos utilizados na infecção experimental não possuía a capacidade de infectar os animais em função do tempo que foram conservados.

Boa *et al.*, 2002, analisaram tecidos de suínos de localidades da Tanzânia, naturalmente infectados a fim de determinar a distribuição e a densidade dos cisticercos de *T. solium* por grupo de músculos e órgãos. Os autores observaram que apenas 10,6% dos cisticercos encontrados estavam nos músculos preconizados como locais indicados para a realização da inspeção sanitária.

No experimento proposto, verificou-se no exame *post-mortem*, que apesar do baixo parasitismo encontrado, a pesquisa da cisticercose nos órgãos (coração, língua, diafragma, masséter e pterigóide) indicados para a rotina de inspeção foi capaz de identificar 6 (85,7%) animais infectados. No entanto, deve-se ressaltar que o exame *post-mortem* realizado no laboratório foi minucioso, o que é inviável de ser praticado à nível de matadouros, dado o grande número de abates diários.

A variação na quantidade de cisticercos encontrados entre os animais pode ser atribuída a diferenças de infectividade entre os ovos administrados, ou ainda devido a uma possível diferença na resistência ao parasita entre os suínos, uma vez que o inóculo

foi padronizado e a via de inoculação foi à mesma para todos os animais. Santamaria *et al.*, 2002, verificaram quantidades variáveis de cisticercos recuperados na necrópsia em suínos que receberam a mesma quantidade de ovos. Os autores também atribuíram o resultado a diferenças entre os suínos.

No experimento proposto todos os cisticercos encontrados estavam viáveis. Del Brutto *et al.*, 1988, afirmam que a grande quantidade de cisticercos viáveis encontrados em animais infectados, pode ser atribuída à imunotolerância, onde o parasita utiliza de mecanismos para a evadir-se da resposta imune, minimizando ou até mesmo escapando das ações de defesa do hospedeiro. Santamaría *et al.*, 2003, infectaram suínos com diferentes quantidades de ovos de *T. solium*, e verificaram que animais inoculados com as maiores quantidades de ovos (10.000 e 100.000), apresentaram alta percentagem de cisticercos vesiculares ao exame *post-mortem*. Os autores concluem que a severidade da doença e a possível regulação dos mecanismos de evasão parasitária dependem do número de metacistos estabelecidos e que permanecem sob a forma vesicular.

Todos os suínos, ainda que negativos ao exame da língua, apresentaram níveis detectáveis de IgG em todos os períodos da infecção (Figuras 3, 4, 5, e 6). Pouedet *et al.*, 2002, examinaram animais de região endêmica, e encontraram cisticercos na língua de 6,1% dos suínos examinados, enquanto que na pesquisa de anticorpos pelo ELISA a positividade observada foi de 21%. Phiri *et al.*, 2002, também examinaram a língua de dois grupos de suínos em regiões endêmicas diferentes, encontrando cisticercos em 8,2% e 5,2% dos animais, enquanto que no ELISA, foram verificados anticorpos em 20,8% no primeiro grupo e 9,3% no segundo grupo. Sato *et al.*, 2003, após o exame da língua *in vivo* de suínos experimentalmente infectados, analisaram o soro daqueles animais que apresentaram resultados negativos no referido exame. Os autores verificaram que destes animais, 34% foram positivos no ELISA. Verifica-se assim que o exame *ante-mortem* pode ser menos sensível, quando comparado com os testes sorológicos, confirmando a necessidade de sua realização principalmente em suínos procedentes de regiões endêmicas.

O preparo dos extratos antigênicos a partir do cisticerco de *T. solium*, utilizados em testes sorológicos constitui-se num grande problema. Deve-se ressaltar que existe uma dificuldade em encontrar o animal naturalmente infectado e nas infecções experimentais há a necessidade de manter o animal em condições de laboratório,

principalmente quando este está localizado em áreas urbanas. Para a realização das infecções experimentais existe ainda, a dificuldade em obter exemplares adultos da *T. solium* e o risco de infecção humana na manipulação dos seus ovos justificando a procura de antígenos alternativos. Nesse sentido, o antígeno produzido a partir de *C. longicollis* apresenta vantagens, uma vez que ele pode ser produzido mediante inoculação intraperitoneal em camundongos, e os animais podem ser facilmente mantidos em biotérios a um custo menor. Além disso, é sabido que esse antígeno heterólogo possui estruturas glicoprotéicas comuns à larva de *T. solium* (Espíndola, 1997), importantes no imunodiagnóstico da cisticercose, devido a presença de epítomos semelhantes entre as duas espécies. (Bueno, 1999; Larralde *et al.*, 1990; Vaz & Livramento, 1996; Vaz *et al.*, 1996; Vaz *et al.*, 1997).

O título de anticorpos do tipo IgG, traduzido pelas absorbâncias das amostras, não apresentou correlação direta com o número de cisticercos encontrados nos animais infectados experimentalmente, sendo detectados em todos os períodos da infecção (Figuras 3, 4, 5 e 6). Sato, *et al.*, 2003, verificaram níveis de anticorpos do tipo IgG em suínos naturalmente infectados que apresentaram mais de 16 cisticercos na necrópsia. Ressalta-se dessa forma, a alta sensibilidade do teste imunoenzimático para os 3 antígenos avaliados pois, eles foram capazes de detectar anticorpos em suínos que apresentaram poucos cisticercos no exame *post-mortem*.

Todos os suínos infectados experimentalmente apresentaram níveis crescentes de anticorpos determinados pelo ELISA utilizando os 3 antígenos (Figura 3). A mesma figura mostra a elevação dos títulos de anticorpos a partir dos 21 dias pós-infecção até o fim do experimento (140 dias). Foi verificado que no 7º dia, a maior parte das amostras ainda exibiam absorbância abaixo do *cut-off* estabelecido para os antígenos, o que era esperado em função do tempo necessário para o alojamento e o desenvolvimento do parasita (Escobar *et al.*, 1972; Manson-Bahr & Bell, 1987; Pessoa & Martins, 1982). Na amostra do 21º dia pós-infecção podem ser considerados positivos 71,42% dos animais quando usado o antígeno T-Tso, 100% dos animais para o antígeno Es-Tso e 71,42% quando realizado o ELISA com antígeno LV-Tcra (Figuras 4, 5, 6 e 7). Nguekam *et al.*, 2002, infectaram experimentalmente suínos e correlacionaram a positividade do ELISA com a presença de cisticercos não calcificados. Santamaria *et al.*, 2002, observaram que suínos infectados com quantidades de 1000, 10000 e 100000 ovos por animal,

apresentavam níveis de anticorpos anti-*Cysticercus* detectáveis aos 30 dias de infecção. De acordo com os autores, a quantidade de cisticercos encontrados na necrópsia, variou de 2 a 1253 parasitas por animal sendo a maior parte viável. Assim, verifica-se que níveis crescentes de anticorpos nas amostras até o final do experimento podem estar relacionados com a existência de cisticercos viáveis, sendo que estes ainda estariam metabolicamente ativos, produzindo e secretando substâncias que estimulariam a resposta humoral dos animais..

Este aumento verificado no título de anticorpos ao longo da infecção, pode ser atribuído ao fato dos cisticercos liberarem uma maior quantidade de antígenos (Flisser *et al.*, 1990), sobretudo após o período mínimo para o desenvolvimento do parasita. Por outro lado, Aluja *et al.*, 1996, observaram que os títulos de anticorpos decresciam após 92 dias, em suínos infectados experimentalmente. Os mesmos autores verificaram que animais com cisticercos viáveis apresentaram soropositividade aos 281 dias pós-infecção, quando havia terminado o período experimental.

A Figura 7 apresenta as sensibilidades e os desvio-padrão de cada teste, caracterizados pelas barras de erros. Os resultados revelam diferenças na eficiência do ELISA utilizando os antígenos propostos. Observa-se que o antígeno T-Tso possui sensibilidade inferior, ainda que considerado o intervalo do desvio-padrão em relação aos outros 2 antígenos. O teste utilizando antígeno T-Tso apresentou sensibilidades que variaram de 42,8 a 100%. O antígeno LV-Tcra apresentou sensibilidades entre 71,4 e 100%. Em relação ao antígeno Es-Tso, foi observado sensibilidades que variaram de 85,7 à 100%, dependendo do período da infecção. Índice de 100% de positividade determinados pelo ELISA foi encontrado no 133^o dia pós-infecção para o T-Tso; nos dias 21^o, 28^o, 70^o, 112^o e 133^o pós-infecção para o Es-Tso; e no 133^o dia pós-infecção para o LV-Tcra. No entanto, quando são comparados os resultados dos antígenos Es-Tso e LV-Tcra, observa-se que há sobreposição das barras de erros nos dias 28, 49, 70, 91 e 133 pós-infecção (Figura 7), indicando sensibilidades semelhantes entre os antígenos Es-Tso e LV-Tcra.

González *et al.*, 1990, realizaram imunoblot em soros de suínos com cisticercose utilizando antígeno T-Tso e observaram uma sensibilidade de 79,8%. Pinto *et al.*, 2000, avaliaram os antígenos T-Tso, Es-Tso e LV-Tcra aplicado ao diagnóstico da cisticercose suína. Foram estabelecidos dois *cut-off*s, e os resultados encontrados

foram de 72 e 88% de sensibilidade quando utilizado o antígeno T-Tso, 72 e 84% de sensibilidade para o antígeno Es-Tso e 80 e 96% para o LV-Tcra, indicando ser este o antígeno recomendado para pesquisas de cisticercose em suínos. Biondi, *et al.*, 1996, analisaram o soro de suínos infectados utilizando o ELISA com antígenos de *T. crassiceps*. Os autores observaram que a sensibilidade do método foi de 100% independentemente do *cut-off* de 2 e 3 desvio-padrão. Nunes *et al.*, 2000, utilizando antígeno total e líquido vesicular de *C. longicollis*, obtiveram como resultados uma sensibilidade respectivamente de 96,4 e 100%

A alta sensibilidade do teste quando utilizado o antígeno Es-Tso pode ser atribuído ao fato desse antígeno apresentar uma maior concentração de glicoproteínas de baixo peso molecular, demonstrada por Ev *et al.*, 1999, as quais podem conferir alta sensibilidade e especificidade ao ELISA, uma vez que ocorrem um maior número de ligações específicas entre antígeno e anticorpo.

O tempo de infecção deve ser levado em consideração uma vez que um melhor resultado no ELISA com os antígenos T-Tso e LV-Tcra foi observado após 2 meses de infecção. Este fato pode ter como justificativa a maturidade dos cisticercos que ocorre por volta dos 60 dias de infecção, ou seja, quando o cisticerco encontra-se completamente desenvolvido (Escobar *et al.*, 1972; Manson-Bahr; Bell, 1987; Pessoa & Martins, 1982). Além disso, em trabalhos anteriores (Aluja *et al.*, 1996; Santamaria *et al.*, 2002), foi verificado que em estágios mais avançados da infecção, predominam glicoproteínas (antígenos) de maior peso molecular, conferindo uma maior sensibilidade ao teste utilizando os antígenos TTso e LV-Tcra neste período. Essas glicoproteínas devem estar presentes nestes antígenos, sendo reconhecidas por anticorpos presentes no soro dos animais.

Diante da variação dos títulos de anticorpos circulantes entre os animais, observou-se que alguns suínos poderiam ser considerados falsos negativos, em função de exibirem absorbância inferior ao *cut-off*, mas com infecção constatada pelo exame *post-mortem*. Tal observação está em concordância com resultados obtidos em infecção experimental realizada em bovinos, seguida de avaliação sorológica pelo ELISA, onde Smith *et al.*, 1991, utilizando antígenos obtidos a partir de fluido cístico do cisticerco de *T. hydatigena*, observaram os maiores níveis de anticorpos entre 40 e 60 dias pós-infecção, seguido de diminuição gradual. Os autores concluíram que os baixos níveis de

anticorpos circulantes em infecções brandas poderiam ocasionar resultados falsos positivos ou falsos negativos dependendo do ponto de seleção do *cut-off*. Vale ressaltar que comportamentos semelhantes em testes imunoenzimáticos em soros de suínos experimentalmente infectados, foram observados com maior frequência para os antígenos T-Tso e LV-Tcra. Verifica-se dessa forma que baixos níveis de anticorpos em infecções brandas dificultam a seleção de um valor de absorbância para o *cut-off* e a interpretação dos resultados, sendo que a escolha de um valor para o *cut-off* pode interferir nos resultados.

Os índices de reatividade para os 03 antígenos foram calculados mediante a comparação das absorbâncias ao longo da infecção experimental com a absorbância medida antes da infecção. Através da Tabela 2 é possível observar que suínos que apresentaram quantidades maiores de cisticercos na necrópsia não demonstram necessariamente os maiores índices de reatividade, enquanto que outros animais com pequena quantidade de cisticercos recuperados, apresentaram índices de reatividade maiores.

A partir dos índices de reatividade de cada animal, foi calculada a média destes índices para cada dia escolhido. Verificou-se que à medida que a infecção evoluiu, os índices de reatividade para os 3 antígenos T-Tso, Es-Tso e LV-Tcra usados no ELISA, também aumentaram, o que significa aumento na taxa de anticorpos (Figura 9). Nota-se que o antígeno T-Tso é o que apresenta os menores índices de reatividade em todas as amostras analisadas quando comparado com os outros 2 antígenos. Aos 28 dias de infecção, os valores das densidades ópticas obtidas no ELISA usando T-Tso foram aproximadamente duas vezes, enquanto que no mesmo ensaio imunoenzimático com os antígenos Es-Tso e LV-Tcra, as leituras foram aproximadamente 4 vezes maior do que as leituras das mesmas amostras no “dia zero”. Verifica-se que o antígeno T-Tso apresentou os menores índices porque as absorbâncias das amostras coletadas antes da infecção foram elevadas, podendo tal fato ser atribuído a ligações inespecíficas com outros anticorpos presentes no soro.

Os índices de reatividade das amostras da 2ª metade da infecção, obtidos com antígenos T-Tso e Es-Tso praticamente se igualaram, revelando densidades ópticas quase 3 vezes maiores do que nas amostras coletadas antes da infecção. Por outro lado, o antígeno LV-Tcra apresentou índices de reatividade bem maiores (Figura 9), onde os

valores médios das leituras das amostras foram aproximadamente 7 vezes maiores do que as leituras das amostras pré-infecção. As absorbâncias determinadas nas amostras coletadas antes da infecção utilizando o antígeno LV-Tcra foram menores que as encontradas para os outros antígenos. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de anticorpos do tipo IgG, inespecíficos, estarem presentes nos soros dos suínos. Estes anticorpos podem reconhecer proteínas do hospedeiro quando utilizadas preparações antigênicas preparadas à partir de *C. cellulosa*. Isso pode ser minimizado quando é utilizado um antígeno heterólogo como o LV-Tcra. Para diminuir essas reações inespecíficas, Vaz, 1993, propõe a pré-absorção dos soros com proteínas suínas.

De posse dessas informações, observa-se que a infecção experimental causou resultado esperado, que foi a elevação dos níveis de anticorpos traduzidos na forma da elevação das absorbâncias.

Os testes imunoenzimáticos realizados em soros de animais com infecção natural confirmada revelaram que os 3 antígenos foram capazes de detectar níveis de anticorpos, com absorbância, acima do *cut-off*, para todas as amostras analisadas (Figuras 4, 5 e 6). Observou-se que todos os testes apresentaram sensibilidades de 100%, no entanto, não foi possível estabelecer a relação entre as absorbâncias de cada amostra e a quantidade de cisticercos que cada animal apresentou ao exame *post-mortem*. Sato *et al.*, 2003, analisaram soros de 12 suínos com infecção natural pelo ELISA utilizando como antígeno, uma glicoproteína purificada. Os autores observaram que 7 animais apresentaram positividade no teste, sendo que estes animais apresentavam na necrópsia, de 2,5 à 5 cisticercos/Kg. Provavelmente, alguns suínos naturalmente infectados apresentavam poucos cisticercos na necrópsia visto que, os títulos de anticorpos determinados pelo ELISA (Figuras 4, 5 e 6) no soro destes animais mostram valores próximos ao *cut-off*.

Baseado no ELISA padronizado para os animais experimentalmente infectados, foram realizados testes utilizando o antígeno Es-Tso em amostras de animais suspeitos para cisticercose. A Figura 8 apresenta os resultados das amostras analisadas, onde aproximadamente 64,3% (9) revelaram absorbância superior ao *cut-off*, sendo os animais considerados como prováveis portadores de cisticercose. A alta soropositividade pode ser atribuída ao fato de que as amostras foram selecionadas em criações tradicionais, nas quais foram notificados casos de cisticercose. A provável

presença da cisticercose em suínos procedentes de região endêmica detectada pelo ELISA é confirmada no trabalho de epidemiologia realizado por Sakai *et al.*, 2001, no interior do Estado da Bahia, que verificaram a prevalência de anticorpos para *T. solium* de 4,4% em Salvador, 3,2% em Santo Amaro e 23,5% em Jequié. Os autores justificam a soroprevalência da cisticercose associando estes resultados às condições sanitárias deficientes.

A busca de evidências da cisticercose nos 14 suínos suspeitos através dos exames *ante-mortem* não revelou a presença de cisticercos em nenhum dos animais. No entanto, através dos testes imunoenzimáticos realizados, foi possível observar amostras positivas (Figura 8).

A cisticercose ainda é um grave problema no Brasil e em diversas regiões do mundo, merecendo atenção da pesquisa para que medidas eficazes de controle possam ser implementadas. O resultado encontrado nos animais infectados experimentalmente, bem como naqueles suspeitos, confirmam a necessidade de avaliações mais precisas da cisticercose suína.

Os ensaios imunoenzimáticos constituem uma importante metodologia para o diagnóstico da cisticercose e os antígenos avaliados no trabalho proposto, principalmente o antígeno Es-Tso, conferiram ao método uma alta sensibilidade. A utilização de frações protéicas obtidas de *C. cellulosae* e *C. longicollis*, purificadas por anticorpos monoclonais ou preparadas através de expressão gênica, podem conferir ao teste imunoenzimático uma melhor sensibilidade e especificidade. E ainda, a avaliação sorológica de animais com cisticercose através do método Western Blot é uma metodologia auxiliar de grande importância na especificidade dos testes para diagnóstico dessa parasitose.

7. CONCLUSÕES

Os níveis de anticorpos da classe IgG avaliados pelo ELISA aumentaram significativamente a partir do 21º dia após a inoculação dos ovos de *T solium* em todos os suínos experimentalmente infectados, apresentando um perfil semelhante durante o período avaliado.

O ELISA realizado em soros de suínos experimentalmente infectados, utilizando antígeno obtido a partir de escólex de *C. cellulosae* (Es-Tso) foi o que apresentou o melhor comportamento.

O maior índice de reatividade foi verificado com o antígeno LV-Tcra, podendo este, estar associado a um menor número de reações inespecíficas,

Os resultados do ELISA em amostras de animais procedentes de região endêmica, utilizando o antígeno Es-Tso, reforçam a necessidade da utilização de uma prova sorológica para o diagnóstico da cisticercose suína.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALUJA, A. S.; VILLALOBOS, A. N. M.; PLANCARTE, A.; RODARTE, L. F.; HERNANDEZ, M.; SCIUTTO, E. Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p. 49-59, 1996.

ALUJA, A.S.; VILLALOBOS, A. N. M.; PLANCARTE, A.; RODARTE, L. F.; HERNANDEZ, M.; ZAMORA, C.; SCIUTTO, E.. *Taenia solium* cysticercosis: immunity in pigs induced by primary infection. **Veterinary Parasitology**, v. 81, p. 129-35, 1999.

BASÍLIO DE OLIVEIRA, C.C. Cisticercose: problema médico-social. **Informativo Cisticercose**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 5, p. 1-4, 1984.

BENITEZ, L. Sequence and immunogenicity of the *Taenia saginata* homologue of the major surface antigen of *Echinococcus spp.* **Parasitology Research**, v. 84, p. 426-31, 1998.

BIONDI, G. F.; MUCCIOLO, R. G.; NUNES. C. M.; RICHTZENHAIN L. J. Immunodiagnosis of swine cysticercosis by indirect ELISA employing a heterologous antigen from *Taenia crassiceps* metacestode. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p. 261-266, 1996.

BOA, M.E.; KASSAKU, A.A.; WILLINGHAM III, A.L.; KEYYU, J.D.; PHIRI, I.K.; NANSEN, P. Distribution an density of cysticerci of *Taenia solium* by muscle groups and organs in naturally infected local finished pigs in Tanzania. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 155-164, 2002.

BONAMETTI, A.M. **Índice de positividade da reação imunoenzimática (ELISA) para cisticercose no líquido cefalorraquidiano e no soro de pacientes com epilepsia.** 1991. 50 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 263, n. 32, p. 16626-30, 1976.

BUENO, E.C.; NAKAMURA, P.M.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; VAZ, A.J. Diagnóstico imunológico da neurocisticercose: Anticorpos IgG anti-*Taenia solium* (forma larvária) em líquido cefalorraquidiano e soro utilizando antígeno heterólogo. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 34, sup. 2, p. 10, 1998.

BUENO, E. C. **Neurocisticercose: avaliação da resposta imune humoral nas diferentes fases evolutivas da doença pelo ELISA e imunoblot com antígenos de *T. solium* e *T. crassiceps*.** 1999. 144 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

BUENO, E. C.; VAZ, A. J.; MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A. ; MIELLE, S. R. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* Antigenic Peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 146-151, 2000.

CASTILLO, S. Investigación de antígenos y anticuerpos de *Cysticercus cellulosae* en el diagnóstico de cisticercosis humana y porcina por el método ELISA. **Rev. Asoc. Guatemal. Parasitol. Med. Trop.**, v. 6, p. 102-3, 1991.

CHENG, R. W. K.; KO, R. C. Purification of larval *Taenia solium* antigens by gel filtration. **Veterinary Parasitology**, v. 43, p. 65-73, 1992.

COOK, G.C. Neurocysticercosis: parasitology, clinical resentation, diagnosis and recent advances in management. **Quaterly Journal of Medicine**, New Series, v. 68, n. 256, p. 575-83, 1988.

CORREA, W.M.; PARDINI, A.X.; BAREA, T.S.; NAKAMURA, P.M.; VAZ, A.J. Caracterização de antígeno glicoprotéico de *Taenia crassiceps* para pesquisa de anticorpos na neurocisticercose humana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36, sup. 1, p. 13, 2000.

DEL BRUTTO, O.J.D.; GARCÍA, E.; TALÁMAS,O.; SOTELO, J. Sex-related severity of inflammation in parenchymal brain cysticercosis. **Arch. Intern. Med.**, v. 148, p. 544-546, 1988.

DORNY, P.; VERCAMMEN, F.; BRANDT, J.; VANTEENKISTE, W.; BERKVEN, D.; GEERTS, S. Sero-epidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Belgian catle. **Veterinary Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 43-49, 2000.

ESCOBAR, A.; ARUFFO, C.; CRUZ-SANCHEZ, F.; CERVOS-NAVARRO, J. Hallazgos neuropatológicos en la neurocisticercosis. **Archivos de Neurobiologia**, v. 48, p. 151-6, 1985.

ESCOBAR, A.; NIETO, D. Cysticercosis. In: MINKLER, J., ed. **Pathology of the Nervous System**. New York: Mc Graw-Hill Book, 1972. v. 3, p. 2507-15.

ESPÍNDOLA, N.M.; CHUANG, R.K.; BUENO, E.C.; NAKAMURA, P.M.; VAZ, A.J. Caracterização de antígenos de cisticercos de *Taenia crassiceps* para diagnóstico da cisticercose. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 33, sup. 2, p. 14, 1997.

ESPÍNDOLA, N.M. *T. solium e T. crassiceps: Caracterização dos antígenos e obtenção de anticorpos monoclonais*. 1999. 136p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

EV, L.V.; MAIA, A.A.M.; PIANETTI, G.; NASCIMENTO, E. Immunological evaluation of a 26-kDa antigen from *Taenia solium* larvae for specific immunodiagnosis of human neurocysticercosis. **Parasitology Research**, v. 85, p. 98-102, 1999.

FAUST, E.C.; RUSSELL, P.F.; JUNG, R.C., ed. **Craig and Faust's clinical parasitology**. 8. ed. Philadelphia, Lea & Fabiger, 1970. p. 529-35.

FLISSER, A. Epidemiological studies of taenioses and cysticercosis in Latin America. In.: CRAIG, P.; PAWLOWSKI, Z. (eds.) **Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis. an emergent and global problem**. Amsterdam: IOS, 2002. p. 3-12.

FLISSER, A., GONZALEZ, D.; PLANCARTE, A. et al. Praziquantel treatment of brain and muscle porcine *Taenia solium* cysticercosis. 2 - immunological and cytogenetic studies. **Parasitology Research**, v. 76, p. 640-2, 1990.

GARCIA-NOVAL, J.; ALLAN, J. C.; FLETES, C.; MORENO, E.; DE MATA, F.; TORRES,-ALVAREZ, R.; DE ALFARO, H. S.; YURRITA, P.; HIGUEROS-MORALES, H.; MENCOS, F.; CRAIG, P.S. Epidemiology of *Taenia solium* teniaiss and cysticercosis in two rural guatemalan communities. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 3, p. 282-289, 1996.

GEERTS, S.; ZOLI, A.; WILLINGHAM, L.; BRANDT, J.; DORNY, P.; PREUX, T. M. *Taenia solium* cysticercosis in Africa: an under-recognized problem. In.: CRAIG, P.; PAWLOWSKI, Z. (eds.). **Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis an emergent and global problem**. Amsterdam: IOS, 2002. p. 13-24.

GONZALEZ, A. E.; CAMA, V.; GILMAN, R. H.; TSANG, V. C. W.; PILCHER, J. B.; CHAVERA, A.; CASTRO, M.; MONTENEGRO, T.; VERASTEGUI, M.; MIRANDA, E.; BALTASAR, H. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** , v. 43, p. 194-9, 1990.

ITO, A.; SAKO, Y.; NAKAO, M.; NAKAYA, K. Neurocysticercosis in Ásia: serology/seroepidemiology in humans and pigs. In.: CRAIG, P.; PAWLOWSKI, Z. (eds.) **Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis an emergent and global problem**. Amsterdam: IOS, 2002. p. 25-32.

KAMANGA-SOLLO, E. I. P.; LINDQVIST, K. J. Identification of antigens for use in immunodiagnosis of *Taenia saginata* cisticercosis. **Res. Vet. Science**, v. 50, p. 162-169, 1991.

KAUR, M.; JOSHI, K.; GANGULY, N. K.; MAHAJAN, R. C.; MALLA, N. Evaluation of the efficacy of albendazole against the larvae of *Taenia solium* in experimentally infected pigs, and kinetics of the immune response. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 12, pp. 1443-1450, 1995.

KERCKHOVEN, I.V.; VANSTEENKISTE, W.; CLAES, M.; GEERTS, S.; BRANDT, J. Improved detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* metacestodes. **Veterinary Parasitology**, v. 76, p. 269-274, 1998.

KUMAR, D.; GAUR, S. N. S. Serodiansis of porcine cysticercosis by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using fractioned antigens. **Veterinary Parasitology**, v. 24, p. 195-202, 1987.

LARRALDE, C.; SOTELO, J.; MONTOYA, R.M.; PALENCIA, G.; PADILLA A.; GOVEZENSKY, T.; DIAS, M.L.; SCIUTTO, E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid: antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticercy effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v. 114, p. 926-928, 1990.

LIGHTOWLERS, M.W.; ROLFE, R.; GAUCI, C. G. *Taenia saginata*: vaccination against cysticercosis in cattle with recombinant oncosphere antigens. **Experimental Parasitology**, v. 84, p. 330-38, 1996.

LODOÑO, D. P.; ALVAREZ, J. I.; TRUJILLO, J.; JARAMILO, M. M.; RESTREPO, B. I. The inflammatory cells infiltrates in porcine cysticercosis: immunohistochemical analysis during various stages of infection. **Veterinary Parasitology**, 109, 249-259, 2002.

MAHAJAN, R. C. Geographical distribution of human cysticercosis. In: FLISSER, A., ed. **Cysticercosis**: present state of knowledge and perspectives. New York: Academic Press, 1982. p 39-46.

MANSON-BAHR, P.E.C.; BELL, D.R. **Manson's tropical diseases**. 19. ed. London: Philadelphia, Baillière Tindall, 1987. p. 527-29; 536-40.

MAYTA, H.; TALLEY, A.; GILMAN, R. H.; JIMENEZ, J.; VERASTEGUI, M.; RUIZ, M.; GARCIA, H. H.; GONZALEZ, A. E. Differentiating *Taenia Solium* and *Taenia Saginata* infection by simple hematoxylin - eosin staining and PCR restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 133-137, 2000.

MOLINARI, J. L.; MEZA, R.; SUÁREZ, B.; PALACIOS, S.; TATO, P. *Taenia solium*: immunity in hogs two the cysticercus. **Experimental Parasitology**, v. 55, p. 340-57, 1983.

MONTEIRO, L.; COELHO, T.; STOCKER, A. Neurocysticercosis: a review of 231 cases. **Infection**, v. 20, n. 2, p. 61-5, 1992.

MORAKOTE, N.; NAWACHAROEN, W.; SUKONTHASUN, K.; THAMMASONTHI, W.; KHAMBOONRUANG, C. Comparison of cysticercus extract, cyst fluid and *Taenia saginata* extract for use in ELISA for serodiagnosis of neurocysticercosis. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 23, p. 77-81, 1992.

NASCIMENTO, E.; ARAÚJO, F. G. Estudos imunoquímicos em extratos aquosos de larvas e adultos de *Taenia solium*. II: relacionamento antigênico, padrões cromatográficos, atividade imunológica do escólex. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 24, p. 359-363, 1982.

NASCIMENTO, E.; MAYRINK, U. Avaliação de antígenos de *Cysticercus cellulosae* no imunodiagnóstico da cisticercose humana pela hemaglutinação indireta. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, p. 289-294, 1984.

NASCIMENTO, E.; NOGUEIRA, P. M. P.; TAVARES, C. A. P. Improved immunodiagnosis of human cysticercosis with scolex protein antigens. **Parasitology Research**, v. 73, p. 446-450, 1987.

NGUEKAM, A.; ZOLI, A. P.; VONDOU, L.; POUEDET, S.M.R.; ASSANA, E.; DORNY, P.; BRANDT, J.; LOSSON, B.; GEERTS, S. Kinetics of circulating antigens in pigs experimentally infected with *Taenia solium* eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p. 323-332, 2002.

NUNES, C. M.; BIONDI, G. F.; HEINEMANN, M. B.; RICHTZENHAIN, L. J. Comparative evaluation of an indirect ELISA test for diagnosis of swine cysticercosis employing antigen from *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* metacestodes. **Veterinary Parasitology**, v. 93, p. 135-140, 2000.

PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. Classe cestóidea. In: **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p. 433-42.

PHIRI, I. K.; NGOWI, H.; AFONSO, S.; MATENGA, E. et al. The emergence of *Taenia solium* cysticercosis in eastern and southern África as a serious agricultural problem and public health risk. **Acta Tropica**, p. 1-11, 2003.

PHIRI, I.K.; DORNY, P.; GABRIEL, S.; WILLINGHAM, A.L. III; SPEYBROECK, N.; VERCRUYSE, J. The prevalence of porcine cysticercosis in eastern and southern provinces of Zambia. **Veterinary Parasitology**, v. 108, p. 31-39, 2002.

PINTO, P. S. A.; VAZ, A. J.; GERMANO, P. M. L.; NAKAMURA, P. M. Performance of the ELISA test for swine cysticercosis using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. **Veterinary Parasitology**, v. 88, p. 127-130, 2000.

POUEDET, M.S.R.; ZOLI, A.P.; NGUEKAM; VONDOU, L.; ASSANA, E.; SPEYBROECK, N.; BERKVENS, D.; DORNY, P.; BRANDT, J.; GEERS, S. Epidemiological survey of swine cysticercosis in two rural communities of West-Cameroon. **Veterinary Parasitology**, v. 108, p. 45-54, 2002.

RAJSHEKHAR, V.; JOSHI, D. D.; DOANH, N. Q.; DE, N.; XIAONONG, Z. *Taenia solium*, taeniosis/cysticercosis in Ásia: epidemiology, impact and issues. **Acta Tropica**, p. 1-8, 2003.

RAMIREZ-BON, E.; MERCHANT, M.T.; GONZALEZ-DELPiEGO, M.; CANEDO, L. Ultrastructure of the bladder wall of metacestode of *Taenia solium*. In: FLISSER, A.; WILLMS, K.; LACLETTE, J.P.; LARRALDE, C.; RIDAURA, C.; BELTRAN, F. Eds. **Cisticercosis: presente state of knowledge and perspectives**. New York: Academic Press, 1982. p. 1-7.

SAKAI, H.; BARBOSA JR., H. V.; SILVA, E. M.; SCHLABITZ, F. O.; NORONHA, R. -P.; NONAKA, N.; FRANKE, C. R.; UENO, H. Short Report: Seroprevalence of *Taenia solium* cysticercosis in pigs in Bahia State, Northeastern Brazil. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 61, pp. 268-269, 2001.

SANTAMARIA, E.; PLANCARTE, A.; ALUJA, A. S. The experimental infection of pigs with different numbers of *Taenia solium* eggs: immune response and efficiency of establishment. **Journal of Parasitology**, 88(1), pp. 69-73, 2002.

SATO, M.O.; YAMASAKI, H.; SAKO, Y.; NAKAO, M. et al. Evaluation of tongue inspection and serology for diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in swine: usefulness of ELISA using purified glycoproteins and recombinant antigen. **Veterinary Parasitology**, v. 2493, p. 1-14, 2003.

SAS INSTITUTE INC., SAS/STAR[®]. User's guide, version 6. 4 ed., v. 1, Cary, N.C.: **SAS Institute Inc.**, 1989. 846 p.

SILVA, J. E. P. da. **Estudo comparativo e valor de referência de positividade de testes imunológicos para o diagnóstico da neurocisticercose humana**. 1995. 95 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

SMITH, H. J.; SNOWDON, K. E.; FINLAY, R. C. Serological diagnosis of Cysticercosis by an Enzyme-linked Immunossorbent assay in experimentally infected cattle. **Veterinary Research**, v. 55, p. 274-276, 1991.

SOUZA, P. E.; HAFEEZ, M.D. Detection of *Taenia solium* Cysticercosis in pigs by ELISA with an excretory-secretory antigen. **Veterinary Research Communications**, v. 23, p. 293-298, 1999.

SPINA-FRANÇA, A. Neurocisticercose. In: MARCONDES, M.; SUSTOVICH, D.R.; RAMOS, O.L. eds. **Propedêutica e fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. p. 718-24.

STEVENSON. Observations on the hatching and activation of fresh *Taenia saginata* eggs. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 77, p. 399-404, 1983.

TAKAYANAGUI, O. M.; JARDIM, E. Clinical aspects of neurocysticercosis: analysis of 500 cases. **Arq de Neuro-Psiquiat.** 41: 50-63, 1983.

TAKAYANAGUI, O. M.; SILVA, A. A. M. C. C. E.; SANTIAGO R. C.; ODASHIMA, N. S.; TERRA, V. C.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Compulsory notification of cysticercosis in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 54, p. 557-564, 1996.

TAVARES, J. R. **Aspectos neuropsiquiátricos da neurocisticercose humana**. 1994. São Paulo. Tese (Doutorado em Medicina). Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

TRELLES, J. O.; LAZARTE, J. Cisticercosis cerebral: estudio clínico, histopatológico y parasitológico. **Revista de Neuro-Psiquiatria**. (Lima), v. 3, p. 393, 1940.

VAZ, A. J. *Cysticercus longicollis*: caracterização antigênica e desenvolvimento de testes imunológicos para pesquisa de anticorpos em líquido cefalorraquidiano no diagnóstico da neurocisticercose humana. 1993. 100 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

VAZ, A. J.; LIVRAMENTO, J. A. Neurocisticercose. In: FERREIRA, A. W.; AVILA, S. L. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 177-184.

VAZ, A. J.; NUNES, C. M.; PIAZZA, R. M. F.; LIVRAMENTO, J. A.; SILVA, M. V.; NAKAMURA, P. M.; FERREIRA, A. W. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 3, p. 354-357, 1997.

VAZ, A. J.; NAKAMURA, P. M.; CAMARGO, M. E.; CAMARGO, E. D.; FERREIRA, A. W. Dot-ELISA for detection of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies in human cerebrospinal fluid using a new solidphase (resin-treated polyester fabrics) and *Cysticercus longicollis* antigens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 6, p. 391-396, 1996.

YAKOLEFF-GREENHOUSE, V.; FLISSER, A.; SIERRA, A; LARRALDE, C.
 Analysis of antigenic variation in cysticerci of *Taenia solium*. **Journal of Parasitology**,
 v. 68, n. 1, p. 39-47, 1982.

WIDDOWSON, M.-A.; COOK, A. J. C.; WILLIAMS, J. J.; ARGÆS, F.; RODRIGUEZ,
 I.; DOMINGUEZ, J. L.; RODRIGUEZ, R. Investigation of risk factors for porcine
Taenia solium cysticercosis: a multiple regression analysis of a cross-sectional study in
 the Yucatan Peninsula, México. **American Journal of Tropical Medicine and
 Hygiene**, v. 94, p. 620-624, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The cysticercus working group in Peru: the
 marketing of cysticercosis pigs in Sierra of Peru. **Bull. W.H.O.**, 71, 223-8, 1993.