UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Avaliação do desempenho diagnóstico do teste ELISA para
a cisticercose em inquéritos sorológicos

Eloi Marcos de Oliveira Lago

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Associada Adelaide José Vaz

São Paulo
2007

Eloi Marcos de Oliveira Lago

**Avaliação do desempenho diagnóstico do teste ELISA para
a cisticercose em inquéritos sorológicos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo para obtenção do grau de
MESTRE em Farmácia

Área de concentração: Análises Clínicas
Orientadora: Profa. Associada Adelaide José Vaz

São Paulo
2007

Eloi Marcos de Oliveira Lago

Avaliação do desempenho diagnóstico do teste ELISA para a cisticercose em
inquéritos sorológicos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Associada Adelaide José Vaz
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de 2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Eloi Marcos de Oliveira Lago no Programa: Farmácia (Análises Clínicas), do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 30 dias do mês de agosto de 2007, no(a) Auditório Bloco 13 A realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Eloi Marcos de Oliveira Lago, apresentada para a obtenção do título de Mestre em Farmácia - Área: Análises Clínicas, intitulada:

"Avaliação do desempenho diagnóstico do teste ELISA para a cisticercose em inquéritos sorológicos"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Adelaide Jose Vaz	Presidente	FCF - USP	Aprovada
Kioko Takei	Titular	FCF - USP	Aprovada
Luis dos Ramos Machado	Titular	FM - USP	Aprovado
Resultado Final:			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Ana Maria Dias Dantas, Secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 30 dias do mês de agosto de 2007.

Kioko Takei

Luis dos Ramos Machado

Adelaide Jose Vaz
Orientador(a)

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

AGRADECIMENTOS

Ao único e soberano **Deus**, razão maior da minha vida, senhor, autor e consumidor da minha fé.

A minha mãe, **Miralva de Oliveira**, força minha, inspiração e afago sempre presentes.

A minha orientadora, Profa. **Adelaide José Vaz**, fonte de conhecimento e apoio em todos os momentos, pela oportunidade ímpar e zelo proporcionados e acima de tudo pela dedicação voluntária essencial.

A Profa. **Kioko Takei**, pelo estímulo e companheirismo.

Ao Prof. **Luiz Roberto Viana Fernandes**, pela grande suporte na carreira acadêmica e exemplo de vida a ser seguido.

Aos professores **Dr. Luis dos Ramos Machado e Dr. Osvaldo Massaiti Takayanagui**, por gentilmente encaminharem as amostras de pacientes com neurocisticercose.

A equipe do laboratório: **Alberto, Nô, Déia, Cris, Faby, F. Érica e Rosa**, que sempre estiveram, em todo o momento, gerando apoio e momentos felizes.

A **FAPESP** pelo apoio financeiro e credibilidade na pesquisa.

RESUMO

O diagnóstico sorológico da cisticercose vem se destacando como uma fonte alternativa seguramente eficaz ao estudo da doença. Com a proposta de acessibilidade, devido primordialmente a relação custo, os testes ELISA são promissores à pesquisa sorológica de campo. O problema iminente está na utilização de extratos antigênicos capazes de gerar ao teste, parâmetros compatíveis para a pesquisa de anticorpos na população de baixa prevalência. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou a avaliação de um teste ELISA com alto valor preditivo positivo (VPP) para a pesquisa de anticorpos anti-cisticercos de *Taenia solium* em inquéritos sorológicos na população geral. Os antígenos ensaiados foram proteína 18/14 kDa de líquido vesicular de *T. crassiceps* (18/14-Tcra), líquido vesicular de *T. crassiceps* (LV-Tcra) e total de cisticercos de *T. solium* (T-Tso), respectivamente estes constituíram os testes ELISA-18/14, ELISA-Tcra e ELISA-Tso. Foram ensaiadas 610 amostras de soro de indivíduos supostamente saudáveis e 20 amostras de soro de indivíduos com neurocisticercose confirmados por critérios clínicos e laboratoriais. Após os ensaios, o teste ELISA-18/14 apresentou sensibilidade e especificidade de 100% e mesmo em diferentes prováveis prevalências (0,1; 0,5; 1,0 e 5,0%) o VPP e o valor preditivo negativo (VPN) foram fixados também em 100%. A repetitividade das leituras do teste expressa em coeficiente de variação apresentou-se entre 16 e 18%. O teste ELISA-Tcra não demonstrou o mesmo desempenho, a especificidade foi calculada em 96,3% e o VPP variou entre 2,6 a 59,3% para prevalências de 0,1 a 5,0%; quanto à sensibilidade e VPN houve similaridade entre os resultados. O ELISA-Tso apresentou resultados ainda menos expressivos, a especificidade foi calculada em

95,7% e o VPP variou entre 2,3 a 55% para as prevalências de 0,1 a 5,0%; essa redução na especificidade se dá pelo aumento do número de resultados falso-positivos no teste em consequência da expressão de proteínas de alto peso molecular. Através dos parâmetros avaliados fica notório o desempenho promissor do teste ELISA-18/14 na pesquisa de anticorpos anti-cisticercos de *Taenia solium* em inquéritos sorológicos da população geral.

Palavras chaves: cisticercose, diagnóstico, validação, parâmetros e soro-epidemiologia

ABSTRACT

The serum diagnosis of cyticercosis has been highlighted as an efficient alternative source in the study of the disease. With an accessibility proposal, due to the expense, the ELISA's tests are promising to the serum's field research. This problem makes necessary the use of antigens extracts able to give the test, trusted and compatible parameters to the research of antibodies in the population of low prevalence. In this context, this current work stablished the evaluation of the ELISA's test with a high predictive value positive (PPV) to the anti-cysticerci of *Taenia solium* antibodies research in a serum inquiry of the general population. The antigens tested were the 18/14 kDa protein of the vesicular liquid of *T. crassiceps* (18/14-Tcra), the vesicular liquid of *T. crassiceps* (LV-Tcra) and the total of *T. solium* (T-Tso). That constituted in the ELISA 18/14, ELISA-Tcra and ELISA-Tso test respectively. There were 610 sample of serum were tested of healthy people and 20 samples of serum with confirmed neurocysticercosis by clinical and laboratorial criterias. After these tests, the ELISA's test showed sensibility and specificity in 100% of the cases, even in different prevalences (0,1; 0,5; 1,0 and 5,0%) the VPP and the predictive value negative (VPN) were also fixed in 100%. The repetition of the test expressed in variation coefficient occurred between 16 and 18% of the cases. The ELISA-Tcra didn't show the same development, the specificity were calculation in 96,3% and the VPP wanted between 2,6 and 59,3% to the prevalences of 0,1 to 5,0%; there were similarities of the results of sensibility and VPP. The ELISA-Tso showed less important results the specificity was calculated in 95,7% and the VPP between 2,3 and 55,0% to the prevalences of 0,1 to 5,0%, this reduction of specificity is due to the increase of the

number of false-positive results in the test because of the expression of proteins of high molecular weight. Through these parameters it's clear the promising development of the ELISA-18/14 test, as been arbitrary in the studies of serology inquiry in the general population.

Key words: cysticercosis, diagnosis, validation, parameters and serum-epidemiology

LISTA DE ABREVIATURAS

18/14: antígeno de 18 e 14 kDa de *T. crassiceps*

AcMos: Anticorpos monoclonais

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

LCR: líquido cefalorraquiano

LV-Tcra: Antígeno de líquido vesicular de *Taenia crassiceps*

T-Tso: antígeno total de *Taenia solium*

NC: neurocisticercose

PBS: Tampão fosfato salina (Na_2HPO_4 0,0075 M, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,025 M e NaCl 0,14 M, pH 7,2)

PBS-T: PBS contendo 0,05% de Tween 20

RMN: ressonância magnética nuclear

SNC: sistema nervoso central

T. crassiceps: *Taenia crassiceps*

T. solium: *Taenia solium*

TC: tomografia computadorizada

T-Tso: antígeno total de cisticercos de *Taenia solium*

CDC: centers for disease control and prevention

NCID: division of parasitic disease

WHO: collaborating center for cysticercosis and taeniasis

HCFMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São paulo

FCF: Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FAPESP: Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo

GE: Grupo estudo

CP: Controle positivo

CN: Controle negativo

CR: Controle referência

ORF: Ontary Research Fundation

OPD: ortofenilenodiamina

ROC: Receiver Operating Characteristics

IR: índice de reatividade

IB: Immunoblot

SDS-PAGE: Gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio

SD: Desvio Padrão

VPP: Valor preditivo positivo

VPN: Valor preditivo negativo

CV: Coeficiente de variação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Resultados em IR obtidos para as 610 amostras de soro do GE e 20 amostras CP no ELISA-18/14 para pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium*..... 44

Figura 2- Resultados em IR obtidos para as 610 amostras de soro do GE e 20 amostras CP na diluição 1:100 no ELISA-Tcra para a pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium*..... 45

Figura 3- Resultados em IR obtidos para as 610 amostras de soro do GE e 20 amostras CP na diluição 1:200 no ELISA-Tcra para a pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium*..... 46

Figura 4- Resultados em IR obtidos para as 610 amostras de soro do GE, e 20 amostras CP na diluição 1:400 no ELISA-Tcra para a pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium*..... 46

Figura 5- Resultados em índice de reatividade (IR) obtidos para as amostras do grupo estudo e controle positivo na diluição 1:100 no ELISA-Tso para a pesquisa de anticorpos anti-cisticercos de *T.solium*..... 48

Figura 6- Resultados em índice de reatividade (IR) obtidos para as amostras do grupo estudo (GE) e amostras controle positivo (CP) na diluição 1:200 no ELISA-Tso para a pesquisa de anticorpos anti-cisticercos de *T.solium*..... 48

Figura 7- Resultados em índice de reatividade (IR) obtidos para as amostras do grupo estudo e amostras CP na diluição 1:400 no ELISA-Tso para a pesquisa de anticorpos anti-cisticercos de *T.solium*..... 49

Figura 8- Resultados do IB-Tcra utilizando amostras do GE reativas no ELISA-Tcra, controle positivo e controle negativo..... 52.

Figura 9- Resultado do IB-Tso utilizando as amostras do GE reativas no ELISA-Tso, controle positivo e controle negativo..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Positividade das amostras GE testadas no teste ELISA utilizando antígenos proteína 18/14, LV-Tcra e T-Tso..... 50

Tabela 2- Distribuição dos resultados das amostras ensaiadas no IB-Tcra e IB-Tso em relação à reatividade observada com frações inespecíficas e ausência de reatividade..... 54

Tabela 3- Distribuição dos resultados do VPP para os testes ELISA-Tcra e ELISA-Tso.....57

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	17
1.1 - ASPECTOS GERAIS	17
1.2- ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	18
1.3- ASPECTOS CLÍNICOS PATOLÓGICOS	21
1.4- DIAGNÓSTICO	22
2 -OBJETIVOS	29
3 -MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1- AMOSTRAS E CONTROLES	32
3.1.1- Amostras do grupo estudo	32
3.1.2- Amostras controle positivo	33
3.1.3- Amostra controle negativo	33
3.1.4- Amostra controle referência	33
3.2.- OBTENÇÃO DOS PARASITAS	34
3.2.1- Obtenção de cisticercos de <i>Taenia solium</i>	34
3.2.2- Obtenção de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	34
3.3- EXTRATOS ANTIGÊNICOS	35
3.3.1- Antígeno total de <i>Taenia solim</i>	35
3.3.2- Líquido vesicular de <i>Taenia crassiceps</i>	36
3.3.3- Proteínas de 18 e 14 kDa de LV-Tcra Purificados por Imunoafinidade com Anticorpo Monoclonal Anti-LV-Tcra (18/14-Tcra)	36
3.4- IMUNOENSAIOS para Detecção de Anticorpos Anti- <i>T. solium</i>	37
3.4.1- ELISA	37
3.4.1.1- Padronização dos ELISA	38
3.4.1.2- Calculo do Limiar de Reatividade (<i>cut off</i>)	39
3.4.1.3- Interpretação dos Resultados	40
3.4.2- Imunoblot (IB) Utilizando Antígenos T-Tso e LV-Tcra	40
3.4.2.1- Interpretação dos Resultados do Imunoblot	42
4 -RESULTADOS	43
4.1- ELISA com antígeno de <i>T. solium</i> , <i>T. crassiceps</i>	44
4.1.1- ELISA utilizando Antígeno Proteína 18/14 kDa de Líquido Vesicular de <i>T. crassiceps</i> (ELISA-18/14)	

4.1.2-	ELISA utilizando Antígeno Líquido Vesicular de <i>T. crassiceps</i> (ELISA-Tcra)	45
4.1.3-	ELISA utilizando Antígeno Total de <i>T. solium</i> (ELISA-Tso)	47
4.2-	IMUNOBLOT utilizando Antígeno de <i>T. solium</i> e <i>T. crassiceps</i>	50
4.2.1-	Imunoblot com Antígeno Proteínas 18/14 kDa (IB-18/14)	51
4.2.2-	Imunoblot com Antígeno Líquido Vesicular de <i>T. crassiceps</i> (IB-Tcra)	51
4.2.3-	Imunoblot com Antígeno Total de <i>T. solium</i> (IB-Tso)	52
4.3-	PARÂMETROS PARA VALIDAÇÃO	54
4.3.1-	Sensibilidade	54
4.3.2-	Especificidade	55
4.3.3-	Valor Preditivo Positivo (VPP)	55
4.3.4-	Valor Preditivo Negativo (VPN)	57
4.3.5-	Repetitividade	57
5	- DISCUSSÃO	59
5.1-	ELISA e/ou Imunoblot utilizando os antígenos 18/14-Tcra, LV-Tcra e T-Tso	62
6	- CONCLUSÃO	66
7	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
8	- ANEXOS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS

A cisticercose humana é causada pela presença da forma larvária da *Taenia solium* em tecidos após a ingestão de ovos viáveis. A localização do parasita no sistema nervoso central (SNC), neurocisticercose (NC), é a forma mais estudada, pela gravidade dos sintomas e elevadas letalidade e morbidade. A forma larvária ainda tem tendência a se instalar no globo ocular, conjuntivo interfascicular do músculo estriado, tela subcutânea e leptomeninges.

A incidência da NC é variável e relacionada principalmente a fatores sócio-econômico-culturais, constituindo importante problema de Saúde Pública em regiões de condições sanitárias deficientes, assim como em países desenvolvidos que recebem imigrantes de regiões onde a infecção é endêmica. O homem é o hospedeiro definitivo do verme adulto, e elimina ovos embrionados pelas fezes, que são infectantes no meio ambiente. O suíno, após ingestão dos ovos, pode desenvolver cisticercose, a forma larvária do parasita. O homem, ingerindo a carne suína com parasitas viáveis, desenvolve o verme adulto (teníase). Devido aos maus hábitos de higiene e as condições sanitárias deficientes, o homem também pode adquirir cisticercose após ingerir acidentalmente água e alimentos contaminados com ovos embrionados ou, ainda, por auto-infecção, quando portador do verme adulto.

Quando a forma larvária se localiza no SNC, pode desenvolver manifestações clínicas de diferentes formas que dependerá de um conjunto de fatores, incluindo

resposta imune do hospedeiro, topografia da lesão, localização das larvas, quantidade de cistos e tipos de seqüelas desenvolvidas no homem (SOTELO et al., 1985). Esse pleomorfismo da doença torna difícil o diagnóstico clínico e a utilização de terapia adequada.

A dificuldade de se estabelecer um tratamento adequado e a gravidade da doença torna necessário adotar medidas profiláticas. No entanto, esses procedimentos encontram-se aquém do mínimo necessário em diferentes regiões do terceiro mundo, motivo pelo qual a incidência ainda continua alta (SPINA-FRANÇA et al., 1993). A presença de suínos infectados e condições sanitárias insuficientes, caracterizadas por falta ou deficiência de fiscalização sanitária das carnes de consumo e hábitos de higiene insatisfatórios, são fatores relevantes na transmissão da cisticercose humana (SPINA-FRANÇA 1956). A NC é mais freqüente em locais com condições de saneamento básico precário e tal situação facilita a disseminação e persistência da parasitose (MAHAJAN, 1982).

1.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Estima-se que a NC cause anualmente a morte de 50.000 pessoas e que 50 milhões são portadores de cisticercose no mundo (CANTÚ & BARINAGARREMENTERIA, 1996). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, foi proposto que a NC deva ser declarada uma doença mundial. Novos casos de NC vem sendo relatados por clínicos e em hospitais. Acredita-se que a notificação compulsória seja a melhor forma de quantificar a incidência e a prevalência da NC, e

que permitirá o emprego de recursos para a sua erradicação (ROMÁN et al., 2000).

A NC é considerada uma doença endêmica em regiões carentes da América Latina, Ásia, África, China, Indonésia e preocupa autoridades em países em desenvolvimento (McMANUS, 1990; VALDEZ et al., 1994; MONTENEGRO et al., 2003; SARTI et al., 2003), provocando elevado número de casos de epilepsia (ROMÁN et al., 2000). A migração e o turismo têm contribuído para o surgimento de casos de NC na Austrália, Europa e América do Norte (ROMÁN et al., 2000). Levantamentos epidemiológicos demonstraram que a NC é uma doença emergente em países desenvolvidos como os Estados Unidos (GARCIA et al., 1997; SCIUTTO et al., 2000; FLISSER et al., 2003). Em recente estudo, foi demonstrado que em 11 estados americanos com população hispânica, como na Califórnia e no Texas, a NC foi responsável pelo aumento de 10% de casos de epilepsia indefinidos encontrados no hospital de emergência (SCHANTZ & TSANG, 2003).

O “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC), salientou a importância do controle de doenças infecciosas em todo o mundo. Sendo assim uma das formas de prevenção, controle e diagnóstico da cisticercose nos Estados Unidos, contou com levantamento e aplicação de programas de saúde para o controle das áreas endêmicas dada pela “Division of Parasitic Diseases” (NCID/CDC) e “WHO/CDC Collaborating Center for Cysticercosis and Taeniasis” (SCHANTZ & TSANG, 2003).

No Brasil, são áreas endêmicas os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Minas Gerais, Espírito Santo e Distrito Federal, e áreas com casos ocasionais os estados da Bahia, Maranhão, Pernambuco, Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte (AGAPEJEV, 1996).

A análise de dados publicados no Brasil entre 1915 e 1995 mostrou índices de

prevalência de NC, em autópsias, de 0,12% em São Paulo a 9% em Minas Gerais. Nos Serviços de Neurologia e Neurocirurgia de São Paulo, a frequência observada foi de 0,031 a 7,5%, enquanto que na região Nordeste foi de 0,03 a 0,06%.

Em estudos foi citada a incidência de cisticercose no Brasil de 0,68 a 5,2% (AGAPEJEV, 1996). A partir de estudo soroepidemiológico realizado em Brasília, foi encontrada a frequência de anticorpos anti-cisticerco de *Taenia solium* em 5,2% de 1.122 indivíduos estudados (VIANNA et al., 1986).

VAZ et al., 1990, estudaram a frequência de anticorpos anti-*T. solium* em 1.264 amostras de soro de indivíduos de cinco municípios do estado de São Paulo, observando a frequência de positividade de 2,3%, 0,82% e 5,0% respectivamente para soros de 821 adultos e 243 crianças da população geral e 200 pacientes adultos internados em hospital psiquiátrico.

A frequência da NC não mostra diferença quanto à etnia e sexo. A maioria dos estudos revela uma faixa etária de 11 a 60 anos, e dentre estes, a maior frequência ocorre na faixa etária de 21 a 40 anos. O período de hospitalização de pacientes com NC é em torno de 9 a 28 dias e a letalidade da doença em Serviços de Neurologia e Neurocirurgia varia de 4,8 a 25,9% (AGAPEJEV, 1993).

A maior parte dos dados relatados refere-se a casuística isolada de grupos de pesquisadores de centros especializados, uma vez que a doença não é de notificação compulsória no Brasil. Considerando que o Brasil apresenta as condições adequadas para a manutenção do ciclo evolutivo do parasita, a viabilidade dos ovos no meio ambiente, a dificuldade de acesso ao Sistema de Saúde e os aspectos clínicos pleomórficos (SCHANTZ et al., 1993). Pode-se presumir que o Brasil deve ainda ser considerado como país endêmico para a cisticercose humana e animal.

1.3. ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS

O período compreendido entre a infecção inicial e o aparecimento dos sintomas na NC é variável podendo ser de alguns meses a vários anos.

O aspecto clínico da NC é polimórfico; a enfermidade pode variar desde a forma assintomática até incapacidade e mesmo a morte.

As manifestações clínicas da NC são inespecíficas. Dependem de vários fatores, como número, tamanho, localização, estado evolutivo do parasita, bem como do grau de reação inflamatória e resposta imunológica do hospedeiro ao parasita (COLLI et al., 1994). Dentre os sintomas mais freqüentemente observados na NC estão: convulsão freqüentemente relacionada ao envolvimento do parênquima cerebral; síndrome de hipertensão intracraniana; hidrocefalia; demência; meningite e paraparesias, isoladas ou associadas (TAKAYANAGUI & JARDIM, 1983; VAZ & LIVRAMENTO, 1996; SARTI, 1999).

Na cisticercose humana, o número de parasitas encontrado costuma ser pequeno. Em cerca de 77% dos casos de cisticercose humana são encontrados até cinco parasitas (SCHENONE et al., 1982). A gravidade da doença pode ser mensurada pelo coeficiente de letalidade da NC, estimado entre 5 e 25% (MACHADO et al., 1988).

As localizações preferenciais do cisticerco no sistema nervoso central (SNC) são as leptomeninges, os ventrículos e o parênquima cerebral, podendo mais raramente ser encontrado no canal espinhal (LIVRAMENTO et al., 1993; COLLI et al., 1994). A localização ventricular é atribuída à passagem ativa das oncosferas através dos capilares do plexo coróide. Dentro dos ventrículos, dependendo do tamanho do

cisticerco, estes podem ser carregados pelo líquido cefalorraquiano (LCR) até o espaço sub-aracnóideo. A chegada direta da oncosfera ao espaço sub-aracnóideo ou aos ventrículos através das meninges ou das veias subpiais é controvertida (COLLI et al., 1994). Os cisticercos geralmente atingem tamanhos de 4 a 20mm no maior diâmetro, quando localizados no interior do parênquima cerebral. Estas dimensões são geralmente maiores quando o cisticerco se desenvolve nos ventrículos ou no espaço sub-aracnóideo, quando podem assumir a forma racemosa. Nestes, além do aumento de tamanho observado, há ausência de escólex, membrana de aspecto irregular e múltiplas vesículas fundidas.

Os cisticercos apresentam um processo natural de evolução que culmina com sua morte e degeneração. As manifestações clínicas da NC são dependentes dos diferentes estágios evolutivos dos cistos, interagindo com a resposta imune do hospedeiro (COLLI et al., 1994).

De acordo com SPINA-FRANÇA, 1989, a NC exibe um modelo patogênico de infecção onde prevalecem os fenômenos peculiares ao SNC. Este modelo patogênico local, do tipo repetitivo, caracteriza-se por apresentar evolução crônica, com surtos de agudização sem periodicidade definida. Estes surtos de agudização ocorrem quando os cisticercos entram em processo de degeneração, liberando antígenos parasitários e exacerbando a síndrome do LCR na NC, caracterizada por eosinofilia, proteinorraquia, determinando muitas vezes o início da sintomatologia, ou exacerbando a existente (SPINA-FRANÇA, 1989; LIVRAMENTO et al., 1993; MACHADO, 1994).

1.4. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da NC baseia-se em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. O diagnóstico clínico da NC é dificultado em razão da sintomatologia polimorfa e inespecífica, podendo ser confundida com outras patologias que acometem o SNC. Apesar desta diversidade, existem sinais e alterações de exames complementares que são mais freqüentes na NC do que em outras doenças do SNC. Dados epidemiológicos como a endemicidade da área de procedência do paciente também auxiliam no direcionamento diagnóstico (VAZ & LIVRAMENTO, 2001).

É consenso geral que o diagnóstico preciso é alcançado em instituições especializadas através do uso simultâneo de estudos de imagem e análise laboratorial do LCR, que inclui exame citomorfológico, bioquímico e testes imunológicos (COLLI et al., 1994).

No diagnóstico por imagem, a radiografia simples (Raios X) mostra apenas cistos calcificados (COLLI et al., 1994). Outros exames de imagem permitem a visualização de parasitas nas formas císticas e calcificadas, na tomografia computadorizada (TC) (MACHADO et al., 1990) e cistos viáveis, no início da degeneração, hialinização e fibrose, na ressonância magnética (RM) (SCHROTH et al., 1987). Em consenso reunindo autoridades mundiais para debater critérios diagnósticos da doença, diversos aspectos de neuroimagem foram descritos, e classificados, quanto à sua importância para o diagnóstico, em imagens patognomônicas, altamente sugestivas e compatíveis com NC (Del BRUTO et al., 2001). É considerada imagem patognomônica, ou critério absoluto para o diagnóstico, a presença de imagem cística com demonstração de escólex, que é visto como um nódulo excêntrico em seu interior. Uma única imagem com essas características, que pode ser demonstrada tanto pela TC quanto pela RM, é

suficiente para o diagnóstico definido de NC. Algumas imagens são consideradas altamente sugestivas de NC. Entre elas se incluem lesões císticas sem escólex, única ou múltiplas lesões com realce anelar ou nodular, e calcificações arredondadas parenquimatosas. Isoladamente, estas imagens sugerem, mas não confirmam o diagnóstico de NC, exigindo diagnóstico diferencial com outras doenças neurológicas. São considerados critérios maiores para o diagnóstico, e duas delas, associadas a mais um critério menor (clínico, de imagem ou laboratorial) e epidemiologia positiva para a doença, também permitem o diagnóstico definido. Dentro deste grupo, podem ser consideradas também lesões císticas que se resolveram após tratamento com droga parasiticida, e pequenas lesões hipercaptantes de resolução espontânea. Todas estas imagens podem ser vistas à TC, mas são melhores discriminadas pela RM, com exceção das calcificações. Como achado compatível com NC, podemos citar dilatação ventricular, captação anômala de contraste pela leptomeninge e falhas de enchimento múltiplos em exame mielográfico, ou outros exames de imagem da coluna, como TC ou RM, que possam sugerir a presença de cistos espinhais. São imagens inespecíficas, que podem ser encontradas em diversas outras situações, e são considerados critérios menores para o diagnóstico (ABRAHAM, 2003).

Lamentavelmente estas técnicas de imagem apresentam custos elevados e estão restritas aos centros especializados e não são acessíveis à maior parte da população que padece da doença (FLISSER et al., 1997; SARTI, 1999). A busca de técnicas diagnósticas capazes de garantir acessibilidade à população de baixa renda, tornou-se consenso no cenário de pesquisa.

O exame de LCR é um importante teste na avaliação e acompanhamento de pacientes com suspeita de NC embora possa, em alguns pacientes, apresentar-se

normal ou com alterações insuficientes para o diagnóstico da doença (LIVRAMENTO et al., 1987). As alterações encontradas no LCR são pleocitose linfomononuclear, eosinofílorraquia, e presença de anticorpos específicos (LANGE, 1940). Ocorre ainda aumento da taxa de proteínas totais, aumento de gamaglobulinas e eventualmente alteração no padrão de eletroforese (oligoclonal), em consequência, pode haver diminuição da relação albumina/globulina. Estas últimas alterações estão relacionadas à concentração de anticorpos específicos no LCR (SPINA-FRANÇA et al., 1976).

No diagnóstico imunológico, as dificuldades são relacionadas a: fatores pertinentes ao parasita (localização em sítio imunológico privilegiado, número de cisticercos presentes, fase evolutiva dos mesmos, liberação de antígeno comuns a outros parasitas); a fatores inerentes ao hospedeiro que determinam respostas individuais e variadas frente ao parasita; à heterogeneidade das reações imunológicas empregadas (tipo de antígeno, diluição das amostras, reagentes, grau de sensibilidade e especificidade, etc) (GARCIA-ROSALES et al., 1990). Ainda assim, a pesquisa de anticorpos anti-cisticercos de *T.solium* no LCR constitui um importante elemento de auxílio diagnóstico. A interpretação dos resultados dos testes diagnósticos deve ser feita conjuntamente com os dados clínicos e com o resultado dos exames de neuroimagem, quando possível, pois poderão ocorrer resultados falso-negativos. As justificativas para estas ocorrências são entre outras, estágios evolutivos da doença, variação antigênica do parasita, efeitos imunossupressores da corticoterapia e a baixa sensibilidade de alguns testes (FLISSER et al., 1979).

A primeira técnica utilizada no diagnóstico imunológico da NC foi a reação de fixação do complemento no LCR. A reação foi descrita por WEINBERG em 1909 e empregada em soros de suínos infectados. Esta técnica utilizada no passado tem

algumas desvantagens, como padronização constante dos reativos utilizados. Apresenta confiabilidade somente quando realizada em amostras que não apresentem atividade anti-complementar (FLISSER et al., 1997).

Em nosso meio, MACHADO et al., 1973, aplicaram a reação de imunofluorescência em amostras de LCR, utilizando como antígenos partículas deslipidizadas de cisticerco de *T. solium*. Posteriormente, esta técnica foi empregada por BASSI et al., 1979 e LIVRAMENTO, 1981, em grande número de amostras de LCR, com sensibilidade variando de 87,0% a 96,0%.

Apesar dos testes imunológicos para o diagnóstico de NC em LCR serem de grande importância e utilidade, o procedimento invasivo para a obtenção da amostra requer profissional especializado em local apropriado. Por outro lado, a utilização de amostras séricas apresenta baixo índice de especificidade, mas poderá ser melhorado se houver uma padronização adequada do teste de acordo com a população a ser estudada (VAZ, 1999).

Em 1964, BIAGI & PIÑA, descreveram pela primeira vez a reação de imunofluorescência indireta, usando como antígeno cortes histológicos do cisticerco da *T. solium*. Estes, quando colocados em presença de soros de suíno infectados revelaram um padrão de fluorescência mais intenso nos corpúsculos calcáreos, menos intenso na membrana e escólex e nenhuma fluorescência na cutícula.

PROCTOR et al., 1966, empregaram a reação de hemaglutinação passiva, utilizando para sensibilizar as hemácias uma preparação antigênica obtida de cisticerco total. A reação foi positiva em 85,0% dos soros humanos de pacientes com cisticercose comprovada radiologicamente ou por autópsia.

TSANG et al., 1989, desenvolveram o enzyme-linked immunoelectrotransfer blot

(EITB) para diagnóstico da cisticercose humana no soro e LCR, utilizando antígenos de glicoproteínas (*T.solium*) purificadas por afinidade a lentil-lectina; tornando-se hoje referência para diagnóstico da cisticercose humana pelo CDC.

Em 1978, ARAMBULO et al., introduziram o teste ELISA para o diagnóstico da NC no soro, utilizando antígeno deslipidizado das formas adulta e larvária da *T.solium*.

A utilização do soro tem grande aplicação na identificação das áreas endêmicas e dos fatores de risco de transmissão, que têm sido determinados por levantamento soropidemiológico utilizando o teste ELISA (COKER-VANN et al., 1981; VIANNA et al., 1986; PAMMENTER et al., 1987b; SARTI-GUTIERREZ et al., 1988; CAMACHO et al., 1990; FRITZSCHE et al., 1990; BONAMETTI et al., 1992).

Os resultados obtidos com o emprego do ELISA no soro são relatados como razoáveis, em torno de 80% de sensibilidade e especificidade de 70 a 95% (LARRALDE et al., 1986; NASCIMENTO et al., 1987; MORAKOTE et al., 1992; RAMOS-KURI et al., 1992). BUENO et al., 2000^a, relataram sensibilidade de 94,1% e especificidade de 100% com amostras de LCR, sensibilidade de 70,6% e especificidade de 80% com amostras com amostras de soro quando avaliado o teste ELISA com antígeno salino total de *T.solium*.

A introdução de antígenos obtidos a partir da forma larvária de *T. crassiceps* traçou novos rumos ao diagnóstico sorológico da cisticercose e NC e tem sido empregado como fonte alternativa de antígeno em diferentes testes imunodiagnósticos da NC. A reatividade cruzada observada com antígenos da forma larvária de *T.solium* indica que os parasitas apresentam epítomos antigênicos comuns e importantes, presentes em concentrações suficientes para o uso em testes imunológicos (LARRALDE et al., 1990a; GARCIA et al., 1995; ANDRADE et al., 1996; FERREIRA et

al., 1997; VAZ et al., 1997a; VAZ et al., 1997b; BUENO et al., 2000a; ESPÍNDOLA et al., 2000; VAZ & LIVRAMENTO, 2001).

O líquido vesicular de *T. crassiceps* (LV-Tcra) tem sido utilizado de forma eficiente no imunodiagnóstico da cisticercose. Assim BUENO et al., 2000^a, relataram sensibilidade de 91,2% e especificidade de 80% utilizando-se teste ELISA com antígeno LV-Tcra. Entretanto, a avaliação de um teste sorológico em escala de pesquisa, nem sempre produz resultados que correspondem quando ele é aplicado em campo, quando outros grupos populacionais e de condições laboratoriais de difícil previsão interferem na eficiência dos testes.

Assim, uma vez padronizado o teste, o estudo populacional pode revelar o desempenho diagnóstico do teste em condições reais de uma situação diagnóstica.

Apesar da praticidade do ELISA, especialmente após a introdução do antígeno de *T. crassiceps*, a sensibilidade e especificidade para o soro ainda eram insuficientes, já que, sendo a cisticercose uma infecção de baixa prevalência, o valor preditivo positivo (VPP) do teste seria muito baixo.

A purificação do líquido vesicular de *T. crassiceps* por cromatografia de afinidade e a obtenção de proteína de 18 e 14 kDa realizada por ESPÍNDOLA et al., 2005, abriram novas perspectivas no imunodiagnóstico da cisticercose. O uso dessa proteína como antígeno propiciou sensibilidade e especificidade de 100%, tanto no ELISA como no imunoblot, podendo ser realizado tanto no soro quanto no LCR com a mesma eficiência.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consiste na avaliação do desempenho do teste ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-cisticercos de *Taenia solium*, para elaboração de estratégias sorológicas na população geral.

Para tanto, foram necessários:

- Avaliação de testes ELISA utilizando os antígenos 18/14-Tcra, LV-Tcra e T-Tso em 610 amostras da população geral.
- Análise dos parâmetros sorológicos como: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e repetitividade, para cada teste utilizado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho faz parte do projeto temático Cisticercose: Imunodiagnóstico, Antígenos, Resposta Imunológica e Aspectos Clínico-Epidemiológicos, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). Foi desenvolvido no laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em colaboração com o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais FCF/USP.

3.1. AMOSTRAS E CONTROLES

3.1.1. Amostras do Grupo Estudo

As amostras de soro do grupo estudo (GE) foram cedidas gentilmente pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, totalizando 610 amostras de indivíduos selecionados para doação sangüínea na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, foram aqui consideradas saudáveis e possivelmente representantes da população geral por ser uma instituição que recebe doadores das mais variadas regiões do Brasil

3.1.2. Amostras Controle Positivo

Foram utilizadas como controle positivo (CP) 20 amostras de soro de indivíduos com neurocisticercose confirmada por critérios clínicos, laboratoriais e por exames de imagem cedidas pelo Profº Dr. Osvaldo Massati Takayanagui do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP e Profº Dr. Luís dos Ramos Machado da Faculdade de Medicina, USP.

3.1.3 Amostra Controle Negativo

O controle negativo (CN) utilizado nos ensaios foi uma amostra de soro cedida pelo Laboratório de Análises Clínicas da FCF/USP, e faz parte da coleção de amostras do Departamento de Imunologia da FCF/USP, com sorologia não reagente para cisticercose nos testes ELISA e Imunoblot. Essa amostra foi adicionada aos ensaios em diferentes dias nos testes processados. E constituiu-se o controle negativo dos testes.

3.1.4 Amostra Controle Referência

O critério para escolha e obtenção da amostra controle referência (CR) foi o mesmo utilizado no CN. Essa amostra foi ensaiada nos diferentes dias da execução dos testes com o propósito de correção das absorbâncias das amostras GE, CP e CN, influenciada pelas diferentes condições diárias nos ensaios.

Todas as amostras utilizadas foram mantidas em alíquotas a -20°C durante o estudo.

3.2. OBTENÇÃO DOS PARASITAS

3.2.1. Obtenção de Cisticercos de *Taenia solium*

As larvas de *T. solium* foram obtidas de músculos de suínos naturalmente infectados cedidas pelo Profº Antonio A M Maia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade do Estado de São Paulo, em Pirassununga, SP.

3.2.2. Obtenção de Cisticercos de *Taenia crassiceps*

As larvas de *T. crassiceps*, cepa ORF - Ontary Research Fundation, Canadá (FREEMAN, 1962), foram cedidas em 1989 pelo Prof. Dr. Carlos Larralde do Instituto de Investigaciones Biomédicas da Universidad Nacional Autonoma de México. Desde 1990, a cepa vem sendo mantida por passagens intraperitoneais, a cada 90 dias, em camundongos fêmeas BALB/c de 8 a 12 semanas de idade.

Os parasitas foram mantidos por inoculação intraperitoneal de 5 a 10 vesículas pequenas (sem brotamentos visíveis), em suspensão com volume mínimo (cerca de

200 µL) de solução salina (NaCl 0,15 M). A inoculação foi feita com o auxílio de agulha hipodérmica de calibre 25 x 7 mm.

Após noventa dias, os animais que apresentaram aumento de volume peritoneal foram sacrificados e os cisticercos foram retirados e lavados exaustivamente com solução salina, sendo desprezados aqueles em fase de degeneração ou calcificação. Os parasitas foram imediatamente processados para a obtenção dos extratos antigênicos.

3.3. EXTRATOS ANTIGÊNICOS

3.3.1. Antígeno Total de *Taenia solium*

O antígeno total de *T. solium* (T-Tso) foi obtido segundo Espíndola et al. (2002). Os cisticercos de *T. solium* foram lavados aproximadamente 10 vezes em PBS (Na_2HPO_4 0,025 M, KH_2PO_4 0,007 M e NaCl 0,14 M, pH 7,2). Após liofilização, o material foi reconstituído com PBS (100mg/mL), homogeneizado em banho de gelo por 5 minutos e centrifugado (15,000g por 60 minutos à 4°C). Os sobrenadantes foram submetidos ao tratamento por ultra-som (Ultrasonic Power Unit – MSE, USA) em 4 ciclos de 30 segundos a 1mA e 20kHz, em banho de gelo e re-centrifugados, este sobrenadante constituiu o antígeno T-Tso.

3.3.2. Líquido Vesicular de *Taenia crassiceps* (LV-Tcra)

Os cisticercos íntegros foram rompidos com auxílio de bastão de vidro e centrifugados a 15.000g, durante 20 minutos a 4°C. Foi retirado o sobrenadante e então re-centrifugado. O sobrenadante foi submetido ao tratamento por ultra-som em 4 ciclos de 30 segundos a 1mA e 20kHz, em banho de gelo. O material resultante foi centrifugada a 15.000g durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi novamente centrifugado dando origem ao extrato antigênico LV-Tcra. Ao antígeno obtido foi adicionado inibidor de proteases, na concentração final de 4×10^{-1} mM e, então, dividido em alíquotas e conservado a -20°C (VAZ et al., 1997b).

As proteínas do antígeno LV-Tcra foram quantificadas pelo método descrito por LOWRY et al. (1951), utilizando albumina bovina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) como padrão.

3.3.3. Proteínas de 18 e 14 kDa de LV-Tcra Purificados por Imunoafinidade com Anticorpo Monoclonal Anti-LV-Tcra (18/14-Tcra)

O antígeno LV-Tcra foi purificado em coluna de afinidade sepharose 4B preparada com anticorpo monoclonal (AcMo) anti- LV-Tcra. Foram aplicados 10 mL do antígeno LV-Tcra contendo 10 mg de proteínas. O material eluído da coluna foi caracterizado como proteínas 18/14-Tcra. (ESPÍNDOLA et al., 2005).

O anticorpo monoclonal (AcMo) anti-LV-Tcra foi obtido segundo Espíndola et al.

(2002), tendo sido testado em imunoblot na concentração de 1,7 µg/mL frente a diferentes antígenos para o estudo de especificidade. Os antígenos utilizados para a caracterização desse AcMo foram LV-Tcra, T-Tso, líquido vesicular, membrana e escólex de *T. solium*, escólex, membrana e extrato total de *Taenia saginata*.

O AcMo anti-LV-Tcra apresentou reatividade com frações menores que 20 kDa com todos os antígenos estudados (ESPÍNDOLA, 2003)

As proteínas 18/14-Tcra foram dosadas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), utilizando albumina bovina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) como padrão.

3.4. IMUNOENSAIOS para Detecção de Anticorpos Anti-*T. solium*

O “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay” (ELISA) e o imunoblot foram padronizados com titulações em bloco de todos seus reagentes (concentração antigênica, diluição de amostra, conjugado, substrato e cromógeno), bem como tempos de bloqueio, incubações e temperatura.

3.4.1. ELISA

Os ELISA foram realizados com os antígenos T-Tso (ELISA-Tso), LV-Tcra (ELISA-Tcra) e 18/14-Tcra (ELISA-18/14) e amostras de soro de todos os grupos. Os ensaios foram realizados de acordo com ELISA padronizado.

3.4.1.1. Padronização dos ELISA

O conjugado utilizado foi anti-IgG humana marcada com peroxidase (Biomerieux Brasil S.A). O conjugado foi empregado no seu título ótimo, previamente determinado para cada antígeno, utilizando diluições seriadas em 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000 contra soros padrões positivos e negativos. Foram escolhidas as condições que permitiram melhor diferenciação entre as amostras positivas e negativas.

As placas de microtitulação de poliestireno de fundo plano, não estéreis, de 96 cavidades (NUNCTM Maxisorp loose, Denmark) foram sensibilizadas com 0,2µg do antígeno T-Tso, 0,1µg do antígeno LV-Tcra e 0,07µg da proteína 18/14-Tcra em tampão carbonato/bicarbonato 0,5M pH 9,6 e incubadas a 4°C durante 18 horas em câmara úmida. Após esta etapa de incubação, as microplacas foram lavadas 3 vezes em lavadora automática com solução salina contendo Tween 20 a 0,05% (salina-T). As placas foram bloqueadas durante 2 horas com 200µL de solução composta de leite desnatado (Molico Nestlé, Araçatuba, SP, Brasil) a 5% em PBS-T a 37°C.

Após varias lavagens, as amostras de soro foram incubadas diluídas de forma seriada a 1:100, 1:200, 1:400 nos testes ELISA-Tcra e ELISA-Tso e 1:50 no teste ELISA-18/14, foram repetidas as lavagens e, então adicionado o conjugado diluído a 1:1000 nos testes ELISA-Tcra e ELISA-18/14, e 1:3000 para o ELISA-Tso. Em seguida,

as placas foram lavadas novamente e incubadas com ortofenilenodiamina (OPD, Sigma Chem. Co USA) / H_2O_2 (Merck, Alemanha).

As incubações foram realizadas a 37°C por 1 hora em todas as etapas, com exceção da incubação com o substrato cromogênico (15 minutos) e o bloqueio (2 horas). A reação enzimática foi interrompida com ácido sulfúrico 4N e a intensidade da coloração foi quantificada em leitor de placas (SLT-Spectra) em comprimento de onda de 492nm.

Em cada teste foi feito um “branco” da reação, este constituiu-se da reação sem a presença da amostra, para verificar a reatividade de fundo (back-ground) da reação.

3.4.1.2. Calculo do Limiar de Reatividade (*cut off*)

No ELISA, o *cut off* foi determinado utilizando-se a curva ROC. Os diferentes pontos (*cut-off*) nos quais se discriminam o grupo portador da doença em estudo do grupo sadio resultaram em diversas sensibilidades e especificidades de um teste. A curva ROC estuda o ponto de corte ideal em que se obtém melhores valores dos parâmetros de *sensibilidade* e *especificidade* do teste.

Ao projetarmos um gráfico em que o eixo das ordenadas representa a sensibilidade dos diversos pontos de cortes analisados e o eixo das abscissas a taxa de falsos positivos (1 - especificidade), para estes mesmos pontos de corte obteremos uma curva ROC.

Assim sendo, a curva ROC demonstra graficamente a relação entre o índice de verdadeiros positivos e o índice de falsos positivos, sendo que o critério de decisão

varia sistematicamente entre 0 e 100 %. Esta medida parte do cálculo da área sob a curva. Um valor mínimo de 0,50, representado graficamente por uma linha a 45°C, determina que o teste não possui capacidade discriminatória, ou ainda, que a taxa de verdadeiros positivos equivale à de falsos positivos. O valor máximo atingido por uma curva *ROC* é de 1,0, representada por uma linha sobreposta ao eixo das ordenadas. Neste caso, o teste possui valor preditivo positivo considerado perfeito, ou seja, o teste é capaz de detectar os verdadeiros positivos, não existindo resultados falso positivos.

3.4.1.3. Interpretação dos Resultados

O resultado de cada amostra foi expresso pelo índice de reatividade (IR). Este índice foi calculado pela divisão dos valores da absorbância de cada amostra pelo valor do controle referência do dia. De acordo com a proposta deste trabalho, foram adotados como critério de seleção de amostras a serem analisadas pelo imunoblot, os valores de $IR \geq 0,60$ para ELISA-Tso nas diluições 1:100, 1:200 e 1:400, no ELISA-Tcra $IR \geq 1,70$ na diluição 1:100 e $IR \geq 1,40$ nas diluições 1:200 e 1:400 e no ELISA-18/14 $IR \geq 0,64$ na diluição 1:50.

3.4.2. Imunoblot (IB) Utilizando Antígenos T-Tso e LV-Tcra

Os antígenos T-Tso e LV-Tcra foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE; USB Corporation Cleveland, USA) sob condições redutoras, em sistema descontínuo (LAEMMLI, 1970).

Foi utilizado gel de separação a 15% e gel de empilhamento a 5% em sistema descontínuo. Os antígenos T-Tso e LV-Tcra foram aplicados na proporção de 7 µg/mm, o padrão de peso molecular utilizado foi de 14,4 a 94 kDa (Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Suécia). A corrida eletroforética (BioRad Laboratories Inc, Califórnia, EUA) foi realizada a 50V até a passagem da amostra do gel de empilhamento para o gel de separação, quando a voltagem foi aumentada e mantida a 100V, até a chegada do marcador azul de bromofenol (Pharmacia Biotech, Suíça) no final do gel.

Após a eletroforese, foi realizada transferência dos peptídeos separados por SDS-PAGE do gel para membranas de nitrocelulose 0,2µ (Milipore, USA) segundo a metodologia descrita por TOWBIN et al. (1984). A transferência foi realizada em sistema úmido utilizando cuba eletroforética (TE 42 Transphor Unit, Amershan Pharmacia Biotech, New Jersey, USA) a 4°C durante 18 horas a 50V. Em seguida a membrana foi corada com Ponceau-S 0,5% (Serva Feinbiochemical, GmbH e Co. KG, Alemanha) e descorada com água destilada para a retirada do excesso de corante e armazenada entre papéis de filtro a 4°C até o momento do uso.

As amostras de soro reativas no ELISA utilizando antígenos T-Tso e LV-Tcra foram ensaiadas no imunoblot utilizando os respectivos antígenos para avaliação da especificidade. Em paralelo foram incubadas as amostras dos grupos controles (CP e CN).

As membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de 3mm, lavadas em PBS-T e bloqueados os sítios reativos remanescentes durante 2 horas em tampão de

bloqueio (solução de leite desnatado 5% em PBS-T pH 7,2), sob agitação constante a temperatura ambiente. Como diluente de amostra foi utilizada solução de leite desnatado 1% em PBS-T.

Seguido o bloqueio, as tiras foram lavadas 3 vezes em PBS-T e incubadas com amostras de soro diluídas a 1:50 por 18 horas a 4°C

Após a incubação das amostras, repetiram-se as lavagens e foi adicionado 800µl do conjugado anti-IgG humana biotinilado/avidina-peroxidase (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) diluído a 1:2000 por 1 hora.

A reação foi revelada com substrato cromogênico, preparado com 3,0mg de 4-cloro-1-naftol (Sigma) dissolvido em 1,0mL de metanol e 5,0mL de solução tris-salina (Tris-hidroximetilaminoetano a 0,01 M e NaCl a 0,15M, pH 7,5), acrescido de 5,0µl de H₂O₂, por 15 minutos. A reação foi interrompida com lavagens em água.

3.4.2.1. Interpretação dos Resultados do Imunoblot

No imunoblot com antígeno T-Tso (IB-Tso), as amostras consideradas reativas foram as que apresentaram reatividade com as frações 28 e 18 kDa segundo nossa proposta de trabalho e com o antígeno LV-Tcra (IB-Tcra) os que reagiram com as frações 18 e 14 kDa.

4. RESULTADOS_____

4.1. ELISA com antígeno de *T. solium*, *T. crassiceps*

4.1.1. ELISA utilizando Antígeno Proteína 18/14 kDa de Líquido Vesicular de *T. crassiceps* (ELISA-18/14)

Os resultados em índices de reatividade obtidos na pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium* nas 610 amostras do grupo estudo (GE) e nas 20 amostras controle positivo (CP) estão expressos na figura 1.

Fig. 1: Resultados em IR obtidos para as 610 amostras de soro do GE e 20 amostras CP no ELISA-18/14 para pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium*.

Os valores de IR apresentados no teste com as amostras do GE variaram entre 0,01 a 0,39 (Média=0,15; SD=0,09); o limiar de reatividade (*cut off*) estimado foi de IR $\geq$ 0,64. Assim, das 610 amostras testadas, nenhuma apresentou IR acima do *cut off* ; todas as amostras foram consideradas negativas pelo critério de positividade.

Nas amostras CP a variação do IR esteve entre 0,9 a 5,2 (Média=3,4; SD=2,55). A diluição das amostras e controles no teste foi de 1:50.

4.1.2. ELISA utilizando Antígeno Líquido Vesicular de *T. crassiceps* (ELISA-Tcra)

Os resultados em índice de reatividade obtidos na pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium* utilizando antígeno LV-Tcra e amostras diluídas a 1:100; 1:200; 1:400 estão apresentados nas figuras 2, 3 e 4 respectivamente.

Fig. 2: Resultados em IR obtidos para as 610 amostras de soro do GE e 20 amostras CP na diluição 1:100 no ELISA-Tcra para a pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium*.

Fig. 3: Resultados em IR obtidos para as 610 amostras de soro do GE e 20 amostras CP na diluição 1:200 no ELISA-Tcra para a pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium*.

Fig. 4: Resultados em IR obtidos para as 610 amostras de soro do GE, e 20 amostras CP na diluição 1:400 no ELISA-Tcra para a pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium*.

As amostras do GE apresentaram uma variação no IR entre 0,02 e 4,50 (Média=0,48; SD=0,51) utilizando a diluição 1:100; na diluição 1:200, a variação esteve entre 0 a 3,20 (Média=0,38; SD=0,46) e na diluição 1:400 a variação ocorreu entre 0 e 4,10 (Média=0,41; SD=0,56). O limiar de reatividade (*cut off*) calculado foi estimado em $IR \geq 1,7$ na diluição 1:100 e, das 610 amostras do GE testadas 24 (3,9%) apresentaram IR acima desse *cut off*. Na diluição 1:200, 22 (3,6%) amostras apresentaram $IR \geq 1,4$ e na diluição 1:400 com o *cut off* estimado em $IR \geq 1,4$ foi observado um total de 23 (3,7%) amostras positivas. Pelo critério estabelecido de positividade, essas amostras foram selecionadas para o teste confirmatório imunoblot utilizando antígeno líquido vesicular de *T. crassiceps* (IB-Tcra).

Nas amostras CP houve variação de 1,7 a 5,5 (Média=3,6; SD=2,7) na diluição 1:100; na diluição 1:200, as amostras CP variaram entre 1,4 e 6,4 (Média=3,9; SD=2,7); na diluição 1:400, a variação da amostra CP ficou entre 1,4 a 10,5 (Média=5,6; SD=4,6).

4.1.3. ELISA utilizando Antígeno Total de *T. solium* (ELISA-Tso)

Os resultados em índice de reatividade (IR) obtidos na pesquisa de anticorpos anti-cisticercos de *T. solium*, utilizando antígeno de T-Tso e amostras diluídas a 1:100; 1:200; 1:400 no grupo GE e grupo CP estão apresentados nas figuras 5, 6 e 7 respectivamente.

Fig. 5: Resultados em índice de reatividade (IR) obtidos para as amostras do grupo estudo e controle positivo na diluição 1:100 no ELISA-Tso para a pesquisa de anticorpos anti-cisticercos de *T.solium*.

Fig. 6: Resultados em índice de reatividade (IR) obtidos para as amostras do grupo estudo (GE) e amostras controle positivo (CP) na diluição 1:200 no ELISA-Tso para a pesquisa de anticorpos anti-cisticercos de *T.solium*.

Fig. 7: Resultados em índice de reatividade (IR) obtidos para as amostras do grupo estudo e amostras CP na diluição 1:400 no ELISA-Tso para a pesquisa de anticorpos anti-cisticercos de *T.solium*.

Os valores de IR do ELISA-Tso para pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T.solium* nas amostras do GE na diluição 1:100 variaram entre 0,01 a 1,30 (Média=0,23; SD=0,18); na diluição 1:200, a variação ocorreu entre 0,00 a 1,50 (Média=0,19; SD=0,19) e na diluição 1:400, a variação ocorreu entre 0,00 a 1,40 (Média =0,17; SD=0,20). Das 610 amostras testadas, 33 (5,4%) apresentaram $IR \geq 0,60$ com diluição 1:100; na diluição 1:200, utilizando como *cut off* $IR \geq 0,60$, a positividade foi observada em 24 (3,9%) amostras; na diluição 1:400, um total de 27 (4,4%) amostras apresentaram $IR \geq 0,60$; essas amostras por critérios de positividade proposta no trabalho foram selecionadas para o imunoblot utilizando o antígeno T-Tso (IB-Tso).

Os valores de IR no teste para as amostras CP variaram entre 0,7 a 2,8 (Média=1,7; SD=0,71) utilizando a diluição 1:100; na diluição 1:200, a variação ficou entre 0,6 e 4,1 (Média=1,7; SD=0,93) e na diluição 1:400, a variação esteve entre 0,6 e

6,0 (Média=2,0; SD=1,36).

A tabela 1 mostra a distribuição dos resultados positivos nos testes ELISA utilizando os antígenos T-Tso e LV-Tcra e proteína 18/14 kDa nas amostras do GE.

Antígeno	Diluição amostra	Positividade no teste ELISA nas amostras do GE
18/14	1:50	0 (zero)
	1:100	24 (3,9%)
LV-Tcra	1:200	22 (3,6%)
	1:400	23 (3,7%)
	1:100	33 (5,4%)
T-Tso	1:200	24 (3,9%)
	1:400	27 (4,4%)

Tab. 1: Positividade das amostras GE testadas no teste ELISA utilizando antígenos proteína 18/14, LV-Tcra e T-Tso.

4.2. IMUNOBLOT utilizando Antígeno de *T. solium* e *T. crassiceps*

4.2.1. Imunoblot com Antígeno Proteínas 18/14 kDa (IB-18/14)

Das 610 amostras testadas no ELISA-18/14, para a pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium*, nenhuma apresentou critério de positividade determinado pelo limiar de reatividade estabelecido ($IR \geq 0,64$), portanto não houve amostras selecionadas para o IB-18/14, uma vez que o ELISA-18/14 apresentou 100% de especificidade.

4.2.2. Imunoblot com Antígeno Líquido Vesicular de *T. crassiceps* (IB-Tcra)

O teste IB-Tcra foi ensaiado com 24 (3,9%) das 610 amostras de soro do GE que apresentaram $IR \geq 1,7$ no ELISA-Tcra na menor diluição, 1:100, essas amostras perfazem também as 23 amostras positivas na diluição 1:400 que mostraram melhor discriminação.

Em todas as amostras ensaiadas foi observada a ausência de reatividade específica, portanto não reativas. Os resultados obtidos no IB-Tcra utilizando algumas amostras do GE positivas no ELISA-Tcra estão ilustrados na figura 8.

Fig. 8: Resultados do IB-Tcra utilizando amostras do GE reativas no ELISA-Tcra, controle positivo e controle negativo.

Das vinte e quatro amostras ensaiadas no IB-Tcra, 21 (87,5%) delas não demonstraram reatividade, porém 3 amostras foram reativas com frações inespecíficas > 30 kDa. Essas amostras com reações inespecíficas apresentaram uma variação do IR entre 1,7 a 2,6 no teste ELISA-Tcra, sendo 1 amostra (33%) $\geq 2,0$.

4.2.3. Imunoblot com Antígeno Total de *T. solium* (IB-Tso)

O teste foi realizado utilizando as 33 amostras do GE consideradas positivas,

com IR acima do *cut off* estabelecido quando ensaiadas no ELISA-Tso na diluição 1:100.

Os resultados obtidos mostram a ausência de reatividade específica (não reatividade) no IB-Tso utilizando as 33 amostras do GE positivas no ELISA-Tso. O aspecto do IB-Tso representado por algumas amostras estão apresentados na figura 9.

Fig. 9: Resultado do IB-Tso utilizando as amostras do GE reativas no ELISA-Tso, controle positivo e controle negativo.

O critério de positividade para o IB-Tso foi estabelecido pela reatividade com as frações 18 e 28 kDa, consideradas específicas. Dezesesseis (48,5%) amostras testadas no IB-Tso para a pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium*, apresentaram reatividade com frações > 30 kDa consideradas inespecíficas e nas demais amostras

(17) não foi observado reatividade com nenhuma fração.

Das 16 amostras com reatividade inespecífica no IB-Tso, 6 (37,5%) amostras apresentaram $IR \geq 0,9$ no ELISA-Tso. A variação do IR esteve entre 0,6 a 1,7.

A distribuição dos resultados das amostras séricas testadas no IB-Tso, IB-Tcra em não reativas e reativas com frações > 30 kDa, estão expressos na tabela 2.

Teste	Ausência de Reatividade	Reatividade inespecífica > 30 kDa	Total de amostras
IB-Tcra	21 (87,5%)	3 (12,5%)	24
IB-Tso	17 (51,5%)	16 (48,5%)	33

Tabela 2: Distribuição dos resultados das amostras ensaiadas no IB-Tcra e IB-Tso em relação à reatividade observada com frações inespecíficas e ausência de reatividade

4.3. PARÂMETROS PARA VALIDAÇÃO

Com o objetivo de avaliar um teste ELISA quanto à eficiência diagnóstica para a cisticercose, para uso em inquéritos sorológicos na população geral, foram analisados e calculados os parâmetros a partir dos dados expressos nos resultados.

4.3.1. Sensibilidade

A porcentagem dos resultados acima do limiar de reatividade estabelecido (considerados portanto positivos) nas 20 amostras CP (indivíduos sabidamente doentes) foi de 100% nos testes, ELISA-18/14, ELISA-Tcra e ELISA-Tso. Em todas as diluições trabalhadas, foi dispensável a utilização de um teste confirmatório.

4.3.2. Especificidade

Nas 610 amostras de indivíduos supostamente saudáveis, a porcentagem de resultados negativos variou entre os diferentes testes envolvidos, relatando diferentes especificidades.

No teste ELISA-18/14 utilizando a diluição 1:50, todas as amostras ensaiadas (610) apresentaram um IR abaixo do limiar de reatividade estabelecido, portanto negativas. Não houve resultados falso positivos nessas amostras, determinando a especificidade do teste em 100%.

No ELISA-Tcra utilizando as diluições 1:100, 1:200 e 1:400, o teste apresentou uma especificidade de 96,2%; 96,5% e 96,3% respectivamente. No ELISA-Tso, também utilizando as diluições 1:100, 1:200 e 1:400 a especificidade calculada ficou em 94,8%; 96,2% e 95,7% respectivamente.

4.3.3. Valor Preditivo Positivo (VPP)

O VPP expressa a probabilidade de doença quando o resultado do teste é positivo e depende da prevalência da doença na população. Levando em consideração diversas prevalências possíveis na população geral, foram calculados VPP utilizando prevalências que variam de 0,1 a 5% com a finalidade de expressar oscilações coerentes na população.

O ELISA-18/14 apresentou um VPP igual a 100% para todas as prevalências trabalhadas, a saber: 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0%.

No ELISA-Tcra utilizando a diluição 1:100, para uma prevalência de 0,1% o VPP ficou em 2,0%, utilizando as prevalências de 0,5; 1,0 e 5,0% o VPP foi fixado em 13,2; 21 e 58% respectivamente. Na diluição 1:400, onde a especificidade e a discriminação dos controles positivos foi melhor, utilizando as mesmas prevalências o VPP ficou em 2,6; 13,5; 21,5 e 59,3% respectivamente.

No ELISA-Tso também utilizando a diluição 1:100, o VPP ficou estabelecido em 1,8% para uma prevalência de 0,1%, para as prevalências de 0,5; 1,0 e 5,0% o VPP foi de 10; 16,2 e 50% respectivamente. Na diluição 1:400, utilizando as mesmas prevalências o VPP foi fixado em 2,3; 11,8; 19 e 55% respectivamente.

A tabela 3 apresenta os resultados do VPP para o ELISA-Tcra e ELISA-Tso, utilizando as diluições 1:100 e 1:400 nas diferentes prevalências estudadas

Prevalência	VPP (%)			
	ELISA-Tcra		ELISA-Tso	
	1:100	1:400	1:100	1:400
0,1%	2,0	2,6	1,8	2,3
0,5%	13,2	13,5	10,0	11,8
1,0%	21,0	21,5	16,2	19,0
5,0%	58,0	59,3	50,0	55,0

Tab. 3: Distribuição dos resultados do VPP para os testes ELISA-Tcra e ELISA-Tso.

4.3.4. Valor Preditivo Negativo (VPN)

Refere-se à probabilidade de não-ocorrência de doença quando o resultado do teste é negativo. O critério para a determinação do VPN foi o mesmo utilizado no VPP no que se refere à utilização de diversas prevalências para representação da população geral.

Devido ao desempenho dos testes em relação à sensibilidade, ao demonstrarem 100% de incidência, o VPN seguiu essa tendência e fechou em 100% para todos os testes independente da prevalência utilizada.

4.3.5. Repetitividade

Após observação do desempenho do teste ELISA-18/14 nos parâmetros empregados, seguiu-se a este a avaliação da reprodutibilidade de forma intrateste (repetitividade). Foram utilizadas 2 amostras positivas e 2 amostras negativas ensaiadas em replicata de 30 vezes cada uma delas. Em relação aos resultados expressos em índices de reatividade, foram calculados a média e o desvio padrão, estabelecendo assim a variação da reprodutibilidade expressa em coeficiente de variação (CV).

O CV na replicata das duas amostras negativas foi fixado em 13,3 e 12,5%; nas amostras positivas, o resultado obtido para o CV foi de 18,5 e 16,8%.

5. DISCUSSÃO

A cisticercose, um grave problema de saúde pública no Brasil e que vem tomando rumos em escala mundial, encontra-se em uma situação de destaque no cenário endêmico das parasitoses. Parte deste problema deve-se ao difícil diagnóstico, devido à grande variedade de sinais e sintomas; parte, à falta de dados capazes de demonstrar a real situação da parasitose no país, considerada endêmica.

O objetivo deste trabalho foi contribuir no estudo da cisticercose através da avaliação do desempenho de um teste ELISA para elaboração de estratégias sorológicas na população geral, para tanto realizou-se a análise comparativa dos parâmetros apresentados nos diferentes extratos antigênicos, a saber: antígeno total de *T. solium* (T-Tso), líquido vesicular de *T. crassiceps* (LV-Tcra) e proteína 18/14 kDa de LV-Tcra (18/14-Tcra) utilizando-se o teste imunoenzimático (ELISA) para a pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *Taenia solium*, em amostras de soro humano.

Embora relevantes, poucos estudos soroepidemiológicos têm sido conduzidos para investigação da cisticercose humana, principalmente pela deficiência nos métodos diagnósticos aplicáveis na pesquisa de campo. As dificuldades observadas na análise comparativa dos resultados obtidos nestes estudos são basicamente decorrentes dos diversos antígenos e testes utilizados, indicando a necessidade de padronização metodológica para estudos de campo (BRAGAZZA, 2001). Uma alternativa encontrada para melhorar a qualidade dos testes imunológicos é a obtenção de antígenos específicos e imunodominantes, que favoreçam a redução de resultados falso-positivos e falso-negativos (ESPÍNDOLA, 2003).

Inquéritos sorológicos representam também uma forma de avaliação de técnicas imunológicas em larga escala, tendo em vista a facilidade de ensaiar grande número de

amostras séricas (BRAGAZZA, 2001).

A escolha de um extrato antigênico para utilização no teste ELISA e posterior aplicação de uma estratégia sorológica, que se destina ao estudo de população geral, passa por algumas prerrogativas; no que se refere à especificidade tem-se demonstrado cada vez mais a necessidade de melhores índices, a fim de evitar a utilização de testes confirmatórios, o que gera custo adicional. Tal fato foi observado por BUENO et al., 2000b, onde, no estudo de um grupo de população geral, principalmente em nosso país onde as parasitoses exibem grande prevalência e, portanto, ocorram reações cruzadas em testes como o ELISA (EARNEST et al., 1987), há a necessidade de posterior confirmação deste achado, com um teste mais específico como o imunoblot.

A obtenção de extratos antigênicos homólogos em quantidades adequadas para a utilização em estudo de larga escala, é dificultada pela obtenção de suínos naturalmente infectados com larvas de *T. solium*, assim como sua difícil manipulação. A forte fixação das vesículas ao tecido, em sua maioria muscular, favorece o rompimento das larvas no momento da extração, ocasionando perda do material, principalmente do líquido vesicular, que é rico de proteínas de baixo peso molecular, consideradas imunodominantes (KUNZ et al., 1989; BUENO et al., 2000). Essa difícil retirada da vesícula favorece também a contaminação do material com proteínas do tecido animal, gerando antígenos não muito adequados. Tais obstáculos estimulam a busca de fontes alternativas de parasitas (LARRALDE et al., 1990; VAZ et al., 1997a).

O emprego do extrato antigênico de líquido vesicular de *T. crassiceps* para verificação de anticorpos anti-cisticerco nos testes ELISA e imunoblot, em amostras de soro, em nosso meio, foi feito por VAZ et al., 1997a, e BUENO et al 2000a, com boa eficiência para uso diagnóstico. As vantagens da utilização do antígeno heterólogo são:

fácil obtenção do antígeno, garantia de homogeneidade nos lotes preparados, menor custo e boa reprodutibilidade. Embora heterólogo, o antígeno é rico em componentes do líquido vesicular, que incluem antígenos solúveis de excreção e secreção. Estes antígenos também se fazem presentes nos cisticercos da *T. solium*, mas em concentrações inferiores comparativamente aos presentes nos componentes de membrana e escólex, devido ao rompimento das vesículas durante o processo de remoção dos mesmos do suíno parasitado (BUENO et al., 2000b).

Recentemente ESPÍNDOLA et al., 2005, realizaram a purificação das proteínas de 18 e 14 kDa do líquido vesicular de *T. crassiceps* por cromatografia de imunoafinidade utilizando coluna de sefarose acoplada aos anticorpos monoclonal, constituindo o antígeno 18/14-Tcra. Este antígeno apresenta as mesmas vantagens do LV-Tcra em relação ao antígeno total de *T. solium*.

5.1. ELISA e/ou Immunoblot utilizando os antígenos 18/14-Tcra, LV-Tcra e T-Tso

A pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium* nas amostras de soro do grupo estudo revelou uma especificidade respectivamente de 100%, 96,2% e 94,8% no teste ELISA-18/14, ELISA-Tcra e ELISA-Tso utilizando a diluição 1:100 no ELISA-Tcra e Tso e 1:50 no ELISA18/14 nas amostras.

No ELISA-Tso observamos que 33 (5,4%) das 610 amostras do grupo estudo foram reativas e, portanto, ensaiadas posteriormente no IB-Tso, para confirmação dos resultados, após o término desses ensaios foi verificado que essas amostras não apresentaram reatividade com as frações consideradas específica (28 e 18 kDa)

segundo o nosso critério de positividade.

Essa inespecificidade observada no antígeno Tso é caracterizada pela expressão de proteínas de alto peso molecular (> 30 kDa), que foi demonstrada em 16 (48,5%) amostras das 33 ensaiadas no IB-Tso. Na diluição 1:200, ainda no ELISA-Tso, um número menor de amostras foi selecionado por critérios de positividade, 24 apenas, esse decréscimo se dá possivelmente pela diminuição de anticorpos heterófilos presentes nas amostras que reagem com frações inespecíficas do antígeno bruto. Na diluição 1:400, 27 amostras demonstraram positividade nos ensaios, nessa última diluição a especificidade foi de 95,7%, discretamente maior que na diluição 1:100.

A sensibilidade do teste que se refere à porcentagem de resultados positivos nas amostras de indivíduos sabidamente doentes (CP), foi de 100%, das 20 amostras ensaiadas todas apresentaram reatividade, sendo assim o valor preditivo negativo do teste também foi estipulado em 100%. Devido à variação da especificidade e utilização de diferentes prevalências, o valor preditivo positivo do teste para prevalências de 0,1 a 5% na diluição 1:100 variou entre 1,8 a 50%, na diluição 1:400 a variação ficou entre 2,3 a 55% apresentando melhor desempenho. Se considerarmos a prevalência da doença no Brasil, que provavelmente se encontra entre 0,1 a 1,0%, o VPP está baixo, variando entre 2,3 a 19% e, mesmo nos serviços de neurologia e neuropsiquiatria aonde a prevalência chega a 5,0% (VAZ et al., 1990), o VPP é de 55% ainda considerado baixo.

No ELISA-Tcra utilizando a diluição 1:100, 24 (3,9%) amostras das 610 ensaiadas do GE apresentaram reatividade, sendo, portanto selecionadas para o IB-Tcra. Das 24 amostras testadas no IB-Tcra, 21 (87,5%) não apresentaram reatividade, sendo que apenas 3 amostras apresentaram frações > 30 kDa. As frações imunodominantes consideradas como critério de reatividade foram as de peso molecular

18 e 14 kDa, essas frações se mostraram 100% específicas e também não foram observadas nas amostras de soro do grupo normal no estudo realizado por BUENO, 1999. A especificidade observada aqui (96,2%) está em concordância com os relatados por BRAGAZZA, 2001, que na pesquisa de anticorpos anticisticercos de *T. solium* nas amostras de soro de grupo controle revelou 96,4% de especificidade, utilizando as diluições 1:200 e 1:400 a especificidade apresentou um valor discretamente maior, 96,5 e 96,3% respectivamente. Apesar da elevada especificidade apresentada pelos testes ELISA-Tcra e ELISA-Tso, não fica descartada a possibilidade de confirmação dos resultados pelo teste imunoblot.

A sensibilidade do teste foi de 100% assim como o VPN, porém o mesmo desempenho não foi observado para o VPP que na prevalência de 0,1% ficou em 2%, aumentando o índice em 5% de prevalência o valor preditivo positivo foi de 58% para a diluição 1:100; na diluição 1:400, aonde a discriminação dos valores dos IR nas amostras foi melhor, utilizando prevalências de 0,1 a 5% a variação foi de 2,6 a 59,3%.

No ELISA-18/14 a especificidade e sensibilidade de 100% mostraram concordância com os resultados relatados por ESPÍNDOLA, 2005, usando 194 amostras de soro de indivíduos saudáveis e 20 amostras de pacientes com NC. O VPN e VPP foram também 100% para todas as prevalências utilizadas, e a repetitividade do teste expressa em coeficiente de variação esteve entre 16 a 18%. Em uma análise comparativa fica claro o melhor desempenho do teste ELISA-18/14 em relação aos demais testes ELISA-Tcra e ELISA-Tso, principalmente em relação à especificidade e ao VPP, o que reflete em um número menor de resultados falso-positivos. Os resultados da sensibilidade e especificidade do ELISA-18/14 ainda se mostraram melhores que o teste referência para o diagnóstico da cisticercose pelo CDC, o EIBT, que em estudo

utilizando LCR e soro na pesquisa de anticorpos anticisticercos de *Taenia solium* apresentou sensibilidade de 98% e especificidade de 100% (TSANG et al., 1989); na época as amostras consideradas positivas contavam apenas com critérios de radiografia para confirmação da positividade, conseqüentemente a avaliação de pacientes com lesões simples (um cisto) ou múltiplas lesões (dois ou mais cistos) não foram discriminadas. WILSON et al., (1991) demonstraram que em pacientes com múltiplas lesões a sensibilidade foi de 94%, porém naqueles pacientes com lesões simples apenas 5 (33%) de 15 amostras foram reativas no EIBT, até então uma análise comparativa entre o EIBT e o ELISA mostrava uma grande deficiência no teste ELISA pelo número de reações cruzadas para anticorpos não específicos, esse problema é descartado no ELISA18/14. TSANG et al., (1989) apresenta no EIBT um VPP de 100% e VPN de 99,9% em uma prevalência de 3%, sendo essa prevalência (3%) não expressa a real prevalência na população geral; no ELISA 18/14 o VPP e VPN de 100% foi estimado em uma prevalência de 0,1%, portanto em inquéritos epidemiológicos aplicado à população em larga escala, o ELISA-18/14 teria melhor probabilidade de expressar doença ou sanidade nos resultados positivos e negativos respectivamente. Apesar da elevada especificidade e sensibilidade do ELISA-18/14, esse teste não substitui a análise de LCR e os exames de neuroimagem no diagnóstico da neurocisticercose. Sendo assim visando a performance com posterior escolha de um teste ELISA que defina estratégias sorológicas em inquéritos na população geral; frente aos parâmetros analisados, os resultados apontam o ELISA-18/14 como um teste promissor para a pesquisa de anticorpos anti-cisticercos de *Taenia solium* na população geral de baixa prevalência, com a proposta de excluir cada vez mais a utilização de testes confirmatórios, para o diagnóstico da cisticercose.

6. CONCLUSÃO

1 - A avaliação feita sobre o teste ELISA utilizando diferentes extratos antigênicos, a saber: proteína 18/14 kDa, LV-Tcra e T-Tso, em amostras que provavelmente representem a população geral, deixou claro o melhor desempenho diagnóstico do teste ELISA utilizando o antígeno proteína 18/14 kDa.

2 - O ELISA 18/14 apresentou valor 100% em relação à sensibilidade, especificidade, VPP e VPN, reduzindo a utilização de testes confirmatórios e com eles o custo sobressalente, o que aumenta a inclusão da população de baixa renda, a maior detentora da parasitose.

3 - A melhor estratégia sorológica para pesquisa de anticorpos anticisticercos e *T. solium* na população geral com provável baixa prevalência parece ser a utilização do ELISA-18/14, devido ao seu alto VPP, sem excluir a possível análise do LCR e exames de neuroimagem.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, R. **Dosagem de antígenos de cisticercos e sua relação com a atividade clínica da doença.** São Paulo 2003, (Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

AGAPEJEV, S. Epidemiology of neurocysticercosis in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.38, n.3, p.207-216, 1996.

ANDRADE, A. P.; VAZ, A. J.; NAKAMURA, P. M.; PALOU, V. S. E. B.; CUNHA, R. A. F.; FERREIRA, A. W. Immunoperoxidase for the detection of antibodies in cerebrospinal fluid in neurocysticercose: use of *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus longicollis* particles fixed on microscopy slides. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**., São Paulo, v.38, n.4, p.259-263, 1996.

ARAMBULO, P. V.; WALLS, K. W.; BULLOCK, S.; KAGAN, I. G. Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immunospecific assay (ELISA). **Acta. Trop.**, Shannon, v.35, p.63-67, 1978.

BASSI, G. E.; CAMARGO, M. E.; BITTENCOURT, J. M. T.; GUARNIERI, D. B. Reação de imunofluorescência com antígenos de *Cysticercus cellulosae* no líquido cefalorraqueano. **Neurologia**, Recife, v.42, p.165-170, 1979.

BIAGI, F. F.; PIÑA, A. P. Presence of antigens in calcareous corpuscles of cysticercus. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.6, n.3, p.114-116, 1964.

BONAMETTI, A. M.; BASILE, M. A.; VAZ, A. L.; BALDY, J. L. S.; TAKIGUTI, C. K. Índice de positividade da reação imunoenzimática (ELISA) para cisticercose no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no soro de pacientes com eplépsia. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**., São Paulo, v.34, n.5, p.451-458, 1992.

BRAGAZZA, L. M. **Contribuição ao estudo da cisticercose: testes imunológicos para detecção de anticorpos séricos.** 2001. 118f. Tese (Doutorado em análises Clínicas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

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*.** São Paulo, 1999 (dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da 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 simples. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.38, n.1, p.146-151, 2000.

CAMACHO, S. D.; RUIZ, A. C.; BELTRÁN, M. U.; WILLMS, K. Serology as indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in Mexico. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v.84, p.563-566, 1990.

CANTÚ, C.; BARINAGARREMENTERIA, F. Cerebrovascular complication of neurocysticercosis. Clinical and neuroimaging spectrum. **Arch neurol.** v.53, n.3, p.233-239. 1996.

COKER-VANN, M. R.; SUBIANTO, D. B.; BROWN, P.; DIWAN, A. R.; DESOWITZ, R.; GARRUTO, R. M.; GIBBS Jr, C. J.; GAJDUSEK, D. C. ELISA antibodies to cysticerci of *Taenia solium* in human populations in New Guinea, Oceania, and Southeast Asia. **Southeast Asian j. Trop. Med. Public Health**, Bangkok, v.12, n.4, p.499-505, 1981.

COLLI, B. O.; MARTELLI, N.; ASSIRATI JR.; J. A.; MACHADO, H. Del BRUTTO, O. H. D.; SOTELO, J.; ROMAN, G. C. Therapy for neurocysticercosis: a reappraisal. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.17, p.730-735, 1993.

Del BRUTO, O.H.; RAJSHEKHAR, V.; WHITE, Jr A.C, et al. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology* 2001; 57: 177-183.

EARNEST, M. P.; RELLER, L. B.; FILLEY, C. M.; GREK, A. J. Neurocysticercosis in the United States: 35 cases and a review. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v.9, n.5, p.961-979, 1987.

ESCOBEDO, F.; GONZÁLEZ-MARISCAL, G., REVUELTA, R.; RUBEN, M. Surgical treatment of cerebral cisticercosis. In: FLISSER, A.; WILLMS, K.; LACLETE, J. P.; LARRALDE, C.; RIDAURA, C.; BELTRÁN, F. **Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives**. New York: Academic Press Inc.; 1982, p.201-205.

ESPÍNDOLA, N. M. **Caracterização de antígenos de cisticercos e sua aplicação para o diagnóstico da cisticercose humana**. 2003 95f. Tese (Doutorado em análises Clínicas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

ESPÍNDOLA, N. M.; De GASPARI, E. N.; NAKAMURA, P. M.; VAZ, A. J. Cross-reactivity of anti-*Taenia crassiceps* cysticerci immune antibodies with *Taenia solium* antigens. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.89, p.321-326, 2000.

ESPÍNDOLA, N. M.; IHA, A. H.; FERNANDES, I.; TAKAYANAGUI, O. M.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J. A.; MAIA, A. A. M.; PERALTA, J. M.; VAZ, A. J. Cysticercosis immunodiagnosis using 18- and 14-kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticerci antigens obtained by immunoaffinity chromatography. **J. Clin. Microbiol.**, United states, v.43, n.7, p.3178-3184, 2005.

ESPÍNDOLA, N. M.; VAZ, A.J.; PARDINI, A.; FERNANDEZ, I. Excretory/secretory antigens (ES) from in-vitro cultures of *Taenia crassiceps* cysticercis, and use of an anti-

ES monoclonal antibody for antigen detection in samples of cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, England, v.96, n.4, p.361-368, 2002.

FERREIRA, A. W.; VAZ, A. J.; NAKAMURA, P. M.; SASAKI, A. T.; FERREIRA, A. W.; LIVRAMENTO, J. A. Hemagglutination test for the diagnosis of human neurocysticercosis: development of a stable reagent using homologous and heterologous antigens. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.39, n.1, p.29-33, 1997.

FLISSER, A.; MADRAZO, I.; DELGADO, H. **cisticercosis humana**. México: El Manual Moderno, 1997. p.29-32.

FLISSER, A.; PÉREZ-MONTFORT, R.; LARRALDE, C. The immunology of human animal cisticercosis: a review. **Bull. WHO**, v.57, n.5, p.839-856, 1979.

FLISSER, A.; SARTI, E.; LIGHTOWLERS, M.; SCHANTZ, P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. **Acta Trop.**, Amsterdam, v.87, n.1, p.43-51, jun. 2003.

FREEMAN, R. S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. **Can. J. Zoo.**, 40: 969-990, 1962.

FRITZSCHE, M.; GOTTSTEIN, B.; WIGGLESWORTH, M. C.; ECKERT, J. Serological survey of human cysticercosis in Irianese refugee camps in Papua, New Guinea. **Acta Trop.**, Amsterdam, v.47, p.69-77, 1990.

GARCIA, E.; ORDONEZ, G.; SOTELO, J. Antigens from *Taenia crassiceps* used in complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay, and western blot (immunoblot) for diagnosis of neurocysticercosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, n.12, p.3324-3325, 1995.

GARCIA, H. H.; PARKHOUSE, R. M. E.; GILMAN, R. H.; VERASTEGUI, M.; GONZALEZ, A. E.; TSANG, V. C. W. Serological evolution of neurocysticercosis patients after antiparasitic therapy. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.175, p.486-489, 1997.

GARCIA-ROSALES, J. J.; QUIROZ, M. G.; CHACÓN, R. A. Utilidad de los métodos: Elisa, hemaglutinación indirecta y fijación del complemento en el diagnóstico de la cisticercosis en niños. **Rev. Latinoamer. Microbiol.**, México, v.32, p.197-207, 1990.

GROLL, E. W. Chemotherapy of human cysticercosis with praziquantel. In: FLISSER, A.; WILLMS, K.; LACLETTE, J. P.; LARRALDE, C.; RIDAURA, C.; BELTRÁN, F. **Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives**. New York: Academic Press Inc., 1982, p.207-218.

KUNZ, J.; CALINA, B.; WATSCHKE, V.; GEYER, E. *Taenia crassiceps* metacestode vesicular fluid antigens shared with the *Taenia solium* larval stage and reactive with serum antibodies from patients with neurocysticercosis. **Zentralbl. Bakteriol.**,

Loebdergraben, v.271, p.510-520, 1989.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, n.5259, p. 680-685, 1970.

LANGE, O. Síndrome líquórica da cisticercose encéfalo-meníngea. **Ver. Neurol. Psiquiat.** São Paulo, v.6, n.2, p.35-48, 1940.

LARRALDE, C.; LACLETTE, J. P.; OWEN, C. S.; MADRAZO, I.; SANDOVAL, M.; BOJALIL, R.; SCIUTTO, E.; CONTRERAS, L.; ARZATE, J.; DIAZ, M. L.; GOVEZENSKY, T.; MONTOYA, R. M.; GOODSID, F. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination test. **Am. J. Trop. Me. Hyg.**, Northbrook, v.35, n.5 p.965-973, 1986.

LARRALDE, C.; SOTELO, J.; MONTOYA, R. M.; PALENCIA, G.; PADILLA, A.; GOVEZENSKY, T.; DIAZ, M. L.; SCIUTTO, E. Immunodiagnosis of human cisticercosis in cerebrospinal fluid. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v.114, p.926-928, 1990.

LIVRAMENTO, J. A. Contribuição de reações de imunofluorescência no líquido cefalorraqueano ao estudo da neurocisticercose. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, São Paulo, v.39, n.3, p.261-278, 1981.

LIVRAMENTO, J. A. Síndrome do líquido cefalorraqueano na neurocisticercose: estudo crítico sobre a evolução da imunidade humoral. **Arq. Neuro-psiquiatr.**, São Paulo, v.45, n.3, p.261-275, 1987.

LIVRAMENTO, J. A.; MACHADO, L. R.; SPINA-FRANÇA, A. immunobiology of neurocysticercosis. In: FERJEMAN, N.; CHAMOLE, N. A.; eds. **New trends in pediatric neurology**. Amsterdam: Elsevier Science, 1993, p.307-312.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.

MACHADO, A. B. B.; PIALARISSI, C. S. M.; VAZ, A. J. Cisticercose humana diagnosticada em hospital geral, São Paulo, SP (Brasil). **Ver. Saúde Publ.**, São Paulo, v.22, n.3, p.240-244, 1988.

MACHADO, A. J.; CAMARGO, M. E.; HOSHIMO, S. Reação de imunofluorescência para a cisticercose com partículas de *Cysticercus cellulosae* fixadas a lâminas de microscopia. **Ver. Soc. Brás. Med. Trop.** Brasília, v.7, n.3, p.181-183, 1973.

MACHADO, L. R. Quando e porque ocorre quebra da BHE em neuroinfecção. In: Neuroinfecção. MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A.; SPINA-FRANÇA, A.; NÓBREGA, J. P. S. editores **Clínica Neurológica HC/FCM USP**, São Paulo, p.40-46, 1994.

MACHADO, L. R.; NOBREGA, J.P.S.; BARROS, N. G.; LIVRAMNETO, J. A.;

BACHESCHI, L. A.; SPINA-FRANÇA, A. Computed topography in neurocysticercosis. A 10 years long evolution analysis of 100 patients with an appraisal of a new classification. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 48, n.4, p.414-418, 1990.

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

McMANUS, D. P. Molecular technology: improving strategies for controlling hydatid disease and cysticercosis. **Southeast Asian j. Trop. Med. Public Health**, Bangkok, v.21, n.2, p.161-173, 1990.

MORAKOTE, W.; NAWACHAROEN, W.; SUKONTHASUN, K.; THAMMASONTHI, W.; KHAMBOONRUANG, C. Comparasion of cysticercus extract, cyst fluid and *Taenia saginata* extract for use in ELISA for serodiagnosis of neurocysticercosis. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.**, Bangkok, v.23, n.1, p.77-81, 1992.

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

PAMMENTER, M. D.; ROSSOW, S. R.; EPSTEIN, S. R. Diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linker immunosorbent assay. **S. Afr. Med. J.**, Cape Town, v.71, p.512-514, 1987b.

PROCTOR, E. M.; POWELL, S. J.; ELSDON-DEW, R. The serological diagnosis of cysticecosis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Basingstoke, v.60, n.2, p.146-151, 1966.
R.; SALVARANI, C. P.; SASSOLI, V. P.; FORJAZ, S. V. Cysticercosis of the central nervous system. I. Surgical treatment of cerebral cysticercosis. A 23 years experience in the Hospital das Clínicas of Ribeirão Preto Medical School. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v.52, n.2, p.166-186, 1994.

RAMOS-KURI, M.; MONTOYA, R. M.; PADILLA, A. GOVEZENSKY, T.; DÍAS, M. L., SCIUTTO, E.; SOTELO, J.; LARRALDE, C. Immunodiagnosis of neurocysticercosis. Disappointing performance of serology (enzyme-linked immunosorbent assay) in an unbiased sample of neurological patients. **Arch. Neurol.**, Chicago, v.49, p.633-636, 1992.

SARTI, E. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*, 1999. Disponível em: www.insp.mx/salud/39/393.9.html.

SARTI, E.; RAJSHEKHAR, V. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. **Acta. Trop.** V.87, n.1, p.137-143. 2003.

SARTI-GUTIERREZ, E. J.; SCHANTZ, P. M.; AGUILERA, R. L.; FLISSER, A.; DANDOY, H. G. *Taenia solium* taeniasis and cisticercosis in a Mexican village. **Trop. Med. Paasitol.**, Oxford, v.39, p.194-198, 1988.

SCHANTZ, P. M.; CRUZ, M.; SARTI, E.; PAWLOWSKI, Z. Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. **Bull. Pan. Am. Health Organ.**; Washington, v.27, n.4, p.397-402, 1993.

SCHANTZ, P. M.; TSANG, V. C. The US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and research and control of cysticercosis. **Rev. Acta. Trop.** v.87, n.1, p.161-163. 2003.

SCHENONE, H.; VILLARROEL, F.; ROJAS, A.; RAMÍREZ, R. Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. In: FLISSER, A.; WILLMS, K.; LACLETTE, J. P.; LARRALDE, C.; RIDAURA, C.; BELTRÁN, F. **Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives.** New York: Academic Press Inc., 1982, p.25-38.

SCHORTH, G.; KRETZSCHIMAR, K.; GAWEHN, J.; VOIGT, K. Advantage of magnetic resonance imaging in the diagnosis of cerebral infections. **Neuroradiology**, Berlin, v.29, p.120, 1987.

SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G.; FLEURY, A.; LACLETTE, J. P.; SOTELO, J.; ALUJA, A.; VARGAS, L.; LARRALDE, C. *T. solium* disease in human and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. **Rev. microbes infect.** v.2, n.15, p.1875-1890. 2000.

SOTELO, J.; GUERREIRO, V.; RUBIO, F. Neurocysticercosis/ a new classification base don active and inactive forms. **Arch. Intern. Med.**, Chigago, v.145, p.442-445, 1985.

SPINA-FRANÇA, A. Cisticercose do sistema nervoso central. Considerações sobre 50 casos. **Ver. Paul. Med.**, São Paulo, v.48, p.59-70, 1956.

SPINA-FRANÇA, A. Patogenia das infecções do sistema nervoso central e líquido cefalorraquidiano: análise crítica da contribuição diagnóstica. **Rev. Paul. Med.**, São Paulo, v.107, n.3, p.169-174, 1989.

SPINA-FRANÇA, A.; LIVRAMENTO, J. A.; MACHADO, L. R. Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid. Immunodiagnosis of 1573 patients in 63 years (1929-1992). **Arq Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v.51, n.1, p.16-20, 1993.

SPINA-FRANÇA, A.; LIVRAMENTO, J.A.; BACHESCHI, L.A.; GARCIA-LOPES, P. Cerebrospinal fluid immunoglobulins in cysticercosis of the central nervous system. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v.34, n.1, p.40-45, 1976.

TAKAYANAGUI, O. M.; JARDIM, E. Aspectos clínicos da neurocisticercose. Análise de 500 casos. **Arq. Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.41, n.1, p.50-63, 1983.

TAKAYANAGUI, O. M.; JARDIM, E. Theraphy for neurocysticercosis. Comparison between albendazol and praziquantel. **Arch. Neurol.**, Chicago, v.49, p.290-294, 1992.

TOWBIN, H.; GORDON, J. Immunoblotting and dot immunoblotting – current status and Outlook. **J. Immunol. Methods.**, Amsterdam, v.72, p.313-340, 1984.

TSANG, V. C. W.; BRAND, J. A.; BOYER, A. E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). **The journal of infectious diseases.** V.159,n1 1989.

VALDEZ, F.; HERNANDEZ, M.; GOVEZENSKY, T.; FRAGOSO, G.; SCIUTTO, E. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. **J. parasitol.** V.80, n.6, p.931-936. 1994.

VAZ, A. J. & LIVRAMENTO, J. A. Neurocisticercose. In: FERREIRA, A. W. & AVILA, S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes.** Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001, cap.31, p.316-322.

VAZ, A. J. Cisticercose humana. **LAES**, São Paulo, v.65, p.42-53, 1999. [Artigo de Revisão].

VAZ, A. J.; HANASHIRO; FERREIRA, A. W. A. S. J.; CHIEFFI, P. P.; FERREIRA, A. W. Frequência de indivíduos com anticorpos anti-*cysticercus cellulosae* em cinco municípios do Estado de São Paulo. **Ver. Soc. Brás. Med. Trop.**, Brasília, v.23, p.97-99, 1990.

VAZ, A. J.; LIVRAMENTO, J. A. Neurocisticercose. In: FERREIRA, A. W.; AVILA, S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes.** 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*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.57, n.3, p.354-357, 1997b.

VIANNA, L.; MACÊDO, V.; COSTA, J. M.; MELLO, P.; SOUZA, D. Estudo soropidemiológico da cisticercose humana em Brasília, Distrito Federal. **Ver. Soc. Brás. Méd. Trop.**, Brasília, v.19 n.3, p.149-156, 1986.

WILSON, M.; BRYAN, R. T.; FRIED, J. A.; WARE, D. A.; SCHANTZ, P. M.; PILCHER, J. B.; TSANG, V. C. W. Clinical evaluation of the cysticercose enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. **The journal of infectious diseases.** V.164, 1991.

Anexo I. Aval do comitê de ética em pesquisa humana

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas *Comitê de
Ética em Pesquisa -CEP*

Ofício CEP nº 52

São Paulo, 27 de maio de 2003.

Ilmo(a). Sr(a) Adelaide
José Vaz

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 26 de maio passado, **APROVOU** o projeto intitulado "Cisticercose: Imunodiagnóstico, Antígenos, Resposta Imunológica e Aspectos CJínico- Epidemiológicos", apresentado por V .Sa.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 -item C, da Portaria FCF-III/97

Atenciosamente,

Prof. Dr. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

OfCEEA nº 12

CERT[F]CADO

*Certificamos que o Projeto { .Cisticercose : **Imunodiagnóstico, antígenos, resposta imunológica e aspectos clínico-epidemiológicos**” (Protocolo nº13), sob a responsabilidade da Sra.. Adelaide José Vaz, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 02/06/2003.*

São Paulo, 03 de junho de 2003.

LJ..;

11/07/2003

Bacchi

*Assoc. E(friede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA*